

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Fluoreszcenciás módszerek kidolgozása ABC
transzporterek katalitikus ciklusának vizsgálatára és hal
hibridek ploiditásának meghatározására

Gyöngy Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Goda Katalin



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI
ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	8
I. Az ABCG2 és a P-glikoprotein	8
Bevezetés.....	8
A daganatsejtek gyógyszer rezisztenciája és a multidrog rezisztencia.....	8
Az ABC kazettás fehérjecsalád	10
A humán ABC fehérjék és a hozzájuk kapcsolódó betegségek.....	12
Az <i>ABCG2</i> és <i>ABCB1</i> gének és szabályozásuk.....	16
Az ABCG2 és Pgp szerkezeti felépítése	17
Transzmembrán domének és a szubsztrát kötés.....	21
Nukleotid-kötő domének (NBD-k) és az ATP kötés.....	27
Az ABCG2 és Pgp katalitikus ciklusa.....	30
A szubsztrát transzport mechanizmusa az ABCG2 és Pgp fehérjékben.....	31
Az ABCG2 és a Pgp konformáció változásainak megfigyelése.....	32
Az ABCG2 és a P glikoprotein fiziológiás szöveti lokalizációja.....	35
Szubsztrát spektrum és inhibitorok az ABCG2 és a Pgp fehérjékben.....	38
A membránkörnyezet hatása a multidrog transzporterek működésére.....	39
II. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel.....	42
Célkitűzések	45
Anyagok és módszerek.....	46
Anyagok	46
Módszerek	46
Sejtenyésztés	46
Western blot analízis	47
Mitoxantron akkumulációs teszt.....	47
Az ABCG2 direkt immunfluoreszcens jelölése	48
Az UIC2 reaktív konformációban lévő Pgp molekulák arányának meg-határozása.....	48
Sejtek permeabilizálása Streptolizin-O toxinnal	48
Az 5D3 kötődés kinetikájának vizsgálata.....	49
A nukleotid kötés látszólagos affinitásának meghatározása.....	49
Nukleotid csapdázás („trappelés”)	50
5D3 disszociációs kinetika vizsgálata	50
Áramlási citometria	51
Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia (CLSM)	51
Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS).....	52

Membrán preparálás	53
ATPáz aktivitás mérés.....	54
DNS-tartalom elemzés	54
Statisztikai analízis	54
Eredmények.....	56
I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata.....	56
Az MDCK II sejtek funkcionálisan aktív ABCG2-t és ABCG2-GFP-t expresszálnak.....	56
Streptolizin-O-val permeabilizálhatók az MDCK II sejtek.....	57
A nukleotid kötés elégséges az IF-OF konformáció változáshoz.....	58
A szubsztrátok növelik a vanadát- vagy BeFx-csapdázott konformer képződésének sebességét.....	61
Az ABCG2 ligandjai nem befolyásolják az 5D3 kötődés kinetikáját	63
A szubsztrátok felgyorsítják az ABCG2 IF-OF konformációs átmenetét.....	64
Az ABCG2 nukleotidmentes IF konformere nagyobb szubsztrát-affinitással rendelkezik, mint a vanadát-csapdázott poszt-hidrolitikus konformer	66
Az IF konformer MX kötését FCS mérések is igazolják.....	68
Az AMP-PNP kötődés az ABCG2-t alacsony szubsztrát-affinitású konformációba billenti.....	69
II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata.....	71
Az A-hurok és a Walker B mutációk hatással vannak az UIC2-reaktív IF Pgp konformerek arányára	71
Az NBD mutációk befolyásolják a nukleotid kötés affinitását	72
Az Y401A és E556M mutációt hordozó Pgp molekulák mérhető ATP hidrolízis aktivitást mutatnak	74
III. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel.....	76
A diploid és triploid hal vörösvérsejtek jól elkülöníthetők áramlási citometriával	76
A hal vörösvérsejtek mérete ploiditásukkal arányos	77
Amúr embriók DNS-tartalmának vizsgálata	78
A vágótok és az amerikai lapátorru tok véletlenszerű keresztezéséből származó hibridek DNS tartalmának meghatározása	79
Eredmények megbeszélése.....	81
I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata.....	81
II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata.....	85
III. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel.....	86
Eredmények összefoglalása.....	88
Summary of results.....	89
Felhasznált irodalom	90
Saját közlemények.....	101
Tárgyszavak.....	103

Keywords	103
Köszönetnyilvánítás	104
Függelék	105

Rövidítések jegyzéke

4-PBA: 4-fenil-vajsav (4-phenylbutyric acid)

A647: Alexa Fluor® 647 (fluorofór)

ABC: ATP-kötő kazetta (ATP-Binding Cassette)

ABCB1: lásd Pgp

ABCB1a: Multidrug resistance protein 1a Mus musculusban. Az Abcb1a gén kódolja

ABCB2: lásd TAP1

ABCB3: lásd TAP2

ABCC1: lásd MRP1

ABCC7: lásd CFTR

ABCC8: lásd SUR1

ABCC9: lásd SUR2

ABCG2: lásd BCRP

ACF: fluoreszcencia autokorrelációs függvény (autocorrelation function)

ADME-Tox: felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztás és toxicitás (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity)

ADP: adenzin-5'-difoszfát (adenosine diphosphate)

AEBSF: 4-benzolszulfonil-fluorid-hidroklorid (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)

AlF₃: alumínium-fluorid (aluminium fluoride)

AM: acetoxi-metilészter (acetoxymethyl ester)

AMP: adenzin-5'-monofoszfát (adenosine monophosphate)

AMP-PNP: adenzin-5'-(β,γ-imido)-trifoszfát (adenylyl imidodiphosphate)

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance)

AP1: aktivátor protein-1 (activator protein 1)

AP2: aktivátor protein-2 (activator protein 2)

ApoAI: apolipoprotein A-1 (apolipoprotein A-I)

ATP: adenzin-5'-trifoszfát (adenosine triphosphate)

BCRP: mellrák-rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein), szinonímája: ABCG2 vagy ABCP (placenta specifikus ABC fehérje)

BeF_x: berillium-fluorid (beryllium fluoride)

BeSO₄: berillium-szulfát (beryllium sulfate)

CFTR: cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), szinonímája: ABCC7

CLSM: konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia (confocal laser scanning microscopy)

CsA: ciklosporin A (cyclosporin A)

DMEM: Dulbecco módosított Eagle médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)

Dox: doxorubicin (doxorubicin)

DTT: ditiotritol (dithiothreitol)

E1S: ösztron-3-szulfát (estrone-3-sulfate)

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav (ethylene glycol-tetraacetic acid)

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)

ER: endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)

FBS: főtális szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)

FCS: fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (fluorescence correlation spectroscopy)

FSC: előre irányuló fényszórás (forward scatter)

FTC: fumitremorgin C (fumitremorgin C)

GFP: zöld fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein)

gl-PBS: 8 mM glükózzal kiegészített PBS

HDL: nagy sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein)

HRP: torma-peroxidáz (horse radish peroxidase)

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

ICL: intracitoszolikus hurok (intra cytosolic loop)

IF: citoplazma felé néző (befelé néző, inward facing)

Krio-EM: krio-elektronmiskroszkópia (cryo-electronmicroscopy)

LH: nagy genomméret (large genome size)

mAt: monoklonális antitest (monoclonal antibody)

MDCK: Madin-Darby kutyavesesejt (Madin-Darby canine kidney)

MDR: multidrog rezisztencia (multidrug resistance)

MDR1: lásd Pgp

MRP1: multidrog rezisztenciához kapcsolódó fehérje 1 (multidrug resistance associated protein 1), szinonímája: ABCC1

MX: mitoxantron (mitoxantrone)

MsbA: Escherichia coli lipid A transzporter

NaF: nátrium-fluorid (sodium fluoride)

NBD: nukleotid-kötő domén (nucleotide binding domain)

NBS: nukleotid-kötőhely (Nucleotide Binding Site)

OF: extracelluláris tér felé néző (kifelé néző, outward facing)

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gel electrophoresis)

PBS: foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline)

PC: foszfatidil-kolin (phosphatidylcholin)

PCC: Pearson-féle korrelációs együttható (Pearson correlation coefficient)

PEG: polietilén-glikol (polyethylene glycol)

Pgp: P-glikoprotein (P-glycoprotein), szinonímái: ABCB1, MDR1

Pi: inorganikus-foszfát, ortofoszfát-ion, PO_4^{3-}

PIC: proteáz inhibitor koktél (protease inhibitor cocktail)

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethanesulfonyl fluoride)

Sav1866: Staphylococcus aureus baktérium ABC transzportere

SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)

SH: kis genomméret (small genome size)

SLO: streptolizin-O (streptolysin-O)

SP1: szelektív promóter faktor 1 (selective promoter factor 1)

SSC: oldalirányú fényszórás (side scatter)

SUR1: szulfonilurea receptor 1, szinonímája: ABCC8 (sulfonilurea receptor 1)

SUR2: szulfonilurea receptor 2, szinonímája: ABCC9 (sulfonilurea receptor 2)

TAP1: antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 1 (transporter associated with antigen processing 1), szinonímája: ABCB2

TAP2: antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 2 (transporter associated with antigen processing 2), szinonímája: ABCB3

TMAO: trimetilamin-oxid (trimethylamine oxide)

TM: transzmembrán (transmembrane)

TMD: transzmembrán domén (transmembrane domain)

Vi: nátrium-ortovanadát (sodium orthovanadate)

Bevezetés és irodalmi áttekintés

I. Az ABCG2 és a P-glikoprotein

Bevezetés

A humán ABCG2 és a P-glikoprotein (Pgp, ABCB1) elsődlegesen aktív, exporter típusú ABC transzporterek, melyek számos főként hidrofób vagy amfipatikus xeno- és endobiotikumot képesek eltávolítani a sejtekből, mint például kemoterápiás szereket és toxikus metabolikus melléktermékeket. Tumorsejtekben (ABCG2, Pgp) vagy tumor őssejtekben (ABCG2) expresszáldva multidrog rezisztenciát okozhatnak, mely gyakran hozzájárul a daganatok eliminálását célzó kemoterápia sikertelenségéhez. Mindkét fehérje főként a szervezet barrier-funkciókkal rendelkező szöveteiben expresszáldik, beleértve a vér- vagy gátat, a vér-here gátat, a beleket, a májat, a méhlepényt, a veséket és az emlőmirigyeket [1-3]. Szöveti lokalizációjuk, valamint széles szubsztrát-spektrumuk miatt fontos szerepet játszanak a különböző betegségek kezelésére használt gyógyszerek felszívódásában, szervezeten belüli eloszlásában, eliminációjában és toxicitásában (ADME-Tox) [4, 5]. Másrészt a genetikai polimorfizmusok, amelyek az ABCG2 vagy az ABCB1 expressziójának csökkenését és/vagy működésének károsodását eredményezik, megváltozott terápiás választ és a gyógyszeres kezeléssel összefüggő toxikus reakciókat okozhatnak [6, 7]. Mivel az ABCG2 a húgysav eliminációs útvonalának is kulcsszereplője, csökkent expressziója vagy működése hiperurikémiát és köszvényt okozhat [7-9]. Fiziológiai funkcióik és betegségek patomechanizmusában, valamint a gyógyszer rezisztencia kialakulásában betöltött szerepük miatt fontos gyógyszer célpontok, mely szükségessé teszi működési mechanizmusuk részletes megismerését.

A daganatsejtek gyógyszer rezisztenciája és a multidrog rezisztencia

A daganatos betegek citosztatikumok iránti érzékenysége rendkívül variábilis, amelyet egyéni biológiai paramétereik, genetikai eltéréseik jelentősen befolyásolnak. A kemoterápia sikertelenségéért egyes betegekben a daganatos sejtek már eleve meglévő „intrinsic” rezisztenciája (elsődleges rezisztencia) vagy a kemoterápia során kialakuló „szerzett” rezisztencia tehető felelőssé [10].

A citosztatikumoknak ellenálló tumorokban számos mechanizmus eredményezheti a daganatsejtek túlélését, például csökkenhet a kemoterápiás szerek támadáspontjául szolgáló

fehérjék mennyisége, apoptotikus útvonalak gátlódhatnak [11], különféle védekező mechanizmusok aktiválódhatnak, mint például a gyógyszermolekulák detoxifikációja [12, 13], valamint a sérült DNS javítása [14]. A tumorsejtek védekező mechanizmusai közül az egyik legmeghatározóbb a széles szubsztrátspektrumú ATP-függő transzporterek fokozott kifejeződése, melyek képesek a citosztatikumokat a sejtekből eltávolítani mielőtt azok kifejthetnék intracelluláris hatásukat a sejtek rezisztenciáját okozva [15, 16]. Utóbbi jelenséget az 1970-es években Biedler és mtsai *in vitro* is megfigyelték. Azt is kimutatták, hogy ha daganatos sejtvonalakat kezeltek citosztatikumokkal, olyan szelektált sejtvonalak jöttek létre, amelyek nemcsak az adott szelektáló ágensre, hanem számos más, szerkezetileg is eltérő daganatellenes szerre is rezisztenssé váltak. Abban az esetben, ha a sejt kereszt-rezisztenciát mutat különböző, szerkezetében és hatásmechanizmusában is eltérő vegyülettel szemben, multidrog rezisztenciáról (MDR) beszélünk.

1976-ban Juliano és Ling azonosítottak egy 170 kDa méretű fehérjét, amelyet összefüggésbe hoztak a daganatos sejtek MDR-jával. Később a fehérjét kódoló gént MDR1-nek, a fehérjét pedig P-glikoproteinnek (Pgp, a „P” a permeabilitás szóból ered) nevezték el a plazmamembrán csökkent drog permeabilitására utalva. Kimutatták, hogy a Pgp szerepet játszik számos a daganatok kemoterápiájában alkalmazott vegyület, pl. antraciklinek, taxánok, etopozid és mitoxantron (MX) sejtekből történő eltávolításában [17]. Később Bell és mtsai. klinikai mintákban is sikeresen detektálták a fehérjét.

Hamarosan világossá vált, hogy a Pgp mellett egyéb transzporterek is szerepet játszhatnak a MDR kialakításában. Cole és mtsai 1992-ben egy új drog rezisztencia gént azonosítottak, doxorubicinnel (Dox) szelektált kissejtes tüdő karcinóma sejtvonalon (H69/AR), amely a multidrog rezisztencia-asszociált protein (MRP1) nevet kapta. Az MRP1-et a Pgp-hez hasonló széles szubsztrát specificitással jellemezték. Doyle és mtsai újabb drog rezisztenciáért felelős fehérje jelenlétéről számoltak be 1998-ban egy Dox szelektált emlőkarcinóma sejtvonal tanulmányozása során (MCF-7 Adr/Vp), amelyhez a Pgp kifejeződésének elkerülése érdekében verapamilt, egy Pgp gátlószert adtak. A drog rezisztenciát okozó fehérjét később a sejtvonal eredetére utalva mellrák rezisztencia proteinnek (BCRP = breast cancer resistance protein) nevezték el. Allikmets és mtsai ezzel párhuzamosan a fehérje magas expresszióját írták le a placentában és ezért placenta specifikus ABC fehérjeként (ABCP) hivatkoztak rá. MX szelektált vastagbél karcinóma sejtvonalon (S1-M1-80) Miyake és mtsai szintén detektálták a gén kifejeződését, amelyet MX rezisztencia génnek neveztek el (MXR). A BCRP/ABCP/MXR később az ABCG2 nevet kapta.

Számos kutatócsoport kimutatta, hogy a Pgp, az ABCG2 és az MRP1 szubsztrátjai közé tartozik a daganat terápiában használt citosztatikumok többsége [18, 19], így ezek a transzporterek fontos szerepet játszanak a MDR kialakításában drogszelektált daganatos sejtvonalakon. Annak ellenére, hogy ezen transzporterek expressziós szintje a terápiára rezisztens páciensek mintáiban messze elmarad az in vitro körülmények között szelektált sejteken tapasztalt transzporter szintektől, szerepüket a MDR létrejöttében egyre több in vivo adat is alátámasztja. A multidrog transzporterek megemelkedett expressziós szintje többnyire korrelál a tumor grádusával [20, 21], valamint jelenlétük negatívan befolyásolhatja a betegség prognózisát. Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben számos próbálkozás történt a Pgp és az ABCG2 funkciójának specifikus gátlására, a klinikumban is biztonságosan alkalmazható megoldást még nem találtak. A gyógyszer rezisztenciában szerepet játszó transzporterek katalitikus ciklusának felderítése új, az eddigieknél hatékonyabb terápiás eljárások kialakításához vezethet, melyek személyre szabott alkalmazása a daganatos betegek gyógyulási esélyeit jelentős mértékben növelheti.

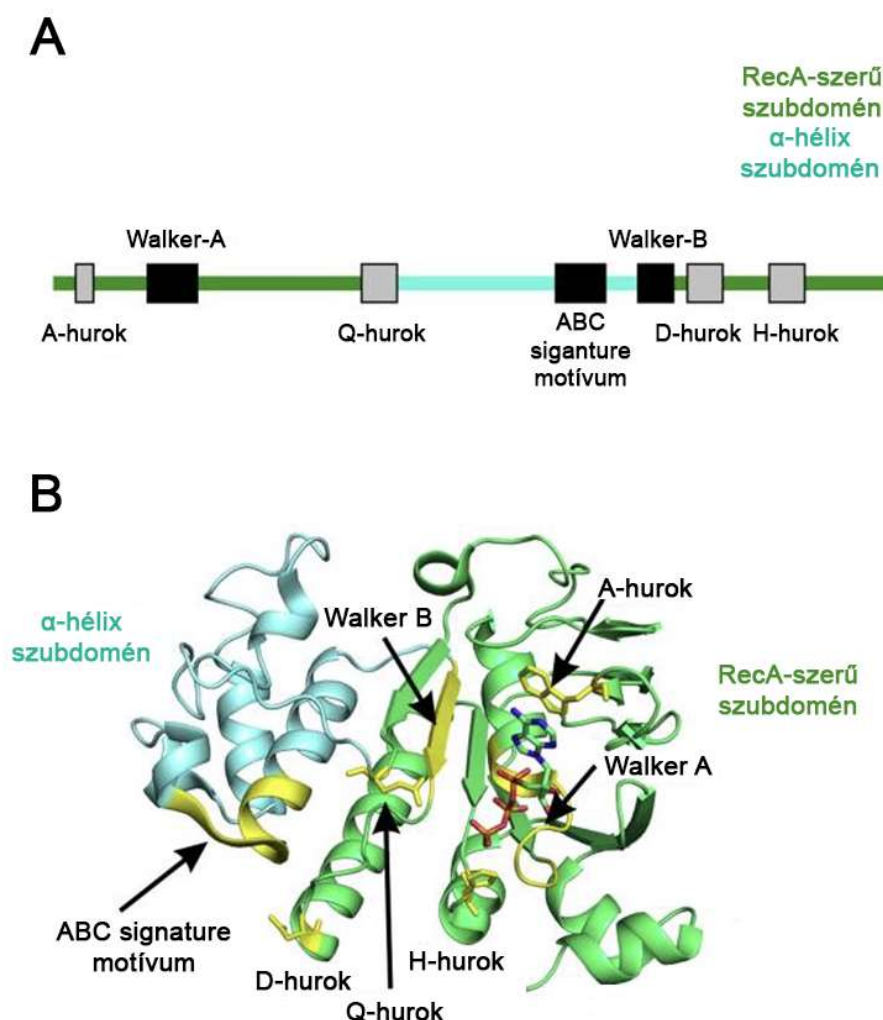
Az ABC kazettás fehérjecsalád

Az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjék alkotják az egyik legnépesebb fehérjecsaládot, melynek tagjai a baktériumoktól az emberig minden élőlényben megtalálhatóak [22]. Közös jellemzőjük az ATP-kötőhely szerkezetének nagyfokú konzerváltsága, valamint az ATP megkötésének és hasznosításának hasonlósága. Az ABC fehérjéket három konzervált szekvencia motívum megléte jellemzi. Ezek az ATP-kötő fehérjékre átlánosan jellemző Walker A szekvencia (GXXGXGKS, ahol az X bármilyen aminosavat jelölhet), a Walker B szekvencia (hhhhD, ahol a h hidrofób aminosavat jelöl), valamint a kizárólag az ABC fehérjékre jellemző „ABC-signature” (LSGGQQ/R/KQR) motívum (**1. ábra**).

Az ABC-transzporterek általánosan két szerkezetileg és funkcionálisan is eltérő doménből épülnek fel: a citoplazmában elhelyezkedő, globuláris szerkezetű nukleotid-kötő doménből (NBD), amely a fehérje katalitikus centruma, itt történik az ATP megkötése és hidrolízise, biztosítva ezzel az energiát a szubsztrátok transzportjához; valamint a membránba ágyazott transzmembrán doménből (TMD), amely a szubsztrát-kötőhelyeket és a szubsztrát transzlokációs útvonalat alakítja ki.

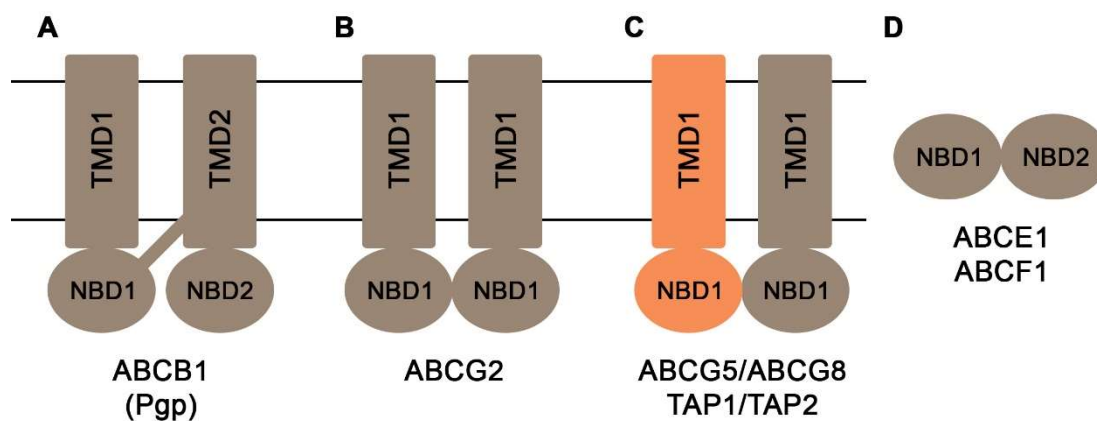
A két NBD által kialakított ATP-kötőhelyekre a fehérjecsaládon belül jellemző a fent említett nagyfokú evolúciós konzerváltság. Az NBD-k tartalmaznak egy Rec-A-szerű béta-

redős szerkezetet, amely magába foglalja a Walker A (P-hurok) és Walker B szekvencia motívumokat, valamint egy főleg α -hélixekből álló szubdomént, melyben az ABC „signature” motívum, valamint a Q- és H-hurkok találhatók meg [23, 24]. Számos ABC fehérjében, pl. a Pgp-ben is megfigyelhető mindkét NBD-ben egy N-terminális elhelyezkedésű aromás aminosavat tartalmazó hurok (A-hurok), amely szerepet játszhat az ATP adeninjének megkötésében [25]. Érdekes módon az ABCG2-ből az A-hurok hiányzik. A két ATP megkötése a két NBD szoros asszociációjával, az ún. „szendvics-dimer” létrejöttével valósul meg, melyben az egyik NBD-ben lévő A-hurok, Walker A, Q-hurok, Walker B és H-hurok a másik NBD „ABC-signature” és D-hurok motívumával közösen alakítja ki az egyik nukleotid-kötőhelyet (NBS1: Nucleotide Binding Site 1) (1. B ábra), míg a másik kötőhely (NBS2) ennek a tükörképe.



1. ábra: A nukleotid-kötő domének (NBD-k) konzervált szekvencia motívumai. Az NBD-k Rec-A-szerű béta-redős szerkezetében foglalnak helyet a Walker A (P-hurok) és Walker B szekvencia motívumok. Az ún. ABC „signature” motívum, valamint a Q- és H-hurkok egy főleg α -hélixekből álló szubdoménben találhatók. Orelle és mtsai munkája alapján [26].

A TMD-k általában 6 membránon átívelő α -hélixből épülnek fel. Egy funkcióképes ABC fehérje többnyire legalább két NBD és két TMD egységből áll. Az ABC fehérjék csoportosíthatók domén szerkezetük alapján, így megkülönböztetünk teljes transzportereket, fél-transzportereket és nem transzmembrán fehérje típusú ABC fehérjéket (2. ábra).



2. ábra: Az ABC transzporterek domén szerkezetük alapján történő csoportosítása. Az ABCB1 a teljes transzporterekhez (A), a homodimer ABCG2 (B), valamint a heterodimer ABCG5/ABCG8 és TAP1/TAP2 a fél-transzporterek csoportjába tartozik (C). A nem transzmembrán fehérje típusú ABC fehérjék csoportjának képviselői az ABCE1 és ABCF1 (D) [27, 28].

Az ABCE és ABCF család képviselői TMD nélküli ATP-kötő domének, melyek nagyobb fehérje komplexek részeként a fehérjeszintézist és expressziót regulálják [18]. Abban az esetben, ha egyetlen polipeptid lánc tartalmazza mind a négy domént (2 NBD és 2 TMD), teljes transzporterekről beszélünk, ilyen például a humán Pgp. A fél-transzporterek csak egy TMD és egy NBD egységből állnak, így a működőképes fehérje két polipeptidlánc homo- vagy heterodimerizációjával jön létre. Ilyen fél-transzporter például a humán ABCG2 (homodimer), a humán TAP1/TAP2 (heterodimer) vagy a *Staphylococcus aureus* multidrog efflux transzportere a Sav1866 (homodimer), amely a humán Pgp homológja [29]. Prokarióták esetében előfordulhat, hogy a négy domént külön gének kódolják, amelyekről átíródó fehérjék funkcionálisan aktív transzporterré oligomerizálódnak a membránban [30-32].

A humán ABC fehérjék és a hozzájuk kapcsolódó betegségek

A humán genomban 48 ABC fehérjét kódoló gént azonosítottak [33, 34], melyeket hét alcsoportba (ABCA-ABCG) soroltak aminosav szekvencia homológiájuk alapján. A legtöbb ABC fehérje transzmembrán fehérje és a plazmamembránban vagy sejtorganelumok

membránjában kifejeződve különböző ionok vagy molekulák transzportjában vesz részt [35]. Találkozhatunk olyan fehérjékkel, amelyek ioncsatornaként működnek, mint például az ABCC7/CFTR (cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor), mely egy ATP-függő klorid-ion csatorna [36] vagy ioncsatorna fehérjék működésének szabályozásában vesznek részt, mint például az ABCC8/SUR1 (szulfonilurea receptor 1), amely a hasnyálmirigy β -sejtjeiben a Kir6.2 kálium-ion-csatornák ATP-függő kapuzásában játszik szerepet [37]. Az ABC transzporter család más képviselői részt vesznek többek között az MHC I-függő antigén prezentációban (TAP1/TAP2), a lipid anyagcserében (pl. ABCA1), a húgysav szerkezetből történő eltávolításában (ABCG2), valamint számos, a májban keletkező glükuronid és glutation konjugátum epébe történő kiválasztásában (pl. ABCC1) [38].

A humán ABC fehérjéket lokalizációjuk alapján is csoportosíthatjuk. Találunk olyan ABC transzportereket, amelyek a plazmamembránban fejeződnek ki (Pgp, ABCG2), olyanokat, amelyek az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában expresszálódnak, mint például a TAP1/TAP2 heterodimer [39], illetve a peroxiszómák membránjában pedig az ABCD1 lipid transzporterrel találkozhatunk [40]. Az ABCB7, az ABCB8 és az ABCB10 pedig a mitokondriumok membránjában bonyolítanak transzport folyamatokat [41-43].

Ezek alapján belátható, hogy az ABC transzporterek számos élettani folyamatban kulcsfontosságú szerepet töltenek be, ebből adódóan több örökletes betegség köthető az aktivitásuk vagy expressziójuk csökkenéséhez vezető mutációkhoz (**1. táblázat**) [33, 44]. Számos ABC fehérje, pl. az ABCA1, ABCB4, ABCB11, valamint az ABCD1 a lipidanyagcsere fontos szereplője. Az ABCA1 fiziológiás körülmények között a foszfolipideket és a felesleges koleszterint exportálja a sejtekből. A transzporter mutációi az autoszomális recesszíven öröklődő Tangier betegséget okozzák, amely következtében károsodhat az apolipoprotein A-1 (ApoAI) képződése, alacsony HDL (high density lipoprotein) szintet eredményezve, valamint koleszterin észterek felhalmozódását a makrofágokban és egyéb retikuloendoteliális sejtekben (pl. mandulákban, nyirokcsomókban, csecsemőmirigyben vagy a lépben) [45]. A betegség következtében megnövekszik az ateroszklerózisra, valamint a szív- és érrendszeri betegségekre való hajlam. Az ABCD1 zsírsavakat transzportál a peroxiszómákba, ahol azok lebontásra kerülnek. A fehérje mutációja következtében hosszú szénláncú zsírsavak halmozódnak fel többek között a központi idegrendszerben, demielinizációt, illetve neurodegenerációt okozva, amely az adrenoleukodisztrófia kórkép kialakulását eredményezi [46].

Különböző ABC transzporterek végzik a hepatocitákból az epesók, foszfatidilkolin (PC), koleszterin, valamint különféle endobiotikumok és xenobiotikumok epébe történő

transzportját. Az ABCB4 a hepatociták kanalikuláris membránjában expresszálódik és a PC epébe történő kiválasztásában vesz részt, melynek fontos szerepe van az epesók májkárosító hatásának kivédésében. A transzporter mutációja hármastípusú progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázist eredményezhet. A kórkép előrehaladott állapotában májtranszplantáció nélkül halálos kimenetelű lehet [47]. Az ABCB11 epesókat exportál a hepatocitákból az epébe. Funkcióvesztése kettes típusú familiáris intrahepatikus kolesztázis kialakulásához vezethet, amelyet toxikus epesók felhalmozódása jellemez a hepatocitákban. Az ABCC2/MRP2 funkcióvesztéses mutációja Dubin-Johnson szindrómát okoz, amely a vér bilirubin szintjének jelentős emelkedésének következtében sárgasághoz vezethet [48].

Az ABCC6 fiziológiásan ATP-t szállít a májsejtek bazolaterális membránján keresztül a máj szinuszoidjaiba, ahol az ATP pirofoszfáttá (PPi) alakul, amely a kötőszöveti meszesedés jól ismert gátlója [49]. A transzporter mutációja a Pseudoxanthoma elasticum betegséget okozza, amely során jelentősen csökken a PPi-koncentrációja a vérben, ami hidroxipatit-csapadék képződésén keresztül érrendszeri és lágy szöveti kalcifikációt (elmeszesedett elasztikus rostok) eredményez. A bőrön papulák, a retinán pedig angioid csíkok keletkezhetnek, amelyek szubretinális neovaszakularizációval társulva vérzések során a centrális látás részleges vagy teljes elvesztéséhez vezethet [50].

Az ABCA4 fehérje defektusa tehető felelőssé a Stargardt betegség autoszomális recesszív módon öröklődő formájáért. A betegségben fiatalkori makula degeneráció, sárgás foltozottság és atrófiás elváltozások figyelhetők meg a makulán, valamint a centrális látás csökkenése tapasztalható a toxikus retinol származékok felhalmozódása miatt. A betegség súlyosabb formáiban akár vakság is kialakulhat [51].

Az ER membránjában expresszálódó ABCB2/ABCB3 (TAP1/TAP2) heterodimer alkotja a TAP komplexet, amely 8-15 aminosavakból álló peptidek citoplazmából az ER lumenébe történő transzportjában vesz részt. Az ER lumenében a peptidek MHCI molekulákkal komplexet alkotnak, majd a sejtfelszínre jutva fontos szerepet töltenek be az antigén prezentációban [39]. A TAP komplex bármelyik alegységét kódoló gén mutációja az antigén feldolgozás károsodásához, valamint az MHCI expresszió csökkenéséhez vezet a limfociták felszínén. Az ebből eredő károsodott immunválasz bakteriális fertőzésekre való fokozott fogékonyságot eredményez [52-54].

A mukoviszcidózis/cisztikus fibrózis (CF), amely a kaukázusi populációban az egyik leggyakoribb öröklődő betegség, egy több szervet érintő kórkép, amely a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia szabályozó fehérje (CFTR, ABCC7) funkcióvesztéses mutációihoz kapcsolódik, melyet leggyakrabban a NBD1-ben található F508 aminosav

deléciója eredményez. Ez a defektus a fehérje rendellenes feltekeredéséhez, majd a proteaszómákban történő lebomlásához vezet, ami a funkcionális CFTR klorid-ion csatornák hiányát eredményezi az epitél sejtek apikális membránjában [36]. A CFTR fiziológiásan a tüdőbronchusok, -bronchiolusok és egyéb szervek (pl. vékonybél, hasnyálmirigy, ivarszervek) epitél sejteinek membránjában expresszálandó, ATP-hidrolízis és cAMP-függő foszforiláció által kapuzott klorid-ion csatorna. CF betegekben a hörgők epitélsejtjei által kiválasztott váladék ionösszetétele megváltozik, amely viszkózus nyák felszaporodásához vezet a légutakban. A koncentrált nyák táptalajként szolgálhat különböző baktériumok számára. A CF egyik fő tünete a súlyos, visszatérő légúti fertőzés, amelyet a légutak felszínét borító nyák rendellenes összetétele és az ennek következtében csökkent „mukociliáris clearance” okoz [55].

Az itt bemutatott betegségek többségét egy ABC fehérje rendellenes feltekeredése okozza, ami proteaszómális lebomláshoz és a fehérje csökkent sejtfelszíni expressziójához vezethet [56]. Ennek kiküszöbölése érdekében különféle kémiai korrektorokat fejlesztenek, mint például a 4-PBA (4-phenylbutyric acid), VX-809, trimetilamin-oxid (TMAO), polietilén-glikol (PEG), amelyek alkalmasak lehetnek több hibás ABC fehérje működésének javítására [57-60]. A krio-elektronmikroszkópia (krio-EM) fejlődése lehetővé teszi, hogy szerkezeti betekintést nyerjünk az ABC transzporterek mellett a kémiai chaperonok működésébe is [56, 61], ami megalapozhatja új, hatékonyabb kémiai korrektorok szerkezetalapú fejlesztését.

1. táblázat: A humán ABC fehérjékhez kapcsolódó betegségek

Név (egységes nevezéktan)	Hagyományos elnevezés	Feltételezett funkció	Kapcsolódó betegség
ABCA1	ABC1	foszfolipid- és koleszterin transzport	Tangier-betegség, Familiáris HDL hiány, érlemezésedés, Alzheimer kór
ABCA3	ABC-C	foszfolipid transzport	Újszülöttkori RDS (surfactant hiány), tüdőfibrózis, veleszületett szürkehályog
ABCA4	ABCR	N-retinil-PE transzportja a retinába	Stargardt betegség, retinitisz pigmentóza, időskori makula degeneráció
ABCA7	ABCX	koleszterin transzport	Alzheimer kór
ABCA12	-	keratinocita lipid transzporter	Harlequin ichtiózis, lamelláris ichtiózis
ABCA13			skizofrénia, bipoláris depresszió, depresszió
ABCB1	Pgp, MDR1	xenobiotikum export	multidrog rezisztencia (MDR)
ABCB2	TAP1	MHC I-típusú antigénprezentáció	Immundeficiencia, Insulinfüggő diabetes, Bechterew-kór, arthritis kockázat
ABCB3	TAP2	MHC I-típusú antigénprezentáció	Immundeficiencia, Insulinfüggő diabetes, Bechterew-kór, arthritis kockázat
ABCB4	MDR3 (PGY3?)	foszfatidil-kolin szekréció az epébe	Progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis-3
ABCB6		mitokondriális porfirin	letális újszülöttkori metabolikus

		transzport	szindróma (?)
ABCB7	ABC7	mitokondriális porfirin transzport	szideroblasztos anémia és ataxia
ABCB11	BSEP, sister Pgp	kanalikuláris epesó szekréció	progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis 2 (PFIC2), terhességi intrahepatikus kolesztázis, újszülöttkori légzési distressz-szindróma
ABCC1	MRP1	szerves anionok, glükuronidok és szulfátok exportja	multidrog rezisztencia (MDR)
ABCC2	MRP2	anionok szekréciója az epébe	Dubin-Johnson szindróma
ABCC5	MRP5	ciklikus nukleotid transzport (cAMP, cGMP)	Öröklött hipertrichózis
ABCC6	MRP6	ATP transzport	Pszeudoxantóma elasztikum
ABCC7	CFTR	kloridcsatorna (regulátor)	Cisztikus fibrózis, pankreatitisz, bronchiectázia, kongenitális bilaterális vas deferens hiány
ABCC8	SUR1	ATP-függő K ⁺ - csatorna regulátor a pankreász β sejtjeiben	Gyermeckori familiáris hiperinzulinémiás hipoglikémia
ABCC9	SUR2	ATP függő K ⁺ csatorna szabályozása	Cantú szindróma
ABCD1	ALDP	peroxisómális zsírsav transzport	Adrenoleukodisztrófia, adrenomieloneuropátia
ABCD2	ALDL1	peroxisómális zsírsav transzport	Adrenoleukodisztrófia, Zellweger-szindróma
ABCD3	PMP70	peroxisómális zsírsav transzport (dikarboxil-zsírsavak)	Hepatosplenomegália, májbetegség
ABCD4	PMP69	lizoszómális kobalamin és B12 transzport	A B12 vitamin metabolizmus veleszületett zavara
ABCG2	BCRP	húgysav transzport	Köszvény, hiperurikémia, MDR
ABCG5, ABCG8	-	szterolok szelektív transzportja	Sztioszterolémia, szívkoronár-betegség, epekő

Az *ABCG2* és *ABCB1* gének és szabályozásuk

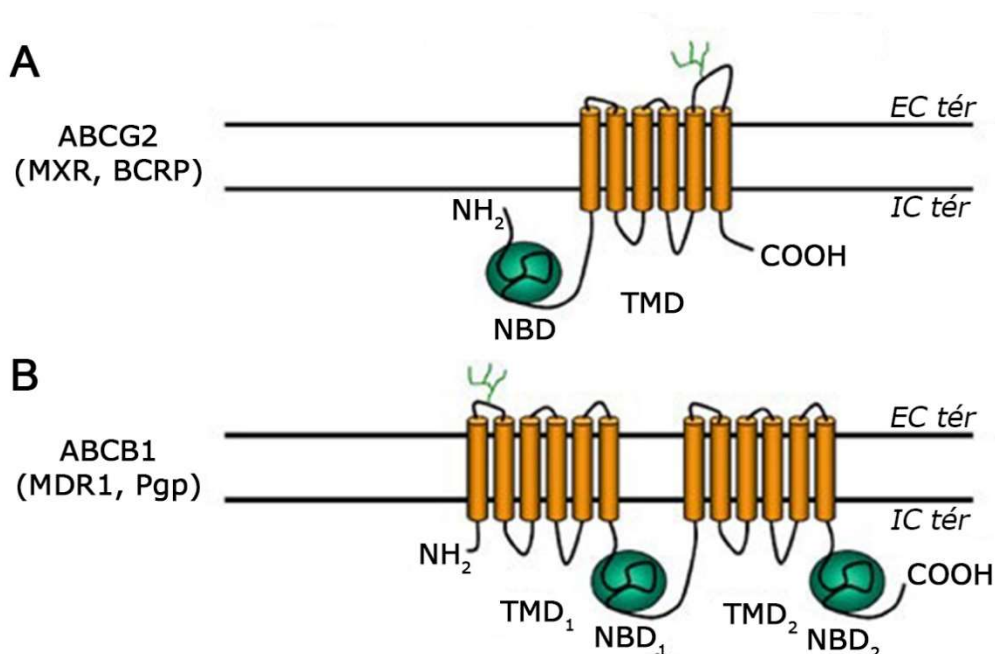
Az ABCG alcsaládba tartozó humán ABCG2 fehérjét kódoló gén a 4-es kromoszóma hosszú karján található (4q21- 22), több mint 60 kb nagyságú, 16 exon és 15 intron építi fel. A promótere nem tartalmaz TATA boxot, azonban számos Sp1 (szelektív promóter faktor 1:GC bokszoikat tartalmazó promóter régiójú gének transzkripciójához szükséges), AP1 és AP2 (Aktivátor protein-1-2) kötőhelyet találunk, amelyeket más ABC-fehérjék esetén is megfigyeltek [62]. Az ABCG2 gén expressziójának szabályozási útvonala még nem teljesen tisztázott. Valószínűsíthető, hogy a hipoxiának [63], a nemi hormonoknak [64], valamint a DNS metilációjának is szerepe van az ABCG2 gén szabályozásában [65].

A humán Pgp az ABC fehérjék B alcsaládjának első tagja (ABCB1), melyet a 7-es kromoszóma hosszú karján (7q21.1) található *ABCB1* (*MDR1*) gén kódol [66]. Az *ABCB1* gén több, mint 100 kb nagyságú, amely 28 intront és 29 exont tartalmaz [67]. Az ABCG2-höz hasonlóan az ABCB1 promótere sem tartalmaz TATA box-ot, amely hiányában a

transzkripció az úgynevezett iniciátor (Inr) elemről indul [68]. Ezen kívül találhatunk még a TATA-box nélküli promóterekre jellemző szekvenciák közül GC-boxokat, amelyekhez az Sp család tagjai (Sp1 és Sp3) kötődnek [69]. Az ABCB1 kifejeződésének szabályozásában feltehetőleg fontos szerepet kapnak különféle tumor szupresszorok, onkogének, hősokk-faktorok, hipoxia-indukálta faktorok, illetve magi receptorok is [70-74].

Az ABCG2 és Pgp szerkezeti felépítése

Az ABCG2 egy 72-kD nagyságú, 665 aminosavból felépülő „féltranszporter”, amelyet egy N-terminálisan elhelyezkedő NBD és egy C-terminális 6 transzmembrán α -hélixből felépülő TMD alkot (**3. A ábra**), melyből a funkcióképes transzporter homodimerizációval jön létre [75].



3. ábra: Az ABCG2 (A) és a Pgp (B) membrán topológiája. A két transzporterben különböző az NBD-k orientációja, a fehérje N-terminálisan helyezkedik el az ABCG2-ben, míg a C-terminálison található a Pgp-ben. A kép forrása: Váradi és mtsai munkája [76] alapján módosítva.

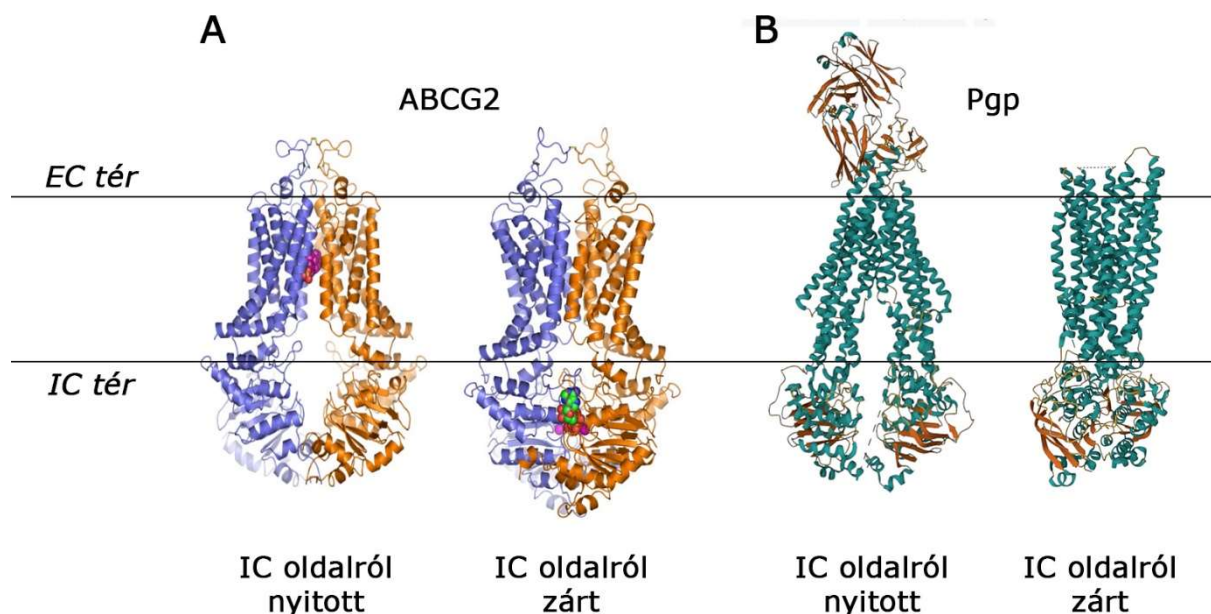
A Pgp egy 170 kDa tömegű, 1280 aminosavból álló „teljes transzporter”, melyben egy polipeptidlánc tartalmazza a két egyenként hat transzmembrán szegmensből felépülő TMD-t és a két NBD-t (**3. B ábra**). A fehérje két fele, melyeket egy 75 aminosavból álló flexibilis linker kapcsol össze [77, 78], nagyfokú aminosav szekvencia homológiát mutat [79]. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a Pgp egy ősi féltranszporterből jött létre génduplikációs esemény során [80, 81], bár az is elképzelhető, hogy két fél-transzporter fúziójával alakult ki [82].

Számos ABC transzporter kristályszerkezete, valamint biokémiai és biofizikai kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy az eukarióta ABC transzporterek működésük során hasonló konformációs állapotokat vesznek fel [83-86]. Ezek az intracelluláris tér felé nyitott, „befeelé néző” („inward facing”, IF) és az extracelluláris tér felé nyitott, „kifelé néző” („outward facing”, OF) konformációk. ATP-mentes körülmények között a két NBD disszociált, mely az IF TMD konformációt eredményezi, amelyben az ABCG2 és a Pgp fordított „V” alakot formál, középen egy nagy üreggel, ahol a fehérjék szubsztrát-kötő zsebe hozzáférhető a membrán belső rétege és az intracelluláris tér felől is a szubsztrátok számára. Nukleotid kötődést követően a két NBD dimerizációjával létrejön az intracelluláris tér felől zárt, de az extracelluláris tér felé nyitott OF konformer, amelynek szerepe a szubsztrátok eltávolítása az extracelluláris tér felé [87-89].

A membránfehérjék röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározása még mindig kihívást jelent, bár az elektronmikroszkópos (EM) szerkezet vizsgálatok alternatívát jelenthetnek. Azonban érdemes megjegyezni, hogy ezzel a technikával lényegesen alacsonyabb feloldás érhető el, és nem kapunk 3D struktúrákat [90]. A közelmúltban a krio-EM technika tökéletesítése közel atomi szintre növelte a feloldást [91], amely így már megközelíti a röntgen krisztallográfia feloldását. Ezért a krio-EM technika hatékony módszerként szolgálhat a nehezen kristályosítható membránfehérjék szerkezetének felderítésére.

Az első alacsony felbontású ABCG2 szerkezeti adatok a tisztított fehérjék EM analíziséből származtak [92, 93]. Ebben a tanulmányban az ABCG2 (R482G) pontmutált változatát vizsgálták, amely kiszélesíti az ABCG2 szubsztrát specifitást, lehetővé téve olyan anyagok szállítását, mint az antraciklinek [92], vagy a rodamin 123 festék [94]. A fent említett vizsgálatban az R482G-mutáns ABCG2-t rovarsejtekben expresszálták és detergens extrakció, valamint kromatográfia kombinációjával izolálták olyan körülmények között, amelyek valószínűleg megőrizték a fehérje natív szerkezetét. Az ABCG2 szerkezetének felderítésében a következő állomás az ABCG2 molekula modellezése volt, különböző ABC transzporterek nagyfelbontású IF kristályszerkezeteinek felhasználásával. Eleinte a bakteriális multidrog transzporterek, például az *Escherichia coli* lipid A transzporter (MsbA) és a Sav1866 [95, 96] szerkezetét használták, annak ellenére, hogy szekvencia homológiájuk rendkívül alacsony mértékű, illetve ismert különbségek is vannak a domén szerveződésükben. Amint elérhetővé vált, az ABCG2-höz jobban hasonlító humán ABCG5/G8 kristályszerkezetét alkalmazták homológia modellekben [97]. Ezek a vizsgálatok egy citoplazma felé néző homodimert mutattak ki, nagy központi üreggel, amelyet a TMD hélixek szegélyeznek. Később a krio-EM technika fejlődésének köszönhetően sikerült azonosítani az ABCG2 citoplazma felé néző 5D3

Fab kötött állapotát. A teljes felbontás 3,8 Å volt, ami az NBD-ket leszámítva elegendőnek bizonyult a fehérje *de novo* szerkezetének felépítéséhez [98]. Az NBD-k feloldásához a szerzők a rendelkezésre álló ABCG5/ABCG8 homológia modellt alkalmazták [86]. Később ugyanez a csoport közzétett egy újabb tanulmányt [99], amelyben az ABCG2 MZ29-et kötött szerkezetét vizsgálták. Az MZ29 egy szelektív ABCG2 inhibitor, mely a Ko143 származéka. A transzporter szerkezetének felbontását 3,1 Å-re növelték az ABCG2 5D3 Fab (egy ABCG2-specifikus antitest Fab fragmentuma) általi stabilizálásával. Ez a felbontás elég jó volt az NBD-k 3D-s *de novo* szerkezetének felépítéséhez, amely korábban kudarcot vallott [98]. Az ATP-függő konformáció változások nyomonkövetésére Manolaridis és mtsai. egy mutáns transzporter variánst alkalmaztak [100]. A „katalitikus glutamát” cseréje a katalitikus centrumban (E211Q mutáció ABCG2 esetén) drasztikusan csökkenti az ABC fehérjék ATP hidrolízis aktivitását, valamint elősegíti a fehérje ATP kötött állapotban való csapdázását. Két szerkezetet elemeztek krio-EM segítségével: a mutált ABCG2 ösztron-3-szulfát-kötött (E1S; ABCG2 szubsztrát), valamint ATP-kötött szerkezetét (3,6 Å és 3,1 Å felbontással). A szubsztrát-kötött ATP-mentes ABCG2 komplex IF szerkezetet mutatott (**4. A ábra**, bal oldali szerkezet), hasonlóan a korábbi szerkezetekhez [98, 99]. Ezzel szemben a „katalitikus glutamát” mutáns ABCG2 ATP-kötött szerkezete jelentősen eltért a korábbiaktól. Két ATP-molekula kötődése az NBD-k 35°-os elfordulását eredményezte, ami lehetővé tette a két NBD dimerizációját (**4. A ábra**, jobb oldali szerkezet). Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a katalitikus glutamát mutációja befolyásolhatja az ABC transzporterek konformáció változásainak energetikáját. Így előfordulhat, hogy az E211Q mutáns ABCG2 ATP jelenlétében megfigyelt állapota nem reprezentál valódi katalitikus intermediert [101, 102].



4. ábra: Az ABCG2 (A) és Pgp (B) intracelluláris oldalról nyitott- és intracelluláris oldalról zárt konformációi. Mindkét transzporter valószínűsíthetően egy nukleotid mentes, intracelluláris oldalról nyitott (IF), illetve egy nukleotid kötött, intracelluláris oldalról zárt (OF) konformáció között fluktuál katalitikus ciklusa során [100, 103, 104].

A humán Pgp szerkezetéről és topológiájáról az ABCG2-höz hasonlóan eleinte csak alacsony felbontású EM-os [89, 105, 106] felvételek álltak rendelkezésre. A Pgp esetében fontos mérföldkő volt a Sav1866 bakteriális ABC transzporter kristályszerkezetének meghatározása [107], mivel a homodimer fehérje 12 transzmembrán hélixszel rendelkezik, amely egyezést mutatott a Pgp EM vizsgálatainak eredményeivel. A Sav1866 fehérjét ATP-kötött OF konformációs állapotban kristályosították, amelyben az NBD-k szoros kapcsolatban vannak, a TMD-k pedig egy központi üreget alkotnak. Ebben a konformációban a TMD-k által körülvevett központi üreg zárt a lipid kettősréteg belső lemeze felől és a citoplazma irányából, azonban nyitott a külső membrán szegmens felé és az extracelluláris tér irányába [107].

2007-ben meghatározták az MsbA ABC fehérje kristályszerkezetét nukleotid-mentes és nukleotid-kötött állapotban is. Ez alapján valószínűsítették, hogy a nukleotidok kötődése a transzmembrán (TM) hélixek átrendeződését okozza és módosítja a transzporter feltételezett szubsztrát-kötő zsebének hozzáférhetőségét a IF állapotból az OF konformációba [108]. Néhány év múlva meghatározták a humán Pgp-vel 87%-os homológiát mutató egér Pgp kristályszerkezetét is az ATP-mentes IF állapotban, valamint azt is bizonyították, hogy ebben az állapotban a transzporter képes a szubsztrátok megkötésére [85, 109]. Egészen a

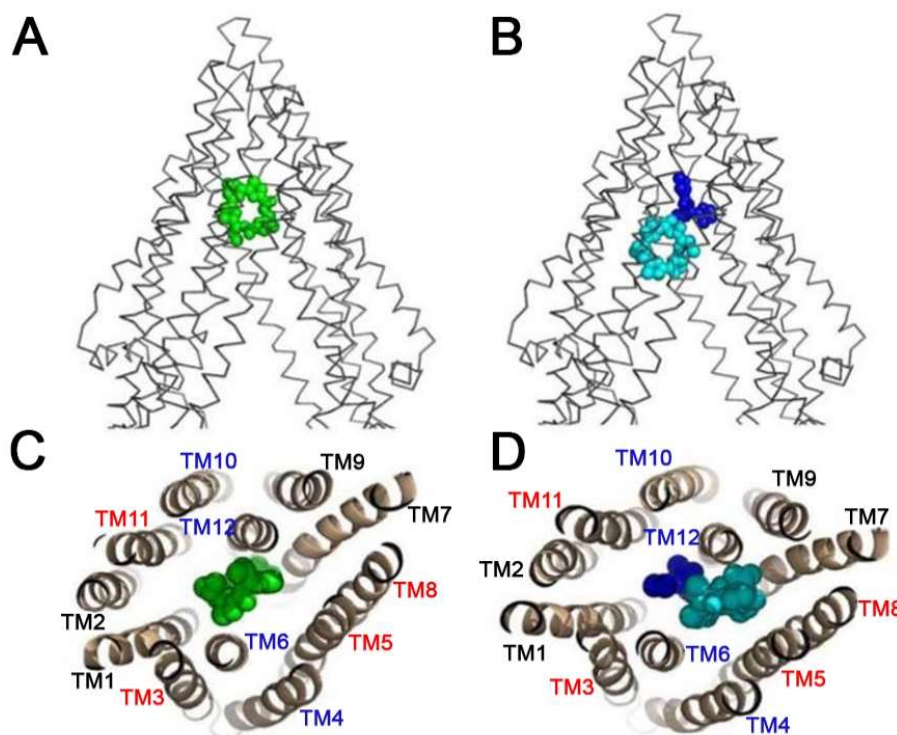
közelmúltig csak a Pgp IF konformációját tudták rögzíteni. Az első OF Pgp-struktúra (CmABCB1 a *Cyanidioschyzon merolae*-ből) 2019-ben jelent meg [109].

Az ABCG2 és a Pgp nagyfelbontású krio-EM struktúrák megerősítették a többi ABC transzporter kristályszerkezete alapján várható konformáció változásokat [83, 84, 110, 111]. Mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy a krio-EM technika által azonosított konformerek a teljes katalitikus ciklus pillanatképeit képviselik csupán. A szerkezeti adatok birtokában rendkívül fontos lehet olyan biokémiai vagy biofizikai vizsgáló módszerek alkalmazása/beállítása, amelyek lehetővé teszik a különböző katalitikus intermedierek közötti átmentek tanulmányozását is.

Transzmembrán domének és a szubsztrát kötés

Az ABC transzporterek szubsztrát-kötőhelyeit, valamint drog transzlokációs útvonalát kialakító TMD-kben sokkal kisebb mértékű az aminosav szekvencia azonosság, mint az NBD-kben. Például a Pgp és az ABCG2 TMD-i egyáltalán nem mutatnak szekvencia hasonlóságot, pedig a két transzporter szubsztrátspektruma részben átfed.

A Pgp-ben a TMD-k két, egyenként 6 TM hélixből álló köteget formálnak, ahol az első köteget a TM 1, 2, 3, 6, 10 és 11 hélixek, míg a második köteget a TM 4, 5, 7, 8, 9 és 12 hélixek alkotják. A TM hélixek egy kb. 6000 Å³ méretű szubsztrát-kötő üreget (zsebet) hoznak létre a membránban [85], amelynek kialakításában fontos szerepe van az 5-ös és 8-as-, valamint a 3-as és 11-es TM hélix-párok kötőhelyet bélelő aminosavainak (**5. ábra**) [112]. A hidrofób szubsztrátok plazmamembránból történő bejutását vélhetőleg a 4-es és 6-os, illetve a 10-es és 12-es TM hélixek által kialakított kapuk segítik elő, amelyek a legszélesebb pontnál 9 Å szélesek [85].

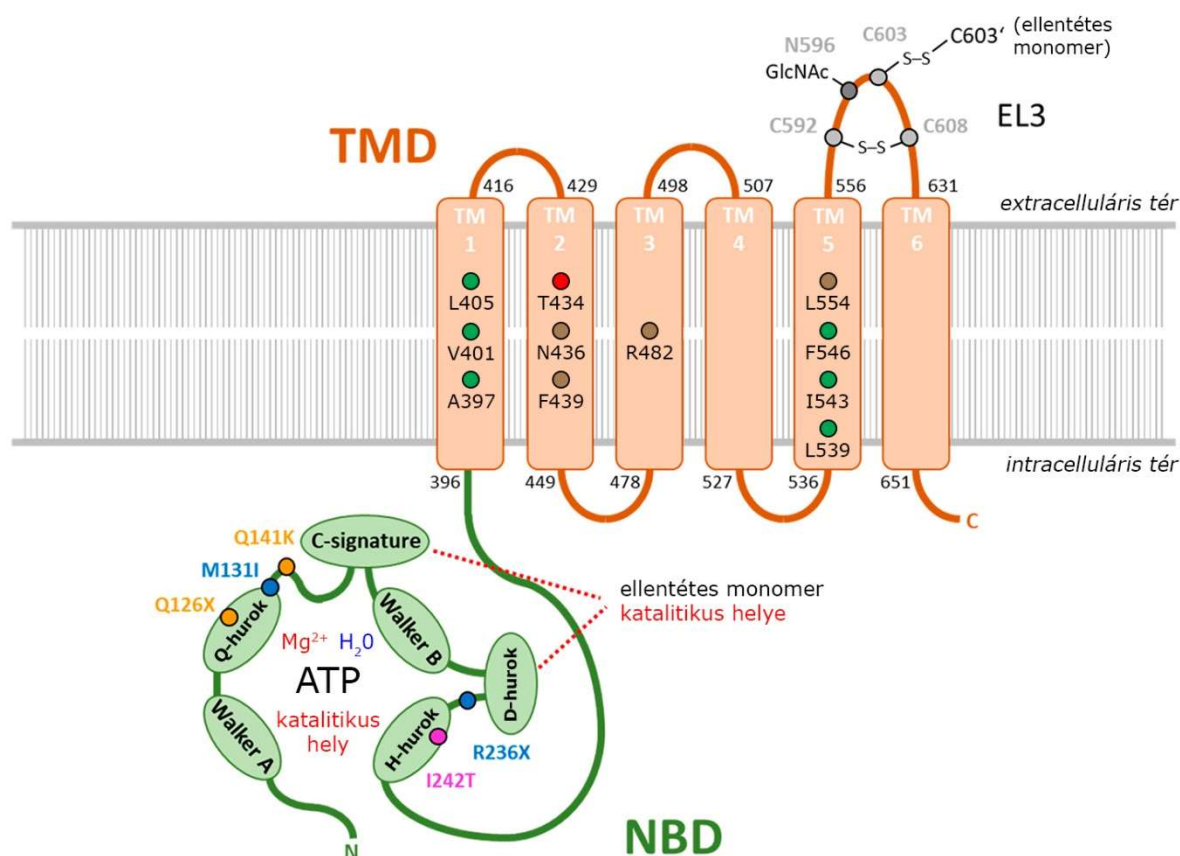


5. ábra: A Pgp TM hélicei által kialakított központi szubsztrát-kötő üreg feltételezett elhelyezkedése (A-B) és felépítése (C-D) a Pgp inhibitor QZ59-RRR (A, C) és QZ59-SSS (B, D) kötődésén keresztül bemutattva. A szubsztrát-kötő üreget valószínűleg a TM3, TM5, TM8 és TM11 hélice alakítják ki, melyeket az ábrán piros színnel tüntettünk fel. A hidrofób szubsztrátok bejutási kapuit a plazmamebránból feltehetőleg a kék színnel jelölt TM4, TM6, TM10 és TM12 biztosítják. A kép forrása: Stephen G. Aller és mtsai munkája [85] alapján módosítva.

A fehérje szubsztrát-kötő zsebe méreténél fogva legalább két szubsztrát molekula szimultán megkötését teszi lehetővé. A szubsztrát-kötő üreget főleg hidrofób és aromás aminosav oldalláncok alkotják, néhány poláris aminosav, valamint két potenciálisan töltött aminosavtól eltekintve.

Az ABCG2 homodimer teljes szimmetriát mutat, hiszen a fehérjében minden szerkezeti elem kétszer ismétlődik. A TM5 és TM6 között az ABC transzporter család többi tagjához képest egy sokkal hosszabb extracelluláris hurok (EL3) figyelhető meg (6. ábra) [113]. Ezen a hurkon az 596-os pozícióban lévő aszpargin N-acetil-glükózamin által módosított funkcionális N-glikozilációt tartalmaz, ami azonban, úgy tűnik, hogy a fehérje lokalizációja és fiziológiai funkciója szempontjából nem tölt be nélkülözhetetlen szerepet [114, 115]. Szintén itt található 603-as pozícióban lévő cisztein, ami szimmetrikus intermolekuláris diszulfid kötés kialakításában játszik szerepet a fehérje homodimerizációja során, azonban a működéséhez szintén nem elengedhetetlen. Az 592-es és 608-as pozícióban található ciszteineknek pedig valószínűleg intramolekuláris kötések létrehozásában van

szerepe [116]. Érdekes módon ezen aminosavak befolyásolják az ABCG2 lokalizációját és transzport funkcióját is [116]. A szubsztrát bejutási kapukat feltehetőleg a TM1 A397, V401 és L405 aminosavai, illetve a TM5 L539, I543 és F546 aminosavai közösen alakítják ki (2. táblázat). A Q141 hidrogén kötésen keresztül szoros kölcsönhatásba lép az N158 aminosavval. Úgy gondolják, hogy ez a kapcsolat a fehérje szerkezetét tekintve fontos, mivel a Q141 polimorfizmusa ABCG2 diszfunkciót és ezáltal hiperurikémiát és köszvényt okozhat [117].

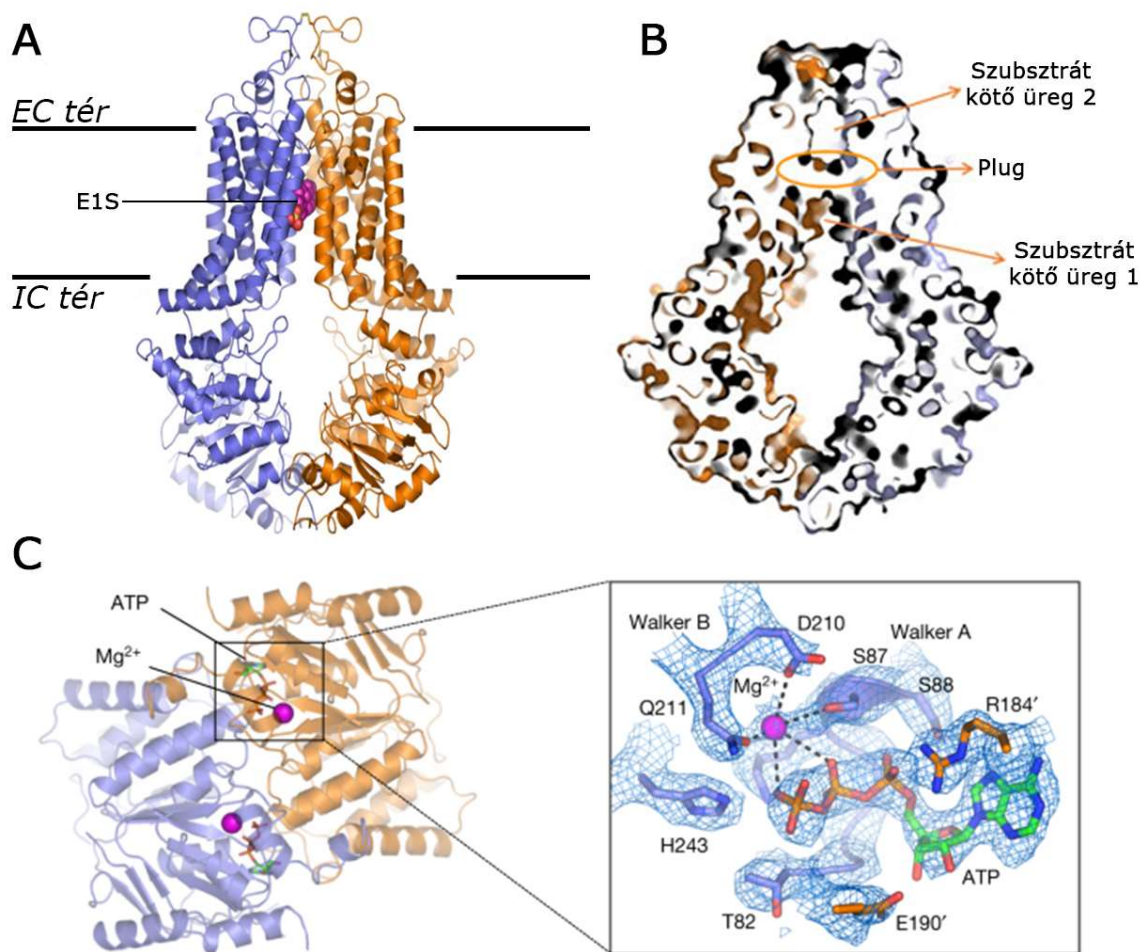


6. ábra: Az ABCG2 szerkezete és funkciója szempontjából fontos aminosavak elhelyezkedése. A megjelölt aminosavak feltételezett szerepét a 2. táblázat mutatja be. Az ABCG2 katalitikus centrumát az egyik monomer Walker A, Q-loop, Walker B és H-hurok szekvenciái, valamint a másik monomer C-signature és D-hurok szekvenciái alkotják. A TMD-n belül a hidrofób szubsztrátok membrán belépési helyét a TM1 és TM5 zöld színnel jelölt aminosavai reprezentálják. A szubsztrát megkötésében részt vevő aminosavak barnával vannak jelölve. Az EL3-ban a diszulfidhidakat kialakító ciszteineket szürke, az N596 pozícióban lévő glikolizációs helyet pedig sötétszürke színnel tüntettük fel. Az ábra Benndorf és mtsai munkája [118] alapján készült.

2. táblázat: Az ABCG2 felépítése és működése szempontjából fontos aminosavak

Aminosav pozíció	Feltételezett funkció	Citáció
A397, V401, L405	TM1-en lévő oldalláncok, amelyek biztosítják a membránban a TM1 és TM5 között a szubsztrát bejutási kapukat	[99]
N436	szubsztrát ösztron-3-szulfát kötés H-kötéssel	[100]
F439	szubsztrát ösztron-3-szulfát kötés	[100]
R482	R482 mutáció szubsztrát specificitás módosulást eredményez, H-kötés a S521-gyel a TM4-en	[94, 98]
L539, I543, F546	TM5a-n lévő oldalláncok, amelyek biztosítják a membránban a TM1 és TM5 között a szubsztrát bejutási kapukat	[99]
L554, L554'	Leucin dugó, szubsztrát kötésben játszott szerep	[98-100]
L555	Strukturális szerep, L555A mutáció diszfunkcionális fehérjét eredményez	[100]
C592	Intramolekuláris diszulfid kötés a C608-cal	[98, 116]
N596	Funkcionális N-glikozilációs hely, GlcNAc kötés	[98, 115]
C603	Intermolekuláris diszulfid kötés a C603-mal	[98, 116]
C608	Intramolekuláris diszulfid kötés a C592-vel	[98, 116]

Az ABCG2 5D3-kötött, citoplazma felé néző krio-EM szerkezete alapján két szubsztrát-kötő üreget valószínűsítene: egy nagy citoplazmatikus oldali üreget (1. üreg), amelyet a központi négy transzmembrán hélix (TH2, TH5, TH2' és TH5') határol, és egy másik az extracelluláris térhez közelebb elhelyezkedő üreget (2. üreg) (7. ábra) [98]. Úgy gondolják, hogy az 1. üreg alkotja a kötőhelyet a lapos, policiklusos és hidrofób tulajdonságokkal rendelkező ABCG2 szubsztrátok számára, felépítésének és aminosav összetételének (többnyire hidrofób aminosavak) köszönhetően. Az extracelluláris oldalon található sokkal kisebb 2. üreget a TMD-k, valamint a TM5 és TM6 között található EL3 közösen alakítja ki. Ez az üreg nem hozzáférhető (zárt) az extracelluláris tér felől az ABCG2 IF konformációjában, illetve érdekes módon nem található meg az ABCG2/ABCG5 heterodimerekben. A 2. üreg belső felülete kevésbé hidrofób az 1. üreghez képest, ami valószínűleg alacsonyabb szubsztrát-kötő affinitást eredményez, és így szerepet játszhat a szubsztrátok extracelluláris térbe történő felszabadulásában [99]. A két üreget egy „leucindugó” (L554 és L555) választja el egymástól, amely szoros hidrofób tömítést képez az 1. üreg tetején az IF konformációban, megakadályozva a szubsztrátok bejutását a 2. üregbe [97, 98]. Az IF konformációt reprezentáló szerkezetekben, amelyeket szubsztrátok vagy inhibitorok jelenlétében azonosítottak, az 1. üreget egy szubsztrát molekula (E1S), vagy pedig egy-két inhibitor molekula (MZ29) foglalja el [119]. Az E1S molekula mélyen az 1. üreg belsejében kötődik, majdnem félúton a membránban. Az ABCG2 kétoldali szimmetriája miatt a szubsztrátok két lehetséges orientációban kötődhetnek, amit főként az N436 és F439 oldalláncok koordinálnak.



7. ábra: Az ABCG2 szubsztrát és nukleotid kötése. Az ABCG2 szubsztrát-kötött (E1S: lila színnel) IF szerkezete (A), a feltételezett szubsztrát kötő üregek (szubsztrát kötő üreg 1-2), illetve az azokat elválasztó leucin dugó (plug) (B). Az ABCG2-t felépítő monomerek lila és narancsszínnel vannak ábrázolva. Az ábra C részén az ATP-kötött NBD dimer szerkezete látható, a kinagyított panelen pedig az ATP és Mg^{2+} megkötésében szerepet játszó konzervált aminosavak vannak feltüntetve. Az ábra Kaspar P. Locher és mtsai [100] munkája alapján készült.

Szubsztrát kötődés, illetve a transzport kinetikai vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a Pgp-nek minimum három vagy négy különböző drog-kötőhelye van a szubsztrát-kötő üregeken belül, amelyek között különféle allosztérikus kölcsönhatások lehetnek [120]. Ilyen a H-hely, amely Hoechst 33342 (H33342), kolhicin és ciklosporin A (CsA) megkötésére képes, az R-hely, ami rodamin 123-, daunorubicin- és doxorubicin-specifikus, valamint a P-hely, ami prazozin és progeszteron felismerésére képes [121, 122]. Irodalmi adatok alapján a rodamin 123 és az LDS-751 képes szimultán kötődni a Pgp szubsztrát-kötő üregébe [123]. Pozitív allosztérikus hatás valószínűsíthető a rodamin 123 és a H33342 esetében, mivel stimulálják egymás transzportját [122]. A Pgp-hez hasonlóan, antraciklinek (daunorubicin és doxorubicin) ABCG2 általi transzport kinetikáját vizsgálva két kötőhely jelenlétét mutatták

ki, amelyek alloszterikus kölcsönhatásokat mutatnak más szubsztrátokkal [124]. Azonban, hogy ezeket a kölcsönhatásokat a térben elkülönülő szubsztrát-kötőhelyek közötti allosztérikus kölcsönhatás alakítja-e ki [121], vagy a komplex szubsztrát-kötőhely más-más oldalláncához kötődő szubsztrátok közötti közvetlen kölcsönhatás során jönnek létre, még nem tisztázott [125].

Röntgenkrisztallográfiás és krio-EM vizsgálatok kimutatták, hogy a Pgp-ben a TM hélixek által kialakított kötőüregben a különböző szubsztrátok eltérő, de részben átfedő helyekhez kötődnek [109, 126, 127]. Számos vegyület, köztük a CsA, a tariquidar és a valinomycin kötőhelyei térben átfednek [109]. A szerkezeti adatokon kívül cisztein mutagenézis kísérleteket is alkalmaztak a szubsztrát kötésben részt vevő helyek azonosítására [128, 129]. Transzport és ATPáz aktivitás mérések során kimutatták, hogy a szubsztrátok kölcsönhatásba léphetnek egy másodlagos kötőhellyel, ha az elsődleges kötőhelyet képező aminosavakat kicserélték [112, 130-132]. A vizsgálatok alapján az is elmondható, hogy a szubsztrátok képesek módosítani a cisztein keresztkötések mintázatát, ami arra utal, hogy a TM hélixek változtatják alakjukat, orientációjukat annak érdekében, hogy a különböző struktúrával rendelkező szubsztrátok megkötéséhez alkalmazkodjanak. Egy adott szerkezetű molekula kötődése a szubsztrát-kötőhelyet kialakító transzmembrán szegmensek specifikus elmozdulását eredményezheti, amely az ún. „szubsztrát-indukált illeszkedés” mechanizmus alapja [133]. Így a komplex szubsztrát-kötő zseb szerkezetileg eltérő szubsztrát molekulákat képes befogadni azáltal, hogy a TM szegmensek szubsztrát-specifikus rotációs és oldalirányú mozgása következtében különböző aminosav oldalláncok válnak elérhetővé a zseb felületén [133]. Ezek az eredmények alátámasztják a szubsztrát-kötő zseb összetett és flexibilis természetét.

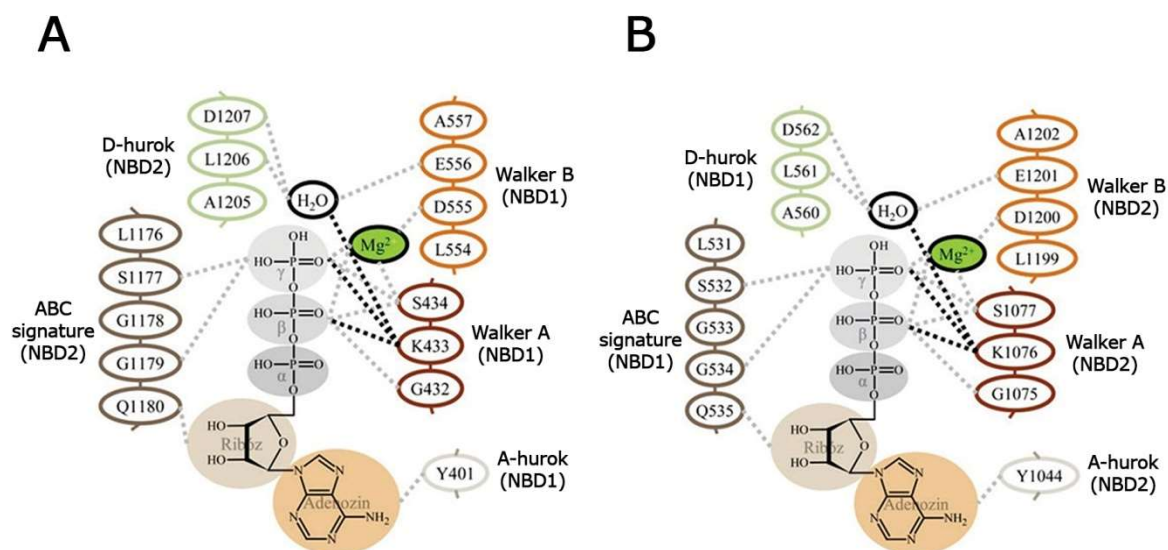
Valószínűsíthető, hogy a részben átfedő szubsztrát spektrum ellenére a Pgp és az ABCG2 szerkezeti különbségei a szubsztrát transzlokáció mechanizmusában is megjelennek [134]. Tekintve, hogy a mind az ABCG2 mind pedig a Pgp rendkívül széles szubsztrát spektrummal rendelkezik, melynek eredményeként szubsztrátok százait képesek transzportálni [75, 135, 136], a polispecifikus szubsztrát kötőhelyek szerkezetének és működésének feltérképezése kiemelten fontos a daganatellenes gyógyszerek, MDR inhibitorok, illetve az ABCG2 esetében a kősvény terápiájában használt gyógyszerek hatékony tervezéséhez.

Nukleotid-kötő domének (NBD-k) és az ATP kötés

Az NBD-k az ABC transzporterek ATP kötéséért és hidrolíziséért felelős funkcionális egységei, amelyek számos az evolúció során konzervált szekvencia motívumot tartalmaznak (**8. ábra**), mint például a Walker A és Walker B motívumok által alkotott P-hurok, az “ABC-signature” szekvencia, valamint az A, D, H és Q-hurkok [137, 138]. Ezeken a szekvencia-motívumokon belüli erősen konzervált aminosavak mutációi jelentősen csökkentik vagy teljesen megszüntetik az ATPáz- és transzportaktivitást [139, 140].

Az NBD-k Walker A motívuma elsősorban az ATP béta- és gamma-foszfátjaival alakít ki hidrogénkötéseket. A konzervált Walker A lizin metioninra vagy argininre (humán Pgp-ben: K433M/R, K1076M/R) történő cseréje az egyik vagy mindkét NBD-ben a nukleotid megkötését nem gátolja, azonban az ATP hidrolízisét feltehetően megakadályozza [78, 141, 142].

A Walker B motívum az ATP gamma-foszfátjával van kapcsolatban, valamint szerepet játszik az ATP hidrolíziséhez szükséges Mg^{2+} -ion koordinálásában is [143]. A Walker B savas „katalitikus” glutamátjának semlegesítése az egyik vagy mindkét NBD-ben (pl. E556Q és/vagy E1201Q a humán Pgp-ben) egyetlen ATP nagy affinitású megkötéséhez (csapdázáshoz) és a transzport és ATPáz funkciók hiányához vezet [144, 145]. Hasonlóképpen, a humán ABCG2-ben sem mutattak ki transzport és ATPáz aktivitást az E211Q Walker B mutáns fehérjében [146]. A szomszédos pozícióban (humán Pgp-ben D555N és/vagy D1200N) található aszparaginsav cseréje szintén katalitikusan inaktív fehérjét eredményezett, összhangban ezen aminosav Mg^{2+} -kötésben betöltött szerepével [147].



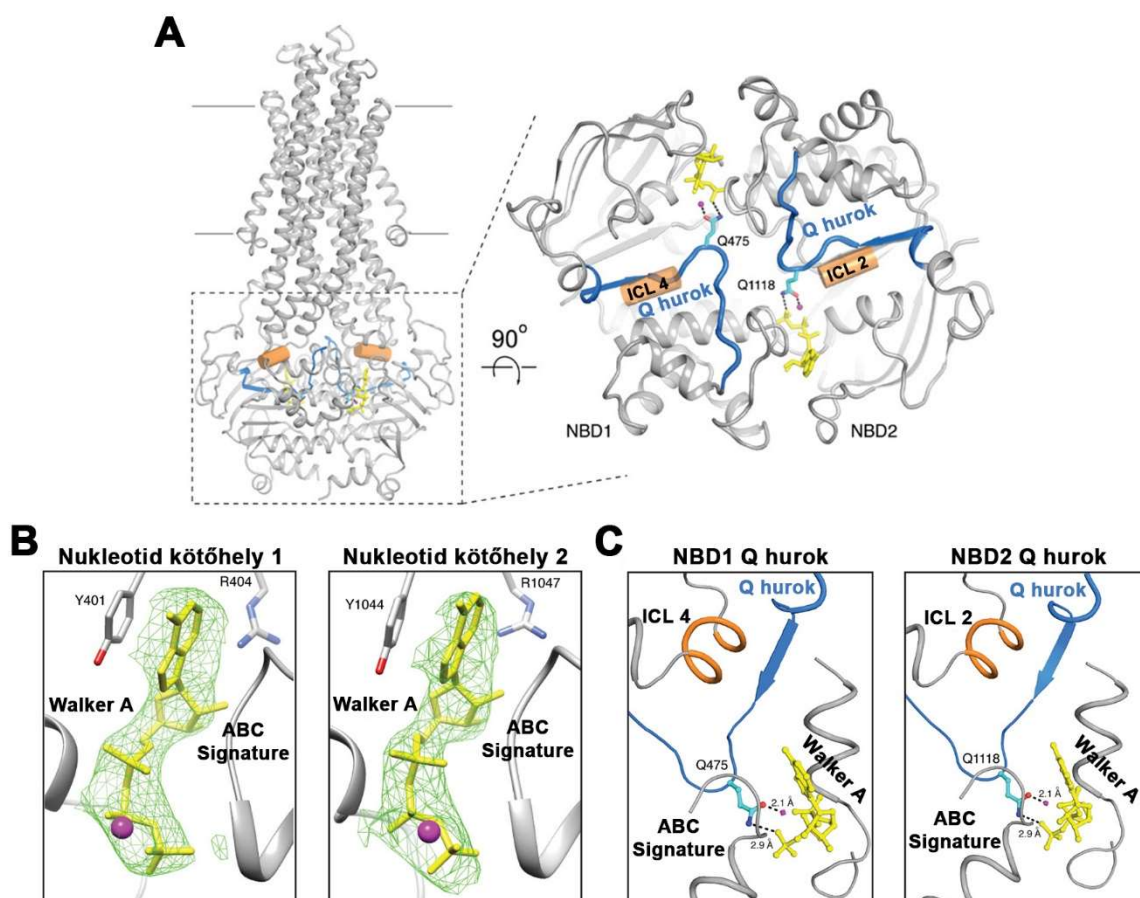
8. ábra: A P-glikoprotein két nukleotid-kötőhelye, a nukleotid kötés szempontjából fontosabb aminosavak feltüntetésével. Az egyik oldali NBD Walker A és B szekvenciái, A-, Q- és H-hurkai a másik oldali NBD ABC „signature” szekvenciájával és D-hurkával alakítja ki az egyik nukleotid-kötőhelyet (NBS1), míg a másik nukleotid-kötőhely ennek a tükörképe (NBS2).

Az „ABC-signature” szekvencia elengedhetetlen a megfelelő ATP kötéshez az ATP gamma-foszfátjának koordinálásán keresztül, valamint döntő szerepe van az NBD dimer („szendvics-dimer”) kialakításában [148, 149]. Humán Pgp esetében az egyik vagy mindkét NBD-ben lévő „ABC-signature” mutációk csökkentik a sejtfelszíni expressziót, valamint a mutáns változatok funkcionálisan inaktívak [150, 151].

A Pgp-ben, más ABC fehérjékhez hasonlóan az A-hurok aromás tirozin oldallánca az ATP adenin gyűrűjét koordinálja (**3. táblázat**), jelentős szerepet betöltve a nukleotid kötésben [25, 152]. Az A-hurok tirozin (Y401 vagy Y1044 humán Pgp-ben) mutációja az egyik vagy mindkét NBD-ben megszünteti a nukleotid kötését és az ATPáz aktivitást [152, 153]. Szerkezeti adatok szerint az A-hurok hiányzik az ABCG2-ből, de az A-hurokkal homológ elhelyezkedésű oldalláncok van der Waals kölcsönhatásba lépnek az ATP-vel [100].

A TMD-k és az NBD-k közötti kölcsönhatást az intracitoszolikus hurkok (ICL) közvetítik, amelyek specifikusan kapcsolják a TMD-ket az NBD-k Q-hurkaihoz (**9. ábra**) [154]. A szerkezeti adatok azt mutatták, hogy a Q-hurok az NBD-k felső felületén helyezkedik el, erős kölcsönhatásban a TMD hélixekkel [100, 155]. A H-hurok közvetlenül, a Q-hurok pedig a vízmolekulán keresztül közvetett módon járul hozzá az ATP γ -foszfátjának koordinálásához [156]. A teljes transzporterek esetében feltehetőleg a Q-hurok létesít kapcsolatot a TMD-k és az ATP γ -foszfátja között, fontos szerepet vállalva az ATP kötés következtében létrejött konformációváltozás TMD-kre való átvitelében (**9. ábra**) [154, 157-159].

159]. A D-hurkok egymással létesített kölcsönhatása a két NBD közötti kommunikációt biztosítja [160].



9. ábra: A Pgp citoszolikus hurkai (ICL, narancsszín) biztosítják az NBD-k és TMD-k közötti kölcsönhatást az NBD-k Q-hurkainak (kék szín) közreműködésével. A Q-hurkok feltehetőleg kapcsolatot létesít a TMD-k és az ATP γ -foszfátja között, elősegítve ATP kötés hatására bekövetkező konformációváltozás TMD-kre történő átvitelét. Youngjin Kim és mtsai munkája alapján [104].

3. táblázat: Az ATP kötésben fontos szerepet betöltő konzervált aminosavak az ABCG2-ben és a Pgp-ben.

Motívum neve	Aminosav pozíció		Feltételezett funkció
	Pgp	ABCG2	
A-hurok	401	185*	Adenozin kötés
Walker A	427-434	80-87	ATP-kötő zseb kialakítása
Q-hurok	473-477	126	Inter-domén kommunikáció
Signature	531-536	186-200	Cross-dimer ATP-kötő zseb kialakítása
Walker B	551-556	206-211	ATP-kötő zseb kialakítása
D-hurok	559-562	217	Cross-dimer interakció
His-hurok	583-587	243	ATP-függő switch régió

(* = feltételezett A-hurok helyettesítő pozíció) [118]

Az ABCG2 és Pgp katalitikus ciklusa

Az ABCG2 és a Pgp általi transzport folyamat főbb eseményei a szubsztrátok megkötése, plazmamembránon keresztüli transzlokációja, végül disszociációja a kötőhelyről az extracelluláris térbe. A szubsztrát transzport a TMD-k konformáció változásaihoz kapcsolódik, amelyet az NBD „szendvics-dimer” ATP-függő kialakulása és szétválása szabályoz. Mindkét transzporter katalitikus ciklusa során valószínűsíthető két fő konformációs állapot, a korábban leírt nukleotid-mentes, intracelluláris oldalról nyitott (inward-facing, IF) állapot és a nukleotid-kötött, extracelluláris oldalról nyitott (outward-facing, OF) állapot [85, 161, 162].

Korábbi eredményeink alapján a Pgp működési ciklusa során az NBD-k dimerizációját az ATP molekulák kötődése váltja ki, amely a TMD-k extracelluláris tér felé nyitott állapotát eredményezi. Ezen konformáció változásokat a szubsztrát-affinitás csökkenése is kíséri a szubsztrát-kötőhelyeken, amely elősegíti a szubsztrátok koncentráció gradiens ellenében végbemenő exportját [163]. Azonban az ABCG2 esetében máig nem tisztázódott, hogy a nukleotid kötés és hidrolízis hogyan kapcsolódnak a TMD-kben létrejövő konformáció változásokhoz, valamint, hogy az ATP kötődése vagy hidrolízise váltja-e ki a transzporter azon konformáció változását, amely során az extracelluláris tér felé nyitott állapotba került transzmembrán domének által létrehozott szubsztrát kötőhelyről ledisszociálnak a szubsztrátok.

A katalitikus ciklus hajtóereje az ATP hidrolízis, amely mindkét transzporter esetében végbemehet mindkét ATP-kötőhelyen, azonban a mai napig vitatott, hogy egy szubsztrát molekula transzportjához hány ATP hidrolízise szükséges. Általánosan megfigyelt jelenség néhány ABC transzporter esetében, hogy a különböző szubsztrátjaik szerkezetüktől és koncentrációjuktól függő módon fokozzák a transzporterek ATPáz aktivitását [164], azonban nem ismert, hogy melyik katalitikus lépés gyorsításával érik el ezt a hatást. Érdekes módon szubsztrátjaik hiányában is megfigyelhető gyengébb ATPáz aktivitás, amelyet bazális ATPáz aktivitásnak neveznek. Vitatott, hogy a bazális ATPáz aktivitás a plazmamembránban jelenlévő endogén szubsztrátok transzportjának eredménye, vagy pedig az ABC transzporterek katalitikus mechanizmusából adódó sajátos tulajdonság [165]. Valószínűsíthető, hogy a transzporterek szubsztrát-mentes bazális, valamint szubsztrát-stimulált ATPáz ciklusának létezhet olyan közös pontja, ahonnan a fehérjék a körülmények függvényében elköteleződhetnek a megfelelő típusú katalitikus ciklus irányában.

Általánosan elfogadott, hogy az ABC transzporterek működéséhez mindkét ATP-kötőhelynek katalitikusan aktívnak kell lennie [166]. Ezzel összhangban a transzporterek foszfát analógokkal (nátrium-ortovanadát (Vi), berillium-fluorid (BeFx) vagy alumínium-fluorid (AlF₃)) történő kezelése során az ATP hidrolízisét követően a két nukleotid-kötőhely egyikén kialakuló stabil komplex (pl. ABCG2-ADP-Vi, Pgp-ADP-BeFx) megakadályozza a fehérjék további működését [161]. Pgp esetében azt is megfigyelték, hogy az egyik katalitikus hely inaktivációja (pl. mutációkkal) megakadályozza a Pgp ATPáz aktivitását [78, 139, 141, 144, 146, 150, 167]. Azonban ezekkel az eredményekkel ellentétben munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az egyik NBD Walker A lizinének metioninra történő cseréje esetén a humán Pgp molekulák jelentős transzport- és ATPáz aktivitást mutatnak, abban az esetben, ha emlős sejtek plazmamembránjában, természetes környezetükben vizsgálják őket [163]. Fontos kiemelni, hogy azon tanulmányok többsége, amelyek arról számolnak be, hogy az egyik katalitikus helyen létrehozott mutációknak is inaktíváló hatása van heterológ expressziós rendszerek (pl. Sf9 [78, 168] vagy *Saccharomyces cerevisiae* [169]) vagy tisztított fehérjék felhasználásával készültek. Mivel valószínűsíthető, hogy a korábbi adatok nem pontosak az NBD-k működése és kooperációja szempontjából, érdemes a mutáns transzporter variánsok funkcionális vizsgálatát emlős sejtek plazmamembránjában megismételni [155, 170].

A szubsztrát transzport mechanizmusa az ABCG2 és Pgp fehérjékben

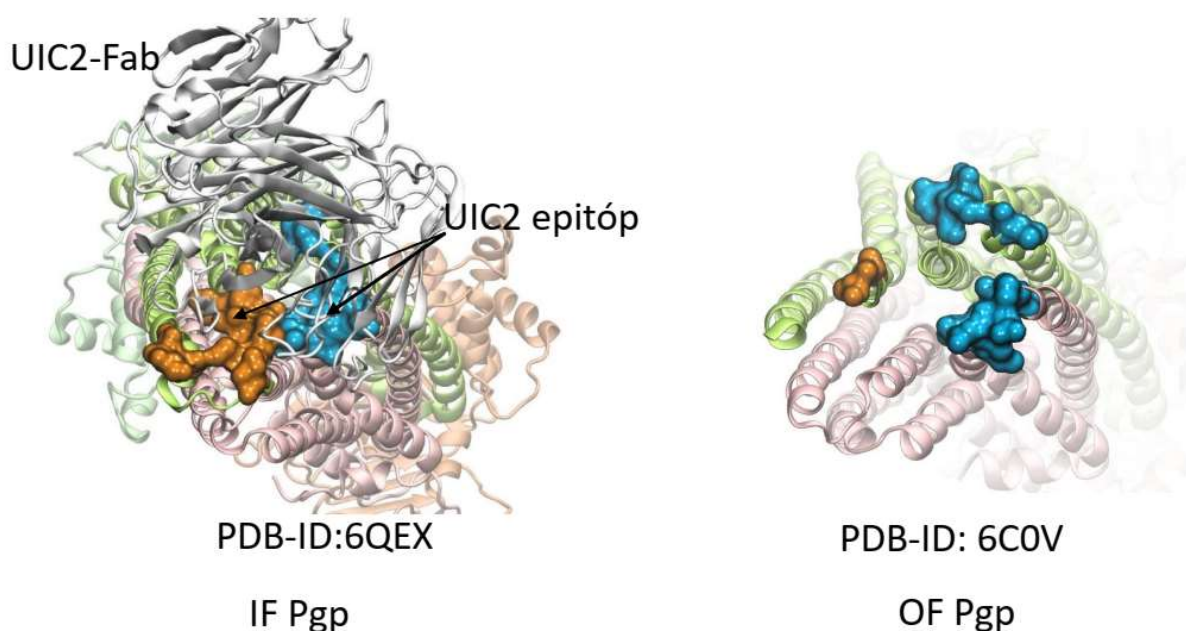
Az ABCG2 és a Pgp szubsztrát transzlokációs folyamatainak leírására különböző modellek születtek. Az ún. *pumpa modell* szerint a transzporter szubsztrátjait közvetlenül a citoszolból az extracelluláris térbe transzportálja egy ATP hidrolízisét igénylő aktív folyamatban [171]. A legtöbb ABCG2 és Pgp szubsztrát azonban hidrofób vagy amfifil vegyület, amelyek a citoplazmához képest lényegesen magasabb koncentrációt tudnak elérni a membránon belül [172]. Jelentősen feldúsulnak a lipidkettősrétegben, koncentrációjuk több ezerszer magasabb lehet a lipid fázisban a vizes fázishoz képest [173, 174]. Így valószínűsíthető, hogy a szubsztrátok megkötése közvetlenül a membránból történik. Szerkezeti adatok is alátámasztják, hogy az IF konformációban mindkét transzporter fel tudja venni a szubsztrátjait a membránból [85, 162, 175-180]. A lipofil természetű Pgp szubsztrát, a calcein-acetoxi-metilészter (calcein-AM) már azelőtt transzportálódik, mielőtt beléphetett volna a citoszolba, ahol aspecifikus észterázok az AM csoportot eltávolítva fluoreszcens calceinné alakítanak, amely már nem szubsztrátja a Pgp-nek [181]. A Pgp-hez hasonlóan az

ABCG2 is képes bizonyos szubsztrátokat, például a MX-t közvetlenül a plazmamembránból eltávolítani [179].

A flippáz modell alapján a transzporter a membrán belső lemezéből a külsőbe transzportálja a szubsztrátokat, egyenlőtlen szubsztrát megoszlást hozva létre a két membránlemez között. A külső rétegben feldúsult szubsztrátok extracelluláris térbe történő távozását a lipid-víz megoszlási hányadosaik határozzák meg [182, 183]. A hidrofób „porszívó” modell szerint pedig a transzporter a membránból közvetlenül az extracelluláris térbe transzlokálja a szubsztrátokat [184]. Sajnos azonban nehéz kísérleti adatokkal alátámasztani vagy megcáfolni a flippáz és a hidrofób „porszívó” modellt. Összességében a szubsztrátok megkötését, a transzport folyamat végén pedig az elbocsátásukat az adott szubsztrát és a transzporter fehérje, valamint a szubsztrát és a membrán közötti kölcsönhatások erőssége határozza meg. Így valószínűsíthető, hogy a szubsztrát lipofil-amfifil jellege határozza meg, hogy a transzlokációs folyamat végén a szubsztrát az extracelluláris tér felé vagy a membrán külső lemeze felé távozik a kötőhelyről [172].

Az ABCG2 és a Pgp konformáció változásainak megfigyelése

Az elmúlt néhány évtizedben számos monoklonális antitestet (mAt-t) fejlesztettek mind a humán Pgp, mind pedig az ABCG2 ellen. Közülük a legtöbb antitest a TMD-ket összekötő extracelluláris hurkokat ismeri fel. Az antitestek némelyike lineáris epitópokhoz kötődik, mint pl. a Pgp egyik extracelluláris hurkát felismerő MM4.17 [185] vagy a BXP-21 és BXP-34, amelyek az ABCG2 intracelluláris részén található epitópokhoz kötődnek. Azonban léteznek olyan antitestek is, amelyek komplex epitópot ismernek fel, mint például a Pgp esetében az MRK16, MRK17, HYB-241, 4E3, 15D3 és az UIC2 [186-188], az ABCG2 esetében pedig az 5D3. A Pgp-t felismerő MRK16-ról, a HYB-241-ről és az UIC2-ről ismert, hogy gátolják a Pgp transzport aktivitását is [189-191].



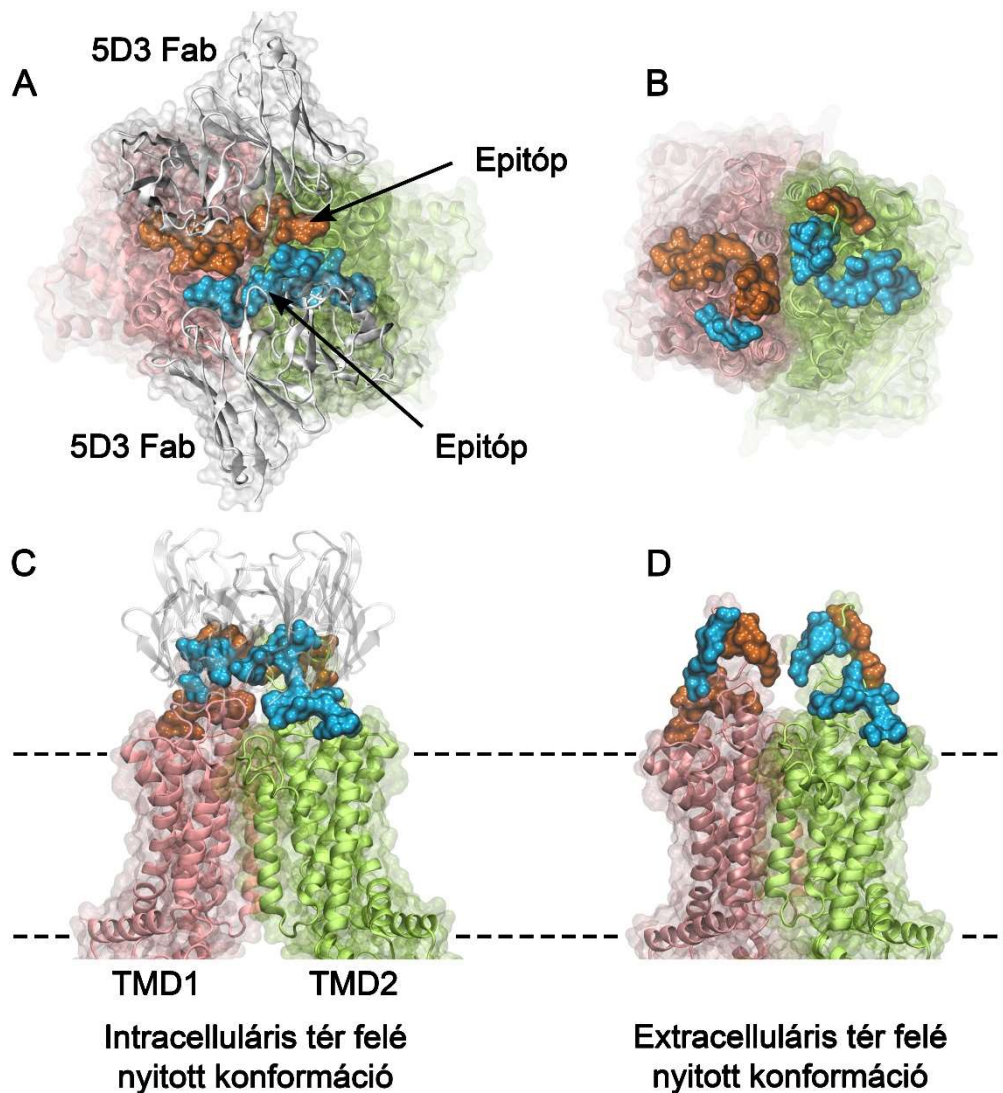
10. ábra: Az UIC2-Fab kötődése az IF Pgp konformerhez (PDB-ID:6QEX), valamint az epitópot alkotó extracelluláris hurkok helyzete az OF konformerben (PDB-ID:6C0V) krio-EM vizsgálatok alapján (Thomas Stockner, nem közölt adatok).

Az UIC2 egy IgG2a izotípusú egér mAt, amely szelektív módon a humán Pgp nagy szubsztrát-kötő affinitású IF konformerét ismeri fel [126, 163, 192]. Az antitest komplex epitópját a humán Pgp 1. 4. és 6. extracelluláris hurkaiban található rövid peptidszekvenciák alkotják [193-195], melyek az OF konformerben eltávolodnak egymástól (**10. ábra**). Az UIC2-Fab-Pgp komplex molekuláris szerkezetének krio-EM vizsgálata során azt is kimutatták, hogy az UIC2-Fab 1:1 sztöchiometriával kötődik a humán Pgp-hez [126] (**10. ábra**). Az UIC2-Fab pozitív töltésű antigén-kötő felülettel rendelkezik [196], hasonlóan az MRK-16 anti-Pgp mAt-hez [197], ami arra utal, hogy a Pgp negatív töltésű extracelluláris hurkai fontosak a mAt-k általi felismerésben [196].

Intakt sejteken az UIC2-t telítő koncentrációban alkalmazva a sejtfelszíni Pgp molekulák csak mintegy 10-40%-ához képes kötődni, azonban a fehérje bizonyos szubsztrátjai vagy inhibitorai jelenlétében a többi Pgp molekula is kimutathatóvá válik. Ezt a jelenséget gyakran „UIC2-shift-nek” nevezik az irodalomban [83]. Többek között ilyen Pgp inhibitor az immunszpresszív hatásáról is ismert CsA [163]. A Pgp inhibitorokkal való kezelése mellett a sejtek ATP depléciója is a Pgp-k UIC2-reaktív konformációját eredményezi [83]. Ugyanakkor ATP/Mg²⁺ adása a permeabilizálással és mosással ATP-mentesített sejtekhez koncentráció függő módon csökkenti az UIC2-reaktivitást [163].

Az UIC2-höz hasonlóan a komplex extracelluláris epitóphoz kötődő 5D3 is konformáció érzékeny módon ismeri fel az ABCG2-t. A konformációs epitóp kialakításában a 5. és a 6. TM hélixeket összekapcsoló extracelluláris hurok (EL3) vesz részt [98]. Az 5D3-Fab fragmentum mindkét ABCG2 monomer extracelluláris hurkaival kölcsönhatásba lép [98]. Krio-EM vizsgálatok alapján [98] az antitest a fehérje nukleotid mentes IF konformációját ismeri fel, míg az OF konformációban az epitópot alkotó extracelluláris hurkok feltételezhetően eltávolodnak egymástól, így ehhez a konformerhez az antitest nem tud kötődni (**11. ábra**).

Bár telítő koncentrációban alkalmazva kvázi az összes sejtfelszíni ABCG2 molekulát felismeri [198], alacsonyabb koncentrációban adva a fehérje aktuális konformációjától függ a kötődése. A sejtek ATP depléciója vagy ABCG2 gátlószerekkel (pl. Ko143) történő előkezelés fokozza az 5D3 kötődését. Ezzel szemben a foszfát analógokkal (pl. Vi, BeFx) való kezelés, amely az ABCG2 molekulákat a poszt-hidrolitikus állapotban csapdázza jelentősen csökkenti az 5D3 kötődését [198].

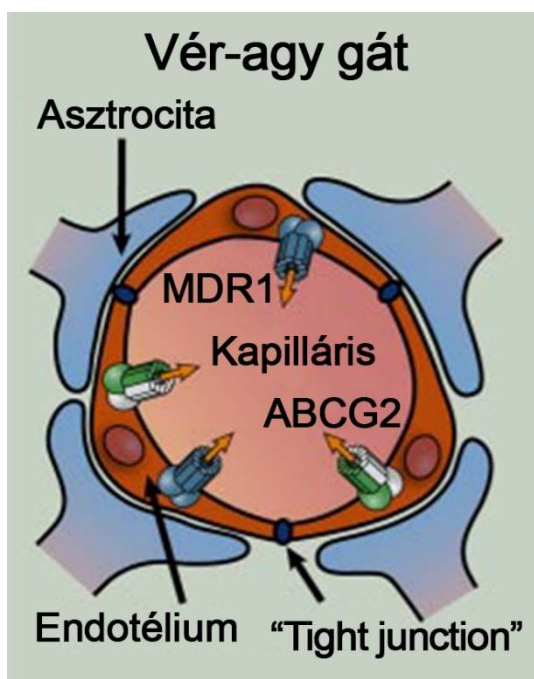


11. ábra: Az ABCG2 intracelluláris (PDB ID: 6ETI) és extracelluláris tér felé nyitott (PDB ID: 6HBU) konformerei krio-EM vizsgálatok alapján. Az ABCG2 extracelluláris hurkai két 5D3 epitópot hoznak létre az intracelluláris tér felé nyitott (IF) konformációban (A, C), míg az extracelluláris tér felé nyitott (OF) konformációban ezek a hurkok eltávolodnak egymástól (B, D). Az A és B panelek az ABCG2 konformerek extracelluláris nézetét, míg a C és D panelek pedig a transzporter oldalnézetét mutatják. Az ABCG2 homodimer két monomerét rózsaszín és zöld színnel ábrázoltuk. A két epitóp kék és narancssárga színnel van kiemelve, és minden olyan aminosavat tartalmaz, amely közvetlenül érintkezik az 5D3 Fab-val (fehér) a 6ETI krio-EM szerkezetben. A membrán határait szaggatott vonalak jelzik.

Az ABCG2 és a P glikoprotein fiziológias szöveti lokalizációja

Pgp-knockout egerekben fiziológias körülmények között a transzporter hiánya nem okozott jelentős fenotípusos elváltozást [199]. Azonban súlyos neurotoxicitást figyeltek meg abban az esetben, amikor a knockout egereket olyan citosztatikumokkal kezelték, amelyek ismert szubsztrátjai a transzporternek. Ez alapján arra következtettek, hogy a Pgp szerepet játszhat a központi idegrendszer toxikus anyagokkal szembeni védelmében. Ma már tudjuk,

hogy mindkét transzporter fontos szerepet tölt be a vér-agy gát barrier funkciójának kialakításában. A vér-agy gát kapilláris-endotél sejtjeinek szoros illeszkedése meggátolja a hidrofíl anyagok bejutását az agyba, a hidrofób toxikus anyagokat pedig az endotél sejtek apikális oldalán expresszáldó ABCG2 és Pgp transzporterek pumpálják vissza a vérbe (12. ábra). A multidrog transzporterek ezáltal megvédik a központi idegrendszert a mérgező xenobiotikumoktól, azonban megemlítendő, hogy ennek köszönhetően az agy terápiás céllal adott gyógyszerek számára is nehezen elérhető, például tumorok vagy egyéb a központi idegrendszert érintő betegségek esetén.



12. ábra: Az ABCG2 és Pgp szerepe a vér-agy gát barrier funkciójának kialakításában. A hidrofíl anyagok elleni védelmi vonalat a kapilláris-endotél sejtek szoros illeszkedése (tight junction) biztosítja, míg a hidrofób anyagokat az ABCG2 és Pgp juttatja vissza a vérbe. Az ábra Sarkadi Balázs és mtsai munkája alapján módosítva [5].

A vér-agy gátban betöltött védő szerepük mellett, magas expresszó figyelhető meg a vér-here gátban, valamint a placenta chorion bolyhainak syncytiotrophoblastjaiban, ahol a transzporterek feltehetőleg védik a fejlődő magzatot az anya szervezetéből potenciálisan átjutó káros anyagokkal szemben. Az ABCG2 magzatvédő szerepét Jonker és mtsai. egereken is demonstrálták [200-202]. Emelkedett ABCG2 szint figyelhető meg laktáló emlőben [203], amely alapján számos munkacsoport úgy véli, hogy a transzporter az anyatejbe szállítja szubsztrátjait. Van Herwaarden és mtsai. vizsgálatai alapján valószínűsíthető, hogy a fehérje fiziológiás funkciója az emlőmirigyben a B-vitaminok anyatejbe való kiválasztása [204]. A

herék intersticiális-, Leydig-, és Sertoli sejtjeiben, illetve a kapillárisok endoteliális falában tapasztalható magas ABCG2 szint funkciója a germinális őssejtek genotoxikus mutagénekkel szembeni védelme lehet. A vesék proximális tubulusainak kefeszegélyes membránjában tapasztalható emelkedett ABCG2 és Pgp expressziós szint [75, 205, 206] segíti a káros anyagok kiválasztását a vizeletbe. A májban, valamint epeutakban az ABCG2 a toxikus anyagok, xenobiotikumok, endogén konjugátumok epével történő kiválasztásában játszhat szerepet. A gasztrointesztinális traktusban az ABCG2 expressziós szintje a duodenumban a legmagasabb, ahol szerepe lehet a különböző drogok/gyógyszerek abszorpciójának limitálásában. Ezen kívül magas ABCG2 expressziós szint figyelhető meg különböző őssejtpopulációkban, például hematopoietikus őssejtekben vagy különböző daganattípusokban jelenlévő őssejtszerű tumoros sejtekben, ezért az ABCG2-t őssejtmarkernek is tekintik [207-210]. A csontvelői sejteket az ABCG2 szubsztrát H33342-vel festve a sejtek hozzátétőlegesen 0,05%-át adó őssejtek H33342-negatív alpopulációként különíthetők el áramlási citometriás vizsgálat során, amelyet „side population”-nek neveztek el. Valószínűleg, az ABCG2 kifejeződése tehető felelőssé a H33342-negatív fenotípus létrehozásáért. A fluoreszcens H33342 a Pgp-nek is szubsztrátja, azonban Pgp knockout egerekben szintén leírták ezt a fenotípust, amely alapján valószínűsíthető, hogy a side population kialakításáért nem a Pgp a felelős [211]. Az ABCG2 a vérképző őssejtek káros anyagok elleni védelmében, valamint az alacsony differenciáltsági szint fenntartásában tölthet be fontos szerepet, egy a sejtek differenciálódáshoz szükséges anyag sejtekből történő eltávolításával [211]. Érdeemes megjegyezni, hogy az ABCG2 magas expressziója az őssejteken pozitív korrelációt mutat az őssejt transzplantációs terápia sikerességével [5]. Fontos megemlíteni azt is, hogy ABCG2 knockout egerekben is normál haemopoetikus őssejtek figyelhetők meg, és az egerek nem mutatnak fejlődési rendellenességeket, ami alapján, úgy tűnik, hogy a transzporter nem nélkülözhetetlen az őssejt állapot fenntartásához, sokkal inkább az őssejtek túléléséhez lehet fontos a káros metabolitok eltávolításával.

A Pgp és az ABCG2 szöveti expressziós mintázata, valamint az *in vitro* és *in vivo* funkcionális vizsgálatok arra utalnak, hogy számos gyógyszer membránon való átjutásának korlátozása révén ezek a transzporterek hozzájárulhatnak hatékony farmakológiai gátek kialakításához, így az exogén toxikus anyagokkal szembeni védekezés mellett fontos meghatározói a gyógyszerek felszívódásának, kiválasztásának, valamint szervezeten belüli eloszlásának [212].

Szubsztrát spektrum és inhibitorok az ABCG2 és a Pgp fehérjékben

Az ABCG2, valamint a Pgp rendkívül széles és részben átfedő szubsztrát spektrummal rendelkezik, amely szerkezetileg változatos pozitív vagy negatív töltésű, főleg hidrofób vegyületeket tartalmaz, melyek 300-2000 Da molekulatömeg tartományba esnek. Szubsztrátjaik között számos klinikailag fontos vegyület található, például különböző hatásmechanizmusú daganatellenes szerek (antimetabolitok, topoizomeráz gátlók, tirozin kináz gátlószerek stb.) antibiotikumok, antivirális szerek és antihisztaminok (a példákat a **4. táblázat** mutatja).

Mindkét transzporter képes különféle fluoreszcens vegyületeket is eltávolítani a sejtekből, amelyeket gyakran használnak szubsztrát akkumulációs vagy efflux-kísérletekben a fehérjék transzportaktivitásának vizsgálatára. Annak ellenére, hogy mindkét transzporter rendkívül széles szubsztrát spektrummal rendelkezik, mindeddig csak néhány fiziológiás szempontból releváns szubsztrátot azonosítottak. Az ABCG2 esetében ilyen fiziológiás szubsztrát a húgysav [8], a Pgp esetében pedig bizonyos foszfolipidek (pl. PC vagy szfingomielin) [183, 213], hormonok (pl. aldosteron [214], β -ösztadiol-17 β -D-glükuronid [215]).

Mivel a Pgp és az ABCG2 nagymértékben hozzájárul a klinikumban megfigyelhető MDR kialakulásához, ezért számos tanulmány célozta a Pgp-re és/vagy ABCG2-re specifikus gátlószerek azonosítását/ fejlesztését [216]. Az ABCG2 elsőként azonosított inhibitora az FTC (fumitremorgin C), amelyet *Aspergillus fumigates*-ből izoláltak. Már az ABCG2 gén klónozása előtt leírták, hogy S1-M1-3.2 vastagbél daganatos sejtvonalon az FTC csökkentette a MX rezisztenciát. Azonban ez a vegyület rendkívül neurotoxikus, így a klinikai alkalmazása nem lehetséges. A Ko143, amely egy nem toxikus FTC analóg, szelektíven gátolja az ABCG2-t. Számos egyéb ABCG2 gátlószer is ismert, pl. a tariquidar és az elacridar, azonban ezek a vegyületek nem szelektív ABCG2 inhibitorok, mivel a Pgp-t vagy az MRP1-et is gátolják [217]. Ugyanakkor a CsA [218] és nem immunszuppresszív származéka az SDZ PSC833 (Valspodar) a Pgp specifikus kompetitív gátlószerei.

4. táblázat: Az ABCG2 és a Pgp által transzportált vegyületek főbb csoportjai néhány példával

ABCG2 szubsztrátok		Pgp szubsztrátok	
Antibiotikumok	Ciprofloxacín, Ofloxacín, norfloxacín, Erythromycin, Dirithromycin, Rifampicin, Nitrofurantoin	Antibiotikumok	Erythromycin, gramicidin A
Antimetabolitok	Antifolátok: Metotrexát (MTX), Metotrexát-diglutamát, Metotrexát-triglutamát, GW1843, Tomudex, Pirimidin analóg: 5-fluorouracil, , CdAMP,	Antihisztaminok	Terfenadin, Fexofenadin
Antraciklinek	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Pirarubicin,	Antraciklinek	Doxorubicin, Daunorubicin,
Kamtotecinek	Topotecan, SN-38, CPT-11, 9-aminocamptothecin, NX211, DX-8951f, Homocamptothecins, BN80915 (diflomotecan), Gimatecan, Belotecan	Kamtotecinek	Topotecan, SN-38, Irinotecan, Ciszplatin
Topoizomeráz gátlók	Mitoxantron (topoizomeráz II. gátló), Etopozid (topoizomeráz II. gátló), NB-506, (topoizomeráz I. gátló), J-107088 (topoizomeráz I. gátló),	Topoizomeráz gátlók	Bizantrén, Mitoxantron, Etopozid
Tirozin kináz inhibitorok (TKI)	Gefitinib, Dasatinib, Erlotinib, Vandetanib, Nilotinib, Sorafenib, Tandtutinib, CI1033 (Pan-HER TKI), CP-724,714 (HER2 TKI), Symadex (fms-like tyrosine kinase 3 inhibitor)	Kalcium-csatorna blokkolók	Verapamil, Nifedipin, Azidopin
Xenobiotikumok szulfát- és glükuronid-konjugátumai	ösztrom 3-szulfát (E1S), 17-beta-ösztadiol szulfát, DHEAS, E3040 szulfát, Troglitazon szulfát, SN-38-glükuronid,	Tubulin polimerizációra ható szerek	Paklitaxel, Kolhicin
Fényérzékenyítők	Feoforbid a, Piroeoforbid a metil észter, Klorin E6, Protoporfirin IX,	Immunszuppresszív ágensek	CsA, Valspodár
Természetes vegyületek és toxinok	Folsav, Húgysav, Riboflavin (B12 vitamin), K3 vitamin, Glutation (GSH), Szfingozin-1-foszfát, PhIP (karcinogén), PPIX (hem prekursor), Quercetin	Polifenolok	Kurkuminoidok, Flavonoidok
Fluoreszcens festékek	Rhodamine 123, Hoechst 33342, Lyotracker green, BODIPY-prazosin, D-luciferin, BODIPY-FL-dihidropiridin, Mitoxantron	Fluoreszcens festékek	Rhodamine 123, Hoechst 33342, Calceim-AM
Antivirális szerek	Zidovudin, Lamivudin, Ganciclovir	HIV proteáz gátlók	Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir
HMG CoA redukáz gátlók	Rosuvasztatin, pravasztatin, cerivasztatin	Vinka alkaloidok	Vinblasztin, Vinkrisztin, Vinorelbin

Forrás: [18]

A membránkörnyezet hatása a multidrog transzporterek működésére

Általánosságban elmondható, hogy a transzmembrán fehérjék, így az ABCG2 és a Pgp is szoros kapcsolatban állnak a környező membránnal, amelynek fiziko-kémiai paraméterei

jelentős hatással vannak a bennük elhelyezkedő fehérjék működésére [219]. A membrán tulajdonságai befolyásolhatják a transzporterek konformáció változásait, transzport aktivitásukat, szubsztrátjaik megoszlását a lipid kettősrétegben, kölcsönhatásukat a transzporterek szubsztrát kötőhelyeivel, vagy akár a fehérjék ATP kötését és hidrolízisét is, közvetlenül az NBD-vel történő interakció révén vagy közvetetten a transzporterek TM régiójának stabilizálásával [172]. Az ABCG2 és a Pgp krio-EM vizsgálata kimutatta, hogy bizonyos lipidmolekulák közvetlenül is kölcsönhatásba lépnek mind az ABCG2, mind a Pgp [98, 103] TM héliceivel. Kb. 53-56 szorosan asszociálódott lipid molekula egy ún. „lipid-övet” képez a Pgp körül, melynek detergenssekkel történő eltávolítása a transzporterek inaktiválásához vezet [220-223]. Irodalomból ismert, hogy a lipid környezet a Pgp esetében módosíthatja a transzporter ATPáz aktivitásának különböző drogok általi stimulációját vagy gátlását is [224]. A koleszterin az emlősök plazmamembránjainak egyik fő alkotóeleme. Bizonyos mikrodomének, mint például a lipid tutajok és kaveolák koleszterinben gazdag membrán régiók. Az ABCG2-t, valamint a Pgp-t is több sejttípusban, koleszterinben gazdag lipid tutajokban azonosították [225, 226]. Megjegyzendő, hogy a membrán koleszterin tartalmának csökkentése jelentősen csökkenti mindkét fehérje transzport aktivitását [227], míg a membrán magas koleszterin tartalma fokozza az ABCG2 ATPáz és transzport aktivitását [223]. Valószínűsíthető, hogy a membrán koleszterin és foszfolipid molekuláival való kölcsönhatások döntő fontosságúak a Pgp és az ABCG2 aktivitása szempontjából. Ezekben a kölcsönhatásokban bekövetkező változások megváltoztathatják a transzporterek konformáció változásait és a szubsztrátok vagy inhibitorok kötődését [228]. Nemrégiben az ABCG2 esetében leírták, hogy a koleszterin (amely nem szubsztrátja az ABCG2-nek) gátolja a foszfolipidek bejutását a szubsztrát-kötő zsebbe, amelyek a szubsztrátok helyére képesek kötődni, ez magyarázhatja a membrán magasabb koleszterintartalmával járó fokozottabb transzport aktivitást [229].

A membrán specifikus lipid összetétele mellett fiziko-kémiai tulajdonságai is befolyásolhatják a membránfehérjék működését. A plazmamembrán fázisátalakulási hőmérséklet (T_m) feletti folyadékkristályos, T_m alatti gél fázisának strukturális rendezettsége, fluiditása és a membránt felépítő lipidek diffúzió sebessége eltérő [230]. Az ABCG2 és a Pgp szubsztrátok többnyire hidrofób molekulák, amelyek passzív diffúziójának mértéke/sebessége a sejtmembránon keresztül nagymértékben függ a membrán fiziko-kémiai jellemzőitől [231]. Ezen paraméterek vizsgálatára a Pgp esetében szerkezetileg is jelentősen eltérő szubsztrátok (pl. LDS-751, H33342, MK-571, vinblasztin, verapamil és daunorubicin) membránban való megoszlását tanulmányozták. Az összes vizsgált szubsztrát membránba oldódásának a

foliadékkristályos állapot kedvezett, azonban gél fázisban nagyobb affinitással kötődtek a transzporterhez [173, 230]. Mivel a szubsztrátok a transzporterhez való kötődéskor elhagyják a lipid kettősréteget, ezért egy kevésbé kedvező szubsztrát-lipid kölcsönhatás elősegítheti a transzporterhez való kötődésüket [172]. Az ABCG2 és a Pgp ATP kötését és hidrolízisét egyaránt módosíthatja a fehérjéket körülölelő membrán fázis állapota. Az ATP hidrolízis aktivációs energiája, illetve az ATP kötődésre jellemző K_d érték jelentősen különbözhet a T_m alatt és fölött. A folyadékkristályos fázisban a Pgp általi ATP kötés affinitása magasabb, míg az ATP hidrolízis K_M értéke a gél fázisban alacsonyabb [172, 232]. Ezek alapján feltételezhető, hogy az NBD-k konformációját és konformáció változásait, valamint a nukleotidok kötődését és hidrolízisét is módosítja a membrán fluiditása és rendezettsége [172].

Különböző modell membránokban, kémiaiilag eltérő Pgp szubsztrátok felhasználásával kimutatták, hogy membrán-megoszlásukat nagymértékben befolyásolja a foszfolipidek acilláncának hossza és a membrán fázisállapota [230]. Következésképpen az ilyen változások a membránban jelentősen megváltoztathatják a Pgp és az ABCG2 szubsztrát kötését. Ezen kívül a membrán fluiditásában bekövetkező változások is befolyásolhatják a szubsztrát kötést és a membrántranszporterek általi transzportot [233].

Az ABCG2 és a Pgp funkcióját különböző kísérleti rendszerekben tanulmányozták, pl. lipid-detergens micellákban [234], mesterséges lipid kettősrétegekben [235] vagy a transzportereket overexpresszáló sejtekből származó membránvezikulákban [236]. Lehetséges, hogy ezek a kísérleti rendszerek nem imitálják megfelelően a fiziológiás membránkörnyezetet, és a fiziko-kémiai tulajdonságaik (pl. oldalnyomás, görbület, lipidösszetétel) különbségei miatt egymásnak ellentmondó eredményekhez vezethetnek. Megjegyzendő, hogy a lipid nanokorongokba rekonstituált egér Pgp-vel végzett kísérletek arra utalnak, hogy az ATP hidrolízis idézi elő a Pgp OF konformációból IF konformációba történő átváltását. Ugyanakkor egy nemrégiben megjelent tanulmány tisztított egér Pgp molekulákkal végzett DEER (Double electron–electron resonance) kísérletekben azt mutatta ki, hogy az ATP hidrolízis az IF konformációból az OF konformációba való átmenetet idézi elő [234].

Mivel a Pgp és az ABCG2 működését nagymértékben befolyásolja membránkörnyezetük, kulcsfontosságúak azok a modellrendszerek, ahol a transzporterek természetes membránkörnyezetükben vizsgálhatók [163, 237].

II. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel

A triploid egyedek jelentősége a halgazdálkodásban

A triploid halak általában sterilek, mivel a kromoszómák szabálytalan meiotikus szegregációja csökkenti az ivarmirigyek fejlődését és abnormális gametogenezist idéz elő [238]. Gazdasági szempontból kiemelten fontos a steril triploid egyedek létrehozása, mivel ezek kevesebb energiát fordítanak a szaporodási folyamatokra, így számos halfaj esetében gyorsabb növekedési ütem és hosszabb élettartam jellemző rájuk. Érdekes módon a triploid halak glikogén- és zsírtartalma is eltérő lehet, ami befolyásolja tápértéküket és ízüket. Fontos kiemelni, hogy a tógazdaságokban a steril triploid egyedek létrehozása megakadályozhatja az idegen fajok elterjedését a tenyésztési létesítményeken kívül, és így elkerülhető a szökések genetikai és/vagy ökológiai hatása a természetes halpopulációkra [238]. Az idegen halfajok steril triploidjai akár természetes vizekbe is engedhetők vízi gyomirtás céljából anélkül, hogy fennállna a túlszaporodás vagy a nemkívánatos fajok megtelepedésének és elterjedésének veszélye [238].

A triploid utódok létrehozására biotechnológiai módszereket alkalmaznak, mint például nyomássokkot, hősokkot vagy hidegsokkot. Ezen technológiai eljárások biológiai alapja, hogy a sokk hatására a zigóta meiotikus osztódásának második szakaszában sarki test visszamaradásával az utód ploiditása megnő. Sajnos a triploid indukciós kezelések nem 100%-os hatékonyságúak, így az adott kezelés során keletkezett triploid lárvák arányának meghatározása segítheti a kutatókat a kezelések optimalizálásában [239].

A tokhalak és hibridizációjuk

A tokhalak az ősi a sugaras úszójú (Actinopterygii) halak képviselői két jelenleg élő családdal: Acipenseridae és Polyodontidae [240]. A Polyodontidae család (kanalastok-félék) körülbelül 120 kromoszómával rendelkező ún. „funkcionális diploid” ($2n$). A kínai lapáthal (*Psephurus gladius*) közelmúltbéli kihalását követően [241] a család egyetlen tagja az amerikai lapátorrú tok (*Polyodon spathula*). Az amerikai lapátorrú tok egy perspektivikus faj a tógazdaságokban, valamint az intenzív halgazdálkodásban, mivel értékeesebb húsa miatt jelentősebb árbevételt eredményez, mint az ugyanezt a táplálékforrást kiaknázó busa.

Az Acipenseridae (tokfélék) családjába 27 ma is élő faj tartozik. Jellemző rájuk a poliploidizáció, ami hozzájárulhatott az ide tartozó fajok rugalmasságához és jó alkalmazkodó képességéhez lehetővé téve fennmaradásukat. Az Acipenseridae családban korábban végbement genomduplikáció eredményeként az ide tartozó fajok többsége, mint például a vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*), kb. 250 kromoszómával rendelkező „funkcionális tetraploidnak” ($4n$ kromoszómakészlet) számítanak [242]. Poliploid genomjuk miatt sikeres lehet a hibridizáció az Acipenseridae családon belül, akár eltérő kromoszómaszámú taxonok között is. Azonban az Acipenseridae családra jellemző gyakori hibridizáció ellenére eddig nem írtak le sikeres hibridizációt az Acipenseridae és Polyodontidae családok között [243, 244]. A nagy filogenetikai távolság mellett, a Polyodontidae és Acipenseridae fajai morfológiájukban, preferált élőhelyükben és táplálkozási szokásaikban is különböznek egymástól [245], ami valószínűsíti hibridizációjuk sikertelenségét.

Kollaborációs partnereink a dunai génállományú vágótok génmegőrzési programjának keretében begyűjtött nőivarú egyedeket kívántak meiotikus ginogenezis módszerével szaporítani, hogy megőrizzék kedvező génállományukat. Ginogenezis során a sperma csak az embrió fejlődését indítja meg, ezért célszerű olyan faj spermáját használni, mellyel a vágótok nem tud hibridizálni. Mivel az Acipenseridae és Polyodontidae családok között eddig nem írtak le sikeres hibridizációt, a ginogenezis kiváltásához az amerikai lapátorrú tok spermáját használták. A keletkezett utódok fenotípusos megjelenése azonban felvetette annak a lehetőségét, hogy mégis bekövetkezett a két filogenetikailag távoli faj hibridizációja, ezért áramlási citometriás DNS-tartalom analízist végeztünk, illetve a továbbiakban kollaborációs partnereink többféle genetikai elemzést is végeztek.

Az áramlási citometriás DNS-tartalom meghatározás

A megfelelő DNS-specifikus fluoreszcens festékkel végzett áramlási citometriás DNS tartalom meghatározás egy egyszerű, de érzékeny technika a sejtek ploiditási szintjének meghatározására [246-248]. Más módszerek, mint például a kromoszómaszám meghatározása, munkaigényesebbek és aktívan osztódó sejtek jelenlétét igénylik. Az áramlási citometriát széles körben használják orvosi diagnosztikai alkalmazásokban aneuploid sejtek vagy fragmentált DNS-tartalmú apoptotikus sejtek kimutatására [249], valamint emlő-, prosztatata- vagy hólyagrák grádusának meghatározására. Emellett az áramlási citometriás DNS tartalom meghatározást gyakran használják taxonómiai és evolúciós vizsgálatokban is a növények [250, 251] és különféle állatfajok ploiditásának meghatározására. A ploiditás

meghatározás a kutatási alkalmazások mellett egyre nagyobb jelentőséggel bír a növénytermesztésben, állattenyésztésben, valamint a halgazdálkodásban is [252, 253].

Azonban a módszernek egyszerűsége ellenére is számos buktatója lehet. A minták nem megfelelő fixálása és permeabilizálása a sejtek aggregációját vagy szétesését okozhatja, ami hamis eredményekhez és/vagy az analízis kivitelezhetetlenségéhez vezethet. A membrán impermeábilis DNS-specifikus festékek használata megköveteli a sejtek permeabilizálását. A sejtek permeabilizálására és/vagy fixálására használt reagensek megválasztása azonban befolyásolhatja a magi DNS sztöchiometrikus festődését is [247, 254]. Sajnos a tógazdaságokban a minták analízise nem mindig végezhető el helyben, így jelentős szállítási idővel is számolni kell. Ezért nagy az igény olyan mintarögzítési és tárolási módszerekre, amelyek terepi körülmények között is könnyen kivitelezhetők és nem rontják a minták minőségét, lehetővé téve azok későbbi elemzését.

Mivel a DNS-re jellemző AT/GC arányban fajspecifikus különbségek lehetnek [255], célszerű bázispreferencia nélküli festékeket, pl. propidium-jodidot vagy YOYO-1-et választani a vizsgálatokra [256]. Természetesen az alkalmazott minta preparálási protokolloknak mindig kompatibilisnek kell lenniük a kiválasztott DNS-specifikus festék jellemzőivel, hogy reprodukálható festődést és alacsony CV-értékeket ($\leq 3\%$) kapjunk a fluoreszcencia intenzitás eloszlási hisztogramokban. Mindezek mellett olyan kísérleti protokollok kidolgozására van szükség, ami lehetővé teszi nagyszámú minta gyors preparálását és áramlási citometriás analízisét.

Célkitűzések

I. Annak ellenére, hogy az ABCG2 katalitikus ciklusát régóta intenzíven tanulmányozzák, még mindig nem tisztázott, hogy az ATP kötés és hasítás részfolyamatai, hogyan kapcsolódnak a TMD konformáció változásokhoz, és hogyan teszik lehetővé végül a szubsztrátok koncentráció gradiens ellenében történő transzportját. Figyelembe véve az ABC transzporterek érzékenységét membránkörnyezetük összetételére, célul tűztük ki olyan kísérleti módszerek kidolgozását, melyek lehetővé teszik az ABCG2 katalitikus ciklusának tanulmányozását normál membrán környezetében. Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Mely katalitikus esemény váltja ki az 5D3-reaktív IF konformációból az 5D3-at nemkötő OF konformációba történő átmenetet?
- Hogyan változik az ABCG2 szubsztrátjaihoz való affinitása a katalitikus ciklus során?
- Melyik katalitikus lépés gyorsításával fokozzák a szubsztrátok az ABCG2 ATPáz aktivitását?

II. Munkánk második felében az A-hurok (Y401A, Y1044A, Y401A/Y1044A), valamint a Walker B (E556M/Q, E1201Q, E556Q/E1201Q, D555N, D1200N, D555N/D1200N) konzervált szekvencia motívumban pontmutációt hordozó Pgp variánsok működését vizsgáltuk, hogy betekintést nyerjünk az NBD-k közti kooperáció mechanizmusába. Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolják a különböző ligandok az UIC2 mAt-tel detektálható IF/OF konformer arányt a különböző mutáns variánsokban.
- Megváltoztatják-e a mutációk a Pgp látszólagos ATP affinitását (K_A)?
- Képesek-e a mutánsok szubsztrát-függő ATP hidrolízisre?

III. Halgazdaságokban a triploid indukciós kezelések optimalizálása során fontos a triploid egyedek arányának gyors és pontos meghatározása. Ezért szerettünk volna kidolgozni egy áramlási citometriás kísérleti protokollt, hal vörösvérsejtek, illetve hal embriók ploiditásának meghatározására, ami lehetővé teszi nagyszámú minta gyors preparálását és analízisét.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A sejtenyésztéshez használt anyagokat és a kísérletekben alkalmazott vegyszereket a MERCK Kft.-től (Budapest, Magyarország), míg az Alexa 488 (A488) és 647 (A647) szukcinimidil-észter fluoreszcens festékeket a Life Technologies-től (Carlsbad, CA, USA) szereztük be. Az UIC2 és 15D3 Pgp elleni, valamint az 5D3 ABCG2 elleni mAt-t, hibridóma felülúszóból preparáltuk affinitás kromatográfiás módszerrel. Az UIC2 és 15D3 hibridóma sejtvonalakat az American Type Culture Collections-től vásároltuk (Manassas, VA, USA). Az 5D3 hibridóma sejtvonal Brain P. Sorrentino (Division of Experimental Hematology, Department of Hematology/Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA) nagylelkű ajándéka. Az antitestek tisztaságát nátrium-dodecilszulfát/poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS/PAGE-el) ellenőriztük, amelyek leglább 97% tisztaságúnak bizonyultak. Az UIC2, 15D3 és 5D3 antitesteket A647-el jelöltük, a nem kötődött festéket Sephadex G-50 oszlopon távolítottuk el. A festék-fehérje arány (F/P) 3 körüli érték volt minden egyes antitest preparátum esetében.

Módszerek

Sejtenyésztés

Az MDCK II (Madin-Darby canine kidney) sejtvonal, valamint annak ABCG2-vel stabilan transzfektált változata Sarkadi Balázs (Enzimológiai Intézet, Természettudományi Kutatóközpont, Budapest, Magyarország) ajándéka. A GFP-vel (Green Fluorescent Protein-zöld fluoreszcens fehérje) jelölt ABCG2-t expresszáló MDCK II sejtvonalat Homolya László és Orbán Tamás (Enzimológiai Intézet, Természettudományi Kutatóközpont) készítette. Az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak humán MDR1 génnel stabilan transzfektált változatát (NIH 3T3 MDR1 sejtvonal), Michael Gottesman (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) laboratóriumából kaptuk. Az A hurok (Y401A, Y1044A) és Walker B (D555N, D1200N, D555N/D1200N, E556M, E556Q, E1201Q, E556Q/E1201Q) mutáns Pgp variánsokat expresszáló transzgénikus NIH 3T3 sejtvonalakat Türk Dóra és Szakács Gergely hozták létre (Enzimológiai Intézet, Természettudományi Kutatóközpont) Sleeping Beauty transzpozon alapú génexpressziós rendszert alkalmazva.

A sejteket letapadó kultúrákban tartottuk fenn 10% hővel-inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS, Gibco, Budapest), 2 mM L-glutamint és 0,1 mg/mL penicillin-streptomycin koktélt tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékban 37°C-on, 5%-os CO₂ atmoszférában, 95%-os páratartalom mellett. A vad típusú humán Pgp-t kifejező sejtek esetében a magas Pgp expressziós szintet doxorubicin (670 nM DOX) szelekcióval tartottuk fenn. A sejteket a kísérletek elvégzése előtt 2 nappal DOX-mentes médiumba helyeztük át.

Az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejteket 0,05%-os tripszin-EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) oldattal (0,5 mg/mL tripszin, 0,2 mg/mL EDTA, 2 perc, 37°C), az MDCK II sejteket pedig 0,25%-os tripszin-EDTA oldattal (2,5 mg/mL tripszin, 0,2 mg/mL EDTA, 5 perc, 37°C) választottuk el a sejtenyésztő flaska aljától és egymástól.

Western blot analízis

A sejteket (2×10^5) 100 µL redukáló Laemmli mintapufferben (6x) 10 percig 95°C-on lizáltuk. Az így elkészített teljes sejtizátum fehérjéit (2,5 µg fehérje/minta) 8%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel választottuk el, majd elektroblottoltuk 0,45 µm-es pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Egyesült Királyság). Az ABCG2-t BXP-21 anti-ABCG2 mAt-vel, míg az β -aktint a C-2 egér mAt-vel jelöltük (mindkettő a Santa Cruz Biotechnology Inc.-től, Santa Cruz, CA, USA). Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG antitestet (HRP-GaMIgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) alkalmaztunk. Mindegyik antitestet 1:2500 hígításban alkalmaztuk. Az előhívást SuperSignal™ West Pico PLUS kemilumineszcens reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) végeztük és a képeket Fluor Chem Q Alpha Innotech géldokumentációs rendszerrel (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA) rögzítettük.

Mitoxantron akkumulációs teszt

Az MDCK II sejteken expresszáldó ABCG2 fehérjék transzport aktivitását MX akkumulációs tesztrel vizsgáltuk. A sejtszuspenziót ($0,5 \times 10^6$ sejt/mL) 8 mM glükózt tartalmazó foszfát pufferben (gl-PBS (150 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 8,6 mM NaH₂PO₄, 1,69 mM KH₂PO₄, 8 mM glükózt) 15 percig 37°C-on előinkubáltuk 2 µM ABCG2 inhibitor Ko143 jelenlétében és hiányában, majd a mintákat 5 µM MX-nal festettük további 30 percig. Ezután a sejteket háromszor mostuk (300×g, 5 perc, 4°C) jéghideg, 0,5% FBS tartalmú gl-

PBS-sel. A halott sejtek elkülönítésére propidium-jodidos (3 $\mu\text{g/mL}$) festést alkalmaztunk. A MX intracelluláris felhalmozódását FACS Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

Az ABCG2 direkt immunfluoreszcens jelölése

A sejtfelszíni ABCG2 fehérjék direkt immunfluoreszcenciás jelöléséhez a mintákat (10^6 sejt/mL gl-PBS-ben) 5 $\mu\text{g/mL}$ 5D3-A647 mAt-vel inkubáltuk 30 percig 37°C -on 2 μM Ko143 jelenlétében vagy távollétében. A jelölést követően a sejteket kétszer mostuk ($300\times\text{g}$, 5 perc, 4°C) 0,5% FBS-t tartalmazó gl-PBS-vel. Az antitest kötődés mértékét FACS Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

Az UIC2 reaktív konformációban lévő Pgp molekulák arányának meghatározása

A vad típusú és a mutáns Pgp variánsokat kifejező intakt NIH 3T3 sejteket (5×10^5 sejt/mL) 30 percig 37°C -on jelöltük UIC2-A647 (10 $\mu\text{g/mL}$) vagy 15D3-A647 (30 $\mu\text{g/mL}$) antitesttel gl-PBS-ben. A CsA kezelt mintákat 10 percig 37°C -on előinkubáltuk 10 μM CsA-val, majd mosási lépés nélkül tovább inkubáltuk UIC2-A647 antitesttel. Az ATP depletált mintákat az antitest jelölés előtt Na-aziddal (10 mM) és 2-dezoxi-D-glükózzal (8 mM) kezeltük 30 percig 37°C -on glükózmentes PBS-ben. Az antitestekkel történő inkubálást követően a sejteket kétszer mostuk jéghideg 0,5% FBS-t tartalmazó gl-PBS-vel. ATP-depletált minták esetén glükózmentes PBS-t használtunk. A minták UIC2-A647 vagy 15D3-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel határoztuk meg. Az UIC2-reaktivitást, vagyis az UIC2-reaktív konformációban lévő sejtfelszíni Pgp molekulák százalékos arányát, az F/P-korrigált UIC2 és 15D3 jelek arányából számítottuk.

Sejtek permeabilizálása Streptolizin-O toxinnal

A streptolizin-O ((SLO) (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország)) a Streptococcus pyogenes pórusképző exotoxinja. A membránban kialakult SLO pórusok átjárhatóak a kis vízoldható molekulák számára, beleértve a nukleotidokat [257]. Az SLO egy oxigén-érzékeny toxin, amelyet a ditiotreitol (DTT) reverzibilisen aktivál. A sejteket (1×10^7 sejt/mL) 250 U/mL SLO-val kezeltük 1 mM DTT, Proteáz Inhibitor Cocktail (PIC: (2 mM AEBSF, 0,3 μM

aprotinin, 116 μM besztatin, 14 μM E1-14 μM leupeptin), 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), valamint 1% FBS jelenlétében gl-PBS-ben 37°C-on 30 percig. Ilyen körülmények között a sejtek körülbelül 50%-a permeabilizálódott, amelyet PI festéssel igazoltunk. A reakciót 20 mL 1% FBS-t tartalmazó PBS-sel állítottuk le, majd a nem-kötődött toxin eltávolítására a sejteket háromszor mostuk ($635\times g$, 5 perc, szobahőmérséklet), végül a mintákat PBS-ben vettük fel a további kezelésekhez [258].

A konfokális mikroszkópos kísérletekhez nyolc-kamrás fedőlemezekben (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) növesztett sejteket 62,5 U/mL SLO-val permeabilizáltuk 1 mM DTT és PIC jelenlétében 37°C-on, 15 percig 1% FBS-t tartalmazó HEPES pufferban (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2).

Az 5D3 kötődés kinetikájának vizsgálata

Az 5D3 antitest kötődés kinetikájának vizsgálata során a permeabilizált sejteket (1×10^6 sejt/mL) 5 $\mu\text{g/mL}$ 5D3-A647 antitesttel festettük 0,5 mM ATP/Mg^{2+} , 2 μM Ko143, valamint 10 μM quercetin hiányában vagy jelenlétében 37°C-on. Az 5D3-A647 kötődés kinetikájának követésére különböző időpontokban mintákat vettünk, melyeket nagy térfogatú jéghideg PBS-sel mostunk. A nem kötődött antitest eltávolítására a mintákat még kétszer megmostuk jéghideg PBS-sel. Az 5D3-A647 kötődés mértékét FACS Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométerrel határoztuk meg.

A nukleotid kötés látszólagos affinitásának meghatározása

A nukleotid kötés látszólagos affinitását (K_A) a korábban leírtak szerint határoztuk meg [163]. A permeabilizált sejteket (1×10^6 sejt/mL) 10 percig 37°C-on előkezeltük különböző koncentrációban alkalmazott nukleotidokkal, majd az ABCG2 esetében 5 $\mu\text{g/mL}$ 5D3-A647 mAt-el, míg a Pgp esetében 10 $\mu\text{g/mL}$ UIC2-A647 mAt-el inkubáltuk a mintákat további 20 percig 37°C-on. Az ATP hidrolízis megakadályozása érdekében az ATP-t Mg^{2+} nélkül 5 mM EDTA jelenlétében adtuk, vagy a teljes kísérletet jégen végeztük. A nukleotid csapdázási kísérletekben a nukleotidot 0,5 mM Vi vagy BeFx-szel (200 μM BeSO_4 (berillium-szulfát) és 1 mM NaF (nátrium-fluorid)) együtt alkalmaztuk 37°C-on 30 percig. Ezt követően a mintákat 5 $\mu\text{g/mL}$ 5D3 mAt-el vagy 10 $\mu\text{g/mL}$ UIC2 mAt-el inkubáltuk a fent leírt módon. A mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel (5 perc, $635\times g$, 4°C). A sejtek 5D3-A647, illetve UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával meghatároztuk, majd a nukleotidkoncentráció függvényében ábrázoltuk. Az ABCG2 és különböző mutáns Pgp

variánsok látszólagos nukleotid-affinitásának (K_A) meghatározásához az adatpontokat négyparaméteres Hill-függvénnyel illesztettük, ahol az $F_{\min}$ és $F_{\max}$ értékek a minimális és maximális fluoreszcencia intenzitást jelentik:

$$F = \frac{F_{\min} \times K_A^n + F_{\max} \times x^n}{K_A^n + x^n} \quad (1)$$

Nukleotid csapdázás („trappelés”)

A Vi vagy BeFx csapdázott konformer képződésének vizsgálatához a permeabilizált ABCG2-t kifejező MDCK II sejteket 10 μ M quercetinnel vagy ösztron-3-szulfáttal (E1S) kezeltük elő 37°C-on, majd tovább inkubáltuk 0,5 mM ATP/Mg²⁺ vagy ADP/Mg²⁺ mellett 0,5 mM Vi vagy BeFx (200 μ M BeSO₄ és 1 mM NaF) jelenlétében. Az inkubáció során a csapdázási reakció kinetikájának követésére meghatározott időközönként 500 μ L mintát vettünk, amelyeket kétszer mostunk 5 mL jéghideg PBS-sel, mely az alkalmazott foszfát analógot tartalmazta a korábban megadott koncentrációban, majd 5 μ g/mL 5D3-A647-tel jelöltük az ABCG2-t kifejező mintákat 4°C-on 45 percig. A minták 5D3-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel határoztuk meg. A sejtek fluoreszcencia intenzitását (F) az idő (t) függvényében ábrázoltuk. Az 5D3-reaktív ABCG2 konformáció fél-életidejét reprezentáló $t_{1/2}$ értékeket a mérési pontokra illesztett exponenciális függvény alapján határoztuk meg:

$$F = F_0 \times e^{-t \times \frac{\ln 2}{t_{1/2}}} + c \quad (2)$$

ahol az F_0 a görbe nulla és végtelen időpontja közötti különbség, és c a sejtek háttér fluoreszcencia intenzitása.

5D3 disszociációs kinetika vizsgálata

A sejteket SLO toxinnal permeabilizáltuk, majd a nukleotidok kimosásával az ABCG2 molekulákat IF konformációban szinkronizálva jelöltük 5D3-A647 antitesttel 10 μ M quercetin vagy 10 μ M E1S hiányában vagy jelenlétében 37°C-on 20 percig. A nem kötődött 5D3-A647 mAt eltávolítása után a sejteket nagy térfogatú 37°C-os PBS-ben inkubáltuk tovább 3 mM ATP/Mg²⁺ vagy 3 mM AMP-PNP/Mg²⁺, valamint a fenti szubsztrátok vagy Ko143 jelenlétében vagy távollétében. Az 5D3 disszociáció kinetikájának

nyomonkövetéséhez rendszeres időközönként 500 μ L-es mintákat vettünk a sejtszuszpenzióból, majd a mintákat kétszer mostuk jéghideg PBS-sel. A sejtek 5D3-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük, és az idő (t) függvényében ábrázoltuk. Az 5D3-reaktív ABCG2 konformáció felezési idejét reprezentáló $t_{1/2}$ értékeket az adatpontok exponenciális illesztéséből számítottuk ki a **2. egyenlet** segítségével.

Áramlási citometria

A sejtek fluoreszcencia intenzitását Becton Dickinson FACS Array áramlási (Becton Dickinson, Mountain View, CA) citométerrel mértük, az adatokat Flowing szoftver (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finland) segítségével értékeltük ki. Az A647 festék gerjesztésére a 635 nm-es lézert használtuk és a fluoreszcenciát a vörös csatornában detektáltuk (emisszió: 661/16 nm). A PI festéket az 532 nm-es lézerrel gerjesztettük, az emissziót pedig 585/42 nm-es sávszűrővel detektáltuk. A MX-t 635 nm-es lézerrel gerjesztettük és a fluoreszcenciát a távoli vörös csatornában detektáltuk (emisszió: 780/60 nm). A sejtörmelék és az összetapadt sejteket az előre irányuló fényszórás (FSC) és oldalirányú fényszórás (SSC) jelek alapján kizártuk az elemzésből. Intakt sejteken végzett vizsgálatok esetében a PI-negatív sejtpopulációt vettük figyelembe, míg permeabilizált sejtekkel végzett vizsgálatok esetén a PI-pozitív sejtpopulációt analizáltuk.

Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia (CLSM)

Az ABCG2-GFP és a fluoreszcens ABCG2 szubsztrát MX plazmamebrán lokalizációjának vizsgálatára CLSM képanalízist végeztünk. A méréseket nyolc-kamrás lemezek (Nunc LabTek Thermo Scientific, Waltham, MA) végeztük. Az intakt sejteket 2 μ M Ko143-mal, 0,5 mM Vi-tal vagy az ATP szintézis gátlására 8 mM 2-dezoxi-D-glükózzal és 10 mM nátrium-aziddal kezeltük elő 15 percig 37°C-on, ezt követően 500 nM MX-nal festettük 15 percig 37 °C-on, végül 3-szor mostuk HEPES pufferrel (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). Az SLO-permeabilizált sejteket 6 μ g/mL PI-val előfestettük, majd további 15 percig inkubáltuk 37°C-on 500 nM MX-nal 5 mM AMP-PNP jelenlétében vagy hiányában, végül 3-szor mostuk hideg HEPES pufferrel.

A fluoreszcens képeket Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán) Plan Apo 60 $\times$ víz-immersziós objektív segítségével készítettük [NA=1,27]. Az ABCG2-GFP-t 488 nm-es hullámhosszú lézer fénnel, míg a MX-t 647 nm-es lézerrel gerjesztettük, az emittált fluoreszcenciát pedig 500-550 nm-es, illetve

660-740 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az összes felvételt a műszer azonos feszültség és lézerteljesítmény beállításai mellett készítettük. A képeket szekvenciális módban vettük fel, hogy minimalizáljuk a csatornák közötti átvilágítást. Körülbelül 1 μm vastag, 512×512 pixelt tartalmazó optikai szeleteket vettünk fel, melyekben 1 pixel mérete 200 nm volt. A zajt 3×3 pixel méretű átlagoló szűrővel szűrtük ki. A kolokalizációs elemzést a két detektált csatorna intenzitása közötti Pearson-féle korrelációs együtthatók kiszámításával végeztük a plazmamembránt reprezentáló pixeleken [259]. Csak azokat a pixeleket vontuk be az elemzésbe, ahol mindkét intenzitás magasabb volt, mint az átlagos autofluoreszcencia intenzitás kétszerese. A képelemzést Mocsár Gábor munkatársunk által írt MATLAB szkriptek segítségével valósítottuk meg (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) [260].

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

A szabad és az ABCG2-höz kötött MX molekulák diffúziós tulajdonságai alapján történő megkülönböztetésére FCS méréseket végeztünk. Az FCS méréseket Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán) Plan Apo 60 $\times$ víz-immersiós objektív [NA=1,27] segítségével végeztük. FCS mérésekhez a mikroszkóp PicoQuant időkorrelált egyfotonszámláló upgrade kittel (PicoQuant, Berlin, Németország) van felszerelve.

Az FCS méréseket ABCG2-GFP-t expresszáló intakt MDCK II sejteken végeztük nyolc-kamrás lemezekon (Ibidi GmbH, Martinsried, Németország). A sejteket 100 nM MX-nal festettük 15 percig 37°C-on 2 μM Ko143 jelenlétében vagy hiányában, vagy a sejtek ATP deplécióját követően (a korábban leírtak szerint). Az ABCG2-GFP-t 488 nm-es a MX-t pedig 647 nm-es lézervonallal gerjesztettük. Az ABCG2-GFP fluoreszcenciáját az 500-550 nm-es, a MX által kibocsátott fluoreszcencia jeleket pedig a 660-740 nm közötti spektrális tartományban detektáltuk egyfotonszámláló detektor segítségével (PicoQuant, Berlin, Németország). 10 $\times$ 10 másodperces méréseket végeztünk minden kiválasztott sejt membránjának három kiválasztott pontján. A fluoreszcencia autokorrelációs görbéket SymPhoTime64 szoftverrel (PicoQuant) számítottuk ki 200 időpontban, 300 ns és 1 s között, kvázi logaritmikus időskálán.

A MX-festett sejtek autokorrelációs görbéit egy triplet állapotot feltételező két komponensű modellel illesztettük, hogy leírjuk a szabad MX (gyors komponens) 3 dimenziós diffúzióját és az ABCG2-hez kötött MX (lassú komponens) 2 dimenziós diffúzióját a plazmamembrán x-z síkjában.

$$G(\tau) = \frac{1-T+Te^{\frac{-\tau}{\tau_{trip}}}}{N(1-T)} \left(\rho \frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_{D1}}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{S^2\tau_{D1}}}} + (1-\rho) \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{D2}}}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{S^2\tau_{D2}}}} \right) \quad (3)$$

A 3. egyenletben N a fluoreszcens molekulák átlagos száma a detektálási térfogatban, T a triplet állapotban lévő molekulák hányada, τ_{trip} a triplet korrelációs ideje. A diffúzió sebességét a diffúziós idő τ_D jellemzi, ami a molekula által a megvilágított térfogatban töltött átlagos időt jelenti. τ_{D1} és τ_{D2} a gyors és a lassú komponens diffúziós ideje, ρ az első komponens, $1-\rho$ pedig a második komponens hányada. A gyors és lassú komponensek diffúziós állandóit (D) a következő egyenletből határoztuk meg:

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_d} \quad (4)$$

ahol ω_{xy} a detektálási térfogat laterális e^{-2} sugara, melyet 100 nM-os A647 festékoldat (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH=7,4)) autokorrelációs görbéinek illesztésével becsültünk meg az A647 diffúziós állandójának ismeretében ($D_{A647} = 330 \mu m^2/s$, $T = 22^\circ C$ -on) [261].

Membrán preparálás

Az ATPáz aktivitás mérésekhez vad típusú vagy mutáns Pgp variánsokat expresszáló NIH 3T3 sejtekből származó membránkészítményeket használtunk. Az NIH 3T3 sejtekből a sejtmembránokat differenciál centrifugálással izoláltuk. A sejttörmelékét és a sejtmagokat $500\times g$ -vel ülepítettük 10 percig $4^\circ C$ -on. A membránfrakciókat centrifugálással izoláltuk $12000\times g$ -vel 60 percig $4^\circ C$ -on. A membránpelleteket TMEP-oldatban (50 mM Tris, pH=7,0, HCl) vettük fel, kiegészítve 50 mM mannittal, 2 mM etilén-glikol-tetraecetsavval (EGTA), 0,5 mM PMSF-el és PIC-al (Sigma-Aldrich, Budapest). A membránminták fehérje koncentrációját Lowry-módszerrel határoztuk meg [262]. A membránmintákat felhasználásig $-80^\circ C$ -on tároltuk. A membránminták transzporter expresszióját (5 μg membránfehérje/minta) immunoblottal ellenőriztük anti-Pgp G-1 mAt (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA), illetve HRP jelölt másodlagos antitest (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) 1:5000 hígításban történő alkalmazásával.

ATPáz aktivitás mérés

A vad típusú és mutáns Pgp-k Vi-érzékeny ATPáz aktivitását kolorimetriás vizsgálattal határoztuk meg. A transzporterek specifikus ATPáz aktivitását a felszabaduló Pi mennyiségéből számítottuk. A szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitás vizsgálatához a membrán preparátumokat Pgp szubsztrát verapamil (40 μM) és 3 mM ATP/Mg²⁺ jelenlétében vagy hiányában 25 percig 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően a reakciót 40 μL 5% SDS-el állítottuk le, majd a mintákat 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 105 μL színreagenssel [164]. A minták abszorbanciáját 700 nm-en mértük a BioTek Synergy HT plate olvasó (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) segítségével.

DNS-tartalom elemzés

A vörösvérsejtek (RBC) és a hal embriók DNS-tartalmát PI festést követően áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg. A hal embriókból 100 $\mu\text{g/mL}$ Proteináz K és 5 mM EGTA kezeléssel (15 perc, 37°C) készítettünk egyedi sejtekből álló sejtszuszpenziót. Mosást követően (500 $\times$ g, 5 perc, 4°C) sejteket 500 μL gl-PBS-ben (10⁷ sejt/ml) vettük fel. A vérsejteket lecentrifugáltuk (500 $\times$ g, 5 perc), majd 500 μL gl-PBS-ben felszuszpendáltuk, hogy a sejtkoncentrációt 1 $\times$ 10⁷ sejt/mL-re állítsuk be. Ezután 4500 μL 70%-os etanolt (Scharlab Magyarország, Budapest) adva a mintákhoz a sejteket 30 percig szobahőmérsékleten fixáltuk és permeabilizáltuk [263]. Ezt követően a mintákat kétszer mostuk PBS-ben (500 $\times$ g-vel 5 percig, majd újraszuszpendáltuk 5000 μL PBS-ben. Ekkor az etanollal rögzített sejteket 40 $\mu\text{g/mL}$ PI-vel (Sigma-Aldrich) festettük 30 percig, majd a sejtek PI fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACS Array áramlási citométerrel mértük.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzéséhez a SigmaPlot szoftvert (14-es verzió, SSI San Jose, CA, USA) használtuk. Két normál eloszlású populációból származó egyenlő szórású minta összehasonlítására Student-féle t-próbát végeztünk, míg egyenlőtlen szórások esetén Kolmogorov–Smirnov tesztet alkalmaztunk. Több minta összehasonlítására varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Holm–Sidak *post hoc* tesztet alkalmazva az adatok utólagos páronkénti összehasonlítására. Egyenlőtlen szórások esetén a Dunnett T3 *post hoc* páronkénti összehasonlítási módszert alkalmaztuk. A különbségeket $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

Az összes görbe illesztést a SigmaPlot szoftverrel (14-es verzió, SSI San Jose, CA, USA) végeztük, kivéve az autokorrelációs görbékét, melyekhez a QuickFit 3.0 szoftvert használtuk, melyet a Német Rákkutató Központban (DKFZ, B040 csoport) Prof. Jörg Langowski fejlesztett ki.

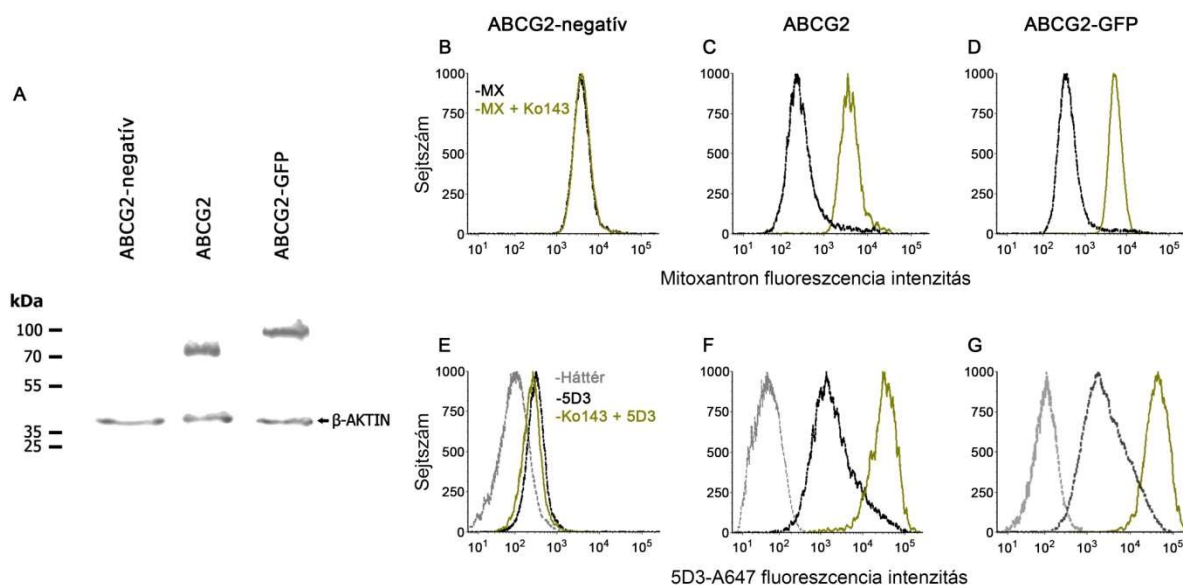
Eredmények

I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata

Az MDCK II sejtek funkcionálisan aktív ABCG2-t és ABCG2-GFP-t expresszálnak

Az ABCG2 és az N-terminálisan GFP-vel jelölt változata (ABCG2-GFP) hasonló mértékben expresszáldott az MDCK II sejtekben, amint azt a Western blot kísérleteink is igazolták (**13A. ábra**). Irodalmi adatoknak megfelelően [264] az ABCG2-GFP hasonló transzport aktivitást mutat, mint a GFP-vel nem jelölt párja, amit a MX akkumuláció hasonló mértékű csökkenése jelez az ABCG2-GFP-t és ABCG2-t expresszáló sejteken az ABCG2-negatív sejtvonalhoz képest. A Ko143 kompetitív ABCG2 inhibitor mindkét sejtvonal MX akkumulációját az ABCG2-negatív sejteknél tapasztalt szintre növelte (**13B-D ábra**).

Korábbi megfigyelések szerint az ABCG2 inhibitorok, mint pl. a Ko143 fokozzák az 5D3 mAt kötődését, mivel eltolják a konformációs állapotok közötti egyensúlyt az IF konformer dominanciája irányába [198, 265]. Ennek megfelelően a kezeletlen élő sejtek plazmamembránjában az ABCG2-GFP és az ABCG2 viszonylag alacsony 5D3-reaktivitást mutatott, amit a Ko143-kezelés hasonló mértékben növelt (**13E-G ábra**), alátámasztva azt az elképzelést, hogy a GFP jelölés nem módosítja az ABCG2 konformáció változásait.



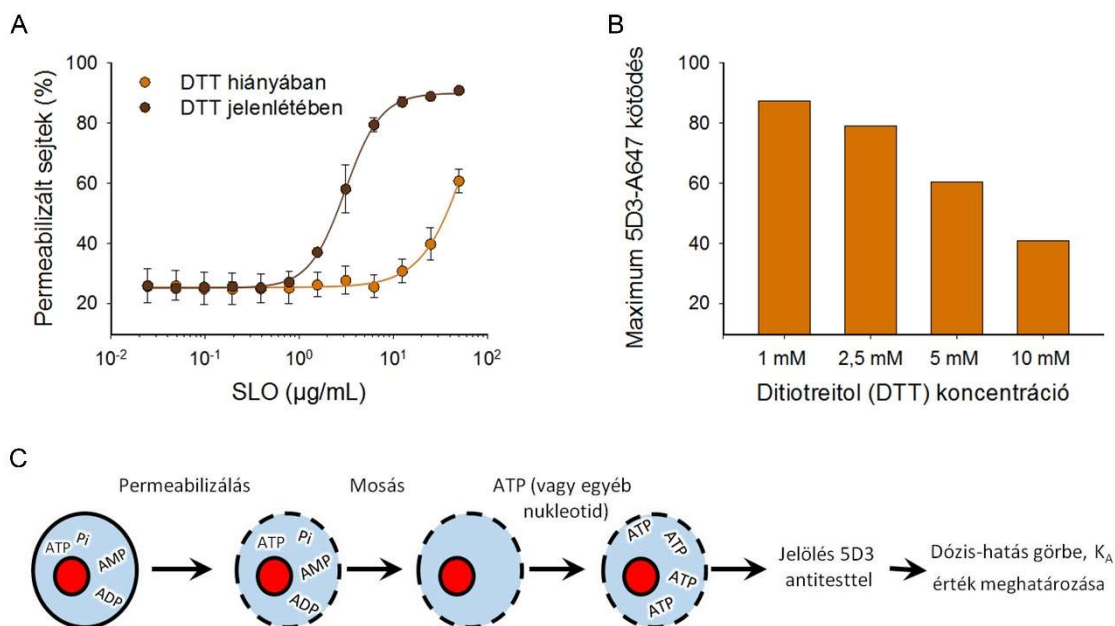
13. ábra: A humán ABCG2 és ABCG2-GFP expressziós szintjének, transzport aktivitásának és konformációs állapotának karakterizálása. Western blot analízis során a minták fehérjetartalmát SDS-PAGE-el választottuk el, majd a blottolás után az ABCG2-t BXP-21 anti-ABCG2 mAt-tel

detektáltuk. Az ábrán egy reprezentatív Western blot (**A panel**) látható. Az ABCG2 transzport funkciójának vizsgálatára mitoxantron (MX) akkumulációs tesztet használtunk (**C, D, E panel**). A mintákat 5 μ M MX-nal kezeltük 2 μ M Ko143 jelenlétében vagy hiányában. Az ABCG2-t és ABCG2-GFP-t expresszáló sejtek csökkent MX felhalmozódást mutattak, melyet a Ko143 (**B-D panel**) az ABCG2-negatív sejtek szintjére növelt. A sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on 5D3-A647 anti-ABCG2 antitesttel 2 μ M Ko143 jelenlétében vagy hiányában (**E, F, G panel**). A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel határoztuk meg. A Ko143 előkezelés növelte az ABCG2 (**F panel**) és ABCG2-GFP (**G panel**) expresszáló sejtek 5D3-reaktivitását. Az ABCG2-negatív sejtek csak elhanyagolható 5D3 kötődést mutattak, amelyet a Ko143 (**E panel**) nem befolyásolt. A bemutatott reprezentatív eredmények 3-5 független kísérletből származnak.

Streptolizin-O-val permeabilizálhatók az MDCK II sejtek

Figyelembe véve az ABC transzporterek érzékenységét membránkörnyezetük összetételére, szerettünk volna olyan kísérleti rendszert kidolgozni, amely lehetővé teszi az ABCG2 katalitikus ciklusának tanulmányozását normál sejtek plazmamembránjában. Vizsgálni kívántuk különböző nukleotidok koncentráció-függő hatását az ABCG2 konformáció változásaira. Mivel a nukleotidok negatív töltéseik miatt nem jutnak át az ép plazmamembránon a sejteket óvatosan permeabilizálni kell. Az MDCK II sejtek jól permeabilizálhatók a Streptococcus pyogenesből származó pórusformáló SLO toxinnal. A toxin a membrán koleszterinjéhez kötődik, oligomerizálódik és így a kisebb molekulák számára átjárható pórust hoz létre [257].

A sejteket különböző koncentrációban alkalmazott SLO-val kezeltük, majd propidium-jodidos festéssel áramlási citométerben meghatároztuk a permeabilizált sejtek arányát. Mivel az SLO oxigén labilis, így oxidatív környezetben a permeabilizálás hatékonysága csökken, ezért redukáló szer (DTT, ditiotritol) mellett is megvizsgáltuk a hatását a sejtekre. A **14A ábrán** látható, hogy magas SLO koncentráció mellett a sejtek jelentős hányada permeabilizálódott, és ezt tovább fokozta a DTT jelenléte. Azonban azt is megfigyeltük, hogy az 5D3 reaktivitása az ABCG2 fehérjéhez magas DTT koncentráció mellett csökkent (**14B ábra**), feltehetőleg azért, mert a DTT redukálja az ABCG2 homodimer kialakításában résztvevő diszulfid hidakat. Hogy elkerüljük az ABCG2 fehérje szerkezeti változását a további kísérletekben 1 mM DTT-t alkalmaztunk. Permeabilizálást követően mosással eltávolítottuk a sejtekből a nukleotidokat, majd feltöltöttük őket a kívánt típusú, illetve koncentrációjú nukleotidokkal vagy nukleotid-analógokkal (pl. ATP, ADP, AMP-PNP) (**14C ábra**).



14. ábra: Az MDCK II sejtek Streptolizin O (SLO) toxinnal történő permeabilizálásának optimalizálása. Az MDCK II sejteket különböző toxin koncentrációk mellett kezeltük 30 percig 37°C-on redukálószer ditiotreitol (DTT) jelenlétében vagy hiányában (**A panel**). A nem kötődött toxin eltávolítását követően a sejteket 3 μg/mL propidium jodiddal festettük a permeabilizálás hatékonyságának meghatározására. A toxin koncentráció optimalizálását követően 5 μg/mL SLO mellett különböző DTT koncentrációkkal (1 mM–10 mM) kezeltük a mintákat a permeabilizálás során, majd 5 μg/mL 5D3 antitesttel jelöltük őket 20 percig 37°C-on (**B panel**). A redukálószer koncentrációjának növelésével csökkent az ABCG2 molekulák 5D3-reaktivitása. A „félleg” permeabilizált sejtekből mosási lépésekkel eltávolítottuk a nukleotidokat, annak érdekében, hogy a kívánt koncentrációban tudjuk alkalmazni az általunk választott nukleotidot (ATP, ADP, AMP-PNP), majd a mintákat a konformáció érzékeny kötődésű 5D3 antitesttel jelöltük, a kapott pontokra pedig dózis-hatás görbét illesztve meghatároztuk a transzporter látszólagos nukleotid-affinitását (**C panel**). A bemutatott reprezentatív eredmények 3-5 független kísérletről származnak.

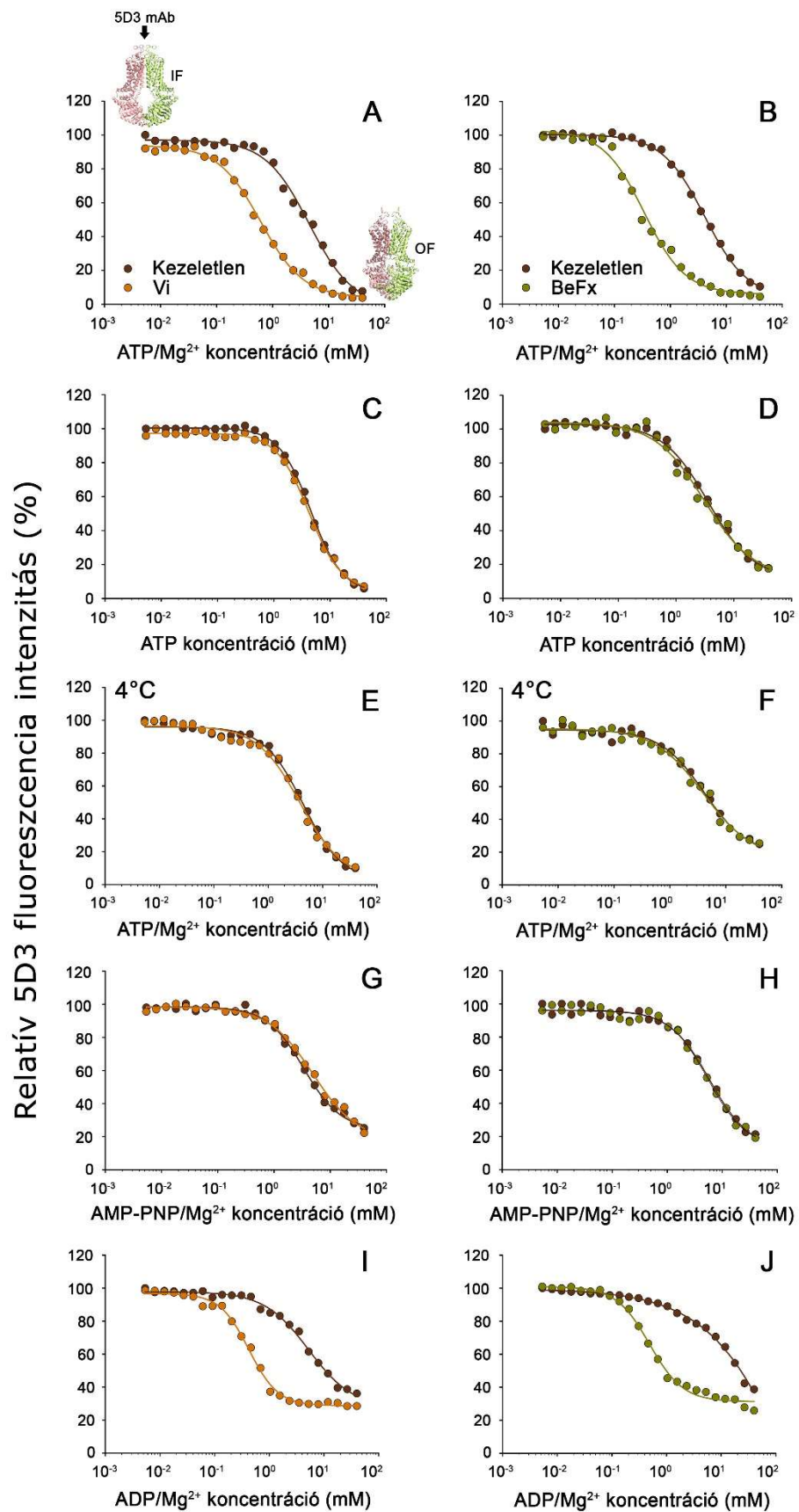
A nukleotid kötés elégséges az IF-OF konformáció változáshoz

Az ABCG2 nukleotid-függő konformáció változásainak tanulmányozásához szisztematikusan változtattuk az intracelluláris nukleotid koncentrációkat SLO toxinnal permeabilizált sejteken. A TMD konformációban tapasztalható ATP-szabályozott váltásnak megfelelően a növekvő ATP/Mg²⁺ koncentráció fokozatosan csökkentette az ABCG2 5D3-A647 festődését, magas ATP/Mg²⁺ koncentrációnál közel nullára csökkent a fehérje 5D3 reaktivitása (**15A és B ábra**). A dózis-hatás görbék illesztésével meghatároztuk az ABCG2 látszólagos ATP/Mg²⁺ affinitását (K_A=4,07±0,76mM). Az ATP hidrolízisének megakadályozására az ATP-t Mg²⁺ hiányában (ATP + EDTA; **15C és D ábra**) vagy alacsony hőmérsékleten alkalmaztuk (**15E és F ábra**), vagy egy nem hidrolizálódó ATP analóggal, az AMP-PNP-vel helyettesítettük (**15G és H ábra**). Érdekes módon az ABCG2-t 5D3-nemkötő

állapotba hozó konformáció változás ATP hidrolízis hiányában is megtörtént, és hasonló nukleotid koncentráció-függést mutatott, mint a hidrolízist lehetővé tevő körülmények között (**5. táblázat**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az 5D3-nemkötő, valamint az 5D3-reaktív konformációk megfelelnek az OF és az IF konformációknak, amint azt az ATP-kötött, illetve a nukleotidmentes krio-EM szerkezetekben láthatjuk (**11. ábra**).

A foszfát-analógokról, például a Vi-ról vagy a BeFx-ről ismert, hogy az ATP hidrolízisét követően a lehasadt gamma-foszfátot helyettesítve stabil háromkomponensű komplexet képeznek az ABC transzporterekkel és a miozin motorfehérjével (pl. ABCG2-ADP-Vi/BeFx). A különböző foszfát-analógokkal kapott miozin komplexek különböző geometriája alapján úgy gondolják, hogy a BeFx-komplex egy pre-hidrolitikus, a Vi-csapdázott komplex pedig egy poszt-hidrolitikus konformert reprezentál [266, 267]. Ennek megfelelően a foszfát-analógokkal végzett kezelések körülbelül 10-szeresére növelték az ABCG2 látszólagos nukleotid-affinitását (**5. táblázat**) az ATP hidrolízist megengedő körülménye között (**15A és B ábra**), megerősítve, hogy mindkét foszfát analóg stabil ADP-csapdázott komplexeket képezhet az ABCG2-vel. Amennyiben az ATP-hidrolízis gátolt, a foszfát-analógok semmilyen hatással nem voltak a K_A -értékekre (**15C-H ábra**).

Hasonlóan az MsbA bakteriális ABC transzporterhez, [111] az ADP/Mg^{2+} is indukálhatja az IF konformer OF konformációra váltását (**15I-J ábra**), bár valamivel magasabb koncentrációban ($K_A = 7,38 \pm 2,31$ mM), mint az ATP/Mg^{2+} (**5. táblázat**). Ezen kívül a Vi vagy BeFx alkalmazása a transzporter molekulákat ADP/Mg^{2+} jelenlétében is magas nukleotid-affinitású állapotban csapdázta, amit a látszólagos nukleotid-affinitás körülbelül 10-szeres növekedése jelzett (**5. táblázat**). Az ADP/Mg^{2+} -ból kiinduló csapdázási reakciók K_A értékei nem tértek el az ATP/Mg^{2+} -ból kiinduló csapdázási reakciók K_A -értékeitől. Az ADP/Mg^{2+} -ból induló csapdázási reakciókban azonban az ABCG2 molekulák körülbelül 30%-a 5D3-reaktív állapotban maradt, még nagyon magas nukleotid koncentrációk mellett is. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy az ADP/Mg^{2+} -ból származó komplex kevésbé stabil, valószínűleg rövidebb élettartamú, mint a hidrolitikus ciklusban ATP/Mg^{2+} -ból képződő komplex, ezért a csapdázási reakció alacsonyabb hatásfokkal megy végbe. Mivel ép, egészséges sejtekben a citoszol ATP-koncentrációja több mint 10-szer magasabb az ADP-koncentrációhoz képest [268], ezek az eredmények azt mutatják, hogy élő sejtekben (i) az 5D3-reaktív IF állapotról az 5D3-nemkötő OF konformerre történő váltást az ATP kötődése indukálja; és (ii) az 5D3-reaktív IF konformáció visszaállítása csak a hidrolízis termékek felszabadulását követően történhet meg.



15. ábra: Az 5D3-reaktivitás nukleotid függése. Az ABCG2-t kifejező MDCK II sejteket SLO toxinnal permeabilizáltuk, hogy lehetővé tegyük az intracelluláris nukleotid koncentráció szisztematikus változtatását. Az 5D3-reaktivitás nukleotid koncentráció függését vizsgáltuk ATP/Mg²⁺ (**A, B panel**), ATP + EDTA (**C, D panel**), AMP-PNP/Mg²⁺ (**G, H panel**) és ADP/Mg²⁺ (**I, J panel**) esetében vanadát (**bal oldali panelek**) vagy BeFx (**jobb oldali panelek**) jelenlétében vagy hiányában. A mintákat 37°C-on 10 percig nukleotidokkal előkezeltük, majd tovább inkubáltuk 5 µg/mL 5D3-A647-tel 37°C-on 20 percig, kivéve az **E, F panelt**, ahol az összes kezelést jégen végeztük. Nukleotid csapdázás esetén 37°C-on 20 percig inkubáltuk a sejteket nukleotidokkal és BeFx-dal vagy Vi-tal, majd a nem kötődött nukleotidokat kimostuk és tovább inkubáltuk a mintákat 5 µg/mL 5D3-A647-tel 37°C-on 20 percig, kivéve **E, F panel** ahol az 5D3 jelölést 45 percig végeztünk jégen. Az **A panele**n a rajzok az ABCG2 IF és OF konformereit ábrázolják. A bemutatott reprezentatív görbék 3-5 független kísérletből származnak.

5. táblázat: Az ABCG2 különböző nukleotidok (ATP, ADP, AMP-PNP) iránti látszólagos affinitása (K_A) az ATP hidrolízist megengedő vagy kizáró körülmények között, valamint a poszt-hidrolitikus állapotban (ns = nem szignifikáns).

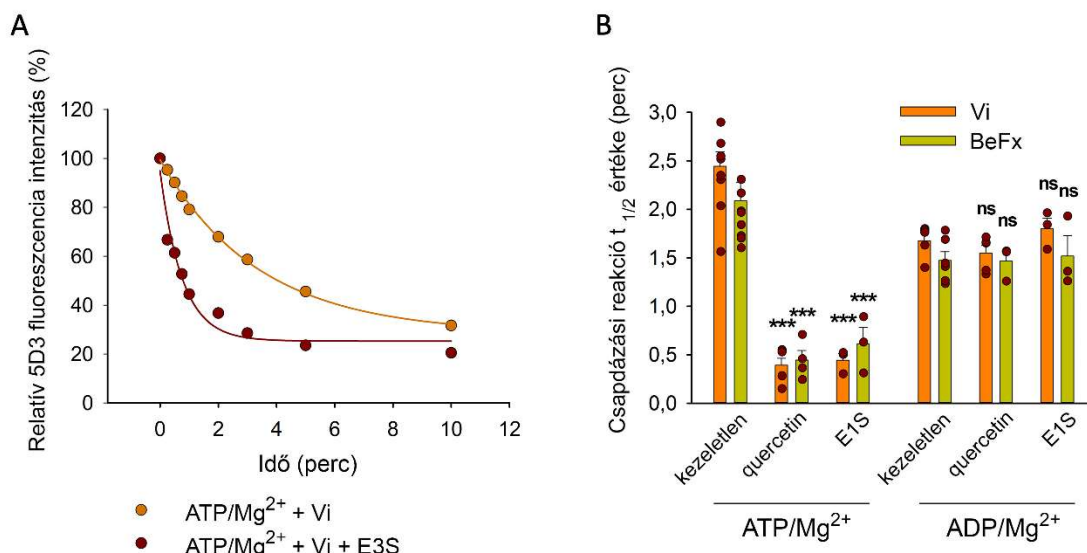
Kezelés	Körülmények		K _A (mM ± SD)	n	ATP/Mg ²⁺ mintához viszonyított statisztika (1. sor)	Ábra
	Hőm.	Mg ²⁺				
ATP	37°C	+	4,15 ± 1,08	11	-	15A
ATP + Vi	37°C	+	0,34 ± 0,25	11	P < 0,001	15A
ATP + BeFx	37°C	+	0,40 ± 0,06	3	P < 0,001	15B
ATP	37°C	-	3,69 ± 0,49	7	ns	15C
ATP + Vi	37°C	-	3,77 ± 0,38	4	ns	15C
ATP + BeFx	37°C	-	3,20 ± 0,15	3	ns	15D
ATP	4°C	+	4,38 ± 0,24	6	ns	15E
ATP + Vi	4°C	+	4,01 ± 0,23	3	ns	15E
ATP + BeFx	4°C	+	4,06 ± 0,46	3	ns	15F
AMP-PNP	37°C	+	5,29 ± 0,22	2	ns	15G
AMP-PNP + Vi	37°C	+	4,91	1	-	15G
AMP-PNP + BeFx	37°C	+	5,88	1	-	15H
ADP	37°C	+	7,37 ± 2,31	6	P < 0,001	15I
ADP + Vi	37°C	+	0,44 ± 0,10	3	P < 0,001	15I
ADP + BeFx	37°C	+	0,57 ± 0,32	3	P < 0,001	15J

A szubsztrátok növelik a vanadát- vagy BeFx-csapdázott konformer képződésének sebességét

A transzportált szubsztrátok fokozzák számos ABC transzporter, köztük az ABCB1 és az ABCG2 ATP hidrolízis aktivitását [164, 265]. A transzporter molekulák fokozatos felhalmozódása a Vi- vagy BeFx-csapdázott állapotban az ABC transzporterek katalitikus

ciklusának egy parciális reakcióját reprezentálja [168]. Ennek megfelelően a szubsztrátok, pl. ösztron-3-szulfát (E1S) vagy a quercetin felgyorsították az ABCG2 felhalmozódását a Vi- vagy BeFx-csapdázott poszt-hidrolitikus állapotban (**16. ábra**). Megfigyeltük, hogy a szubsztrátok kb. ötszörösére csökkentették a csapdázási reakció felezési idejét ($t_{1/2}$ érték, lásd a **16B ábrán**), ami összhangban van ezen vegyületek ATP hidrolízist fokozó hatásának mértékével [265]. A viszonylag hosszú $t_{1/2}$ értékek az ATPáz adatokból kiszámítható [269] kb. 100 ms nagyságrendű teljes ciklusidőhöz képest, arra utalnak, hogy a foszfát analógokkal csapdázott poszt-hidrolitikus komplex keletkezése egy nagyon kis valószínűségű esemény. A csapdázási reakció megnövekedett sebessége szubsztrátok jelenlétében az ATP-áz ciklus nagyobb „fordulatszámával”, vagy a Vi-, illetve BeFx-érzékeny állapot hosszabb élettartamával magyarázható.

Érdekes módon, amikor az ATP/Mg^{2+} -t ADP/Mg^{2+} -ra cseréltük, a foszfátanalóg-csapdázott komplexek képződését nem gyorsították fel a szubsztrátok, ami arra utal, hogy a szubsztrátok nem befolyásolják az ADP-kötött foszfát analógra érzékeny ABCG2 konformer stabilitását vagy élettartamát. Ez akkor fordulhat elő, ha a szubsztrátok hasonló mértékben gyorsítják az ADP-kötött konformer képződését és disszociációját, vagy pedig egyáltalán nincsenek hatással ezekre a folyamatokra.

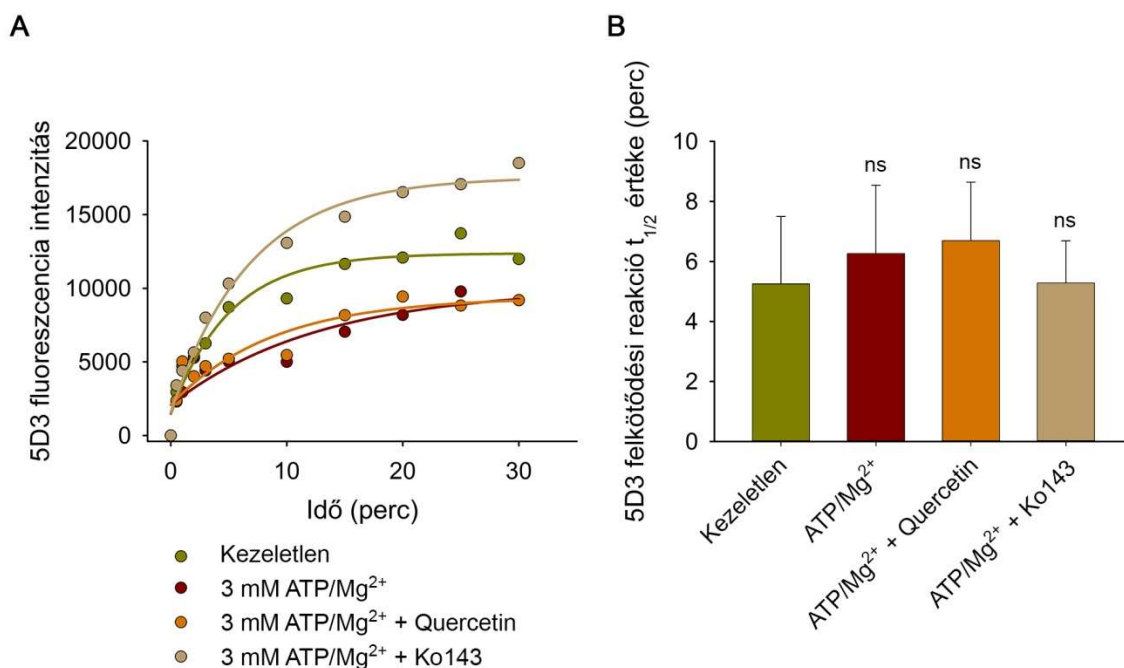


16. ábra: Szubsztrátok hatása a Vi- és BeFx-csapdázott poszt-hidrolitikus komplexek képződésének kinetikájára. A permeabilizált ABCG2-t kifejező MDCK II sejteket $10 \mu\text{M}$ quercetinnel vagy ösztron-3-szulfáttal (E1S) előkezeltük 37°C -on, majd tovább inkubáltuk $0,5 \text{ mM}$ ATP/Mg^{2+} vagy ADP/Mg^{2+} mellett Vi vagy BeFx jelenlétében. A különböző időpontokban vett mintákat $5 \mu\text{g/mL}$ 5D3-A647-tel jelöltük jégen 45 percig. Az **A panel** egy reprezentatív vanadát csapdázási kísérletet mutat be E1S

hiányában vagy jelenlétében, míg a **B panel** a kinetikai görbék exponenciális illesztéséből számított $t_{1/2}$ értékeket foglalja össze (lásd Anyagok és módszerek). Az ábrán 3-5 független kísérlet átlag $\pm$ SD értékeit láthatjuk. A szubsztráttal nem kezelt mintákhoz viszonyított szignifikáns különbségeket: ***: $P < 0,001$; a nem szignifikáns különbségeket pedig: ns felirattal jelöltük. (ANOVA, Holm-Sidak post hoc teszt).

Az ABCG2 ligandjai nem befolyásolják az 5D3 kötődés kinetikáját

A továbbiakban megvizsgáltuk az ATP/Mg²⁺, a quercetin és a Ko143 hatását az 5D3 mAt kötődésének időkinetikájára. Ahogy a **17. ábrán** láthatjuk az 5D3 mAt maximális kötődéséhez körülbelül 20-25 perc szükséges. ATP/Mg²⁺, valamint a szubsztrát quercetin jelenlétében a transzporterek csökkent 5D3-reaktivitása tapasztalható, míg az ABCG2 inhibitor Ko143 jelentősen megnövelte a fehérje 5D3 kötését. Érdekes módon az antitest kötődés kinetikáját nem befolyásolták az ABCG2 ligandjai (**17B ábra**). Így megállapítottuk, hogy az antitest kötődés kinetikáját vizsgálva nem tudunk következtetéseket levonni a transzporter konformáció változásainak kinetikájára vonatkozólag.



17. ábra: ABCG2 ligandok hatása az 5D3 kötődés kinetikájára. Reprezentatív 5D3 antitest kötődési görbék (**A panel**) SLO toxinnal permeabilizált ABCG2-t kifejező MDCK II sejteken. Az SLO toxinnal permeabilizált sejteket 5D3-A647-vel jelöltük 0,5 mM ATP/Mg²⁺, 2 μ M Ko143, illetve 10 μ M quercetin jelenlétében vagy hiányában 37°C-on. A különböző időpontokban vett mintákat kétszer mostuk jéghideg PBS-sel és az áramlási citometriás analízisig jégen tároltuk. A **B panel** az antitest kötődési görbék illesztéséből számított $t_{1/2}$ értékek átlagát $\pm$ SD mutatja 3-5 független mérésből (ns = nem szignifikáns). (ANOVA, Holm-Sidak post hoc teszt).

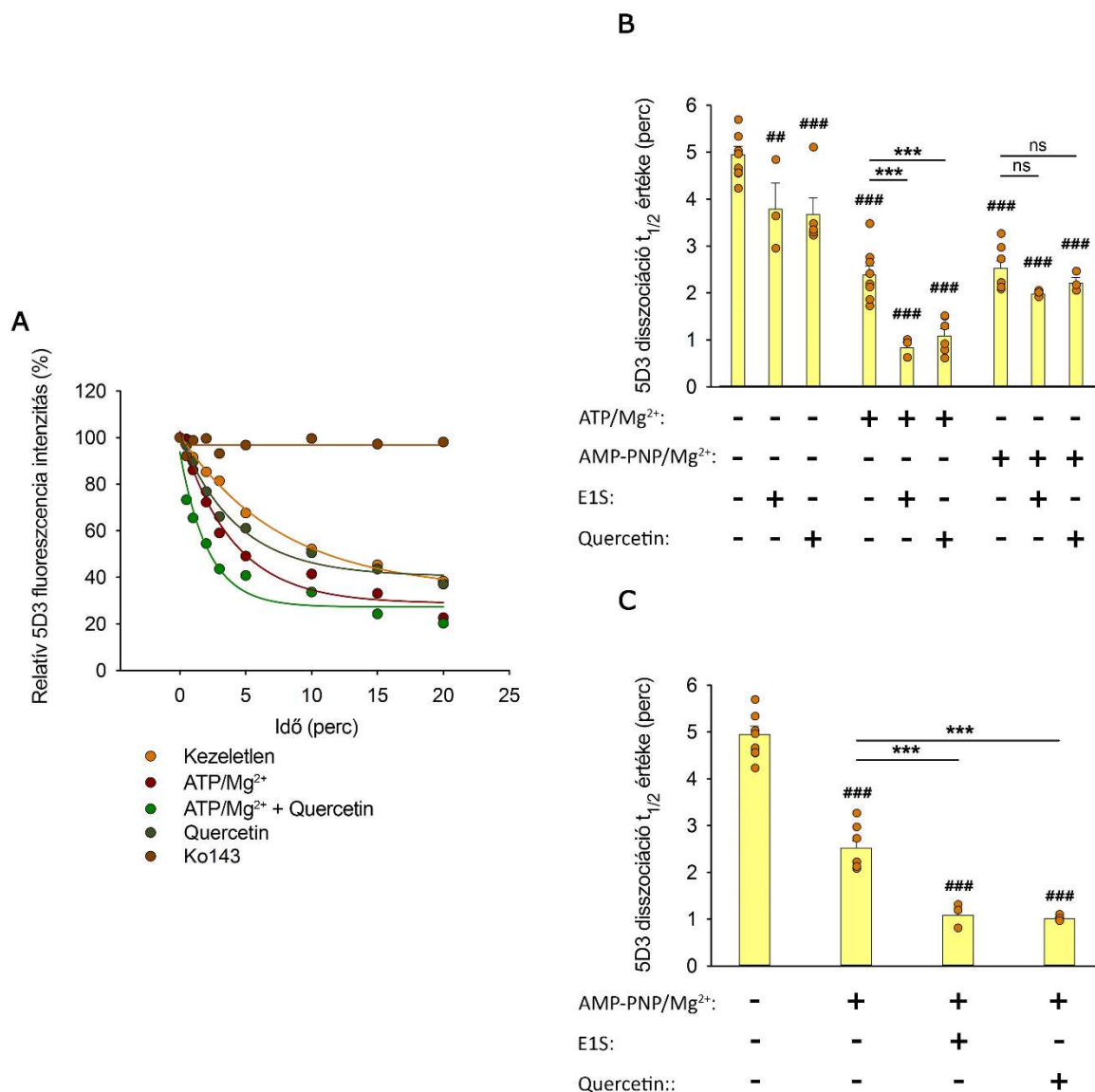
A szubsztrátok felgyorsítják az ABCG2 IF-OF konformációs átmenetét

A következő kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szubsztrátok vajon melyik katalitikus lépés befolyásolásán keresztül képesek az ABCG2 ATP hidrolízisét fokozni. Ezért megvizsgáltuk, hogy a nukleotidok és szubsztrátok befolyásolják-e az ABCG2 5D3 által detektálható IF konformációból az OF konformációba történő átmenetének kinetikáját. A permeabilizált sejtekből a nukleotidokat kimosva az ABCG2 molekulákat az IF konformációban szinkronizáltuk, majd 5D3-A647 antitesttel jelöltük. A nem kötődött 5D3-A647 eltávolítása után a sejteket 37°C-on kellően nagy térfogatban inkubáltuk, hogy megakadályozzuk az antitest újrakötődését. Ilyen körülmények között a sejtek 5D3-A647 fluoreszcenciájának fokozatos csökkenését figyeltük meg (**18A ábra**), amit a Ko143 kezelés teljesen megakadályozott, alátámasztva azt az elképzelést, hogy az ABCG2 inhibitor Ko143 stabilizálja a transzporter molekulákat az 5D3-reaktív IF konformációban (**18A ábra**). Az antitest disszociáció sebessége szignifikánsan megnövekedett transzportált szubsztrátok vagy ATP/Mg²⁺ jelenlétében (**18A és B ábra**). Az 5D3-hoz kötött ABCG2 konformer felezési idejének (t_{1/2}) legnagyobb, kb. 5-szörös csökkenését, azonban akkor figyeltük meg, amikor a szubsztrátokat ATP/Mg²⁺-val együtt adtunk (**18B ábra**).

A további kísérletekben az ATP-t egy nem hidrolizálható analóggal az AMP-PNP/Mg²⁺-al helyettesítettük (**18B ábra**). Az ABCG2 molekulák ATP hidrolízis hiányában is átbillennek az IF konformációból az OF konformációba (**15G és H ábra**), míg a visszafelé történő átmenetnek az IF állapotba rendkívül kicsi a valószínűsége. Az AMP-PNP/Mg²⁺ által indukált 5D3 disszociáció időfüggése hasonló volt az ATP/Mg²⁺ esetén tapasztaltnak, ami alátámasztja, hogy az ATP/Mg²⁺ vagy AMP-PNP/Mg²⁺ jelenlétében megfigyelt antitest disszociációs kinetika az első nukleotid-indukálta IF-OF átmenetet tükrözi (**18B ábra**). Meglepő módon, ha ugyanazokat a szubsztrátokat AMP-PNP/Mg²⁺-val együtt adtuk, nem növelte tovább az 5D3 disszociáció sebességét, ami arra utal, hogy az AMP-PNP/Mg²⁺ kötődés által kiváltott NBD dimer képződés az ABCG2-t alacsony szubsztrát-kötő affinitású állapotba kapcsolja (**18B ábra**). Ugyanakkor a t_{1/2} értékek hasonló csökkenése volt megfigyelhető, amikor a szubsztrátokat az AMP-PNP/Mg²⁺ kezelés előtt adtunk (**18B és C ábra**), ami azt jelzi, hogy a szubsztrátok AMP-PNP/Mg²⁺ kezelés mellett is felgyorsítják az IF-OF átmenetet.

A fenti adatok együttesen azt sugallják, hogy a szubsztrátok kötődése a TMD-khez szerkezeti változást indukál a transzporterben, amely elősegítheti a nukleotid-függő NBD

dimer képződést és az ezzel járó IF-OF konformációs átmenetet, valószínűleg a fenti konformáció változások energia gátjának csökkentésével [270].

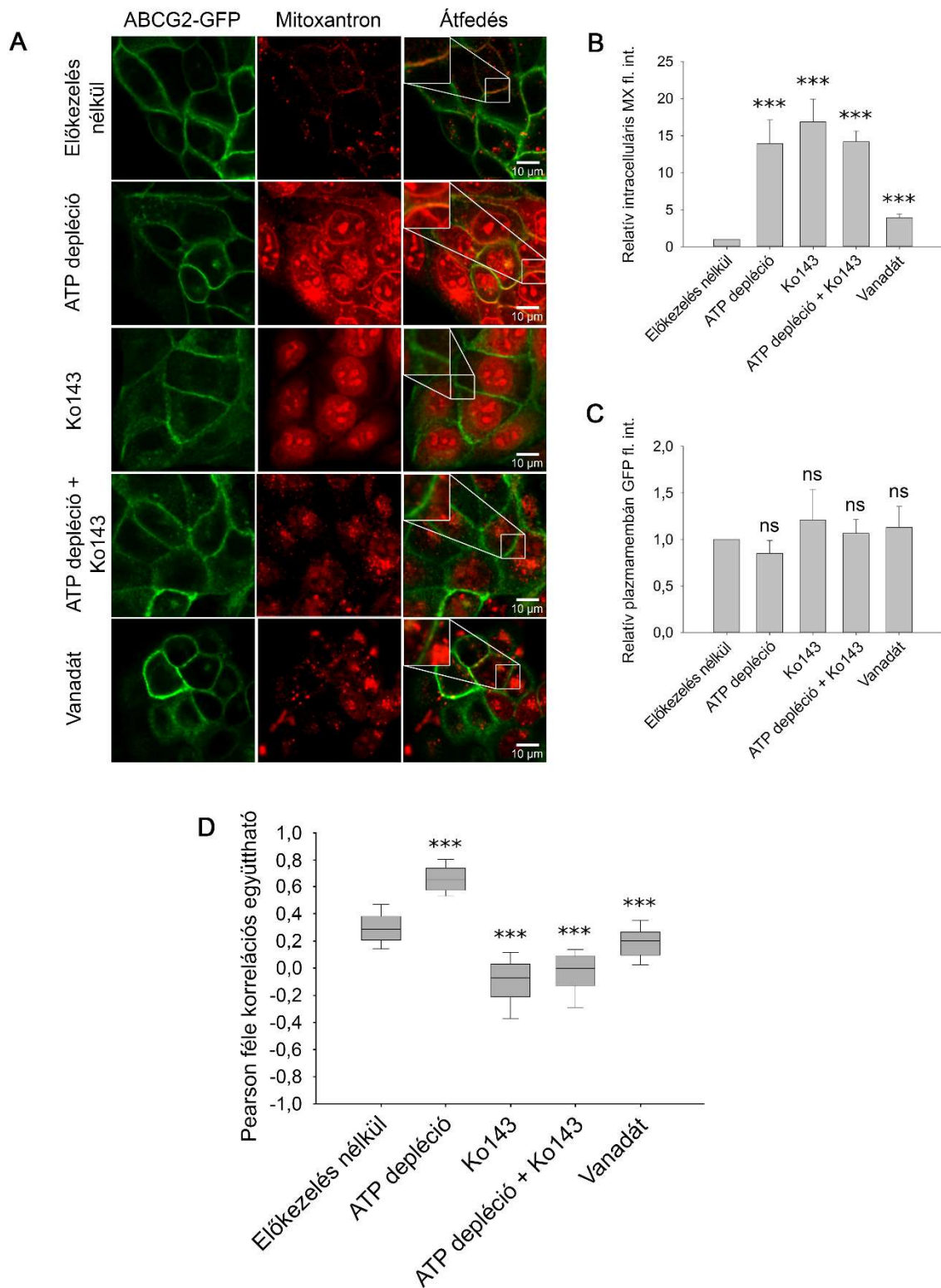


18. ábra: Szubsztrátok és nukleotidok hatása az 5D3 disszociáció kinetikájára, a szubsztrátok és nukleotidok egyidejű (A és B panel), illetve a szubsztrátok nukleotidokat megelőző (C panel) hozzáadásával. A permeabilizált ABCG2-t kifejező MDCK II sejteket előzetesen 5D3-A647-tel jelöltük 10 μ M quercetin vagy ösztrol-3-szulfát (E1S) jelenlétében vagy hiányában 20 percig 37°C-on. A nem kötődött 5D3-A647 eltávolítása után a sejteket tovább inkubáltuk 3 mM ATP/Mg²⁺ vagy AMP-PNP/Mg²⁺ jelenlétében, a transzportált szubsztrátok hiányában vagy jelenlétében. Az **A panel** reprezentatív 5D3 disszociációs görbéket mutat a feltüntetett körülmények között, míg a **B és C panel** a disszociációs görbék exponenciális illesztéséből (lásd Anyagok és módszerek) számított $t_{1/2}$ értékeket foglalja össze 3-5 független mérés átlagát $\pm$ SD felhasználva. Szignifikáns különbségek a kezeletlen mintákhoz képest (1. oszlop) ###: $P < 0,001$ vagy ##: $P < 0,01$ módon jelöltük. Szignifikáns különbségeket a csak nukleotiddal kezelt mintákhoz képest ***: $P < 0,001$ módon- a nem szignifikáns különbségeket pedig ns felirattal jelöltük. (ANOVA, Holm-Sidak post hoc teszt).

Az ABCG2 nukleotidmentes IF konformere nagyobb szubsztrát-affinitással rendelkezik, mint a vanadát-csapdázott poszt-hidrolitikus konformer

A következő kísérletekben az ABCG2-GFP és a fluoreszcens ABCG2 szubsztrát MX sejtbeni lokalizációját vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal. Korábbi megfigyeléseknek megfelelően [179] a MX alacsony koncentrációban alkalmazva csak gyengén festette az MDCK ABCG2-GFP sejteket, míg az ATP depléción, a Ko143 kezelés vagy a foszfát analógok (BeFx, Vi) gátolták az ABCG2 által közvetített szubsztrát kiáramlást, és ennek megfelelően növelték a MX intracelluláris felhalmozódását (**19A és B ábra**).

Érdekes módon az ATP-depletált sejtek plazmamembránjában is erős MX festődését figyeltük meg (**19A ábra**), amelyet a kompetitív ABCG2 inhibitor Ko143 együttes alkalmazása teljesen kivédett, ami arra utal, hogy a MX feldúsulása a plazmamembránban valószínűleg az ABCG2-hez való kötődésének köszönhető. A MX-kötött ABCG2 molekulák arányának számszerűsítéséhez kiszámítottuk a Pearson-féle korrelációs együtthatót (PCC) a MX és az ABCG2-GFP jelek között a plazmamembránt reprezentáló pixelekből. Mivel az ABCG2-GFP jel változatlan maradt a különböző kezelések során (**19C ábra**), a korrelációs együttható értékét leginkább a MX transzporterhez való kötődése határozza meg. Az ATP-depletált sejtekben a magas Pearson-féle korrelációs együtthatók ($PCC = 0,72 \pm 0,12$) (**19D ábra**) azt jelzik, hogy az ABCG2 molekulák többsége MX-hoz kötött konformációban található. A két jel közötti korreláció erősen csökkent Ko143 jelenlétében ($PCC = -0,1 \pm 0,18$), ami arra utal, hogy a kompetitív inhibitor kiszorította a MX-t a transzporter szubsztrát-kötőhelyéről. Akkor is hasonló eredményt kaptunk, amikor az ATP-depléciót Ko143 kezeléssel kombináltuk ($PCC = -0,04 \pm 0,17$). Az MX ABCG2-hez való kötődését foszfát analógok, például Vi ($PCC = 0,18 \pm 0,13$) is csökkentették, ami arra utal, hogy a poszt-hidrolitikus ABCG2 konformer szintén alacsony szubsztrát-affinitással rendelkezik. Érdekes módon a kezeletlen sejtekben szignifikánsan magasabb kolokalizációt mértünk a MX és az ABCG2-GFP jelek között ($PCC = 0,3 \pm 0,12$), mint a Ko143-mal kezelt sejtekben, ami azt valószínűsíti, hogy az élő sejtek plazmamembránjában az ABCG2 molekulák egy kis hányada MX-kötött állapotban van.

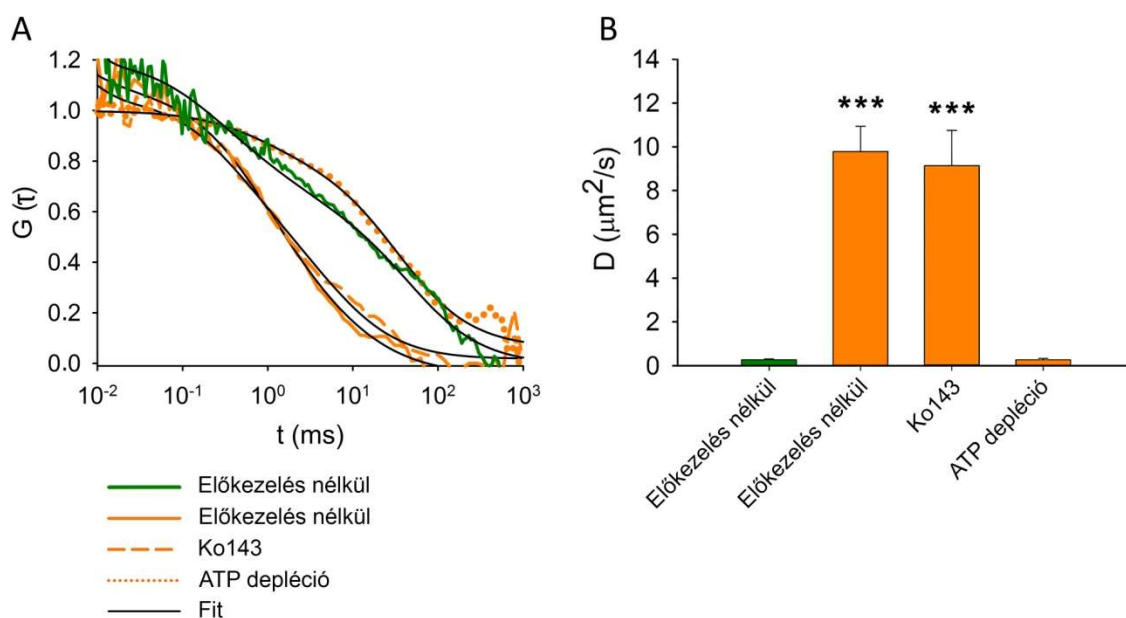


19. ábra: ABCG2-GFP (zöld) és mitoxantron (MX, piros) lokalizációja MDCK II sejtekben ATP-depléción és/vagy Ko143 vagy vanadát kezelés hatására (A panel). Mindegyik kezelés növelte az intracelluláris MX fluoreszcencia intenzitást (B panel), míg az ABCG2-GFP fluoreszcencia intenzitása a plazmamembránban változatlan maradt a kezeléseket során (C panel). A MX-kötött ABCG2 molekulák hányadát a MX és az ABCG2-GFP jelek közötti Pearson-féle korrelációs

együtthatók meghatározásával jellemeztük a plazmamembrán pixeleiben (**D panel**). Az ATP deplécióját a sejtek 10 mM Na-aziddal és 8 mM 2-dezoxiglükózzal végzett 15 perces előkezelésével idéztük elő. A **B és C paneleken** az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket jelentik, míg a **D panelen** boxplot-ok láthatók. Mindegyik kezelt csoportban 150-200 sejtet elemeztünk 3-5 független kísérletből. A szignifikáns különbségeket a kezeltlen kontrollhoz képest *** $P < 0,001$ mutatja. (Kolmogorov-Smirnov teszt).

Az IF konformer MX kötését FCS mérések is igazolják

A fluoreszcencia kolokalizációs kísérletek eredményeinek megerősítésére FCS vizsgáltuk a MX mobilitását ABCG2-GFP-pozitív MDCK II sejtek plazmamembránjában. Az ABCG2-höz kötött MX molekulák várhatóan kisebb diffúziós együtthatóval rendelkeznek a szabad MX-hoz képest [271], a transzporter nagy molekula tömege miatt (~250 kDa az ABCG2-GFP homodimer, míg ~0,5 kDa az MX tömege). A MX (narancssárga) és az ABCG2-GFP (zöld) fluoreszcencia autokorrelációs függvényeit (ACF) a plazmamembránban egy kétkomponensű modell segítségével elemeztük (**20A ábra**). A sejtek ATP deplécióját követően a MX diffúziós együtthatója az ABCG2-GFP esetében kapott értékre csökkent, ami alátámasztja az ABCG2 nukleotidmentes IF konformerének magas szubsztrát-affinitását. A Ko143 kompetitív inhibitor megakadályozta a MX kötődését az ABCG2-hez, ami a nagy mobilitású MX populáció dominanciáját eredményezte a plazmamembránban (**20B ábra**).

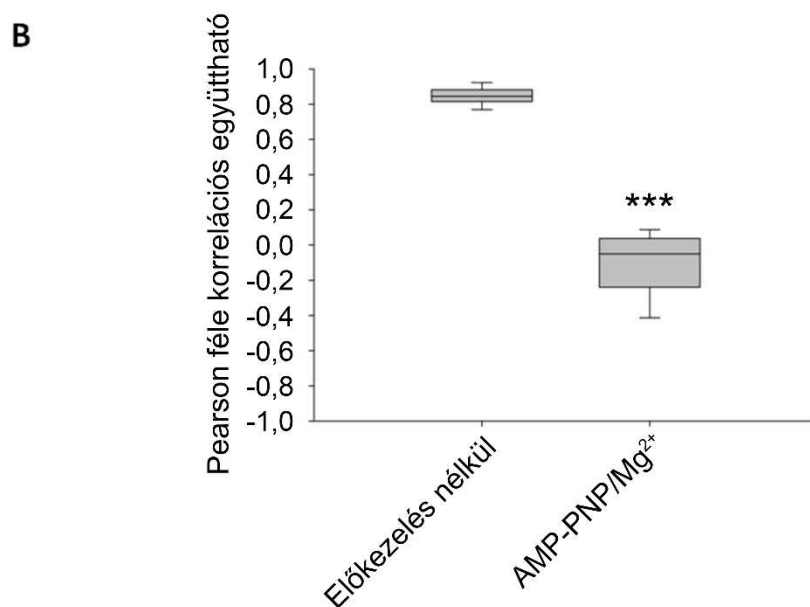
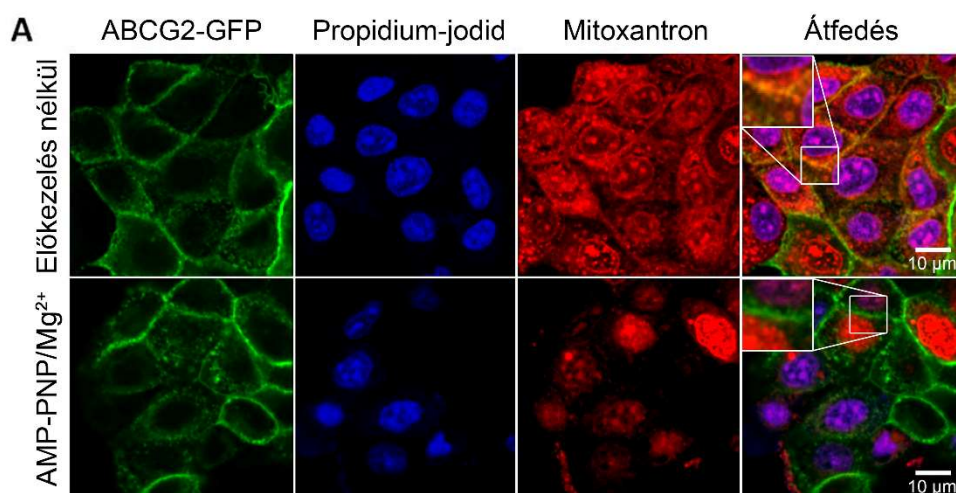


20. ábra: ABCG2-GFP (zöld szín) és MX (narancssárga szín) fluoreszcencia autokorrelációs függvényei (A panel) és diffúziós állandói (B panel) ép MDCK II sejtek plazmamembránjában. Az ABCG2-GFP-t expresszáló sejteket előkezelés nélkül, vagy ATP depléciót vagy Ko143 előkezelést követően 100 nM MX-nal festettük 15 percig 37°C-on. Minden oszlop $n=50-100$ sejt átlag $\pm$ SD értékét

*mutatja legalább 3 független mérésből. A különböző mintákban az MX diffúziós állandóját (narancssárga oszlopok) az ABCG2-GFP kezeletlen sejteken mért diffúziós állandójához (zöld oszlop) viszonyítottuk ***: $P < 0,001$. (Kolmogorov-Smirnov teszt).*

Az AMP-PNP kötődés az ABCG2-t alacsony szubsztrát-affinitású konformációba billenti

A krio-EM vizsgálatokkal összhangban [98] a sejtek SLO-val történő permeabilizálása szinkronizálja az ABCG2 molekulákat ATP-mentes 5D3-reaktív IF konformációban (**15. ábra**). Amikor a permeabilizált sejteket MX-nal kezeltük, erős kolokalizációt figyeltünk meg az ABCG2-GFP és a MX jelek között a plazmamembránban ($PCC = 0,85 \pm 0,05$), ami megerősíti az ABCG2 IF konformerének magas szubsztrát-affinitását. Meglepő módon, a permeabilizált sejtek 5 mM AMP-PNP/Mg²⁺-al történő inkubálása erősen csökkentette a MX és az ABCG2-GFP kolokalizációját a plazmamembránban ($PCC = -0,12 \pm 0,20$), ami azt jelzi, hogy az AMP-PNP kötődés által kiváltott IF-OF konformáció változás megakadályozza a MX ABCG2-höz való kötődését (**21. ábra**).

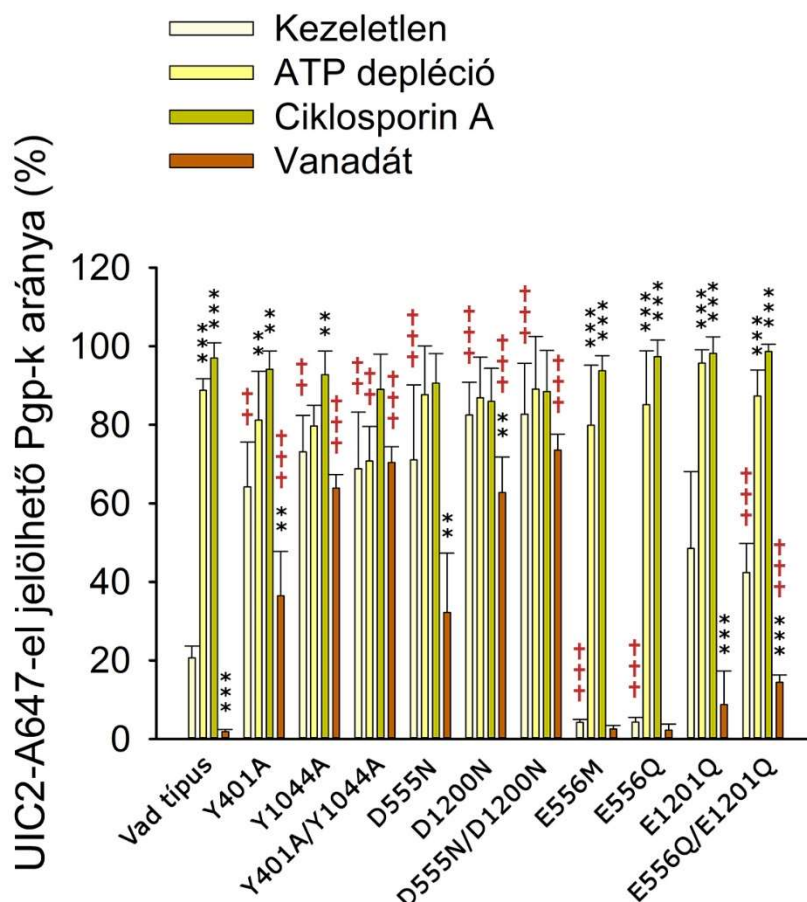


21. ábra: Az ABCG2 szubsztrát-affinitás változásai permeabilizált sejtekben. Az SLO-permeabilizált ABCG2-GFP-t expresszáló sejteket 5 mM AMP-PNP/Mg²⁺-al 15 percig előkezeltük, majd 500 nM MX-nal festettük 15 percig 37°C-on. A permeabilizálás hatékonyságát PI festéssel igazoltuk. A boxplot-ok $n > 150$ sejt Pearson-féle korrelációs együtthatóit mutatják 3 független kísérletből. *** $P < 0,001$ (Kolmogorov-Smirnov teszt).

II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata

Az A-hurok és a Walker B mutációk hatással vannak az UIC2-reaktív IF Pgp konformerek arányára

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az egyik vagy mindkét NBD konzervált szekvenciában előidézett mutációk befolyásolják-e az UIC2-reaktív IF Pgp konformerek arányát. Kezeletlen ép sejtek esetében a vad típusú Pgp-k kb. 20%-a volt UIC2-reaktív IF konformációban (**22. ábra**). A sejtek ATP depléciója, valamint a kompetitív Pgp inhibitor CsA irodalmi adatoknak megfelelően a sejtfelszíni Pgp molekulák közel 100 %-át ATP-mentes UIC2-reaktív IF állapotban csapdázta [126, 163, 272]. Érdekes módon az E556M és E556Q mutáns fehérjéknek csak kb. 5%-a volt UIC2-reaktív konformációban, míg az ATP kötődést gyengítő A-hurok mutánsok esetében az UIC2-reaktív konformer aránya lényegesen megemelkedett a vad típusú transzporterhez képest. Hasonlóképpen emelkedett UIC2-reaktivitást tapasztaltunk a D555N és D1200N mutánsokban is. Érdekes módon a sejtek ATP depléciója és a CsA kezelés valamennyi mutáns variánst közel 100%-ban átbillentette az UIC2-reaktív IF konformációba. A foszfát-analóg Vi hatására a vad típusú fehérjék az ATP hidrolízist követő állapotban csapdázódnak, melyről munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy UIC2-nemkötő OF állapotban van [272]. Vi kezelés hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az IF konformerek arányában a féloldali Walker A és a Walker B aszpartát mutánsokban is, ami arra utal, hogy ezekben a variánsokban legalább az ép katalitikus centrum képes az ATP hidrolízisére. Az ATP-t valószínűleg nagy affinitással kötő variánsok (E556M, E556Q) esetében Vi kezelés nem okozott további csökkenést az IF konformerek arányában.



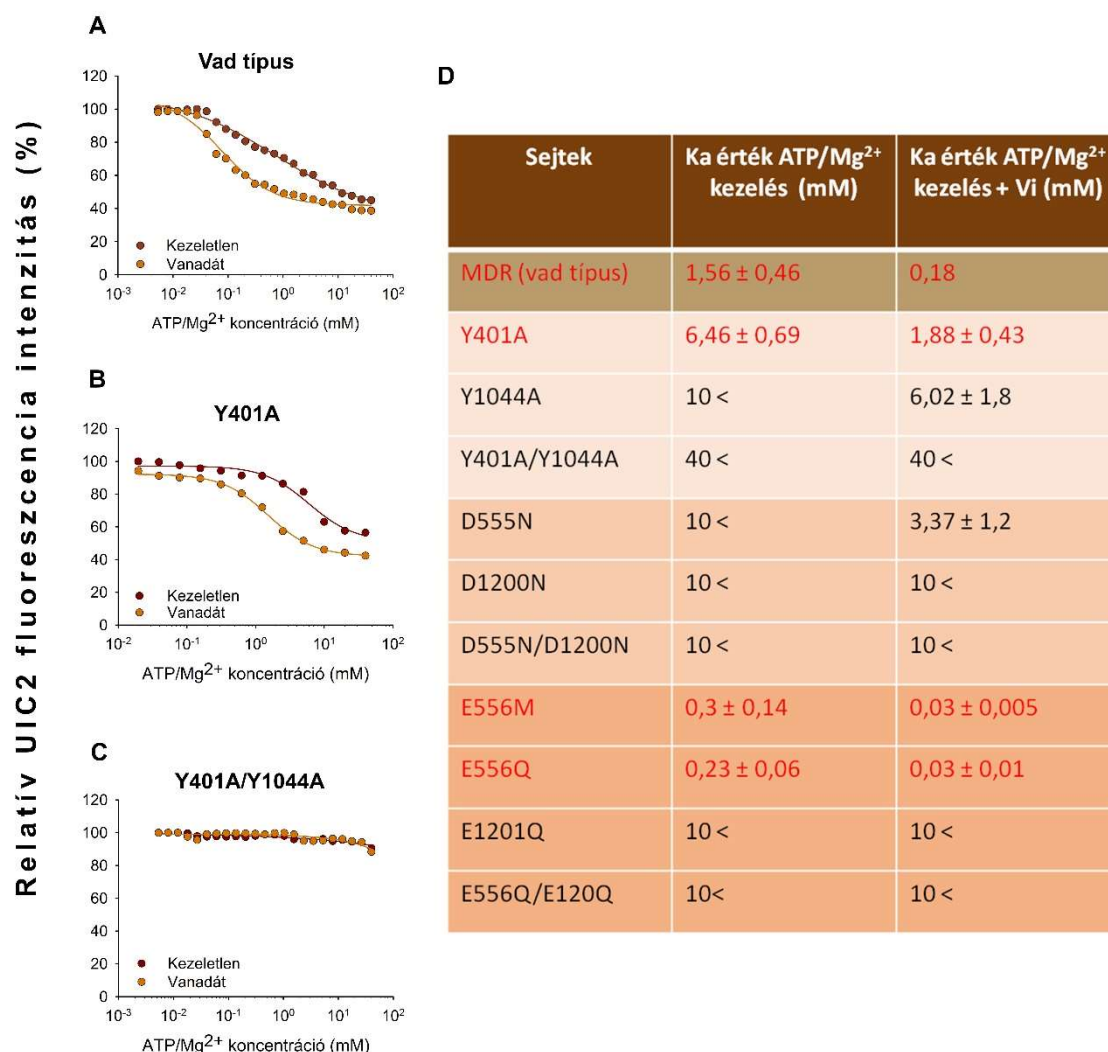
22. ábra: A vad típusú és mutáns Pgp variánsok UIC2-reaktivitása. A kezeletlen vagy különbözőképpen előkezelt (10 μ M ciklosporin A-val, vagy 0,5 mM vanadáttal, vagy a sejtek ATP deplécioja során 10 mM Na-aziddal és 8 mM 2-dezoxi-D-glükózzal 10 percig 37°C-on) sejteket azonos fluorofór/antitest arányú UIC2-A647 vagy 15D3-A647 antitesttel jelöltük. Az UIC2-reaktív konformerek arányát a 15D3-val jelölhető teljes sejtfelszíni Pgp populáció arányában adtuk meg. ANOVA, Dunnett T3 post hoc analízis ($n = 3$), szignifikáns különbségeknek a ***: $P < 0,001$, **: $P < 0,05$, értékeket tekintettük a kezeletlen mintákhoz képest. A vad típusú fehérjéhez viszonyított megfelelően kezelt és a kezeletlen minták közötti szignifikáns különbségeket †††: $P < 0,001$, ††: $P < 0,05$ jelzi.

Az NBD mutációk befolyásolják a nukleotid kötés affinitását

A nukleotidok NBD-hez való kötődése konformáció változásokat indukál a transzporter TMD régióiban az alloszterikus csatolás következtében. SLO toxinnal permeabilizált sejteken szisztematikusan változtattuk az intracelluláris ATP/Mg²⁺ koncentrációt. A TMD-k konformációjában bekövetkező ATP-szabályozott változással összhangban, a növekvő ATP/Mg²⁺ koncentráció, csökkenő UIC2-A647 jelölődést eredményezett (**23A ábra**). A vad típusú Pgp esetében az ATP/Mg²⁺ látszólagos affinitása ($K_A = 1,56 \pm 0,46$ mM), amit a Vi kezelés kb. egy nagyságrenddel megnövelt. A vad típusú Pgp-hez képest az E556M és az E556Q ($K_A = 0,23 \pm 0,06$) variánsok alacsonyabb K_A értéket

mutattak vanadát hiányában és jelenlétében egyaránt (**23D ábra**), ami azt jelzi, hogy a „katalitikus glutamát” cseréje szoros nukleotid kötést eredményez.

A féloldali A-hurok mutáns Y401A és Y1044A esetében is megfigyelhető az UIC2-reaktivitás ATP-függő csökkenése (**23B ábra**), azonban a kapott K_A értékek csökkent ATP affinitásra utalnak a vad típusú fehérjéhez képest. A K_A értékekben tapasztalt csökkenés V_i kezelés hatására valószínűsíti, hogy az Y401A, Y1044A, E556M és E556Q variánsok képesek ATP-t hidrolizálni legalább az ép katalitikus helyükön. A többi mutáns transzporter variáns esetében (Y401A/Y1044A, D555N, D1200N, D555N/D1200N) nagyon gyenge ATP affinitás értékeket tapasztaltunk ($10\text{ mM} <$), amely V_i kezelés hatására sem változott érdemben, mely alapján feltételezhetjük, hogy ezek a fehérjék nem képesek az ATP megkötésére és hidrolízisére.

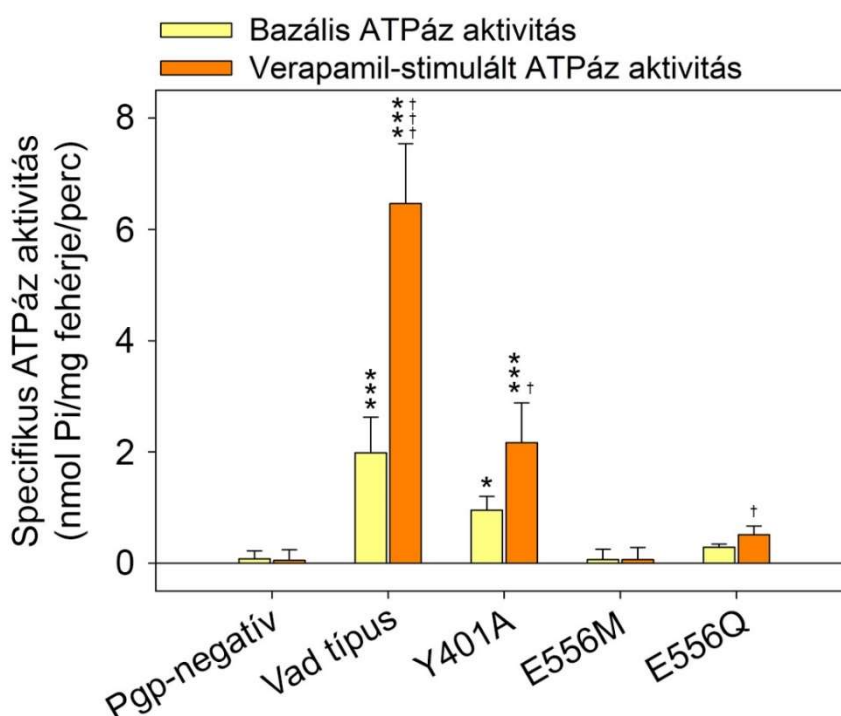


23. ábra: Az UIC2-reaktivitás ATP/Mg²⁺-függése. A vad típusú (A, D) és a mutáns (B-D) Pgp variánsokat expresszáló NIH 3T3 sejteket SLO toxinnal permeabilizáltuk, majd a mintákat különböző koncentrációban alkalmazott ATP/Mg²⁺-val kezeltük elő 10 percig 37°C-on 0,5 mM Vi jelenlétében vagy hiányában, majd mosás nélkül tovább inkubáltuk 10 µg/mL UIC2-A647-vel 20 percig 37°C-on. A mért adatpontokra négyparaméteres Hill függvényt illesztettünk, majd meghatároztuk az adott Pgp variáns, látszólagos nukleotid-affinitását Vi jelenlétében vagy hiányában. A független mérésekből származó látszólagos nukleotid-affinitás (K_A) értékek átlagát és szórását a **D panel** foglalja össze (n = 5-6).

Az Y401A és E556M mutációt hordozó Pgp molekulák mérhető ATP hidrolízis aktivitást mutatnak

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az előbbi kísérleteink alapján feltehetőleg ATP hidrolízis kompetens Pgp variánsok (Y401A, E556M, E556Q) mutatnak-e mérhető ATPáz aktivitást. Ehhez megmértük a vad típusú vagy a különböző mutáns Pgp variánsokat hasonlóan magas szinten expresszáló NIH 3T3 sejtekből készített membrán preparátumok

Pgp-függő steady-state ATPáz aktivitását. A Pgp-negatív preparátumokhoz képest szignifikánsan magasabb bazális ATPáz aktivitást mértünk a vad típusú Pgp-t kifejező preparátumokban (kb. 2 mmol Pi/mg fehérje/perc), amely kb. 3-szorosára nőtt a Pgp szubsztrát verapamil (40 μ M) hatására (**24. ábra**). Bár az Y401A és E556Q mutánsok esetében rendkívül alacsony bazális ATPáz aktivitást tapasztaltunk, mindkét mutáns aktivitását fokozta a szubsztrát adása. Ugyanakkor az E556M variánst kifejező preparátumok ATPáz aktivitása nem különbözött a Pgp-negatív mintákétól. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az Y401A és E556Q mutánsok képesek az ATP hidrolízisére ismétlődő ciklusokban.

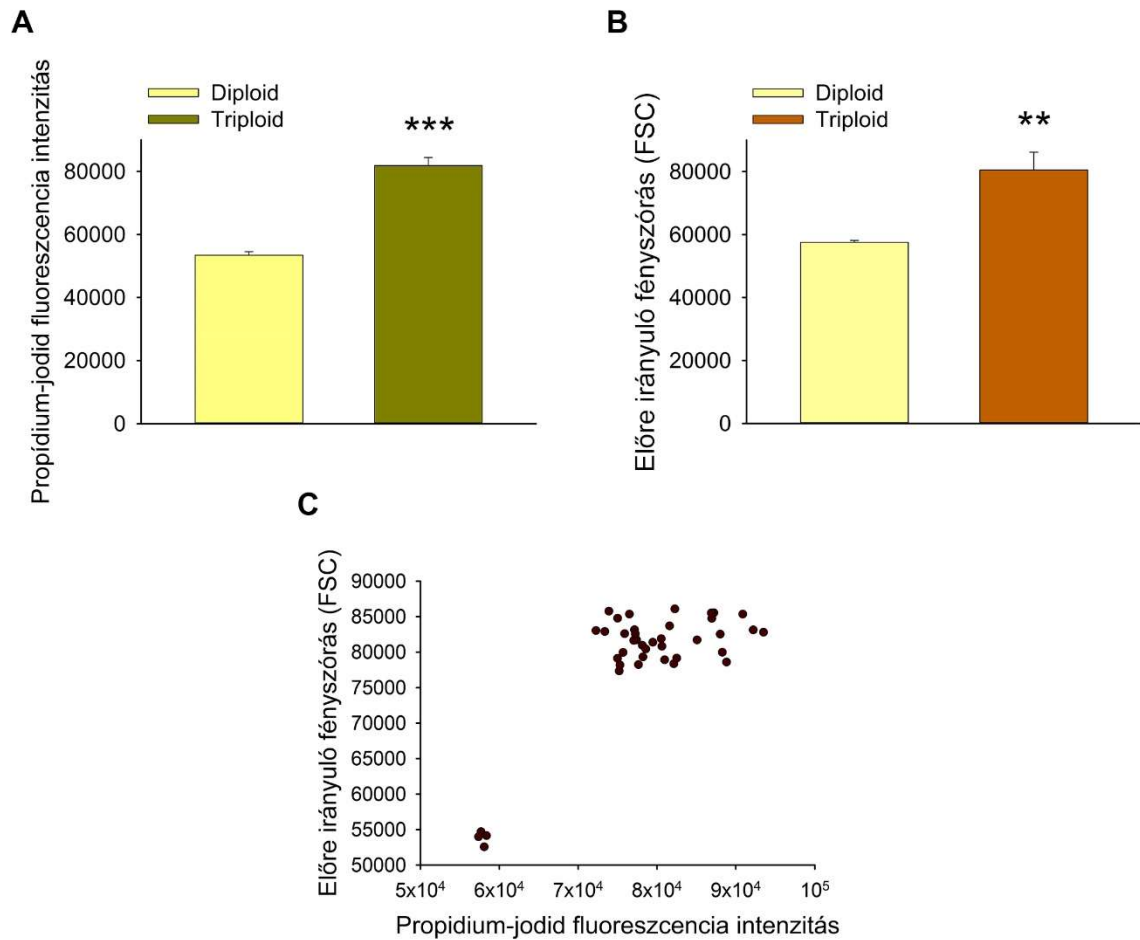


24. ábra: A fél oldali- A-hurok (Y401A) és Walker B (E556M és E556Q) mutációk hatása a Pgp bazális és verapamil stimulált ATPáz aktivitására. A membrán preparátumokat Pgp szubsztrát verapamil és 3 mM ATP/Mg²⁺ jelenlétében vagy hiányában 25 percig 37°C-on inkubáltuk (n = 3) ANOVA, Dunnett T3 post hoc analízis, szignifikáns különbségeknek a ***: P<0,001, *: P<0,05, értékeket tekintettük a Pgp-negatív NIH 3T3 membrán mintákhoz képest. A verapamillal kezelt és a kezeletlen minták közötti szignifikáns különbségeket †††: P<0,001, †: P<0,05 jelzi.

III. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel

A diploid és triploid hal vörösvérsejtek jól elkülöníthetők áramlási citometriával

A hal vörösvérsejtek ploiditásának meghatározására a propidium-jodid DNS festék sztöchiometrikus (DNS-tartalommal arányos) kötődésén alapuló áramlási citometriás módszert állítottunk be. A módszer optimalizálása során a sejtek fixálását 95% etanolos [273], valamint 70% etanolos [263] kezeléssel is megvizsgáltuk. Az amúr vörösvérsejtek analízise során 95%-os etanol tartalmú fixáló oldat alkalmazása esetén a sejtek fokozott aggregációs hajlamot mutattak, így a továbbiakban a 70% etanol tartalmú oldatot használtunk. Kontrollként ismerten diploid amúr vörösvérsejteket használtunk. A statisztikailag megfelelő elemszám biztosítására mintánként 20 ezer sejt propidium-jodid fluoreszcencia intenzitását és fényelvezési paramétereit határozzuk meg. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a minták egy része körülbelül másfélszer magasabb fluoreszcencia intenzitást mutatott, mint az ismerten diploid minták (**25A ábra**). A módszert egyéb halfajokon pl. ponty (*Cyprinus carpio*), csapósügér (*Perca fluviatilis*) is validáltuk, amelyek hasonló eredményt mutattak. A sejtek méretével arányos FSC paramétert is megvizsgáltuk. A magasabb propidium-jodid fluoreszcenciát mutató sejtek esetében a diploid mintákhoz képest körülbelül másfélszer nagyobb FSC jelet detektáltunk (**25B ábra**), amely korrelált a propidium-jodid fluoreszcencia intenzitás növekedésével is (**25C ábra**).

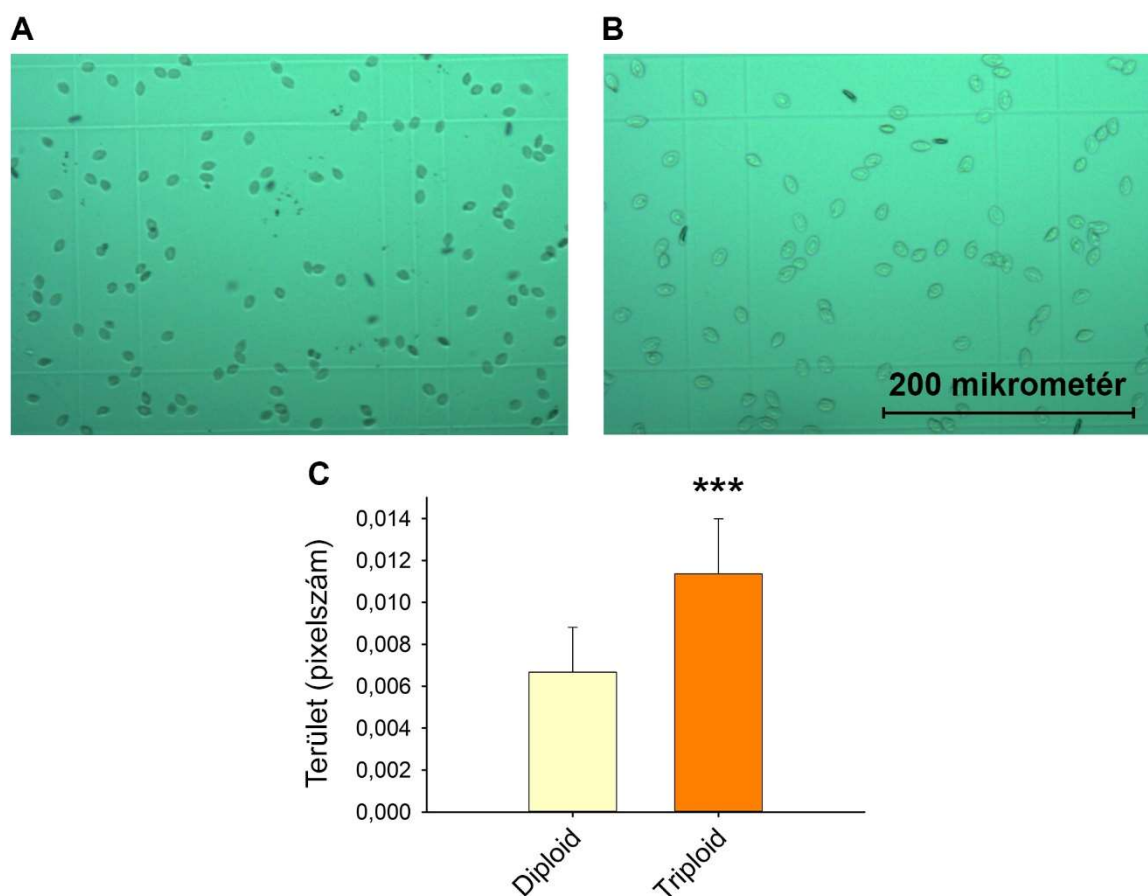


25. ábra: Kontroll diploid, valamint triploid hal vörösvérsejt minták ploiditásának meghatározása áramlási citométerrel. Az amúr vörösvérsejteket (1×10^7 sejt/mL) etanolos fixálást (70% etanol 30 percig szobahőn) követően $40 \mu\text{g/mL}$ propidium-jodiddal festettük. A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel detektáltuk. Az **A panel** 4 db diploid és 36 db vélhetően triploid minta fluoreszcencia intenzitását reprezentálja, míg a **B panel** ugyan ezen minták FSC értékeit ábrázolja. A **C panelen** az előre irányuló fényezés és a propidium-jodid fluoreszcencia intenzitás közötti korreláció látható. A diploid kontroll mintához viszonyított szignifikancia meghatározásához Student-féle *t*-próbát használtunk, ahol a: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,05$.

A hal vörösvérsejtek mérete ploiditásukkal arányos

A továbbiakban a diploid, illetve a triploid amúr vörösvérsejtek méretét fénymikroszkóp segítségével Bürker-kamrában is megvizsgáltuk (**26A és B ábra**). A digitalizált képeken Image J program segítségével meghatároztuk a vörösvérsejtek területét (**26C ábra**). A **C ábra** egy diploid kontroll, valamint egy a korábbi áramlási citometriás méréseink alapján triploid hibridnek bizonyult minta esetében mutatja 65-65 véletlenszerűen kiválasztott sejt területét. Áramlási citometriás propidium-jodid fluoreszcencia intenzitás és

FSC méréseinkkel összhangban a triploid mintákban a sejtek területe szignifikánsabb nagyobb volt (**26B ábra**), mint a diploid kontrollból származó sejteké (**26A ábra**).

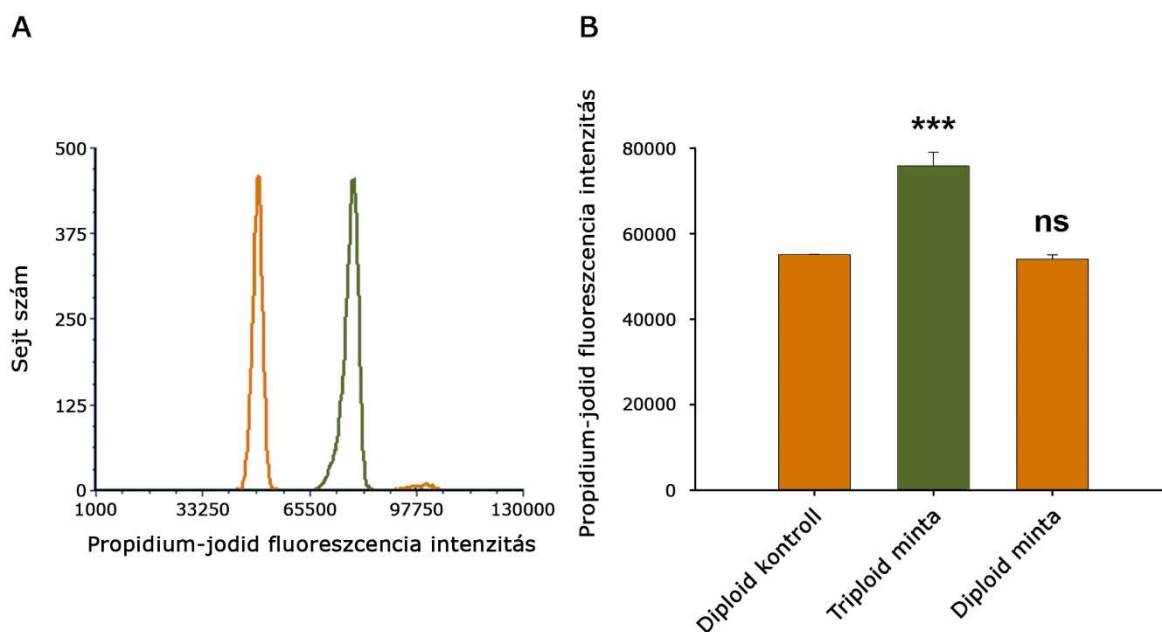


26. ábra: Kontroll diploid (A panel), illetve triploid (B panel) hal vörösvérsejt minták méretének fénymikroszkópiás összehasonlítása. Az amúr vörösvérsejteket fénymikroszkóp segítségével Bürker kamrában vizsgáltunk. A diploid kontroll (A panel), valamint a vélhetően triploid mintákról (B panel) készült felvételeken Image J program segítségével meghatároztuk a sejtek területét, ezt követően a kapott értékeket oszlopdiagrammon ábráztuk (C panel). A diploid kontroll mintához viszonyított szignifikancia meghatározásához Student-féle t-próbát használtunk, ahol a: *** $p < 0,001$, ($n=65$).

Amúr embriók DNS-tartalmának vizsgálata

A sikeres vérvételhez az egyedeknek el kell érniük egy bizonyos méretet, ami nagy egyedszámú populációk esetén jelentős többletköltséggel jár a halgazdaságok számára, ezért további kísérleteinkben olyan módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas a néhány napos amúr embriók DNS-tartalmának meghatározására. Ehhez a néhány napos egyedekből proteinázK emésztéssel egyedi sejtekből álló sejtszuspenziót készítettünk, majd propidium-jodid festés segítségével meghatároztuk a sejtek DNS-tartalmát. Az ismeretlen mintákat diploid kontroll amúr embriók DNS-tartalmához hasonlítottuk. A **27. A** ábrán láthatjuk a diploid kontroll (narancs hisztogram) és egy kb. másfélszeres fluoreszcencia intenzitást

mutató (zöld hisztogram), valószínűleg triploid egyedből származó minta DNS eloszlási hisztogramját. A sejtpopulációk homogén festődést mutattak, amit a hisztogramok 3 % alatti CV értéke is jelzett. A **27.B** ábra diploidként és triploidként azonosított minták propidium-jodid fluoreszcenciájának átlagát és SD-jét mutatja (n=35 db diploid és 30 db triploid minta). A kis SD értékek a fluoreszcencia intenzitások alacsony minták közötti variabilitására utalnak.



27. ábra: Amúr embrió DNS tartalmának meghatározása áramlási citométerrel. A hal embriókból Proteináz K és EGTA segítségével sejtszuszpenziót készítettünk, majd a sejteket fixáltuk és propidium-jodiddal festettük. A kontroll diploid embriók DNS tartalmához hasonlítottuk az ismeretlen DNS tartalmú embriókat (**A panel**). A **B panel** egy reprezentatív mérést mutat be a diploid kontroll, valamint egy triploidnak vélt minta feltüntetésével (ANOVA, Dunnett T3 post hoc analízis, ***: $P < 0,001$).

A vágótok és az amerikai lapátorrú tok véletlenszerű keresztezéséből származó hibridek DNS tartalmának meghatározása

Az áramlási citometriás méréseket 98 hibrid hal, két vágótok (6F15, Ag03) és négy amerikai lapátorrú tok (2E75, 551F, 596B, 6517) esetében végeztük el. Minden mérést háromszor megismételtünk egymástól függetlenül. A vérminták analízisét vak módszerrel végeztük, kivéve a négy hím amerikai lapátorrú tok vérmintáját. A hibrid egyedek átlagos propidium-jodid fluoreszcencia intenzitását normalizáltuk a három hím amerikai lapátorrú tok esetében mért propidium-jodid fluoreszcencia intenzitások átlagára és a DNS-tartalmat pg-ban fejeztük ki Tiersch és mtsai módosított képlete alapján: $\text{DNS-tartalom (pg)} = 3,9 \times (I/P)$, ahol I

a hibridek, P pedig az apai egyedek propidium-jodid fluoreszcencia intenzitása [246]. A 3,9-es konstans a lapátorrú tok DNS-tartalma pg-ban kifejezve [246].

A DNS-tartalom elemzés alapján két fő csoportot különítettünk el a hibrid egyedek között: egy kis genomméretű, feltételezhetően triploid csoportot (SH) $7,22 \pm 0,71$ pg DNS-tartalommal, és egy nagy genomméretű, valószínűleg pentaploid csoportot (LH), amelynek DNS-tartalma $11,60 \pm 0,84$ pg. Néhány különböző DNS-tartalmú mintán kollaborációs partnereink kariotípus analízist is végeztek (**6. táblázat**).

5. táblázat: Az amerikai lapátorrú tok és a vágótok keresztezéséből származó hibridek különböző DNS-tartalmú csoportjai

Azonosító	DNS tartalom (pg)	Kromoszóma szám	Megjegyzések
D4AF3A	$4,39 \pm 0,47$	156 ± 4 (3n)	Triploid hibrid (SH/AP)
D4C16A	$7,49 \pm 0,35$	170 ± 2 (3n)	Triploid hibrid (SH/AP)
D4B091	$7,57 \pm 0,39$	170 ± 6 (3n)	Triploid hibrid (SH/AP), apai hibrid sejtvonala ($1n = 66$)
D4AE5E	$8,42 \pm 0,71$	160 ± 4 (3n)	Triploid hibrid (SH/AP)
D52B1B	$6,85 \pm 0,78$	176 ± 8 (3n)	Triploid hibrid (SH/AP), apai hibrid sejtvonala ($1n = 66-68$)
D4D979	$10,87 \pm 0,65$	308 ± 4 (5n)	Pentaploid hibrid, dicentrikus kromoszóma, apai haploid ($1n = 68$)
D4C9E4	$12,36 \pm 0,84$	302 ± 4 (5n)	Pentaploid hibrid (LH/AAP)
D522C1	$12,87 \pm 1,58$	306 ± 4 (5n)	Pentaploid hibrid (LH/AAP)
Polyodon spathula	3,90	120 (2n)	-
Acipenser gueldenstaedtii	7,86 – 7,88	258 ± 4 (4n)	-

Eredmények megbeszélése

I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata

Az „alternating access” („váltakozó hozzáférés”) modell alapján a membrán transzporterek IF és OF konformációk között fluktuálnak, amelyekben a szubsztrát-kötő zseb egyszerre csak a membrán egyik oldala felől hozzáférhető [274]. Aktív transzporterek esetében, a szubsztrát-kötő zseb hozzáférhetőségének változása a szubsztrátok iránti affinitás változásával is együttjár, és ezek folyamatok az ATP megkötéséhez és hidrolíziséhez kapcsolódnak [157]. Homológia modellek és krio-EM struktúrák alapján, úgy gondolják, hogy az ABCG2 is egy nukleotid mentes IF és egy nukleotid kötött OF állapot között fluktuál transzport ciklusa során (**4A ábra**). Ezen állapotok közötti átmenet számos konformációs változást foglal magában, amelyek végül a szubsztrátok extracelluláris tér felé irányuló szállítását eredményezik. A krio-EM vizsgálatokkal összhangban nukleotid titrálási kísérletekkel kimutattuk (**15. ábra**), hogy az 5D3 mAt kizárólag az ABCG2 nukleotid mentes, IF konformációját ismeri fel [98], mivel az ABCG2 5D3 által felismert komplex epitópja, az extracelluláris hurkok közelségének köszönhetően, csak ebben a konformációban jön létre (**11C-F ábra**). A nukleotid-kötött OF állapotában a fehérje extracelluláris hurkai távolabb kerülnek egymástól, amely meggátolja a konformációs epitóp létrejöttét, ezáltal az 5D3 antitest kötődését.

Az SLO toxinnal szemipermeabilizált sejtek lehetőséget biztosítanak az ABCG2 kvázi természetes membránkörnyezetben történő tanulmányozására. Azonban a permeabilizált sejteken végzett 5D3-reaktivitás vizsgálatoknak számos korlátja van. Az NBD-k és a TMD-k közötti kapcsolat részleteire csak a nukleotidok és szubsztrátok 5D3-reaktív konformerek populációjára kifejtett hatása alapján következtethetünk, anélkül, hogy közvetlen információval rendelkeznenek a különféle intermedierekről vagy az extracelluláris tér felé nyitott állapotokról. Mindazonáltal, különböző nukleotidokat alkalmazva az ABCG2 katalitikus ciklusának különböző lépéseit tudtuk modellezni, mint például a nukleotid kötés vagy az ATP hidrolízis. Ezen kívül jellemeztük a MX ABCG2-höz való kötődését, annak érdekében, hogy jobban megértsük a nukleotid és szubsztrát kötés közötti kapcsolatot. Korábbi vizsgálatokban a fluoreszcens szubsztrátok és az ABC transzporterek kölcsönhatását nanopartikulumban [275] vagy sztirol-maleinsav lipid kopolimer részecskébe ágyzott tisztított transzportereken tanulmányozták [271]. Tudomásunk szerint az FCS technikát

először alkalmaztuk élő sejtekben, természetes plazmamembrán környezetben a szubsztrátok ABCG2-höz való kötődésének vizsgálatára.

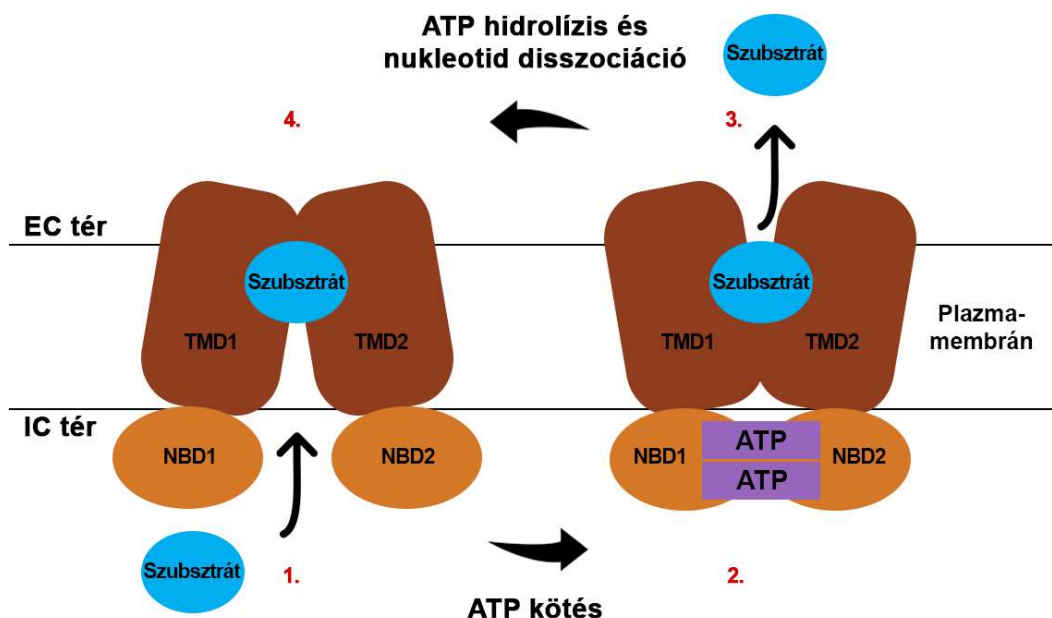
Intakt sejteken végzett konfokális mikroszkópos kísérleteink a korábbi szerkezeti vizsgálatokkal összhangban azt mutatják, hogy az ABCG2 IF konformere nagy MX-affinitással rendelkezik, míg a nukleotid kötés és az NBD-k egyidejű dimerizációja olyan konformáció változásokat indukál, amelyek megakadályozzák a MX kötődést. Az 5D3 és MX kötés egyidejű csökkenése azt jelzi, hogy a szubsztrát-kötő affinitás csökkenése egybeesik az IF-OF konformációs átmenettel. A korábbi krio-EM vizsgálatokkal összhangban, a kompetitív ABCG2 inhibitor Ko143 kiszoríthatja a MX-t a szubsztrát-kötőhelyről (**19. és 20. ábra**) és megakadályozza az ABCG2 IF-OF konformáció változását (**18A ábra**) [99, 119, 269]. Adataink azt is alátámasztják, hogy a MX nagy affinitású kötődéséhez az IF konformáció szükséges, valamint a transzporter nukleotidokkal történő aktiválása nem szükséges a szubsztrát kötéshez. Nukleotid titrálási kísérleteink azt bizonyítják, hogy a nukleotid kötés (ATP, AMP-PNP és ADP) és az egyidejű NBD dimer képződés elegendő az OF állapotba történő konformációs átmenethez (**15. ábra**), valamint a szubsztrát-affinitás magasról alacsonyra váltásához (**21. ábra**). Ezek az eredményeink alátámasztják a „katalitikus” glutamát mutáns ABCG2 variánssal végzett szerkezeti vizsgálatok eredményeit [100]. Megfigyeltük azt is, hogy fiziológiás ATP-koncentrációk jelenlétében az élő sejtek plazmamembránjában az ABCG2 molekulák kis hányada MX-kötött állapotban van (**19D ábra**), készen egy produktív transzportciklus elindítására. A Vi-csapdázott poszt-hidrolitikus állapot alacsony szubsztrát-affinitással rendelkezik (**19A és D ábra**), ami megerősíti, hogy a hidrolízis termékek disszociációja szükséges ahhoz, hogy a transzporter az az OF konformációból visszabilenjen a magas szubsztrát-affinitású IF konformációba.

Kísérleteink igazolták, hogy az 5D3 kötődése az ABCG2-höz reverzibilis, és szubsztrátok, ATP/Mg²⁺ vagy ezek kombinációja felgyorsíthatja az antitest disszociáció kinetikáját. Az 5D3 kötődés reverzibilis természete magyarázza azokat a korábbi megfigyeléseket is, amelyek szerint az antitest telítő koncentrációjával végzett kezelések nem okozták a transzport és az ATPáz aktivitás teljes gátlását [198].

Nukleotidok hiányában végzett 5D3 disszociációs kísérleteik egyértelműen kimutatták, hogy a szubsztrát kötés önmagában is hatással van az ABCG2 konformációs állapotára (**18A és B ábra**). Amennyiben szubsztrátokat a nukleotidok előtt adjuk, az IF-OF átmenet felgyorsul. Ezzel szemben, ha az AMP-PNP nukleotid analógot hagyjuk először kötődni, a szubsztrátok nem tudják elősegíteni ezt az átmenetet (**18B és C ábra**). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a szubsztrátok felgyorsítják a nukleotid kötés, NBD „szendvics-dimer”

képződés és az ezzel járó IF-OF átmenet kumulatív lépését, de csak abban az esetben, ha hozzáférnek az intracelluláris tér felé nyitott szubsztrát-kötőhelyhez. Feltételezhető, hogy a szubsztrátok által kiváltott konformáció változás nagyon kismértékű lehet, mivel egy közelmúltbeli tanulmány nem tudott kimutatni távolság változást az ABCB1 NBD-i közötti FRET segítségével ATP/Mg²⁺ -depletált permeabilizált sejtekben [237]. Érdekes módon, szubsztrát és ATP/Mg²⁺ jelenlétében végzett krio-EM vizsgálatokban két konformert azonosítottak, amelyek az intracelluláris tér felé nyitott állapotból egy félig zárt állapotba való átmenetet reprezentálják. Ezek a szerkezetek valószínűsítik, hogy a szubsztrát-kötőhely hozzáférhetősége fokozatosan csökken az NBD dimer bezáródásával [269], ezért a szubsztrátoknak a fehérje IF konformeréhez kell kötődniük.

Méréseink alapján, arra következtetünk az ABCG2 katalitikus ciklusát illetően, hogy a transzporter ATP mentes állapotban az intracelluláris tér felé nyitott, mely állapotban magas a szubsztrát-kötőhely affinitása, elősegítve a szubsztrátok intracelluláris oldalon történő megkötését (**28. ábra (1)**). Ezt követően a fehérje két ATP-t köt, az ATP kötés hatására az ABCG2 átvált az OF konformációba (**28. ábra (2)**), ebben a konformációban a szubsztrát-kötőhely affinitása lecsökken, amely hozzájárul a transzportálandó anyag extracelluláris térbe történő transzportjához (**28. ábra (3)**). Eredményeink alapján, úgy gondoljuk, hogy az ATP hidrolízis a transzportot követően történik és az OF-IF átmenethez szükséges (**28. ábra (4)**).



28. ábra: Az ABCG2 katalitikus ciklusának főbb lépései. Az ABCG2 a nukleotid mentes magas szubsztrát-affinitású IF konformációban megköti a szubsztrátot (1). ATP kötés hatására átvált az alacsony szubsztrát-affinitású OF állapotba (2), amely lehetővé teszi a szubsztrát extracelluláris térbe

történő transzportját (3). Az ATP hidrolízis energiáját használva a transzporter visszabillen az IF konformációba (4) és így készen áll egy újabb transzport ciklusra.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a nukleotid kötés az ABCG2 konformációjának fő szabályozója. A nukleotid által indukált IF-OF átmenet egybeesik a szubsztrát-affinitás csökkenésével. Az ABC szupercsaládon belül számos transzporter működésének részletes kinetikai elemzésére lesz szükség a katalitikus mechanizmusok közötti különbségek és hasonlóságok pontos feltérképezéséhez. Például az ioncsatorna működésű ABC fehérje a CFTR (ABCC7) esetében az IF-OF konformációs átmenetnek megfelelő a pórusnyitás a kapuzási ciklus leglassabb lépése [276]. Ezzel szemben az ABCC1 [277] és az ABCB1 [163] esetében ez az átmenet nem a katalitikus ciklus sebességmeghatározó lépése. Hasonlóképpen, a **15A és B ábra** azt mutatja, hogy a hidrolizálható ATP telítő koncentrációinak jelenlétében az ABCG2 molekulák többsége 5D3-nemkötő OF konformációt vesz fel, ami azt jelzi, hogy az IF-OF átmenet nem a katalitikus ciklus leglassabb lépése, és ennek következtében nem a ciklusidő fő meghatározója. Ennek megfelelően élő sejtekben az ABCG2 molekuláknak csak egy kis hányada van a szubsztrát-kötött IF konformációban, készen arra, hogy az ATP energiáját a szubsztrát transzport folyamatra fordítsa. A sejtek ATP depléciója növeli az IF konformációban lévő ABCG2 molekulák arányát az IF-OF átmenet előtti várakozási idő meghosszabításával (**19A és D ábra**). Megfigyeltük azt is (**18. ábrán**), hogy a megkötött szubsztrátok felgyorsítják az IF-OF átmenetet, valószínűleg azért, hogy elősegítik a nukleotid-függő NBD dimer képződését. Mindazonáltal, ennek az átmenetnek a felgyorsítása nem növeli jelentősen a katalitikus ciklus sebességét, ami arra utal, hogy az ATPáz aktivitás szubsztrát által közvetített stimulációja más lépés(ek) felgyorsulásának az eredménye. A **19-21. ábrákon** bemutatott eredmények ugyanakkor azt mutatják, hogy az alacsony szubsztrát-affinitású OF konformerhez a szubsztrátok már nem tudnak kötődni, így az ATP hidrolízisre és az ezzel járó NBD disszociációra gyakorolt hatásuk kizárható. Ez a látszólagos paradoxon feloldható különböző katalitikus útvonalak és prehidrolitikus intermedierek feltételezésével a szubsztrát transzporthoz kapcsolódó és a szubsztrát transzport nélkül végbemenő működési ciklus esetén [165, 278]. A szubsztrát transzporthoz kapcsolt ciklusban a szubsztrátok azáltal növelik az ABCG2 katalitikus sebességét, hogy az ABCC1-hez hasonlóan felgyorsítják az IF-OF átmenetet [277]. Szubsztrátok hiányában a transzporter más katalitikus utat követ, amelyben a ciklus leglassabb lépése az IF-OF átmenetet követően van. Azok az ABCG2 molekulák, amelyek szubsztrát kötés nélkül alakították ki az NBD „szendvics-dimert” vagy hidrolízis nélkül disszociálnak, vagy pedig egy szubsztrát transzport nélküli ATP hidrolízis cikluson

mennek keresztül, mely visszaállítja a transzportert a magas szubsztrát-affinitással rendelkező IF állapotba. A jövőben egyedi molekulák konformáció változásainak vizsgálata [277, 279, 280] további betekintést nyújthat a fent tárgyalt átmenetek kinetikájába.

II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata

Az ABCG2-höz hasonlóan, a Pgp is ATP kötés és hidrolízis függő konformáció változásokon megy keresztül, ami végső soron lehetővé teszi a szubsztrátok koncentráció gradiens ellenében történő transzportját. A Pgp-nek két kanonikus, funkcionálisan egyenértékű ATP-kötő helye van, amelyek mindegyike képes ATP-t kötni és hidrolizálni, biztosítva ezzel a katalitikus ciklus energia igényét. Nem ismert azonban, hogy az ATP hidrolízis hogyan koordinálódik a két NBD között, és hogy a Pgp egy vagy két (esetleg több) ATP molekulát hidrolizál-e egy transzport ciklus során. Általános nézet szerint mindkét katalitikus centrum integritására szükséges a transzporthoz, mivel korábbi vizsgálatok során az egyik NBD inaktiválása az ATPáz és a transzport aktivitás gátlását eredményezte [161, 167, 281].

Eredményeink megerősítették, hogy az A-hurok tirozin (Y401A/Y1044A), valamint a Walker B aszpartát (D555N/D1200N) mutációja mindkét NBD-ben a Pgp molekulákat a nukleotid mentes UIC2-reaktív IF konformációban stabilizálja (**22. és 23D ábra**).

Érdekes módon a féloldali A-hurok (Y401A és Y1044A) mutánsokban az ATP kötődése képes az IF-OF átmenetet indukálni mind ép (**22. ábra**), mind permeabilizált sejtekkel (**23B ábra**) végzett kísérletekben. Hasonlóan a vad típusú sejtekhez a V_i növeli a nukleotid kötődés látszólagos affinitását a féloldali A-hurok mutánsok esetén is. Mivel a V_i -függő csapdázódás rendkívül alacsony valószínűségű esemény, a stabil V_i -csapdázott komplex kialakulása, valamint az UIC2 kötési görbék jelentős balra tolódása V_i jelenlétében valószínűsíti, hogy a mutáns transzporter variáns is képes az ATP hidrolízisére az ismétlődő ciklusok során. Mindezek mellett jelentős verapamil stimulált ATPáz aktivitást is tapasztaltunk a féloldali A-hurok tirozin mutáns esetében. Ezek az adatok megerősítik a féloldali Walker A mutánsok vizsgálata során levont következtetésünket [163], miszerint a Pgp egy intakt ATP-kötőhellyel is katalitikusan aktív. Az ATP hidrolízis szigorú váltakozását feltételezve az a két kötőhely között, egyetlen ép kötőhely esetén minden második ATP-hidrolízis esemény az inaktív kötőhelynél következne be, ami a katalitikus ciklus gátlását eredményezné. Ennek ellenére bizonyos féloldali mutációk esetében (Y401A, E556Q) a vad

típusú fehérjéhez képest csökkent, azonban jól mérhető ATPáz aktivitást tapasztaltunk, ami alátámasztja a katalitikus centrumok random elköteleződését az ATP hidrolízisre.

Irodalomból ismert, hogy az ABC transzporterek rendkívül érzékenyek a membrán mikrokörnyezetükre, így a membrán tulajdonságainak változása befolyásolhatja működésüket. Érdekes módon a féloldali Walker B és A-hurok mutációk inaktiváló hatásáról beszámoló korábbi tanulmányok heterológ expressziós rendszereket (pl. Sf9 vagy *Saccharomyces cerevisiae* sejteket) és/vagy tisztított fehérjét alkalmaztak [282]. Munkacsoportunk ezzel szemben a különböző Pgp-változatokat természetes plazmamembrán környezetükben, ép vagy permeabilizált emlőssejtek membránjában tanulmányozta. A rovarsejtek és az élesztősejtek plazmamembránja kevesebb koleszterint tartalmaz az emlőssejtekhez képest [282, 283], ami megmagyarázhatja az eltérő eredményeket.

Kísérleteimben az egyszeres WalkerB aszpartát mutánsok is képesek voltak átbillenni az UIC2-reaktív OF konformációba, azonban ez csak a fiziológiásnál jóval magasabb ATP koncentrációknál következett be (**23D ábra**). Munkacsoportunk más tagjai vizsgálják tovább ezeket a mutánsokat. Eredményeimmel összhangban ép sejteken ők sem detektáltak transzport aktivitást, és a fiziológiásnak megfelelő 3 mM ATP koncentrációnál nem tapasztaltak szignifikáns ATPáz aktivitást sem. A jövőben magasabb ATP koncentrációk mellett végzett ATPáz mérések megerősíthetik a WalkerB aszpartát mutánsok funkcionális aktivitását is.

III. Hal vörösvérsejtek és hal embriók ploiditásának meghatározása nagy áteresztőképességű áramlási citometriás módszerrel

A propidium-jodid egy interkalálódó DNS festék, melynek kvantumhatásfoka a DNS-hez kötődve kb. 100-szorosára nő a vízben oldott festékhez képest. A vizsgálat során a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk, annak érdekében, hogy a propidium-jodid hozzáférjen a DNS-hez, amelyhez sztöchiometrikusan kötődik így, a mért fluoreszcencia intenzitás arányos a sejt DNS tartalmával. A módszer elég érzékeny ahhoz, hogy DNS-tartalom alapján el tudtuk különíteni a diploid és a triploid kromoszóma szerelvénnyel rendelkező sejteket. A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriás módszerrel határozzuk meg. A statisztikailag megfelelő elemszám biztosítására mintánként 20 ezer sejt fluoreszcencia intenzitását és fényszórási paramétereit határozzuk meg. Az módszer nagy áteresztőképességű, mivel a Becton Dickinson FACS Array citométer használatával 1-1,5 óra alatt kb. 100 minta analízisét tette lehetővé.

Áramlási citométer segítségével a fluorofórokból származó fluoreszcencia detektálása mellett a sejtek fényszórását is detektáltuk. Az FSC egyenesen arányos a sejtmérettel, így segítségével az eltérő méretű sejtek elkülöníthetők. Szakirodalomból ismert, hogy a mesterségesen létrehozott amúr triploid hibridek vörösvérsejtjeinek mérete, a diploid amúr vörösvérsejtjeihez viszonyítva szignifikánsan nagyobb, így a DNS-tartalom meghatározás mellett a sejtek előre irányuló fényszórását is megvizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy DNS tartalmuk alapján valószínűsíthetően triploid sejtek közel 1,5-szer nagyobb FSC értékkel jellemezhetők a diploidokhoz képest (**25B ábra**). Ezt a következtetésünket fénymikroszkópos mérésekkel is igazoltuk (**26. ábra**). Mivel a triploid és a diploid vörösvérsejtek méretkülönbsége a gyakorlott szem számára azonnal felismerhető, a mikroszkópos vizsgálat a halgazdaságokban áramlási citométer hiányában is könnyen, gyorsan elvégezhető.

A továbbiakban a propidium-jodid festésen alapuló módszert alkalmazva a vágótok és az amerikai lapátorrú tok véletlenszerű keresztezése során létrejött hibrid hal embriók DNS-tartalmának meghatározását végeztük. A vizsgálatainkat kollaborációs partnerünk morfológiai analízissel, kariotipizálással és a mikroszatellita DNS meghatározásával erősítette meg.

Kísérleteink bizonyították, hogy a nagy filogenetikai távolság ellenére a nőtény vágótok és a hím amerikai lapátorrú tok keresztezése életképes hibrideket eredményezett [284], amelyek megtermékenyülési, kelési és túlélési aránya nagyon hasonló volt az anyai fajéhoz. A hibrid utódok között triploid és pentaploid egyedeket tudtunk megkülönböztetni. A triploid és a pentaploid csoporton belül kollaborációs partnereink kariotipizálás során a kromoszómaszám enyhe eltérését figyelték meg, mely eredhet a mikrokromoszómaszám meghatározásának pontatlanságából vagy okozhatja a mikrokromoszómák elvesztése is, ami a különböző ploiditási szintekkel jellemezhető fajok között létrejött hibridekben gyakran előfordul.

Összességében a nagy áteresztőképességű áramlási citométerek és a megfelelő minta előkészítési és tárolási protokollok kidolgozása révén az áramlási citometriás DNS-tartalom elemzés és ploiditás meghatározás rendkívül hasznos rutin módszerré válhat az halgazdaságokban dolgozó kutatók kezében.

Eredmények összefoglalása

I. Munkánk első részében a humán vad típusú ABCG2 katalitikus ciklusának pontosabb megismerését tűztük ki célul. Ennek érdekében olyan fluoreszcencia alapú módszereket fejlesztettünk ki, melyek lehetővé tették az ABCG2 működésének vizsgálatát normál membrán környezetében. Vizsgálataink során a következő megfigyeléseket tettük:

- Az ATP kötődése kiváltja a transzporter konformáció változását az 5D3-reaktív IF állapotból az 5D3-nemkötő OF állapotba.
- Az IF-OF konformáció változás együtt jár a szubsztrát-affinitás csökkenésével.
- A szubsztrát kötés elősegíti az IF-OF átmenetet, míg bizonyos ABCG2 inhibitorok, pl. a Ko143 megakadályozzák ezt a konformáció változást.
- A nukleotid kötődés a TMD-k konformációjának fő szabályozója, ezért a produktív transzport-ciklus bekövetkezéséhez a szubsztrátok kötődésének meg kell előznie az ATP kötődését.
- Az ATP hidrolízise és a hidrolízis termékek ezt követő disszociációja lehetővé teszi az ABCG2 magas szubsztrát-affinitású IF konformációjának regenerálását és egy új transzport ciklus indítását.

II. Munkánk második részében féloldali és kétoldali A-hurok és Walker B NBD mutáns Pgp variánsok konformáció változásait és ATPáz aktivitását vizsgáltuk, melynek során a következő megállapításokat tettük:

- A féloldali A-hurok és a féloldali Walker B (E556Q) mutáns Pgp-k intakt és permabilizált sejtekben is csapdázhatók a poszthidrolitikus állapotban és szignifikáns ATPáz aktivitást is mutatnak.
- Eredményink alátámasztják, hogy a Pgp molekulák egy intakt ATP-kötőhellyel is működőképesek.

III. Munkánk utolsó részében a halgazdálkodásban alkalmazott triploid indukciós kezelések metodikájának fejlesztésére hal vörösvérsejtek és embriók ploiditásának tesztelését végeztük. Kísérleteink során több halfaj esetében optimalizáltunk egy egyszerű propidium-jodid festésen alapuló áramlási citometriás módszert.

Summary of results

I. In the first half of our work, we attempted to gain a better understanding of the catalytic cycle of the human wild-type ABCG2 by developing fluorescence-based methods that allowed us to study ABCG2 function in a normal membrane environment, making the following observations:

- ATP binding is sufficient to switch ABCG2 from the 5D3-reactive IF to the 5D3-dim OF conformation.
- The decrease in substrate affinity coincides with the switch of the transporter to the OF state.
- Substrate binding promotes the IF-OF transition, whereas certain ABCG2 inhibitors such as Ko143 prevent this conformational change.
- Since nucleotide binding is the main regulator of the TMD conformation, for a productive transport cycle substrate binding should precede ATP binding.
- The hydrolysis of ATP and the subsequent dissociation of the hydrolysis products allows ABCG2 to revert to its high substrate affinity IF conformation to initiate a new transport cycle.

II. In the second part of our work we investigated the conformational changes and the ATPase activity of unilateral and bilateral A-loop and Walker B mutant Pgp variants with the following conclusions:

- Unilateral A-loop and Walker B (E556Q/M, E1201Q) mutant Pgp variants can be trapped in the posthydrolytic state either in intact or permeabilized cells and accordingly capable of significant ATP hydrolytic activity.
- Our results further promote that Pgp variants with a single intact catalytic site are catalytically active.

III. In the last part of our work, to improve the efficacy of triploid induction treatments applied in aquaculture industry, we tested the ploidy level of fish red blood cells and fish embryos. In these studies we have optimized a simple propidium iodide staining-based flow cytometry assay in various fish species.

Felhasznált irodalom

1. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
2. Fetsch, P.A., et al., *Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues*. Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 84-92.
3. van Herwaarden, A.E. and A.H. Schinkel, *The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(1): p. 10-6.
4. Giacomini, K.M., et al., *International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 23-6.
5. Sarkadi, B., et al., *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1179-236.
6. Homolya, L., *Medically Important Alterations in Transport Function and Trafficking of ABCG2*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
7. Ishikawa, T., W. Aw, and K. Kaneko, *Metabolic Interactions of Purine Derivatives with Human ABC Transporter ABCG2: Genetic Testing to Assess Gout Risk*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(11): p. 1347-60.
8. Woodward, O.M., et al., *Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10338-42.
9. Kottgen, A. and M. Kottgen, *A novel mouse model of hyperuricemia expressing a human functional ABCG2 variant*. Kidney Int, 2021. **99**(1): p. 12-14.
10. Fojo, A.T., et al., *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(1): p. 265-9.
11. Lowe, S.W., et al., *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell, 1993. **74**(6): p. 957-67.
12. Kelland, L.R., *New platinum antitumor complexes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1993. **15**(3): p. 191-219.
13. Li, L.H., et al., *The upregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in liver is involved in acquired resistance to 5-fluorouracil*. Eur J Cancer, 2013. **49**(7): p. 1752-60.
14. Synold, T.W., I. Dussault, and B.M. Forman, *The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 584-90.
15. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 615-27.
16. El-Awady, R., et al., *The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 535.
17. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
18. Mo, W. and J.T. Zhang, *Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(1): p. 1-27.
19. Didziapetris, R., et al., *Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity*. J Drug Target, 2003. **11**(7): p. 391-406.
20. Sedlakova, I., et al., *Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2015. **25**(2): p. 236-43.
21. Bagnoli, M., et al., *Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 143202.
22. Dean, M. and T. Annilo, *Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2005. **6**: p. 123-42.
23. Davidson, A.L., et al., *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 317-64, table of contents.
24. Dassa, E., *Natural history of ABC systems: not only transporters*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 19-42.
25. Ambudkar, S.V., et al., *The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1049-55.
26. Machtel, R., et al., *An integrated transport mechanism of the maltose ABC importer*. Res Microbiol, 2019. **170**(8): p. 321-337.
27. Saha, J., et al., *Molecular phylogenetic study and expression analysis of ATP-binding cassette transporter gene family in Oryza sativa in response to salt stress*. Comput Biol Chem, 2015. **54**: p. 18-32.
28. Walsh, D.R., T.D. Nolin, and P.A. Friedman, *Drug Transporters and Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Factor PSD-95/Drosophila Discs Large/ZO-1 Proteins*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(3): p. 656-80.

29. Dawson, R.J. and K.P. Locher, *Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP*. FEBS Lett, 2007. **581**(5): p. 935-8.
30. Hofnung, M., D. Hatfield, and M. Schwartz, *malB region in Escherichia coli K-12: characterization of new mutations*. J Bacteriol, 1974. **117**(1): p. 40-7.
31. Kellermann, O. and S. Szmelema, *Active transport of maltose in Escherichia coli K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein*. Eur J Biochem, 1974. **47**(1): p. 139-49.
32. Silhavy, T.J., et al., *Structure of the malB region in Escherichia coli K12. II. Genetic map of the malE,F,G operon*. Mol Gen Genet, 1979. **174**(3): p. 249-59.
33. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
34. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Hum Genomics, 2009. **3**(3): p. 281-90.
35. Liu, X., *ABC Family Transporters*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1141**: p. 13-100.
36. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
37. Gribble, F.M., S.J. Tucker, and F.M. Ashcroft, *The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1145-52.
38. Alexander, S.P., et al., *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Transporters*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(24): p. 6110-202.
39. Suh, W.K., et al., *Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing*. Science, 1994. **264**(5163): p. 1322-6.
40. Mosser, J., et al., *Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters*. Nature, 1993. **361**(6414): p. 726-30.
41. Allikmets, R., et al., *Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 743-9.
42. Ichikawa, Y., et al., *Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4152-7.
43. Shirihi, O.S., et al., *ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2492-502.
44. Gottesman, M.M. and S.V. Ambudkar, *Overview: ABC transporters and human disease*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(6): p. 453-8.
45. Zhang, J.T., *Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity*. Cell Res, 2007. **17**(4): p. 311-23.
46. McGuinness, M.C., et al., *Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(2): p. 744-53.
47. Falguieres, T., et al., *ABCB4: Insights from pathobiology into therapy*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014. **38**(5): p. 557-63.
48. Siddiqui, A.H., et al., *Dubin-Johnson Syndrome: A Case Report*. Cureus, 2023. **15**(3): p. e36115.
49. Jansen, R.S., et al., *ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 1985-9.
50. Varadi, A., et al., *ABCC6 as a target in pseudoxanthoma elasticum*. Curr Drug Targets, 2011. **12**(5): p. 671-82.
51. Allikmets, R., *Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 793-9.
52. Naderi, M., M. Hashemi, and S. Amininia, *Association of TAP1 and TAP2 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016. **15**(1): p. 62-8.
53. Tao, Y., et al., *Association study of TAP and HLA-I gene combination with chronic hepatitis C virus infection in a Han population in China*. Int J Immunogenet, 2022. **49**(3): p. 169-180.
54. Shinde, V., et al., *Genetic evidence of TAP1 gene variant as a susceptibility factor in Indian leprosy patients*. Hum Immunol, 2013. **74**(6): p. 803-7.
55. Davies, J.C., E.W. Alton, and A. Bush, *Cystic fibrosis*. BMJ, 2007. **335**(7632): p. 1255-9.
56. Rudashevskaya, E.L., et al., *Pharmacological correction of misfolding of ABC proteins*. Drug Discov Today Technol, 2014. **12**(100): p. e87-94.
57. Vauthier, V., C. Housset, and T. Falguieres, *Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters*. Biochem Pharmacol, 2017. **136**: p. 1-11.
58. Zhang, Z., et al., *Direct Measurement of Trafficking of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cell Surface and Binding to a Chemical Chaperone*. Biochemistry, 2017. **56**(1): p. 240-249.

59. Kinting, S., et al., *Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(6): p. 943-953.
60. Iram, S.H. and S.P. Cole, *Differential functional rescue of Lys(513) and Lys(516) processing mutants of MRP1 (ABCC1) by chemical chaperones reveals different domain-domain interactions of the transporter*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(3): p. 756-65.
61. Mozner, O., et al., *Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism*. Cells, 2019. **8**(10).
62. Bailey-Dell, K.J., et al., *Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1520**(3): p. 234-41.
63. Krishnamurthy, P., et al., *The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24218-25.
64. Wang, H., et al., *Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(3): p. 845-54.
65. To, K.K., Z. Zhan, and S.E. Bates, *Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8572-85.
66. Fojo, A., et al., *Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7*. Somat Cell Mol Genet, 1986. **12**(4): p. 415-20.
67. Sakaeda, T., *MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction?* Drug Metab Pharmacokinet, 2005. **20**(6): p. 391-414.
68. Hu, Z., S. Jin, and K.W. Scotto, *Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2979-85.
69. Shen, H., et al., *Upregulation of mdr1 gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma*. Exp Hematol, 2011. **39**(5): p. 558-69.
70. Johnson, R.A., T.A. Ince, and K.W. Scotto, *Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27716-20.
71. Xia, Y., et al., *Differential regulation of c-Jun protein plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19321-9.
72. Vilaboa, N.E., et al., *Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1)*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24970-6.
73. Comerford, K.M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3387-94.
74. Geick, A., M. Eichelbaum, and O. Burk, *Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14581-7.
75. Robey, R.W., et al., *ABCG2: a perspective*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(1): p. 3-13.
76. Offermanns, S., W. Rosenthal, and Ohio Library and Information Network., *Encyclopedia of molecular pharmacology*. 2nd ed ed. Springer reference.
77. Hrycyna, C.A., et al., *Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport*. Biochemistry, 1998. **37**(39): p. 13660-73.
78. Muller, M., et al., *Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 1877-83.
79. Gros, P., J. Croop, and D. Housman, *Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins*. Cell, 1986. **47**(3): p. 371-80.
80. Chen, C.J., et al., *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 381-9.
81. Raymond, M. and P. Gros, *Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6488-92.
82. Chen, C.J., et al., *Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(1): p. 506-14.
83. Mechetner, E.B., et al., *P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12908-13.
84. Sonveaux, N., et al., *Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17649-54.
85. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1718-22.
86. Lee, J.Y., et al., *Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8*. Nature, 2016. **533**(7604): p. 561-4.

87. ter Beek, J., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Structural diversity of ABC transporters*. J Gen Physiol, 2014. **143**(4): p. 419-35.
88. Lee, J.Y., et al., *Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 40125-31.
89. Lee, J.Y., et al., *Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5769-79.
90. Cheng, Y., *Single-particle cryo-EM-How did it get here and where will it go*. Science, 2018. **361**(6405): p. 876-880.
91. Lyumkis, D., *Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis*. J Biol Chem, 2019. **294**(13): p. 5181-5197.
92. McDevitt, C.A., et al., *Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2*. Structure, 2006. **14**(11): p. 1623-32.
93. Rosenberg, M.F., et al., *The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone*. Structure, 2010. **18**(4): p. 482-93.
94. Honjo, Y., et al., *Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6635-9.
95. Hazai, E. and Z. Bikadi, *Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2)*. J Struct Biol, 2008. **162**(1): p. 63-74.
96. Li, Y.F., et al., *Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: a molecular modeling study*. J Mol Graph Model, 2007. **25**(6): p. 837-51.
97. Khunweeraphong, N., T. Stockner, and K. Kuchler, *The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13767.
98. Taylor, N.M.I., et al., *Structure of the human multidrug transporter ABCG2*. Nature, 2017. **546**(7659): p. 504-509.
99. Jackson, S.M., et al., *Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(4): p. 333-340.
100. Manolaridis, I., et al., *Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states*. Nature, 2018. **563**(7731): p. 426-430.
101. Polgar, O., et al., *Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization*. Biochemistry, 2006. **45**(16): p. 5251-60.
102. Lusvardi, S., S.R. Durell, and S.V. Ambudkar, *Does the ATP-bound EQ mutant reflect the pre- or post-ATP hydrolysis state in the catalytic cycle of human P-glycoprotein (ABCB1)?* FEBS Lett, 2021. **595**(6): p. 750-762.
103. Alam, A., et al., *Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein*. Science, 2019. **363**(6428): p. 753-756.
104. Kim, Y. and J. Chen, *Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation*. Science, 2018. **359**(6378): p. 915-919.
105. Rosenberg, M.F., et al., *Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5615-25.
106. Rosenberg, M.F., et al., *Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8294-9.
107. Dawson, R.J. and K.P. Locher, *Structure of a bacterial multidrug ABC transporter*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 180-5.
108. Ward, A., et al., *Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19005-10.
109. Li, J., K.F. Jaimes, and S.G. Aller, *Refined structures of mouse P-glycoprotein*. Protein Sci, 2014. **23**(1): p. 34-46.
110. Zoghbi, M.E., et al., *Substrate-induced conformational changes in the nucleotide-binding domains of lipid bilayer-associated P-glycoprotein during ATP hydrolysis*. J Biol Chem, 2017. **292**(50): p. 20412-20424.
111. Moeller, A., et al., *Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters*. Structure, 2015. **23**(3): p. 450-460.
112. Pleban, K., et al., *P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 365-74.
113. Desuzinges-Mandon, E., et al., *ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33123-33133.

114. Diop, N.K. and C.A. Hrycyna, *N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane*. Biochemistry, 2005. **44**(14): p. 5420-9.
115. Nakagawa, H., et al., *Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2*. FEBS J, 2009. **276**(24): p. 7237-52.
116. Henriksen, U., et al., *Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36926-34.
117. Li, R., et al., *A meta-analysis of the associations between the Q141K and Q126X ABCG2 gene variants and gout risk*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 9812-23.
118. Eckenstaler, R. and R.A. Benndorf, *3D structure of the transporter ABCG2-What's new?* Br J Pharmacol, 2020. **177**(7): p. 1485-1496.
119. Orlando, B.J. and M. Liao, *ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2264.
120. Martin, C., et al., *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(3): p. 624-32.
121. Shapiro, A.B., et al., *Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site*. Eur J Biochem, 1999. **259**(3): p. 841-50.
122. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities*. Eur J Biochem, 1997. **250**(1): p. 130-7.
123. Lugo, M.R. and F.J. Sharom, *Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 14020-9.
124. Clark, R., I.D. Kerr, and R. Callaghan, *Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(5): p. 506-15.
125. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44332-8.
126. Alam, A., et al., *Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(9): p. E1973-E1982.
127. Wong, K., et al., *Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(1): p. 8-16.
128. Taylor, A.M., et al., *Detailed characterization of cysteine-less P-glycoprotein reveals subtle pharmacological differences in function from wild-type protein*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(8): p. 1609-18.
129. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 315-25.
130. Dey, S., et al., *Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10594-9.
131. Chufan, E.E., et al., *Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1)*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82463.
132. Donmez Cakil, Y., et al., *Pore-exposed tyrosine residues of P-glycoprotein are important hydrogen-bonding partners for drugs*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(3): p. 420-8.
133. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13603-6.
134. Khunweeraphong, N., et al., *The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 5433.
135. Ramachandra, M., et al., *Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state*. Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 5010-9.
136. Lam, F.C., et al., *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein*. J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 1121-8.
137. Walker, J.E., et al., *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, 1982. **1**(8): p. 945-51.
138. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer*. Q Rev Biophys, 1999. **32**(1): p. 1-56.
139. Kapoor, P., et al., *Disruption of the Unique ABCG-Family NBD:NBD Interface Impacts Both Drug Transport and ATP Hydrolysis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
140. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39272-8.

141. Azzaria, M., E. Schurr, and P. Gros, *Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(12): p. 5289-97.
142. Henriksen, U., U. Gether, and T. Litman, *Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 7): p. 1417-26.
143. Procko, E., et al., *Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter*. Mol Cell, 2006. **24**(1): p. 51-62.
144. Tomblin, G., et al., *Properties of P-glycoprotein with mutations in the "catalytic carboxylate" glutamate residues*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46518-26.
145. Qu, Q., P.L. Russell, and F.J. Sharom, *Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle*. Biochemistry, 2003. **42**(4): p. 1170-7.
146. Hou, Y.X., et al., *Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport*. Biochemistry, 2009. **48**(38): p. 9122-31.
147. Hrycyna, C.A., et al., *Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 13887-99.
148. Tomblin, G., et al., *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, 2004. **279**(30): p. 31212-20.
149. Tomblin, G., et al., *Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5363-73.
150. Bakos, E., et al., *Characterization of the human multidrug resistance protein containing mutations in the ATP-binding cassette signature region*. Biochem J, 1997. **323** (Pt 3)(Pt 3): p. 777-83.
151. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41303-6.
152. Kim, I.W., et al., *The conserved tyrosine residues 401 and 1044 in ATP sites of human P-glycoprotein are critical for ATP binding and hydrolysis: evidence for a conserved subdomain, the A-loop in the ATP-binding cassette*. Biochemistry, 2006. **45**(24): p. 7605-16.
153. Carrier, I., et al., *Mutational analysis of conserved aromatic residues in the A-loop of the ABC transporter ABCB1A (mouse Mdr3)*. FEBS Lett, 2007. **581**(2): p. 301-8.
154. Zolnerchik, J.K., et al., *The Q loops of the human multidrug resistance transporter ABCB1 are necessary to couple drug binding to the ATP catalytic cycle*. FASEB J, 2014. **28**(10): p. 4335-46.
155. Sauna, Z.E. and S.V. Ambudkar, *About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(1): p. 13-23.
156. Zaitseva, J., et al., *H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB*. EMBO J, 2005. **24**(11): p. 1901-10.
157. Seeger, M.A. and H.W. van Veen, *Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(5): p. 725-37.
158. Wilkens, S., *Structure and mechanism of ABC transporters*. F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 14.
159. Urbatsch, I.L., et al., *Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein*. Biochemistry, 2000. **39**(39): p. 11921-7.
160. Zaitseva, J., et al., *A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 990-5.
161. Urbatsch, I.L., et al., *P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19383-90.
162. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from Caenorhabditis elegans*. Nature, 2012. **490**(7421): p. 566-9.
163. Barsony, O., et al., *A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24810.
164. Sarkadi, B., et al., *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4854-8.
165. Al-Shawi, M.K., et al., *Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52629-40.
166. Urbatsch, I.L., et al., *Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26956-61.
167. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 22957-61.

168. Szabo, K., et al., *Drug-stimulated nucleotide trapping in the human multidrug transporter MDR1. Cooperation of the nucleotide binding domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10132-8.
169. Urbatsch, I.L., et al., *Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4592-602.
170. Zoghbi, M.E. and G.A. Altenberg, *ATP binding to two sites is necessary for dimerization of nucleotide-binding domains of ABC proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(1): p. 97-102.
171. Altenberg, G.A., et al., *Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4654-7.
172. Sharom, F.J., *Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 41.
173. Romsicki, Y. and F.J. Sharom, *The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter*. Biochemistry, 1999. **38**(21): p. 6887-96.
174. Regev, R., et al., *Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(1): p. 161-9.
175. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein*. Eur J Biochem, 1997. **250**(1): p. 122-9.
176. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein*. Eur J Biochem, 1998. **254**(1): p. 181-8.
177. Katzir, H., et al., *Role of the plasma membrane leaflets in drug uptake and multidrug resistance*. FEBS J, 2010. **277**(5): p. 1234-44.
178. Qu, Q. and F.J. Sharom, *Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet*. Biochemistry, 2002. **41**(14): p. 4744-52.
179. Homolya, L., et al., *Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(1): p. 154-63.
180. Elkind, N.B., et al., *Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib)*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1770-7.
181. Homolya, L., et al., *Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21493-6.
182. Higgins, C.F. and M.M. Gottesman, *Is the multidrug transporter a flippase?* Trends Biochem Sci, 1992. **17**(1): p. 18-21.
183. Romsicki, Y. and F.J. Sharom, *Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter*. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6937-47.
184. Raviv, Y., et al., *Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3975-80.
185. Cianfriglia, M., et al., *P-glycoprotein epitope mapping. I. Identification of a linear human-specific epitope in the fourth loop of the P-glycoprotein extracellular domain by MM4.17 murine monoclonal antibody to human multi-drug-resistant cells*. Int J Cancer, 1994. **56**(1): p. 153-60.
186. Georges, E., T. Tsuruo, and V. Ling, *Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1792-8.
187. Cianfriglia, M., et al., *P-glycoprotein epitope mapping. II. The murine monoclonal antibody MM6.15 to human multidrug-resistant cells binds with three distinct loops in the MDR1-P-glycoprotein extracellular domain*. Int J Cancer, 1995. **61**(1): p. 142-7.
188. Mechetner, E.B. and I.B. Roninson, *Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5824-8.
189. Watanabe, T., et al., *Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin, cyclosporin derivatives, and MRK-16 antibodies*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(7): p. 512-8.
190. Naito, M., et al., *Potentiation of the reversal activity of SDZ PSC833 on multi-drug resistance by an anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK-16*. Int J Cancer, 1996. **67**(3): p. 435-40.
191. Rittmann-Grauer, L.S., et al., *Reversal of Vinca alkaloid resistance by anti-P-glycoprotein monoclonal antibody HYB-241 in a human tumor xenograft*. Cancer Res, 1992. **52**(7): p. 1810-6.
192. Druley, T.E., W.D. Stein, and I.B. Roninson, *Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity*. Biochemistry, 2001. **40**(14): p. 4312-22.
193. Schinkel, A.H., et al., *Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 478-84.
194. Zhou, Y., M.M. Gottesman, and I. Pastan, *The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2*. Arch Biochem Biophys, 1999. **367**(1): p. 74-80.

195. Vahedi, S., et al., *Mapping discontinuous epitopes for MRK-16, UIC2 and 4E3 antibodies to extracellular loops 1 and 4 of human P-glycoprotein*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12716.
196. Esser, L., et al., *Crystal structure of the antigen-binding fragment of a monoclonal antibody specific for the multidrug-resistance-linked ABC transporter human P-glycoprotein*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2016. **72**(Pt 8): p. 636-41.
197. Vasudevan, S., T. Tsuruo, and D.R. Rose, *Mode of binding of anti-P-glycoprotein antibody MRK-16 to its antigen. A crystallographic and molecular modeling study*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25413-9.
198. Ozvegy-Laczka, C., et al., *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.
199. Schinkel, A.H., et al., *Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(7-8): p. 1295-8.
200. Jonker, J.W., et al., *Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(20): p. 1651-6.
201. Schinkel, A.H., *P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **36**(2-3): p. 179-194.
202. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 161-78.
203. Jonker, J.W., et al., *The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 127-9.
204. van Herwaarden, A.E., et al., *Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(4): p. 1247-53.
205. Huls, M., et al., *The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane*. Kidney Int, 2008. **73**(2): p. 220-5.
206. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
207. Chaudhary, P.M. and I.B. Roninson, *Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells*. Cell, 1991. **66**(1): p. 85-94.
208. Zhou, J. and Y. Zhang, *Cancer stem cells: Models, mechanisms and implications for improved treatment*. Cell Cycle, 2008. **7**(10): p. 1360-70.
209. Wee, B., et al., *ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25956.
210. Ding, X.W., J.H. Wu, and C.P. Jiang, *ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy*. Life Sci, 2010. **86**(17-18): p. 631-7.
211. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
212. Szakacs, G., et al., *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.
213. Eckford, P.D. and F.J. Sharom, *The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 2): p. 517-26.
214. Parker, R.B., et al., *P-glycoprotein modulates aldosterone plasma disposition and tissue uptake*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(1): p. 55-9.
215. Pawlik, A., et al., *Involvement of P-glycoprotein in the release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone*. J Pharm Pharmacol, 2005. **57**(11): p. 1421-5.
216. Abdallah, H.M., et al., *P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review*. J Adv Res, 2015. **6**(1): p. 45-62.
217. Stacy, A.E., P.J. Jansson, and D.R. Richardson, *Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance*. Mol Pharmacol, 2013. **84**(5): p. 655-69.
218. Ejendal, K.F. and C.A. Hrycyna, *Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(3): p. 902-11.
219. Coskun, U. and K. Simons, *Cell membranes: the lipid perspective*. Structure, 2011. **19**(11): p. 1543-8.
220. Hegedus, C., et al., *Lipid regulation of the ABCB1 and ABCG2 multidrug transporters*. Adv Cancer Res, 2015. **125**: p. 97-137.
221. Doige, C.A., X. Yu, and F.J. Sharom, *The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1146**(1): p. 65-72.
222. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *P-glycoprotein ATPase activity requires lipids to activate a switch at the first transmission interface*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **472**(2): p. 379-83.
223. Telbisz, A., et al., *Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein*. Biochem J, 2013. **450**(2): p. 387-95.

224. Urbatsch, I.L. and A.E. Senior, *Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 135-40.
225. Radeva, G., J. Perabo, and F.J. Sharom, *P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains*. FEBS J, 2005. **272**(19): p. 4924-37.
226. Storch, C.H., et al., *Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(1): p. 257-64.
227. Troost, J., et al., *Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(5): p. 1332-9.
228. Clouser, A.F., Y.H. Alam, and W.M. Atkins, *Cholesterol Asymmetrically Modulates the Conformational Ensemble of the Nucleotide-Binding Domains of P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs*. Biochemistry, 2021. **60**(1): p. 85-94.
229. Rasouli, A., et al., *Differential dynamics and direct interaction of bound ligands with lipids in multidrug transporter ABCG2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023. **120**(1): p. e2213437120.
230. Clay, A.T. and F.J. Sharom, *Lipid bilayer properties control membrane partitioning, binding, and transport of p-glycoprotein substrates*. Biochemistry, 2013. **52**(2): p. 343-54.
231. Aanismaa, P. and A. Seelig, *P-Glycoprotein kinetics measured in plasma membrane vesicles and living cells*. Biochemistry, 2007. **46**(11): p. 3394-404.
232. Romsicki, Y. and F.J. Sharom, *The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein--modulation by interaction with defined phospholipids*. Eur J Biochem, 1998. **256**(1): p. 170-8.
233. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(3): p. 1088-96.
234. Verhalen, B., et al., *Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein*. Nature, 2017. **543**(7647): p. 738-741.
235. Dastvan, R., et al., *Mechanism of allosteric modulation of P-glycoprotein by transport substrates and inhibitors*. Science, 2019. **364**(6441): p. 689-692.
236. Qu, Q. and F.J. Sharom, *FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated*. Biochemistry, 2001. **40**(5): p. 1413-22.
237. Futamata, R., et al., *In vivo FRET analyses reveal a role of ATP hydrolysis-associated conformational changes in human P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2020. **295**(15): p. 5002-5011.
238. Aquaculture. [OhioLINK]; Available from: <http://rave.ohiolink.edu/ejournals/journal/249341751>.
239. American Fisheries Society. *North American journal of aquaculture*. [OhioLINK]; Available from: <http://rave.ohiolink.edu/ejournals/journal/258939778>.
240. Nelson, J.S., T. Grande, and M.V.H. Wilson, *Fishes of the world*. Fifth edition ed. xli, 707 pages.
241. Zhang, H., et al., *Extinction of one of the world's largest freshwater fishes: Lessons for conserving the endangered Yangtze fauna*. Sci Total Environ, 2020. **710**: p. 136242.
242. Rajkov, J., Z. Shao, and P. Berrebi, *Evolution of Polyploidy and Functional Diploidization in Sturgeons: Microsatellite Analysis in 10 Sturgeon Species*. J Hered, 2014. **105**(4): p. 521-531.
243. World Aquaculture Society. *Journal of the World Aquaculture Society*. [OhioLINK]; Available from: <http://rave.ohiolink.edu/ejournals/journal/259639873>.
244. *Journal of applied ichthyology = Zeitschrift für angewandte Ichthyology*. [OhioLINK]; Available from: <http://rave.ohiolink.edu/ejournals/journal/249349984>.
245. *Environmental biology of fishes*. [OhioLINK]; Available from: <http://rave.ohiolink.edu/ejournals/journal/249351100>.
246. Tiersch, T.R., et al., *Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content*. Cytometry, 1989. **10**(6): p. 706-10.
247. Vindelov, L.L., et al., *Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization*. Cytometry, 1983. **3**(5): p. 332-9.
248. Darzynkiewicz, Z., X. Huang, and H. Zhao, *Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry*. Curr Protoc Cytom, 2017. **82**: p. 7 5 1-7 5 20.
249. Radicchio, G., et al., *Flow cytometry in formamide treated cells*. Cytometry A, 2018. **93**(8): p. 829-836.
250. Kron, P., *Endopolyploidy, genome size, and flow cytometry*. Cytometry A, 2015. **87**(10): p. 887-9.
251. Kolarcik, V., V. Kocova, and D. Vaskova, *Flow cytometric seed screen data are consistent with models of chromosome inheritance in asymmetrically compensating allopolyploids*. Cytometry A, 2018. **93**(7): p. 737-748.
252. Tomaszewska, P., et al., *Flow Cytometry-Based Determination of Ploidy from Dried Leaf Specimens in Genomically Complex Collections of the Tropical Forage Grass Urochloa s. l.* Genes (Basel), 2021. **12**(7).

253. Kij-Mitka, B., et al., *Analysis of morphological disorders and ploidy in domestic cat blastocysts*. Theriogenology, 2022. **186**: p. 114-121.
254. Vindelov, L.L., I.J. Christensen, and N.I. Nissen, *Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards*. Cytometry, 1983. **3**(5): p. 328-31.
255. *Physiologia plantarum*. 1961, Munksgaard: Copenhagen. p. V-.
256. Karlin, S. and J. Mrazek, *Compositional differences within and between eukaryotic genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10227-32.
257. Yang, W.S., et al., *Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(6): p. 1610-9.
258. Goda, K., et al., *Human ABCB1 with an ABCB1-like degenerate nucleotide binding site maintains transport activity by avoiding nucleotide occlusion*. PLoS Genet, 2020. **16**(10): p. e1009016.
259. Vamosi, G., et al., *IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11082-7.
260. Volko, J., et al., *IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2Ralpha therapies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(42): p. 21120-21130.
261. Weidemann, T. and P. Schwille, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy with continuous laser excitation in a confocal setup*. Methods Enzymol, 2013. **518**: p. 43-70.
262. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
263. Darzynkiewicz, Z. and G. Juan, *DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis*. Curr Protoc Cytom, 2001. **Chapter 7**: p. Unit 7 5.
264. Orban, T.I., et al., *Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(3): p. 667-73.
265. Telbisz, A., et al., *Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(1-2): p. 101-9.
266. Fisher, A.J., et al., *X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4*. Biochemistry, 1995. **34**(28): p. 8960-72.
267. Szakacs, G., et al., *Transition-state formation in ATPase-negative mutants of human MDR1 protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 1314-9.
268. Williams, S.P., A.M. Fulton, and K.M. Brindle, *Estimation of the intracellular free ADP concentration by ¹⁹F NMR studies of fluorine-labeled yeast phosphoglycerate kinase in vivo*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4895-902.
269. Yu, Q., et al., *Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4376.
270. Orelle, C., L. Schmitt, and J.M. Jault, *Waste or die: The price to pay to stay alive*. Trends Microbiol, 2022.
271. Horsey, A.J., et al., *Application of fluorescence correlation spectroscopy to study substrate binding in styrene maleic acid lipid copolymer encapsulated ABCG2*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020. **1862**(6): p. 183218.
272. Goda, K., et al., *Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells*. Eur J Biochem, 2002. **269**(11): p. 2672-7.
273. Cecchini, M.J., M. Amiri, and F.A. Dick, *Analysis of cell cycle position in mammalian cells*. J Vis Exp, 2012(59).
274. Jardetzky, O., *Simple allosteric model for membrane pumps*. Nature, 1966. **211**(5052): p. 969-70.
275. Li, M.J., A. Nath, and W.M. Atkins, *Differential Coupling of Binding, ATP Hydrolysis, and Transport of Fluorescent Probes with P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs*. Biochemistry, 2017. **56**(19): p. 2506-2517.
276. Vergani, P., D.C. Gadsby, and L. Csanády, *CFTR, an Ion Channel Evolved from ABC Transporter*, in *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, Editor. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 254-265.
277. Wang, L., et al., *Characterization of the kinetic cycle of an ABC transporter by single-molecule and cryo-EM analyses*. Elife, 2020. **9**.
278. Doshi, R. and H.W. van Veen, *Substrate binding stabilizes a pre-translocation intermediate in the ATP-binding cassette transport protein MsbA*. J Biol Chem, 2013. **288**(30): p. 21638-47.
279. Catipovic, M.A., et al., *Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism*. EMBO J, 2019. **38**(9).
280. Josts, I., et al., *Structural Kinetics of MsbA Investigated by Stopped-Flow Time-Resolved Small-Angle X-Ray Scattering*. Structure, 2020. **28**(3): p. 348-354 e3.

- 281. al-Shawi, M.K., I.L. Urbatsch, and A.E. Senior, *Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(12): p. 8986-92.
- 282. Pal, A., et al., *Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(3): p. 1085-94.
- 283. Grillitsch, K., et al., *Isolation and characterization of the plasma membrane from the yeast Pichia pastoris*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(7): p. 1889-97.
- 284. Kaldy, J., et al., *Hybridization of Russian Sturgeon (Acipenser gueldenstaedtii, Brandt and Ratzeberg, 1833) and American Paddlefish (Polyodon spathula, Walbaum 1792) and Evaluation of Their Progeny*. Genes (Basel), 2020. **11**(7).



Nyilvántartási szám: DEENK/155/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyöngy Zsuzsanna
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10073981

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gyöngy, Z.**, Mocsár, G., Hegedűs, É., Stockner, T., Ritter, Z., Homolya, L., Schamberger, A., Orbán, T. I., Gálné Remenyik, J., Szakács, G., Goda, K.: Nucleotide binding is the critical regulator of ABCG2 conformational transitions.
eLife. 12, 1-24, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.83976>
IF: 8.713 (2021)
2. Káldy, J., Mozsár, A., Fazekas, G., Farkas, M., Fazekas, D., Fazekas, G., Goda, K., **Gyöngy, Z.**, Kovács, B., Semmens, K., Bercsényi, M., Molnár, M., Patakiné Várkonyi, E.: Hybridization of Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt and Ratzeberg, 1833) and American Paddlefish (*Polyodon spathula*, Walbaum 1792) and Evaluation of Their Progeny.
Genes. 11 (7), 753-768, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11070753>
IF: 4.096

További közlemények

3. Káldy, J., Patakiné Várkonyi, E., Fazekas, G., Nagy, Z., Jakabné Sándor, Z., Bogár, K., Kovács, G., Molnár, M., Lázár, B., Goda, K., **Gyöngy, Z.**, Ritter, Z., Nánási, P. P. i., Horváth, Á., Ljubobratović, U.: Effects of Hydrostatic Pressure Treatment of Newly Fertilized Eggs on the Ploidy Level and Karyotype of Pikeperch Sander *lucio-perca* (Linnaeus, 1758).
Life (Basel). 11 (12), 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11121296>
IF: 3.251
4. Singh, K., Tarapcsák, S., **Gyöngy, Z.**, Ritter, Z., Batta, G., Bosire, R., Gálné Remenyik, J., Goda, K.: Effects of Polyphenols on P-Glycoprotein (ABCB1) Activity.
Pharmaceutics. 13 (12), 1-17, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122062>
IF: 6.525





5. Bercsényi, M., **Gyöngy, Z.**, Nagy, G., Mosonyi, G., Krasznai, Z., Barta, Á., Bársony, P., Goda, K.:
Nagy hatékonyságú, halgazdaságokban is elvégezhető eljárás szaporodásképtelen amur
(*Ctenopharyngodon idella*) állományok előállítására és ploidiaszintjük ellenőrzésére.
Halászat - Tudomány. 7 (2), 3-8, 2021.
6. Tarapcsák, S., Szalóki, G., Telbisz, Á., **Gyöngy, Z.**, Matúz, K., Csősz, É., Nagy, P., Holb, I., Rühl,
R., Nagy, L., Szabó, G., Goda, K.: Interactions of retinoids with the ABC transporters P-
glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein.
Sci Rep. 7 (41376), 1-31, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41376>
IF: 4.122

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,707

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,809**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2023.05.12.



Tárgyszavak

ABC transzporter, ABCG2, Pgp, multidrog rezisztencia, katalitikus ciklus, szubsztrát-affinitás, 5D3 antitest, UIC2 antitest, ATPáz aktivitás, aktív transzport

Keywords

ABC transporter, ABCG2, Pgp, multidrug resistance, cathalytic cycle, substrateaffinity, 5D3 antibody, UIC2 antibody, ATPase activity, active transport

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Goda Katalinnak** a PhD éveim során nyújtott számtalan segítségét, amely során kiváló szakmai tanácsokkal segítette munkámát és előrehaladásomat.

Köszönettel tartozom **Dr. Szabó Gábor** professzor Úrnak, hogy a munkacsoportjában kezdhettem el kutatói munkámat. A munkacsoport minden tagjainak, hogy egy ilyen rendkívüli csapat tagja lehettem.

Köszönöm **Dr. Szöllősi János** professzor Úrnak és **Dr. Panyi György** professzor Úrnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való kutatómunkát.

Külön köszönöm a technikai segítséget **Vezendiné Nagy Adélnak**, aki a mindennapi labormunkámat hasznos tanácsaival, precizitásával és segítőkészségével nagyban megkönnyítette.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet valamennyi munkatársának. Köszönöm a szerzőtársaknak és munkacsoportunk kollaborációs partnereinek az izgalmas közös munkát.

Köszönöm a **Szüleimnek**, hogy lehetővé tették tanulmányaimat és végül, de nem utolsósorban rendkívüli köszönettel tartozom **Férjemnek, Attilának**, aki végig mellettem állt ezen az úton, rengeteg támogatást, biztatást, megértést és türelmet tanúsítva.

Függelék