

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A humán P-glikoprotein (ABCB1) és a Mellrák
Rezisztencia Fehérje (ABCG2) transzport
mechanizmusának vizsgálata**

Tarapesák Szabolcs
Témavezető: Dr. Goda Katalin



Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola
Debrecen
2021

A humán P-glikoprotein (ABCB1) és a Mellrák Rezisztencia Fehérje (ABCG2) transzport mechanizmusának vizsgálata

Értekezés a doktori (Phd) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Tarapcsák Szabolcs, okleveles Molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskolája keretében
Témavezető: Dr. Goda Katalin

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
Tagok: Prof. Dr. Várad András, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet könyvtára,
2017. február 15. 13 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Enyedi Ágnes, az MTA doktora
Prof. Dr. Csontos Csilla, az MTA doktora

A bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
Tagok: Dr. Enyedi Ágnes, az MTA doktora
Prof. Dr. Csontos Csilla, az MTA doktora
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD

Az értekezés védésének (online formátum) időpontja: 2021. május 28. 14 óra. A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a tarapcsakszabolcs@gmail.com e-mail címre küldött üzenetben 2021. május 27. 14 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. Számos terápiás lehetőség áll rendelkezésre a daganatok kezelésére, így például sugárterápia, immunterápia vagy kemoterápia. A kemoterápiás kezelések során gyakran figyelhető meg, hogy a tumor rezisztenciát alakít ki a kezelés során alkalmazott gyógyszerrel szemben. Számos esetben, a kemoterápiás kezelés kezdeti stádiumában tapasztalt javulást követően, a daganat fokozatosan rezisztensé válik több, gyakran a terápia során korábban nem alkalmazott ágenssel szemben is. Nagyszámú celluláris folyamat deregulációja vezethet drog rezisztenciához. Mivel a kemoterápiás szerek gyakran a sejtciklus vagy az apoptózis szabályozásában szerepet játszó fehérjéket céloznak meg, így ezen celluláris folyamatokban létrejövő változások gyakran vezetnek drog rezisztenciához.

A tumorok drog rezisztenciájáért gyakran azonban az ATP-kötő kazettás (ATP-binding cassette, ABC) fehérjék családjába tartozó membrán transzporterek, így pl. a P-glikoprotein (Pgp, ABCB1, MDR1), a Multidrogtól Rezisztencia Fehérje 1 (MRP1, ABCC1) vagy a Mellrák Rezisztencia Fehérje (ABCG2, BCRP) fokozott expressziója tehető felelőssé. Ezek az ún. multidrogtól transzporter fehérjék rendkívül széles szubsztrát specifitással rendelkeznek, képesek a tumorok kemoterápiájában alkalmazott gyógyszerek nagy többségét felismerni és eltávolítani a daganatos sejtekből. Amikor a tumoros sejtek egy lépésben kereszt-rezisztenciát alakítanak ki nagyszámú, kémiaiilag eltérő kemoterápiás szerrel szemben, ezt a jelenséget *multidrogtól rezisztenciának* nevezzük.

Az ABC fehérjék alkotják az egyik legnagyobb és legváltozatosabb fehérje családot. Az ABC fehérje család tagjai minden élőlényben megtalálhatóak, baktériumoktól egészen az emberig, és rendkívül nagy funkcionális változatosságot mutatnak. Az ABC fehérjék nagy többsége transzmembrán fehérje és csatornaként, csatorna regulátorként vagy aktív transzporterként funkcionál. Az emberi genom 48 ABC fehérjét kódol, amelyeket szekvencia hasonlóság alapján hét alcsaládba sorolunk ABCA-tól ABCG-ig. A humán ABC transzporterek, így pl. a Pgp és az ABCG2 transzport ciklusának pontos molekuláris részletei a mai napig nem teljesen tisztázottak. A multidrogtól transzporterek katalitikus ciklusának pontosabb megismerése elősegítheti olyan újabb terápiás eljárások kidolgozását, amelyekkel a daganatok multidrogtól rezisztenciája legyőzhetővé válik.

1.1. A humán Pgp és ABCG2 szerkezete

A Pgp egy 1280 aminosav hosszú polipeptid láncból álló fehérje két transzmembrán doménnel (TMD) és két nukleotid-kötő doménnel (NBD). A Pgp-vel ellentétben, az ABCG2 egy 655 aminosavból álló fél-transzporter fehérje, ami egy

TMD-ből és egy NBD-ből áll, a Pgp-vel ellentétes NBD-TMD orientációval. Az aktív ABCG2 molekulák a sejtmembránban homodimereket képeznek.

Az eukarióta ABC transzporterek fő konformációs állapotai nagy mértékben hasonlítanak, amit több ABC transzporter kristály szerkezet és számos biokémiai és biofizikai kísérleti eredmény is alátámaszt. Ezek a konformációs állapotok az ún. „befelé-nyitott” és a „kifelé-nyitott” konformációk. A „befelé-nyitott” konformációban a Pgp és ABCG2 molekulák egy fordított „V” alakot formálnak, az intracelluláris tér felé nyitott nagyméretű drog-kötő zsebbel. A „befelé-nyitott” konformáció lehetővé teszi a szubsztrát molekulák belépését a TMD-hélixek által formált, nyitott drog-kötő zsebbe, illetve azok megkötését. A „kifelé-nyitott” konformációban az NBD-k szoros kapcsolatot alakítanak ki egymással, az NBD dimer képződés hatására a drog-kötő zseb az extracelluláris tér felé kinyílik. A „kifelé-nyitott” konformációban jön létre a megkötött szubsztrátok effluxa az extracelluláris tér irányába.

A Pgp és az ABCG2 transzmembrán doménjei felelősek a szubsztrátok megkötéséért és a szubsztrátok effluxáért. A Pgp mindkét TMD-je (egyenként 6 TM hélix-el) pszeudo-szimmetrikus módon járul hozzá a szubsztrát molekulák megkötéséhez. A TM hélixek elsősorban aromás és hidrofób aminosavakból épülnek fel, de számos poláris vagy töltött aminosav is megtalálható bennük. Ezzel szemben, az ABCG2 TMD-i teljesen szimmetrikusak, szubsztrát-kötő zsebe jóval keskenyebb és hidrofóbicitása magasabb. Továbbá, a Pgp-vel ellentétben, az ABCG2 TMD-i egy második, kisebb drog-kötő zsebet is formálnak a TMD-k által formált transzlokációs apparátus extracelluláris oldalán.

Az ABC transzporterek NBD-i felelősek az ATP megkötéséért és hidrolíziséért. Az ABC fehérjék NBD-i egy ún. RecA-szerű doménből és egy α -helikális doménből épülnek fel. A RecA-szerű domént az evolúcionárisan konzervált Walker A és Walker B motívumok hozzák létre, amely szekvencia motívumok a legtöbb ATPáz-ban és molekuláris motorban megtalálhatóak. Az α -helikális domén tartalmazza az ún. "signature" motívumot (LSGGQ motívum), amely egyedül az ABC transzporterek NBD-iben található meg. A két NBD együttesen két nukleotid-kötő helyet (NBS1 és NBS2) alakít ki. Az ATP megkötését követően a két NBD egy ún. "szendvics" dimert formál, amelyben az ATP molekulákat az egyik NBD Walker A és Walker B motívuma és a másik NBD signature motívuma köti. A Walker A, Walker B és signature motívumokon túl számos egyéb szekvencia motívum vesz részt az ATP molekulák megkötésében és hidrolízisében (pl. A-hurok). Az ATP-kötésben és hidrolízisben betöltött fontos szerepük miatt, az ezen szekvencia motívumokban található kulcsfontosságú aminosavak mutációja szignifikánsan csökkenti vagy teljesen meggátolja a fehérjék ATPáz és transzport aktivitását. Ezt számos heterológ

expressziós rendszerben kifejezett és tisztított fehérjékkel végzett mutagenézis vizsgálat támasztja alá.

1.2. A Pgp katalitikus ciklusa, aszimmetria a nukleotid-kötő doméneokban

A Pgp és ABCG2 katalitikus ciklusának molekuláris vizsgálata számos limitációval jár. Ez részben a membrán fehérjék kutatásával járó kísérletes problémákra vezethető vissza (pl. nagyméretű membrán fehérjék kristályosítása). Továbbá, mivel a transzmembrán fehérjék *in silico* vizsgálata molekuláris dinamikai szimulációk segítségével óriási számítási kapacitást igényel, a Pgp és ABCG2 teljes katalitikus ciklusának szimulációs vizsgálata jelenleg nem lehetséges.

A strukturális biológia és a spektroszkópos technikák napjainkban lejátszódott gyors fejlődése azonban rengeteget segített a Pgp és ABCG2 transzport mechanizmusának megértésében. A Pgp katalitikus ciklusának molekuláris lépéseit leíró modellek mindegyike feltételezi az alábbi lépéseket a ciklus során: (1) két ATP molekula kötődése a „befelé-nyitott”, nagy-affinitású konformerhez, (2) NBD-NBD szendvics dimer képződés, (3) a TMD-k konformáció változása és az alacsony-affinitású „kifelé-nyitott” konformer kialakulása, (4) nukleotid hidrolízis az NBD-ken, (5) ADP és inorganikus foszfát (Pi) disszociáció és végül (6) a TMD-kben lejátszódó konformáció változások révén a ciklus újra indulása.

Érdekes módon, a legtöbb jelenleg elfogadott katalitikus ciklus modell egyetért abban, hogy mindkét katalitikus centrum működése szükséges a konformáció változások lejátszódásához és a fehérje transzport aktivitásához. Ezt az elképzelést alátámasztja az a megfigyelés, hogy különböző foszfát analógok jelenlétében (pl. vanadát (Vi)), amelyek az ATP hidrolízisét követően képesek az egyik NBS-en a γ -foszfát helyébe lépve stabil Pgp-ADP-Vi komplex létrehozására, a Pgp molekulákat inaktívválik. Továbbá, korábbi mutagenézis vizsgálatok kimutatták, hogy az NBD-k konzervált szekvencia motívumaiban létrehozott, egy vagy mindkét NBD-t érintő mutációk szintén a Pgp inaktívációjához vezetnek. Ezzel ellentétben, munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy az olyan Walker A mutáns Pgp molekulák (K433M és K1076M), amelyekben a mutáció csak az egyik NBD-t érinti, természetes membrán környezetükben részlegesen transzport és ATPáz aktivitással rendelkeznek.

A humán ABC transzporterek közel felénél mindkét NBD funkcionálisan aktív. Ezek az NBD-k lehetnek teljesen megegyezők (pl. ABCG2) vagy nagymértékben hasonlóak (pl. Pgp) szekvenciáikban. Érdekes módon azonban, a humán ABC transzporterek másik felénél az NBS1 szekvenciája eltér a konszenzus szekvenciától. Ezen ABC transzporterek, mint pl. a fő epesav transzporter ABCB11 (BSEP) esetén a Walker B motívumban található glutamát aminosavat, amit gyakran „katalitikus glutamát” is nevezünk, egy „nem-kanonikus” aminosav helyettesíti. Az ABCB11

esetén további három nem-kanonikus aminosav is felfedezhető a Q-hurokban és a signature motívumban. Érdekes módon, az ABCB11-el ellentétben, ami a „katalitikus glutamát” hiányában is aktív, a Pgp esetén a homológ glutamát (E556) mutációja a fehérje inaktivációjához vezet.

1.3. ABC transzporterek és retinoidok

A Pgp és ABCG2 rendkívül széles és részben átfedő szubsztrát specificitással rendelkezik. A Pgp és ABCG2 egyaránt képes számos kémiai eltérő, 300-2000 Da molekula tömegű, hidrofób vagy amfifil tulajdonságú ágens transzportjára. Érdekes módon, a széles szubsztrát specificitásuk ellenére csak néhány fiziológiás ABCG2 szubsztrát ismert, míg a Pgp esetén nem ismerünk fiziológiás szubsztrátokat.

A retinoidok az A-vitaminból származtatható biomolekulák nagy csoportja. A retinoidok számos celluláris folyamatban vesznek részt, így többek között a proliferáció, a sejt túlélés és a differenciáció szabályozásában. Mivel a retinoidok hidrofób vegyületek, átlagos molekula tömegük kb. 300 Da, fizikokémiai sajátágaik alapján potenciális Pgp és/vagy ABCG2 szubsztrátok. A retinol (A-vitamin) a humán vérplazmában 1-2 μM koncentrációban mutatható ki fiziológiás körülmények között, míg természetes metabolitjai, így pl. a retinil-észterek, az *all-transz*-retinsav (ATRA), a 13-*cisz*-retinsav vagy a 9-*cisz*-retinsav jóval alacsonyabb (pM-nM) koncentrációban mutathatók ki. A transzkripcionálisan aktív retinoidok (pl. 13-*cisz*-retinsav) magreceptorok, pl. retinsav - retinoid X receptor (RAR-RXR), peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR) vagy D-vitamin receptorok (kalcitriol receptor, VDR) aktivációján keresztül fejtik ki biológiai hatásukat. A sejtosztódás és differenciáció szabályozásában betöltött fontos szerepük miatt a retinoidokat rutinszerűen alkalmazzák kemoterápiás kezelések során, a fiziológiás koncentrációknál jóval magasabb koncentrációban (10-20 μM plazma végkoncentráció). A retinil-észtereket, mint pl. a retinil-acetát vagy a retinil-palmitát gyakran alkalmazzák étel adalékanyagokként, illetve öregedés-elleni kozmetikumokban. A retinil-acetátot a retina egyes degeneratív megbetegedéseinek a kezelésében is gyakran alkalmazzák.

A Pgp és/vagy ABCG2 és a retinoidok kapcsolatát, esetleges direkt kölcsönhatásait eddig egy tanulmány se vizsgálta. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy bizonyos retinoid származékok egyenlőtlen eloszlást mutatnak a fejlődő embrió és a placenta között. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy aktív transzporterek vesznek részt a retinoidok transzportjában és a koncentráció grádiensek fenntartásában. Mivel mind a Pgp, mind az ABCG2 kifejeződik a placenta szinciciotrofoblaszt sejteiben, számos egyéb ABC transzporterrel együtt, így szerepük lehet a retinoidok transzportjában, az embrionális szövetek alacsony retinoid koncentrációjának fenntartásában és az embrió védelmében a retinoidok teratogén hatásaival szemben.

2. Célkitűzések

A Pgp és ABCG2 széles szubsztrát specifikitása ellenére csak néhány endogén ABCG2 szubsztrát molekula ismert, és nem ismerünk fiziológias Pgp szubsztrátot. A retinoidok potenciális Pgp és/vagy ABCG2 szubsztrátok/modulátorok fizikokémiai tulajdonságaik alapján (300 Da molekula tömeg, hidrofób jelleg). A retinoidok fiziológias és klinikai jelentősége miatt célul tűztük ki a retinoidok és a Pgp/ABCG2 közötti kölcsönhatások vizsgálatát. Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:

- Kölcsönhatnak-e a retinoidok a Pgp-vel és/vagy az ABCG2-vel? Szubsztrátjai, esetleg inhibitorai a fehérjéknek?
- A különböző retinoid származékok közötti sztereokémiai különbségek befolyásolják-e kölcsönhatásukat a Pgp-vel/ABCG2-vel?
- A retinoidok közvetlenül-, vagy közvetve, a membrán környezet módosítása révén, fejtik ki hatásukat a Pgp-re/ABCG2-re?

Munkánk következő felében, egy intakt NBD-vel rendelkező mutáns Pgp molekulák segítségével vizsgáltuk a nukleotid-kötő helyek közötti funkcionális kapcsolatot a Pgp katalitikus ciklusa során. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Az egy intakt és egy ABCB11-szerű degenerált NBS-el rendelkező Pgp molekulák mutatnak-e funkcionális aktivitást?
- A különböző féloldali A-hurok (Y401A vagy Y1044A) és Walker B (D555N vagy D1200N) mutáns Pgp molekulák rendelkeznek-e transzport aktivitással?
- A transzport-képtelen mutáns Pgp molekulák rendelkeznek-e részleges aktivitással: képesek-e nukleotid kötésre, nukleotid hidrolízisre vagy konformáció változásokra?

3. Anyag és módszer

3.1. Sejtvonalak

A kísérletekhez NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat, és annak humán *MDR1* génnel transzfektált variánsát (NIH 3T3 MDR1 G185), illetve MDCK (Madin-Darby canine kidney) sejtvonalat, és annak ABCG2-vel transzfektált változatát (MDCK-ABCG2) használtuk. A sejteket letapadó kultúrákban tartottuk fenn 37 °C-os inkubátorban. A sejtek tenyésztő közege Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) volt, mely hőinaktivált főtális marha szérumot (FCS), L-glutamint és penicillin-sztreptomycin koktélt tartalmazott. A sejteket rendszeresen teszteltük Mycoplasma fertőzésre MycoAlert mikoplazma detekciós kit segítségével

3.2. Szubsztrát akkumulációs vizsgálatok

A fluoreszcens drog akkumulációs vizsgálatokban calcein-acetoxi-metilésztert (Calcein-AM) és Hoechst 33342 festéket alkalmaztunk a vad-típusú és mutáns Pgp molekulák transzport aktivitásának méréséhez. Az ABCG2 transzport aktivitásának vizsgálatára fluoreszcens szubsztrátként mitoxantront alkalmaztunk. A sejteket háromszor mostuk 7 mM glükóz tartalmú PBS (gl-PBS) vagy HEPES puffer (a Hoechst 33342 kezelt minták esetén) segítségével. A sejteket 20 percig 37 °C-on előinkubáltuk különböző koncentrációkban alkalmazott retinoidokkal, specifikus Pgp inhibitorokkal (ciklosporin A, tariquidar) vagy ABCG2 inhibitorral (Ko143). Ezután a sejteket mitoxantronnal (40 perc), calcein-AM-el (20 perc) vagy Hoechst 33342-vel (30 perc) jelöltük különböző koncentrációkban 37 °C-on. Mosást követően a sejteket jégen tartottuk a mérésig. Az inhibitorral kezelt és nem kezelt minták fluoreszcencia intenzitás értékeiből transzport aktivitás faktort (TAF) számoltunk.

3.3. Western blot analízis

Az Sf9 és NIH 3T3 sejtlizátumok fehérjéit (2,5 vagy 5 µg fehérje/minta) 8%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra elektroblottoltuk. A Pgp expressziót G-1 monoklonális antitesttel, míg az ABCG2 expressziót BXP-21 monoklonális antitesttel detektáltuk torna-peroxidázzal konjugált egér ellenes kecske IgG antitest segítségével. Az előhívást SuperSignal West Fento ECL reagenssel, a kép rögzítését pedig Fluor Chem Q Alpha Innotech géldokumentációs rendszer segítségével végeztük.

3.4. Membrán preparátumok

Az ATPáz aktivitás mérésekhez humán Pgp-t, illetve ABCG2-t kifejező Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) rovar ovárium sejtekből és különböző mutáns és vad-típusú Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejtekből származó sejtmembrán preparátumokat alkalmaztunk. Az Sf9 és NIH 3T3 sejtek feltárása után a membrán frakciókat differenciál centrifugálással választottuk el majd a membrán frakciókat TMEP oldatban

vettük fel. Az ABCG2-t kifejező Sf9 sejtmembrán preparátumokat koleszterinnel töltöttük fel metil- β -ciklodextrin komplex (Chol-RAMEB) alkalmazásával.

3.5. ATPáz aktivitás vizsgálatok

A vad-típusú és mutáns Pgp molekulák, illetve az ABCG2 vanadát-érzékeny ATPáz aktivitását, egy érzékeny kolorimetriás eljárással határoztuk meg. A fehérjék specifikus ATPáz aktivitását a reakció során felszabaduló inorganikus foszfát mennyisége alapján számoltuk ki. Az ATPáz reakciót MgATP hozzáadásával indítottuk el. 25 perc inkubációt követően a reakciót 5% SDS oldat hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat szín előhívó reagens segítségével kezeltük 30 percig szobahőmérsékleten. A minták abszorbancia értékeit 700 nm-en mértük BioTek Synergy HT plate-alapú spektrofotométer segítségével. A retinoid kezelések esetén, a retinoidok félhatásos dózis értékeit (IC_{50}) a mintapontokra illesztett négy paraméteres szigmoid egyenlet segítségével határoztuk meg.

3.6. Retinoidok és transzporter inhibitorok celluláris felvételének vizsgálata

NIH 3T3 sejteket 1% BSA-t tartalmazó gl-PBS-ben, különböző retinoidok vagy specifikus transzporter ligandok (quercetin, ciklosporin A, Ko143) jelenlétében, 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a sejteket centrifugációval elválasztottuk a felülúszótól. A vizsgált vegyületek celluláris felvételét a felülúszó inkubációt megelőzően és azt követően mért abszorbancia értékeinek hányadosa alapján számoltuk. Az abszorbancia méréseket NanoDrop 1000 UV/VIS spektrofotométer segítségével végeztük.

3.7. Fluoreszcencia anizotrópia mérések

Az NIH 3T3 sejteket különböző retinoid származékokkal előkezeltük 10 percig 37 °C-os Hank's pufferben, majd 20 percig inkubáltuk őket sötétben, szobahőmérsékleten DPH vagy TMA-DPH jelenlétében. A fluoreszcencia anizotrópia méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 spektrofluoriméter segítségével végeztük el, a szabályozható hőmérsékletű minta tartót 37 °C-ra állítva. A DPH és TMA-DPH gerjesztése 358 nm-en történt, az emissziót pedig 427 nm-en detektáltuk.

3.8. Citotoxicitási vizsgálatok

Pgp-negatív, vad-típusú vagy mutáns Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejteket 96 lyukú plate-en, drogmentes médiumban tenyésztettük 24 órán keresztül, majd további 72 órán keresztül inkubáltuk különböző koncentrációkban alkalmazott vinblasztin vagy retinil-acetát jelenlétében és hiányában. Ezt követően a médiumot Alamar Blue tartalmú médiumra cseréltük, és további két óra inkubálást követően a redukált Alamar Blue mennyiségét BioTek Synergy HT plate-alapú spektrofluoriméter segítségével határoztuk meg a fluoreszcencia emisszió alapján (530/90 nm). A minták fluoreszcencia intenzitásait a kezeletlen minták fluoreszcencia intenzitására normáltuk majd a sejtek életképességét a retinil-acetát vagy vinblasztin koncentráció függvényében ábrázoltuk.

3.9. Sejtek permeabilizálása streptolizin-O toxinnal

A sejtuszpenziókat streptolizin-O (SLO) toxinnal 30 percig permeabilizáltuk 37 °C-on, DTT és proteáz inhibitor koktél mellett BSA-t tartalmazó PBS-ben. A permeabilizált sejtek arányát propidium jodidos (PI) festéssel határoztuk meg. A permeabilizálást nagy térfogatú 37 °C-os PBS segítségével állítottuk le, amikor a sejtek kb. 50-70%-a PI pozitívvá vált. A permeabilizálást követően a szabad toxint háromszoros PBS-es mosással távolítottuk el.

3.10. Látszólagos ATP-kötő affinitás meghatározása

Vad-típusú vagy mutáns Pgp-t expresszáló NIH 3T3 sejteket permeabilizáltuk SLO toxinnal, majd széles koncentráció tartományban alkalmazott nukleotidokkal 20 percig előinkubáltuk őket, V_i jelenlétében vagy hiányában. Ezt követően mosás nélkül tovább inkubáltuk őket telítő koncentrációban alkalmazott UIC2-A647 monoklonális antitesttel, 37 °C-on 30 percig. Az UIC2 reverzibilis módon kötődik a Pgp-hez MgATP jelenlétében, ezért az UIC2-t közel telítési koncentrációban alkalmaztuk. Az antitesttel történő jelölést követően a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel. A permeabilizált PI-pozitív sejtek áramlási citométerrel mért UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását a nukleotid koncentráció függvényében ábrázoltuk. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a Pgp variánsok látszólagos ATP-kötő affinitását, az ábrázolt mérési pontokat négy-paraméteres Hill-függvény segítségével illesztettük.

3.11. UIC2-reaktivitási esszé

Intakt vad-típusú és mutáns Pgp molekulákat kifejező NIH 3T3 sejteket 30 percig kezeltük CsA jelenlétében gl-PBS-ben 37 °C-on. További mintákat 30 percig 37 °C-on glükóz mentes PBS-ben, Na-azid és 2-deoxi-D-glükóz segítségével, ATP-depletáltunk. Mosás nélkül UIC2-A647 vagy 15D3-A647 antitestet adtunk mind a kezeletlen, a CsA kezelt és az ATP-depletált mintákhoz és további 30 percig inkubáltuk őket 37 °C-on. A sejteket ezt követően jéghideg PBS-el mostuk az áramlási citometriás mérés előtt. Az UIC-reaktivitás mértékét az F/P korrigált UIC2 és 15D3 szignálok arányaként számoltuk.

3.12. UIC2-disszociáció kinetikai vizsgálata

Vad-típusú vagy mutáns Pgp-t expresszáló NIH 3T3 sejteket streptolizin-O (SLO) toxinnal 30 percig permeabilizáltuk, 37 °C-on 30 percig, majd jéghideg PBS-el mostuk őket háromszor. A permeabilizált sejteket A647-konjugált UIC-Fab fragmentumokkal jelöltük 20 percig 37 °C-on, majd két mosást követően nagy térfogatú PBS-ben felvéve a citometriás mérésig jégen tartottuk őket. Mérés előtt, a sejteket előmelegített 37 °C-os PBS-el kevertük össze, különböző koncentrációjú MgATP és/vagy verapamil jelenlétében. A sejtek fluoreszcencia intenzitását 37 °C-on 15 percig folyamatosan mértük Becton Dickinson FACSAria III áramlási citométer segítségével.

3.13 Áramlási citometria

A calcein-AM, mitoxantron és Hoechst 33342 akkumulációs méréseket Becton Dickinson FACSria III áramlási citométerrel végeztük. A calcein gerjesztéséhez 488 nm kék lézert használtunk, az emissziót pedig egy 502 nm dikroikus tükörrel és egy 530/30 nm sáv szűrő segítségével mértük. A mitoxantron gerjesztéséhez 631 nm vörös lézert alkalmaztunk az emittált fluoreszcencia intenzitásokat pedig 685/15 távoli vörös sáv szűrő segítségével rögzítettük. A Hoechst 33342 gerjesztéséhez a citométer 365 nm UV lézerét alkalmaztuk és a festék kék emissziós intenzitását egy 445/40 sáv szűrővel detektáltuk. A PI gerjesztéséhez a citométer 562 nm zöld lézert alkalmaztuk az emittált fluoreszcencia intenzitásokat pedig egy 590 nm dikroikus tükör és egy 595/50 nm sáv szűrő segítségével detektáltuk.

A permeabilizált sejtek UIC2 jelölésének vizsgálatához Becton Dickinson FACSria áramlási citométert alkalmaztunk. Az A647 festék gerjesztéséhez egy 635 nm lézert alkalmaztunk és az emissziót a piros csatornában detektáltuk (661/16 nm), míg a PI gerjesztéséhez egy 532 nm zöld lézert használtunk, az emissziót pedig 585/42 sáv szűrő segítségével detektáltuk.

Az UIC2 disszociációs kísérletekhez Becton Dickinson FACSria III citométert használtunk. Az A647-jelölt UIC2 antitest detektálásához 631 nm vörös lézert és egy 660/20 nm sáv szűrőt, míg a PI detektálásához az 562 nm zöld lézert, egy 590 nm dikroikus tükröt és egy 505/50 sáv szűrőt alkalmaztunk. Az UIC2 disszociáció folyamatos nyomon követéséhez 15 percen keresztül mértük a fluoreszcencia intenzitásokat a 37 °C-ra melegített minta tartó segítségével.

Minden áramlási citometriás mérés esetén a sejt törmelékét kikapuztuk az analízishez a sejtek FSC és SSC szignálja alapján. Az áramlási centiméteres eredmények kiértékeléséhez FCS Express 4 Research Edition programot alkalmaztunk.

3.14 Kiértékeléshez használt programok és statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisére SigmaStat programot alkalmaztunk, és az adatokat átlag \pm SD-ként adtuk meg. Két független csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát, három vagy több csoport összehasonlítására varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. A minták páronkénti összehasonlításához egyenlő varianciák esetén Holm-Sidak, különböző varianciák esetén pedig Dunnett T3 *post hoc* tesztet alkalmaztunk. A különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A dózis hatás görbéik illesztésére SigmaPlot 12.0 programot alkalmaztunk.

4. Eredmények

I. A retinoidok kölcsönhatása a humán Pgp-vel és ABCG2-vel

4.1. A retinoidok gátolják a Pgp- és ABCG2- általi szubsztrát transzportot

NIH 3T3/NIH 3T3 MDR1 és MDCK/MDCK ABCG2 sejtek segítségével vizsgáltuk különböző retinoid származékoknak a Pgp és ABCG2 transzport aktivitására kifejtett hatását. A rezisztens sejtvonalak nagy mennyiségben expresszálták a humán Pgp-t és ABCG2-t, amint azt immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk.

A Pgp és az ABCG2 transzport aktivitás méréséhez calcein-AM és mitoxantron akkumulációs esszét alkalmaztunk. Kísérleti eredményeink megmutatták, hogy a vizsgált retinoidok közül a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és a retinil-acetát koncentráció függő módon gátolta mindkét rezisztens sejtvonalban a fluoreszcens transzporter szubsztrátok felhalmozódását. A fiziológias koncentrációkat jelentősen meghaladó koncentráció tartományokban (25-100 μM), a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és a retinil-acetát gátló hatása összevethető volt a specifikus Pgp és ABCG2 inhibitorok, a CsA és a Ko143 gátló hatásával. A retinoidok gátló hatása nem vezethető vissza azok esetleges citotoxikus hatására, mivel a transzportereket nem expresszáló NIH 3T3 és MDCK sejtek esetén 50 μM koncentrációban alkalmazva a különböző retinoidokat nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a sejtek életképességében.

4.2. A retinoidok gátolják a Pgp és az ABCG2 alap- és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását

További kísérleteinkben Sf9 rovar sejtekből származó, humán Pgp-t és ABCG2-t magas szinten expresszáló sejtmembrán preparátumokat alkalmaztunk. Egy érzékeny ATPáz ésszé segítségével vizsgáltuk a retinoidok a Pgp és ABCG2 alap- és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitására kifejtett hatását.

A retinil-acetát kis mértékben stimulálta a Pgp alap ATPáz aktivitását arra utalva, hogy a retinil-acetát a Pgp szubsztrátja. Azonban Alamar Blue-alapú citotoxicitási vizsgálatainkban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a retinil-acetát szenzitív- és rezisztens NIH 3T3 sejtekre kifejtett citotoxikus hatásában.

A calcein-AM és mitoxantron akkumulációs vizsgálatokkal összhangban, magasabb koncentrációkban a retinil-acetát gátolta mind a Pgp, mind az ABCG2 alap- és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását. Továbbá, a retinol és a 13-*cisz*-retinsav is koncentráció függő módon gátolta a fehérjék ATPáz aktivitását.

Érdekes módon, sztereospecifikus különbségeket fedeztünk fel az egyes alkalmazott retinoidok hatása között (pl. 13-*cisz*-retinsav és 9-*cisz*-retinsav). A retinoidok sztereospecifikus hatásának egyik lehetséges magyarázata lehet a retinoidok eltérő felhalmozódása a membránban. Ennek vizsgálatára Pgp-negatív NIH 3T3 sejteket különböző retinoid származékokkal kezeltünk, és a sejtek felülúszójának

abszorbanciája alapján megbecsültük a különböző retinoidok celluláris akkumulációjának mértékét. Kísérleteinkben erős korrelációt figyeltünk meg a retinoidok oktanol-víz megoszlási hányadosa (LogP_{ow}) és intracelluláris/membrán akkumulációjuk között, de nem tapasztaltunk sztereospecifikus eltéréseket.

4.3. A gátló hatású retinoidok csökkentik a membrán fluiditását a membrán belső, hidrofób rétegében

Figyelembe véve a Pgp és ABCG2 szoros funkcionális kapcsolatát membrán környezetükkel, további kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolják a retinoidok a membrán fluiditását és indirekt módon a transzporterek működését. A membrán fluiditásra kifejített hatásaik vizsgálatára DPH és TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia méréseket végeztünk. A DPH a membrán belső, hidrofób rétegében halmozódik fel, míg kationos származéka, a TMA-DPH a foszfolipidek poláris fejcsoportjainak környezetében akkumulálódik. A két fluoreszcens membrán festék alkalmazásával lehetséges a membrán fluiditásban létrejövő változások követése a membrán különböző rétegeiben.

Pgp-t és ABCG2-t expresszáló és nem expresszáló NIH 3T3 és MDCK sejteket kezeltünk DPH és TMA-DPH segítségével. A DPH fluoreszcencia anizotrópia értékei 0,14 és 0,18 között változtak steady state körülmények között, utalva a membrán belső rétegének nagyfokú strukturális rendezettségére, míg a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia értékei 0,28 és 0,30 között változtak. A mért fluoreszcencia anizotrópia értékek megegyezők voltak a szenzitív és rezisztens sejtvonalak között, korábbi irodalmi adatokkal összhangban. Érdekes módon, a korábbi ATPáz és transzport aktivitás mérésekben azonosított gátló hatású retinoidok, a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és retinil-acetát jelentős mértékben növelték a DPH fluoreszcencia anizotrópia értékeit, míg más tesztelt retinoidok esetén nem tapasztaltunk hasonló változást. Érdekes módon továbbá, a retinil-acetát DPH anizotrópiára kifejített hatása szignifikánsan alacsonyabb volt a Pgp-t expresszáló NIH 3T3 MDR1 sejtekben a szenzitív sejtekhez mérten. Ez valószínűleg a Pgp-meditált retinil-acetát transzportra vezethető vissza.

4.4. A retinoidok kevert-típusú gátlás révén akadályozzák meg a Pgp és ABCG2 ATPáz aktivitásának szubsztrát-stimulációját

Annak érdekében, hogy megértsük a retinoidok transzporterekre kifejített hatásának molekuláris részleteit, kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy milyen módon befolyásolják a retinoidok az ATPáz aktivitás szubsztrátok általi stimulációját. A Pgp és ABCG2 ATPáz aktivitását növekvő koncentrációban alkalmazott verapamil és quercetin segítségével stimuláltuk különböző koncentrációban alkalmazott retinol és 13-*cisz*-retinsav jelenlétében. A kapott dózis hatás görbék megmutatták, hogy a retinol szignifikánsan megemelte a transzporter stimuláció K_M értékét és lecsökkentette a v_{max} értékét mindkét transzporter esetén (kevert típusú transzporter gátlás).

A 13-*cisz*-retinsav kevert gátlás révén gátolta az ABCG2 ATPáz aktivitásának quercetin-stimulációját, egyaránt változtatva a K_M és v_{max} értékét. Ezzel ellentétben, a Pgp esetén a 13-*cisz*-retinsav nem változtatta meg szignifikánsan a verapamil-stimuláció K_M értékét, de a v_{max} értékét jelentősen csökkentette. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a 13-*cisz*-retinsav non-kompetitív módon gátolja Pgp ATPáz aktivitásának verapamil-stimulációját.

II. A Pgp katalitikus ciklusának vizsgálata ATP-kötő hely mutánsok segítségével

4.5. Az egy nem-kanonikus NBS1-el rendelkező négyszeres mutáns Pgp-k visszanyerik konformációs flexibilitásukat

Számos ABC fehérjében, így pl. Az ABCB11 esetén, a Walker B motívum glutamátját („katalitikus glutamát”) nem-kanonikus aminosavak helyettesítik. Az ABCB11-el ellentétben, a Pgp esetén a „katalitikus glutamát” mutációja inaktív fehérjét eredményez. A Pgp és az ABCB11 NBD-NBD interface-e csupán 4 aminosavban tér el egymástól, beleértve a „katalitikus glutamátot” is. Az ABCB11 degenerált ATP kötő helyén található négy nem-kanonikus aminosav szerepének vizsgálatához egy ABCB11-szerű NBS1-et hoztunk létre a humán Pgp-ben mutagenézis révén. Kísérleteinkhez létrehozunk egy E556M „katalitikus glutamát” mutánsot és egy „négyszeres” mutánsot, amelyben az ABCB11 NBS1 további három mutációja is megtalálható volt (S474E, G1178R és Q1180E).

A „katalitikus glutamát” és a négyszeres mutáns Pgp molekulák konformációs flexibilitásának vizsgálatához UIC2 antitestet jelöléseket végeztünk NIH 3T3 sejteken Pgp inhibitor CsA jelenlétében vagy ATP-depléciót követően. A vad-típusú Pgp-k alacsony UIC2-reaktivitást mutattak kezeletlen sejtekben, csupán a sejt felszíni Pgp molekulák egy kis hányada (kb. 20%) jelölődött a konformáció érzékeny UIC2 antitesttel. ATP-depléciót követően, a CsA kezeléshez hasonlóan, az összes sejt felszíni Pgp UIC2-reaktív konformációra váltott. A „katalitikus glutamát” mutáns Pgp molekulák jelentősen eltérő viselkedést mutattak: kezeletlen sejtekben a sejt felszíni Pgp molekulák alig több mint 5%-a jelölődött UIC2 antitesttel és a CsA kezelés is csak kis mértékben fokozta az UIC2-reaktivitást. Érdekes módon, a négyszeres mutáns Pgp-k a vad-típusú Pgp-hez nagyon hasonló viselkedést mutattak: kezeletlen sejtekben a sejt felszíni Pgp molekulák kb. 20% jelölődött, míg CsA kezelés vagy ATP-depléció hatására a teljes sejt felszíni Pgp pool átváltott a „befelé-nyitott”, UIC2-reaktív konformációba. Eredményeink alapján elmondható, hogy a négyszeres mutáns Pgp molekulák az E556M „katalitikus glutamát” mutánsokkal ellentétben visszanyerik konformációs flexibilitásukat.

További kísérleteinkben SLO-toxin permeabilizált sejtek segítségével mértük a vad-típusú és mutáns Pgp molekulák látszólagos ATP-kötő affinitását (K_A) vanadát

jelenlétében és hiányában. A vad-típusú és négyszeres mutáns Pgp molekulák hasonló látszólagos ATP-kötő affinitással rendelkeztek, vanadát kezelés hatására az affinitásuk két-három nagyságrenddel megnövekedett. Ez arra utal, hogy a négyszeres mutáns Pgp molekulák képesek ATP hidrolízisre az intakt ATP kötőhelyük segítségével. A vad-típusú és a négyszeres mutánssal ellentétben, az E556M „katalitikus glutamát” mutáns hasonlóan magas látszólagos ATP-kötő affinitással rendelkezett *Vi* jelenlétében és hiányában egyaránt.

4.6. A négyszeres mutáns Pgp molekulák visszanyerik ATPáz és transzport aktivitásukat

A következő kísérleteinkben azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a mutáns Pgp molekulák funkcionális aktivitását ATPáz aktivitás- és szubsztrát akkumulációs kísérletekben. Az NIH 3T3 sejtekből izolált vad-típusú Pgp-t expresszáló membrán preparátumok alap ATPáz aktivitással rendelkeztek, verapamil jelenlétében pedig kb. négyszeres stimuláció volt megfigyelhető az ATPáz aktivitásban. A négyszeres mutáns alacsony steady state ATPáz aktivitással rendelkezett, amely verapamil jelenlétében stimulálható volt. Habár az alap ATPáz aktivitás értéke alacsony volt, a verapamil-stimuláció mértéke a vad-típusú és négyszeres mutáns Pgp esetén megegyező volt. Ezzel ellentétben, a „katalitikus glutamát” mutáns nem mutatott sem alap-, sem szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitást.

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a négyszeres mutáns képes-e ATPáz aktivitását a koncentráció grádienssel szembeni aktív szubsztrát transzporttal összekapcsolni calcein és Hoechst 33342 akkumulációs vizsgálatokat végeztünk intakt NIH 3T3 sejteken. A Pgp-t nem expresszáló sejtek esetén a számolt transzport aktivitási faktor (TAF) értéke közel nulla volt, míg a vad-típusú Pgp-t expresszáló sejtek képesek voltak hatékonyan megakadályozni az intracelluláris Hoechst 33342 és calcein akkumulációt, amint azt a megnövekedett TAF értékek mutatták. Az E556M mutáns, a csökkent konformációs flexibilitással és a steady state ATPáz aktivitás hiányával összhangban, nem mutatott mérhető transzport aktivitást. Ezzel ellentétben a négyszeres mutáns Pgp molekulák képesek voltak a vad-típusú Pgp-hez hasonlóan megakadályozni a Hoechst 33342 és calcein akkumulációját, habár csökkent hatékonysággal. Ezek a kísérleti adatok egyértelműen alátámasztják, hogy a négyszeres mutáns Pgp molekulák a „katalitikus glutamát” hiányában is képesek szubsztrátjaik effluxára.

4.7. Vanadát jelenlétében megemelkedik az A-hurok és Walker B mutáns Pgp-k ATP-kötő affinitása

Korábbi heterológ expressziós rendszerek vagy tisztított fehérjék felhasználásával végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy az A-hurok és Walker B motívumok kulcsfontosságú aminosavaiban létrehozott mutációk (A-hurok: Y401A és/vagy

Y1044A, Walker B: D555N és/vagy D1200N), függetlenül attól, hogy csak egy vagy mindkét NBS-t érintette a mutáció, inaktiválják a Pgp molekulákat. Ezen mutáns Pgp molekulák konformációs aktivitásának vizsgálatát tűztük ki célul az UIC2 antitest használatával intakt emlős NIH 3T3 sejtekben.

Az irodalmi adatokkal összhangban, a vad-típusú Pgp-k kezeletlen sejtekben alacsony UIC2-reaktivitást mutattak, azonban CsA kezelés, illetve ATP-depléció hatására UIC2-kötő konformációra váltottak. Ezzel ellentétben, az A-hurok tirozin, illetve a Walker B aszpartát mutáns Pgp-k magas UIC2-reaktivitással rendelkeztek kezeletlen sejtekben, és az ATP-depléció, illetve CsA kezelés nem eredményezett szignifikáns növekedést az UIC2 kötődésben. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy intakt sejtekben az alábbi mutáns Pgp-k az ATP-mentes, „befelé nyitott” konformációban találhatóak.

Hogy tovább vizsgáljuk az A-hurok és Walker B mutációk hatását az ATP-kötésre, különböző ATP koncentrációk mellett mértük a mutáns Pgp molekulák UIC2-reaktivitását vanadát jelenlétében és hiányában és meghatároztuk a K_A értéküket. Kimutattuk, hogy az féldoldali A-hurok mutáns (Y401A és Y1044A) illetve az féldoldali Walker B mutáns (D555N és D1200N) Pgp molekulák a vad-típusú Pgp-hez mérten jóval magasabb K_A értékekkel rendelkeztek. Érdekes módon, V_i jelenlétében a féldoldali A-hurok és Walker B mutáns Pgp-k esetén is jelentősen csökkent a K_A értéke, arra utalva, hogy ezek a mutánsok képesek ATP hidrolízisére az intakt ATP kötéshelyükön. Ezzel ellentétben a kétoldali mutáns Pgp-k esetén (Y401A/Y1044A és D555N/D1200N) nem volt megfigyelhető változás a K_A értékekben V_i jelenlétében, arra utalva, hogy a kétoldali mutáns Pgp-k nem képesek ATP hidrolízisre.

4.8. A féldoldali A-hurok és Walker B mutánsok képesek ATP hidrolízisre és szubsztrátjaik transzportjára

Következő lépésként NIH 3T3 sejtekből származó membrán preparátumok segítségével ATPáz aktivitás méréseket végeztünk. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, milyen hatással bírnak a mutációk a Pgp alap- és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitására. A vad-típusú Pgp-t expresszáló NIH 3T3 sejtekből nyert membrán preparátumok alacsony alap aktivitással rendelkeztek és verapamil jelenlétében közel háromszoros stimuláció volt megfigyelhető az ATPáz aktivitásban. Az Y401A és Y1044A féldoldali A-hurok mutánsok, illetve a D555N és D1200N féldoldali Walker B mutánsok alacsony ATPáz aktivitással rendelkeztek, verapamil jelenlétében azonban csupán az Y401A A-hurok mutáns esetén tapasztaltunk kb. kétszeres stimulációt az ATPáz aktivitásban.

A továbbiakban calcein-AM akkumulációs vizsgálatokat és Alamar Blue-alapú citotoxicitási vizsgálatokat végeztünk a különböző mutánsokat kifejező NIH 3T3 sejtekkel. Az intracelluláris calcein akkumuláció és a vinblasztin-indukált citotoxicitás

vizsgálata megmutatta, hogy a vad-típusú, Y401A és Y1044A A-hurok mutáns Pgp molekulákat expresszáló NIH 3T3 sejtek szignifikáns transzport aktivitással rendelkeznek.

4.9. Az féloldali A-hurok és Walker B mutánsok képesek többször, ismételten áthaladni a katalitikus cikluson

Korábbi UIC2-jelölési kísérleteink alapján tudjuk, hogy az UIC2 antitest kötődése a Pgp-hez reverzibilis és az antitest disszociációja kiváltható MgATP és Pgp szubsztrátok jelenlétében. További kísérleteinkben SLO-toxin permeabilizált NIH 3T3 sejtek segítségével mértük az UIC2-Fab fragmentumok disszociációjának kinetikáját. MgATP hiányában a vad-típusú Pgp esetén nem volt megfigyelhető szignifikáns UIC2-Fab disszociáció, azonban MgATP jelenlétében szignifikáns UIC2-Fab disszociáció volt megfigyelhető az féloldali A-hurok és Walker B mutáns Pgp-t expresszáló sejtek esetén, a vad-típusú Pgp-hez hasonlóan. A verapamil Pgp stimuláló hatásával összhangban verapamil kezelés hatására a vad-típusú és a transzport kompetens mutáns Pgp-k esetén fokozódott az UIC2-Fab disszociáció mértéke. Az A-hurok és Walker B mutánsokhoz hasonlóan, a négyszeres mutáns esetén is emelkedett UIC2-Fab disszociációt tapasztaltunk verapamil jelenlétében. Az ATPáz és transzport aktivitással nem rendelkező kétoldali A-hurok és Walker B mutánsok esetén nem volt megfigyelhető UIC2-Fab disszociáció. Habár a Pgp képes ATP-kötésre Mg^{2+} ionok hiányában is és képes az UIC2-t nem kötő, „kifelé-nyitott” konformáció kialakítására, ilyen körülmények között az ATP hidrolízis gátolt és a katalitikus ciklus megakad. Ezzel összhangban, Mg^{2+} ionok hiányában az ATP hozzáadása nem eredményezett UIC2-Fab disszociációt a vad-típusú Pgp-t expresszáló sejtek esetén. Ez arra utal, hogy a Pgp molekuláknak, így az féloldali A-hurok és Walker B mutáns Pgp-knek is számos katalitikus cikluson keresztül kell haladnia a megkötött UIC2 disszociációjához.

5. Diskusszió

5.1. A retinoidok kölcsönhatása a humán Pgp-vel és ABCG2-vel

Kísérleteinkben számos fiziológias jelentőségű retinoid származék (pl. retinol, 13-*cisz*-retinsav vagy 9-*cisz*-retinsav) és a Pgp/ABCG2 közötti lehetséges direkt kölcsönhatásokat vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és a retinil-acetát effektív inhibitorai a Pgp- és ABCG2-mediált szubsztrát transzportnak. A vizsgált retinoid származékok erősen hidrofób karaktere, illetve a celluláris enzimek általi biokonverziójuk igen nehézkessé teszi a retinoidok megkötésének és transzportjának vizsgálatát élő sejtekben. Ezért további kísérleteinkben, humán Pgp-t vagy ABCG2-t expresszáló Sf9 membrán preparátumok segítségével, vizsgáltuk a retinoidok ATPáz aktivitásra kifejtett hatását. Az ATPáz aktivitás mérések megerősítették a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és a retinil-acetát Pgp/ABCG2 gátló hatását. Továbbá, ATPáz aktivitás méréseink megmutatták, hogy a retinil-acetát kb. 10 μ M koncentrációban gyengén stimulálja a Pgp alap ATPáz aktivitását, arra utalva, hogy a retinil-acetát egy potenciális Pgp szubsztrát. Ezzel a megfigyeléssel összhangban, DPH fluoreszcencia anizotrópia méréseinkben azt tapasztaltuk, hogy a Pgp pozitív sejtekben a retinil-acetát eltérő membrán eloszlást mutat a Pgp negatív sejtekhez mérten. Mindazonáltal, megegyező mértékű retinil-acetát indukált citotoxicitást figyeltünk meg Pgp pozitív és negatív NIH 3T3 sejtek esetén. Ez arra utal, hogy mégha a Pgp képes is transzportálni a retinil-acetátot, a Pgp általi aktív efflux mértéke elhanyagolható a retinil-acetát passzív influxához mérten.

Érdekes módon, a 13-*cisz*-retinsav erős gátló hatással bírt a Pgp és ABCG2 ATPáz és transzport aktivitására egyaránt, míg sztereoiszomerjei, pl. az all-*transz*-retinsav (ATRA) vagy a 9-*cisz*-retinsav nem befolyásolták a transzporterek működését. Figyelembe véve a Pgp és ABCG2 rendkívül széles szubsztrát specifitását, a retinoidok hatásaiban tapasztalt sztereospecifikus eltérések igen fontos új információkat szolgáltathatnak a Pgp és ABCG2 szubsztrát felismerésével, és a drog kötés mechanizmusával kapcsolatban. Számos korábbi tanulmány mutatott ki sztereospecifikus eltéréseket Pgp modulátorok különböző izomerjei között. Az egér Pgp korai, nagy felbontású röntgen kristallográfiás szerkezeteiben a QZ59-RRR és QZ59-SSS ciklikus oligopeptidek eltérő módon hatnak kölcsön a Pgp-vel: a QZ59-RRR egy kötő helyen hat kölcsön a szubsztrát kötő zseb centrumában, míg a QZ59-SSS két eltérő helyen kötődik a szubsztrát kötő zsebbel. Hasonló sztereospecifikus különbségeket fedeztek fel a flupentixol Pgp modulátor *cisz* és *transz* izomerjei között is. Habár mind a *cisz*, mind a *transz* flupentixol gátolja a Pgp transzport aktivitását, ellentétes hatással bírnak azonban az ATP hidrolízis mértékére, illetve a Pgp foto

aktiválható szubsztrát [125I]IAAP-általi jelölésére. Összefoglalva, számos korábbi tanulmány azonosított sztereospecifikus eltéréseket a különböző ligandok kölcsönhatásában a Pgp-vel. Ezzel ellentétben, kísérleteinkben megmutattuk, hogy a különböző retinoidok Pgp és ABCG2- általi felismerése sztereoszelektív.

A ligandok sztereoszelektív felismerése megvalósulhat a drog kötő zseb(ek), vagy az allosztérikus hely(ek) szelektivitása révén, illetve indirekt módon a plazma membrán révén, ahonnan a Pgp és ABCG2 a szubsztrátjait felismeri és megköti. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a tesztelt retinoidok nagy mennyiségben akkumulálódnak NIH 3T3 sejtekben, és az akkumuláció mértéke szoros korrelációt mutatott a retinoidok LogP_{ow} értékével. Mivel a különböző retinoid sztereoizomerek hasonló LogP_{ow} értékekkel rendelkeztek, és megegyező celluláris akkumulációt mutattak, így valószínűsíthető, hogy a sztereoizomerek membránon belüli eltérő lokalizációjával magyarázhatóak a tapasztalt különbségek. Ezzel a hipotézissel összhangban, korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a zeaxantin *cisz* és *transz* izomerjei DMPC membránokban eltérő orientációt vesznek fel. Érdekes módon, az eltérő orientációnak megfelelően, a *cisz* és *transz* zeaxantin molekulák eltérően módosították a membrán biofizikai tulajdonságait a membrán különböző rétegeiben, így pl. a membrán hidrofóbicitását, a membrán rendezettségét és a membrán fluiditás értékét. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban, DPH fluoreszcencia anizotrópia méréseinkben kimutattuk, hogy a retinol, a 13-*cisz*-retinsav és a retinil-acetát szelektíven csökkentette a membrán fluiditás értékét a membrán belső, hidrofób régiójában. Ezzel ellentétben, a gátló hatással nem rendelkező retinoidok, így pl. az ATRA vagy a 9-*cisz*-retinsav nem változtatták meg a DPH fluoreszcencia anizotrópia értékeit. Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a különböző retinsav izomerek eltérő transzmembrán orientációt vesznek fel a lipid kettős rétegben. A retinoidok eltérő izoprén lánc hossza, illetve a *cisz* kötés által a molekulában létrehozott törés pozíciója magyarázhatja az izomerek eltérő orientációját a membránban.

Hogy pontosabban megvizsgáljuk a retinoidok kölcsönhatását a transzporterekkel, további kísérleteinkben a retinol és 13-*cisz*-retinsav Pgp és ABCG2 szubsztrát stimulációjának kinetikai paramétereire (K_M és v_{max}) kifejtett hatásait vizsgáltuk ATPáz aktivitás mérésekben. A transzporterek ATPáz aktivitásának stimulációjához jól ismert Pgp (verapamil) és ABCG2 (quercetin) szubsztrátokat alkalmaztunk. Így a retinoid kezelés hatására az ATPáz aktivitás stimulációjának kinetikai paramétereiben létrejövő változások jól reprezentálták a transzporterek szubsztrát kötésében/transzportjában létrejövő változásait. A növekvő koncentrációban alkalmazott retinol hatására megfigyelt növekedés a verapamil és quercetin stimuláció K_M értékében arra utal, hogy a retinol közvetlen kölcsönhatásba lép a Pgp-vel és az ABCG2-vel. A 13-*cisz*-retinsav az ABCG2 quercetin stimulációjának K_M értékét megnövelte, azonban nem változtatta

meg a Pgp verapamil stimulációjának K_M értékét. Továbbá, mind a retinol, mind a 13-*cis*-retinsav lecsökkentette a szubstrátok stimulációjának v_{max} értékét, ami visszavehető a fehérjék non-kompetitív gátlására, vagy alternatív módon a szubstrátok plazma membránban elért csökkent effektív koncentrációjára.

Mint ahogy az korábban olvasható volt, a retinol és természetes származékai piko- és nano moláris koncentrációkat érnek el a humán szövetekben fiziológiás körülmények között, míg kísérleteinkben a retinoidok fél hatásos gátló koncentrációja 20-70 μM között változott. Ez a nagy különbség valószínűtlenné teszi azt az elképzelést, hogy a retinoidok fiziológiás körülmények között gátolnák a Pgp vagy az ABCG2 működését *in vivo*. Azonban retinoid terápia esetén a vérplazmában, vagy orálisan alkalmazott retinoidok hatására a bél epitél sejtekben, a retinoidok koncentrációja nagy mértékben megemelkedhet, ami a fiziológiás barrierekből kifejeződő Pgp és ABCG2 molekulák gátlásához vezethet. A Pgp és ABCG2 működésének retinoidok általi gátlása hatással lehet a retinoidokkal együttesen alkalmazott kemoterápiás gyógyszerek farmakokinetikájára. Ezt figyelembe kell venni a retinoidok terápiás alkalmazása esetén, az esetleges nem várt drog kölcsönhatások elkerülésére.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a különböző retinoid sztereoizomerek eltérő membránon belüli orientációja fontos meghatározója lehet a Pgp- és ABCG2-általi szelektív felismerésüknek.

5.2. A Pgp katalitikus ciklusának vizsgálata ATP-kötő hely mutánsok segítségével

Biokémiai és biofizikai kísérletek, röntgen kristallográfiás szerkezetek és számos krio-elektron mikroszkópos (krio-EM) szerkezet alapján tudjuk, hogy a Pgp az ATP-kötés és hidrolízis nyomán számos konformáció változáson megy keresztül, annak érdekében, hogy lejátszódhasson a szubstrátok transzportja. Az NBD-k általi ATP hidrolízis révén az ATP foszfát kötéseiben tárolt kémiai energia felszabadul. Az ATP hidrolízise az NBD-k elmozdulásával jár, ami az NBD-k és TMD-k közötti kooperáció révén konformáció változásokat idéz elő a TMD-kben. A domének közötti kooperációt számos kísérletes eredmény támasztja alá: i) Pgp kristály szerkezetekben megfigyelhető kölcsönösen összefüggő konformáció változások a TMD-k és NBD-k között, ii) a szubstrát-stimulált ATPáz aktivitás, amely arra utal, hogy a szubstrát kötés hatására a TMD-kben lejátszódó konformáció változások átterjednek az NBD-kre és iii) biokémiai kísérletek melyek megmutatták, hogy a TMD-k szubstrát kötése konformáció változást indukál az NBD-kben. Kísérleteink eredményei alátámasztják azt az elképzelést, hogy a nukleotidok a Pgp konformációjának legfőbb szabályozói, mivel a nukleotid kötés (ATP, ADP vagy ADP + V_i) mutáció függő módon szabályozza a fehérje konformációját, míg nukleotidok hiányában az összes Pgp variáns egyaránt az UIC2-reaktív konformációban található. Élő sejtekben a Pgp konformációjának

elsődleges szabályzója az ATP, mivel az ATP intracelluláris koncentrációja megközelítőleg egy nagyságrenddel nagyobb, mint az ADP koncentrációja és közel tízszer magasabb, mint a Pgp ATP-iránti K_D értéke.

A Pgp két kanonikus ATP kötő hellyel rendelkezik és mindkét kötő hely egyaránt képes az ATP hidrolízisére, és így a transzport ciklushoz szükséges energia biztosítására. A Pgp-vel ellentétben, számos ABC transzporter, mint pl. a CFTR, SUR1 és az ABCB11, csak egy kanonikus ATP kötő hellyel rendelkezik, míg az NBS1-ben az effektív ATP hidrolízishez szükséges „katalitikus glutamát” hiányzik. A „katalitikus glutamát” ATP hidrolízisben betöltött szerepe azonban a mai napig nem teljesen tisztázott. A negatívan töltött „katalitikus glutamát” és az ATP negatívan töltött foszfát csoportjai közötti direkt interakció nem valószínű, nagyobb valószínűséggel közvetett szerepe van az ATP hidrolízisben. A foszfát atomokkal szembeni nukleofil támadás, ami az ATP β és γ foszfátja közötti kötés felszakadásához szükséges, egy a „katalitikus glutamát” hozzájárulásával képződő aktivált OH^- nukleofil segítségével játszódhat le. Amikor a humán Pgp NBS1-ében lévő „katalitikus glutamátot” az ABCB11-hez hasonlóan egy metioninra cseréltük le mutagenézis révén (E556M), egy konformációs csapdázott, transzport inkompetens és ATP-hidrolízisre képtelen fehérjét kaptunk, megerősítve számos korábbi kísérleti eredményt.

Az ABC transzporterek NBD-NBD interface-ének aminosav szekvenciái nagy mértékben konzerváltak, ezzel is utalva az NBD szekvencia motívumok kritikus szerepére az ATP-kötésben és hidrolízisben. Az ABCB11 és Pgp NBD szekvenciáinak összehasonlítása megmutatta, hogy a „katalitikus glutamát” mutációján túl további három aminosav tér el a Pgp és az ABCB11 NBD-NBD interface-ében. A „négyyszeres” mutáns létrehozásával egy olyan Pgp molekulát hoztunk létre, amely fehérjének NBS1-e megegyezik az ABCB11 nem-kanonikus ATP kötő helyével. Feltűnő módon, az E556M mutánssal ellentétben, a négyyszeres mutáns Pgp molekulák visszanyerték konformációs flexibilitásukat, szubsztrát-stimulált ATPáz- és transzport aktivitásukat. Az alábbi adatok azt valószínűsítik, hogy a négyyszeres mutáns Pgp-k képesek elkerülni a nagy affinitású ATP kötést és csapdázódást, ami az E556M „katalitikus glutamát” mutáns esetén megfigyelhető. A négyyszeres mutáns gyengébben köti az ATP-t: molekuláris dinamikai szimulációink megmutatták, hogy a négyyszeres mutánsban a foszfát atomok hidratációja megnövekedett, és jóval nagyobb NBD-NBD szeparáció figyelhető meg (nem bemutatott eredmény). Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a négyyszeres mutáns ABCB11-szerű NBS1-e lehetővé teszi az ATP megkötését, de a megváltozott kölcsönhatások révén megakadályozza az ATP „okklúzióját” és ezáltal az erős ATP-kötődést.

További kísérleteinkben fél- és kétoldali Walker B aszparaginsav és A-hurok tirozin mutáns Pgp variánsok konformációs dinamikáját, ATPáz- és transzport aktivitását vizsgáltuk NIH 3T3 sejtekben.

Korábbi tanulmányokban azt tapasztalták, hogy a Walker B aszparaginsav és az A-hurok tirozin mutációi, függetlenül attól, hogy a mutáció egy vagy mindkét NBS-t érinti, a Pgp inaktivációjához vezetnek. A saját eredményeink megerősítették, hogy a kétoldali A-hurok (Y401A/Y1044A) és Walker B (D555N/D1200N) mutáns Pgp-k nem mutatnak sem ATPáz, sem transzport aktivitást NIH 3T3 sejtekben és az UIC2-reaktív konformációban csapdázódnak MgATP vagy szubsztrát molekulák jelenlétében és hiányában egyaránt.

Érdekes módon azonban, a féloldali A-hurok mutáns fehérjék szignifikáns alap és szubsztrát stimulált ATPáz, illetve transzport aktivitást mutattak, míg a féloldali Walker B aszparaginsav mutáns fehérjék esetén nem tapasztaltunk mérhető ATPáz vagy transzport aktivitást, valószínűleg az alacsony ATP-kötő affinitásuk miatt. Tovább vizsgálva a féloldali Walker B mutáns fehérjék konformációs aktivitását kimutattuk, hogy a kétoldali mutánsokkal ellentétben, a féloldali mutánsok nem csapdázódnak az UIC2-reaktív konformációban, MgATP-függő módon képesek átváltani a UIC2-reaktív „kifelé-nyitott” konformációba, habár a vad-típushoz mérten jóval magasabb ATP koncentrációk mellett. Továbbá, Vi kezelés hatására a látszólagos ATP-kötő affinitásukban egy kb. öt- tízszeres növekedés volt megfigyelhető, utalva arra, hogy képesek az intakt NBS segítségével ATP hidrolízisre. A vad-típusú és a transzport kompetens mutáns Pgp-khez hasonlóan, ATP hidrolízis függő UIC2 disszociációt mutattak NIH 3T3 sejtekben, további bizonyítékként alátámasztva, hogy habár csökkent effektivitással, de képesek számos katalitikus cikluson áthaladni.

Az ABC transzporterek rendkívül érzékenyek membrán mikrokozonyezetükre. A membrán fizikokémiai tulajdonságainak változásai szignifikáns hatással lehetnek a transzporterek működésére. Azon korábbi tanulmányok, melyek leírták a Walker B és A-hurok mutációk inaktíváló hatását, heterológ expressziós rendszereket (pl. Sf9 vagy *Saccharomyces cerevisiae* sejteket), vagy tisztított és rekonstituált fehérjéket alkalmaztak a funkcionális vizsgálatokhoz. A korábbi tanulmányokkal ellentétben, kísérleteinkben a különböző Pgp variánsokat természetes membrán mikrokozonyezetükben, emlős sejtekben vizsgáltuk. A rovar sejtek (pl. Sf9) és alacsonyabb rendű eukarióták (pl. *Saccharomyces cerevisiae*) membránja szignifikánsan kevesebb koleszterint tartalmaz, mint az emlős sejtmembránok. Az ABC transzporterek rendkívül érzékenyek a membrán koleszterin tartalmára, így a heterológ expressziós rendszerekben kifejezett A-hurok és Walker B mutáns Pgp-k funkcionális inaktivitása összefüggésbe hozható membrán kozonyezetük alacsony koleszterin tartalmával.

A négyszeres mutáns Pgp-k funkcionális aktivitásával összefüggő eredményeink megkérdőjelezték azon katalitikus ciklus modelleket, amelyek azt feltételezik, hogy az NBS1 és NBS2 szigorúan váltakozva hidrolizálják el az ATP molekulákat. Ha a két NBS szigorúan alternálva működne, az egy intakt NBS-el rendelkező Pgp variánsok (pl. négyszeres mutáns vagy féloldali A-hurok mutánsok) esetén minden második ATP hidrolízise az inaktív, mutációt tartalmazó NBS-en történne és a katalitikus ciklus megakadását eredményezné. Kísérleti eredményeink továbbá nem támogatják azokat a katalitikus ciklus modelleket, amelyek azt feltételezik, hogy egy második ATP hidrolízise szükséges a második NBS-n ahhoz, hogy a transzporter kilépjen a ciklusból és egy új transzport ciklust indítson el. Mivel, pl. a négyszeres mutáns Pgp egy intakt NBS2 segítségével is képes számos cikluson áthaladni. Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az egy intakt katalitikus centrummal rendelkező Pgp variánsok (pl. féloldali A-hurok mutánsok és a négyszeres mutáns) funkcionális aktivitása azt valószínűsíti, hogy a Pgp két katalitikus centruma véletlenszerűen köteleződik el az ATP hidrolízis irányában.

6. Összefoglalás

Munkánk első részében különböző retinoid származékok, a Pgp és ABCG2 transzport és ATPáz aktivitására kifejtett hatását vizsgáltuk, melynek során az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Egyes retinoid származékok (retinol, 13-*cisz*-retinsav, retinil-acetát) koncentráció függő módon gátolják a Pgp és az ABCG2 transzport és ATPáz aktivitását.

2. DPH és TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia méréseink alapján, a Pgp-t és ABCG2-t gátló retinoid származékok elsősorban a membrán belső, hidrofób rétegében halmozódnak fel és ott lokálisan csökkentik a membrán fluiditását.

3. A retinoidok ABC transzporterek általi felismerését és megkötését befolyásolja membránon belüli elhelyezkedésük.

Munkánk második felében a Pgp két nukleotid-kötő helye közötti funkcionális együttműködést tanulmányoztuk, egy vagy mindkét kötőhelyben mutációt hordozó Pgp variánsok segítségével, azok konformáció változásait és katalitikus aktivitását vizsgálva. Kísérleteink alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. A „katalitikus glutamát” metioninra történő cseréje (E556M) a Pgp N-terminális ATP-kötő helyén, mérhető transzport és ATPáz aktivitással nem rendelkező fehérjét eredményez. Az ABCB11-re jellemző további 3 aminosav szimultán mutációja konformáció változásokra képes és mérhető transzport/ATPáz aktivitással rendelkező fehérje változatot eredményez.

2. Az A-hurok tirozin szimultán mutációja mindkét nukleotid kötő helyen katalitikusan inaktív, konformáció változtatásra képtelen Pgp variáns eredményez, míg a féloldali mutánsok funkcióképesek.

3. A Walker B aszparaginsav szimultán mutációja mindkét nukleotid kötőhelyben katalitikusan inaktív és konformáció változásra is képtelen Pgp variánsokat eredményez. A féloldali Walker B mutánsok képesek ATP kötés és hidrolízis függő konformáció változásokra, azonban mérhető transzport aktivitással nem rendelkeznek.

4. A féloldali A-hurok mutáns és az ABCB11-szerű degenerált N-terminális ATP-kötő hellyel rendelkező Pgp-k funkcionális aktivitása arra utal, hogy egy intakt ATP-kötő hely megléte elégséges a Pgp katalitikus aktivitásához. Eredményeink támogatják azokat a katalitikus ciklus modelleket, amelyek a két katalitikus centrum random elköteleződését feltételezik az ATP hidrolízis irányában.



Nyilvántartási szám: DEENK/337/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

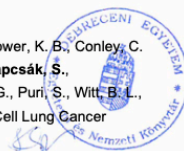
Jelölt: Tarapcsák Szabolcs
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Goda, K., Dönmez-Cakil, Y., **Tarapcsák, S.**, Szalóki, G., Szöllősi, D., Parveen, Z., Türk, D., Szakács, G., Chiba, P., Stockner, T.: Human ABCB1 with an ABCB1-like degenerate nucleotide binding site maintains transport activity by avoiding nucleotide occlusion. *PLoS Genet.* 16 (10), 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1009016>
IF: 5.174 (2019)
2. **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

További közlemények

3. Firouzi Niaqi, E., Van Acker, T., Imre, L., Nánási, P. P. i., **Tarapcsák, S.**, Bacsó, Z., Vanhaecke, F., Szabó, G.: Interactions of Cisplatin and Daunorubicin at the Chromatin Level. *Sci. Rep.* 10 (1), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-57702-7>
IF: 3.998 (2019)
4. Ireland, A. S., Micinski, A. M., Kastner, D. W., Guo, B., Wait, S. J., Spainhower, K. B., Conley, C. C., Chen, O. S., Guthrie, M. R., Soltero, D., Qiao, Y., Huang, X., **Tarapcsák, S.**, Devarakonda, S., Chalisehar, M. D., Gertz, J., Moser, J. C., Marth, G., Puri, S., Witt, B. L., Spike, B. T., Oliver, T. G.: MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell.* 38 (1), 60-78; e1-e12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2020.05.001>
IF: 26.602 (2019)





5. Kiss, A., Ráduly, A. P., Regdon, Z., Polgár, Z., **Tarapcsák, S.**, Sturniolo, I., El-Hamoly, T., Virág, L., Hegedüs, C.: Targeting nuclear NAD⁺ synthesis inhibits DNA repair, impairs metabolic adaptation increases chemosensitivity of U-2OS osteosarcoma cells.
Cancers (Basel). 12 (5), 1-27, 2020.
IF: 6.126 (2019)
6. Biró, A., Markovics, A., Homoki, J., Szöllösi, E., Hegedüs, C., **Tarapcsák, S.**, Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammatory Response.
Molecules. 24 (19), 3427-3441, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24193427>
IF: 3.267
7. Bársony, O., Szalóki, G., Türk, D., **Tarapcsák, S.**, Gutay-Tóth, Z., Bacsó, Z., Holb, I., Székvölgyi, L., Szabó, G., Csanády, L., Szakács, G., Goda, K.: A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein.
Sci. Rep. 6 (24810), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24810>
IF: 4.259
8. Kerényi, F., **Tarapcsák, S.**, Hrubai, E., Baráthné Szabó, Á., Hegedüs, V., Balogh, S., Bági, K., Varga, G., Hegedüs, C.: Fogból eredetű őssejtek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 109 (1), 29-33, 2016.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 53,548

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapján szolgáló közleményekre): 9,296

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

Debrecen, 2020.11.12.

