

Az információs entrópia felhasználása polipeptidek konformációs sokaságainak és belső dinamikájának jellemzésére

Ph.D. disszertáció tézisei

Gyimesi Gergely

Témavezetők:

Dr. Závodszy Péter
Dr. Szilágyi András

Külső konzulens:

Dr. Hegedűs Tamás

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai Kar

Budapest, 2011.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Molekuláris sokaságok konformációs entrópiájának becslése.....	5
2.1. A kitűzött kutatási feladat és hátttere	5
2.2. Új tudományos eredmények.....	8
3. ABC transzporterek alloszterikus mechanizmusa.....	13
3.1. A kitűzött kutatási feladat és hátttere	13
3.2. Új tudományos eredmények.....	16
4. Az eredmények hasznosítási lehetőségei, alkalmazhatóságuk.....	18
5. Publikációk jegyzéke.....	20
6. Irodalomjegyzék.....	21

1. Bevezetés

A statisztikus fizikában és az információelméletben bevezetett entrópiafogalom között szoros matematikai analógia áll fenn. Ez a kapcsolat lehetőséget teremt egyrészt a fizikai entrópia információs technológiai módszerekkel történő becslésére, másrészt az egyes fizikai állapotok információtartalmának értelmezésére. Az entrópia a fizikában a szabadenergia mennyiségén keresztül meghatározza az egyes egyensúlyi állapotok stabilitását, és a spontán bekövetkező folyamatok irányát. A szabadenergiát becslő módszerek között kitüntetett szerep jut azoknak a számítási módszereknek, amelyek molekuláris rendszerek egyensúlyi abszolút konformációs entrópiájának kiszámítására alkalmasak. Munkám első felében egy ilyen, általam fejlesztett új módszert mutatok be. Az egyensúlyi entrópia elméleti kifejezése ugyanakkor felbontható a molekuláris rendszert felépítő elemi részek (oszcillátorok) önálló, független entrópiájának az összegére, és a közöttük levő két- és többtest-kölcsönhatásokból származó kölcsönös információ tagokra. A kölcsönös információ kiszámítása önmagában tehát információt szolgáltat a rendszeren belüli kölcsönhatásokról, és az ebből eredő különböző korrelációs jelenségekről. A korrelált mozgások különösen fontos szerepet játszanak a fehérjék, mint molekuláris rendszerek működésének kialakításában. Ennek eklatáns példája az allostéria jelensége, amelyben a korrelációs hatások révén a fehérje távol eső régiói, kötőhelyei lépnek kölcsönhatásba egymással, befolyásolják egymás működését. Az allostéria jelensége különösen érdekes módon jelenik meg az ABC (ATP-Binding Cassette, ATP-kötő kazetta) transzporter fehérjékben, ahol az ATP-hasítás és a szubsztráttranszport összekapcsolásáért felelős. A dolgozat második fele ennek a folyamatnak a megismerésével foglalkozik. Az allostérikus folyamatok megismerésével új lehetőségek nyílhatnak az ABC transzporter fehérjékkel kapcsolatos betegségek elleni racionális gyógyszertervezés irányában.

2. Molekuláris sokaságok konformációs entrópiájának becslése

2.1. A kitűzött kutatási feladat és háttere

A molekuláris biológiában előforduló rendszerek egyensúlyi tulajdonságait a szabadenergia (szabadentalpia) mennyisége határozza meg. Az eddigi elméleti tanulmányok jelentős része foglalkozott két egyensúlyi állapot közötti szabadenergia-különbség

kiszámításával. A két állapot közötti útvonalon integrálással számoló módszerek, mint a termodinamikai integrálás (TI, [1]), a szabadenergia-perturbáció (FEP, [1, 2]) és a hisztogramanalízis módszerek [3] esetén a reakciókoordináta megfelelő felvétele és a két állapot közötti nagyobb szerkezeti különbségek is akadályozhatják a számításokat [4]. Alternatívát jelenthetnek azok a módszerek, amelyek a két állapot abszolút szabadenergiáját becsülik. Ebben az esetben viszont kulcsfontosságú egy olyan hatékonyan működő módszer kidolgozása, amely alkalmas a két egyensúlyi állapotban a rendszer konformációs entrópiájának megbecslésére.

Az rendszer egyensúlyi állapotaiban előforduló molekuláris konformációkat rendszerint valamilyen hatékony mintavételezési módszerrel, pl. molekuláris dinamikai (MD) szimulációval vagy Metropolis-féle Monte Carlo (MC) mintavételezéssel állítják elő. Az így keletkező molekuláris sokaságok entrópiájának becslésére többféle módszer is létezik, amelyek rendszerint a rendszer fázistérbeli sűrűségfüggvényére adnak egy közelítést, majd annak információs entrópiáját számolják. A konformációs entrópia kiszámítására vonatkozó egyik legkorábbi módszer a kváziharmonikus közelítés, amely a konfigurációs térbeli sűrűséget többváltozós Gauss-eloszlásként közelíti [5]. A módszer legvonzóbb tulajdonsága, hogy az eloszlás paraméterei az adatokból egyszerűen származtathatók, és a kapott eloszlás információs entrópiája analitikusan kiszámítható. A Gauss-eloszlás tengelyei olyan vibrációs módusokat határoznak meg, amelyeket a kváziharmonikus közelítés már egymástól független oszcillátoroknak tekint.

Az eredeti kváziharmonikus módszer a molekuláris konformációk leírására az ún. BAT („bond-angle-torsion”) koordinátarendszert használta, amely az atomok pozícióját a kötéshosszak, kötésszögek és torziós szögek segítségével adja meg. Ezeknek az ún. belső koordinátáknak a használata azért előnyös, mert a különböző vibrációs módusok könnyen szétválaszthatók, és elkülöníthetők a különböző konformációk létrehozásáért felelős lényeges koordináták. A gyakorlatban azonban egy nemredundáns belső koordinátakészlet megadása nem triviális feladat, és nehézséget okozhat a periodikus koordináták kezelése is. A kváziharmonikus módszer Schlitter által Descartes-koordinátákra adaptált változatában lehetőség nyílt a kinetikus szabadsági fokokból származó entrópia figyelembevételére, és a molekuláris rezgések kvantummechanikai figyelembevételére is [6].

A kváziharmonikus feltételezés hátterében az a közelítés áll, hogy a rendszer egyetlen, minimális energiájú állapot körül harmonikus fluktuációkat végez. A molekuláris biológiai rendszerek azonban tipikusan bonyolult, rendkívül tagolt energiafelszínnel rendelkeznek, a releváns hőmérsékleteken több, alacsony energiagáttal elválasztott, lokálisan minimális

energiájú konformációt is meglátogatnak. Komoly hibát jelent emellett a kváziharmonikus módusok függetlenségének tekintése, vagyis a szabadsági fokok között levő másod- és magasabb rendű korrelációk elhanyagolása [5, 7]. E problémák kezelésére többféle megoldás és módszer született.

Az anharmonicitás figyelembevételére különböző, a minták háttérében álló folytonos eloszlás pontosabb becslésére alkalmas módszereket alkalmaztak, pl. Fourier-sorok segítségével történő paraméteres becslés [8], vagy anizotróp magfüggvényekkel történő nem-paraméteres becslés [9]. A Numata és munkatársai által kidolgozott entrópiabecslő módszer a sűrűségfüggvény adatpontok helyén felvett értékeit becsli a k -legközelebbi szomszéd sűrűségbecslő módszerrel [10], amelynek előnye, hogy nem tesz *a priori* feltételezést a sűrűségfüggvény alakjára. Az említett módszerek hátránya azonban, hogy a konvergenciához igen nagy számú ($\sim 10^6$) mintára van szükség.

Más megközelítést használ a Wang és Brüscheiler által kidolgozott 2D entrópia módszere, amely Gauss-magfüggvényekkel végez sűrűségbecslést a kváziharmonikus komponensek mentén, amelyek entrópiáját aztán numerikus integrálással számítja ki [11]. A 2D entrópia módszer szintén figyelembe veszi az anharmonicitásból adódó jelenségeket, azonban paraméterként tartalmazza a Gauss-magfüggvény szélességét, amelynek értéke nem átvihető különböző rendszerek között [11, 12], és erősen befolyásolja a számított entrópia értékét.

A koordináták közötti magasabb rendű korrelációk figyelembe vehetőek a kölcsönös információn alapuló kifejtéssel (MIE), amely a rendszer entrópiáját az

$$S(q_1, \dots, q_N) = \sum_{i=1}^N S_1(q_i) - \sum_{i<j} I_2(q_i, q_j) + \sum_{i<j<k} I_3(q_i, q_j, q_k) - \dots$$

alakban írja fel [13]. Itt S_1 az egyváltozós, marginális entrópiákat jelöli, az I_k kölcsönös információ tagokról pedig megmutatható, hogy a koordináták közötti k . rendű korreláció mértékét jellemzik [14-16]. A k . rendű kölcsönös információ kiszámítható a k . és alacsonyabb rendű entrópiák alapján, pl. $k = 2$ esetén

$$I_2(q_1, q_2) = S_1(q_1) + S_1(q_2) - S_2(q_1, q_2)$$

A kölcsönös információ kifejtést több entrópiabecslő módszer is alkalmazza [10, 13, 17]. Az általunk is vizsgált Numata-módszer a másodrendű ($k = 2$) kölcsönös információ tagokat használja fel az entrópiabecslés javítására.

A doktori munkám célja egy új, Gauss-keverék függvényeken alapuló módszer kidolgozása és tesztelése molekulák konformációs entrópiájának becslésére. A teszteléshez

öt, kisméretű peptidekből álló rendszert hoztam létre, amelyek entrópiája numerikusan kiszámítható *ab initio* módszerrel, és összehasonlítható a Gauss-keverék, és más, az irodalomban leírt eljárások által adott értékekkel.

A megvalósításhoz Octave, Python és Perl nyelveken írt szkripteket hoztam létre. A molekuláris tesztrendszerek koordinátáit a SYBYL 7.1 program segítségével készítettem el. A konformációk energiájának kiszámítására a GROMACS programcsomagot használtam és a GROMOS96 egyesített-atom (united atom) force-fieldet [18]. Az irodalomban leírt módszereket szintén Octave szkriptek formájában valósítottam meg, míg a Numata és munkatársai által közölt módszerhez a programot a szerző bocsátotta rendelkezésemre.

2.2. Új tudományos eredmények

1. Gauss-keverék függvényeken alapuló entrópiabecslő módszer létrehozása.

A Gauss-keverék függvényeken alapuló, konformációs entrópia becslésére használatos módszer létrehozását az motiválta, hogy létezzen egy olyan koncepcionálisan egyszerű, áttekinthető módszer, amely a nagyobb, sok szabadsági fokkal rendelkező molekulák komplex energiefelszíneiből származó komplikációkat is képes kezelni. A Gauss-keverék függvények különálló, többváltozós Gauss-függvények súlyozott összegei,

$$f(x; \theta) = \sum_{k=1}^K p_k g(x; m_k, \sigma_k)$$

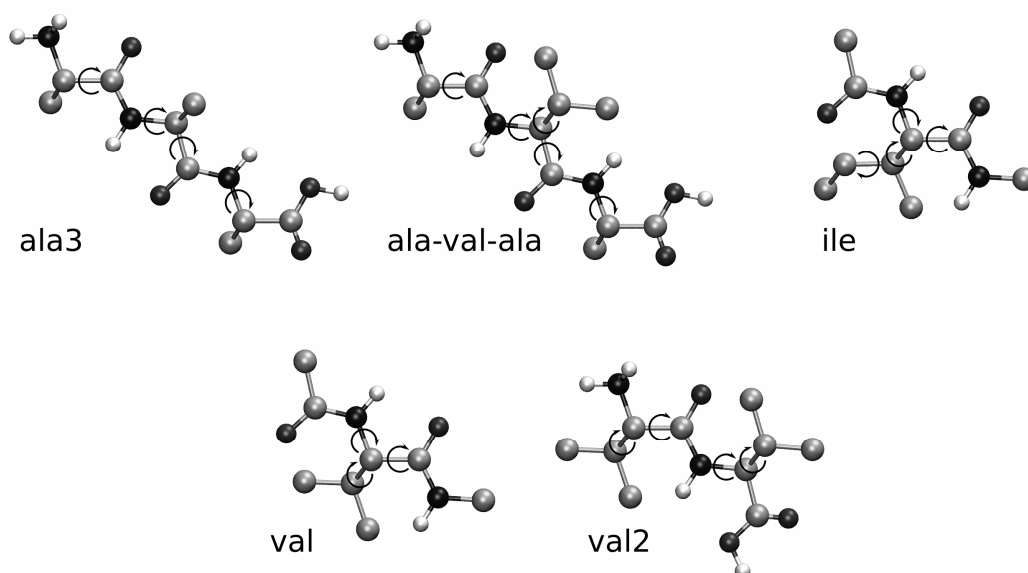
ahol $g(x; m_k, \sigma_k)$ az m_k középpont körüli, σ_k kovarianciamátrixszal jellemzett Gauss-függvény, θ az m_k, σ_k paraméterek összessége, K pedig a Gauss-komponensek száma. A Gauss-keverék függvények segítségével bármilyen sima függvény tetszőleges pontossággal közelíthető [19]. A módszer első lépésként a vizsgált konformációs sokaságra egy normalizált Gauss-keverék függvényt illeszt a legnagyobb valószínűség módszerével (maximum likelihood estimation, MLE), majd megbecsli az így kapott folytonos eloszlás információs entrópiáját. A likelihood maximalizálására az expectation maximization (EM) módszert alkalmaztam. A kapott Gauss-keverék függvények entrópiáját a Huber és munkatársai által leírt módszerrel számoltam ki [20]. A Huber-féle módszer az egyes Gauss-komponensek középpontjának környékén a többi komponens járulékát egy másodrendű Taylor-sorfejtéssel közelíti, így a közelített érték analitikusan kiszámítható.

2. A Gauss-keverék alapú módszer alkalmas molekuláris rendszerek konformációs entrópiájának pontos megbecslésére.

Molekuláris rendszerek konformációs entrópiájának megbecslésekor a nehézségeket rendszerint az energiefelszín tagoltsága, és az egyes lokálisan minimális energiájú állapotok körüli fluktuációk anharmonicitása okozza. A Gauss-keverék módszert ezért kisméretű peptidrendszereken teszteltem. A molekulák választásakor szempont volt, hogy bemutassam a fehérjékre való alkalmazhatóság lehetőségét, és hogy a kiválasztott peptidek oldalláncai többféle rotamer állapottal is rendelkezzenek.

Az módszer jellemzésére a kapott eredményeket összehasonlítottam először egy *ab initio* módszerrel kiszámított referenciaértékkel (a továbbiakban „egzakt” érték), majd más, már létező módszerekkel kapott eredményekkel is. Az irodalomban megtalálható négy másik, az entrópia becslésére kifejlesztett módszert valósítottam meg: az eredeti Karplus és Kushick-féle kváziharmonikus módszert [5], a Schlitter-féle kovarianciamátrix-alapú módszert [6], a Wang és Brüschweiler-féle 2D entrópia módszerét [11], és Numata és munkatársai módszerét (amelyhez a szoftvert Jorge Numata bocsátotta rendelkezésünkre) [10].

A vizsgálathoz öt különböző molekuláris rendszert hoztam létre, amelyek az Ala₃, Ala-Val-Ala, Ace-Ile-Nme, Ace-Val-Nme, Val₂ peptidek voltak, és 4, 5, 4, 3 és 4 elforgatható kötéssel rendelkeznek (1. ábra).

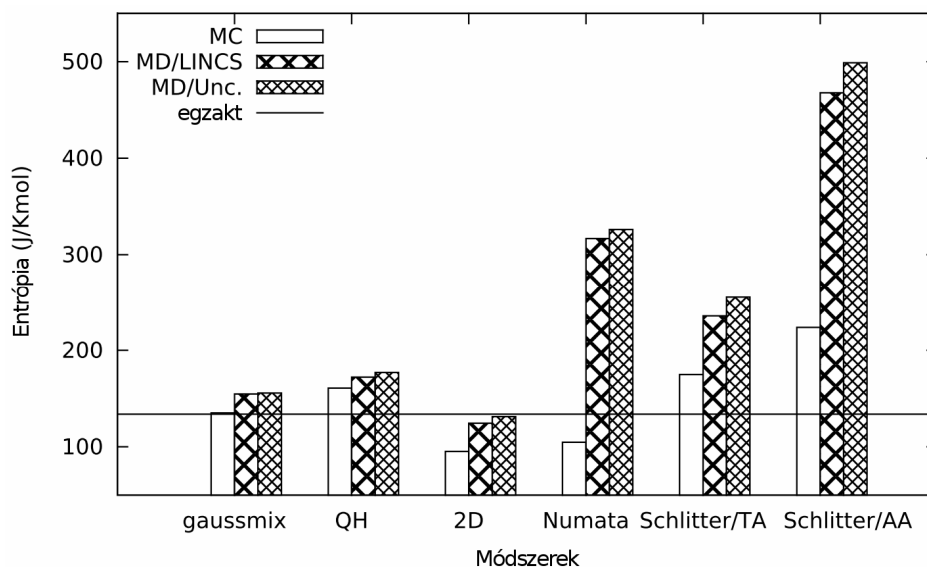


1. ábra. A számításokhoz kiválasztott kisméretű peptidek és peptidszármazékok. A kiválasztott molekulák az Ala₃ („ala3”), Ala-Val-Ala („ala-val-ala”), Ace-Ile-Nme („ile”), Ace-Val-Nme („val”) és Val₂ („val2”). A peptidek végei minden esetben semlegesek. Az egyesített szénatomokat szürke, az oxigén és nitrogénatomokat fekete, a hidrogéneket fehér szín jelöli. A szabadsági fokokat jelentő elforgatható torziós szögeket nyilak jelzik.

A tesztrendszerek generálásának első lépése minden molekulára az ún. teljes konformerhalmaz létrehozása volt, amelyet a belső koordináták (elforgatható torziós szögek) terének teljes, uniform mintavételezésével kaptam. A teljes konformerhalmaz lehetőséget adott a rendszerek egzakt entrópiájának *ab initio* kiszámítására a statisztikus fizikai definíció szerint, a teljes konfigurációs tér feletti numerikus integrálással. A módszerek bemeneti adataiként szerepelt egyrészt a teljes konformerhalmaz Monte Carlo (MC) mintavételezésével, másrészt kétféle, molekuláris dinamikai (MD) szimuláció segítségével előállított kanonikus konformersokaság. A konstrukció módja miatt az MC sokaságból számított entrópiaértékek közvetlenül összehasonlíthatóak az egzakt értékkel. Az MD adathalmaz létrehozását az motiválta, hogy a gyakorlatban a molekuláris dinamikai mintavételezés elterjedt, ahol rendszerint flexibilisen kezelik a kötésszögeket, és gyakran a kötэшosszakat is. A módszerek tesztelésére ezért két MD sokaságot hoztam létre, az egyikben a kötэшögek flexibilisek, a kötэшosszak pedig rögzítettek („MD/LINCS”), a másik esetében pedig mind a kötэшosszak, mind a kötэшögek flexibilisen változhattak („MD/Unc”). A flexibilis koordináták növelik a rendszer szabadsági fokainak számát, ezért az ezekből a sokaságokból kapott entrópiaértékek közvetlenül nem összehasonlíthatóak az egzakt entrópiaértékekkel.

A számításokból kapott lényeges eredmények illusztrálására a „val2” rendszerre kapott eredmények láthatóak a 2. ábrán. Az eredmények alapján azt találtam, hogy az MC sokaságokra kapott értékek a Gauss-keverék módszer esetén (*gaussmix*) kiváló egyezést mutatnak az egzakt, enumeráción alapuló értékkel (átlagos eltérés 2,04%). A várakozásoknak megfelelően a Karplus és Kushick-féle kváziharmonikus módszer (QH) szisztematikusan túlbecsüli a valódi értéket [6], bár az átlagos eltérése az egzakt értéktől viszonylag kicsi (10,4%). A Schlitter-féle kváziharmonikus módszer Descartes-koordinátákat használ a belső koordináták (torziós szögek) helyett, ez a módszert kétféle verzióban szerepelt. Az első esetben az összes atom koordinátája szerepelt a módszer bemeneteként (Schlitter/AA), ekkor a módszer az egzaktnál lényegesen magasabb értékeket adott (átlagos eltérés 39,97%). A második esetben viszont csak azok az atomok kerültek felhasználásra, amelyek a belső koordinátákat definiáló torziós szögeket alkotják (Schlitter/TA), ebben az esetben a módszer szisztematikusan alulbecsülte az egzakt értéket (átlagos eltérés 17,77%). A Wang és Brüschweiler-féle 2D entrópia módszere esetén szintén azt találtam, hogy ez az eljárás alulbecsüli az egzakt értékeket. Ennél a módszernél a kapott értékek azonban erősen függenek a módszer részeként szereplő σ sáv szélesség-paramétertől. A Numata-féle módszer

viszonylag jó egyezést mutat az egzakt értékekkel (átlagos eltérés 17,54%), azonban ötből három esetben alulbecsli az entrópiát.



2. ábra. A „val2” rendszer entrópiái grafikonon ábrázolva, öt különböző módszerrel számolva a három sokaságra. Az egzakt entrópiáértéket vízszintes vonal mutatja. Az MC sokaságok esetén a legjobb egyezést az egzakt értékkel a Gauss-keveréket alkalmazó módszer adja. Az MD sokaságok több szabadsági fokkal rendelkeznek (kötésszögek és kötэшosszak), és az egzakt entrópiájuk nem ismert. Esetükben a számolt entrópia nagymértékben függ attól, hogy az egyes módszerek hogyan veszik figyelembe a kötэшögek és kötэшosszak vibrációiból adódó entrópiajárulékot.

Az MD sokaságokra kapott entrópiáértékek általánosan mindig magasabbak, mint az MC sokaságokra kapott értékek. Az MD/Unc sokaságok majdnem mindig magasabb entrópiáértékeket adnak, mint az MD/LINCS sokaságok, bár a különbség viszonylag kicsi. Ez arra utal, hogy a kötэшosszak vibrációinak járuléka csekély. Megfigyelhető az is, hogy a Descartes-koordinátákat használó módszerek (a Schlitter- és Numata-féle módszerek) lényegesen magasabb entrópiáértékeket eredményeznek mindkét MD sokaság esetén, mint az MC sokaságokra. Ezzel ellentétben a belső koordinátákat használó módszereknél (a kváziharmonikus, a 2D entrópia és a Gauss-keverék módszerek) ez a különbség sokkal kisebb. Ez azt mutatja, hogy a kötэшögek vibrációja jelentős járulékot ad a konfigurációs entrópiához, amit a belső koordinátákat használó módszerek nagyrészt elhanyagolnak.

Az ötféle peptidből álló rendszerekre kapott eredmények alapján azt találtam, hogy Gauss-keverék módszerrel kapott entrópiáértékek kiváló egyezést mutatnak az egzakt entrópiáértékekkel, miközben a többi tesztelt módszer lényegesen rosszabb egyezést mutatott (átlagos eltérés 10–40%).

A módszerek eltérő teljesítményének több oka is lehet. Az egyik az entrópia becslésére alkalmazott eltérő elvek alkalmazása. A Gauss-keveréken alapuló módszer, a

kváziharmonikus és a 2D entrópia módszereihez hasonlóan, pusztán a megfigyelt konfigurációs mintákra hagyatkozik, míg a másik két módszer az adatok háttérében rejlő fizikai rendszerről tett feltételezésekből indul ki. Ez a különbség abban is látszik, hogy a Schlitter- és Numata-módszerrel ellentétben a Gauss-keveréken alapuló eljárás nem használja fel az atomi tömegeket a számításokhoz. A fizikai modellből kiinduló módszerekben gyakori az oszcillátorok kvantummechanikai kezelése, és a kinetikus entrópiajárulékot is figyelembe veszik, ezeket azonban a Gauss-keverék módszer nem tartalmazza.

A módszerek e kétféle csoportja abban is különbözik egymástól, hogy milyen koordinátákat használ a számításokhoz. A Descartes-koordinátákat használó Schlitter- és Numata-módszerek a kinetikus szabadsági fokokból származó járulékot és a kötэшosszak és kötэшögek vibrációiból származó járulékokat is figyelembe veszik, szemben a másik három módszerrel. A kötэшögek rezgései azonban jelentős mértékű csatolást mutatnak a torziós szögek fluktuációival, amelyek nem elhanyagolhatóak, és megjelennek két állapot közötti entrópiakülönbségekben is [5]. Különbözö koordinátakészletet használó módszerek esetén a köztük levő kapcsolatot leíró Jacobi-determináns is hozzájárul a kapott entrópiaértékek közötti különbséghez, de ezt a járulékot az itt bemutatott módszerek nem veszik figyelembe.

3. ABC transzporterek alloszterikus mechanizmusa

3.1. A kitűzött kutatási feladat és háttere

A kölcsönös információ közvetlenül összefüggésbe hozható a rendszeren belüli magasabb rendű korrelációkkal [13], amelyek fehérjékben fontos szerepet játszanak funkció megvalósításában [21, 22]. A kölcsönös információt többen alkalmazták a fehérjéken belüli korrelált mozgások számszerűsítésére és lokalizálására [23-25]. Az ilyen vizsgálatok segíthetnek a funkció szempontjából fontos aminosavak azonosításában is. Munkámban a kölcsönös információ segítségével kvantitatív módon vizsgálom az ABC exporter fehérjéken belüli korrelált mozgásokat.

Az ABC (ATP-Binding Cassette, ATP-kötő kazetta) fehérjecsalád főként membrántranszportereket tartalmaz, amelyek az ATP megkötésével és/vagy elhasításával segítik elő különböző szubsztrátok átjuttatását a membránon. Az emberi genomon eddig azonosított 49 ABC transzporter közül számos okozhat betegséget hibás működés esetén (pl. cisztás fibrózis [26, 27], Dubin-Johnson szindróma [28], kettes típusú diabetes mellitus [29], adrenoleukodisztrófia [30]). Kemoterápiás kezelések során megfigyelt jelenség a tumorsejtek multidrog-rezisztenciája, amelynek egyik fő oka az, hogy bizonyos, megnövekedett expressziójú ABC exporterek a drogot a sejten kívüli térbe pumpálják [31-33]. Különböző ABC transzporterek működésének befolyásolása tehát fontos klinikai jelentőséggel bír, aminek elengedhetetlen feltétele az ABC transzporterek szerkezetének és működésének részletes ismerete.

A funkcionális ABC transzporterek két, a citoplazmatikus oldalon elhelyezkedő nukleotidkötő doménből (NBD) és két transzmembrán doménből (TMD) épülnek fel [34, 35]. Az ATP bekötődése a két NBD szimmetrikus, szoros asszociációját idézi elő, a nukleotidok a két domén közötti felszínen kötődnek [36, 37]. Az ATP-kötött (holo) állapotban a transzmembrán domének citoplazmatikus szakaszai is kontaktusba lépnek egymással, és egy ún. „alul zárt” konformációt alkotnak. Nukleotidok hiányában (apo állapot) a röntgendiffrakciós szerkezetekben az NBD-k eltávolodást mutatnak egymástól [38-40], az eltávolodás mértékétől függően megkülönböztethetünk egy ún. „alul zárt” és egy „alul nyitott” apo konformációt. A jelenleg ismert három apo szerkezet alapján az NBD-k eltávolodása széles tartományban mozoghat, azonban ennek mértéke nincs összhangban a dupla elektron-elektron rezonancián (DEER) [41] és a kémiai keresztkötésen (cross-linking) alapuló távolságmérésekkel [42]. A kristályosítás és szerkezetmegoldás mesterséges

körülményeinek fényében kérdés marad, hogy hogyan értelmezhetőek a kapott fehérjeszerkezetek, és milyen relevanciával bírnak az *in vivo* apo állapot modellezésében.

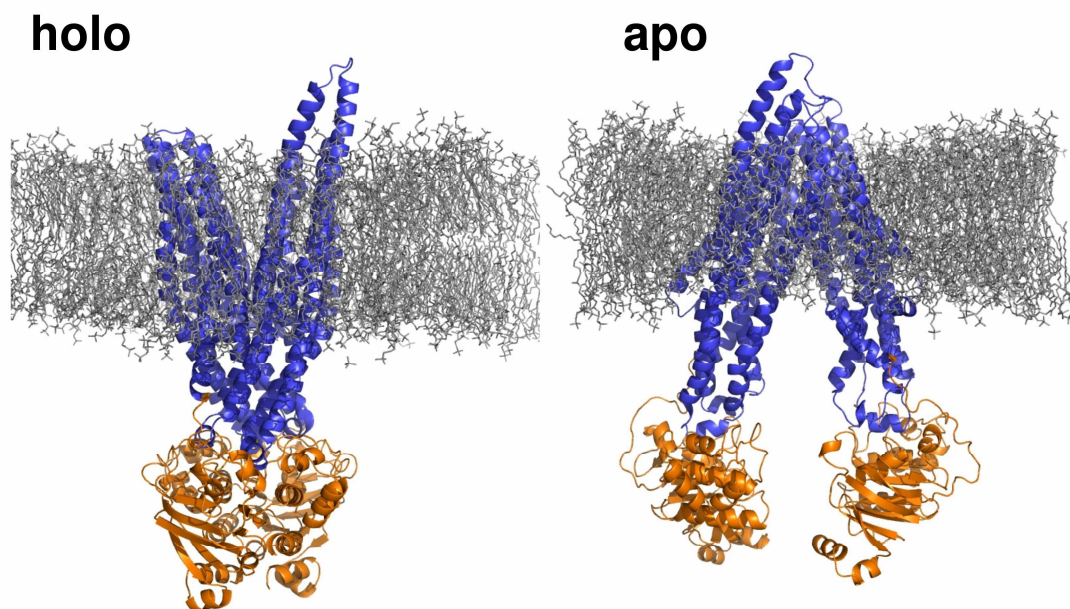
Az ABC transzporterek működésére több mechanisztikus modell is született [43-48]. Ezek a mechanizmusok alapvetően abban különböznek egymástól, hogy egy vagy két ATP molekula hasítását tételezik fel egy transzportciklusban, és hogy feltételeznek-e állandó kontaktust a két NBD között a működés során. Az ún. „processive clamp” vagy „switch” modell [46-48] szerint mindkét ATP egymást követő elhasítása szükséges az NBD-k disszociációjához, míg az ún. „alternating sites” modell [44] szerint pedig a kötőhelyek felváltva hasítanak ciklusonként egy ATP-t. Az ún. „constant contact” modell [45] szintén ciklusonként egy ATP hasítását tételezi fel, de olyan módon, hogy a transzportciklus során az NBD-k nem távolodnak el jelentős mértékben egymástól. Az ABC transzporterek működésére tehát nincs egységes, konszenzuson alapuló modell.

Az ABC transzporterek nukleotidkötő és transzmembrán doménjei között kifinomult alloszterikus kommunikáció áll fenn. Ezt mutatja, hogy multidrog-exporterekben a szubsztrát bekötődése, amely a transzmembrán régióban történik [49, 50], fokozza az egyébként is jelen lévő ATPáz aktivitást az NBD-kben, az ATP hidrolízise azonban szükséges a koncentrációgradiens ellenében történő aktív transzporthoz. Az NBD és a TMD között több olyan hurkot és oldalláncot azonosítottak, amelynek szerepe lehet az alloszterikus mechanizmusban. Ezek közül a legfontosabbak az TMD-ben az NBD–TMD interfészen elhelyezkedő ún. coupling hélixek [51], az NBD-ben az ATP és ADP megkülönböztetésére alkalmas Q-hurok [51, 52], és a coupling hélixekkel kontaktust létesítő X-hurok [53, 54].

Több, molekuláris dinamikai számításokat alkalmazó vizsgálat szól a nukleotidok stabilizáló hatásáról csak izolált NBD-eket tartalmazó rendszerekben [45, 55-58]. Annak ellenére, hogy nincs egyértelmű utalás arra, hogy az egyik kötőhelyen történő hidrolízis elősegíti-e a szemközti (*trans*) kötőhelyen levő nukleotid hidrolízisét [58, 59], a legtöbb szimulációs eredmény és egy félig nyitott NBD dimert tartalmazó röntgendiffrakciós szerkezet által jósolt konformációs változások a Q- és X-hurkok együttmozgását mutatják a hidrolízis után [45, 55]. A magas számításigény miatt kevés tanulmány számol be teljes hosszúságú ABC transzporterekkel lipid környezetben végzett szimulációkról. A BtuCD bakteriális transzporter esetén megmutatták, hogy az ATP bekötődése konformációs változást indukál az NBD-ben és a TMD-ben is [60], illetve, hogy az ATP-kötött transzporter aszimmetrikus záródása az alternáló hidrolízis mechanizmusát támasztja alá [61]. A teljes Sav1866 bakteriális transzporterrel végzett szimulációk segítségével sikerült rámutatni olyan oldalláncokra a Q- és X-hurkokban, amelyek egymástól függően több különböző

konformációs állapotot is felvehetnek, és ez által molekuláris kapcsolóként továbbíthatják a konformációs változásokat az NBD és a TMD között [52]. Mindmáig azonban nem történt szisztematikus vizsgálat az NBD-ben eredő és a TMD felé továbbított konformációs változások teljes útvonalaról.

Munkám során kitűzött céloom az volt, hogy megvizsgáljam, milyen változásokat okoz az ATP hidrolízise a teljes transzporter korrelált mozgásainak mintázatában, továbbá, hogy összehasonlítsam a holo és apo állapotban fellépő kollektív mozgásokat. A rendszer mozgásait molekuláris dinamikai szimulációkból kapott trajektóriák alapján vizsgáltam. A szimulációk során a teljes transzportert lipid kettősrétegbe és explicit vízmolekulákból álló oldószerbe ágyaztam a fiziológiás környezet modellezésére, és az összes molekula atomi szinten volt figyelembe véve. Az ATP hidrolízis hatásának vizsgálatához a Sav1866 bakteriális transzporter nukleotidokkal együtt kristályosított szerkezetét használtam, amelyből egy ATP/ATP (mindkét kötőhelyen ATP-t tartalmazó) és egy ATP/ADP (az egyik kötőhelyen ATP-t, másikon ADP-t tartalmazó) szimulációs rendszert hoztam létre a hidrolízis előtti és utáni állapot modellezésére. A holo és az apo állapot dinamikai összehasonlításához a humán MDR1 fehérje homológiamodelljeit használtam, amelyek a Sav1866 (holo) és az egér MDR3 (apo) fehérjék röntgendiffrakciós szerkezete alapján lettek felépítve (3. ábra).



3. ábra. Az ABC exporterek molekuláris dinamikai szimulációkban használt két konformációja. Az ábrán a humán MDR1 „alul zárt” holo (bal oldalt) és „alul nyitott” apo (jobb oldalt) homológiamodelljei szerepelnek.

3.2. Új tudományos eredmények

1. A Sav1866 fehérjében egyetlen ATP elhasadása megváltoztatja az oldalláncok közötti csatolt mozgások mintázatát, ami a transzporter felnyílását idézheti elő a citoplazmatikus oldalon.

Az ATP/ATP és ATP/ADP rendszerek közötti dinamikai különbségek összesítésére kiszámoltam az egyes torziós szögek közötti kölcsönös információt, mindkét rendszerre 5 db, egyenként legalább 50 ns hosszú szimulációs trajektória alapján. Az egyes aminosavpárokra kapott, összegzett kölcsönös információ a köztük levő korreláció mértékére lesz jellemző, és ez alapján kiválaszthatóak az egymással erősen korrelált mozgást végző aminosavpárok. A kölcsönös információ kiszámítását a McClendon és munkatársai által létrehozott MutInf módszerrel végeztem, amelyet sikeresen alkalmaztak az interleukin-2 alloszterikus mechanizmusának feltárására [25].

A jelentős mértékű konformációs korrelációt mutató oldalláncokat hálózatban ábrázoltam, amelyről leolvashatóak voltak az erősen korrelált klaszterek, és az ATP/ATP és ATP/ADP rendszer közötti különbségek is. Az ATP/ATP rendszer hálózatában az egymással korrelált mozgást végző aminosavak a Gln422 és a Glu473 oldalláncok köré csoportosulnak, ez a két klaszter pedig egymástól gyakorlatilag független. A 473-as pozícióban található konzervált Glu az X-hurok része, amely igen fontos szerepet játszik az NBD-kből a transzmembrán domének felé történő konformációs változások továbbításában [53, 54]. Szintén fontos, a hálózatban is megjelenő szerkezeti elem az X-hurokkal együtt mozgó ún. tetrahélix-köteg, amelyet a TM3 és TM4 transzmembrán hélixek citoplazmatikus szakaszai alkotnak az „alul zárt” szerkezetben.

Az ATP/ADP rendszer korrelációs hálózata egyszerűbb szerkezetű, az oldalláncok között általában gyengébb a csatoltság. Az ATP/ATP rendszer esetén megfigyelhető klaszterek itt hiányoznak, ami az X-hurkok és a tetrahélix-köteg csatoltságának megszűnését mutatja. Ez a szétkapcsolódás elősegítheti a tetrahélix-köteg szétesését, amelyről irányított MD szimulációk megmutatták, hogy a transzporter katalitikus ciklusának egyik fontos lépése [62]. A Glu473 oldallánc központi szerepét a Q-hurokban található, ATP-érzékelő Gln422 vette át, amely a coupling hélixek oldalláncaival mutat csatoltságot az ATP/ADP rendszerben. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy akár egyetlen ATP hidrolízise is olyan formában változtatja meg a transzporter oldalláncainak korrelált mozgási mintázatát, amely elősegítheti

a citoplazmatikus oldal felnyílását, és az apo állapot irányába történő átmenetet. Sikerült továbbá a korrelációs hálózat alapján más aminosavakat is azonosítani (pl. Met311, Asn494, Asn495, Asn252 vagy Asp323), amelyek az erős dinamikai csatoltságuk révén fontos szerepet játszhatnak a fehérje funkciójának megvalósításában.

2. Az „alul nyitott” apo szerkezet MD szimulációkban instabil. Az instabilitás és a holo konformációban megfigyelt kollektív mozgások alapján javaslom, hogy az „alul zárt” apo szerkezet fiziológiailag relevánsabb modellje a transzporterek apo állapotának.

A holo és az „alul nyitott” apo konformáció dinamikai összehasonlítására tett kísérlet nem járt sikerrel, mert az apo hMDR1 modell instablnak mutatkozott a molekuláris dinamikai szimulációk során. Annak ellenőrzésére, hogy az instabilitás nem a homológiamodell pontatlanságaiból fakad, megismételtem a szimulációt a mintaként használt egér MDR3 röntgendiffrakciós szerkezettel, amely a homológiamodellel azonos módon instablnak mutatkozott. A kísérletileg megoldott szerkezet tehát olyan konformációt tartalmaz, amely lipid kettősrétegbe visszahelyezve jelentős mértékben torzul a szimulációk során. Az egyes domének és a teljes fehérje C_{α} atomjaira kiszámolt RMSD (négyzetes közepes eltávolodás) értékek azt mutatják, hogy a domének saját szerkezete kevésbé, egymáshoz képesti helyzete viszont jelentős mértékben változik. A domének elmozdulásának oka, hogy a TMD-k fokozatosan elvesztik a másodlagos szerkezetüket, a kezdetben helikális aminosavak pusztán 63,13%-a marad dominánsan helikális állapotban, szemben a Sav1866 „alul zárt” konformáció esetén kapott 90,04%-os értékkel. Ez a változás nagyrészt a TMD és NBD közötti interfész régióra koncentrálódik, és ez a szerkezetvesztés okozza az NBD-k lecsatolódását és eltávolodását a TMD-k citoplazmatikus oldalától.

Az instabilitás egyik lehetséges okaként az „alul nyitott” konformációban megnövekedett, az oldószer felé exponált hidrofób felszint jelöltem meg. Az intracelluláris hurkokban valóban sok olyan hidrofób aminosav található, amelynek az „alul nyitott” apo konformációban az oldószer által hozzáférhető felszíne kedvezőtlen módon jelentősen megnövekedett az „alul zárt” konformációhoz képest. Az emelkedés mértéke bizonyos oldalláncok esetében 20-30-szoros. Az instabilitás jelentheti azt is, hogy a kísérletileg meghatározott szerkezet csak a kristályosítás körülményei között stabil, natív környezetbe visszahelyezve már nem. A nem-natív körülményeket jelzi az is, hogy az alul nyitott szerkezetek (egér MDR3, MsbA) kristályának elemi cellájában több teljes transzporter foglal

helyet, amelyek az NBD-TMD interfész környékén jelentős kontaktfelülettel, nem-natív kölcsönhatások révén érintkeznek egymással.

Az „alul nyitott” apo szerkezet instabilitása és a nem-natív kristálykontaktusok miatt az apo állapot alternatív modelljeként javaslom az „alul zárt” apo szerkezetet, amelyet az MsbA fehérje egyik kísérletileg meghatározott konformációja jellemez. Az „alul zárt” apo szerkezetben az NBD-k egymáshoz képest kisebb eltávolodást, és az őket összekötő tengelyhez képest oldalirányú kitérést mutatnak. Az „alul zárt” holo konformációban megfigyelhető kollektív mozgási módusok analízise azt mutatja, hogy a transzporterben jelen lévő mozgások lehetővé teszik az „alul zárt” apo konformáció felé történő elmozdulást. Mindezen eredmények alapján azt javaslom, hogy az „alul zárt” apo szerkezet jobb, fiziológiailag relevánsabb leírását adhatja az apo állapotnak, mint az „alul nyitott” szerkezet.

4. Az eredmények hasznosítási lehetőségei, alkalmazhatósága

A Gauss-keverék módszer tesztelésére kisszámú (3–5) szabadsági fokkal rendelkező molekuláris rendszereket és állandó számú (10) Gauss-komponenst használtam a Gauss-keverékekben. Ezekben az esetekben gyors konvergenciát tapasztaltam, és a Gauss-keverék módszerrel kapott entrópiaértékek jó egyezést mutattak az egzakt értékekkel. Az illesztésnek és az entrópiabecslésnek a futási ideje a legtöbb szabadsági fokkal rendelkező „ala-val-ala” rendszer esetén sem haladta meg az 54 órát egy Intel Xeon E5430 számítógépen. Nagyobb rendszerek esetén azonban egyrészt a Gauss-komponenseket leíró mátrixok mérete is növekszik (d^2 mátrixelem d szabadsági fok esetén), másrészt szükség lehet a Gauss-komponensek számának (k) növelésére is. A módszer jelenlegi megvalósításának skálázódása $O(nd^3k)$, ahol n a sokaságbeli konformációk száma. Nagyobb rendszerekre ezért várhatóan a számítások konvergenciája nehezebben érhető el. A szabadsági fokok számának csökkentésére nagyobb rendszerek (pl. fehérjék) esetén különböző technikákat lehet alkalmazni. Teljes korrelációs analízis (FCA, [63]) segítségével a rendszert feloszthatjuk minimálisan csatolt alrendszerekre [9], majd adott esetben a kölcsönös információn alapuló kifejtéssel a dimenziószám tovább csökkenthető [13]. Ezután a csatolt alrendszerek entrópiája a Gauss-keverék módszerrel könnyen és gyorsan kiszámítható. A szükséges Gauss-komponensek számának megbecslésére alkalmazhatók klaszterezési módszerek (pl. fuzzy klaszterezés), amelyekkel a konformersokaságban kompakt, lazábban csatolt klaszterek azonosíthatók.

A jelenlegi munkám annak a bemutatására szolgál, hogy a Gauss-keverékeken alapuló megközelítés működőképes és pontos módszer nem-diffúzív molekuláris rendszerek konfigurációs entrópiájának becslésére. A Gauss-keverék módszer alapként szolgálhat nagyobb rendszerek (pl. fehérjék) konfigurációs entrópiáját számoló, további módszerek fejlesztéséhez.

Az ABC transzporter fehérjék működésének befolyásolása és szabályozása számos, súlyos emberi betegség gyógyítására jelenthetne megoldást. A szabályozás egyik lehetséges módja olyan kismolekulák tervezése, amelyek szükség szerint serkentik vagy gátolják egyes ABC transzporterek működését. A működés finomabb modulálására nyílnak lehetőségek olyan alloszterikus kötőhelyek azonosításával, amelyek az NBD-k és a TMD-k közötti kommunikációt befolyásolják. A CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) transzporter esetén a cisztás fibrózist okozó $\Delta F508$ delécióval rendelkező mutáns az NBD és TMD közötti interfész sérülését okozza [54]. Kismolekulák (ún. kémiai chaperone-ok) segítségével sikerült helyrehozni a mutáns fehérje szerkezetét a membránban, és a fehérje működését serkentő molekulákat is azonosítottak [64-66]. A transzporterek szerkezetének és dinamikájának megismerése segíthet abban is, hogy ezeknek a már ismert molekuláknak a hatásmechanizmusát feltárjuk. Az alloszterikus hatás felhasználásával lehetőség nyílna arra is, hogy a transzporterek funkcióját az extracelluláris térből befolyásoljuk. Ennek a megközelítésnek a járhatóságát illusztrálja az ABCG2 transzporter elleni 5D3 nevű, az extracelluláris tér felől kötődő antitest, amelyről megmutatták, hogy képes érzékelni a transzporterben végbemenő, funkcióhoz köthető konformációs változásokat (pl. ATP kötődése). [67, 68]

A racionális gyógyszertervezéshez a transzporterek helyes, membránbéli szerkezete szükséges, az egyes kismolekulák hatásának értelmezéséhez pedig gyakran a célfehérje működési mechanizmusának és dinamikai viselkedésének ismeretére is szükség van. Munkámban arra törekedtem, hogy elméleti módszerek alkalmazásával hozzájáruljak a transzportciklus ATP hasítást követő szakaszának megértéséhez, és az egyes, kísérleti módszerekkel meghatározott atomi szerkezetek értelmezéséhez.

5. Publikációk jegyzéke

1. Gyimesi G., Závodszky P., Hegedűs T., and Szilágyi A., „Calculation of configurational entropy from molecular dynamics trajectories using Gaussian mixtures.”, beküldés alatt
2. Gyimesi G., Ramachandran S., Kota P., Dokholyan N.V., Sarkadi B., Hegedűs T., „ATP hydrolysis at one of the two sites in ABC transporters initiates transport related conformational transitions.” *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, elfogadva
3. Papp A., Szommer T., Barna L., Gyimesi G., Ferdinándy P., Spadoni C., Darvas F., Fujita T., Üрге L., Dormán G., „Enhanced hit-to-lead process using bioanalogous lead evaluation and chemogenomics: application in designing selective matrix metalloprotease inhibitors.” *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2007**. 2(5): p. 707-723.
4. Flachner B., Varga A., Szabó J., Barna L., Hajdú I., Gyimesi G., Závodszky P., Vas M., „Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase.” *Biochemistry*. **2005**. 44(51): p. 16853-65.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Beveridge D.L., DiCapua F.M., "Free Energy via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems". *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **1989**. 18: p. 431-92.
- [2] Zwanzig R.W., "High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases". *Journal of Chemical Physics*, **1954**. 22(8): p. 1420-26.
- [3] Kumar S., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A., Rosenberg J.M., "The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method". *Journal of Computational Chemistry*, **1992**. 13(8): p. 1011-1021.
- [4] Meirovitch H., Cheluvaraja S., White R.P., "Methods for calculating the entropy and free energy and their application to problems involving protein flexibility and ligand binding". *Curr Protein Pept Sci*, **2009**. 10(3): p. 229-43.
- [5] Karplus M., Kushick J.N., "Method for estimating the configurational entropy of macromolecules". *Macromolecules*, **1981**. 14(2): p. 325-332.
- [6] Schlitter J., "Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the covariance matrix". *Chem Phys Lett*, **1993**. 215(6): p. 617-621.
- [7] Baron R., van Gunsteren W.F., Hünenberger P.H., "Estimating the configurational entropy from molecular dynamics simulations: anharmonicity and correlation corrections to the quasi-harmonic approximation". *Trends Phys Chem*, **2006**. 11: p. 87-122.
- [8] Hnizdo V., Fedorowicz A., Singh H., Demchuk E., "Statistical thermodynamics of internal rotation in a hindering potential of mean force obtained from computer simulations". *J Comput Chem*, **2003**. 24(10): p. 1172-83.
- [9] Hensen U., Grubmüller H., Lange O.F., "Adaptive anisotropic kernels for nonparametric estimation of absolute configurational entropies in high-dimensional configuration spaces". *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **2009**. 80(1 Pt 1): p. 011913.
- [10] Numata J., Wan M., Knapp E.W., "Conformational entropy of biomolecules: beyond the quasi-harmonic approximation". *Genome Inform*, **2007**. 18: p. 192-205.
- [11] Wang J., Brüschweiler R., "2D Entropy of Discrete Molecular Ensembles". *J Chem Theory Comput*, **2006**. 2(1): p. 18-24.
- [12] Li D.-W., Khanlarzadeh M., Wang J., Huo S., Brüschweiler R., "Evaluation of Configurational Entropy Methods from Peptide Folding–Unfolding Simulation". *J Phys Chem B*, **2007**. 111(49): p. 13807-13813.
- [13] Killian B.J., Yudenfreund Kravitz J., Gilson M.K., "Extraction of configurational entropy from molecular simulations via an expansion approximation". *J Chem Phys*, **2007**. 127(2): p. 024107.
- [14] Matsuda H., "Physical nature of higher-order mutual information: Intrinsic correlations and frustration". *Phys Rev E*, **2000**. 62(3): p. 3096-102.
- [15] Attard P., "Information content of signals using correlation function expansions of the entropy". *Phys Rev E*, **1997**. 56(4): p. 4052-67.

- [16] Reiss H., "Superposition Approximations from a Variation Principle". *Journal of Statistical Physics*, **1972**. 6(1): p. 39-47.
- [17] Hnizdo V., Tan J., Killian B.J., Gilson M.K., "Efficient calculation of configurational entropy from molecular simulations by combining the mutual-information expansion and nearest-neighbor methods". *J Comput Chem*, **2008**. 29(10): p. 1605-14.
- [18] Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E., "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation". *J Chem Theory Comput*, **2008**. 4(3): p. 435-447.
- [19] Loftsgaarden D.O., Quesenberry C.P., "A Nonparametric Estimate of a Multivariate Density Function". *Annals of Mathematical Statistics*, **1965**. 36(3): p. 1049-51.
- [20] Huber M.F., Bailey T., Durrant-Whyte H., Hanebeck U.D., "On entropy approximation for Gaussian mixture random vectors", in *IEEE International Conference on Multisensor Fusion and Integration for Intelligent Systems*. **2008**. p. 181-188.
- [21] Agarwal P.K., Billeter S.R., Rajagopalan P.T., Benkovic S.J., Hammes-Schiffer S., "Network of coupled promoting motions in enzyme catalysis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**. 99(5): p. 2794-9.
- [22] Benkovic S.J., Hammes-Schiffer S., "A perspective on enzyme catalysis". *Science*, **2003**. 301(5637): p. 1196-202.
- [23] Lange O.F., Grubmuller H., de Groot B.L., "Molecular dynamics simulations of protein G challenge NMR-derived correlated backbone motions". *Angew Chem Int Ed Engl*, **2005**. 44(22): p. 3394-9.
- [24] Lange O.F., Grubmuller H., "Generalized correlation for biomolecular dynamics". *Proteins*, **2006**. 62(4): p. 1053-61.
- [25] McClendon C.L., Friedland G., Mobley D.L., Amirkhani H., Jacobson M.P., "Quantifying Correlations Between Allosteric Sites in Thermodynamic Ensembles". *J Chem Theory Comput*, **2009**. 5(9): p. 2486-2502.
- [26] Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., et al., "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA". *Science*, **1989**. 245(4922): p. 1066-73.
- [27] Senior A.E., Gadsby D.C., "ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR". *Semin Cancer Biol*, **1997**. 8(3): p. 143-50.
- [28] Wada M., Toh S., Taniguchi K., Nakamura T., Uchiumi T., Kohno K., Yoshida I., Kimura A., Sakisaka S., Adachi Y., Kuwano M., "Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome". *Hum Mol Genet*, **1998**. 7(2): p. 203-7.
- [29] Reis A.F., Ye W.Z., Dubois-Laforgue D., Bellanne-Chantelot C., Timsit J., Velho G., "Association of a variant in exon 31 of the sulfonyleurea receptor 1 (SUR1) gene with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians". *Hum Genet*, **2000**. 107(2): p. 138-44.
- [30] Mosser J., Douar A.M., Sarde C.O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A.M., Mandel J.L., Aubourg P., "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters". *Nature*, **1993**. 361(6414): p. 726-30.

- [31] Eckford P.D., Sharom F.J., "ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs". *Chem Rev*, **2009**. 109(7): p. 2989-3011.
- [32] Gottesman M.M., Ling V., "The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research". *FEBS Lett*, **2006**. 580(4): p. 998-1009.
- [33] Szakacs G., Varadi A., Ozvegy-Laczka C., Sarkadi B., "The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)". *Drug Discov Today*, **2008**. 13(9-10): p. 379-93.
- [34] Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F., "Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport". *Nature*, **1990**. 346(6282): p. 362-5.
- [35] Higgins C.F., "ABC transporters: from microorganisms to man". *Annu Rev Cell Biol*, **1992**. 8: p. 67-113.
- [36] Smith P.C., Karpowich N., Millen L., Moody J.E., Rosen J., Thomas P.J., Hunt J.F., "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer". *Mol Cell*, **2002**. 10(1): p. 139-49.
- [37] Chen J., Lu G., Lin J., Davidson A.L., Quioco F.A., "A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle". *Mol Cell*, **2003**. 12(3): p. 651-61.
- [38] Kerr I.D., Jones P.M., George A.M., "Multidrug efflux pumps: the structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues". *Febs J*, **2010**. 277(3): p. 550-63.
- [39] Ward A., Reyes C.L., Yu J., Roth C.B., Chang G., "Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2007**.
- [40] Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G., "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding". *Science*, **2009**. 323(5922): p. 1718-22.
- [41] Zou P., Bortolus M., McHaourab H.S., "Conformational cycle of the ABC transporter MsbA in liposomes: detailed analysis using double electron-electron resonance spectroscopy". *J Mol Biol*, **2009**. 393(3): p. 586-97.
- [42] Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M., "Human P-glycoprotein is active when the two halves are clamped together in the closed conformation". *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**.
- [43] Jones P.M., O'Mara M.L., George A.M., "ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma". *Trends Biochem Sci*, **2009**. 34(10): p. 520-31.
- [44] Senior A.E., al-Shawi M.K., Urbatsch I.L., "The catalytic cycle of P-glycoprotein". *FEBS Lett*, **1995**. 377(3): p. 285-9.
- [45] Jones P.M., George A.M., "Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle". *Proteins*, **2009**. 75(2): p. 387-96.
- [46] Janas E., Hofacker M., Chen M., Gompf S., van der Does C., Tampe R., "The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p". *J Biol Chem*, **2003**. 278(29): p. 26862-9.

- [47] van der Does C., Tampe R., "How do ABC transporters drive transport?" *Biol Chem*, **2004**. 385(10): p. 927-33.
- [48] Higgins C.F., Linton K.J., "The ATP switch model for ABC transporters". *Nat Struct Mol Biol*, **2004**. 11(10): p. 918-26.
- [49] Loo T.W., Clarke D.M., "Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12". *J Biol Chem*, **1997**. 272(34): p. 20986-9.
- [50] Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M., "Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket". *Biochem J*, **2006**. 399(2): p. 351-9.
- [51] Dawson R.J., Locher K.P., "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter". *Nature*, **2006**. 443(7108): p. 180-5.
- [52] Aittoniemi J., de Wet H., Ashcroft F.M., Sansom M.S., "Asymmetric switching in a homodimeric ABC transporter: a simulation study". *PLoS Comput Biol*, **2010**. 6(4): p. e1000762.
- [53] Oancea G., O'Mara M.L., Bennett W.F., Tieleman D.P., Abele R., Tampe R., "Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2009**. 106(14): p. 5551-6.
- [54] He L., Aleksandrov A.A., Serohijos A.W., Hegedus T., Aleksandrov L.A., Cui L., Dokholyan N.V., Riordan J.R., "Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in cfr mediate regulation of channel gating". *J Biol Chem*, **2008**.
- [55] Jones P.M., George A.M., "Nucleotide-dependent allostery within the ABC transporter ATP-binding cassette: A computational study of the MJ0796 dimer". *J Biol Chem*, **2007**. 282(31): p. 22793-803.
- [56] Jones P.M., George A.M., "Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**. 99(20): p. 12639-44.
- [57] Newstead S., Fowler P.W., Bilton P., Carpenter E.P., Sadler P.J., Campopiano D.J., Sansom M.S., Iwata S., "Insights into how nucleotide-binding domains power ABC transport". *Structure*, **2009**. 17(9): p. 1213-22.
- [58] Wen P.C., Tajkhorshid E., "Dimer opening of the nucleotide binding domains of ABC transporters after ATP hydrolysis". *Biophys J*, **2008**. 95(11): p. 5100-10.
- [59] Campbell J.D., Sansom M.S., "Nucleotide binding to the homodimeric MJ0796 protein: a computational study of a prokaryotic ABC transporter NBD dimer". *FEBS Lett*, **2005**. 579(19): p. 4193-9.
- [60] Oloo E.O., Tieleman D.P., "Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD". *J Biol Chem*, **2004**. 279(43): p. 45013-9.
- [61] Ivetac A., Campbell J.D., Sansom M.S., "Dynamics and Function in a Bacterial ABC Transporter: Simulation Studies of the BtuCDF System and Its Components". *Biochemistry*, **2007**. 46(10): p. 2767-78.
- [62] Weng J.W., Fan K.N., Wang W.N., "The conformational transition pathway of ATP binding cassette transporter MsbA revealed by atomistic simulations". *J Biol Chem*, **2010**. 285(5): p. 3053-63.

- [63] Lange O.F., Grubmuller H., "Full correlation analysis of conformational protein dynamics". *Proteins*, **2008**. 70(4): p. 1294-312.
- [64] Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M., "Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones". *J Bioenerg Biomembr*, **2005**. 37(6): p. 501-7.
- [65] Wellhauser L., Kim Chiaw P., Pasyk S., Li C., Ramjeesingh M., Bear C.E., "A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability". *Mol Pharmacol*, **2009**. 75(6): p. 1430-8.
- [66] Schultz B.D., Frizzell R.A., Bridges R.J., "Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX". *J Membr Biol*, **1999**. 170(1): p. 51-66.
- [67] Ozvegy-Laczka C., Varady G., Koblos G., Ujhelly O., Cervenak J., Schuetz J.D., Sorrentino B.P., Koomen G.J., Varadi A., Nemet K., Sarkadi B., "Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface". *J Biol Chem*, **2005**. 280(6): p. 4219-27.
- [68] Ozvegy-Laczka C., Laczko R., Hegedus C., Litman T., Varady G., Goda K., Hegedus T., Dokholyan N.V., Sorrentino B.P., Varadi A., Sarkadi B., "Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter". *J Biol Chem*, **2008**. 283(38): p. 26059-70.