

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A P-glikoprotein szerkezetének és fehérje interakcióinak vizsgálata keresztkötéses tömegspektrometriával

Dr. Gellén Gabriella

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Bevezetés	7
3.	Irodalmi áttekintés	9
3.1.	Az ABC-kazettás transzporterek	9
3.2.	Az ABCB1/P-glikoprotein (Pgp) tulajdonságai és működése	11
3.2.1.	A Pgp szerkezete és katalitikus ciklusa	11
3.2.2.	A membrán-mikrokörnyezet hatása a Pgp-re	13
3.2.3.	Pgp-t felismerő antitestek	16
3.3.	Fehérjeszerkezet-vizsgáló proteomikai módszerek	17
3.3.1.	A szerkezeti proteomikában használt tömegspektrometriás alapfogalmak	20
3.3.2.	Keresztkötéses tömegspektrometria (XL-MS)	22
3.3.3.	Kovalens jelöléses tömegspektrometria (CL-MS)	27
3.3.4.	Hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS)	28
3.3.5.	Limitált proteolízissel kapcsolt tömegspektrometria (LiP-MS)	29
3.3.6.	Natív és Top-down tömegspektrometria	29
3.3.7.	Ionmobilitás-tömegspektrometria (IM-MS)	30
4.	Célkitűzések	32
5.	Anyagok és módszerek	33
5.1.	Felhasznált anyagok	33
5.2.	Sejttenyésztés	33
5.3.	Monoklonális antitestek előállítása	33
5.4.	Keresztkötés élő sejteken	34
5.4.1.	BS2Gdo/d4 (bisz-szulfoszukcinimidil-glutarát-d0/d4)	34
5.4.2.	DSSO (diszukcinimidil-szulfoxid)	34
5.5.	Gyöngyös keresztkötés	34
5.6.	Membránfehérje preparálás és immunprecipitációs dúsítás	35
5.7.	Western Blot analízis	35
5.8.	Áramlási citometriás mérés	36
5.9.	Tripszines emésztés és LC-MS/MS analízis	36
5.10.	Az adatok kiértékelése és értelmezése	37
5.11.	Molekuladokkolás	38
6.	Eredmények	40
6.1.	Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása transzmembrán fehérjék XL-MS analíziséhez	40
6.1.1.	A keresztkötési reakció körülményeinek optimalizálása és az immunoprecipitáció hatékonyságának ellenőrzése	41
6.1.2.	PNGáz-F kezelés hatása a 15D3 és UIC2 monoklonális antitestek sejtfelszíni kötődésére	43
6.1.3.	Protein G gyöngyök redukív metilezése	45
6.2.	Azonosított mono-linkek a Pgp-n	45
6.3.	Azonosított keresztkötések a Pgp-n	48
6.4.	A 15D3 monoklonális antitest dokkolása a Pgp extracelluláris régióihoz	59

6.5.	A P-glikoprotein fehérjepartnereinek azonosítása keresztkötéssel és immuno-affinitás kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával.....	60
7.	Megbeszélés.....	65
8.	Összefoglalás	71
9.	Summary	72
10.	Irodalomjegyzék	73
11.	Tárgyszavak	86
12.	Köszönetnyilvánítás	87
13.	Függelék.....	88

1. Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP-binding cassette
AMBIC	ammonium bicarbonate
ATP	adenosine triphosphate
BRCP	breast cancer resistance protein
BS2G	bis-sulfosuccinimidyl-glutarate
BS3	bis-sulfosuccinimidyl-suberate
BSA	bovine serum albumin
CDR	complementarity-determining region
CID	collision-induced dissociation
cIM-MS	cyclic ion mobility mass spectrometry
CL-MS	covalent labelling mass spectrometry
CRAC	Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus domains
CCS	collision cross section
CSM	cross-link spectra match
DDA	data-dependent acquisition
DIA	data-independent acquisition
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSBU	disuccinimidyl-dibutyl-urea
DSP	dithiobis-succinimidyl-propionate
DSS	disuccinimidyl-suberate
DSSO	succinimidyl-sulfoxide
DTT	dithiothreitol
ECD	electron-capture dissociation
ECL	extracellular loop
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ER	endoplasmatic reticulum
ESI	electrospray ionization
ETD	electron-transfer dissociation
FPOP	fast photochemical oxidation of proteins
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GO	gene ontology
HCD	higher-energy C-trap dissociation
HDMS^E	high definition MS ^E
HDX-MS	hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry
HPV	human papillomavirus
HRF-MS	hydroxyl radical footprinting mass spectrometry
ICH	intracellular coupling helix
IDP	intrinsically disordered protein
IDR	intrinsically disordered region
IF	inward-facing

IgG	immunoglobulin G
IM.MS	ion mobility mass spectrometry
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
krio-EM	cryo-electronmicroscopy
LC	liquid chromatography
LiP-MS	limited proteolysis-coupled mass spectrometry
mAb	monoclonal antibody
MDR	multidrug resistance
MMTS	S-methyl methanethiosulfonate
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
NBD	nucleotide-binding domain
NBS	nucleotide-binding site
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
nMS	native mass spectrometry
OF	outward-facing
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PDB	Protein Data Bank
Pgp	P-glycoprotein, ABCB1
PhoX	disuccinimidyl phenyl phosphonic acid
PNGáz-F	peptide-N-glycosidase F
PSM	peptide–spectrum match
PTM	posttranslational modification
Q	quadrupole
RIME	rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RMSD	root-mean-square deviation
RT	room temperature
SCX	strong cation exchange
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMALP	styrene maleic acid lipid particles
SPC	spectral count
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TD-MS	top-down mass spectrometry
TFA	trifluoroacetic acid
TMD	transmembrane domain
TMH	transmembrane helix
TX-100	Triton X-100 detergent
WHO	World Health Organization

XL-MS	cross-linking mass spectrometry
--------------	---------------------------------

2. Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján 2020-ban az összes haláleset körülbelül 17 %-a valamilyen rákos megbetegedésből fakad [1]. Az összes rákos megbetegedés mintegy 44 %-a megfelelő prevencióval megelőzhető lenne [2].

A rákos esetek 1 %-a jelentkezik 20 éves kor alatt, melyek oka igen sokszor ismeretlen, nem hozható összefüggésbe genetikailag öröklődő mutációval [3]. Amikor a szervezet saját védekező mechanizmusai már nem elegendőek a mutáns, tumoros sejtek eradikációjához, mindenképp szükségessé válik tudományosan bizonyított terápiás gyógymódok alkalmazása. A rák típusának leginkább megfelelő kezelés kiválasztásához és új terápiás eljárások fejlesztéséhez szükséges a rákos sejtek és az egész kórkép kialakulásában résztvevő sejtek molekuláris biológiai folyamatainak megismerése, a sejteket felépítő fehérjék szerkezetének és interakcióinak feltérképezése.

A terápiás módszerek nagy részét különböző kemoterápiás szerek és azok kombinációja képezi, melyeket sebészeti eljárásokkal vagy sugár- és biológiai terápiákkal kiegészítve gyakran alkalmaznak sikereket elérve. Hagyományos citosztatikumok önmagukban is hatékonyak lehetnek főleg vérképzőszervi daganatok (leukémiák, limfómák) esetén. A rákos sejtek azonban képesek nemcsak a szervezet természetes védekező mechanizmusai során szelektálódni és ellenállóvá válni, de a citosztatikus kezelésekkel szemben is fel tudják venni a küzdelmet. Az úgynevezett multidrog rezisztencia (MDR) során az elváltozott sejtek érzéketlenné válnak számos különböző típusú kemoterapeutikummal szemben. Rezisztenciáért lehet felelős a tumor heterogenitás, a tumoriniciáló sejtek jelenléte, a rákellenes szereket eltávolító intrinzik, vagy mutáció révén kiépített útvonalak, rákos sejtprolifерáció, programozott sejthalált érintő mutációk, tumor mikrokörnyezetében létrejött változások, epigenetikai elváltozások és az immunrendszer kijátszása [4]. A rezisztenciához nagyban hozzájárulnak az transzmembrán ATP-kötő kazetta (*ATP-Binding Cassette*, ABC) transzporterek [5], melyek közül a legtöbbet tanulmányozott az *mdr1* gén által kódolt P-glikoprotein (Pgp) vagy más néven ABCB1, MDR1 fehérje [6], valamint az ABCC1 vagy MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) és az ABCG2 vagy BCRP (mellrák rezisztencia fehérje, *breast cancer resistance protein*). A soktényezős multidrog rezisztencia kialakulásában egyértelműen szerepet játszik a Pgp [7], azáltal, hogy hozzájárul a hidrofób és amfipatikus kemoterapeutikumok eltávolításához [8]. A Pgp prognosztikus faktor is lehet bizonyos tumor típusok esetén, mivel expressziós szintje gyakran korrelál a betegség stádiumával [9].

Ismert, hogy az ABC transzporterek különböző típusú immunsejtekben kifejeződve megváltoztatják a tumor immun-mikrokörnyezetet különböző citokinek transzportja révén, csökkentve a tumor-ellenes immunitást és a rákellenes szerek hatékonyságát [10]. A Pgp fiziológiai állapotban megjelenik számos veleszületett (makrofágok [11], természetes ölüsejtek [12], dendritikus sejtek [13]) és adaptív (naív B-sejtek [14], CD4+ [15] és CD8+ T-sejtek [16]) immunválaszt kialakító sejtben, fontos szerepet betöltve azok érésében, migrációjában és effektor hatásának kialakításában. A Pgp aktivitását módosító kemoterapeutikumok nem célzott alkalmazása tehát befolyásolja a tumort infiltráló sejtek aktivitását, mely hatással lehet a tumorelles terápia kimenetelére [15].

A Pgp funkciójával, szerkezetével és potenciális Pgp működést befolyásoló anyagok fejlesztésével kapcsolatban intenzív kutatások folynak, ám olyan specifikus gátlószert, mely a gyakorlatban terápiásan használható lenne MDR esetén, egyelőre nem találtak. A membránba ágyazott Pgp működésének, molekula-szerkezetének és fehérje interakcióinak vizsgálata tehát esszenciális a multidrog rezisztencia jobb megértéséhez és sikeres kezeléséhez. Azonban a membránfehérjék, így a Pgp kísérletes vizsgálata is nehézségekbe ütközik, mivel szerkezetük és működésük szoros kapcsolatban áll a membránban lévő lipidekkel. Izolációjuk és tisztításuk nehézkes, szerkezetük megváltozik és funkciójukat elveszíthetik a lipid összetétel megváltozása következtében. Nem véletlen, hogy a fehérjeszerkezeti adatbázis (*Protein Data Bank*, PDB) csak körülbelül 2 %-ban tartalmaz információt transzmembrán fehérjéről [17], pedig a fehérjekódoló gének 25 %-a kódolhat valamilyen transzmembrán fehérjét [18]. A plazmamembrán fehérjék pontosabb ismerete segítheti a célzott terápiák fejlesztését, tumormarkerek azonosítását, a membránfehérjék által mediált, rezisztenciáért felelős jelátviteli útvonalak és mechanizmusok megakadályozását. Mindemellett fontos megjegyezni, hogy a nem csak a rák kezelésére használt gyógyszerek 60 %-a céloz valamilyen membrán asszociált fehérjét. Tehát döntő fontosságú olyan kísérleti eljárások kifejlesztése és beállítása, mely lehetővé teszi ezen fehérjék könnyebben kivitelezhető vizsgálatát, optimálisan a fiziológias membránkörnyezet megtartása mellett.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az ABC-kazettás transzporterek

A membrán-transzportfehérjéknek alapvetően négy fő csoportját különböztetjük meg, az aktív pumpa fehérjéket, a csatornafehérjéket, a transzporter fehérjéket és az aquaporinokat. Az ABC transzporterek az aktív pumpa fehérjék közé tartoznak, mivel a különböző molekulák vagy ionok transzportjához az ATP hidrolíziséből származó energiát használják. Az igen ősi ABC transzporterek megtalálhatók prokariótákban és eukariótákban egyaránt [19–21]. Közös jellemzőjük, hogy funkcionális egységük két, konzervált aminosav szekvenciából felépített ATP-kötő kazettával (*ATP-Binding Cassette*, ABC), illetve két alacsony konzerváltságú transzmembrán doménnel (TMD) rendelkezik. A funkcionális egység összeszerelődéséhez szükséges régiók állhatnak különálló polipeptid láncokból, melyet különálló gének kódolnak (féltranszporterek), vagy egy polipeptid láncból, melyet egyetlen gén kódol (teljes transzporterek) [22]. A féltranszporterek összeszerelődhetnek homo- vagy heterodimerként is. A transzport iránya alapján lehetnek exporterek és importerek, funkciójuk szerint pedig három csoportba sorolhatók: (i) pumpálhatnak szubsztrátokat koncentrációgradienssel szemben, (ii) csatornaként ionokat transzportálhatnak, (iii) egy fehérje partner működését szabályozhatják. Az ABC transzporterek alapvető szerkezetük és a TMD-k feltekeredése alapján 7 csoportba (I–VII) oszthatók [23].

A humán genom 49 ABC transzporter génjét tartalmazza, melyeket hét (A-tól G-ig) alcsaládra lehet osztani szekvencia és szerkezeti homológiájuk alapján (**1. ábra**) [24]. Ezek mindegyike a IV-es vagy V-ös szerkezeti csoportba sorolható. Az ABCA és C alcsalád teljes transzportereket tartalmaz, az ABCB család teljes és féltranszportereket is, az ABCD és ABCG alcsalád csak féltranszportereket, az ABCE és ABCF alcsalád pedig csak szolubilis nukleotid kötő doméneket (*nucleotide-binding domain*, NBD) tartalmaz [25]. Az emberi ABC transzporterek többsége exporter pumpa típusú, kivéve a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR, ABCC7) fehérje, mely egy kapuzott Cl⁻ csatorna, a retina-specifikus importer ABCA4, a lizoszomális kobalamin importer ABCD4, és a SUR1, SUR2 fehérjék (ABCC8, ABCC9), melyek ATP-szenzitív K⁺ csatorna működését befolyásolják.



1. ábra: Humán ABC transzporterek filogenetikai fája. A 49 humán ABC transzporter nukleotid szekvenciájának illesztését a MEGA 11 szoftver ClustalW programjával végeztük. A filogenetikai fa felépítéséhez az ML Modellt választottuk a MEGA 11 felhasználásával [26]. Az ábrán az általunk vizsgált ABCB1 transzporter piros kiemeléssel szerepel.

Gén	Név	Felépítés	Szubsztrát
ABCB1	PGP, MDR	T	Drog
ABCB2	TAP1	F	Peptid (ER)
ABCB3	TAP2	F	Peptid (ER)
ABCB4	PGY3	T	PC
ABCB5		F	Drog
ABCB6	MTABC3	F	Fe (KM)
ABCB7	ABC7	F	Fe/S klaszter (BM)
ABCB8	M-ABC1	F	Peptid (BM)
ABCB9	TAPL	F	Peptid (L)
ABCB10	M-ABC2	F	Peptid (BM)
ABCB11	SPGP	T	Epesók

1. táblázat: Az ABCB alcsalád tagjainak szerkezeti és funkcionális összesítése. T: teljes transzporter, F: féltranszporter, ER: endoplazmatikus reticulum, KM: külső mitokondriális membrán, BM: belső mitokondriális membrán, L: lizoszóma, PC: foszfadilkolin.

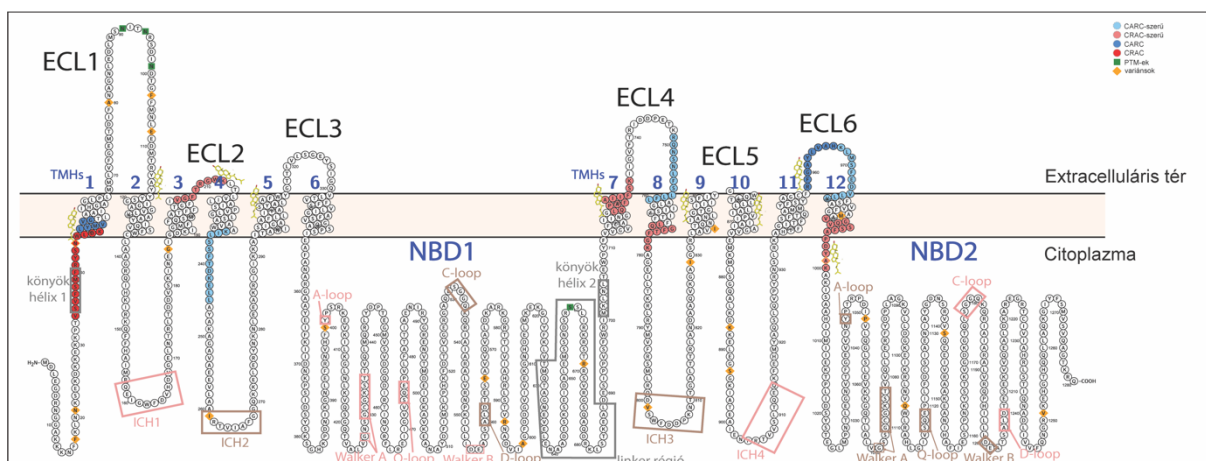
A humán ABCB alcsalád változatos tagjait az **1. táblázat** foglalja össze [27]. Ide tartozik az egyik legrégebb óta tanulmányozott Pgp (ABCB1) is, mely az egészséges szervezetben örökent

védelmezi a sejteket, szöveteket különböző toxikus szerektől. Jellemzően a belső terek és külső környezet határterületein expresszálódik, mint pl. a vér-agy gátban, vér-here gátban, vékonybélhám sejtekben vagy kapillaris endotél sejtekben. Ennek, és promiszkuus szubsztrátspecifitásának köszönhetően sok esetben befolyásolja a különböző betegségekben alkalmazott és gyógyszerfejlesztésben tanulmányozott komponensek abszorpcióját, disztribúcióját, metabolizmusát, exkrécióját és toxicitását (ADME-Tox) [28]. Tumorsejtekben overexpresszálódva pedig hozzájárulhat a multidrog rezisztenciához [7].

3.2. Az ABCB1/P-glikoprotein (Pgp) tulajdonságai és működése

3.2.1. A Pgp szerkezete és katalitikus ciklusa

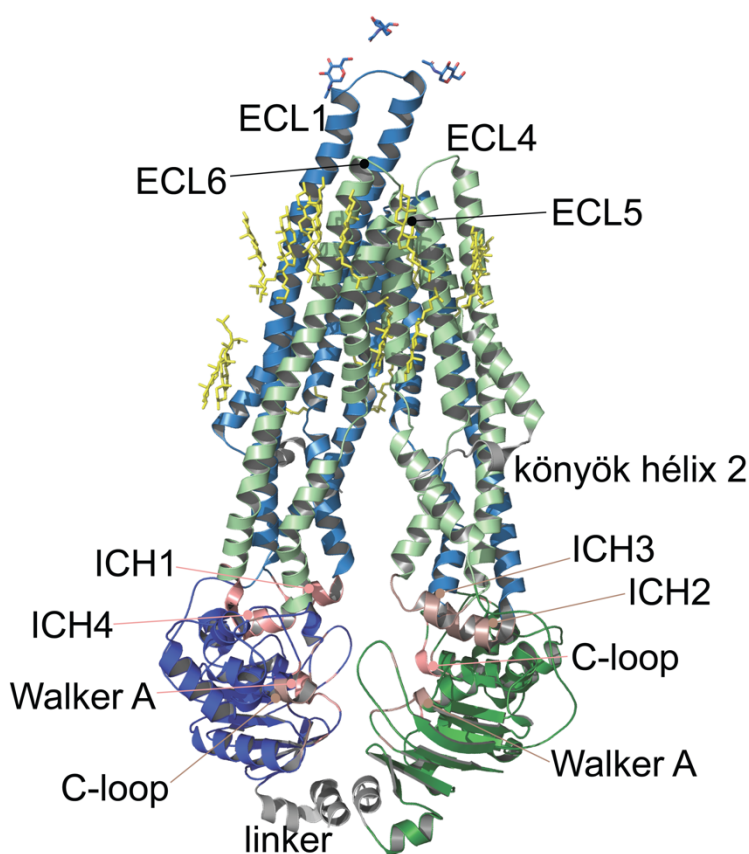
A 170 kDa-os teljes transzporter humán Pgp, 12 transzmembrán hélixet (TMH) tartalmaz, melyek 2 transzmembrán domént (TMD), 6 extracelluláris hurkot (loop) (ECL) formáznak (2. ábra).



2. ábra: A Pgp elsődleges szerkezetének topológiája a Protter szoftver megjelenítésében [29]. A nukleotid-kötő hely 1 (NBS1) régióit rózsaszínnel, míg az NBS2-höz tartozó szekvenciákat barnával emeltem ki. A TMH-eket kék számokkal (1–12), míg a NBD-et kék felirattal jelöltem. Az NBS1-et felépítő szegmenseket rózsaszínnel, az NBS2-höz tartozó régiókat pedig barnával jelöltem. A flexibilis linkert és a könyök hélixeket szürkével jelöltem. A koleszterin felismerő CRAC szekvenciákat a jobb felső sarokban lévő jelmagyarázat szerint színezttem, illetve sárga színű koleszterineket helyeztem oda, ahol a 6qx PDB szerkezetben is azonosítottak koleszterint.

A TMD-k közvetlenül és közvetve is kapcsolódnak az ATP-kötő doménekhez (*nucleotide-binding domain*, NBD). Közvetlen összeköttetés a TMH6 és az NBD1, illetve a TMH12 és az NBD2 alfa-hélixeken keresztül alakul ki. Közvetett, nem kovalens kapcsolódás jön létre a membránból a citoplazmába irányuló 4 intracelluláris kapcsoló hélixek (*intracellular coupling helices*, ICH1-4) mentén [30,31]. Az ICH-k fontos szerepet játszanak a membránban

bekövetkező változások szignáljainak közvetítésében az NBD-k felé, s ilyen módon befolyásolhatják az ATP megfelelő kötődését és hidrolízisét [32]. Az ATP-kötő zsebeket (kazettákat) (*nucleotide-binding site*, NBS) a két szemközti NBD intracelluláris loopjai és hélicei alakítják ki. Az egyik NBD-n lévő Walker régiók, Q-loop és A-loop, a másik NBD-n található D-loop és C-loop (*signature motif*) között alakítja ki az ATP-kötő zsebet, egy vízmolekula és Mg^{2+} interkalációjával. Ezen specifikus ATP kötéshez szükséges régiók szekvenciája evolúciósan konzervált. A fehérje két homológ felét egy rendezetlen kapcsoló régió (linker) köti össze, mely flexibilitása révén könnyen létesít kapcsolatot fehérjepartnerekkel és a Pgp katalitikus ciklusa során összeköttetést hozhat létre a két NBD között [33,34]. Mozgékonyága miatt a linker régió gyakran hiányzik a fehérjeszerkezeti modellekből (**3. ábra**) [35] és különböző konformációs állapotai egyelőre nem tisztázottak [36].



3. ábra: A befele néző humán Pgp terciér szerkezete (PDB: 6qex), annak specifikus szekvenciáinak kiemelésével. A TMD1 (világos kék) összeköttetésben áll az NBD1-el (sötétkék), a TMD2 (világos zöld) pedig az NBD2-vel (sötétzöld) kapcsolódik. Az NBS1-et felépítő szegmenseket rózsaszínnel, az NBS2-höz tartozó régiókat pedig barnával jelöltem. A flexibilis linkert és a könyök héliceket szürkével jelöltem. Az ECL1-en lévő N-glikánok kék színűek, ahol az oxigén atomok piros színűek.

A TMD-k belső üregében, körülbelül a membrán kettős réteg belső lemezének magasságáig, a TMH-k mindegyikének részvételével alakul ki a szubsztrát-kötő zseb, melyben

több helyen is bekötődhetnek a különböző szerkezetű szubsztrátok és inhibitorok [37]. A kötődés kialakításában főként hidrofób interakciók vesznek részt, de bizonyos esetekben specifikus hidrogén kötések részvételét is leírták [38]. A bekötődő szubsztrátok transzportjának mechanizmusával, és a Pgp szerkezetében bekövetkező változások dinamikájával kapcsolatosan számos tanulmányt publikáltak, ám egységes molekuláris modellt még nem sikerült felállítani. Ennek okai a nagyméretű transzmembrán fehérjék kristályosításának nehézségei és izolációjuk során bekövetkező térszerkezetbeli változások. A különböző modellek egy része szerint a két NBD szétválik egymástól ATP hiányában (*ATP-switch model* [39], *processive clamp model* [40]), mások szerint viszont az egész katalitikus ciklus során kontaktusban maradnak (*alternating catalytic sites model* [41], *nucleotide occlusion model* [42], *constant contact model* [43]). Amit biztosan tudunk, hogy szubsztrát kötődés hatására az ATP-hidrolízise fokozódik, és a hidrolízis hatására megtörténik a szubsztrát-transzlokáció; az ICH-k és a konzervált nukleotid-kötő motívumok szükségesek az NBD-k dimerizációjához; a dimerizáció ATP kötődés hatására jön létre; és hogy az ATP hidrolízisét követően a nukleotid kötő zseb nyitott állapotban van [37]. Az egyirányú transzport mechanizmus során az NBD-k, ICH-k és a membrán között szerkezeti jelátvitel történik. Korábbi eredményekkel ellentétben, melyek a Pgp működését annak natív környezetéből kivonva vizsgálták, az újabb, fiziológias körülmények között végzett vizsgálatok szerint egyetlen funkcionális NBS elegendő az ATPáz aktivitáshoz, és szubsztrát-transzportoz [44].

Térszerkezeti modellek alapján a Pgp két fő konformációt vesz fel, a szubsztrát-kötő befele néző (*inward-facing*, IF) konformációt, és a szubsztrát-kiengedő kifelé-néző (*outward-facing*, OF) konformációt. Egy újabb, köztes domináns szerkezet, a pre-hidrolitikus (okkludált) szerkezet alapján a Pgp kifelé és befele is zárt állapotot vesz fel [45]. Szimulációs modellek a Pgp aszimmetrikus konformációs állapotait feltételezik, és az NBD-k *intrinsic* hajlamát aszimmetrikus okkludált formák kialakítására [46]. A fő konformációk mellett számos kisebb és lassabban kialakuló szerkezeti elmozdulást is megfigyeltek, amit főként a membrán és annak lipid összetétele befolyásol [47].

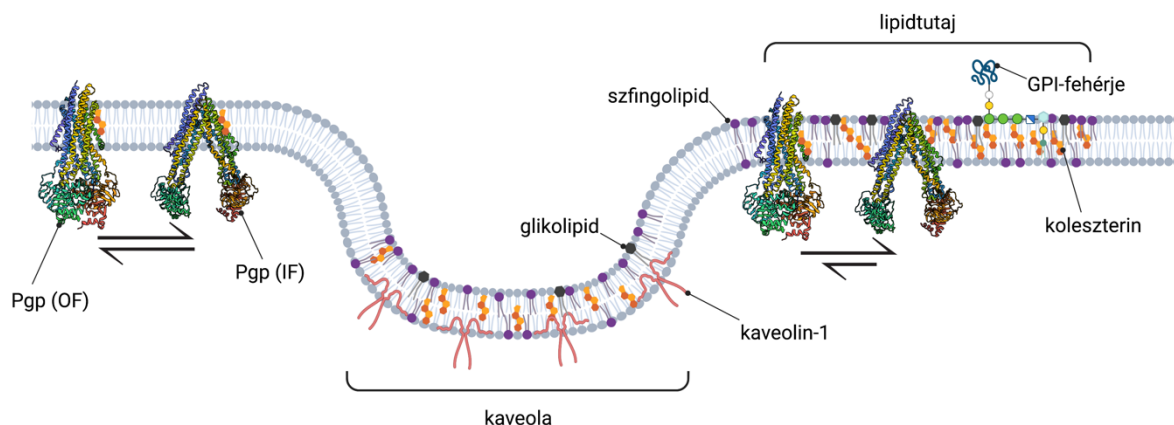
3.2.2. A membrán-mikrokörnyezet hatása a Pgp-re

Az integráns membránfehérjék megfelelő működését és szerkezetét egyértelműen meghatározza a membrán összetétele és fizikai állapota [48]. A Pgp aktivitását befolyásolja a membrán vastagsága [49,50], fluiditása és olvadáspontja [51], és a membránt felépítő lipid komponensek eloszlása [50,52]. A lipid komponensek eloszlását maga a Pgp is befolyásolhatja, hiszen a lipideket és azok származékait „floppáz” mechanizmus révén a lipid kettős réteg külső

lemezébe tudja transzportálni [53]. A membránfehérjék, s a Pgp esetén is a hidrofób transzmembrán régiót körülvevő lipid gyűrű (annuláris lipidek) közvetlenül befolyásolják a fehérje megfelelő működését. A lipidek detergenssekkel való eltávolítása gátolja a Pgp ATPáz aktivitását [32,49]. Ezzel szemben a lipid kettős réteget stabilizáló koleszterin jelenléte a Pgp aktivitásához nem nélkülözhetetlen [54], de módosítja annak alap és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását, drog kötő- és transzportáló képességét, illetve flippáz funkcióit [55–57].

A speciális lipid és fehérje összetételű membrán-mikrodomének, a lipidtutajok (*raft*) és annak egy változata, a kaveolák fontos szerepet játszanak például különböző jelátviteli folyamatokban, membránfehérjék és szubsztrátok transzportjában. Ezen körülbelül 20-100 nm széles struktúrák jellemzően szfingolipidben gazdagok, mely főleg a lipid kettős réteg külső lemezébe koncentrálnak szorosan összekapcsolódva koleszterinnel, mely szoros összerendeződés kialakítja a dinamikus mikrodomén struktúráját. A *raftok* jellemzően inhomogének, külső régiójuk kevésbé struktúrált, míg belső részük kompaktabb. Ezen struktúrák megkülönböztethetők a nemionos Triton X-100 (TX-100) detergenssel való oldhatóságuk alapján. Míg a központi régió TX-100-ban nem oldódik, addig a struktúrálatlan részek oldhatóak, de enyhébb detergenssekkel szemben már ezek is rezisztensek (például Brij96 vagy Lubrol). A kaveolák a TX-100 rezisztens struktúrák közé tartoznak. A Pgp mind *raft* és *nem-raft* membrán-mikrodoménekben megtalálható, s ennek megoszlása sejttípustól függhet, de jellemzően a *raftok* struktúrálatlan, TX-100 oldható frakciójában helyezkednek el [58]. A Pgp kaveolákban nem fordul elő, s a kaveolák befűződését stabilizáló „hajtű-szerű” kaveolinnal nagy valószínűséggel inkább csak közvetett interakcióban van **(4. ábra)**.

A lipidtutajok összerendeződésében és stabilizálásában fontos szerepe van a citoszkeletális fehérjéknek, melyek összeköttetést létesíthetnek membránfehérjék között is, befolyásolva azok működését. A Pgp funkciói és szubsztrátspecifitása a különböző membrán mikrodomének esetén eltérő lehet [59]. Mindemellett laboratóriumunkban korábban azt találták, hogy az UIC2 konformáció-érzékeny antitest (lásd **3.2.3 fejezet**) nagymértékben a *raft*-asszociált Pgp-ekhez kötődik [60,61]. A szubsztrát-kötő, IF Pgp konformer tehát nagyobb mértékben fordul elő a lipidtutajokban.



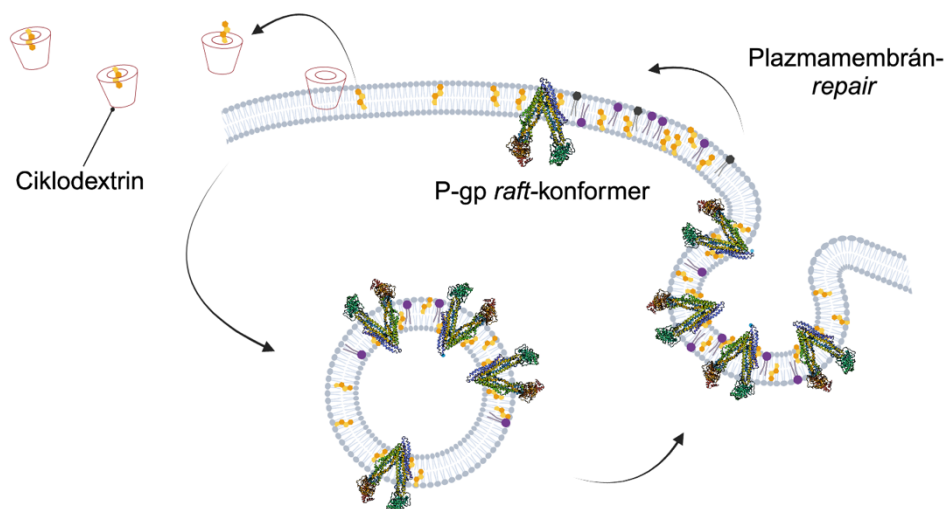
4. ábra: A Pgp előfordulása különböző lipidösszetételű membrán-mikrodoménekben. A Pgp előfordulhat *raft* (lipidtutaj) és nem-*raft* lipid-mikrodoménekben is, kaveolákban azonban nem jellemző. A *raft* régiókban a Pgp dinamikus konformációja a befele néző (IF) irányba tolódik el. A Pgp-hez szorosan kapcsolódó koleszterinek jelenléte jellemző a nem-*raft* doménekben is.

A Pgp szerkezetét és működését a koleszterin nem csak közvetetten, a membrán fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltoztatásával befolyásolhatja, hanem közvetlenül, a Pgp-hez kötődve is [55,62]. Az ABCG2 fehérje esetén specifikus szekvencia-mintázatot mutató koleszterin-kötő doménekhez (*Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus domains*: CRAC, CRAC-szerű, CARC, és CARC-szerű [63]) kötődik koleszterin [64]. Ilyen jellegű szekvenciák az ABCC1 [65] és a Pgp transzmembrán héliceiben és extracelluláris régióin is megtalálhatók (2. ábra), mely régiók nagy részéhez krio-EM kísérletekkel bizonyították a koleszterin kötődését [35].

MDR sejtekben a *raft*-asszociált Pgp-k aránya, sejtípustól függően, körülbelül 22-40 %-az összes Pgp mennyiségnek. Mindemellett, általánosságban elmondható, hogy MDR esetén a *raft*- és kaveola-asszociált fehérjék és lipidek mennyisége emelkedett [66]. Ennek oka lehet, hogy a tumorterápiában alkalmazott kemoterápiás szerek sok esetben megváltoztathatják a membrán lipidösszetételét [67]. A Pgp lipid flippáz funkciója révén stabilizálhatja a membrán mikrodoméneket, bár koleszterin-transzport valószínűleg nem jellemző a Pgp-re [55].

Munkacsoportunk vizsgálatai szerint, a plazmamembrán-koleszterin szintjének csökkenése esetén a *raft*-konformer Pgp szelektív transzportja a plazmamembránba emelkedett MDR sejtekben, a kontroll sejtekhez képest (5. ábra). Az eredmények megerősítik, hogy a Pgp és a kapcsolódó koleszterinek, a sejtek vezikuláris *trafficking* folyamatai (Golgiról lefűződő vezikulák, endoszómák és lizoszómák exocitózisa) révén segítik a membrán javító (*repair*) mechanizmusait, így egy ellenállóbb fenotípust kialakítva MDR esetén [68–70].

Az MDR sejtekre jellemző a membrán lipidösszetételének megváltozása, illetve a koleszterin emelkedett szintje [71], így a Pgp ebből következő szerkezetváltozásainak ismerete segítheti a hatékonyabb gyógyszertervezést, és az MDR sejtekben kifejeződő Pgp specifikus blokkolását.



5. ábra: MDR sejtekben koleszterin kivonás hatására a *raft*-konformer Pgp exocitózisa emelkedett, mely hozzájárul azok nagyobb ellenállóképességéhez. A plazmamembrán koleszterinszintjét és az emiatt kialakuló léziókat, a Pgp-t és annak strukturális koleszterinjét szállító vezikulák emelkedett exportja állítja helyre.

3.2.3. Pgp-t felismerő antitestek

A Pgp szerkezetét és az ECL-ek orientációját gyakran vizsgálják monoklonális antitestekkel (mAb), melyek segítségével lehetséges a Pgp szerkezetváltozásainak követése *in vivo* fiziológias körülmények között [72,73]. Jó néhány mAb kötődik specifikusan a plazmamembrán Pgp-k extracelluláris epitópjaihoz (pl. 15D3, UIC2, MRK16, 4E3, MM4.17) [74–79].

Az antitestek általában az összes sejtfelszíni Pgp-t képesek jelölni, függetlenül annak fő konformációs változásaitól. Azonban a konformációs epitópot felismerő UIC2 IgG_{2a} mAb az ATP-hiányos, szubsztrát kötő IF konformációt részesíti előnyben. Az UIC2 nem egybefüggő epitópját az 1., 3. és 4. ECL-en lévő régiók állítják össze, melyek az IF konformációban közel kerülnek egymáshoz [44,61]. Szubsztrát hiányában az UIC2 a sejtfelszíni Pgp-k körülbelül 10–40 %-át jelöli (*Pool 1*), szubsztrátkötődés hatására viszont az összes fennmaradó Pgp is jelölődik (*Pool 1 + Pool 2*). Ez az ún. *UIC2 shift* jelenség tehát a több kötőhely kialakulása miatt jön létre, mely akár 10-szeresére is emelheti a kötőhelyek számát [80].

A Pool 1 és Pool 2 sejtfelszíni Pgp-eket egyaránt jelölő 15D3 IgG₁ mAb kötődési affinitása β -ciklodextrinekkal való koleszterin kivonás hatására csökken [62]. Ennek oka, hogy a Pgp-hez szorosan kapcsolódó szerkezeti koleszterinek szükségesek az ECL-ek azon orientációjának megtartásához, melyet a 15D3 antitest felismer. A 15D3 antitest epitópját, és a koleszterin-érzékeny ECL-eket korábban még nem határozták meg. Mint ahogyan a fent említett antitestek közül sok kompetícióban van egymással a kötőhelyekért, úgy a 15D3 és az UIC2 is, tehát feltételezhetően epitópjaik részben átfednek. Ezt bizonyítja munkacsoportunk azon eredménye, miszerint Pgp-szubsztrát, pl. ciklosporin A jelenlétében a transzportert expresszáló MDR sejteket UIC2-vel előinkubálva csökkent a 15D3 kötődési affinitása [62]. Mindemellett, az UIC2 kötődését a koleszterin kivonás nem befolyásolja, illetve korábbi kísérleteink alapján a 15D3 kötődési helye is konformációs epitóp, azaz nem egy egybefüggő peptidszakasz.

Tehát a 15D3 a teljes katalitikus ciklus során képes kötődni a Pgp-hez, míg az UIC2 inkább az IF szerkezetet kedveli, amikor az 1. és 4. ECL közel vannak egymáshoz. Szerkezeti adatok alapján az 1. és a 6. ECL a teljes katalitikus ciklus során közel marad egymáshoz, illetve az 1. ECL részben átfed az UIC2 antitesttel, tehát felmerül a lehetősége annak, hogy a 15D3 ezekhez a régiókhoz kötődik. Ennek kísérletes bizonyítása disszertációm fő célja.

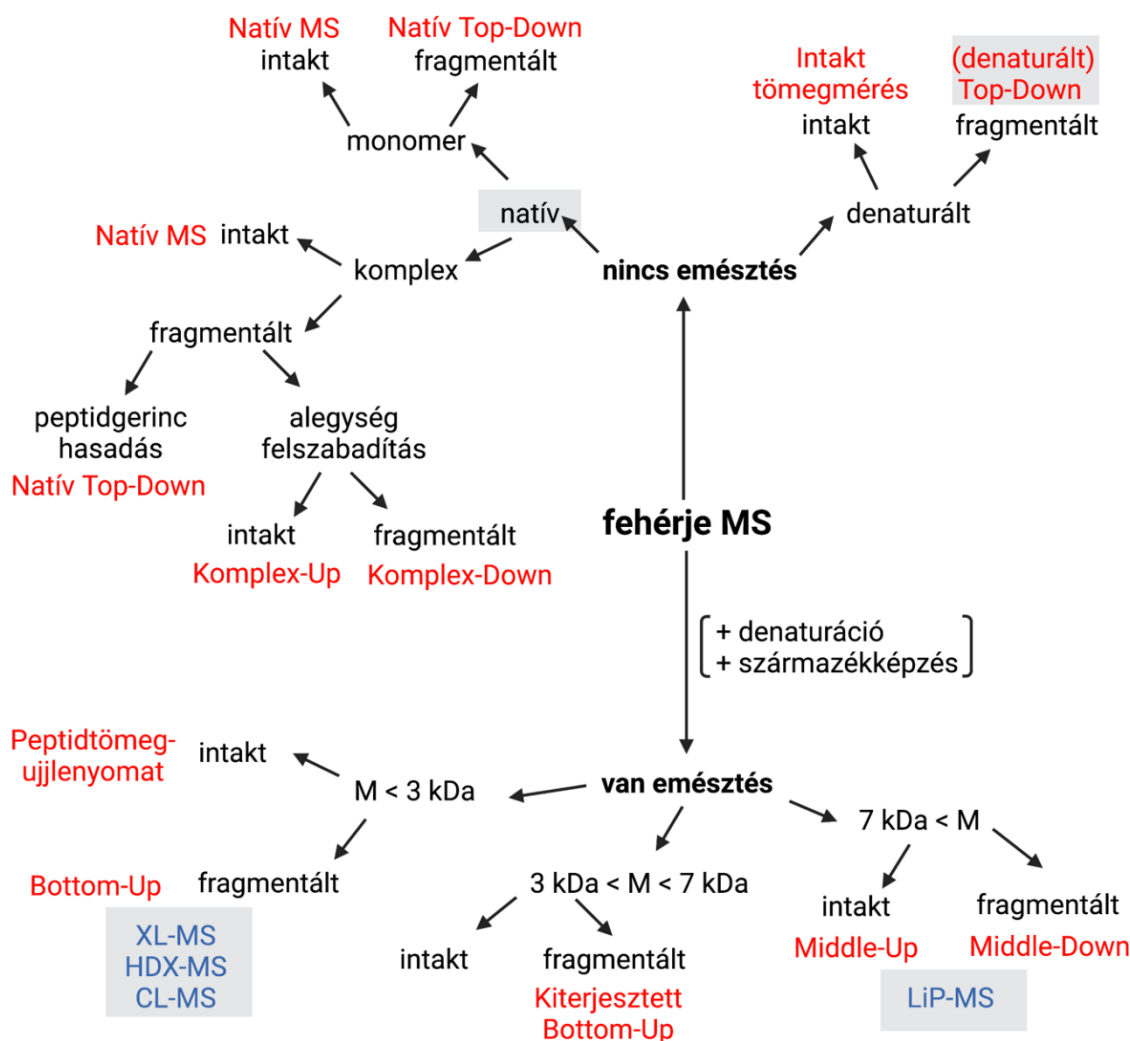
3.3. Fehérjeszerkezet-vizsgáló proteomikai módszerek

A fehérjék 3D szerkezetének vizsgálatára leggyakrabban fehérjekrisztallográfiai módszereket alkalmaznak, ám ezekkel a módszerekkel a membránfehérjék, illetve a rendezetlen fehérjék (*intrinsically disordered protein*, IDP) vagy rendezetlen régiót (*intrinsically disordered region*, IDR) tartalmazó fehérjék csak nehezen, vagy egyáltalán nem vizsgálhatók. Ennek oka, hogy a membránfehérjék amfipatikusak, és eredeti szerkezetük megtartásához a fiziológiai membránkörnyezet szükséges. Tisztításuk és analízisük ilyen módon kihívásokkal teli. Az IDP és IDR fehérjék nem kristályosíthatóak, így röntgendiffrakciós vizsgálatuk nem lehetséges. Mozgékonyáguk miatt ezen fehérjék térszerkezete konformációs sokaságként jellemezhető, vizsgálatuk krio-elektronmikroszkópiával (krio-EM) és NMR-spektroszkópiával is nehézkes, a rendezetlen régiók gyakran hiányoznak is a szerkezeti adatokból. A fehérjék szerkezetének és mozgásának leírásában egyre fontosabb szerepet töltenek be az elméleti számítások és predikciók. A neurális hálózaton alapuló AlphaFold (DeepMind) [81] gépi tanulási algoritmusai lehetővé teszi olyan fehérje típusok (mint például a membránfehérjék)

szerkezetének megbízható jóslását is, melyek a betanításra felhasznált adatbázisban nem voltak jelen [82]. Azonban a flexibilis régiók analízise ezen algoritmusokkal továbbra is limitált és több kísérletesen meghatározott adatra van szükség ahhoz, hogy megfelelő térszerkezeteket tudjunk generálni. Ilyen információkat nyerhetünk például az alábbiakban részletezett szerkezeti proteomika módszereivel.

Az utóbbi 30 évben a tömegspektrometria (*mass spectrometry*, MS) folyamatos fejlődése révén egyre több lehetőség nyílik a fehérjék nemcsak elsődleges, de másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetének vizsgálatára is ezen módszerrel. Tömegspektrometriás vizsgálathoz nem szükséges a fehérjeminta fagyasztása vagy kristályosítása és a fehérje mérete általában nem korlátozza az analízist (főleg a bottom-up módszerek esetén lásd alább) [83]. Natív MS alkalmazásával a konformációs sokaságok elkülöníthetőek egymástól, tehát nem csak sokaságátlagot tudunk vizsgálni [84], lehetséges a konformációs állapotok közötti átmenetek és a fehérje mozgásának követése, illetve különböző ligandumok, lipidek vagy fehérje partnerek kötőhelye és a kötődés dinamikája is leírható tömegspektrometriás módszerekkel [85–89]. A tömegspektrometriás fehérje-térszerkezet vizsgálati eredmények kiválóan alkalmasak a hagyományos szerkezeti biokémiai módszerek kiegészítésére, betekintést nyújtva a fehérjék olyan tulajdonságaiba, melyeket hagyományos módszerekkel nem tudunk detektálni.

A proteomika tudománya egy adott időpillanatban expresszált fehérjék vizsgálata változatos módszerekkel, egy adott fehérjekomplexben, sejtservecskében, sejtben, szövetben, szervben vagy szervezetben. Nagy mennyiségű fehérje vizsgálatában alapvető fontosságú a tömegspektrometria módszere. Sokféle kísérletes megközelítés létezik a fehérjék tömegspektrometriás vizsgálatára, melyeket a **6. ábra** összesít. A bottom-up (alulról felfelé irányuló építkezés) módszerek során a fehérjéket először enzimatisz emésztéssel kisebb peptidekre daraboljuk, majd ezután LC-MS/MS analízissel vizsgáljuk azok szekvenciáját, és adott adatbázisok alapján azonosítjuk a peptideknek megfeleltethető fehérjét. A top-down (fentről lefelé irányuló elemzés) megközelítések esetén a teljes fehérjét mérjük tömegspektrometrián, s a fehérje fragmentációjával megállapítható annak aminosav szekvenciája. A következő fejezetekben röviden bemutatom, hogy a különböző proteomikai módszerek hogyan használhatók membránfehérjék, illetve IDR vagy IDP fehérjék szerkezetének elemzéséhez.



6. ábra: Fehérjék tömegspektrometriás vizsgálatához alkalmazott megközelítések. Fehérjé-térszerkezet meghatározásra leggyakrabban használt módszereket szürke háttérrel emeltem ki. A natív tömegspektrometriás módszerek információt nyújtanak ligand, lipid, vagy más fehérje partnerekkel való kölcsönhatás sztöchiometriájáról, a Top-Down módszerek (Natív Top-Down, Komplex-Down, denaturált Top-Down) (3.3.6 fejezet) pedig a proteoformákról is. A keresztkötéses tömegspektrometria (*cross-linking mass spectrometry*, XL-MS) (3.3.2 fejezet) segítségével meghatározhatunk aminosav reziduumok közti távolságot, illetve azok hidrofóbicitását. A hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometriás (*hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*, HDX-MS) (3.3.4 fejezet) és a kovalens jelöléses tömegspektrometriás (*covalent labelling mass spectrometry*, CL-MS) (3.3.3 fejezet) módszereket a fehérjék dinamikus mozgásának és oldószer hozzáférhetőségének vizsgálatához alkalmazzák. A nem denaturáló közegben történő részleges proteolízisen alapuló Middle-Up és Middle-Down technikákkal felderíthetők a fehérje felszínén lejátszódó változások, különböző körülmények, interakciók hatására. A limitált proteolízissel kapcsolt tömegspektrometria (*limited proteolysis-coupled mass spectrometry*, LiP-MS) (3.3.5 fejezet) módszer a Middle-Up és Bottom-Up módszerek keveréke, mely lehetővé teszi a fehérjék szerkezetváltozásainak *in situ* vizsgálatát. Mindezeket a módszereket kiegészítheti és fehérjeszerkezeti ismereteinket bővítheti az ionmobilitás elválasztás (ionmobilitás-tömegspektrometria, IM-MS) (3.3.7 fejezet).

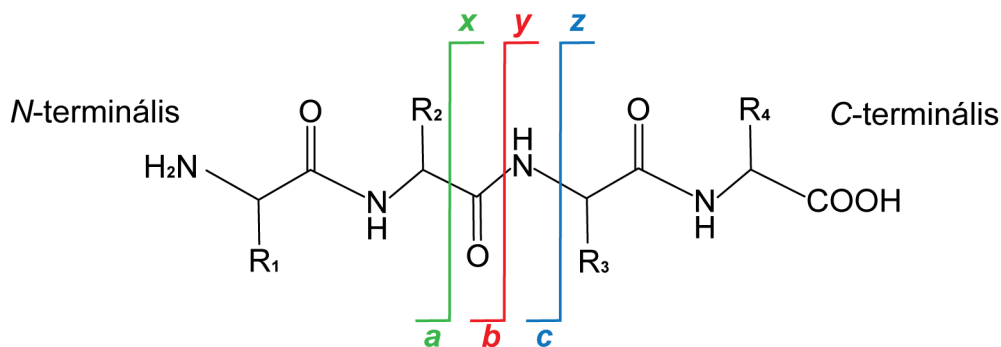
3.3.1. A szerkezeti proteomikában használt tömegspektrometriás alapfogalmak

A tömegspektrometriás analízis során ionizált molekulákat tömeg/töltés (m/z) értékük szerint elválasztjuk, majd a detektorba érkezett jel alapján kiszámítható azok mennyisége (intenzitása) és molekulatömege. Proteomikai vizsgálatok során jellemzően összetett mintákat vizsgálunk, így a molekulákat tömegspektrométerbe való érkezésük előtt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) vagy ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (UHPLC) szokás elválasztani. Folyadékkromatográfiához való kapcsolhatósága és jobb reprodukálhatósága miatt proteomikában leggyakrabban alkalmazott ionizációs technika az elektroporlasztásos ionizáció (*electrospray ionisation*, ESI) [90], valamint ennek nanoáramlásos változata (nanoESI). Az ESI-t jellemzően pozitív módban használva a peptidok és fehérjék többszörös pozitív töltést hordoznak ($[M+nH]^{n+}$).

Az intakt tömegspektrometriás mérések esetén az ionizációt követően további fragmentáció nélkül az ionokat tömeg szerint elválasztjuk és detektáljuk (MS1). Tandem tömegspektrometria (MS/MS) esetén az ionizáció után műszertől függően jellemzően kétféle adatgyűjtési módszert használhatunk. Az adat-függő adatgyűjtés (*data-dependent acquisition*, DDA) esetén intenzitás alapján kiválaszthatunk egy iont, melyet szekvenálni szeretnénk és csak ezt az iont gerjesztjük, majd az így kapott fragmenseket m/z értékük szerint szétválasztjuk. Az előre beállított kiválasztási paraméterek alapján az ionok szelektálása és fragmentálása mérés közben automatikus. A prekursor ion szelekciót kvadrupól szűrővel vagy ioncsapdában végezhetjük. Kvadrupól (Q) szűrő esetén az elektródokon alkalmazott elektromos erőter beállításával szabályozzuk, hogy az elektródok között mely fragmensek haladjanak át a tömegspektrométer további térrészeibe (térbeli tandem tömegspektrometria) [91]. Ioncsapda esetén, az elektródokra kapcsolt megfelelő feszültségek alkalmazásával csak az általunk kiválasztott, adott m/z értékű ionok maradnak az ioncsapdában, majd itt kerülnek fragmentációra (időbeli tandem tömegspektrometria) [92]. Az ioncsapda típusú analizátorok felhasználásával, illetve hibrid készülékekben (többféle tömeg analizátor kapcsolásával) a keletkezett fragmenseket tovább hasíthatjuk (MS^n). A másik adatgyűjtési módszer az adatfüggetlen adatgyűjtés (*data-independent acquisition*, DIA), mely során nincs prekursor ion szelekció, hanem minden jelen lévő prekursor ion fragmentálásra kerül. Ennek előnye, hogy nem csak a legintenzívebb prekursor ionokról készül MS/MS spektrum, hanem a kevésbé abundáns ionokról is. Komplex, keverék minták esetén gyakran előfordulhat, hogy pont az általunk keresett ion nem kerül MS/MS fragmentálásra, mert az intenzitása nem éri el a DDA

módszer esetén beállított küszöb értéket. A DIA során készült adatok elemzése azonban bonyolult, és speciális szoftvereket igényel.

Az egyik legelterjedtebb MS/MS fragmentációs technika az ütközésindukált disszociáció (CID), ahol az ionokat elektromos erőterben felgyorsítva (*beam-type*) vagy rezonanciagerjesztéssel (*trap-type*) aktiválják, ezáltal megnövekszik kinetikus energiájuk és a csapdát kitöltő inert gázzal való ütközés hatására a peptidváz amidkötéseinél elhasadnak, így jellemzően *b* és *y* típusú ionok keletkeznek (7. ábra). A CID bár gyors és hatékony módszer, a poszttranszlációs módosításokról (PTM) és különböző proteoformákról a fragmentáció során gyakran információt veszítünk, azok lehasadása miatt. Ilyen esetekben érdemes valamelyik elektronbefogásos technikát alkalmazni, ahol a prekursorionok vagy elektronnyalábbal (ECD, *Electron-Capture Dissociation*, elektronbefogásos disszociáció) vagy anionokkal (fluorantén anion, 1,4-dicianobenzol) ütközve elektront vesznek fel (ETD, *Electron-Transfer Dissociation*, elektrontranszfer disszociáció), és az amidkötés nitrogénje és az α -szén közötti kötés elhasadásával *c* és *z* típusú ionok keletkeznek (7. ábra) [93]. Ezen utóbbi technikák bár kevésbé hatékonyak és inkább nagyobb töltésű ionokat lehet így fragmentálni, mivel elsősorban a peptidgerinc hasad el és az oldalláncok, PTM-ek pedig nem, így lehetőséget nyújt azok detektálására és szekvenciában való elhelyezkedésük azonosítására.



7. ábra: Különböző fragmentációs módszerek során keletkező ion típusok. Fragmentációs technikától függően, egyszeres kötéshasadással *a*, *b* és *c* ionok keletkezhetnek az *N*-terminális felől, illetve *x*, *y* és *z* ionok a *C*-terminális felől.

A modern proteomikában és a fehérje-térszerkezetek vizsgálatát célzó kísérletekben leggyakrabban hibrid műszereket alkalmaznak, jellemzően a nagyfelbontású Orbitrap (pl. Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer) és kvadrupóllal kapcsolt repülési idő analízátor (QTOF) (pl. Waters SELECT SERIES Cyclic IMS) típusú készülékeket.

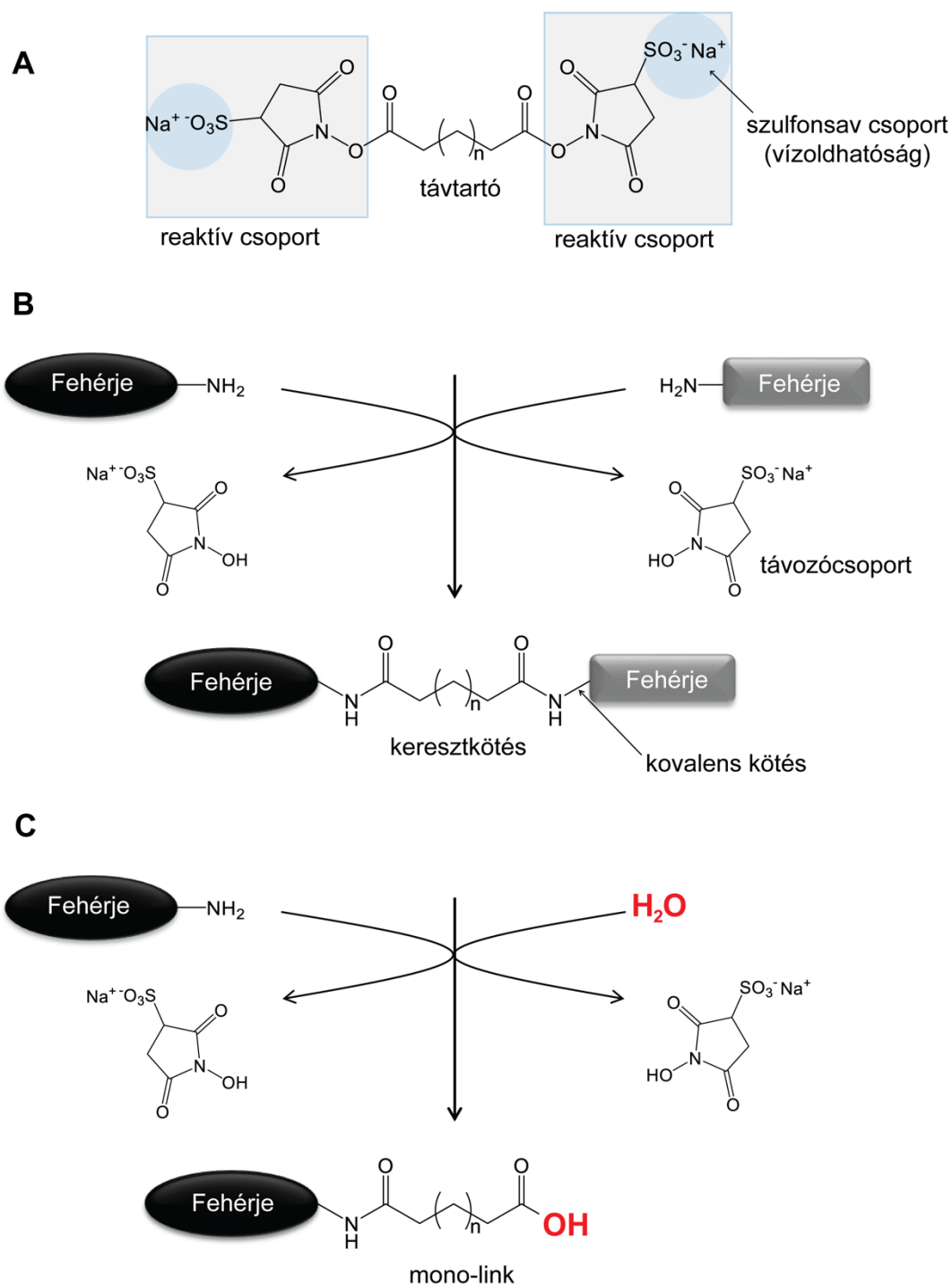
A tömegspektrométer által rögzített spektrumok kiértékelése rendszerint szoftverek segítségével történik. Az algoritmusok leggyakrabban úgy működnek, hogy az általunk megadott adatbázisban lévő fehérjéken *in silico* proteolízist és az így keletkező elméleti

prekurzorokon *in silico* fragmentációt végeznek. Ezeket az elméleti adatokat hasonlítják össze a ténylegesen mért spektrumokkal, és különböző statisztikai próbák és fals pozitív érték (*false discovery rate*, FDR) számításával azonosítják azt a peptidet, mely az adott mért spektrum adataihoz leginkább illeszkedik.

3.3.2. Keresztkötéssel tömegspektrometria (XL-MS)

Az utóbbi években az XL-MS technika a hagyományos fehérje-tér szerkezet vizsgáló eljárások (például röntgendiffrakció, NMR-spektroszkópia) széles körben bevett kiegészítő módszerévé vált, különösen a nehezen vizsgálható fehérjék, mint a membránfehérjék, vagy az IDP és IDR fehérjék esetén. A keresztkötési reakció jellemzően fiziológiai körülmények között zajlik *in vitro* izolált fehérjén oldatban, gélben [94] vagy immunprecipitációs gyöngyön [95], de *in vivo*, élő sejtekben [96,97], szövetekben [98] is lehetséges. A keresztkötő molekulák kovalens kötést alakítanak ki két, egymáshoz megfelelő közelségben lévő aminosav oldallánc között. Ezután a fixációs lépés után, a kialakított kötés stabil marad az akár erélyes mintapreparálási lépések alatt és a tömegspektrométerben történő ionizáció során is. A kémiai keresztkötő ágensek általában két reaktív csoportot tartalmaznak, amelyeket egy meghatározott hosszúságú ún. távtartó rész (*spacer*) kapcsol össze (8. ábra A). A távtartó hossza információt szolgáltat egy fehérjén belül lévő vagy különböző fehérje-fehérje partnerek adott aminosav oldalláncai között lévő távolságról (*distance constraint*). A fehérje polipeptidláncán keresztkötött aminosavakat ezután jellemzően bottom-up proteomikai megközelítésekkel határozzák meg, tehát származékképzés (denaturálás, redukálás, alkilálás) és enzimatiszta emésztést követően LC/ESI-MS/MS technikával történnek a mérések.

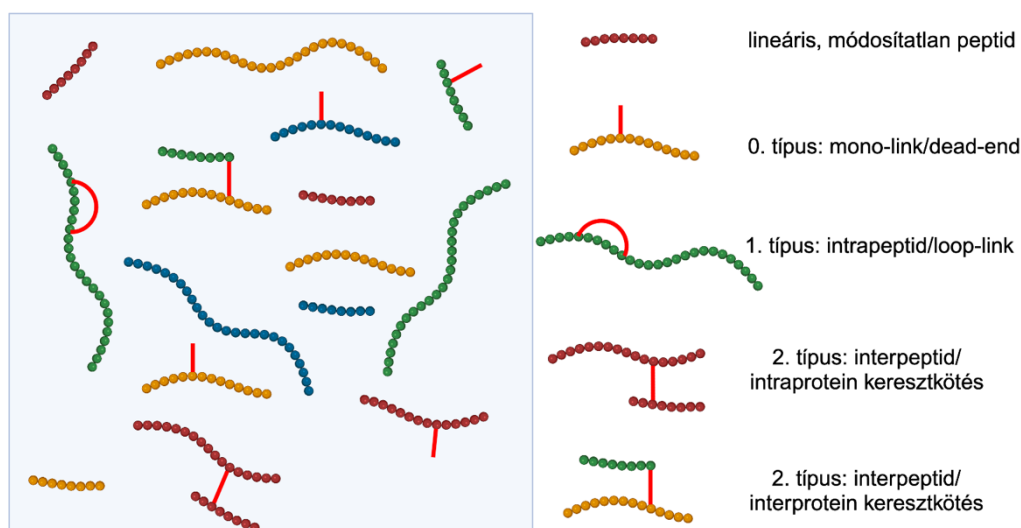
A keresztkötő ágensek célpontjai lehetnek például szulfhidril (cisztein), karboxil (aszparaginsav, glutaminsav) vagy amino (lizin) csoportok. A leggyakrabban használt keresztkötők az amin-reaktív N-hidroxisukcinimid (NHS) észterek, amelyek elsősorban a lizin oldalláncok ϵ -nitrogénjét célozzák (8. ábra B). Kisebb mértékben reagálhatnak szerinnel (12.5 %-a az összes reaktív csoportnak) tirozinnal (4.3 %) és treoninnal (3 %) is [99,100], azonban saját kísérleti tapasztalataink alapján ezen reakciók gyakorlatilag elhanyagolhatók. Az XL-MS-sel foglalkozó kutatók közösségének javaslata szerint ezen reakciókat érdemes figyelmen kívül hagyni a számítógépes lekeresés során, ha a mintánk összetett és a mért tömegspektrumok sok adatot tartalmaznak, így csökkentve az adatkiértékelés számításigényét és a fals pozitív találatok mértékét [101].



8. ábra: Az NHS-észter típusú keresztkötők szerkezete (A) és reakciói (B,C). (A) Az NHS-észter típusú keresztkötők jellemzően két szukcinimidil észter reaktív csoportot tartalmaznak, melyeket adott hosszúságú távtartó köt össze. A vízoldható keresztkötők két szulfoszukcinimidil észter csoportot tartalmaznak. (B) Két lizin oldallánc aminoscsoportja közötti keresztkötés kialakulása során peptidkötés jön létre az ϵ -nitrogén és a keresztkötő karbonilsocportja között, az N-hidroxi-szukcinimid vagy N-hidroxi-szulfo-szukcinimid távozása mellett. (C) A vizes közegben gyakran előforduló mono-linkek úgy alakulnak ki, hogy a keresztkötőnek csak az egyik vége alakít ki peptidkötést, míg a másik vége elhidrolizál.

A keresztkötési reakció hatékonysága körülbelül 1-5 % [102] és az egymáshoz képest megfelelő távolságban lévő lizin oldalláncok mennyisége is limitált [103,104]. Tehát a minta

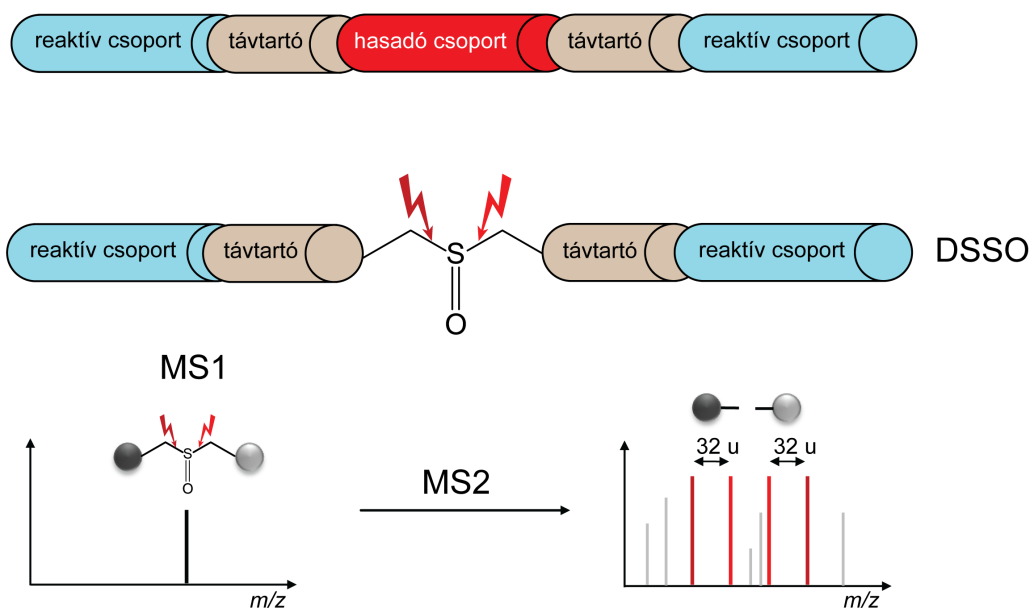
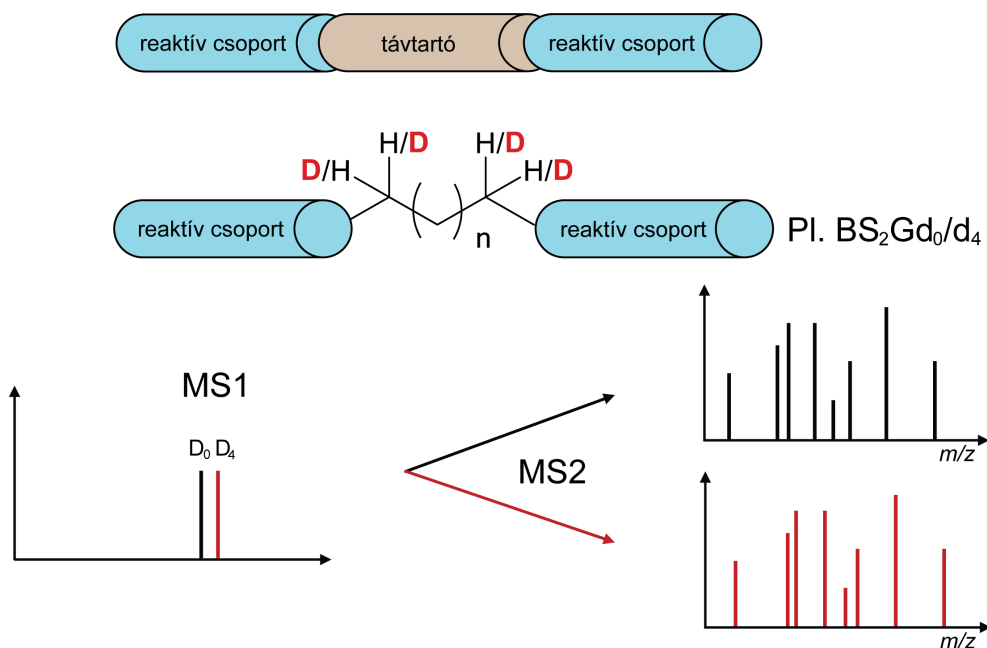
jelentős hányada módosítatlan peptideket tartalmaz, illetve a keresztkötési reakció során keletkező egyéb termékeket (9. ábra). Nagy számban fordulnak elő, az ún. mono-linkek, melyek úgy jönnek létre, hogy a keresztkötőnek csak az egyik vége reagál a fehérje egy lizin oldalláncán, a másik vége jellemzően a vizes közegben elhidrolizál (8. ábra C), vagy a reakciót leállító (*quench*) pufferrel (pl. Trisz, glicin) elreagál. Az NHS-észterek féléletideje 7-es pH-n körülbelül 1 óra, azonban 8-as pH-n már csak 15-20 perc körül van [105]. A mono-linkek hasznos információt szolgáltathatnak a fehérje hidrofíl régióiról, és hogy mely lizinek a leginkább reaktívak [106]. Ritkábban fordulnak elő az egy peptiden belül kialakuló intrapeptid keresztkötések (loop-link), ezek jellemzően α -hélix vagy hurkok esetén képződnek. Keresztkötéseket továbbá megkülönböztetünk az alapján is, hogy egy fehérjén belül (intraprotein) vagy két különböző fehérje között (interprotein) alakultak-e ki.



9. ábra: A keresztkötési reakció során képződő termékek. Jellemzően csak kisebb számban keletkeznek módosított peptidek, ezek közül is a leggyakoribb a mono-link. Intrapeptid és interpeptid keresztkötéseket csak 1-5 %-ban nyerünk.

A kereskedelemben számos különböző oldhatóságú és hosszúságú NHS-észter keresztkötő létezik, melyek egymást kiegészítő információkat szolgáltatnak a fehérje szerkezetéről [107,108] A leggyakrabban használt vízdékony keresztkötők közé tartozik a BS3 (bisz-szulfoszukcinimidil-szuberát, 11.4 Å) és a BS2G (bisz-szulfoszukcinimidil-glutarát, 7.7 Å). Általánosan használt, nem vízdékony reagensek a BS3 szulfonsav nélküli származéka, a DSS (diszukcinimidil-szuberát), DSP (ditiobisz-szukcinimidil-propionát, 12.0 Å), illetve a 0 Å hosszúságú (*zero length*) EDC ((1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid)hidroklorid) [109]. Az EDC az aszparaginsav vagy glutaminsav karboxil csoportját alakítja át úgy, hogy peptidkötés alakuljon ki egy közelben lévő lizinnel.

A fent említett keresztkötők, a nem hasadó keresztkötők közé tartoznak, mert gázfázisban történő fragmentáció esetén (CID) csak magasabb elektromos feszültség mellett fragmentálódnak. Az NHS-észterekről leírták, hogy a keresztkötő – lizin amidkötés mentén hasadnak el, jellegzetes fragmentációs csúcsokat adva, melyek segíthetik az azonosítást [110]. Azonban ilyen keresztkötések esetén az MS/MS spektrum mindkét keresztkötött peptid, plusz a linker fragmentjeit tartalmazza, ami így négyzetesen növeli a lekeresési teret (n^2 probléma), jelentősen fokozva ezzel a kiértékelés számításigényét és a hibás azonosítások valószínűségét [111]. Annak érdekében, hogy a lekeresési tér ne növekedjen négyzetesen (n), kifejlesztették a hasadó keresztkötőket, melyek a peptidgerinc hasadásához szükséges feszültségnél alacsonyabb feszültségértékeken fragmentálódva jellegzetes szignál spektrumokat adnak [112]. A leggyakrabban használt DSSO (diszukcinimidil-szulfoxid) például MS2-ben fragmentálva 2 intenzív szignál ionpárt ad 32 Da eltolódással (**10. ábra A**). A jelző ionok alapján, arra alkalmas tömegspektrométerben, kiválaszthatjuk a peptidpár egy-egy tagját, majd ezeket tovább fragmentálva MS3-ban már csak egy peptid darabjai lesznek egy spektrumon belül (n lekeresési tér). Mivel mindehhez speciális műszer szükséges, mely nem érhető el mindenhol széles körben, olyan keresztkötőket is szintetizáltak (pl. DSBU, diszukcinimidil-dibutiril-urea) [113], melyek a peptidgerinc hasadásához szükséges feszültség értékek mellett adnak intenzív jelző ionokat, melyek segítik a szoftveres kiértékelést és a lekeresési teret algoritmusok segítségével csökkentik [114,115]. Szintén az egyértelmű keresztkötés-azonosítás érdekében használnak olyan keresztkötőket, melyeket deutériummal jelölnek. Így a jelölt és jelöletlen keresztkötőt 1:1 arányban adva, karakterisztikus tömegeltolódást kaphatunk az MS1 és MS2 tömegspektrumokban (**10. ábra B**).

A**B**

10. ábra: A gázfázisban hasadó (A) és nem hasadó deuterizált (B) keresztkötők sematikus felépítése és fragmentációja. Az MS spektrumokban kapott jellegzetes fragmentációs mintázatok segítik a keresztkötések azonosítását.

Az adatok komplexitásának csökkentése érdekében további módszer a keresztkötött peptidek dúsítása pl. méretkizárásos kromatográfiával (géliszűrés) vagy erős kationcserés kromatográfiával (*strong cation exchange*, SCX). Dúsításra használhatók még olyan trifunkciós keresztkötők, melyek egy a reaktív csoportok mellett egy harmadik, szelektíven dúsítható „fogantyút” is tartalmaznak. A foszforosav „fogantyúval” rendelkező PhoX nevű keresztkötőt

gyantába immobilizált fémion állófázison (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) dúsítva 300-szoros dúsítási hatékonyságot értek el [102]. Ám ebben az esetben is a dúsított termékek 60 %-a mono-linkelt peptid volt. Erre a problémára megoldásként alkalmazható az ionmobilitás elválasztás, ami a keresztkötött, nagyobb molekulákat elválasztja a mono-linkektől, azok ütközési hatáskeresztmetszete (*collision cross section*, CCS) alapján, így lehetővé válik az, hogy az adatgyűjtés kizárólag keresztkötött molekulákról történjen [116].

XL-MS technikát sikeresen alkalmazták például szinaptikus vezikulák membránfehérjéinek szerkezetvizsgálatára [117], *in vivo* membrán glikoproteinek sejtfelszíni jelölésére és interakcióinak felderítésére [118]. Transzmembrán fehérjék esetén nehézséget jelent az intramembrán régióra eső hidrofób aminosavak jelölődése, illetve a membrán sztérikus takaró hatása. Így gyakran olyan membránfehérjékre alkalmazták az XL-MS technikát sikerrel, melyek nagyobb része a membránon kívül esik. Különböző oldékonyságú és aminosav reaktivitású NHS-észter keresztkötők használatával sikeresen azonosítottak keresztkötéseket izolált baktérium membránfehérjén [108]. Diazirin típusú keresztkötők — mint például a fény hatására aktiválható azi-koleszterol — hidrofóbicitásuk révén kifejezetten a transzmembrán régióban tudnak jelölni, és fehérje-lipid kölcsönhatást kimutatni [119]. Ám mivel az *in vivo* keresztkötési reakcióval generált komplex adathalmazban kihívás azonosítani a relatíve ritka keresztkötött peptideket, intenzív kutatások zajlanak olyan specifikusan membránfehérjét célzó és dúsítható keresztkötők kifejlesztése érdekében, melyek *in vivo* is hatékonyan alkalmazhatók [96,120].

Egy keresztkötési reakció során a dinamikusan változó szerkezetek összességét tudjuk fixálni. A különböző konformációs állapotok analízisében számos algoritmus segítséget nyújthat [121,122], ám a szerkezeti sokaságok elkülönítése jelenleg még nem megoldott. XL-MS technikával a rendezetlen fehérjék globulárisabb konformációi jellemzően felülreprezentáltak a kitekeredett formákhoz képest, ám így is sikeresen alkalmazható más tömegspektrometriás szerkezetvizsgálati módszerekkel együtt [123].

3.3.3. Kovalens jelöléses tömegspektrometria (CL-MS)

A CL-MS, vagy más néven „protein footprinting” az aminosav oldalláncok specifikus, vagy aspecifikus kovalens jelölését jelenti, mellyel a fehérjék felszínének oldószertől hozzáférhetőségét tudjuk monitorozni. Jellemzően összehasonlító elemzést szoktak végezni, különböző behatásokra létrejövő konformációs állapotok között, mely ligand vagy fehérje kötődés hatására következik be. A kovalens jelölés, a HDX módszerrel ellentétben (lásd **3.3.4 fejezet**), stabil marad, így a jelölés után történő mintaelőkészítés során nincs szükség speciális

körülmények fenntartására. A kovalens jelölés lényegében hasonlít a keresztkötéses reakció során kialakuló mono-linkekre (**3.3.2 fejezet**). Specifikus jelölést EDC és szulfo-NHS észter alkalmazásával sikeresen alkalmaztak élő sejtek transzmembrán fehérjeinek extracelluláris régióinak vizsgálatára [124]. Ebben a tanulmányban Müller és mtsai. nemcsak olyan fehérjét tudtak jelölni, melyek egyszeres („single pass”) transzmembrán régióval és kiterjedt extracelluláris doménnel rendelkeznek, hanem a membránban sokszorosan (*multipass*) átívelő és extracellulárisan csak egy-egy kisebb hurkot tartalmazó fehérjéket is. Nem specifikus jelöléssel nagyobb szerkezet lefedettséget érhetünk el, mivel ebben az esetben többféle aminosavat tudunk jelölni. Leggyakrabban hidroxilgyökös ($\cdot\text{OH}$) (*hydroxyl radical footprinting* MS, HRF-MS) jelölést alkalmaznak, ahol a $\cdot\text{OH}$ gyököket H_2O_2 -ből UV lézersugárázással (*Fast Photochemical Oxidation of Proteins*, FPOP) vagy szinkrotron röntgensugárázással állítanak elő. A HRF-MS jelölés előnye, hogy a jelölés gyorsabb, mint a fehérje fel- vagy letekeredése, így elkerülhető a jelölés által kiváltott nem kívánatos szerkezetváltozás. *In vivo* FPOP jelölést lehetővé tévő protokollt Espino és mtsai. dolgoztak ki az elmúlt években [125].

3.3.4. Hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometria (HDX-MS)

A HDX eljárás során a kémiai jelöléshez hasonlóan, az oldószer számára kitett fehérje felületeket tudjuk monitorozni. Ebben az esetben viszont csak minimális változtatás éri a fehérjét, mivel a fehérje főláncbéli amid-hidrogének cserélődnek ki deutériumra. Ez a változás gyakorlatilag nem idéz elő elmozdulást a fehérje térszerkezetében, viszont tömegspektrometrián mérhető tömegeltolódást hoz létre. Az amid hidrogének kicserélődése oldószernek kitett, vagy flexibilis, rendezetlen régiókban gyors, míg oldószertől elzárt, globulárisabb szerkezeti elemekben lassú. A mintákat D_2O -ban inkubálva történik a H/D csere, majd a reakciót különböző időpontokban hűtéssel (0°C) és a pH csökkentésével ($\text{pH} \sim 2.5$) állítják le. Ezen körülményeket a kísérlet további lépéseiben (nem specifikus pepszin emésztés, sótalanítás, kromatográfiás elválasztás) is szükséges fenntartani, a H/D visszacsere megelőzése érdekében. Az eljárást manapság leggyakrabban automatizált rendszerekben végzik, a gyors és reprodukálható eredmények elérése érdekében. Membránfehérjék vizsgálata esetén előnyös a lipidek eltávolítása az emésztés és LC-MS mérés előtt, melyet Hammerschmid és mtsai. ZrO_2 csapdázó oszlop segítségével automatizáltak [126]. A rendezetlen régiókon kb. 10 sec alatt megtörténik a teljes H/D kicserélődés. Annak érdekében, hogy ezen flexibilis régiók dinamikus mozgását monitorozni tudjuk ms-os nagyságrendű jelölési időket kell alkalmazni. Automatizált, ms-os impulzus-jelölést alkalmaztak például a bakteriorodopszin

feltekeredésének vizsgálatához [127] és a rendezetlen hiszton-lizin-acetiltranszferáz (CREBBP) H/D csere kinetikájának monitorozásához [128].

HDX mérés esetén szükséges a fehérjék izolálása, ezért gyakran rekombináns, membrán mimetikumokba, pl. membrán kettős rétegbe (nanodiszk), vagy sztirol maleinsavanhidrid lipid részecskébe csomagolva (SMALP) végeznek H/D cserét. *In vivo* vizsgálatokhoz mindenképp szükséges olyan dúsítási módszer, mely automatizálható, gyors és a visszacsere megakadályozásához szükséges körülmények között is alkalmazható. Hammerschmid és mtsai. jelenleg olyan „SpyTag” („SpyCatcher”) [129,130] alapú specifikus dúsítási módszerrel dolgoznak, mely 0 °C-on, savas pH-n és online rendszerben használható.

HDX eljárással sikeresen vizsgálták a Pgp szerkezetét izolált lipid nanodiszkben és detergens micellákban [45,47]. Clouser és mtsai. nanodiszkben izolált rekombináns egér Pgp-n vizsgálták, hogy a koleszterin jelenléte lassú, aszimmetrikus változást idéz elő az NBD-k konformációjában [131]. A HDX kísérletek során megfigyelt szerkezeti változások összecsengenek az általunk kapott XL-MS eredményekkel (lásd **7. fejezet**).

3.3.5. Limitált proteolízissel kapcsolt tömegspektrometria (LiP-MS)

Natív fehérjék részleges proteolízisét már régóta használják olyan flexibilis régiók azonosítására, melyek a fehérje felszínén könnyen hozzáférhetők az emésztőenzim számára [132]. Ezzel a módszerrel azonosítani lehet ligand vagy fehérje partner kötődési helyét. A Picotti csoport pár évvel ezelőtt írt le egy újabb protokollt, a LiP-MS technikát, mely során a natív körülmények között végzett nem specifikus parciális proteolízist követően a mintákat denaturáló közegben szekvencia-specifikus (pl. tripszin, Lys-C) enzimmel is kezelik [133]. Így a reakcióelegyben keletkeznek kanonikus, teljesen triptikus és fél-triptikus peptidek is. MS/MS analízist követően a minták proteolitikus mintázatát összehasonlítva különbségeket lehet találni az egyes minták (kezeletlen kontroll — kezelt) között. LiP-MS-t, XL-MS-t és krio-EM-t felhasználva a Picotti csoport *in vitro* és *in vivo* körülmények között vizsgálta a borjú retina pálcikáiból izolált cGMP-függő kalcium csatorna fehérje (CNG csatorna) szerkezetének változását kalmodulin (CaM) kötődés hatására [134].

3.3.6. Natív és Top-down tömegspektrometria

Az utóbbi évek tömegspektrometriai újításai lehetővé tették a natív (nMS) és Top-Down (TD) MS módszerek fejlődését és egyre gyakoribb alkalmazását fehérje konformációs állapotok és proteoformák vizsgálatában. Fehérje izolálás és tisztítást követően jellemzően

nESI ionizációval juttatják az oldott molekulákat gázfázisba, ahol szerkezetük intakt marad. A feltekeredett fehérjék töltésállapota kisebb, mint a kitekeredettekké, így az egyes töltéseloszlások alapján következtethetünk a fehérje konformációs állapotára és a fehérjekomplexek sztöchiometriájára. Carol Robinson csoportjának kutatási célpontja kifejezetten a membránfehérjék natív tömegspektrometriás vizsgálata. Számos publikációjuk született membránfehérjék lipid kötődés által generált konformáció változásairól [85,87–89,135,136]. A TmrAB heterodimer ABC transzporter fehérjéről, mely szintén részt vesz multidrog rezisztencia kialakításában, natív MS-es módszer alkalmazásával azt találták, hogy a heterodimer stabilitásához és az ATP-áz aktivitáshoz szükséges a fehérjéhez szorosan kötődő annuláris lipidek jelenléte [85].

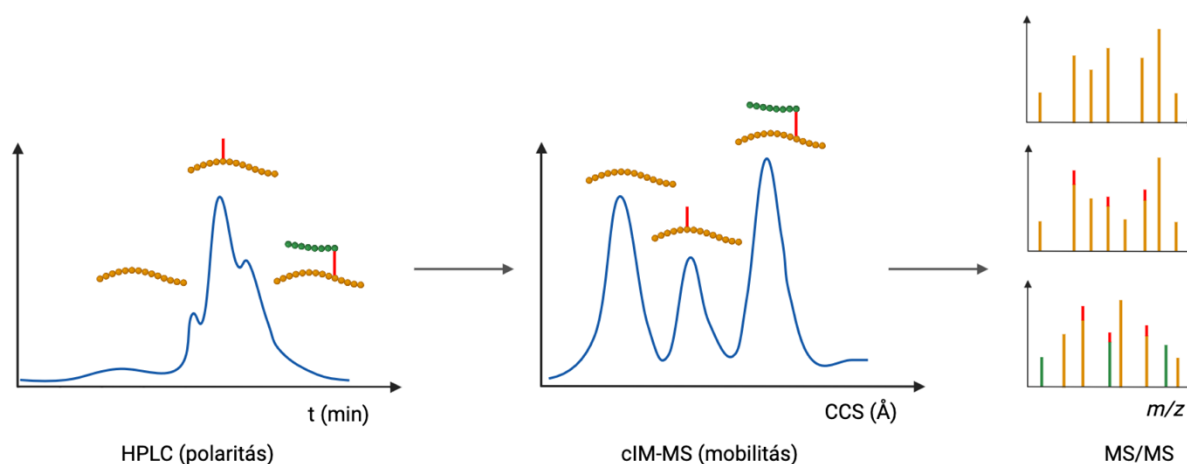
A natív Top-Down (nTD) MS módszer összeköti az nTD-t és a (denaturált) TD proteomikai módszereket, mivel ez esetben a fehérje intakt tömegének meghatározása után (MS1), fragmentációval információt kaphatunk a monomerek szekvenciájáról, konformációjáról és a PTM-ekről (MS2) egyetlen mérés alatt. A Kelleher csoport kétlépéses fragmentációs (MS2/MS3) módszere lehetővé teszi nagyobb fehérjekomplexek vizsgálatát is [137], mely membránfehérjék esetén is alkalmazhatónak bizonyult [138]. Albanese és mtsai. TD-MS és XL-MS módszereket használva vizsgálták a PSII–LHCII fehérjekomplex szerkezetét a tilakoid membránban [139].

3.3.7. Ionmobilitás-tömegspektrometria (IM-MS)

IM-MS során a tömegspektrométerbe érkező ionokat egy inert puffer gáz jelenlétében elektromos térben vezetik a tömeg analizátor felé, így a gázzal történő lágy ütközések következtében az egyes ionok elválaszthatók egymástól, azok mérete, alakja és töltése alapján. Ez a plusz elválasztási technika, LC-vel (ahol a molekulák hidrofóbicitásuk alapján válnak el) és a tömeg analizátorral (ahol m/z alapján válnak el) összekötve lehetővé teszi a nemkívánatos zaj eltávolítását a tömegspektrumból [140], és a különböző fehérje/peptid módosulatok, konformációk elválasztását [141]. Az ütközési hatáskeresztmetszet (CCS), a gázfázisban pörgő-forgó ionok kiátlagolt irányainak ütközési területe a töltött analit és semleges puffer gáz között. Az IM elválasztás során kapott CCS értékek alapján következtetni lehet tehát a molekula méretére, ami önmagában is hasznos információ szerkezetkutatás szempontjából. Laganowsky és mtsai. több tanulmányt is publikáltak membránfehérjék szerkezetének vizsgálatáról, ahol nMS-t IM elválasztással egészítették ki [89,136].

IM elválasztást az LC és ESI után, de a fragmentációs cella és a tömeg analizátor előtt elhelyezve lehetséges a lineáris peptidek elválasztása a módosítottaktól (azok fragmentációja előtt) ami nagyban segítheti a keresztkötött peptidek azonosítását komplex minták esetén is [116,142,143]. A pár éve elérhető ciklikus ionmobilitás tömegspektrométerben (cIM-MS) az ionokat több körben elválasztva, a hosszabb úthosszból fakadóan nagyobb ionmobilitás felbontást kaphatunk. cIM-MS használata növeli a fehérje szekvencia lefedettséget és az azonosított peptidek számát [144,145]. Kutatócsoportunk a rendezetlen α -syn fehérjét bottom-up DIA (MS^E) XL-IM-MS módszerrel vizsgálva azt találta, hogy már egy körös cIM (HDMS^E) elválasztás alkalmazása után is, az azonosított keresztkötött spektrumok száma nagyjából duplájára nőtt az IM alkalmazása nélkül mért mintákhoz képest, a módosítatlan és a módosított peptidek hatékonyabb elválasztása révén (11. ábra). Mindemellett nMS-el azt is meg tudtuk állapítani, hogy az α -syn esetén, egy molekulára maximum 1-2 keresztkötés esett, viszont keresztkötetlen molekulák csak ~10 %-ban maradtak a mintában.

A különböző tömegspektrometriás megközelítések együttes alkalmazása, a fehérjék szerkezetének különböző aspektusait megvilágítva, segít kirakni a térszerkezetek puzzle képeit.



11. ábra: Az XL-MS módszert cIM elválasztással kiegészítve a módosított peptidek azonosítása fokozható. A módosítatlan, illetve a mono-linkelt peptidek között lehetnek olyanok, melyeknek hidrofóbicitása hasonló, tehát HPLC-vel kevésbé szeparálhatók el egymástól, míg IM elválasztással különböző méretük és alakjuk révén elkülönülnek egymástól, így MS/MS analízisük és azonosításuk hatékonysága növelhető.

4. Célkitűzések

Ismert, hogy a P-glikoprotein szerkezetét és működését nagyban befolyásolja a membrán mikro környezet, a lipidek és koleszterinek közvetlenül kapcsolódnak a transzmembrán fehérjéhez. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a 15D3 monoklonális antitest koleszterin függő módon kötődik a P-glikoprotein extracelluláris régiójához, azonban annak pontos epitópja egyelőre ismeretlen. Annak érdekében, hogy a fiziológias membrán mikro környezetet megtartva tudjuk vizsgálni a P-glikoprotein szerkezetét és meghatározni a 15D3 epitópját, keresztkötéses tömegspektrometriára (XL-MS) alapuló kísérleti megközelítéseket alkalmaztunk.

1. Célunk volt olyan robusztus mintaelőkészítési módszerek optimalizálása, melyekkel reprodukálhatóan és a természetes membrán környezetet megtartva lehet vizsgálni membránfehérjéket.
2. Célul tűztük ki az általunk használt tömegspektrométer beállításának optimalizálását, illetve megbízható és hatékony kiértékelő szoftverek beállítását annak érdekében, hogy a legtöbb módosított peptidet tudjuk azonosítani.
3. Optimalizált módszereinkkel kívántuk feltérképezni a P-glikoprotein dinamikus szerkezetét, illetve olyan régióit, melyeket hagyományos szerkezeti biológiai módszerekkel nehézkes vizsgálni.
4. A 15D3 antitest variábilis régiójának aminosav szekvenciája alapján kívántunk egy elméleti harmadlagos szerkezetet felállítani.
5. Elméleti fehérje dokkolással és a keresztkötéses tömegspektrometriás eredmények alapján kívántuk meghatározni a 15D3 monoklonális antitest epitópját a P-glikoprotein sejt felszíni régióján.
6. Mindemellett célunk volt a P-glikoprotein 3T3 sejtekben található közvetlen és közvetett fehérje partnereinek azonosítása és a 15D3 és UIC2 antitestekkel való dúsítás során kapott fehérje listák összehasonlítása.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált anyagok

Minden vegyszer a Sigma-Aldrich (München, Németország) cégtől származik, kivéve ahol másként van feltüntetve. Minden puffer Milli-Q vízzel készült és a tömegspektrometriás mintaelőkészítéshez és méréshez felhasznált összes oldatot 22 µm-es szűrőegységgel filtersterilizáltuk.

5.2. Sejttenyésztés

Vizsgálataink során NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonal *mdr1* génnel transzfektált változatát (NIH 3T3-MDR1 G185) használtuk. Az NIH 3T3 sejtvonalakat M. Gottesman (NIH, Bethesda, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A sejteket 10 % inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FCS Gibco), 5 mM glutaminsavat és 25 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékban növesztettük állandó 37 °C-os hőmérséklet, 5 %-os CO₂ atmoszféra, 95 %-os páratartalom mellett. A Pgp-t kifejező sejtvonalakat 670 nM doxorubicint tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn és felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő oldatban tartottuk tovább. A sejteket rendszeresen ellenőriztük Mycoplasma fertőzés kizárása érdekében MycoAlert teszt (Lonza, Budapest, Magyarország) segítségével.

5.3. Monoklonális antitestek előállítása

Az UIC2 (IgG2a; ATCC No. HB-11027) és 15D3 (IgG1; ATCC No. HB-11342) anti-ABCB1 monoklonális antitesteket BALB/c egerek peritoneális folyadékából származó makrofág tápláló sejtrétegen (*feeder layer*) tenyésztett hibridóma sejtek felülúszójából állítottuk elő [146]. A felülúszókat Protein G affinitáskromatográfiával dúsítottuk és tisztítottuk. A hibridóma sejtvonalakat az American Type Tissue Culture Collections-ből (Manassas, VA, USA) szereztük be. Az egereket a Debreceni Egyetem Kísérleti Állatházában tartották, elkülönítve egymástól, ad libitum vízhez és takarmányhoz való hozzáféréssel, 12 órás sötét-fény ciklusban, 22 ± 1 °C-on.

5.4. Keresztkötés élő sejteken

5.4.1. BS2Gd₀/d₄ (bisz-szulfoszukcinimidil-glutarát-d₀/d₄)

Az NIH 3T3 MDR1 sejteket T75-ös sejttenyésztő edényben, teljes tenyésztő folyadékban növesztettük. A ~90 % konfluencia elérésekor a felülethez tapadó sejteket 2 percig tripszinnel kezeltük (0,05 % tripszin és 0,02 % EDTA pH 7,4-es PBS-ben), majd a sejteket teljes médiumban szuszpendálva állítottuk le a tripszint. A sejteket kétszer mostuk szérummentes, 0,1 % molekuláris biológiai minőségű BSA-val kiegészített tenyésztő folyadékkal a PNGáz-F kezelés előkészítéséhez. ~ 8×10^7 sejt/mL koncentrációjú sejszuspenziót bakteriális Petri-csészében 100 U/mL PNGáz-F-fel (New England Biolabs) kezeltünk, amelyet 0,1 % molekuláris biológiai minőségű BSA-val kiegészített szérummentes médiummal hígítottunk. A sejteket 4 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk 5 % CO₂-t és 95 %-os páratartalmat biztosító inkubátorban. A sejteket 15 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és kétszer mostuk glükóz-PBS-sel (8 mM glükózzal kiegészített foszfát-pufferelt sóoldat). Az extracelluláris antitest-kereszt-kötéses mintákhoz 10^7 sejt/mL koncentrációjú mintákat inkubáltunk 100 µg/mL 15D3-mal vagy UIC2-vel 30 percig 37 °C-on, enyhe keverés mellett. Kétszeri glükóz-PBS mosás után RT-n (szobahőmérsékleten), mintánként 3×10^7 sejtet pH 7,0-es PBS-ben reszuspendáltunk, és 1:1 arányban adtunk hozzá a BS2Gd₀/d₄ (Thermo Fisher Scientific) keverékét 5 mM-os végső koncentráció eléréséhez, pH 7,0-es PBS-ben oldva 1 mL végső térfogatban. A kereszt-kötési reakciót 60 percig, 37 °C-on hagytuk lejátszódni, majd 5 percig RT-n 1 M pH 7,5-ös Trisz pufferrel állítottuk le, a reakcióelegyben 20 mM-os végkoncentrációban.

5.4.2. DSSO (diszukcinimidil-sulfoxid)

Az élő sejteket a fent leírtak szerint PNGáz F-fel kezeltük, és mintánként 3×10^7 sejtet reszuspendáltunk pH 7,0-es PBS-ben. 50 mM DSSO (Thermo Fisher Scientific) törzsoldatot készítettünk DMSO-ban, és tovább hígítottuk a mintákkal úgy, hogy 0,5 mM, 1 mM, 5 mM és 10 mM végső koncentrációt érjünk el 1 mL végső térfogatban. A kereszt-kötési reakciót 60 percig hagytuk 37 °C-on végbemenni, majd a mintákat a fent leírtak szerint kezeltük.

5.5. Gyöngyös kereszt-kötés

A Protein G redukív metilezését [147] nátrium-cianoborohidriddel (NaBH₃CN) végeztük Dynabeads mágneses gyöngyökön, az immunprecipitációt és a kereszt-kötést megelőzően.

500 µl gyöngyöt háromszor mostunk pH 6-os PBS-sel, majd 0,1 M metanol mentes paraformaldehiddel, végül 0,1 M NaBH₃CN-t adtunk hozzá. Az elegyet 30 percig inkubáltuk RT-n, enyhe keverés mellett. A gyöngyöket háromszor mostuk pH 7,4-es PBS-sel, majd új csőbe helyeztük. A membránfehérje preparálást és a 15D3, illetve az UIC2 antitestekkel történő immunprecipitációt az alábbiakban leírtak szerint végeztük (5.6 fejezet). RIPA pufferrel történő mosást követően a gyöngyöket kétszer mostuk pH 7,0-es PBS-sel, majd a második mosást egy új csőben végeztük. A mintákhoz 1 mM DSSO-t adtunk, amelyet előzőleg 50 mM-os DMSO törzskoncentrációban oldottunk fel. A keresztkötési reakciót 60 percig hagytuk RT-n, enyhe keverés mellett. Ezután 5 percig 1 M-os, pH 7,5-ös ammónium-hidrogén-karbonáttal (AMBIC) állítottuk le a keresztkötési reakciót, a reakcióelegyhez adva 20 mM-os végkoncentrációt elérve. Ezután a gyöngyöket kétszer mostuk 25 mM AMBIC-kal. (Biztonsági és környezetvédelmi megfontolásokból ezeket a kísérleteket elszívó vegyifülke alatt végeztük, és minden felülúszót és NaBH₃CN-t tartalmazó maradék oldószert nátrium-hipoklorit oldattal semlegesítettünk.)

5.6. Membránfehérje preparálás és immunprecipitációs dúsítás

A membránfehérje preparálást a Thermo Fisher Scientific protokollja szerint végeztük a Mem-PER™ Plus (#89842) membránfehérje extrakciós készlettel. A fehérjekoncentrációt Direct Detect spektrométerrel határoztuk meg. Az immunprecipitációhoz 100 µl Dynabeads Protein G (Invitrogen) mágneses gyöngyöt négyszer mostunk 5 mg/ml BSA-val kiegészített PBS-ben (PBS/BSA). A gyöngyökhöz mintánként 500-500 µg fehérjét tartalmazó, 1 mg/mL koncentrációjú sejtlizátumot adtunk, és 4 °C-on egy éjszakán át forgó keverőn inkubáltuk. Másnap a gyöngyöket kilencszer mostuk 1 mL RIPA pufferben [148] 4 °C-on. Ezután a gyöngyöket kétszer mostuk 1 mL frissen elkészített, jéghideg 100 mM AMBIC-ban, majd a második mosást egy új csőbe helyeztük. A gyöngyöket ekkor lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a tripszin emésztésig és az LC-MS/MS mérésig.

5.7. Western Blot analízis

A membránpreparátumokat és az immunprecipitációs gyöngyöket (7 µg fehérje/minta) SDS mintapufferrel hígítottuk (0,31 M Tris-HCl, pH 6,8, 50% glicerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,01% brómfenol-kék, 1 M β-merkaptotanol), majd 65 °C-on, 10 percig, rázatva inkubáltuk. 7 %-os SDS-poliakrilamid gélen Laemmli pufferben elektroforézissel választottuk el, majd Towbin pufferben elektro-transzferáltuk nitrocellulóz membránra (BioRad), 100 V-on,

1,5 órán keresztül, 4 °C-on. A membránt PBS-ben oldott 5 %-os tejporral blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A Pgp-t D3H1Q (Cell Signaling Technology) humán Pgp ellenes nyúl monoklonális elsődleges antitesttel (1:1000-hez, 5 %-os tejporos PBS oldatban hígítva) jelöltük 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. A nem kötődött antitesteket 0,1 % Tween-20 tartalmú PBS-sel mostuk 3-szor 10 percig szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. Ezután nyúl ellenes, torma-peroxidázzal konjugált kecske IgG másodlagos antitesttel (1:5000-hez, 5 %-os tejporos PBS oldatban hígítva) jelöltük, 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. A nem kötődött antitesteket ismét 3-szor mostuk, majd az előhívást SuperSignal West Femto ECL reagenssel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A kép rögzítését Chemidoc Imaging (Bio-Rad Hungary Ltd, Budapest, Hungary) géldokumentációs rendszer segítségével végeztük.

5.8. Áramlási citometriás mérés

Mintánként 500000 sejtet, melyeket a fent leírtak szerint előzőleg különböző koncentrációjú PNGase F-fel kezeltünk (0, 50, 100, 200 U/mL), szorter csövekbe helyeztük 500 µL glükóz-PBS-ben. A sejteket 10 µg/mL koncentrációjú 15D3 vagy UIC2 elsődleges antitesttel jelöltük 30 percig, 37 °C-on. Három PBS-es mosást követően a sejteket 1 µg/mL Alexa-488 fluoroforral kapcsolt, egér ellenes kecske másodlagos antitesttel (Thermo Fisher Scientific) jelöltük 1 órán át, jégen. A sejteket 2-szer mostuk PBS-ben, majd 100 µL, jéghideg, 4 %-os PFA oldatban reszuszpendáltuk. A sejteket NovoCyte áramlási citométerrel (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) vizsgáltuk. Mintánként 20000 sejtet gyűjtöttünk. Az egyes sejteket az FSC-H/SSC-H és SSC-H/SSC-A diagramok alapján kapuztuk, majd az FSC-H/FL1-H szórásdiagram alapján homogén populációkat választottunk ki. Az Alexa-488 festék FL1-H jelét az egymásra helyezett hisztogramokon ábrázoltuk. Az adataelemzést és a grafikonokat az FCS Express 6-os verziójának (De Novo Software, Glendale, CA, USA) felhasználásával készítettük.

5.9. Tripszines emésztés és LC-MS/MS analízis

A gyöngyöket 25 mM-os AMBIC-ban reszuszpendáltuk, és a fehérje-diszulfidkötéseket 1 mM trisz(2-karboxietil)foszfínnal (TCEP) redukáltuk 10 percig, RT, majd a keletkező szulfhidreket 2,4 mM S-metil-metánetilszulfonáttal (MMTS) derivatizáltuk 10 percig, RT. A fehérjeemésztés oldallánc-védett sertés tripszinnel (Promega) egy éjszakán át zajlott 37 °C-on, majd az emésztést a minták 0,2 %-os trifluorecetsavval (TFA) való savanyításával állítottuk le.

Az emésztmények analízisét LC-MS/MS módszerrel végeztük egy Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific) tömegspektrométerben, amely *on-line* ACQUITY UPLC M-Class rendszerhez (Waters) vagy Evosep One HPLC rendszerhez (Evosep) csatlakozott. Az ACQUITY UPLC M-Class berendezésben a mintákat egy Symmetry C18 Trap oszlopra (100 Å, 5 µm, 180 µm × 20 mm, 2D, V/M) töltöttük 5 µL/perc áramlási sebességgel 5 percig 1 % B oldószer mellett, majd egy Peptid BEH 130 C18 oszlopon (130 Å, 1.7 µm, 100 µm × 100 mm) vagy egy Peptid CSH C18 oszlopon (130 Å, 1,7 µm, 75 µm × 250 mm) 400 nL/perc áramlási sebességgel és B oldószer gradienssel 5-10 % 2 perc alatt, 10-35 % 50 perc alatt, 35-50 % 15 perc alatt, majd 90 %-ig 8 perc alatt, 45 °C-os oszlophőmérséklet tartása mellett. Az Evosep One berendezésben a mintákat az Evotip Pure hegyekre töltöttük, és az Extended 15 SPD (*samples per day*) módszerrel választottuk szét az EV-1106 analitikai oszlopon (C18, 1,9 µm, 150 µm × 150 mm). Mindkét beállításban az A oldószer 0,1 %-os hangyasav volt vízben, a B oldószer 0,1 %-os hangyasav volt acetonitrilben. Az MS-adatgyűjtés adatfüggő módon történt többszörösen töltött prekursor ionokon. A nem keresztköött és a BS2G keresztköött mintákat csak MS2-HCD fragmentációval elemeztük. A DSSO keresztköött minták esetében célzott MS3-HCD spektrumokat gyűjtöttünk, amikor az MS2-CID-ben specifikus DSSO fragmentáció tömegkülönbséget detektáltunk, itt az adatgyűjtést MS2-EThcD és MS2-HCD fragmentációval egészítettük ki. Az MS1 és MS2-CID adatokat az orbitrapben mértük 60k, illetve 30k felbontással, az MS2-HCD adatokat vagy az orbitrapben 15k felbontással, vagy az ioncsapdában gyors szkenneléssel, míg az MS3-HCD és MS2-EThcD adatokat az ioncsapdában gyors szkenneléssel mértük.

5.10. Az adatok kiértékelése és értelmezése

A nyers adatokból a Proteome Discoverer (v1.4 vagy v2.4) szoftver segítségével csúcslistákat generáltunk, majd a ProteinProspector (v5.24.0, v6.2.1 vagy v6.3.1) adatbázisban végeztünk fehérje lekeresést. Első lépésként az adatokat az Uniprot 2017.11.01 adatbázisban (83889 *entry*), illetve SwissProt 2021.06.18 adatbázisban (17089 *entry*) található egér proteomban kerestük le, a mintában jelen lévő fehérjék azonosítása érdekében. A humán Pgp, a protein G, az UIC2 és a 15D3 antitestek ismert szakaszainak szekvenciáit és a gyakori szennyeződések (pl. humán keratinok vagy szarvasmarha-szérumfehérjék) is figyelembe vettük. A prekursor ionok esetén 5 ppm tömeg tolerancia, a fragmens ionok esetén pedig 20 ppm (orbitrap adatok) vagy 0,6 Da-ra (ioncsapda adatok) volt megengedett. Csak teljesen triptikus peptideket vettünk figyelembe, legfeljebb két kihagyott hasadással. Rögzített

módosításként a ciszteinek metiltio-módosítását állítottuk be. Nem rögzített, változó módosításként a következőket állítottuk be: metionin oxidáció, fehérje *N*-terminálisának acetilálása, peptidek *N*-terminális Gln-reziduumainak piroglutaminsav-képzése, lizinek hidrolizált DSSO vagy BS2G_{d0/d4} származékai. Csak a legfeljebb 1 % FDR értékkel rendelkező, és fehérjénként legalább két egyedi peptiddel rendelkező találatokat fogadtuk el. A második lépésben a legalább 2 (gyöngyös minták esetén) vagy 5 (élő sejtes minták esetén) peptiddel biztosan azonosított fehérjék között kerestünk le lizin reziduumok közötti DSSO, illetve BS2G keresztkötéseket Protein Prospector szoftver, illetve a Proteome Discoverer v3.0.1.27 XlinkX [149] csomagjának segítségével. A DSSO keresztkötött mintákban változó módosításként állítottuk be az alkén-, telítetlen tiol- és szulfénsav-származékokat (amelyek a fragmentáció során keletkeznek) az MS3-HCD mérések esetén, a tripszin által kihagyott lizin hasítóhelyeken. Végül az MS2 és MS3 spektrumokat egymáshoz rendeltük, és a keresztkötéseket manuálisan értékeltük.

5.11. Molekuladokkolás

A 15D3 antitest szerkezetét az ABodyBuilder2 (*root-mean-square deviation*, RMSD a CDR-H3 esetében 2,81 Å) webes alkalmazással modelleztük az Egyesült Államok US5849877 szabadalmából származó 15D3 variábilis nehéz- és könnyűlánc szekvencia felhasználásával. Az 5 Å küszöbérték alatti RMS predikciós hibákat az ImmuneBuilder [150] *deep learning* algoritmusával számoltuk ki (2. táblázat).

CDR régió	Predikciós hiba
Framework H-chain	0.33
CDR-H1	0.33
CDR-H2	0.20
CDR-H3	0.20
Framework L-chain	0.20
CDR-L1	0.31
CDR-L2	0.16
CDR-L3	0.18

2. táblázat: Az egyes CDR hurkokra vonatkozó predikciós hibák.

A fehérje-fehérje dokkolást a ClusPro 2.0 [151] webszerveren végeztük Antibody módban és automatikus non-CDR maszkolással. A 15D3 ABodyBuilder2 segítségével létrehozott PDB-szerkezetét és a humán MDR1 PDB-szerkezetét (6qex), egy PyMOL-ban létrehozott maszkoló

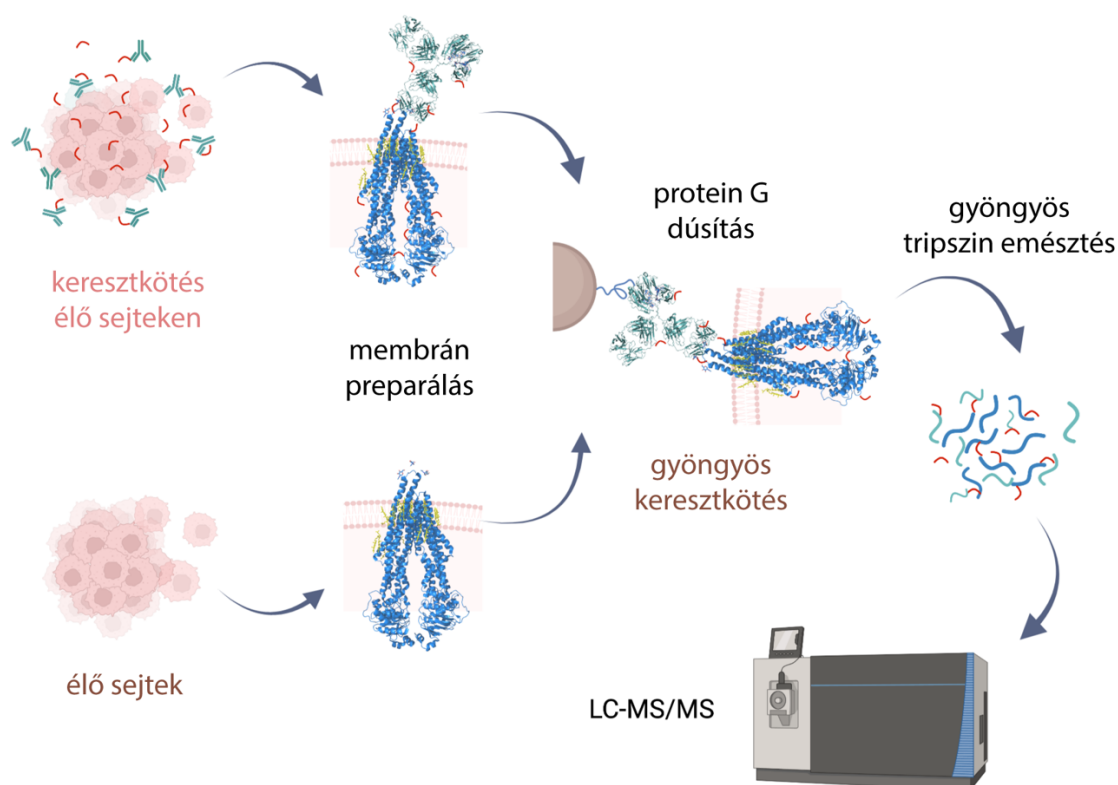
PDB-fájlal együtt töltöttünk be, azért, hogy a dokkoláshoz csak a humán MDR1 extracelluláris hurkait vegye figyelembe a szoftver. A továbbiakban az eredmények megjelenítéséhez, a ClusPro 2.0 szerint legjobban illeszkedő, 177 tagot tartalmazó 0. klasztert használtuk.

6. Eredmények

6.1. Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása transzmembrán fehérjék XL-MS analíziséhez

Tömegspektrometriás vizsgálatainkhoz kétféle mintaelőkészítési megközelítést alkalmaztunk. (i) Élő 3T3 MDR sejteket kezeltünk keresztkötő ágensekkel, majd membrán preparálást követően Pgp elleni monoklonális antitestekkel végeztünk immunoprecipitációs dúsítást Protein G mágneses gyöngyökön. (ii) 3T3 MDR sejteken először membrán preparálást végeztünk majd a Pgp-t immunoprecipitációval dúsítottuk. Ezt követően végeztünk keresztkötést a Protein G gyöngyökön dúsított Pgp-n és annak szorosan kapcsolt fehérje partnereire.

Mintaelőkészítési módszereink eredetileg a *Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins* (RIME) protokoll [148] lépéseiből indultak ki. Ezen protokoll alapján az élő sejtek keresztkötése és a fehérjék immunoprecipitációs dúsítása után erős RIPA pufferes mosást alkalmaznak, így több nem specifikus kötődő szennyezőt el tudunk távolítani a tömegspektrometriás mérés előtt. A mi protokollunk során a RIME módszert, mely inkább sejtmagi fehérjék izolálására fókuszál, membránpreparálással egészítettük ki. Többféle eljárást kipróbálva a Thermo Fisher Scientific Mem-PER™ Plus membránfehérje extrakciós készlet bizonyult a legmegfelelőbbnek, mellyel nagy mennyiségű membrán fehérjét, reprodukálható módon lehet preparálni. Ezzel a módszerrel az egy vagy több transzmembrán doménnel rendelkező fehérjéket és hozzájuk kapcsolódó perifériás és citoszolikus fehérjéket lehet izolálni [152]. Az ikerionos detergenst tartalmazó szolubilizáló puffer meghagyja a lipid molekulák egy részét a Pgp körül, így a fehérje képes megőrizni az ATPáz aktivitását is [49]. Mintaelőkészítési módszereink egyszerűsített folyamatábráját az **12. ábra** mutatja.

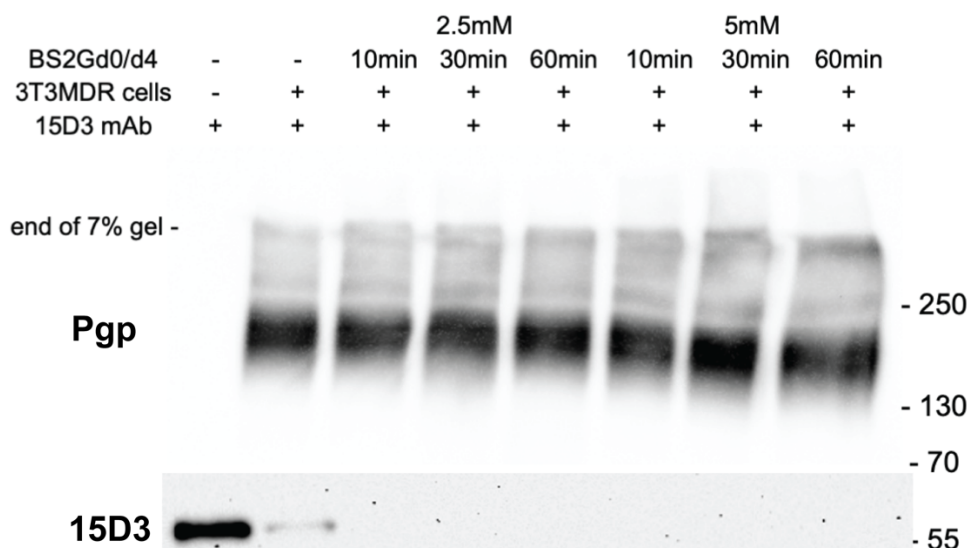


12. ábra: Mintaelőkészítési megközelítéseink a Pgp XL-MS technológiával való vizsgálatához. Az általunk alkalmazott, a lizinek oldalláncaán található aminocsoporttal reagáló NHS-észter típusú keresztlinkő ágensek, a DSSO és a BS2Gd₀/d₄, az élő sejt keresztkötés esetén, közvetlenül az ép sejtek felületén és a sejtekben alakított ki kovalens kötést a fehérjék lizin oldalláncain. Ezt követően végeztünk membrán preparálást, majd Pgp elleni monoklonális antitestekkel, a 15D3-mal és UIC2-vel végeztünk immunprecipitációs dúsítást Protein G mágneses gyöngyökön. A gyöngyös keresztkötés esetében a membrán preparálás és immunprecipitációs dúsítást követően a gyöngyön végeztük el a keresztkötési reakciót. Mindkét megközelítés esetén a gyöngyön végeztük el a tripszines emésztést, és az LC-MS/MS mintapreparálási lépéseket. Az élősejtes keresztkötés lépései rózsaszínnel, a gyöngyös keresztkötéshez tartozó folyamatok barnával, és a közös lépések pedig feketével vannak feltüntetve az ábrán.

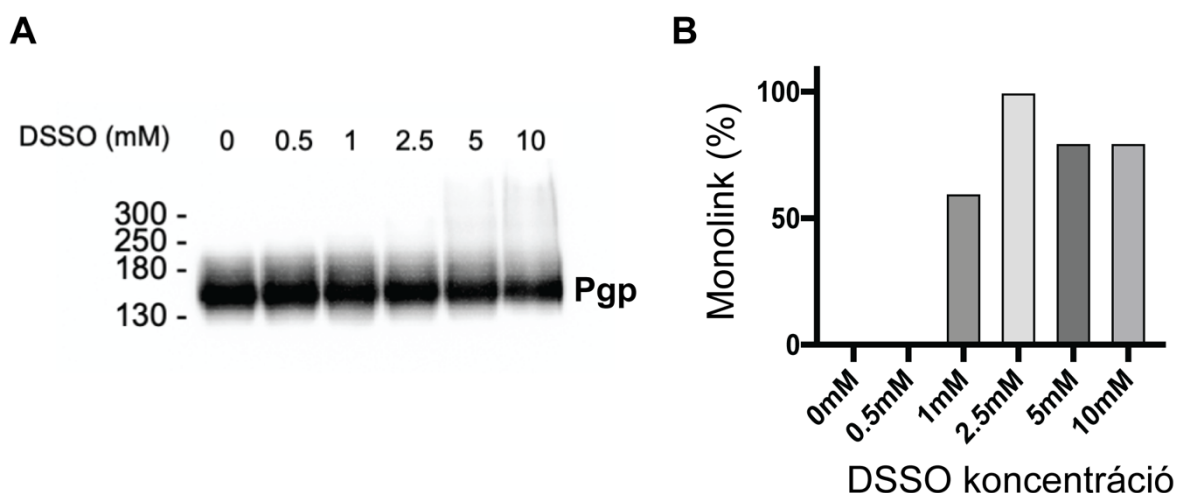
6.1.1. A keresztkötési reakció körülményeinek optimalizálása és az immunoprecipitáció hatékonyságának ellenőrzése

Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb keresztkötést tudjuk azonosítani és a műtermék képződést minimalizáljuk, többféle keresztkötő koncentrációt és keresztkötési időt teszteltünk, melyeket Western Blot analízissel ellenőriztünk (**13. ábra, 14. ábra**). A keresztkötő ágensek koncentrációjának és a reakcióidőnek az emelésével fokozatosan megjelent a Pgp jele a magasabb (250 kDa) molekulatömegű tartományokban. Ezzel párhuzamosan a 15D3 mAb jele fokozatosan eltűnik, feltehetően azért, mert keresztkötött komplexbe kerül (**13. ábra**). Azt tapasztaltuk, hogy a keresztkötő 5 mM-os koncentrációja felett a fehérjék túlzott keresztkötése miatt az azonosított módosítások száma lecsökken. Így az élő sejt kísérleteinkhez az 5 mM-

os koncentrációt választottuk a továbbiakban. A gyöngyös DSSO kísérletekhez 1 mM-os koncentrációt alkalmaztunk, mivel itt a Pgp-t és annak fehérje partnereit direkter el a keresztkötő molekulák, így túlzott keresztkötés már alacsonyabb koncentrációnál is bekövetkezhet.

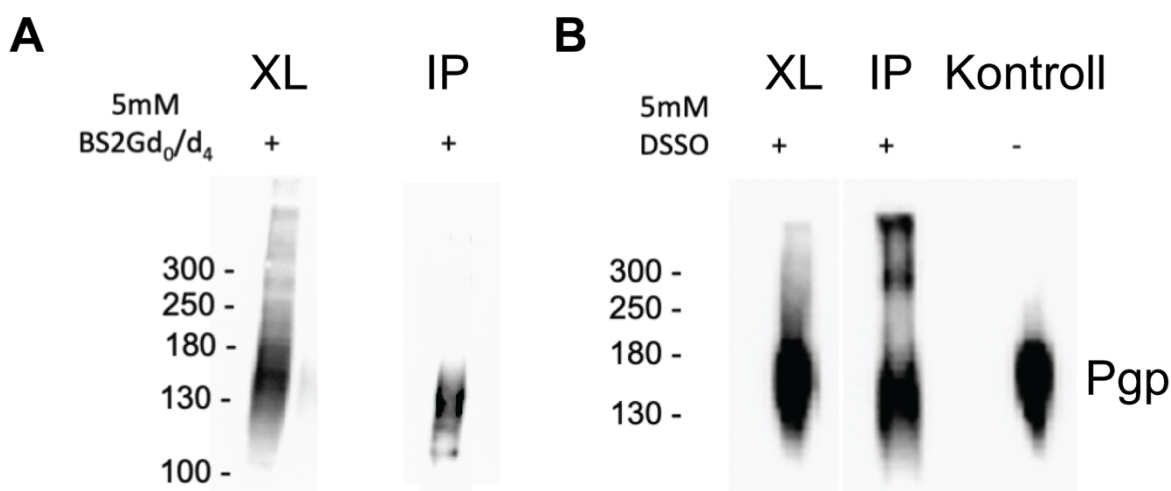


13. ábra: A BS2G_{d0/d4} keresztkötés különböző körülmények között Western Blot analízissel követve. A BS2G_{d0/d4} koncentráció és inkubációs idő növekedésével egyre intenzívebben tűnik elő a Pgp jele a 250 kDa feletti molekulatömeg tartományban. A Pgp-t D3H1Q monoklonális elsődleges antitesttel jelöltük. Ezzel ellentétben, a 15D3 jele fokozatosan eltűnik a keresztkötő ágens hozzáadásával. A 15D3-mat egér ellenes torma-peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel jelöltük.



14. ábra: A DSSO keresztkötés különböző körülmények között vizsgálva. (A) Különböző koncentrációjú DSSO kezelések Western Blot analízise. A Pgp-t D3H1Q monoklonális elsődleges antitesttel jelöltük. A DSSO koncentrációjának növekedésével egyre intenzívebben tűnik elő a Pgp jele a 250 kDa feletti molekulatömeg tartományban. **(B)** Az azonosított mono-linkek százalékos eloszlása a különböző DSSO koncentrációjú mintákban. Tapasztalataink alapján 5 mM-os koncentráció felett a fehérjék túlzott keresztkötése miatt az azonosított módosítások száma lecsökken.

Az immunoprecipitációs dúsítások hatékonyságát is ellenőriztük Western Blotton (15. ábra). A keresztkötés nélküli kontrollhoz képest a keresztkötött (XL) mintákban itt is megjelenik a Pgp jele a 250 kDa-os molekulatömeg feletti tartományokban. A 15D3-mal való dúsítás (15. ábra A) során kevesebb Pgp-t tudtunk kimutatni az UIC2-vel való dúsításhoz (15. ábra B) képest. Ennek oka valószínűleg a 15D3 koleszterin-érzékenysége, mivel a membránpreparáció után a sejtmembránban fiziológiásan előforduló koleszterin szintje némileg csökkenhet.



15. ábra: Az immunoprecipitációs (IP) dúsítás követése különböző antitestek és keresztkötők alkalmazása után. (A) 15D3 antitesttel való dúsítás az élősejtes BS2Gd₀/d₄ keresztkötést követően. (B) UIC2 antitesttel való dúsítás az élősejtes DSSO keresztkötést követően. A két keresztkötő használata után (XL) a Pgp jele megjelent a 250 kDa feletti molekulatömeg tartományban is, tehát a keresztkötés hatással volt a Pgp-re. A 15D3-mal és UIC2-vel való dúsítást összehasonlítva (IP) látható, hogy az UIC2 jobban dúsította a Pgp-t. A 15D3 csökkent kötődése magyarázható annak koleszterin jelenlététől függő kötődésétől. A membránpreparációt követően a fiziológiásan jelen lévő koleszterin szintje némileg csökkenhet.

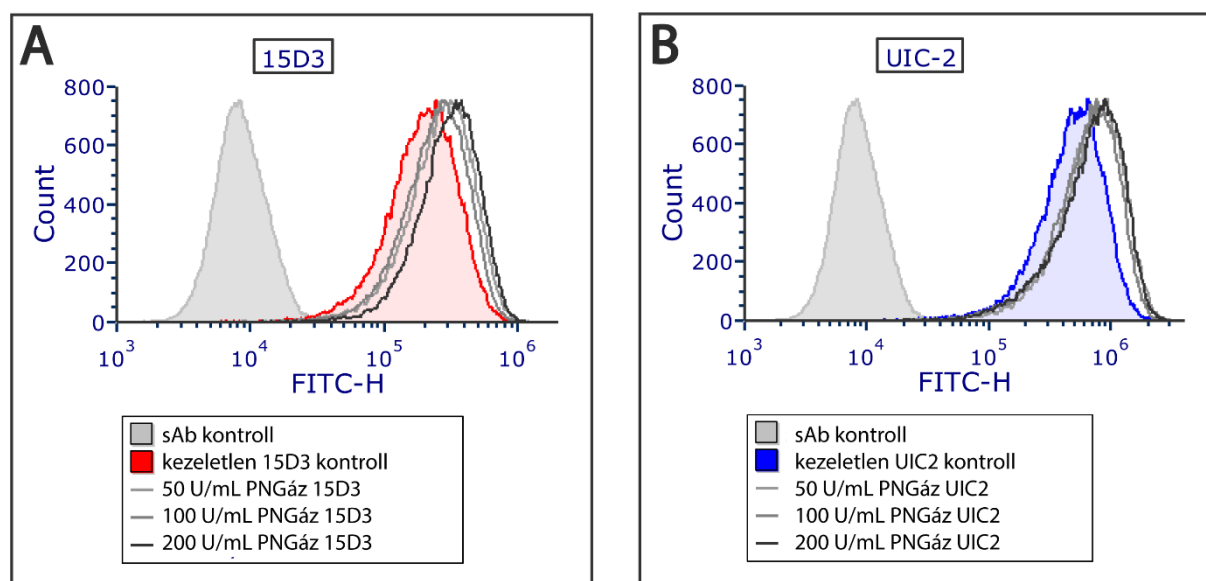
6.1.2. PNGáz-F kezelés hatása a 15D3 és UIC2 monoklonális antitestek sejtfelszíni kötődésére

Az élősejtes keresztkötés esetén az antitesttel való inkubáció előtt PNGáz-F (Peptid-N-Glikozidáz F) kezelést iktattunk be, mivel áramlási citometriás méréseink során azt tapasztaltuk, hogy ez javítja a 15D3 és UIC2 monoklonális antitestek kötődési affinitását (16. ábra). A Pgp-n található első extracelluláris hurkon van (ECL1) három N-glikozilációs hely (91-, 94-, és 99-es aszparagin), melynek N-glikán mintázata sejtvonaltól és kórképtől függően igen változatos lehet [153]. A PNGáz-F a legbelső GlcNAc és az aszparagin között hasít az N-glikozilált fehérjéken [154]. A Pgp N-glikánjai feltehetőleg sztérikusan akadályozzák az

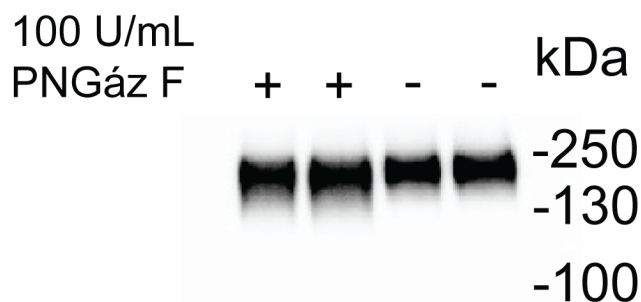
antitestek dokkolását, így az N-glikánok eltávolítása kis mértékben növelte a 15D3 és UIC2 monoklonális antitestek sejtfelszíni kötődését. Korábbi kísérletek alapján a glikánok eltávolítása nem befolyásolja a Pgp megfelelő működését [155].

A 170 kDa-os Pgp-n lévő cukor oldalláncok Endo F enzimmal való lehasítása következtében 140 kDa-os, glikoziláció nélküli fehérjét kapunk [156]. A glikoziláció következtében a Pgp SDS-PAGE módszerrel való elválasztása során, a Pgp vándorlása az elektroforetikus térben megváltozik, és gyakran egy diffúz foltot ad Western Blot analízis során [157]. A Pgp-t Western Blotton, Pgp elleni D3H1Q monoklonális antitest jelöléssel vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az általunk élő sejteken elvégzett sejtfelszíni PNGáz-F kezelés következtében a kontrollhoz képest a PNGáz-F-kezelt minták foltjai az alacsonyabb molekulatömeg irányába mozdulnak el. Ezen elmozdulás körülbelül a 140 kDa-os molekulatömegnél jelentkezett (**17. ábra**). A Western Blot analízis, az áramlási citometriás mérések mellett bizonyította, hogy a PNGáz-F kezelés valóban lehasította a Pgp-n található N-glikánokat.

Ezen eredményeink alapján feltételezhető, hogy a PNGáz-F kezelés más extracellulárisan glikozilált membránfehérjék sejtfelszíni jelölése esetén is előnyös lehet.



16. ábra: A 15D3 (A) és UIC2 (B) antitestek kötődésének vizsgálata áramlási citometriával, különböző koncentrációjú sejtfelszíni PNGáz-F kezelést követően. A PNGáz-F kezelés nélküli kontrollhoz képest a PNGáz-F koncentrációjának növelésével fokozatos eltolódás tapasztalható a magasabb FITC-H intenzitás értékek irányába, ami az antitestek erősebb kötődésével arányos. Ezen jobb kötődési affinitás feltehetőleg annak tudható be, hogy az N-glikánok sztérikusan akadályozzák az antitestek jobb kötődését, így azok eltávolításával, az antitestek szabadabban kötődhetnek a Pgp extracelluláris régióihoz.



17. ábra: PNGáz-F kezelés következtében a Pgp foltja alacsonyabb molekulatömeg felé tolódik el a kezeletlen kontrollhoz képest. A Western Blot analízis a nyúlban termelt D3H1Q monoklonális anti-Pgp elsődleges antitest és kecskében termelt poliklonális nyúl ellenes másodlagos antitest jelöléssel készült.

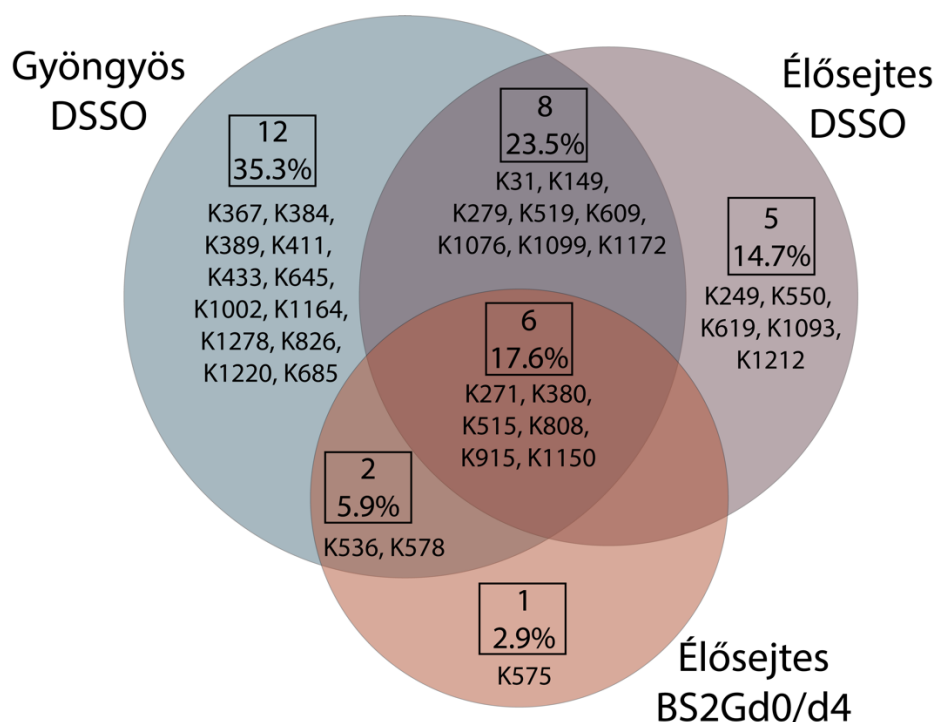
6.1.3. Protein G gyöngyök redukzív metilezése

Gyöngyös keresztkötéses mintaelőkészítési megközelítésünket azért alkalmaztuk, hogy ilyen módon közvetlenül és hatékonyabban tudjuk a Pgp-t keresztkötni. Első próbálkozásaink során azonban azt tapasztaltuk, hogy a Protein G-n kialakuló keresztkötések jóval nagyobb számban fordulnak elő az antitesten és a dúsított Pgp-n azonosítható keresztkötéseknél. Így a Protein G-hez tartozó azonosítások magas intenzitása miatt, a Pgp-n és az antitesteken lévő keresztkötések detektálása tömegspektrometrián lényegében lehetetlenné vált. A Protein G gyöngyök metilezésével a korábban 1704 spektrummal (*spectral count*, SPC) azonosított Immunoglobulin G-kötő fehérje, a Protein G, 13 darab SPC-re csökkent. A DSSO keresztkötött peptid azonosításokhoz tartozó spektrumok száma (*cross-link spectra match*, CSM) pedig 61-ről 0-ra csökkent. Mindemellett a Protein G-hez kötődő antitestek azonosított spektrumainak száma nem csökkent a metilezést követően, tehát a módosítás feltehetőleg nem befolyásolta érdemben az antitest kötődési affinitását a Protein G-hez. Ilyen módon az általunk vizsgálni kívánt fehérjék tömegspektrometriás analízise egyszerűsödött és hatékonyabbá vált.

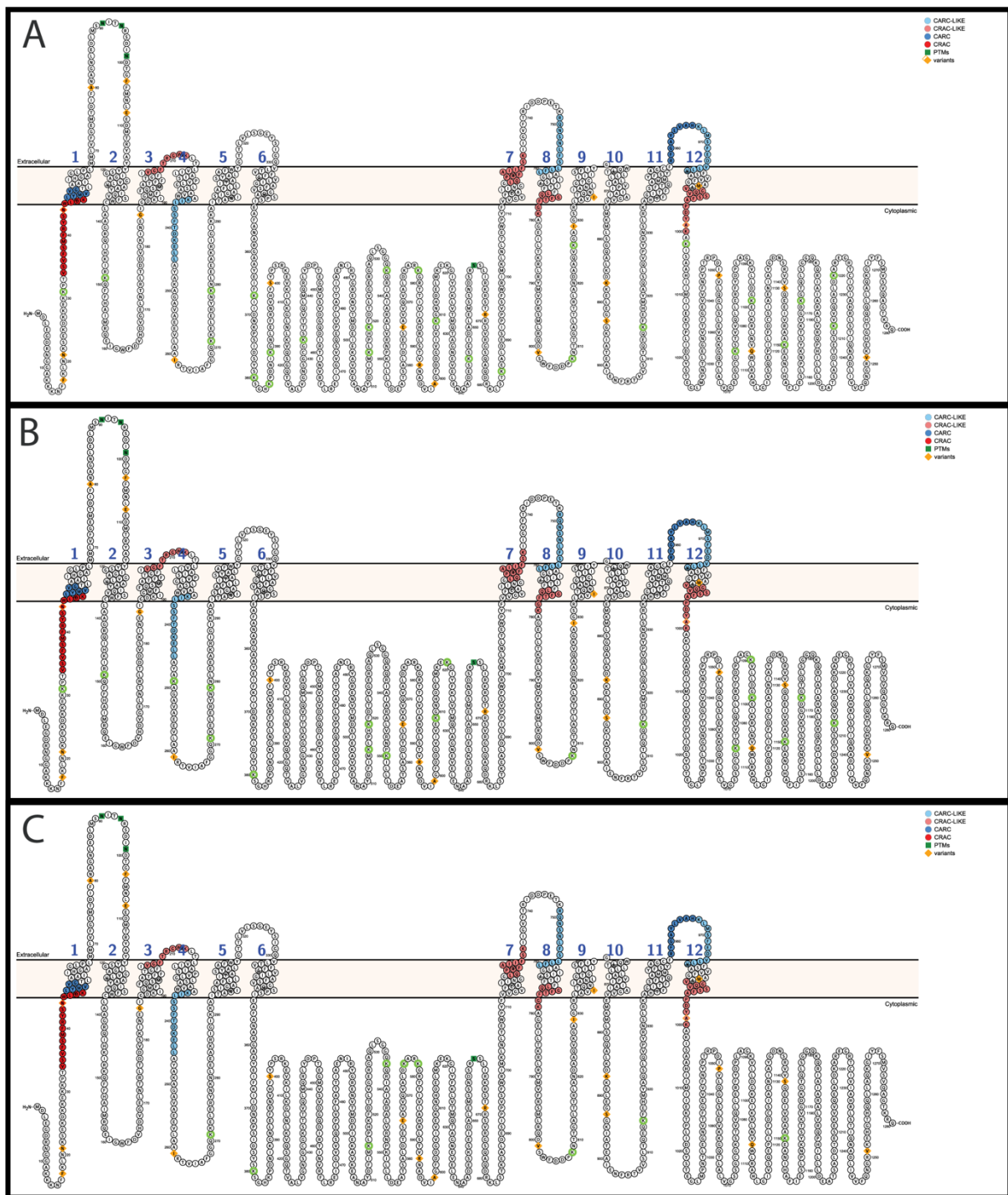
6.2. Azonosított mono-linkek a Pgp-n

Gyakran előfordul, hogy a keresztkötő reaktív csoportjai közül csak az egyik alakít ki kovalens kötést egy lizin amino csoportjával, és a másik reaktív csoport pedig elhidrolizál a semleges pH-jú vizes puffer oldatban. Ezek az úgynevezett mono-linkek sokkal nagyobb koncentrációban keletkeznek a keresztkötésekhez képest, azonban ezen módosítások is hordoznak hasznos információkat. Segítségükkel lehetséges a fehérje hidrofób és hidrofíl szegmenseinek feltérképezése, hasonlóan a hidrogén-deutérium cseréhez (HDX), ezáltal segítve a fehérje térszerkezetének feltérképezését [106].

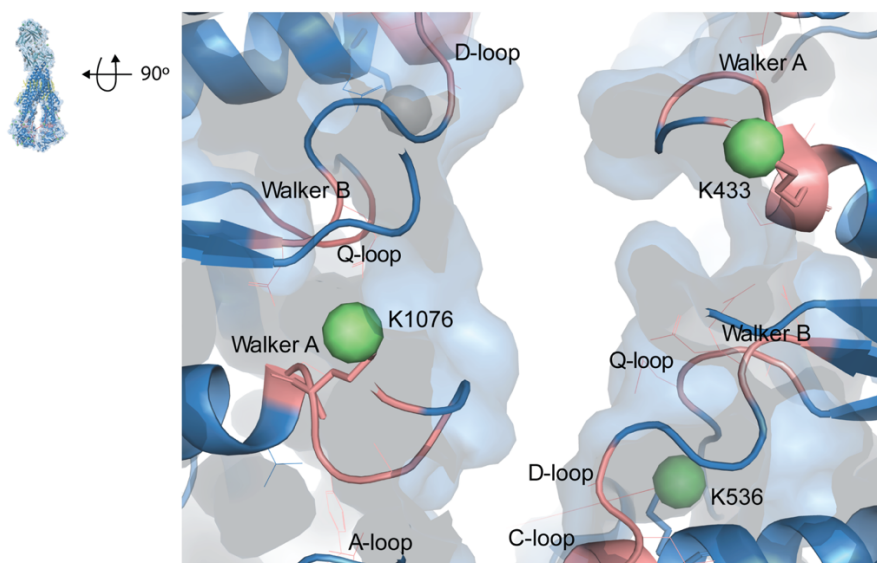
A Protein G gyöngyök felületén DSSO-val keresztkötött minták esetében összesen 28 darab egyedi mono-linket azonosítottunk, míg az élősejtes DSSO kezelés után 19, a BS2G_{d0/d4} hatására pedig 9 db egyedi mono-link került detektálásra a Pgp-n (**18. ábra**). A 15D3 és UIC2 antitesteken 10-10 db mono-linket azonosítottunk a gyöngyös mintaelőkészítési módszerrel. A K271-, K380-, K515-, K808-, K915- és K1150-es lizineket mindhárom módszerrel detektáltuk, ami arra utal, hogy ezek a lizin oldalláncok a legkönnyebben hozzáférhetőek poláris oldószerben. A két NBD-n lévő Walker A régiókon azonosítottunk egy-egy mono-linket a K433-as és K1076-os lizineken a gyöngyös DSSO keresztkötéses módszerrel, illetve a K1076-os mono-linket az élősejtes DSSO módszerrel is megtaláltuk (**19. ábra A, B; 20. ábra**). Közvetlenül a C-motívum (C-loop) mellett található K536-os lizinen is azonosítottunk mono-linket, illetve keresztkötéseket is (lásd **6.3-es fejezet**). A Pgp-n lévő két ATP kötő zseb kialakításában fontos szerepe van az NBD1- és NBD2-n lévő C-motívumnak.



18. ábra: Különböző kísérleti megközelítésekkel azonosított Pgp mono-linkek. Mindhárom módszer esetén a 15D3 és az UIC2 antitestet is alkalmaztuk immunoprecipitációs dúsításhoz. a 34 db egyedi mono-linkből 17.6 %-ot azonosítottunk mind a három módszerrel. Ezen mono-linkek valószínűsíthetően a leginkább vízhozzáférhetőek. A mono-linkek 47 %-a legalább 2 módszerrel azonosítható volt. Ez alapján elmondható, hogy még igen különböző mintapreparálási eljárásokkal is lehet találni számos egyező kémiai módosítást.



19. ábra: Mono-linkék a Pgp-n, Protter 1.0. szoftverrel [29] készített elsődleges szerkezetén ábrázolva. (A) Mono-linkék a gyöngyös DSSO kezelést követően, illetve **(B)** élősejtes DSSO és **(C)** élősejtes BS2Gd₀/d₄ kezelés után detektált mono-linkék. A mono-linkelt lizineket világoszölden emeltem ki. Az ábrán látszanak továbbá a lehetséges koleszterinkötő helyek is (lásd bevezetés). A legtöbb mono-link a gyöngyön keresztbekötött Pgp-n található, melyek közül a K31-es és K1002-es a koleszterinkötő régiókhoz viszonylag közel esik.



20. ábra: A Walker A régiókon található mono-linkék a Pgp 6qex PDB szerkezetén alulnézetből. A mono-linkelt lizin oldalláncok nitrogén atomját zöld labdával emeltem ki. Az ATP-kötő zsebet kialakító régiókat rózsaszínnel emeltem ki.

6.3. Azonosított keresztkötések a Pgp-n

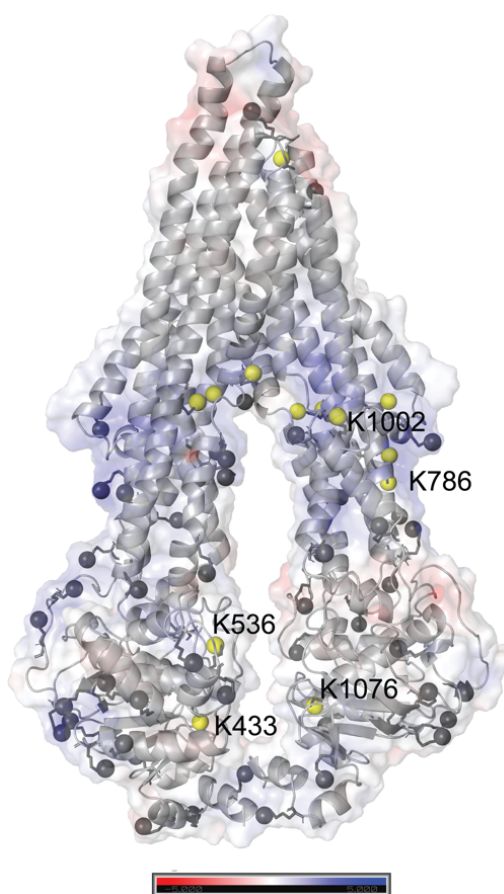
A kevésbé gyakori keresztkötések információt nyújtanak a két keresztkötött aminosav vízhozzáférhetőségéről, továbbá a köztük lévő távolságról. A DSSO és a BS2G a leggyakrabban használt kémiai keresztkötők közé tartozik [109].

CID során alacsonyabb ütközési energia alkalmazásával a szulfoxid mellett lévő C – S kötés felhasad, míg a peptidgerinc fragmentációja csak magasabb energiákon következik be. Ezáltal a DSSO keresztkötés fragmentációja során keletkező jellegzetes ionok segítik a keresztkötés beazonosítását az MS2 spektrumokban. Akár a tömegspektrometriás mérés alatt, az adatrögzítő szoftver segítségével automatikusan felismerhető ezeknek az ionoknak a csúcsa a tömegspektrumban, így DDA során specifikusan kiválaszthatók további fragmentációra és szekvenálásra (MS3) azok a peptidek, amelyeknél a keresztkötésre jellemző csúcsokat azonosítottuk.

A nem hasítható keresztkötők azonosítása nagyobb kihívást jelent, mert ebben az esetben az MS2 fragmentáció során mindkét keresztkötött peptid fragmens ionjai megjelennek egy spektrumon belül (lásd 3.3.2-as fejezet). Kísérleteink során mi a BS2G keresztkötő nem deuterizált (d_0) és négyszeresen deuterizált (d_4) változatait 1:1 arányban alkalmaztuk, így MS1-ben egy karakterisztikus m/z eltolódást kapunk a jelölt és jelöletlen peptidek spektrumai között, ami segíti a keresztkötések biztosabb beazonosítását [158].

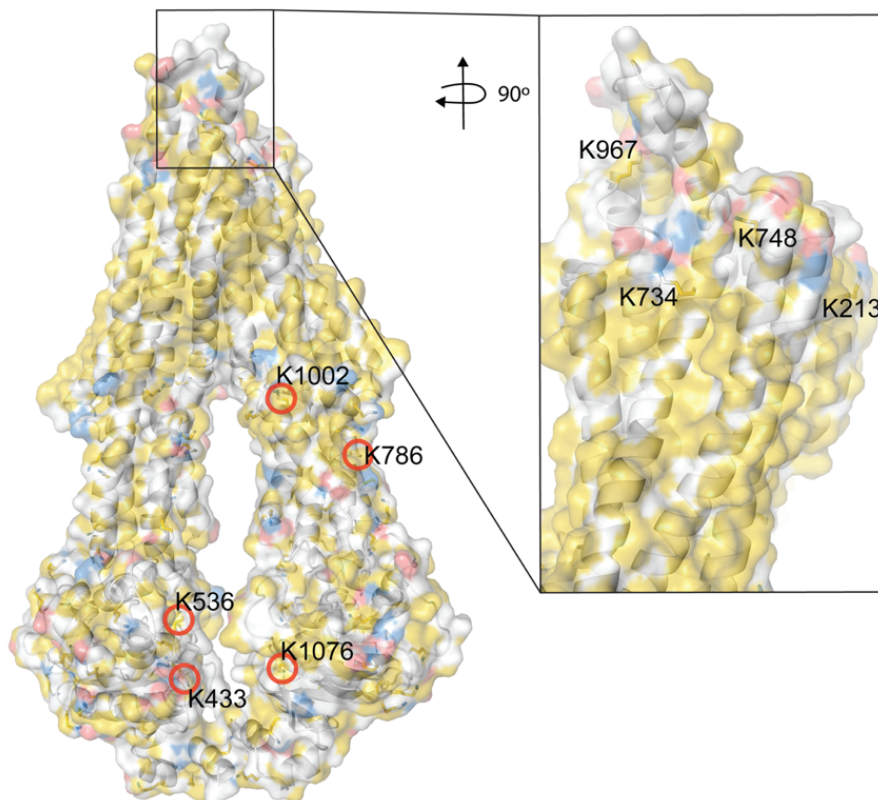
A két általunk használt keresztkötő különböző hidrofóbicitással és távtartó hosszal rendelkezik. Míg a DSSO 7.7 Å hosszú és inkább egy hidrofób, membrán permeábilis vegyület, addig a BS2G 10.3 Å hosszúságú és könnyen vízzoldható. Ezek a különbségek magyarázhatják a különböző mintapreparálási módokkal kapott eltérő eredményeket.

A WESA online program [159] segítségével prediktálni lehet egy adott fehérjében lévő, a víz számára hozzáférhető aminosavakat. Így kaptuk, hogy a Pgp összesen 85 darab lizinje közül 70 a fehérje felületén könnyen vízhozzáférhető, 15 pedig a fehérje harmadlagos szerkezetében beágyazott. A felületen kitett lizinek közül 34-et (49 %) tudtunk keresztkötővel kémiai módon módosítani, az inkább elfedett lizinek közül pedig 5-ön (33 %) detektáltunk keresztkötést vagy mono-linket. Az összes lizin közül így 39 (46 %) reagált valamelyik keresztkötővel az összes mintaelőkészítési eljárást figyelembe véve. Az elfedett lizinek nagy része a membránhoz közel található mind intra- és extracellulárisan (**21. ábra**), a transzmembrán régió pedig víz számára nem hozzáférhető (**22. ábra**). A membrán közelében található, kevésbé vízhozzáférhető lizinek jelölődése a belső üregben, mint például a K826-os lizin, arra utal, hogy a keresztkötő molekulák a Pgp szubsztrátokhoz hasonlóan lépnek be a fehérje belsejébe ott is kialakítva kovalens módosításokat.



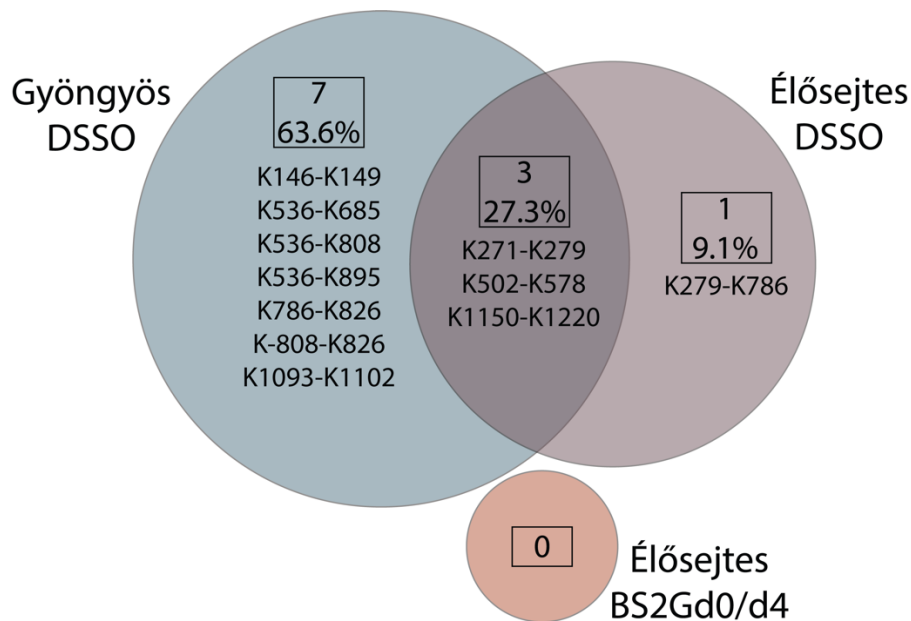
21. ábra: A lizinek vízhozzáférhetősége a Pgp-n. Az elektrosztatikus potenciál eloszlása a befele nyitott Pgp felszínén a 6qex PDB szerkezet alapján. A lizinek oldalláncán lévő nitrogén atomokat szürke

gömbökkel jelöltem, illetve azokat, amelyek a WESA predikciója alapján víz számára kevésbé hozzáférhetőek, sárga színnel emeltem ki. Az 5 darab feliratozott lizinen azonosítottunk keresztkötő által kialakított kémiai módosítást.

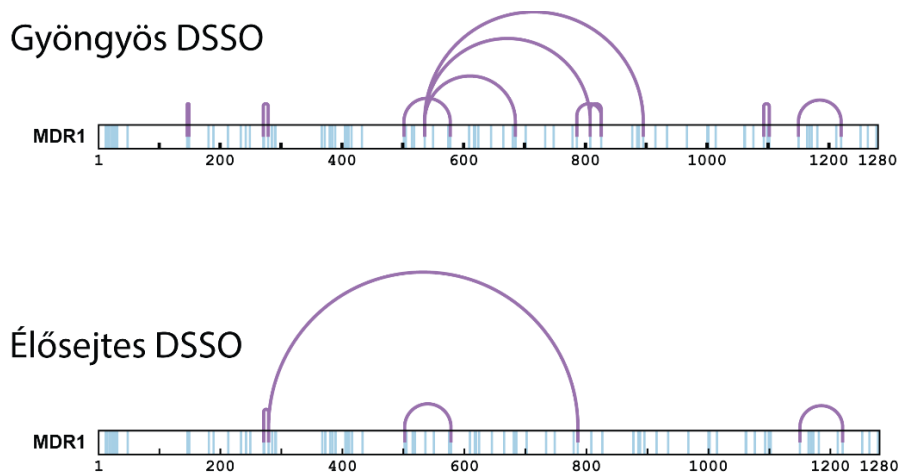


22. ábra: Hidrofóbicitás és töltéseloszlás a Pgp felszínén. Azok a szén atomok, amelyek nem kötődnek sem nitrogénhez sem oxigénhez sárgával, a glutaminsavon és aszparaginsavon lévő negatív töltést hordozó oxigéneket pirossal, a lizinen és argininben lévő pozitív töltésű nitrogéneket pedig kézzel jelöltem [160]. Minden más atom fehér. Piros karikával azokat a lizineket emeltem ki, melyek kevésbé vízhozzáférhetőek, ennek ellenére mégis történt kovalens módosítás ezen régiókon. A nagyítás az extracelluláris lizineket emeli ki, melyek közül a K734- és K967-es lizinek a felületen kitéttek, azonban 15D3 vagy UIC2 kötődés hatására a hozzáférhetőségük gátlódhat.

A keresztkötések nagy részét a gyöngyön keresztkötött mintákban azonosítottuk 10 darab egyedi keresztkötéssel, míg az élősejtes DSSO keresztkötött mintákban 4 darab egyedi keresztkötést, a BS2Gd₀/d₄-kezelt mintákban egy keresztkötést sem azonosítottunk (**23. ábra**, **24. ábra**). Extracellulárisan az UIC2 antitest konstans nehézláncán 1 darab keresztkötést azonosítottunk. Az élősejtes mintákban talált keresztkötések közül mindegyik jelen volt a gyöngyös mintákban is, kivéve egyet, a K279-es és a K786-os lizinek között. Az egyik leggyakrabban azonosított keresztkötést a D-loop közelében lévő K1220-as és K1150-es lizinek között találtuk, mely utóbbi igen gyakran mono-link módosítást is hordozott. A mintapreparálási eljárások közötti különbség okozhat változást a Pgp szerkezetében, így a keresztkötési mintázatok között is lehetnek eltérések.



23. ábra: Különböző kísérleti megközelítésekkel azonosított Pgp keresztkötések. Összesen 11 egyedi keresztkötezt azonosítottunk az általunk alkalmazott módszerekkel. A találatok 27 %-át a gyöngyös DSSO keresztkötezés és az élősejtes DSSO keresztkötezéses eljárással is azonosítottuk. A BS2Gd0/d4 kezelt mintákban egy keresztkötezt sem azonosítottunk.

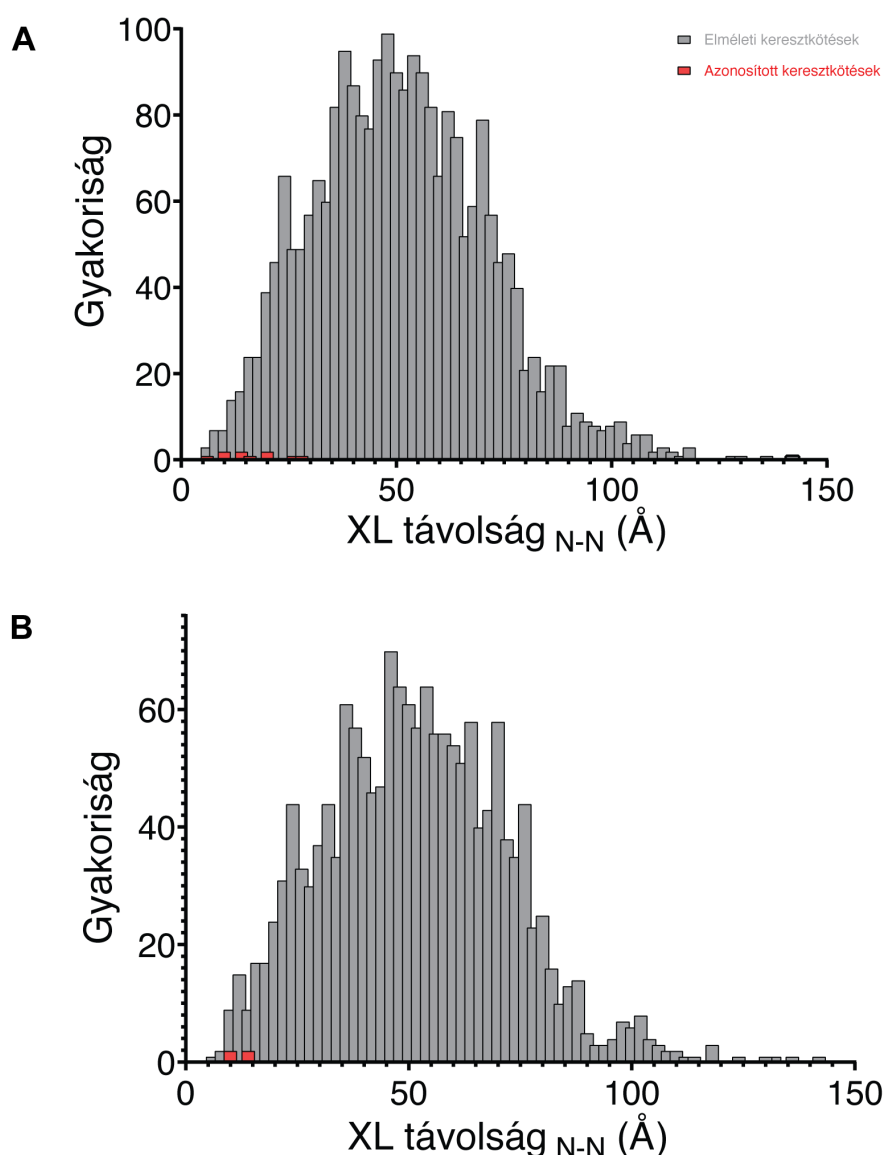


24. ábra: Keresztkötött helyek eloszlása a Pgp lineáris szekvenciáján a különböző mintaelőkészítési módszerek esetén. Minden lizint kék színnel, míg a keresztköteket lila színnel jelöltem.

Nem azonosítottunk egyértelmű keresztkötezt a Pgp és az antitestek között, és közülük egyik sem alakított ki interprotein keresztkötezt fehérje interakciós partnerekkel. Továbbá interprotein keresztkötezt különböző Pgp molekulák között sem azonosítottunk, amit megerősítenek a Western Blottos vizsgálataink, ahol nem azonosítható dimer képződés (**14. ábra**). Tehát a továbbiakban minden keresztkötezt intraprotein keresztkötezésre utal.

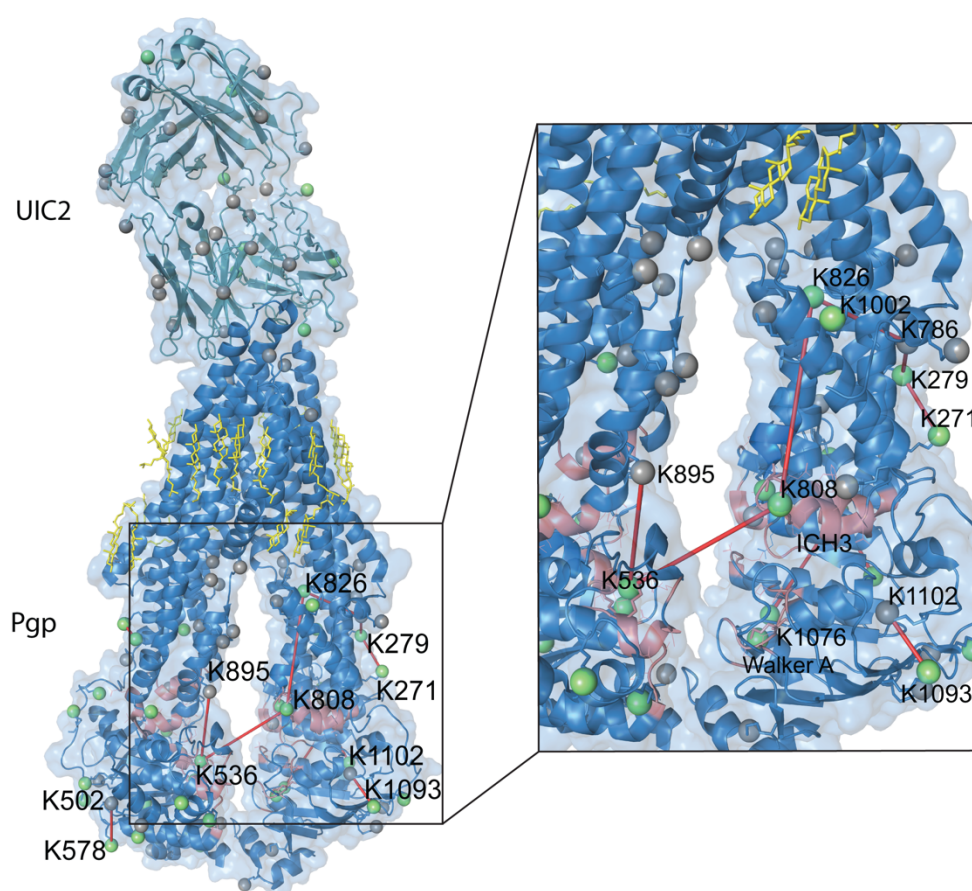
A kísérleteink során azonosított keresztkötések mennyisége nagyságrendileg azonos más kutatócsoportok NHS-észterekkel végzett hasonló keresztkötéses kísérleteihez viszonyítva [95,161], tehát módszerünk megfelelően hatékornak tekinthető.

A keresztkötött lizinek közötti távolságot 5 Å és 30 Å között fogadtuk el korábbi publikációk ajánlásai alapján [102,143]. Ilyen módon minden keresztkötést rá tudunk illeszteni a Pgp 6qex PDB szerkezetére (25. ábra). Mivel a lizinek igen flexibilisek és a fehérjéken általánosságban gyakran előfordulnak mozgékony rendezetlen régiók (IDR), ezért lehet szükséges és releváns egy megengedőbb intervallum a keresztkötők által létrehozott kötés hosszára.



25. ábra: A monolinkelt lizinek ϵ -aminocsoportjai között kialakuló lehetséges keresztkötések távolságának eloszlása (A) a gyöngyös, illetve (B) az élősejtes minták esetén. Az összesen 34 monolinkelt lizin között 561 féle keresztkötést lehetne létrehozni, ám ezek nagy része túl távol helyezkedik el egymástól, vagy sztérikusan akadályozott. Az elméletileg lehetséges keresztkötéseket szürkével, míg a kísérletesen azonosított keresztkötéseket pirossal jelöltem. Minden keresztkötés hossza 5 Å és 30 Å közé esik, ami erősíti eredményeink megbízhatóságát.

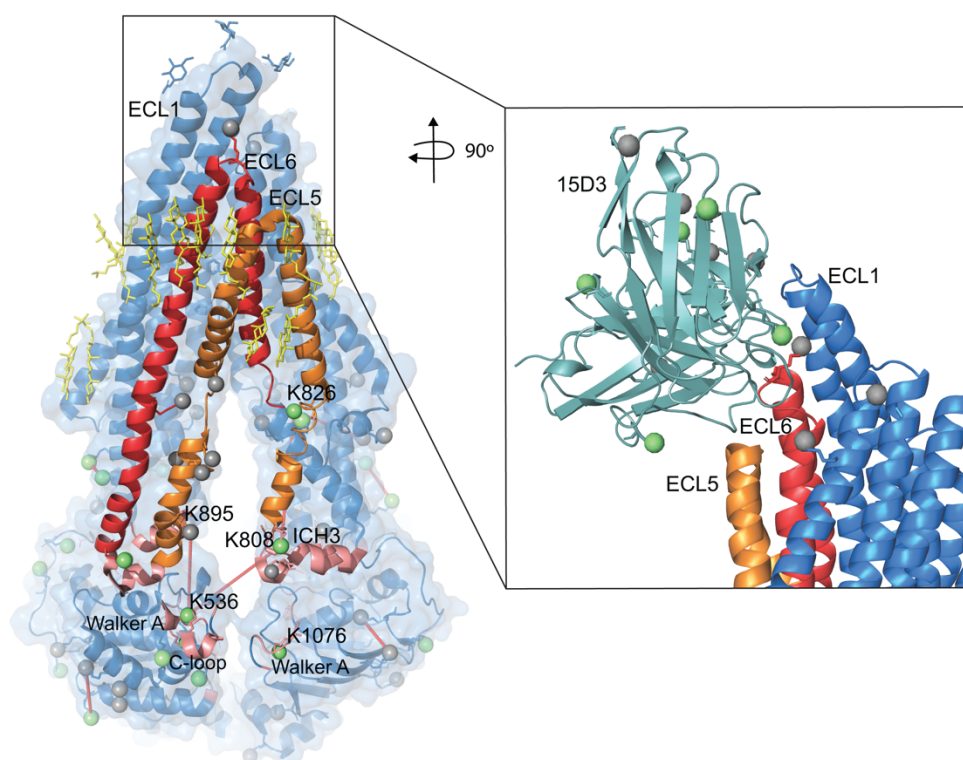
A fehérjék IDR loopjait gyakran nehézkes megtartani a hagyományos szerkezeti biológiai módszerek mintaelőkészítése során. Keresztkötéses tömegspektrometriával több szerkezeti információt kaphatunk ezekről a régiókról is, mivel a keresztkötés a fiziológiás körülményekhez közeli, semleges pH-jú pufferoldatban történik. Kísérleteink során több mono-linket és keresztkötést is találtunk a Pgp rendezetlen régióin. Mono-linkeket azonosítottunk a könyök hélix *N*-terminális részén a K31-es lizinen és a linker régió K645-ös és K685-ös lizinjein. Ezek a régiók mind hiányoznak a Pgp PDB adatbázisban található 6qex krio-EM szerkezetéből [35]. Keresztkötést a linker régió K685-ös és a C-loop mellett található K536-os lizinek között azonosítottunk.



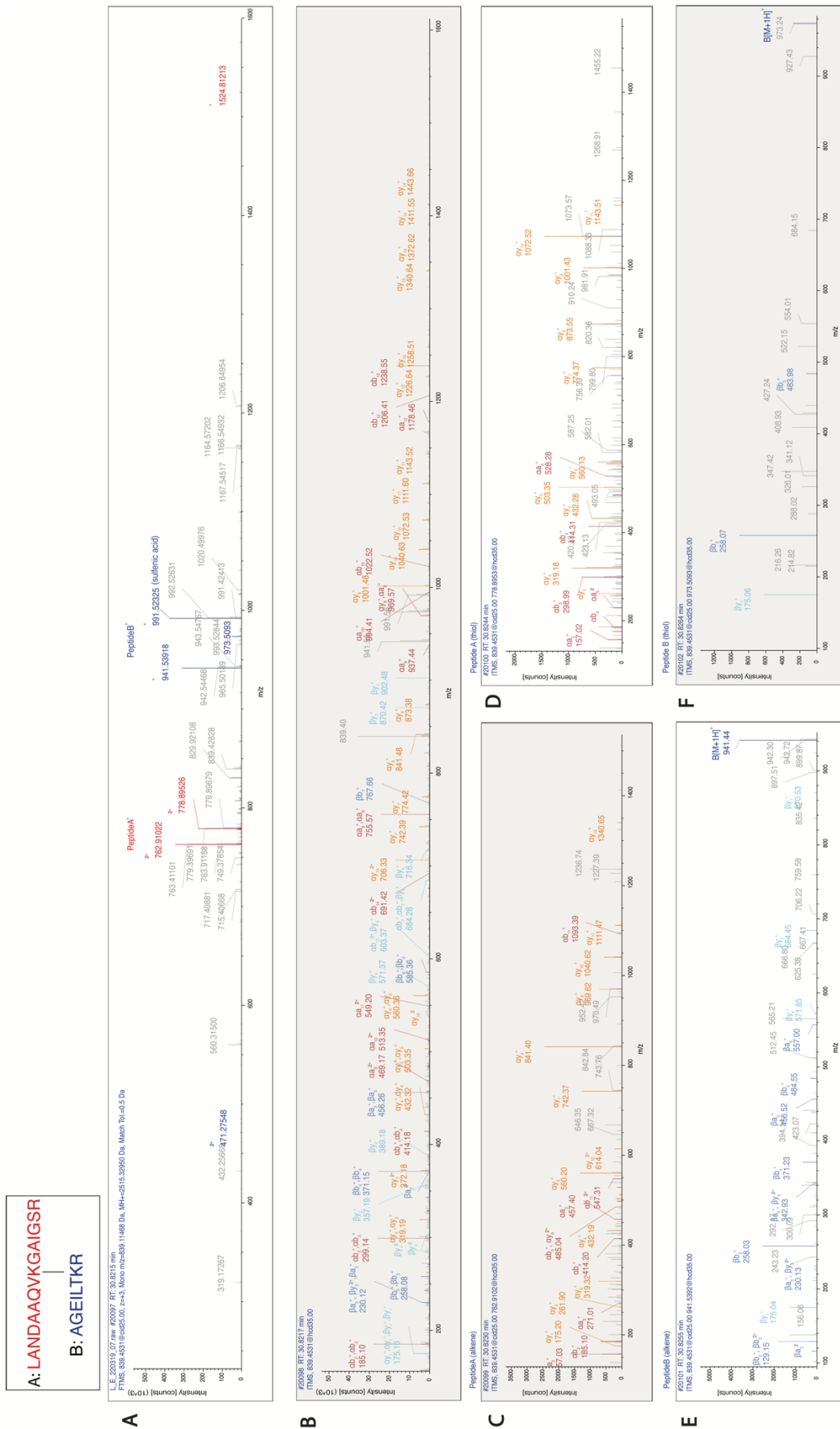
26. ábra: Mono-linkek és keresztkötések az UIC2 antitesttel komplexben lévő befele néző Pgp 3D-s szerkezetén (PDB 6qex) megjelenítve. A mono-linkeket világoszöld labdaként, míg a keresztkötéseket piros vonalakkal emeltem ki. A módosíthatatlan lizineket szürke labdaként tüntettem fel. A koleszterinek és lipidek sárgák. Rózsaszínnel az ATP-kötő helyeket jelöltem. A nagyítás az ICH3-mas hurkot mutatja, mely számos keresztkötésben részt vesz. Az ICH3-mas hurokról korábban leírták, hogy a koleszterin befolyásolja a térszerkezetét.

Kísérleteinkben keresztkötést találtunk a belső üregben lévő K826 és K786-os lizinek között (**26. ábra**) és a K826 és az ICH3 loopon lévő K808-as lizinek között, mely utóbbi az NBD2 felett közvetlenül helyezkedik el, és azzal szoros szerkezeti és funkcionális kapcsolatban

áll. Mindemellett a K808-as lizint keresztkötésben találtuk az NBD1-en lévő C-motívum mellett található K536-os lizinnel is, ami az NBD1-en lévő Walker A régióhoz is közel esik, amelyen szintén azonosítottunk mono-link módosítást. Az ICH4-es hélix az NBD1 felett helyezkedik el közvetlenül, és tőle nem messze az *N*-terminális irányába a K895-ös lizin keresztkötésben volt a K536-tal, továbbá az ICH4 mellett közvetlenül a *C*-terminális irányában a K915-ös lizinen mono-linket azonosítottunk. Tehát a NBD1-en lévő C-motívum közelségben van az ICH4-gyel és a szemközti ICH3-mal, melyek közvetlenül kapcsolódnak az ECL5 és ECL6-os extracelluláris hurkokhoz (**27. ábra**). Ezek a keresztkötött régiók közel esnek a 15D3 antitest prediktált kötőhelyéhez (lásd **6.4-ös fejezet**), továbbá közvetlen közelükben koleszterinek kötődnek a Pgp-hez a transzmembrán régiókban.



27. ábra: Keresztkötött régiók kapcsolata az extracelluláris hurkokkal. Az ECL5-tel közvetlen összeköttetésben lévő ICH3 keresztkötésben van a szemközti C-motívummal, ami keresztkötésben van az ICH4-gyel is. Az ICH4 hélix pedig közvetlen kapcsolatban van az ECL6-os hurokkal. Az ECL5-ös és ECL6-os hurkok körül koleszterinek kötődnek a Pgp-hez a transzmembrán régiókban. Rózsaszínnel az ATP-kötő régiókat és az ICH-kat emeltem ki. Narancssárgával az ECL5-hoz kapcsolódó TMH9-et és 10-et, piros színnel pedig az ECL6-hoz kapcsolódó TMH11-et és 12-t jelöltem. A nagyításban a 15D3 prediktált kötőhelyét emeltem ki, narancssárgával az ECL5-öt és pirossal az ECL6-ot, melyek szerkezete feltételezéseink szerint koleszterin által befolyásolt. A 15D3 antitesten azonosított monolinkeket zöld gömbökkel emeltem ki.

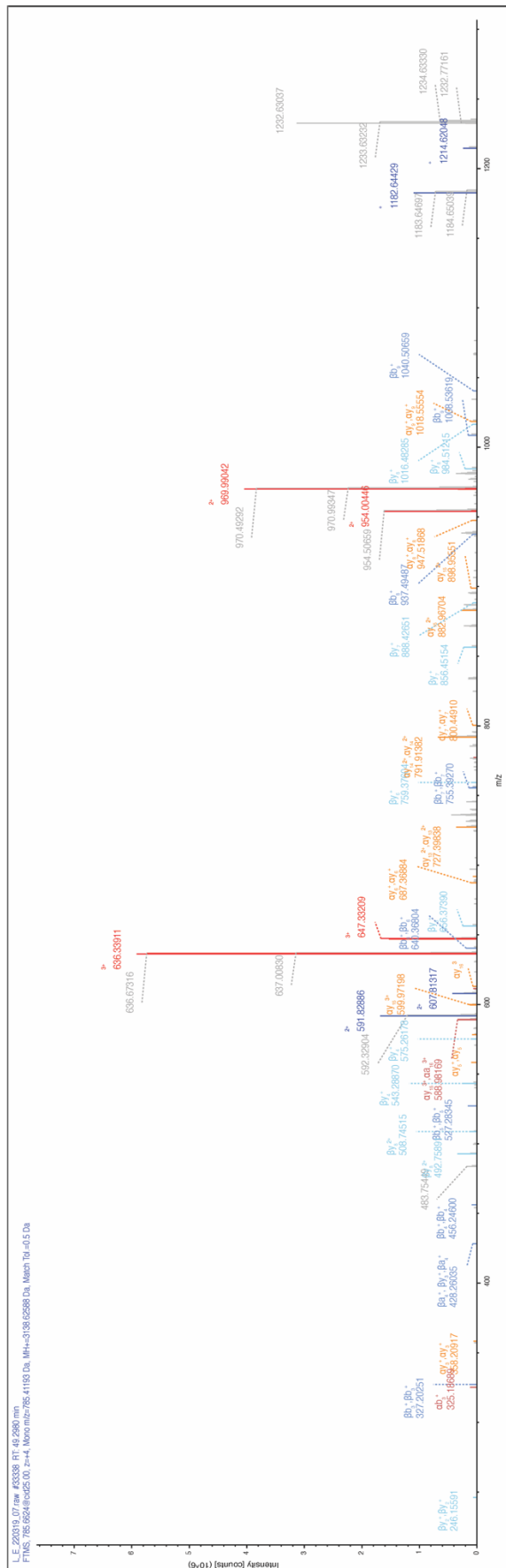


28. ábra: A Pgp-n XlinkX programcsomag által azonosított K786- és K826-os lizinek közötti keresztkötés spektrumai. (A) MS2-CID spektrum, ahol a két keresztkötött peptid jellegzetes csúcsai

dominálnak, melyek a DSSO keresztkötő fragmentációjával keletkeznek. **(B)** MS2-HCD spektrum tartalmazza a két keresztkötött peptid gerincének fragmenseit, mely segíti a peptidek szekvenciájának meghatározását. Az A peptidhez (PeptideA) tartozó *a* ionokat narancssárgával, a *b* ionokat pedig pirossal, míg a B peptidhez (PeptideB) tartozó *a* ionokat sötétkéssel, a *b* ionokat pedig világoskékkel jelöltem. **(C-F)** Az MS2-CID fragmentációval detektált peptid pár MS3-HCD spektrumai. Az A peptid szekvenciáját a **(C-D)** spektrumok igazolják, a B peptid szekvenciáját pedig az **(E-F)** spektrumok segítségével azonosítottuk. Az A peptid szekvenciája: LANDAAQVKGAIGSR [818-832]. A B peptid szekvenciája pedig: AGEILTKR [780-787]. A spektrumok felett kék színnel láthatók az adott spektrumra vonatkozó metaadatok: # spektrumszám, RT retenciós idő, a fragmentáció típusa (CID, HCD) és az ütközés energiája (pl. @cid25), illetve a tömeg analízis helye (FTMS: Orbitrap, ITMS: ioncsapda) és a kiválasztott anyaionok *m/z* értéke látható (pl. 839.4531 *m/z*).

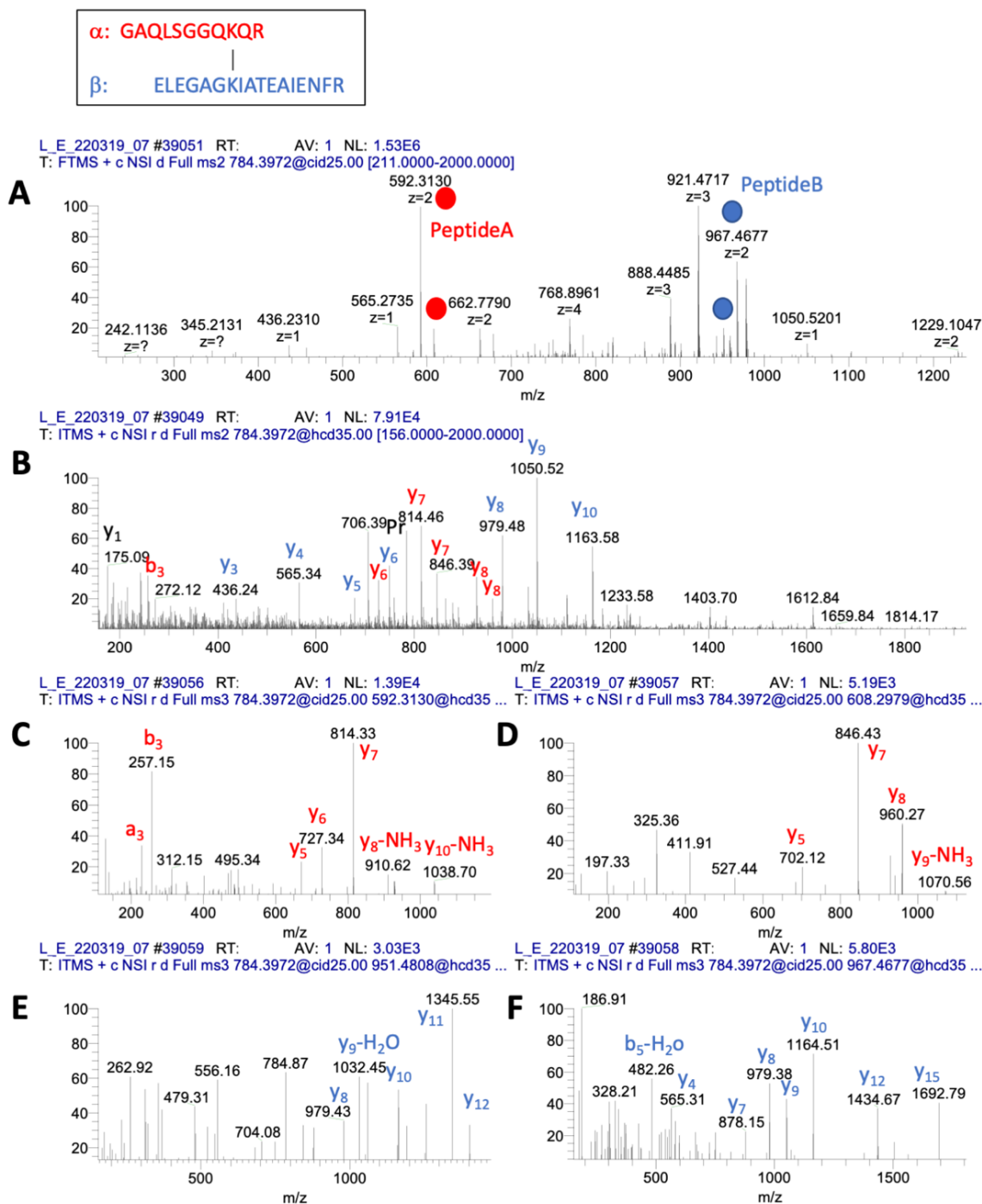
A keresztkötések lekeresését két különböző kiértékelő szoftverrel is elvégeztük. A Proteome Discoverer (v3.0.1.27) XlinkX nevű programja képes a keresztkötött peptidek MS2 és MS3 spektrumait automatikusan összeilleszteni, így segítve a pontosabb azonosítást **(28. ábra)**. Mindemellett lehetséges a keresztkötött peptidek azonosítása az MS2 spektrumon belül is, amennyiben nem csak a DSSO keresztkötés hasad el létrehozva annak jellegzetes csúcsait, hanem a peptidgerinc is fragmentálódik **(29. ábra)**. A másik általunk használt szoftver a Protein Prospector, mely nem illeszti össze automatikusan az összetartozó MS2 és MS3 spektrumokat, így azt manuálisan végeztük el **(30. ábra)**.

A: AAKEANIHFIESLPNK
B: VVOEALDKAR



29. ábra: A Pgp-n XlinkX programcsomag által azonosított K1150- és K1220-as lizinek közötti keresztkötés spektruma. MS2-CID spektrum, melyben dominálnak a két keresztkötött peptid

jellegzetes csúcsai, melyek a DSSO keresztkötő hasadásával keletkeznek, továbbá a két peptidgerinc fragmenseit is tartalmazza, mely segíti a peptid aminosav szekvenciájának meghatározását. Az A peptidhez tartozó *a* ionokat narancssárgával, a *b* ionokat pedig pirossal, míg a B peptidhez tartozó *a* ionokat sötétkékkel, a *b* ionokat pedig világoskékkel jelöltem. Az A peptid szekvenciája: AAKEANIHFIESLPNK [1148-1164]. A B peptid szekvenciája pedig: VVQEALDKAR [1213-1222]. A spektrumok felett kék színnel láthatók az adott spektrumra vonatkozó metaadatok: # spektrumszám, RT retenciós idő, a fragmentáció típusa (CID) és az ütközés energiája (pl. @cid25), illetve a tömeg analízis helye (FTMS: Orbitrap) és a kiválasztott anyaionok *m/z* értéke látható (785.6624 *m/z*).



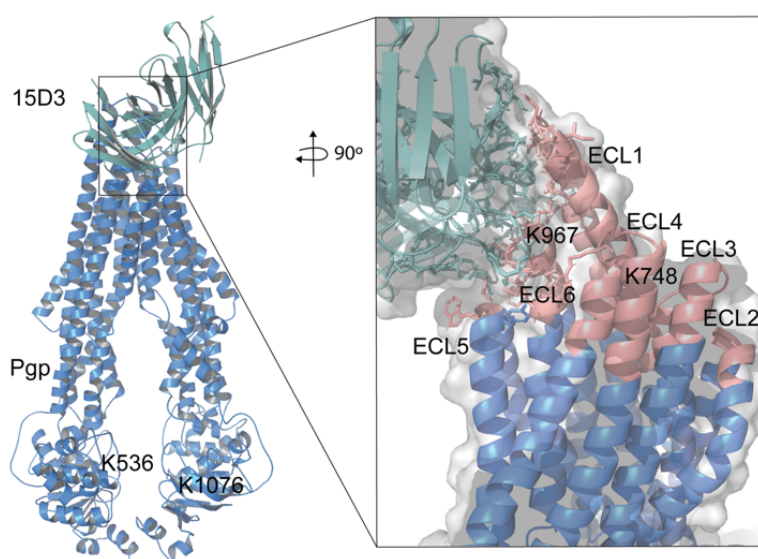
30. ábra: Pgp-n található K536- és K895-ös lizinek közötti keresztkötés spektrumai. A Protein Prospector szoftver által MS3 spektrumokban azonosított módosított peptideket az MS2-ben detektált prekursorokkal egymáshoz rendeltük és a keresztkötéseket manuálisan értékeltük. (A) MS2-CID

spektrum, ahol a két keresztkötött peptid jellegzetes csúcsai dominálnak, melyek a DSSO keresztkötő fragmentációjával keletkeznek. **(B)** MS2-HCD spektrum tartalmazza a két keresztkötött peptid gerincének fragmenseit, mely segíti a peptidok szekvenciájának meghatározását. Az A peptidhez (PeptideA) tartozó fragmenseket pirossal, míg a B peptidhez (PeptideB) tartozó fragmenseket kézzel jelöltem. **(C-F)** Az MS2-CID fragmentációval detektált peptid pár MS3-HCD spektrumai. Az A peptid szekvenciáját a **(C-D)** spektrumok igazolják, a B peptid szekvenciáját pedig az **(E-F)** spektrumok segítségével azonosítottuk. Az A peptid szekvenciája: GAQLSGGQKQR [528-538]. A B peptid szekvenciája pedig: ELEGAGKIAIEIENFR [889-905], ami különbözik a kanonikus Swissprot adatbázisban lévő szekvenciától egy S893A szubsztitúcióval (Pgp természetes variáns). A „Pr” a nem fragmentált prekursor iont jelöli. A spektrumok felett kék színnel szerepelnek az adott spektrumra vonatkozó metaadatok (lásd előző két ábra felirat).

6.4. A 15D3 monoklonális antitest dokkolása a Pgp extracelluláris régióihoz

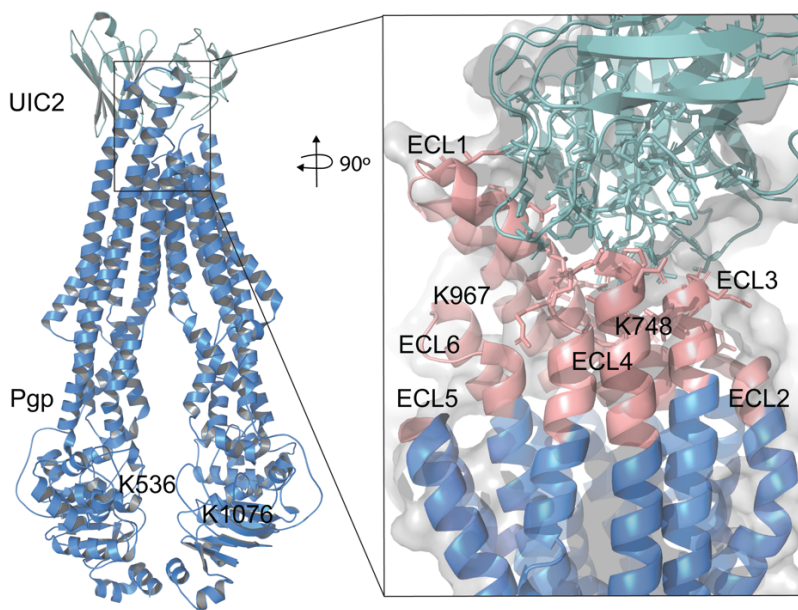
Mivel a 15D3 monoklonális antitest és a Pgp extracelluláris loopjai között nem azonosítottunk egyértelmű keresztkötéseket, így molekuladokkolással igyekeztünk prediktálni a 15D3 kötőhelyét, melynek értelmezését segítették a Pgp-n intracellulárisan azonosított módosítások és korábbi ismereteink a Pgp elleni antitestekről.

A 15D3 mAb variábilis régiójának szerkezetét annak aminosav szekvenciája (Patent US 5849877) alapján becsültük meg az ABodyBuilder2 [150] szoftver segítségével. Ezt a becsült szerkezetet illesztettük a humán Pgp 6qex PDB szerkezetéhez [35] a ClusPro 2.0 [151] webszerveren. Az illesztés alapján a 15D3 antitest komplementaritásért felelős régiói (*complementarity-determining regions*, CDRs) a szubsztrát kötött, befele néző Pgp-n elsősorban az első és hatodik extracelluláris hurkokhoz (ECL1 és ECL6) kerül közel (**31. ábra**). Ehhez képest az UIC2 antitest az első, harmadik és negyedik extracelluláris hurkokhoz dokkol (ECL1, ECL3, ECL4), így a Pgp-t ellenkező irányból megközelítve (**32. ábra**).



31. ábra: A 15D3 monoklonális antitest kötőhelye a Pgp extracelluláris loopjain. A ClusPro 2.0 predikciója alapján a 15D3 az ECL1-hez és az ECL6-hoz kötődik elsősorban, de az ECL5-höz is

közelségbe kerül. A Pgp-t kékkel az antitestet pedig világoszölddel jelöltem. A nagyításban rózsaszínnel jelöltem az extracelluláris térben lévő Pgp régiókat, illetve kiemeltam az interakcióban lévő aminosavak oldalláncait. Látható, hogy a potenciálisan keresztköthető K967-es lizin a 15D3 által fedésbe kerül, így az oldószerben lévő keresztkötő ágens számára elérhetetlenné válik.



32. ábra: Az UIC2 monoklonális antitest kötőhelye a Pgp extracelluláris loop-jain. A 6qex PDB fehérjeszerkezet alapján az UIC2 az ECL1-hez, az ECL3-hoz és az ECL4-hez kötődik, a 15D3 prediktált kötőhelyéhez képest ellentétes oldal felől. A Pgp-t kékkel az antitestet pedig világoszölddel jelöltem. A nagyításban rózsaszínnel jelöltem az extracelluláris térben lévő Pgp régiókat, illetve kiemeltam az interakcióban lévő aminosavak oldalláncait. Látható, hogy a potenciálisan keresztköthető K748-as lizin az UIC2 kötőhely közelében van, így az oldószerben lévő keresztkötő ágens számára kevésbé könnyen hozzáférhető lehet.

Tehát a koleszterin függő 15D3 az ECL5 és ECL6 felől, az ECL1-het is érintve közelíti meg a Pgp extracelluláris részét. Ezen loopokkal összeköttetésben lévő intracelluláris régiók között azonosítottunk keresztkötéseket és mono-linkeket, melyeket a **6.2-es és 6.3-as fejezetekben** ismertettem.

6.5. A P-glikoprotein fehérjepartnereinek azonosítása keresztkötéssel és immunoaffinitás kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával

A Pgp számos ismert fehérjepartnerét azonosítottuk tömegspektrometriásan immunoprecipitációs kísérleteinkben.

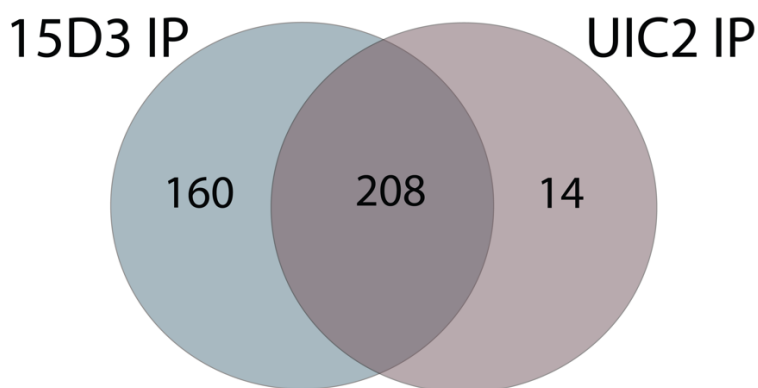
Noha keresztkötést nem azonosítottunk a Pgp és egyéb fehérjék között, mivel a dúsítás után kilencszer mostuk intenzíven a mágneses gyöngyöket RIPA pufferrel, feltételezhetően nem sok szennyező és gyenge interakciós partner maradt a gyöngyökön. Ezt bizonyítja, hogy a

szarvasmarha szérumból albumint (BSA), amivel a protein G mágneses gyöngyöket blokkoltuk az immunoprecipitáció előtt, a mosást követően csak relatíve alacsony SPC-vel detektáltuk a mosást követően.

Kísérleteinket humán *mdr1* génnel transzfektált NIH 3T3 egér fibroblaszt sejteken végeztük, így feltételezhető, hogy az általunk azonosított ismert partnerek olyan konzervált szekvenciák mentén kapcsolódnak, melyek a humán és egér proteómban megegyeznek.

A gyöngyön keresztbekötött minták esetén egy nagyságrenddel több fehérjét azonosítottunk az élősejtes mintákhoz képest, mivel a gyöngyös minták esetén a protein G fehérje zavaró hatását csökkentettük a redukív metilezéssel (lásd **6.1.3-es fejezet**).

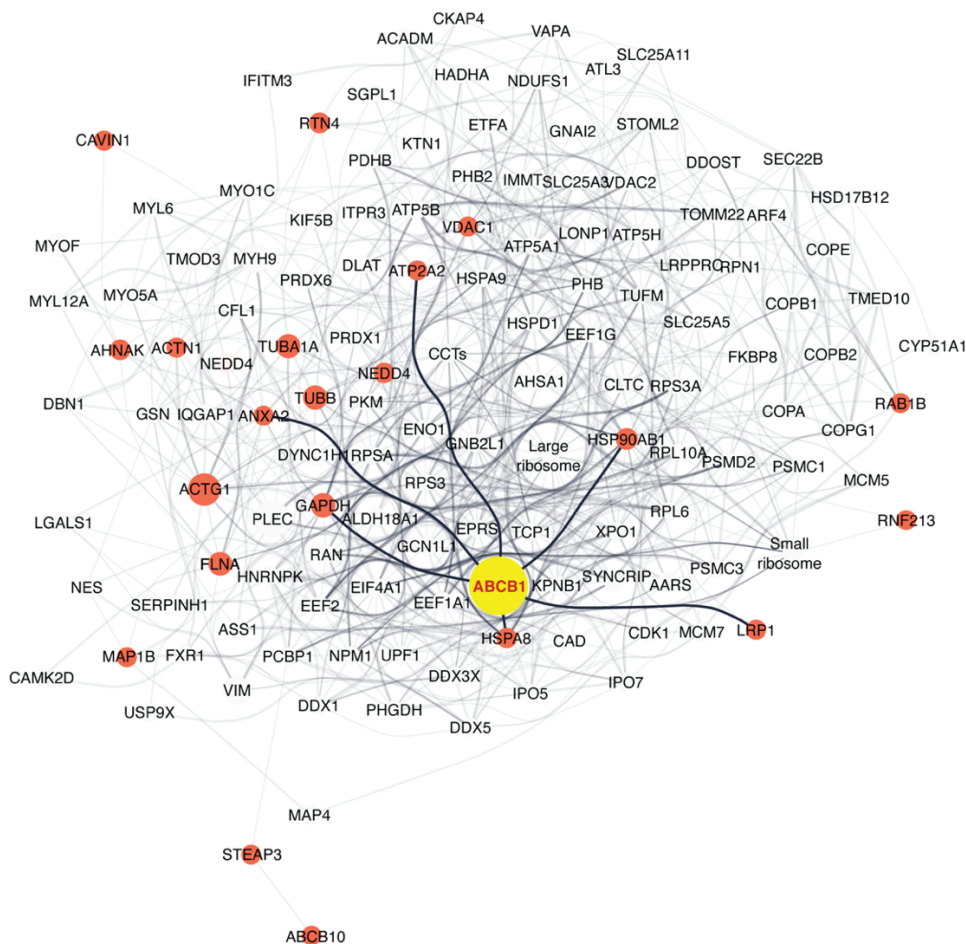
Gyöngyös mintáink esetén a 15D3 antitesttel való dúsítás esetén 368 fehérjét, az UIC2-vel pedig 222 fehérjét azonosítottunk tömegspektrometriásan legalább 10 SPC-vel. Ezek közül 208 fehérje mindkét fajta mintában azonosításra került (**33. ábra**). A 15D3 antitest, mivel a katalitikus ciklustól függetlenül kötődik a Pgp-hez, valószínűleg többféle fehérjepartnerrel tud dúsítani még úgy is, hogy az UIC2 körülbelül 7-szer több Pgp-t tudott dúsítani az azonosított SPC-k alapján. Ez utóbbi jelenség oka lehet, hogy a 15D3 antitest kötődési affinitását csökkentette az alapvetően koleszterin-depletált közeg, a membránpreparált mintában. Ezzel ellentétben az UIC2-t nem befolyásolta a membránpreparáció következtében kialakult koleszterinszint változás, mindazonáltal csak a befele néző szubsztrát kötött konformációt ismeri fel, ezért csak azokat a fehérjéket tudtuk így tisztítani, amelyek ehhez a konformációhoz kötődnek.



33. ábra: Tömegspektrometriásan azonosított fehérjetalálatok összehasonlítása a 15D3 és az UIC2 extracelluláris anti-Pgp antitestekkel való immunoprecipitációs (IP) dúsítást követően. A 15D3 monoklonális antitest feltehetőleg azért tudott többféle fehérjét dúsítani, mert a Pgp-hez annak katalitikus ciklusától függetlenül képes kötődni.

A fehérjelisták alapján hálózatelemzést végeztem a STRING adatbázis [162] és a Cytoscape [163] szoftver felhasználásával. A hálózatok megrajzolása kísérleti és predikciós

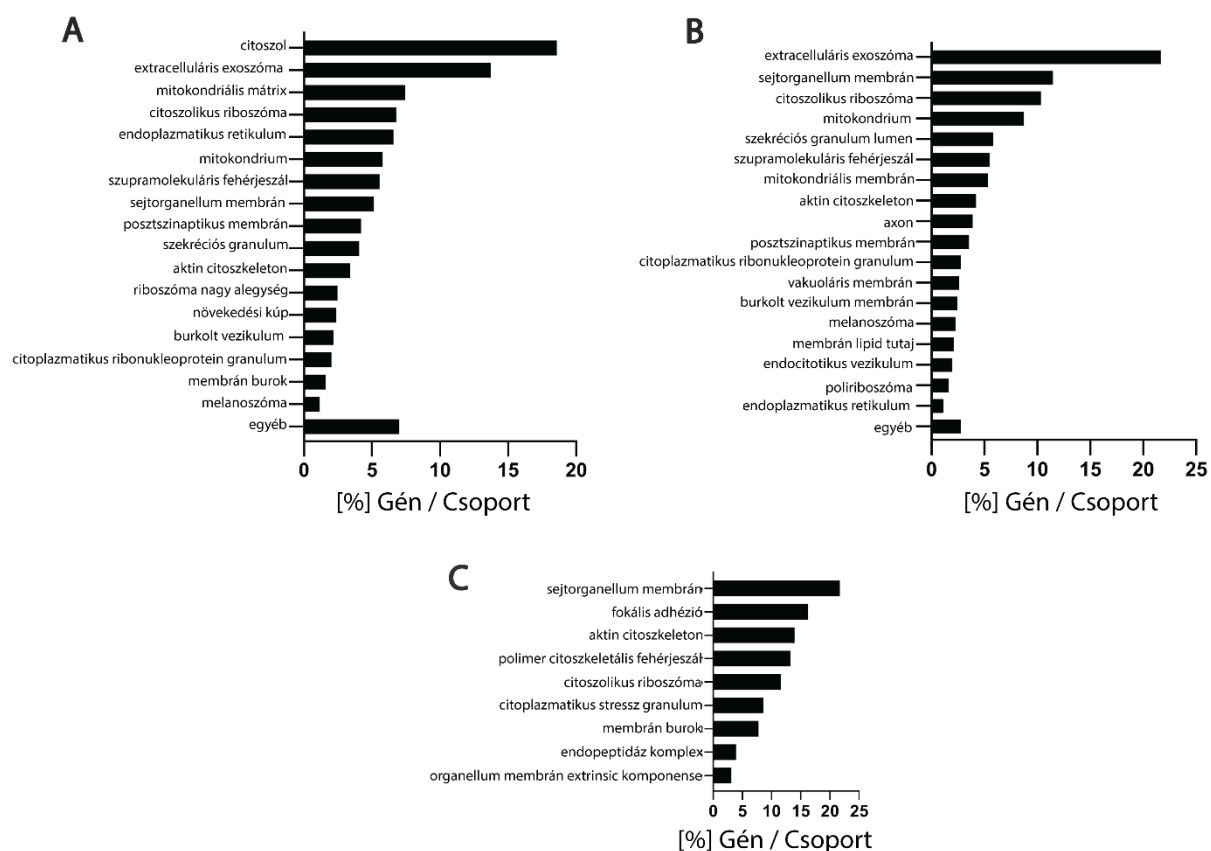
MDR-ban résztvevő Pgp interakciós partnereket pedig narancssárga színnel emeltem ki, ezen fehérjék szomszédait halvány szürkével. A csomópontok mérete arányos az egyes fehérjék normalizált SPC-je alapján szemikvantitatíven becsült mennyiségükkel. A riboszóma és proteoszóma alegységek, illetve a dajkafehérje sokalegységes komplex (*chaperonin-containing T-complex*) komponenseit egy-egy csomópontként jelenítettem meg azért, hogy a hálózat komplexitását csökkentsem. A 15D3-mal való dúsítással 368 darab fehérjét tudtunk azonosítani legalább 10 SPC-vel, melyek közül sokról leírták, hogy működése koleszterin által befolyásolt.



35. ábra: Az UIC2 antitesttel dúsított fehérjék interakciós hálózata. A hálózatrajzolást a STRING adatbázis [162] és Cytoscape [163] szoftver felhasználásával végeztem. A Pgp-t sárga színnel, az ismert MDR-ban résztvevő Pgp interakciós partnereket narancssárga színnel emeltem ki, ezen fehérjék szomszédait pedig halvány szürkével. A csomópontok mérete arányos az egyes fehérjék normalizált SPC-je alapján szemikvantitatíven becsült mennyiségükkel. A riboszóma és proteoszóma alegységek, illetve a dajkafehérje sokalegységes komplex (*chaperonin-containing T-complex*) komponenseit egy-egy csomópontként jelenítettem meg azért, hogy a hálózat komplexitását némileg csökkentsem. Az UIC2-vel való dúsítással 222 darab fehérjét tudtunk azonosítani legalább 10 SPC-vel.

A Cytoscape a hálózatmegjelenítésen kívül alkalmas a funkcionális, illetve sejtkompartment-eloszlás elemzésre is, melyekre különböző applikációk állnak rendelkezésre. Az általam használt ClueGO program [164] a megadott fehérjelistát génontológiai (*gene ontology*, GO) besorolás (*The Gene Ontology Consortium* 2013) alapján rendezi csoportokba

azok sejten belüli lokalizációja (*cellular component*) szerint. A szoftver a csoportokban leginkább feldúsult, statisztikailag szignifikánsan gyakrabban előforduló fehérjéknek megfelelő GO sejt-kompartment elnevezéseket listázza, és opcionálisan megjeleníti a csoportokhoz rendelt gének (fehérjék) százalékos arányát az összes lekérdezett és csoportosított fehérjéhez képest (36. ábra). Egy fehérje több GO sejt-kompartment csoportosításhoz is tartozhat, ezért mivel viszonylag egy nagy adatbázisban kívántam dolgozni, a kiértékeléshez felhasználtam a program redundancia csökkentésére szolgáló statisztikai számításait.



36. ábra: A (A) 15D3 és (B) UIC2 monoklonális antitestekkel dúsított Pgp partnerek sejt-kompartment eloszlása, (C) a 15D3-mas dúsítás során talált 160 egyedi fehérje kompartmenteloszlása. A statisztikai elemzést a Cytoscape ClueGO [164] applikációjával végeztem az opcionális redundancia csökkentés (*fusion*) beállításával.

7. Megbeszélés

A membránba ágyazott Pgp szerkezete és működése nagyban befolyásolt a membránkörnyezetben lévő koleszterin [55,56,131] és egyéb lipidek [32] által. A Pgp-hez direkt módon kötődik koleszterin nem csak a lipid tutajok és kaveolák közelében, és befolyásolja annak intracelluláris és extracelluláris térszerkezetét is [62,165].

Kísérleteink célja elsősorban az volt, hogy meghatározzuk a Pgp extracelluláris régióhoz koleszterin jelenlététől függően kötődő 15D3 monoklonális antitest epitópját, s ezáltal fényt derítve arra, hogy a koleszterin mely extracelluláris régiók térszerkezetét befolyásolja. Vizsgálatainkhoz az XL-MS módszert választottuk. Ezzel az eljárással lehetőségünk nyílt a membrán mikrokörnyezet megtartása mellett vizsgálni a Pgp-t. Módszereink optimalizálása után két fő kísérletes megközelítési módot követtünk: (i) Élő sejteket kezeltünk DSSO vagy BS2Gd₀/d₄ keresztkötőkkel, majd egy ikerionos detergens felhasználásával membrán preparálást végeztünk, és 15D3 vagy az UIC2 antitestek felhasználásával immunoprecipitációval dúsítottuk a keresztkötött komplexeket. (ii) A sejteken először membrán preparálást végeztünk, ezután a 15D3 vagy az UIC2 antitestek segítségével immunoprecipitációval tisztítottuk a Pgp-t, majd a gyöngyök alapos mosását követően hajtottuk végre a keresztkötési reakciót a gyöngyökön. Az élősejtes keresztkötés során egyértelmű, hogy a fiziológiásan előforduló koleszterin hatása jelen van a fixálás alatt. A gyöngyös keresztkötés során azonban ez a természetes koleszterin mennyiség csökkenhet. Az általunk használt membrán preparálási eljárás során a Pgp közvetlen közelében lévő koleszterinek egy része elvész, de mivel az immunoprecipitáció működött a 15D3 antitesttel, – még ha az UIC2-höz képest csökkent mértékben is – feltételezhetően marad olyan Pgp is a rendszerben, amihez kötve marad koleszterin. A kísérleteinkben azonosított módosítások alapján a két eljárás körülbelül 40 %-ban fed át, ami erősíti, hogy mindkét módszer alkalmas lehet a Pgp szerkezetének vizsgálatára. A gyöngyös minták esetén ugyanannyi egyedi mono-linket azonosítottunk, mint az élősejtes mintákban (DSSO és BS2Gd₀/d₄ kezelést együttvéve), keresztkötést viszont 60 %-kal többet azonosítottunk a gyöngyös eljárással előkészített mintákban. Ezen jelenségnek az oka valószínűleg az, hogy az élősejtes minták esetén a keresztkötő molekulák egy része elhidrolizál, amíg a sejtbe belép, illetve, hogy a membrán felületén lévő lizinekhez a membrán zavaró hatása miatt nem fér hozzá. Ezzel szemben a gyöngyös minták esetén a keresztkötő rövidebb úton eljut a Pgp-hez, és ki tud alakítani kovalens kötést az egymáshoz közelségben lévő lizin oldalláncok között.

A két mintaelőkészítési módszer együttes alkalmazásával lehetőségünk nyílik arra, hogy összehasonlítsuk a csökkent koleszterinszinttel vagy a megváltozott lipidösszetétellel rendelkező környezet (gyöngyös eljárás) hatásait a fehérje szerkezeti változásaira, a teljesen fiziológiás koleszterin környezetben lévő Pgp szerkezetéhez képest (élősejtes eljárás).

A mono-link módosítások segíthetik a Pgp szerkezetváltozásainak tanulmányozását a fiziológiás körülmények megtartása mellett, mivel információt nyújtanak a víz számára hozzáférhető lizinekről. A Walker A régiók — ahol találtunk mono-linkeket az élő sejtes és gyöngyös minták esetén is — szerkezetének és funkcióinak megértése céljából intenzív kutatások folynak [44,166,167]. Az általunk azonosított mono-linkelt lizinek többségét korábban már leírták, hogy HDX során deuterizálódtak [45], ami alátámasztja, hogy a mono-linkek valóban információt szolgáltatnak a vízhozzáférhetőségről. Mindemellett azonosítottunk olyan módosított lizin reziduumokat is (K411, K550, K1093, K1099 és K1212), melyekkel kapcsolatosan HDX módszer segítségével megállapították, hogy vízhozzáférhetőségük, tehát térbeli orientációjuk, a membránban jelenlévő koleszterin által befolyásolt [131]. Továbbá a mono-linkelt K1002-es lizin, mely összeköttetésben van az ECL6-tal közel helyezkedik el egy CRAC-szerű doménhez, ahol krio-EM-val valóban meghatároztak kötődő koleszterint (**26. ábra**) [35]. Bár a HDX és krio-EM technikákkal már betekintést nyerhettünk a Pgp szerkezetének működésébe, de ezen módszerek nem adnak információt a reziduumok elmozdulásának egymáshoz viszonyított kapcsolatáról, illetve teljesen hiányoznak a flexibilis régiók, tehát nincs információ azok dinamikájáról. Ezen kívül ezeket a kísérleteket gyakran rekombináns egér Pgp-n végzik el humán Pgp helyett, mely utóbbit nehezebb úgy izolálni, hogy megmaradjon annak eredeti feltekeredése. Még ha lipid nanodiszkokba építik is ezen rekombináns fehérjét, csak egy közelítő modellt állít a fiziológiás lipid és koleszterin közegekről. Az általunk használt módszerek az előbb említetteknél jóval robusztusabbak, tehát egyszerűen követhetők, és viszonylag gyorsan elvégezhetők, így könnyebben reprodukálhatóvá válnak eredményeink. Ilyen módon egy közel fiziológiás közeget fenntartva tudunk módosított reziduumokat azonosítani, melyek, mint világítótornyok jelzik a lipidkörnyezet modulációjára jelentkező szerkezetváltozás pontjait.

Az általunk detektált keresztkötések a Pgp intracelluláris oldalán helyezkednek el, számos közülük a nehézkesen vizsgálható ATP-kötő zsebeket kialakító régiókon és a linker peptiden található. A K536-os és K685-ös lizinek közötti keresztkötés kiegészítheti a linker orientációjával kapcsolatos kutatásokat [168], segítheti a Pgp szerkezetével kapcsolatos predikciós számításokat, melyek eredményei egyelőre ellentmondásosak [36]. A linker régióról

ismert, hogy számos konzervált foszforilációs helyet tartalmaz, nagy affinitással kötődik a tubulinhoz, illetve valószínűleg szerepe van a katalitikus ciklusban is [34]. Mivel a K536-os lizin közvetlenül az NBS2-n lévő C-loop mellett helyezkedik el, ez a keresztkötés megerősíti azt az elképzelést mely szerint a linker kapcsolatban van az NBD-kel és szabályozza az ATP-hidrolízist és a szubsztrát specificitást [33].

A K826-os lizin molekuladinamikai számolások és IM-MS kísérletek szerint elektrosztatikus interakcióban van foszfolipidek foszfát csoportjával [169]. A mi kísérleteinkben a K826-os lizin keresztkötésben volt a K786-os lizinnel és az ICH3-mas hélixen lévő K808-as lizinnel (**26. ábra**). Nanodiszkekbe ágyazott Pgp-n, HDX mérésekkel megállapították, hogy az NBD2-n nyugvó ICH3-mas hélix koleszterin jelenlétében védetté válik deutérium cserével szemben [131]. A K808-as lizint keresztkötésben találtuk még az NBD1-en lévő C-motívum melletti K536-tal, ami közel esik a Walker A régióhoz is, továbbá keresztkötésben volt az ICH4 mellett elhelyezkedő K895-tel. A Walker A régióról és az ICH4-ről ismert, hogy lipidek jelenlétében interakcióba lépnek egymással [32]. Az NBD1-en nyugvó ICH4-es hélix közvetlen összeköttetésben van az ECL5-tel és ECL6-tal a TMH10- és TMH11-en keresztül, továbbá Clouser és mtsai. kimutatták, hogy koleszterin jelenlétében könnyebben deuterizálódik, ellentétben az ICH3-mal, ami nehezebben megközelíthetővé vált [131]. A Pgp ezen régióin azonosított keresztkötések párhuzamban vannak azon korábbi eredményekkel, melyek bizonyítják, hogy a koleszterin és a membrán összetétele komplex módon hatással van a Pgp intracelluláris szerkezetére is és annak megfelelő működésére. A koleszterinekkal körbevett ECL5 és ECL6 [35] a transzmembrán régiókon keresztül közvetlenül kapcsolódnak az ICH3- és ICH4-es hélixekhez, amik aszimmetrikus módon elmozdulnak koleszterin jelenlétében. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy az ECL5 és az ECL6 térbeli orientációja is megváltozik koleszterin hatására (**27. ábra**).

Érdekes módon, a D-loop térszerkezete is koleszterin érzékeny [131], aminek a közelében lévő K1220-as lizin keresztkötésben volt a K1150-es lizinnel, ami a legkönnyebben hozzáférhető volt az általunk használt keresztkötők számára. A kísérleteink során azonosított keresztkötött lizinek mindegyikéről leírták korábban, hogy deuterizálható HDX kísérletek során, ezek alapján ezen lizinek valóban hozzáférhetőek a vizes pufferben oldott keresztkötők számára is [45].

Az élő sejtes kísérletek esetén a natív lipidkörnyezet érintetlenül fennmarad a keresztkötéses reakció alatt, de a keresztkötő reagensek hamarabb elhidrolizálnak, mintsem, hogy elérjenek egy lizint a vizsgálni kívánt fehérjén. Így ebben az esetben kevesebb információt tudunk kinyerni. A gyöngyös keresztkötéses módszer kevésbé tartja meg a natív környezetet,

bár az általunk használt ikerionos detergens valamennyi lipid molekulát meghagy a Pgp körül, így az nem veszi el ATPáz aktivitását [49]. A kétféle eljárással kapott mono-link és keresztkötés azonosítások hasonlósága (**18. ábra, 23. ábra**) arra enged következtetni, hogy a gyöngyön történő keresztkötéses eljárás is ugyanúgy alkalmas membránfehérje-szerkezet vizsgálatra.

Kísérleteink betekintést nyújtanak abba, hogy a krisztallográfia és a tömegspektrometria módszereivel (XL-MS, HDX-MS, IM-MS) kapott eredmények hogyan egészítik ki egymást még akár a bonyolult, membránfehérjék feldolgozása során kapott adatok esetén is.

Molekuladokkolásos predikciónk alapján a 15D3 antitest az ECL1-es és az ECL6-os hurkok közelében kötődik (**31. ábra**). A 15D3 a katalitikus ciklus szerkezetváltozásaitól függetlenül kötődik a Pgp-hez, így a 15D3 nagy valószínűséggel olyan extracelluláris hurkokhoz kell, hogy kötődjön, amik az egész ciklus során közel maradnak egymáshoz. Az ECL1-es és ECL6-os loopok valóban közel esnek egymáshoz és a Pgp fő szerkezetváltozásai ezt nem befolyásolják. Mindemellett ismert, hogy a 15D3 és az UIC2 egymással részben átfedő epitópokhoz kötődik, így ha a 15D3 egyik kötőhelye az ECL1-en helyezkedik el, az megmagyarázza a két antitest közötti kompetíciót [62].

Az élősejtes kísérletekben azonosított mono-linkek közül csupán kettő esik a linker-ICH3-ICH4 régiókra. Ezek a mono-linkek megtalálhatóak a gyöngyön keresztkötött mintákban is, illetve ebben az esetben még három további mono-link (K645, K685, K626) és öt keresztkötés (**18. ábra, 23. ábra**) is azonosításra került ezeken a régiókon. Ezen különbségekből arra következtethetünk, hogy a kétféle módszerrel előkészített Pgp szerkezetében jelentkezhettek átrendeződések. A mono-linkek és keresztkötések gyakoribb elhelyezkedése a linker-ICH3-ICH4 régiókon a koleszterin-csökkentett gyöngyös keresztkötéses mintákban jelezheti, hogy ezen régiók koleszterin érzékeny módon elmozdulnak. Mint ahogy azt korábbi HDX-MS kísérletekben is leírták [131], koleszterin hatására egyfajta kompakció és dekompakció következik be az ICH3-mas és ICH4-es régiók mentén. Hasonló eltérés a kétféle mintaelőkészítés között a mono-linkek elrendeződésében a Pgp egyéb régióin nem volt tapasztalható, mely megfigyelésünk belső kontrollja lehet, mivel a mono-linkek várhatóan véletlenszerűbben viselkednek a keresztkötésekhez képest.

Eredményeink alapján tehát feltételezhetően egy vertikális átrendeződés zajlik le a membrán koleszterinszintjének csökkenése esetén, a linker és az ICH3-mas és ICH4-es citoplazmatikus régiók mentén, kapcsolódva az ECL4-hez, ECL5-höz és ECL6-hoz a rigid transzmembrán hélixeken keresztül. Ez az átrendeződés az ECL5-öt és ECL6-ot vertikálisan

behúzhatja a membrán irányába, míg koleszterin jelenlétében ezek a loopok inkább kiemelkednek a membránból. Mivel az ECL4-es hurok hosszabb, mint az ECL5 és az ECL6, ezért annak relatív mozgása kevésbé szignifikáns lehet. A koleszterin hatása kialakulhat a felületi feszültséghez hasonló módon, a koleszterin kötő motívumokon keresztül, melyek az ECL4-en és ECL6-on bőségesen megtalálhatók. Koleszterin-telítettségben a koleszterin molekulák „felkúszhatnak” a fehérje koleszterin kötő motívumai mentén, ami deformálhatja a transzmembrán fehérje szerkezetét a membrán horizontális síkjában. Mindez szolgálhat egyfajta magyarázattal a 15D3 antitest koleszterin-függő kötődésére.

Az ECL6-os hurok és az ICH-NBD interfészek közötti kapcsolatot molekuladinamikai számítások alapján is felvetették már, mivel úgy találták, hogy a modulátor kötőhely (M-site) mutációja (F978A) az ECL6 közelében, csökkenti az ICH3 és NBD2 közötti kontaktusokat, de növeli az ICH4-NBD1 közötti interakciókat [30].

Az immunaffinitás kromatográfiával dúsított Pgp számos ismert fehérje partnerét is azonosítottuk tömegspektrometriásan a Pgp mellett.

A nagy előfordulással azonosított citoszkeletális fehérjék jelenléte támogatja azt az elképzelést miszerint a Pgp erősen citoszkeleton asszociált (**34. ábra, 35. ábra**). Az általunk is azonosított aktin [170,171], tubulinok [172] és filamin A [173] már számos korábbi publikációban megjelentek, mint a Pgp közvetlen vagy közvetett interakciós partnerei. Az AHNK fehérje, – amit minden mintában magas SPC-vel azonosítottunk expressziós szintje megváltozik olyan MDR sejtekben, ahol a Pgp-t overexpresszáltak [173].

Mindemellett a Hsp90-es és Hsp70-es hősokkfehérjékről, amik szintén nagy mennyiségben előfordultak mintáinkban ismert, hogy kapcsolatban vannak a Pgp-vel [174,175]. Ezek a hősokkfehérjék gyakran a lipídutajok közelében helyezkednek el, továbbá a Hsp90 koleszterin-függő módon aktiválhatja a Pgp-t [176,177].

A csak 15D3-mal dúsított mintákban azonosított 160 egyedi fehérje közül számos E3 ubikvitin ligáz. A leggyakrabban előforduló fehérje ezek közül a NEDD4 volt, amely segíti a Pgp ubikvitinációját és degradációját [178,179]. Annak az oka, hogy vajon az E3 ligázok miért abundánsabbak a 15D3 antitesttel dúsított mintákban, nem ismert, viszont érdekes módon azt tudjuk, hogy megnövekedett koleszterinszint esetén az ABC transzporter ABCA1 és ABCG1 degradációja gátolt az ubikvitin-proteoszóma útvonal mentén [180]. Egy másik E3 ubikvitin ligáz, a gyűrűsujj fehérje 2 (*RING finger protein 2*) mind a 15D3-mal és UIC2-vel dúsított mintákban azonosításra került, és ismert, hogy a Pgp-hez közvetlenül kapcsolódik annak linker régióján keresztül [181].

Továbbá a kaveola-asszociált fehérje 1-et (kavin-1) (*Caveolae-associated protein 1*, Cavin-1) is nagyobb mennyiségben azonosítottuk a 15D3-mal dúsított mintákban. A kavin-1 fehérje koleszterin függő módon stabilizálja a kaveolákat [182] azáltal, hogy kötődik a kaveolin-1 fehérjéhez annak állványzati egységnek (*scaffolding domain*) nevezett, fehérjét kötő részén keresztül, a koleszterinben és savas karakterű lipidekben (foszfatidilinozitol-foszfát, foszfatidil-szerin és foszfatidsav) dús plazmamembrán régiók laterális oldalán [183]. A kaveolák a plazmamembrán koleszterinben gazdag lipidtutaj régióiban helyezkednek el, melyeknek a gyarapodása segíti az agresszívebb tumorok és a multidrog rezisztencia (MDR) kialakulását [184]. A kavin-1 expressziós szintje megemelkedik MDR esetén, ugyanúgy ahogy a kaveolin-1 és a Pgp szintje is, amikről úgy gondolják, hogy szükségesek a lipidtutajok felépítésének megerősítéséhez és ezáltal MDR-hez is [185]. Az expresszált Pgp-k egy jelentős hányada a membrán lipidtutajokban helyezkedik el [57] és bizonyos sejttípusokban úgy találták, hogy a Pgp közvetlen kontaktusban van a kaveolin-1 fehérjével és hogy a kaveolin-1 szabályozza a Pgp működését [186]. Hinrichs és munkatársai viszont azt találták, hogy más sejttípusokban a Pgp-nek és a kaveolin-1-nek különbözik a Triton X-100 oldhatósága, tehát a Pgp nem magában a kaveolákban helyezkedik el [187]. Kísérleteink alapján felvetődik, hogy a Pgp-nek szorosabb kapcsolata van a kavin-1-gyel és a citoszkéletális fehérjékkel, és csak ezeken a kapcsolódásokon keresztül szabályozza a kaveolin-1 a Pgp működését. Mivel a 15D3 antitest kötődése koleszterin jelenlétét igényli, így valószínűleg több olyan fehérjét tudunk így dúsítani, amik koleszterin érzékeny módon kötődnek a Pgp-hez.

8. Összefoglalás

A Pgp szerkezetét és fehérje interakciós partnereit élősejtes és immunaffinitás kromatográfiával kapcsolt XL-MS technológiával vizsgáltuk. Módszereink optimalizálásához a korábban alkalmazott technikákat és protokollokat kiegészítettük sejtfelszíni PNGáz-F kezeléssel, membránpreparálással, és az immunoprecipitációs gyöngyök metilezésével. Újszerű kísérleti eljárásainkkal az alábbi következtetéseket tudtuk levonni:

- Az általunk azonosított mono-linker jelzik a Pgp vízhozzáférhetőségét és azokat a lizineket, melyek nagyobb valószínűséggel kapcsolódhatnak fehérjepartneréhez.
- Az NBD1-en lévő C-loop és a linker közötti keresztkötés alátámasztja a linker ATP-hidrolízist szabályozó hatását.
- Az azonosított keresztkötések alapján a C-loop közelségben van az ICH4-gyel és a szemközti ICH3-mal, melyekről ismert, hogy orientációjuk koleszterin-érzékeny. Az ICH3 és ICH4 közvetlenül kapcsolódnak az ECL5 és ECL6-os extracelluláris hurkokhoz, melyekhez szorosan kapcsolódik koleszterin.
- Vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy a linker-ICH3-ICH4 régiók koleszterin-csökkentett környezetben elmozdulnak, mely összecseng az ICH3-mal és ICH4-es régiók mentén koleszterin hatására bekövetkező aszimmetrikus kompaktációs és dekompakciós változásokat leíró korábbi eredményekkel.
- Eredményeink alapján egy vertikális átrendeződést feltételezünk a koleszterinszint-csökkenés hatására, mely az ECL5-öt és ECL6-ot behúzhatja a membrán irányába, míg koleszterin jelenlétében ezek a loopok inkább kiemelkednek a membránból.
- A koleszterin-érzékeny 15D3 antitest molekuladokkolásos eredményeink alapján az ECL1-hez, az ECL5-höz és az ECL6-hoz kötődik, mely összecseng ezen extracelluláris loopok keresztkötéses eredményeink alapján feltételezett koleszterin-függő konformációs változásaival.
- Az általunk azonosított fehérjepartnerek kompartment eloszlása alapján a Pgp szoros citoszkeleton-asszociáltságát feltételezhetjük.
- A 15D3-mal dúsított mintákban nagyobb mennyiségben azonosítottunk E3 ubikvitin ligázokat és kavin-1-et.
- Kísérleteink alapján feltételezhető, hogy a Pgp interakcióba lép a lipidtutajokra jellemző kavin-1 fehérjével.

9. Summary

The structure and protein interaction partners of Pgp were investigated by XL-MS, applying cross-linkers on living cells or on immunoaffinity magnetic beads. To optimize our methods, we supplemented previously published techniques and protocols with cell surface PNGase F treatment, membrane preparation, and methylation of immunoprecipitation beads. Our novel experimental procedures allowed us to draw the following conclusions:

- The mono-links we identified indicate the solvent accessibility of Pgp and the lysines that are more likely to bind to protein partners.
- The cross-linking between the C-loop on NBD1 and the linker supports the regulatory effect of the linker on ATP hydrolysis.
- The identified cross-links suggest that the C-loop is in close proximity to ICH4 and ICH3 at the opposite side of Pgp, which are known to have cholesterol-sensitive orientations. ICH3 and ICH4 are directly linked to ECL5 and ECL6, which bind cholesterol nearby.
- Our studies suggest that the linker-ICH3-ICH4 regions shift in a cholesterol-depleted environment, consistent with previous results describing asymmetric compaction and decompaction along the ICH3 and ICH4 regions when cholesterol levels were increased.
- Based on our results, we hypothesize a vertical rearrangement in response to cholesterol depletion, which may pull ECL5 and ECL6 in towards the membrane, whereas in the presence of cholesterol these loops may protrude from the membrane.
- The cholesterol-sensitive 15D3 mAb binds to ECL1, ECL5 and ECL6 based on our molecular docking results, which is consistent with the cholesterol-dependent conformational changes in these extracellular loops hypothesized from our cross-linking results.
- The compartmental distribution analysis of the protein partners we identified suggests a strong cytoskeleton association of Pgp.
- We identified higher amounts of E3 ubiquitin ligases and cavin-1 in 15D3-enriched samples.
- Our experiments suggest that Pgp interacts with the protein cavin-1, which is specific for lipid rafts.

10. Irodalomjegyzék

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int J Cancer* **2021**, *149*, 778–789, doi:10.1002/ijc.33588.
2. Tran, K.B.; Lang, J.J.; Compton, K.; Xu, R.; Acheson, A.R.; Henrikson, H.J.; Kocarnik, J.M.; Penberthy, L.; Aali, A.; Abbas, Q.; et al. The Global Burden of Cancer Attributable to Risk Factors, 2010–19: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **2022**, *400*, 563–591, doi:10.1016/S0140-6736(22)01438-6.
3. Steliarova-Foucher, E.; Colombet, M.; Ries, L.A.G.; Moreno, F.; Dolya, A.; Bray, F.; Hesselting, P.; Shin, H.Y.; Stiller, C.A.; Bouzbid, S.; et al. International Incidence of Childhood Cancer, 2001–10: A Population-Based Registry Study. *Lancet Oncol* **2017**, *18*, 719–731, doi:10.1016/S1470-2045(17)30186-9.
4. Emran, T. Bin; Shahriar, A.; Mahmud, A.R.; Rahman, T.; Abir, M.H.; Siddiquee, M.F.R.; Ahmed, H.; Rahman, N.; Nainu, F.; Wahyudin, E.; et al. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* **2022**, *12*.
5. Gottesman, M.M.; Fojo, T.; Bates, S.E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
6. Chen, -Jie; Chin, J.E.; Ueda, K.; Clark, L.P.; Pastan, I.; Gottesman, E.M.; Roninson, B. *Internal Duplication and Homology with Bacte Transport Proteins in the Mdal (P-Glycoprotein Ene from Multidrug-Resistant Human Cells*; 1986; Vol. 47;.
7. Pokharel, D.; Roseblade, A.; Oenarto, V.; Lu, J.; Bebawy, M. Proteins Regulating the Intercellular Transfer and Function of P-Glycoprotein in Multidrug-Resistant Cancer. *Ecancermedicalsecience* **2017**, *11*, doi:10.3332/ecancer.2017.768.
8. Krishna, R.; Mayer, L.D. *Multidrug Resistance (MDR) in Cancer Mechanisms, Reversal Using Modulators of MDR and the Role of MDR Modulators in Influencing the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs*; 2000; Vol. 11;.
9. Sedláková, I.; Laco, J.; Caltová, K.; Červinka, M.; Tošner, J.; Řezáč, A.; Špaček, J. Clinical Significance of the Resistance Proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* **2015**, *25*, 236–243, doi:10.1097/IGC.0000000000000354.
10. Fan, J.; To, K.K.W.; Chen, Z.S.; Fu, L. ABC Transporters Affects Tumor Immune Microenvironment to Regulate Cancer Immunotherapy and Multidrug Resistance. *Drug Resistance Updates* **2023**, *66*.
11. Cory, T.J.; He, H.; Winchester, L.C.; Kumar, S.; Fletcher, C. V. Alterations in P-Glycoprotein Expression and Function Between Macrophage Subsets. *Pharm Res* **2016**, *33*, 2713–2721, doi:10.1007/s11095-016-1998-x.
12. Vasquez, E.M.; Petrenko, Y.; Jacobssen, V.; Sifontis, N.M.; Testa, G.; Sankary, H.; Benedetti, E. An Assessment of P-Glycoprotein Expression and Activity in Peripheral Blood Lymphocytes of Transplant Candidates. In *Proceedings of the Transplantation Proceedings*; Elsevier USA, 2005; Vol. 37, pp. 175–177.
13. Lee, J.S.; Jung, I.D.; Lee, C.M.; Noh, K.T.; Park, J.W.; Son, K.H.; Heo, D.R.; Shin, Y.K.; Kim, D.; Park, Y.M. Venlafaxine Inhibits the Development and Differentiation of Dendritic Cells through the Regulation of P-Glycoprotein. *Int Immunopharmacol* **2011**, *11*, 1348–1357, doi:10.1016/j.intimp.2011.04.019.
14. Yagi, K.; Yamamoto, K.; Umeda, S.; Abe, S.; Suzuki, S.; Onishi, I.; Kirimura, S.; Fukayama, M.; Arai, A.; Kitagawa, M.; et al. Expression of Multidrug Resistance 1 Gene in B-Cell Lymphomas: Association with Follicular Dendritic Cells. *Histopathology* **2013**, *62*, 414–420, doi:10.1111/his.12035.

15. Bossennec, M.; Di Roio, A.; Caux, C.; Ménétrier-Caux, C. MDR1 in Immunity: Friend or Foe? *Oncoimmunology* 2018, 7.
16. Chen, M.L.; Sun, A.; Cao, W.; Eliason, A.; Mendez, K.M.; Getzler, A.J.; Tsuda, S.; Diao, H.; Mukori, C.; Bruno, N.E.; et al. Physiological Expression and Function of the MDR1 Transporter in Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* **2020**, 217, doi:10.1084/jem.20191388.
17. Kozma, D.; Simon, I.; Tusnády, G.E. PDBTM: Protein Data Bank of Transmembrane Proteins after 8 Years. *Nucleic Acids Res* **2013**, 41, doi:10.1093/nar/gks1169.
18. Fagerberg, L.; Jonasson, K.; Von Heijne, G.; Uhlén, M.; Berglund, L. Prediction of the Human Membrane Proteome. *Proteomics* **2010**, 10, 1141–1149, doi:10.1002/pmic.200900258.
19. Davidson, A.L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2008**, 72, 317–364, doi:10.1128/mmbr.00031-07.
20. Theodoulou, F.L. *Plant ABC Transporters*;
21. Gottesman, M.M.; Ambudkar, S. V *Overview: ABC Transporters and Human Disease*; 2001; Vol. 33;.
22. Holland, I.B.; Blight, M.A. *ABC-ATPases, Adaptable Energy Generators Fuelling Transmembrane Movement of a Variety of Molecules in Organisms from Bacteria to Humans*;
23. Thomas, C.; Tampé, R. Annual Review of Biochemistry Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. **2020**, doi:10.1146/annurev-biochem-011520.
24. Vasiliou, V.; Vasiliou, K.; Nebert, D.W. *Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Family*;
25. Neumann, J.; Rose-Sperling, D.; Hellmich, U.A. Diverse Relations between ABC Transporters and Lipids: An Overview. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017, 1859, 605–618.
26. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* **2021**, 38, 3022–3027, doi:10.1093/molbev/msab120.
27. Flanagan, J.; Flanagan, J.U.; Huber, T. *Structural Evolution of the ABC Transporter Subfamily B*; 2007;
28. Szakács, G.; Váradi, A.; Özvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B. The Role of ABC Transporters in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008, 13, 379–393.
29. Omasits, U.; Ahrens, C.H.; Müller, S.; Wollscheid, B. Protter: Interactive Protein Feature Visualization and Integration with Experimental Proteomic Data. *Bioinformatics* **2014**, 30, 884–886, doi:10.1093/bioinformatics/btt607.
30. Bonito, C.A.; Ferreira, R.J.; Ferreira, M.J.U.; Gillet, J.P.; Cordeiro, M.N.D.S.; dos Santos, D.J.V.A. Theoretical Insights on Helix Repacking as the Origin of P-Glycoprotein Promiscuity. *Sci Rep* **2020**, 10, doi:10.1038/s41598-020-66587-5.
31. Rosenberg, M.F.; Callaghan, R.; Modok, S.; Higgins, C.F.; Ford, R.C. Three-Dimensional Structure of P-Glycoprotein: The Transmembrane Regions Adopt an Asymmetric Configuration in the Nucleotide-Bound State. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 2857–2862, doi:10.1074/jbc.M410296200.
32. Loo, T.W.; Clarke, D.M. P-Glycoprotein ATPase Activity Requires Lipids to Activate a Switch at the First Transmission Interface. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, 472, 379–383, doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.124.

33. Sato, T.; Kodan, A.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Nakatsu, T.; Kato, H. Functional Role of the Linker Region in Purified Human P-Glycoprotein. *FEBS Journal* **2009**, *276*, 3504–3516, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07072.x.
34. Ford, R.C.; Marshall-Sabey, D.; Schuetz, J. Linker Domains: Why ABC Transporters ‘Live in Fragments No Longer.’ *Trends Biochem Sci* **2020**, *45*, 137–148.
35. Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K.P. Structural Insight into Substrate and Inhibitor Discrimination by Human P-Glycoprotein. *Science (1979)* **2019**, *363*, 753–756, doi:10.1126/science.aav7102.
36. Huang, J.; Ecker, G.F. A Structure-Based View on ABC-Transporter Linked to Multidrug Resistance. *Molecules* **2023**, *28*.
37. Szöllösi, D.; Rose-Sperling, D.; Hellmich, U.A.; Stockner, T. Comparison of Mechanistic Transport Cycle Models of ABC Exporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2018**, *1860*, 818–832.
38. Cakil, Y.D.; Khunweeraphong, N.; Parveen, Z.; Schmid, D.; Artaker, M.; Ecker, G.F.; Sitte, H.H.; Pusch, O.; Stockner, T.; Chiba, P. Pore-Exposed Tyrosine Residues of p-Glycoprotein Are Important Hydrogen-Bonding Partners for Drugs. *Mol Pharmacol* **2014**, *85*, 420–428, doi:10.1124/mol.113.088526.
39. Higgins, C.F.; Linton, K.J. The ATP Switch Model for ABC Transporters. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, *11*, 918–926.
40. Janas, E.; Hofacker, M.; Chen, M.; Gompf, S.; Van der Does, C.; Tampé, R. The ATP Hydrolysis Cycle of the Nucleotide-Binding Domain of the Mitochondrial ATP-Binding Cassette Transporter Mdl1p. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 26862–26869, doi:10.1074/jbc.M301227200.
41. Senior, A.E.; Al-Shawi, M.K.; Urbatsch, I.L. The Catalytic Cycle of P-Glycoprotein. *FEBS Lett* **1995**, *377*, 285–289, doi:10.1016/0014-5793(95)01345-8.
42. Siarheyeva, A.; Liu, R.; Sharom, F.J. Characterization of an Asymmetric Occluded State of P-Glycoprotein with Two Bound Nucleotides: Implications for Catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 7575–7586, doi:10.1074/jbc.M109.047290.
43. Jones, P.M.; George, A.M. Opening of the ADP-Bound Active Site in the ABC Transporter ATPase Dimer: Evidence for a Constant Contact, Alternating Sites Model for the Catalytic Cycle. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **2009**, *75*, 387–396, doi:10.1002/prot.22250.
44. Barsony, O.; Szaloki, G.; Turk, D.; Tarapcsak, S.; Gutay-Toth, Z.; Bacso, Z.; Holb, I.J.; Szekvolgyi, L.; Szabo, G.; Csanady, L.; et al. A Single Active Catalytic Site Is Sufficient to Promote Transport in P-Glycoprotein. *Sci Rep* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep24810.
45. Kopcho, N.; Chang, G.; Komives, E.A. Dynamics of ABC Transporter P-Glycoprotein in Three Conformational States. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-50578-2.
46. Gyimesi, G.; Ramachandran, S.; Kota, P.; Dokholyan, N. V.; Sarkadi, B.; Hegedus, T. ATP Hydrolysis at One of the Two Sites in ABC Transporters Initiates Transport Related Conformational Transitions. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2011**, *1808*, 2954–2964, doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.038.
47. Jiarong Li, M.; Guttman, M.; Atkins, W.M. Conformational Dynamics of P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs and Detergent Micelles Reveal Complex Motions on a Wide Time Scale. *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 6297–6307, doi:10.1074/jbc.RA118.002190.
48. Coskun, Ü.; Simons, K. Cell Membranes: The Lipid Perspective. *Structure* **2011**, *19*, 1543–1548.
49. Sharom, F.J.; Yu, X.; Chu, J.W.K.; Doige, C.A. *Characterization of the ATPase Activity of P-Glycoprotein from Multidrug-Resistant Chinese Hamster Ovary Cells*; 1995; Vol. 308;.

50. Moeller, A.; Lee, S.C.; Tao, H.; Speir, J.A.; Chang, G.; Urbatsch, I.L.; Potter, C.S.; Carragher, B.; Zhang, Q. Distinct Conformational Spectrum of Homologous Multidrug ABC Transporters. *Structure* **2015**, *23*, 450–460, doi:10.1016/j.str.2014.12.013.
51. Romsicki, Y.; Sharom, F.J. The ATPase and ATP-Binding Functions of P-Glycoprotein. Modulation by Interaction with Defined Phospholipids. *Eur J Biochem* **1998**, *256*, 170–178, doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2560170.x.
52. Senior, A.E.; Marwan, I.; Ai-Shawi, K.; Urbatsch, I.L. *ATP Hydrolysis by Multidrug-Resistance Protein from Chinese Hamster Ovary Cells*; 1995; Vol. 27;.
53. Hegedüs, C.; Telbisz, Á.; Hegedus, T.; Sarkadi, B.; Özvegy-Laczka, C. Lipid Regulation of the ABCB1 and ABCG2 Multidrug Transporters. In *Advances in Cancer Research*; Academic Press Inc., 2015; Vol. 125, pp. 97–137.
54. Sarkadi, B.; Price, E.M.; Boucher, R.C.; Germann, U.A.; Scarborough, G.A. Expression of the Human Multidrug Resistance CDNA in Insect Cells Generates a High Activity Drug-Stimulated Membrane ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 4854–4858, doi:10.1016/s0021-9258(18)42909-2.
55. Kimura, Y.; Kioka, N.; Kato, H.; Matsuo, M.; Ueda, K. Modulation of Drug-Stimulated ATPase Activity of Human MDR1/P-Glycoprotein by Cholesterol. *Biochemical Journal* **2007**, *401*, 597–605, doi:10.1042/BJ20060632.
56. Eckford, P.D.W.; Sharom, F.J. Interaction of the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump with Cholesterol: Effects on ATPase Activity, Drug Binding and Transport. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13686–13698, doi:10.1021/bi801409r.
57. Bacso, Z.; Nagy, H.; Goda, K.; Bene, L.; Fenyvesi, F.; Matkó, J.; Szabó, G. Raft and Cytoskeleton Associations of an ABC Transporter: P-Glycoprotein. *Cytometry Part A* **2004**, *61*, 105–116, doi:10.1002/cyto.a.20081.
58. Radeva, G.; Perabo, J.; Sharom, F.J. P-Glycoprotein Is Localized in Intermediate-Density Membrane Microdomains Distinct from Classical Lipid Rafts and Caveolar Domains. In *Proceedings of the FEBS Journal*; October 2005; Vol. 272, pp. 4924–4937.
59. Orłowski, S.; Martin, S.; Escargueil, A. P-Glycoprotein and “Lipid Rafts”: Some Ambiguous Mutual Relationships (Floating on Them, Building Them or Meeting Them by Chance?). *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, *63*, 1038–1059.
60. Goda, K.; Bacsó, Z.; Szabó, G. *Multidrug Resistance through the Spectacle of P-Glycoprotein*;
61. Vahedi, S.; Lusvardi, S.; Pluchino, K.; Shafrir, Y.; Durell, S.R.; Gottesman, M.M.; Ambudkar, S. V. Mapping Discontinuous Epitopes for MRK-16, UIC2 and 4E3 Antibodies to Extracellular Loops 1 and 4 of Human P-Glycoprotein. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-30984-8.
62. Gutay-Tóth, Z.; Fenyvesi, F.; Bársony, O.; Szente, L.; Goda, K.; Szabó, G.; Bacsó, Z. Cholesterol-Dependent Conformational Changes of P-Glycoprotein Are Detected by the 15D3 Monoclonal Antibody. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **2016**, *1861*, 188–195, doi:10.1016/j.bbalip.2015.12.007.
63. Baier, C.J.; Fantini, J.; Barrantes, F.J. Disclosure of Cholesterol Recognition Motifs in Transmembrane Domains of the Human Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Sci Rep* **2011**, *1*, doi:10.1038/srep00069.
64. Gál, Z.; Hegedüs, C.; Szakács, G.; Váradi, A.; Sarkadi, B.; Özvegy-Laczka, C. Mutations of the Central Tyrosines of Putative Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus (CRAC) Sequences Modify Folding, Activity, and Sterol-Sensing of the Human ABCG2 Multidrug Transporter. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2015**, *1848*, 477–487, doi:10.1016/j.bbamem.2014.11.006.

65. Andrea Pálfi; Zsolt Bacso *Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference "Laugh and Be the Best in Research and Patient Care" Poster: Cholesterol Binding Motifs in ATP Binding Casette Transporters*; Prague, 2013;
66. George, K.S.; Wu, S. Lipid Raft: A Floating Island of Death or Survival. *Toxicol Appl Pharmacol* **2012**, *259*, 311–319, doi:10.1016/j.taap.2012.01.007.
67. Liu, Y.Y.; Han, T.Y.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Expression of Glucosylceramide Synthase, Converting Ceramide to Glucosylceramide, Confers Adriamycin Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 1140–1146, doi:10.1074/jbc.274.2.1140.
68. Garrigues, A.; Escargueil, A.E.; Phane Orlowski, S. *The Multidrug Transporter, P-Glycoprotein, Actively Mediates Cholesterol Redistribution in the Cell Membrane*; 2002;
69. Fenyvesi, F.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Goda, K.; Bacsó, Z.; Bácskay, I.; Váradi, J.; Kiss, T.; Molnár, É.; Janáky, T.; et al. P-Glycoprotein Inhibition by Membrane Cholesterol Modulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *34*, 236–242, doi:10.1016/j.ejps.2008.04.005.
70. Zsuzsanna Gutayne Toth; Orsolya Barsony; Katalin Goda; Gabor Szabo; Zsolt Bacso Abstracts of the 8th EBSA (European Biophysical Societies Association) European Biophysics Congress. Poster: Conformational Dependent Trafficking of P-Glycoprotein with Rafts. In Proceedings of the European biophysics journal : EBJ; Budapest, August 23 2011; Vol. 40 Suppl 1, pp. 35–256.
71. Kopecka, J.; Trouillas, P.; Gašparović, A.Č.; Gazzano, E.; Assaraf, Y.G.; Riganti, C. Phospholipids and Cholesterol: Inducers of Cancer Multidrug Resistance and Therapeutic Targets. *Drug Resistance Updates* 2020, *49*.
72. Nagy, H.; Goda, K.; Arceci, R.; Cianfriglia, M.; Mechetner, E.; Bor Szabo, G.Â. *P-Glycoprotein Conformational Changes Detected by Antibody Competition*;
73. Nagy, H.; Goda, K.; Fenyvesi, F.; Bacsó, Z.; Szilasi, M.; Kappelmayer, J.; Lustyik, G.; Cianfriglia, M.; Szabó, G. Distinct Groups of Multidrug Resistance Modulating Agents Are Distinguished by Competition of P-Glycoprotein-Specific Antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *315*, 942–949, doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.156.
74. Leonardo, E.; Scagl, G. *IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF P-GLYCOPROTEIN IN HUMAN MALIGNANCIES BY MONOCLONAL, ANTIBODY MC57*; 1994; Vol. 57;.
75. Esser, L.; Shukla, S.; Zhou, F.; Ambudkar, S. V.; Xia, D. Crystal Structure of the Antigen-Binding Fragment of a Monoclonal Antibody Specific for the Multidrug-Resistance-Linked ABC Transporter Human P-Glycoprotein. *Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications* **2016**, *72*, 636–641, doi:10.1107/S2053230X16009778.
76. Georges\$, E.; Tsuruol, T.; Ling\$, V. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Topology of P-Glycoprotein as Determined by Epitope Mapping of MRK-16 Monoclonal Antibody**; 1993; Vol. 268;.
77. M Cianfriglia; M C Willingham; M Tombesi; G V Scagliotti; G Frasca; A Chersi 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., doi:10.1002/ijc.2910560127.
78. Schinkel~, A.H.; Arcecp, R.J.; Smit, J.J.M.; Wagenaar~, E.; Baas3, F.; Doll^, M.; Tsuruo4, T.; Mechetner', E.B.; Roninsons, I.B.; Borst', P. *BINDING PROPERTIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES RECOGNIZING EXTERNAL EPITOPES OF THE HUMAN MDRI P-GLYCOPROTEIN*; 1993; Vol. 55;.

79. Zhou, Y.; Gottesman, M.M.; Pastan, I. *The Extracellular Loop between TM5 and TM6 of P-Glycoprotein Is Required for Reactivity with Monoclonal Antibody UIC2*; 1999; Vol. 367;.
80. Mechetner* † ‡ § ¶, E.B.; Schott, B.; Morse, B.S.; Stein, W.D.; Druley, T.; Davis, K.A.; Tsuruo, T.; Roninson, I.B. *P-Glycoprotein Function Involves Conformational Transitions Detectable by Differential Immunoreactivity*; 1997; Vol. 94;.
81. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
82. Hegedűs, T.; Geisler, M.; Lukács, G.L.; Farkas, B. Ins and Outs of AlphaFold2 Transmembrane Protein Structure Predictions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, *79*, doi:10.1007/s00018-021-04112-1.
83. Van De Waterbeemd, M.; Fort, K.L.; Boll, D.; Reinhardt-Szyba, M.; Routh, A.; Makarov, A.; Heck, A.J.R. High-Fidelity Mass Analysis Unveils Heterogeneity in Intact Ribosomal Particles. *Nat Methods* **2017**, *14*, 283–286, doi:10.1038/nmeth.4147.
84. Scarff, C.A.; Almeida, B.; Fraga, J.; Macedo-Ribeiro, S.; Radford, S.E.; Ashcroft, A.E. Examination of Ataxin-3 (Atx-3) Aggregation by Structural Mass Spectrometry Techniques: A Rationale for Expedited Aggregation upon Polyglutamine (PolyQ) Expansion. *Molecular and Cellular Proteomics* **2015**, *14*, 1241–1253, doi:10.1074/mcp.M114.044610.
85. Bechara, C.; Nöll, A.; Morgner, N.; Degiacomi, M.T.; Tampé, R.; Robinson, C. V. A Subset of Annular Lipids Is Linked to the Flippase Activity of an ABC Transporter. *Nat Chem* **2015**, *7*, 255–262, doi:10.1038/nchem.2172.
86. Young, L.M.; Saunders, J.C.; Mahood, R.A.; Revill, C.H.; Foster, R.J.; Tu, L.H.; Raleigh, D.P.; Radford, S.E.; Ashcroft, A.E. Screening and Classifying Small-Molecule Inhibitors of Amyloid Formation Using Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Nat Chem* **2015**, *7*, 73–81, doi:10.1038/nchem.2129.
87. Bechara, C.; Robinson, C. V. Different Modes of Lipid Binding to Membrane Proteins Probed by Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc* **2015**, *137*, 5240–5247, doi:10.1021/jacs.5b00420.
88. Barrera, N.P.; Zhou, M.; Robinson, C. V. The Role of Lipids in Defining Membrane Protein Interactions: Insights from Mass Spectrometry. *Trends Cell Biol* **2013**, *23*, 1–8.
89. Laganowsky, A.; Reading, E.; Allison, T.M.; Ulmschneider, M.B.; Degiacomi, M.T.; Baldwin, A.J.; Robinson, C. V. Membrane Proteins Bind Lipids Selectively to Modulate Their Structure and Function. *Nature* **2014**, *510*, 172–175, doi:10.1038/nature13419.
90. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*; 1989; Vol. 246;.
91. Mathieu, Émile. Mémoire Sur Le Mouvement Vibratoire d'une Membrane de Forme Elliptique. **1868**.
92. Paul, W. *Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles*;
93. Steen, H.; Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 699–711.
94. Hevler, J.F.; Lukassen, M. V; Cabrera-Orefice, A.; Arnold, S.; Pronker, M.F.; Franc, V.; Heck, A.J.R. Selective Cross-linking of Coinciding Protein Assemblies by In-gel Cross-linking Mass Spectrometry. *EMBO J* **2021**, *40*, doi:10.15252/embj.2020106174.
95. Makowski, M.M.; Willems, E.; Jansen, P.W.T.C.; Vermeulen, M. Cross-Linking Immunoprecipitation-MS (XIP-MS): Topological Analysis of Chromatin-associated Protein Complexes Using Single Affinity Purification. *Molecular and Cellular Proteomics* **2016**, *15*, 854–865, doi:10.1074/mcp.M115.053082.

96. Rey, M.; Dhenin, J.; Kong, Y.; Nouchikian, L.; Filella, I.; Duchateau, M.; Dupré, M.; Pellarin, R.; Duménil, G.; Chamot-Rooke, J. Advanced in Vivo Cross-Linking Mass Spectrometry Platform to Characterize Proteome-Wide Protein Interactions. *Anal Chem* **2021**, *93*, 4166–4174, doi:10.1021/acs.analchem.0c04430.
97. Matzinger, M.; Mechtler, K. Cleavable Cross-Linkers and Mass Spectrometry for the Ultimate Task of Profiling Protein-Protein Interaction Networks in Vivo. *J Proteome Res* **2021**, *20*, 78–93.
98. Chavez, J.D.; Lee, C.F.; Caudal, A.; Keller, A.; Tian, R.; Bruce, J.E. Chemical Crosslinking Mass Spectrometry Analysis of Protein Conformations and Supercomplexes in Heart Tissue. *Cell Syst* **2018**, *6*, 136–141.e5, doi:10.1016/j.cels.2017.10.017.
99. Kalkhof, S.; Sinz, A. Chances and Pitfalls of Chemical Cross-Linking with Amine-Reactive N-Hydroxysuccinimide Esters. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *392*, 1–8, doi:10.1007/s00216-008-2231-5.
100. Mädler, S.; Bich, C.; Touboul, D.; Zenobi, R. Chemical Cross-Linking with NHS Esters: A Systematic Study on Amino Acid Reactivities. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44*, 694–706, doi:10.1002/jms.1544.
101. Iacobucci, C.; Piotrowski, C.; Aebersold, R.; Amaral, B.C.; Andrews, P.; Bernfur, K.; Borchers, C.; Brodie, N.I.; Bruce, J.E.; Cao, Y.; et al. First Community-Wide, Comparative Cross-Linking Mass Spectrometry Study. *Anal Chem* **2019**, *91*, 6953–6961.
102. Steigenberger, B.; Pieters, R.J.; Heck, A.J.R.; Scheltema, R.A. PhoX: An IMAC-Enrichable Cross-Linking Reagent. *ACS Cent Sci* **2019**, *5*, 1514–1522, doi:10.1021/acscentsci.9b00416.
103. Chavez, J.D.; Bruce, J.E. Chemical Cross-Linking with Mass Spectrometry: A Tool for Systems Structural Biology. *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *48*, 8–18.
104. Leitner, A.; Walzthoeni, T.; Kahraman, A.; Herzog, F.; Rinner, O.; Beck, M.; Aebersold, R. Probing Native Protein Structures by Chemical Cross-Linking, Mass Spectrometry, and Bioinformatics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2010**, *9*, 1634–1649.
105. Grumbach, I.M.; Veh, R.W. *Sulpho-N-Hydroxysuccinimide Activated Long Chain Biotin A New Microtitre Plate Assay for the Determination of Its Stability at Different PH Values and Its Reaction Rate with Protein Bound Amino Groups*; 1991; Vol. 140;.
106. Sinnott, M.; Malhotra, S.; Madhusudhan, M.S.; Thalassinou, K.; Topf, M. Combining Information from Crosslinks and Monolinks in the Modeling of Protein Structures. *Structure* **2020**, *28*, 1061–1070.e3, doi:10.1016/j.str.2020.05.012.
107. Ding, Y.H.; Fan, S.B.; Li, S.; Feng, B.Y.; Gao, N.; Ye, K.; He, S.M.; Dong, M.Q. Increasing the Depth of Mass-Spectrometry-Based Structural Analysis of Protein Complexes through the Use of Multiple Cross-Linkers. *Anal Chem* **2016**, *88*, 4461–4469, doi:10.1021/acs.analchem.6b00281.
108. He, G.; Zhang, H.; King, J.D.; Blankenship, R.E. Structural Analysis of the Homodimeric Reaction Center Complex from the Photosynthetic Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum Tepidum*. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4924–4930, doi:10.1021/bi5006464.
109. Steigenberger, B.; Albanese, P.; Heck, A.J.R.; Scheltema, R.A. To Cleave or Not to Cleave in XL-MS? *J Am Soc Mass Spectrom* **2020**, *31*, 196–206, doi:10.1021/jasms.9b00085.
110. Trnka, M.J.; Baker, P.R.; Robinson, P.J.J.; Burlingame, A.L.; Chalkley, R.J. Matching Cross-Linked Peptide Spectra: Only as Good as the Worst Identification. *Molecular and Cellular Proteomics* **2014**, *13*, 420–434, doi:10.1074/mcp.M113.034009.

111. Fischer, L.; Rappsilber, J. Quirks of Error Estimation in Cross-Linking/Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2017**, *89*, 3829–3833, doi:10.1021/acs.analchem.6b03745.
112. Sinz, A. Divide and Conquer: Cleavable Cross-Linkers to Study Protein Conformation and Protein–Protein Interactions. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409*, 33–44.
113. Müller, M.Q.; Dreiocker, F.; Ihling, C.H.; Schäfer, M.; Sinz, A. Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal Chem* **2010**, *82*, 6958–6968, doi:10.1021/ac101241t.
114. Iacobucci, C.; Götze, M.; Ihling, C.H.; Piotrowski, C.; Arlt, C.; Schäfer, M.; Hage, C.; Schmidt, R.; Sinz, A. A Cross-Linking/Mass Spectrometry Workflow Based on MS-Cleavable Cross-Linkers and the MeroX Software for Studying Protein Structures and Protein–Protein Interactions. *Nat Protoc* **2018**, *13*, 2864–2889, doi:10.1038/s41596-018-0068-8.
115. Pirklbauer, G.J.; Stieger, C.E.; Matzinger, M.; Winkler, S.; Mechtler, K.; Dorfer, V. MS Annika: A New Cross-Linking Search Engine. *J Proteome Res* **2021**, *20*, 2560–2569, doi:10.1021/acs.jproteome.0c01000.
116. Steigenberger, B.; Van Den Toorn, H.W.P.; Bijl, E.; Greisch, J.-F.; Ather, O.R.; Lubeck, M.; Pieters, R.J.; Heck, A.J.R.; Scheltema, R.A. Benefits of Collisional Cross Section Assisted Precursor Selection (Caps-PASEF) for Cross-Linking Mass Spectrometry., doi:10.1101/2020.04.16.044859.
117. Wittig, S.; Ganzella, M.; Barth, M.; Kostmann, S.; Riedel, D.; Pérez-Lara, Á.; Jahn, R.; Schmidt, C. Cross-Linking Mass Spectrometry Uncovers Protein Interactions and Functional Assemblies in Synaptic Vesicle Membranes. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-21102-w.
118. Sun, F.; Suttapitugsakul, S.; Wu, R. Unraveling the Surface Glycoprotein Interaction Network by Integrating Chemical Crosslinking with MS-Based Proteomics. *Chem Sci* **2021**, *12*, 2146–2155, doi:10.1039/d0sc06327d.
119. Ferraro, N.A.; Cascio, M. Cross-Linking-Mass Spectrometry Studies of Cholesterol Interactions with Human A1 Glycine Receptor. *Anal Chem* **2018**, *90*, 2508–2516, doi:10.1021/acs.analchem.7b03639.
120. Müller, M.; Gräbnitz, F.; Barandun, N.; Shen, Y.; Wendt, F.; Steiner, S.N.; Severin, Y.; Vetterli, S.U.; Mondal, M.; Prudent, J.R.; et al. Light-Mediated Discovery of Surfaceome Nanoscale Organization and Intercellular Receptor Interaction Networks. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-27280-x.
121. Webb, B.; Viswanath, S.; Bonomi, M.; Pellarin, R.; Greenberg, C.H.; Saltzberg, D.; Sali, A. Integrative Structure Modeling with the Integrative Modeling Platform. *Protein Science* **2018**, *27*, 245–258, doi:10.1002/pro.3311.
122. Ding, Y.H.; Gong, Z.; Dong, X.; Liu, K.; Liu, Z.; Liu, C.; He, S.M.; Dong, M.Q.; Tang, C. Modeling Protein Excited-State Structures from “over-Length” Chemical Cross-Links. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292*, 1187–1196, doi:10.1074/jbc.M116.761841.
123. Calabrese, A.N.; Schiffrin, B.; Watson, M.; Karamanos, T.K.; Walko, M.; Humes, J.R.; Horne, J.E.; White, P.; Wilson, A.J.; Kalli, A.C.; et al. Inter-Domain Dynamics in the Chaperone SurA and Multi-Site Binding to Its Outer Membrane Protein Clients. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-15702-1.
124. Müller, A.; Langó, T.; Turiák, L.; Ács, A.; Várady, G.; Kucsma, N.; Drahos, L.; Tusnády, G.E. Covalently Modified Carboxyl Side Chains on Cell Surface Leads to a Novel Method toward Topology Analysis of Transmembrane Proteins. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-52188-4.

125. Espino, J.A.; Jones, L.M. In Vivo Hydroxyl Radical Protein Footprinting for the Study of Protein Interactions in *Caenorhabditis Elegans*. *Journal of Visualized Experiments* **2020**, *2020*, doi:10.3791/60910.
126. Hammerschmid, D.; Calvaresi, V.; Bailey, C.; Russell Lewis, B.; Politis, A.; Morris, M.; Denbigh, L.; Anderson, M.; Reading, E. Chromatographic Phospholipid Trapping for Automated H/D Exchange Mass Spectrometry of Membrane Protein-Lipid Assemblies. *Anal Chem* **2023**, *95*, 3002–3011, doi:10.1021/acs.analchem.2c04876.
127. Khanal, A.; Pan, Y.; Brown, L.S.; Konermann, L. Pulsed Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry for Time-Resolved Membrane Protein Folding Studies. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 1620–1626, doi:10.1002/jms.3127.
128. Keppel, T.R.; Weis, D.D. Analysis of Disordered Proteins Using a Simple Apparatus for Millisecond Quench-Flow H/D Exchange. *Anal Chem* **2013**, *85*, 5161–5168, doi:10.1021/ac4004979.
129. Vester, S.K.; Rahikainen, R.; Khairil Anuar, I.N.A.; Hills, R.A.; Tan, T.K.; Howarth, M. SpySwitch Enables PH- or Heat-Responsive Capture and Release for Plug-and-Display Nanoassembly. *Nat Commun* **2022**, *13*, doi:10.1038/s41467-022-31193-8.
130. Keeble, A.H.; Turkki, P.; Stokes, S.; Khairil Anuar, N.A.; Rahikainen, R.; Hytönen, V.P.; Howarth, M. Approaching Infinite Affinity through Engineering of Peptide-Protein Interaction., doi:10.1073/pnas.1909653116/-/DCSupplemental.
131. Clouser, A.F.; Alam, Y.H.; Atkins, W.M. Cholesterol Asymmetrically Modulates the Conformational Ensemble of the Nucleotide-Binding Domains of P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs. *Biochemistry* **2021**, *60*, 85–94, doi:10.1021/acs.biochem.0c00824.
132. Marcoux, J.; Man, P.; Castellan, M.; Vivès, C.; Forest, E.; Fieschi, F. Conformational Changes in P47phox upon Activation Highlighted by Mass Spectrometry Coupled to Hydrogen/Deuterium Exchange and Limited Proteolysis. *FEBS Lett* **2009**, *583*, 835–840, doi:10.1016/j.febslet.2009.01.046.
133. Schopper, S.; Kahraman, A.; Leuenberger, P.; Feng, Y.; Piazza, I.; Müller, O.; Boersema, P.J.; Picotti, P. Measuring Protein Structural Changes on a Proteome-Wide Scale Using Limited Proteolysis-Coupled Mass Spectrometry. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 2391–2410, doi:10.1038/nprot.2017.100.
134. Barret, D.C.A.; Schuster, D.; Rodrigues, M.J.; Leitner, A.; Picotti, P.; Schertler, G.F.X.; Kaupp, U.B.; Korkhov, V.M.; Marino, J. Structural Basis of Calmodulin Modulation of the Rod Cyclic Nucleotide-Gated Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2023**, *120*, doi:10.1073/pnas.2300309120.
135. Landreh, M.; Costeira-Paulo, J.; Gault, J.; Marklund, E.G.; Robinson, C. V. Effects of Detergent Micelles on Lipid Binding to Proteins in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2017**, *89*, 7425–7430, doi:10.1021/acs.analchem.7b00922.
136. Cong, X.; Liu, Y.; Liu, W.; Liang, X.; Russell, D.H.; Laganowsky, A. Determining Membrane Protein-Lipid Binding Thermodynamics Using Native Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 4346–4349, doi:10.1021/jacs.6b01771.
137. Belov, M.E.; Damoc, E.; Denisov, E.; Compton, P.D.; Horning, S.; Makarov, A.A.; Kelleher, N.L. From Protein Complexes to Subunit Backbone Fragments: A Multi-Stage Approach to Native Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2013**, *85*, 11163–11173, doi:10.1021/ac4029328.
138. Ro, S.Y.; Schachner, L.F.; Koo, C.W.; Purohit, R.; Remis, J.P.; Kenney, G.E.; Liauw, B.W.; Thomas, P.M.; Patrie, S.M.; Kelleher, N.L.; et al. Native Top-down Mass Spectrometry Provides Insights into the Copper Centers of Membrane-Bound Methane Monooxygenase. *Nat Commun* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41467-019-10590-6.
139. Albanese, P.; Tamara, S.; Saracco, G.; Scheltema, R.A.; Pagliano, C. How Paired PSII–LHCII Supercomplexes Mediate the Stacking of Plant Thylakoid Membranes Unveiled

- by Structural Mass-Spectrometry. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-15184-1.
140. Baker, E.S.; Burnum-Johnson, K.E.; Ibrahim, Y.M.; Orton, D.J.; Monroe, M.E.; Kelly, R.T.; Moore, R.J.; Zhang, X.; Théberge, R.; Costello, C.E.; et al. Enhancing Bottom-up and Top-down Proteomic Measurements with Ion Mobility Separations. *Proteomics* **2015**, *15*, 2766–2776, doi:10.1002/pmic.201500048.
 141. Dodds, J.N.; Baker, E.S. Ion Mobility Spectrometry: Fundamental Concepts, Instrumentation, Applications, and the Road Ahead. *J Am Soc Mass Spectrom* **2019**, *30*, 2185–2195, doi:10.1007/s13361-019-02288-2.
 142. Schnirch, L.; Nadler-Holly, M.; Siao, S.W.; Frese, C.K.; Viner, R.; Liu, F. Expanding the Depth and Sensitivity of Cross-Link Identification by Differential Ion Mobility Using High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* **2020**, *92*, 10495–10503, doi:10.1021/acs.analchem.0c01273.
 143. Ihling, C.H.; Piersimoni, L.; Kipping, M.; Sinz, A. Cross-Linking/Mass Spectrometry Combined with Ion Mobility on a TimsTOF Pro Instrument for Structural Proteomics Title: Cross-Linking/Mass Spectrometry Combined with Ion Mobility., doi:10.1101/2021.03.26.437136.
 144. Zöllner, J.; Hong, S.; Eisinger, M.L.; Anderson, M.; Radloff, M.; Desch, K.; Gennis, R.; Langer, J.D. Ligand Binding and Conformational Dynamics of the E. Coli Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase Revealed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Comput Struct Biotechnol J* **2022**, *20*, 5430–5439, doi:10.1016/j.csbj.2022.09.036.
 145. Nagy, K.; Gellén, G.; Papp, D.; Schlosser, G.; Révész, Á. Optimum Collision Energies for Proteomics: The Impact of Ion Mobility Separation. *Journal of Mass Spectrometry* **2023**, doi:10.1002/jms.4957.
 146. Greenfield, E.A. Preparing Feeder Cell Cultures to Support Hybridoma Growth. *Cold Spring Harb Protoc* **2019**, *2019*, 722–725, doi:10.1101/pdb.prot103168.
 147. Gidley, M.J.; Sanders, J.K.M. *Reductive Methylation of Proteins with Sodium Cyanoborohydride Identification, Suppression and Possible Uses of N-Cyanomethyl by-Products*; 1982; Vol. 203;.
 148. Mohammed, H.; Taylor, C.; Brown, G.D.; Papachristou, E.K.; Carroll, J.S.; D'Santos, C.S. Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous Proteins (RIME) for Analysis of Chromatin Complexes. *Nat Protoc* **2016**, *11*, 316–326.
 149. Klykov, O.; Steigenberger, B.; Pektaş, S.; Fasci, D.; Heck, A.J.R.; Scheltema, R.A. Efficient and Robust Proteome-Wide Approaches for Cross-Linking Mass Spectrometry. *Nat Protoc* **2018**, *13*, 2964–2990, doi:10.1038/s41596-018-0074-x.
 150. Abanades, B.; Wong, W.K.; Boyles, F.; Georges, G.; Bujotzek, A.; Deane, C.M. ImmuneBuilder: Deep-Learning Models for Predicting the Structures of Immune Proteins., doi:10.1101/2022.11.04.514231.
 151. Kozakov, D.; Hall, D.R.; Xia, B.; Porter, K.A.; Padhorny, D.; Yueh, C.; Beglov, D.; Vajda, S. The ClusPro Web Server for Protein-Protein Docking. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 255–278, doi:10.1038/nprot.2016.169.
 152. Walid Qoronfleh, M.; Benton, B.; Ignacio, R.; Kaboord, B. *Selective Enrichment of Membrane Proteins by Partition Phase Separation for Proteomic Studies*; 2003; Vol. 4;.
 153. Greer, D.A.; Ivey, S. *Distinct N-Glycan Glycosylation of P-Glycoprotein Isolated from the Human Uterine Sarcoma Cell Line MES-SA/D×5*;
 154. Maley, F.; Trimble, R.B.; Tarentino, A.L.; Plummer, T.H. *Characterization of Glycoproteins and Their Associated Oligosaccharides through the Use of Endoglycosidases I*; 1989; Vol. 180;.

155. Gribar, J.J.; Ramachandra, M.; Hrycyna, C.A.; Dey, S.; Ambudkar, S. V *Functional Characterization of Glycosylation-Deficient Human P-Glycoprotein Using A Vaccinia Virus Expression System*; 2000;
156. Richert D. Nancy; Aldwin Lois; Nitecki Danute; Gottesman Michael M.; Pastan Ira *Stability and Covalent Modification of P-Glycoprotein in Multidrug-Resistant KB*; 1988; Vol. 27;.
157. Schinkel, A.H.; Kemp, S.; Dolle, M.; Rudenko, G.; Wagenaar, E. N-Glycosylation and Deletion Mutants of the Human MDR1 P-Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 7474–7481, doi:10.1016/s0021-9258(18)53199-9.
158. Holding, A.N.; Lamers, M.H.; Stephens, E.; Skehel, J.M. Hekate: Software Suite for the Mass Spectrometric Analysis and Three-Dimensional Visualization of Cross-Linked Protein Samples. *J Proteome Res* **2013**, 12, 5923–5933, doi:10.1021/pr4003867.
159. Chen, H.; Zhou, H.X. Prediction of Solvent Accessibility and Sites of Deleterious Mutations from Protein Sequence. *Nucleic Acids Res* **2005**, 33, 3193–3199, doi:10.1093/nar/gki633.
160. Hagemans, D.; van Belzen, I.A.E.M.; Luengo, T.M.; Rüdiger, S.G.D. A Script to Highlight Hydrophobicity and Charge on Protein Surfaces. *Front Mol Biosci* **2015**, 2, doi:10.3389/fmolb.2015.00056.
161. Kamal Mandal; Gianina Wicaksono; Clinton Yu, J.J.A.; Michael R. Hoopmann; William C. Temple; Bonell Patiño Escobar; Maryna Gorelik; Christian H. Ihling; Matthew A. Nix; Akul Naik, E.R.; et al. Structural Surfaceomics Reveals an AML-Specific Conformation of Integrin-B2 as a CAR-T Therapy Target., doi:10.1101/2022.10.10.511511.
162. Szklarczyk, D.; Kirsch, R.; Koutrouli, M.; Nastou, K.; Mehryary, F.; Hachilif, R.; Gable, A.L.; Fang, T.; Doncheva, N.T.; Pyysalo, S.; et al. The STRING Database in 2023: Protein–Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest. *Nucleic Acids Res* **2023**, 51, D638–D646, doi:10.1093/nar/gkac1000.
163. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **2003**, 13, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
164. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Hackl, H.; Charoentong, P.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Fridman, W.H.; Pagès, F.; Trajanoski, Z.; Galon, J. ClueGO: A Cytoscape Plug-in to Decipher Functionally Grouped Gene Ontology and Pathway Annotation Networks. *Bioinformatics* **2009**, 25, 1091–1093, doi:10.1093/bioinformatics/btp101.
165. Clay, A.T.; Lu, P.; Sharom, F.J. Interaction of the P-Glycoprotein Multidrug Transporter with Sterols. *Biochemistry* **2015**, 54, 6586–6597, doi:10.1021/acs.biochem.5b00904.
166. 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 ABCB11-like Degenerate Nucleotide Binding Site Maintains Transport Activity by Avoiding Nucleotide Occlusion. *PLoS Genet* **2020**, 16, doi:10.1371/journal.pgen.1009016.
167. Kodan, A.; Futamata, R.; Kimura, Y.; Kioka, N.; Nakatsu, T.; Kato, H.; Ueda, K. ABCB1/MDR1/P-Gp Employs an ATP-Dependent Twist-and-Squeeze Mechanism to Export Hydrophobic Drugs. *FEBS Lett* 2021, 595, 707–716.
168. Stahl, K.; Graziadei, A.; Dau, T.; Brock, O.; Rappsilber, J. Protein Structure Prediction with In-Cell Photo-Crosslinking Mass Spectrometry and Deep Learning. *Nat Biotechnol* **2023**, doi:10.1038/s41587-023-01704-z.
169. Marcoux, J.; Wang, S.C.; Politis, A.; Reading, E.; Ma, J.; Biggin, P.C.; Zhou, M.; Tao, H.; Zhang, Q.; Chang, G.; et al. Mass Spectrometry Reveals Synergistic Effects of

- Nucleotides, Lipids, and Drugs Binding to a Multidrug Resistance Efflux Pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 9704–9709, doi:10.1073/pnas.1303888110.
170. Miletti-González, K.E.; Chen, S.; Muthukumaran, N.; Saglimbeni, G.N.; Wu, X.; Yang, J.; Apolito, K.; Shih, W.J.; Hait, W.N.; Rodríguez-Rodríguez, L. *The CD44 Receptor Interacts with P-Glycoprotein to Promote Cell Migration and Invasion in Cancer*;
 171. Mori, T.; Kitano, K.; Terawaki, S.I.; Maesaki, R.; Fukami, Y.; Hakoshima, T. Structural Basis for CD44 Recognition by ERM Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 29602–29612, doi:10.1074/jbc.M803606200.
 172. Georges, E. The P-Glycoprotein (ABCB1) Linker Domain Encodes High-Affinity Binding Sequences to α - and β -Tubulins. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7337–7342, doi:10.1021/bi7006228.
 173. Guo, H.; Dong, J.; Hu, S.; Cai, X.; Tang, G.; Dou, J.; Tian, M.; He, F.; Nie, Y.; Fan, D. Biased Random Walk Model for the Prioritization of Drug Resistance Associated Proteins. *Sci Rep* **2015**, *5*, doi:10.1038/srep10857.
 174. Yin, L.; Yang, Y.; Zhu, W.; Xian, Y.; Han, Z.; Huang, H.; Peng, L.; Zhang, K.; Zhao, Y. Heat Shock Protein 90 Triggers Multi-Drug Resistance of Ovarian Cancer via AKT/GSK3 β / β -Catenin Signaling. *Front Oncol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.620907.
 175. Xin, Y.; Yin, F.; Qi, S.; Shen, L.; Xu, Y.; Luo, L.; Lan, L.; Yin, Z. Parthenolide Reverses Doxorubicin Resistance in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Attenuating NF-KB Activation and HSP70 up-Regulation. *Toxicol Lett* **2013**, *221*, 73–82, doi:10.1016/j.toxlet.2013.06.215.
 176. Kumar, P.; Devaki, B.; Jonnala, U.K.; Amere Subbarao, S. Hsp90 Facilitates Acquired Drug Resistance of Tumor Cells through Cholesterol Modulation However Independent of Tumor Progression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2020**, *1867*, doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118728.
 177. Nimmervoll, B.; Chtcheglova, L.A.; Juhasz, K.; Cremades, N.; Aprile, F.A.; Sonnleitner, A.; Hinterdorfer, P.; Vigh, L.; Preiner, J.; Balogi, Z. Cell Surface Localised Hsp70 Is a Cancer Specific Regulator of Clathrin-Independent Endocytosis. *FEBS Lett* **2015**, *589*, 2747–2753, doi:10.1016/j.febslet.2015.07.037.
 178. Katayama, K.; Noguchi, K.; Sugimoto, Y. FBXO15 Regulates P-Glycoprotein/ABCB1 Expression through the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Cancer Cells. *Cancer Sci* **2013**, *104*, 694–702, doi:10.1111/cas.12145.
 179. Chai, A.B.; Callaghan, R.; Gelissen, I.C. The Ubiquitin E3 Ligase Nedd4 Regulates the Expression and Amyloid- β Peptide Export Activity of P-Glycoprotein. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23031019.
 180. Hsieh, V.; Kim, M.J.; Gelissen, I.C.; Brown, A.J.; Sandoval, C.; Hallab, J.C.; Kockx, M.; Traini, M.; Jessup, W.; Kritharides, L. Cellular Cholesterol Regulates Ubiquitination and Degradation of the Cholesterol Export Proteins ABCA1 and ABCG1. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 7524–7536, doi:10.1074/jbc.M113.515890.
 181. Prema S. Rao Kavita B. Mallya Kalkunte S. Srivenugopal K. C. Balaji U. Subrahmanyeswara Rao *RNF2 Interacts with the Linker Region of the Human P-Glycoprotein*; 2006;
 182. Hill, M.M.; Bastiani, M.; Luetterforst, R.; Kirkham, M.; Kirkham, A.; Nixon, S.J.; Walser, P.; Abankwa, D.; Oorschot, V.M.J.; Martin, S.; et al. *PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function*;
 183. Wanaski, S.P.; Ng, B.K.; Glaser, M. Caveolin Scaffolding Region and the Membrane Binding Region of Src Form Lateral Membrane Domains. *Biochemistry* **2003**, *42*, 42–56, doi:10.1021/bi012097n.

184. Yang, C.P.H.; Galbiati, F.; Volonté, D.; Horwitz, S.B.; Lisanti, M.P. Upregulation of Caveolin-1 and Caveolae Organelles in Taxol-Resistant A549 Cells. *FEBS Lett* **1998**, *439*, 368–372, doi:10.1016/S0014-5793(98)01354-4.
185. Yi, J.S.; Mun, D.G.; Lee, H.; Park, J.S.; Lee, J.W.; Lee, J.S.; Kim, S.J.; Cho, B.R.; Lee, S.W.; Ko, Y.G. PTRF/Cavin-1 Is Essential for Multidrug Resistance in Cancer Cells. *J Proteome Res* **2013**, *12*, 605–614, doi:10.1021/pr300651m.
186. Barakat, S.; Demeule, M.; Pilorget, A.; Régina, A.; Gingras, D.; Baggetto, L.G.; Béliveau, R. Modulation of P-Glycoprotein Function by Caveolin-1 Phosphorylation. *J Neurochem* **2007**, *101*, 1–8, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04410.x.
187. Hinrichs, J.W.J.; Klappe, K.; Hummel, I.; Kok, J.W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Enriched in Non-Caveolar Detergent-Insoluble Glycosphingolipid-Enriched Membrane Domains (DIGs) in Human Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 5734–5738, doi:10.1074/jbc.M306857200.

11. Tárgyszavak

multidrog rezisztencia; ABC transzporterek; P-glikoprotein; membrán; koleszterin; keresztkötéses tömegspektrometria; keresztkötés; mono-link; fehérje térszerkezet; rendezetlen régió

multidrug resistance; ABC transporters; P-glycoprotein; membrane; cholesterol; cross-linking mass spectrometry; cross-link; mono-link; protein structure; intrinsically disordered region

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Bacsó Zsoltnak, hogy szakmai tanácsival és támogatásával segítette PhD munkámat és előrehaladásomat.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Szöllösi Jánosnak és Prof. Dr. Panyi Györgynek, hogy lehetővé tették, hogy doktori tanulmányaim alatt Intézetükben dolgozhassak.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának szakmai segítségét és együttműködését kísérleteim során.

Szeretném kifejezni hálámat Dr. Schlosser Gittának, hogy doktori tanulmányaim leteltével lehetővé tette, hogy az MTA-ELTE Lendület Ionmobilitás-tömegspektrometria Kutatócsoport tagjaként folytathassam kísérleteimet és bátorítását PhD munkám befejezésében.

Hálás vagyok a Lendület csoport összes korábbi és jelenlegi munkatársának szakmai és emberi támogatásáért és barátságáért.

Köszönöm kollaborátoraink segítőkészségét, kiemelten a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatócsoportjából Dr. Medzihradszky Katalinnak és Dr. Klement Évának, hogy építő kritikáikkal és szakmai hozzáértésükkel lehetővé tették XL-MS méréseink megvalósítását.

Hálával tartozom szüleim és testvéreim állandó támogatásáért, bármilyen nehéz helyzet adódjék is, rájuk mindig számíthatok.

Köszönöm barátaim bátorító jelenlétét, Robin Frot Python számításokban nyújtott segítségét és kedvességét.

S. D. G.

A Waters Select Series Cyclic IMS tömegspektrométer beszerzése az ELTE Szint+ Témaerületi Kiválósági Program keretében valósult meg, az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásával.

A 2018-1.2.1-NKP-2018-00005 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2018-1.2.1-NKP pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A munkát az MTA Lendület programja, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA SNN 138407) támogatta.

13. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/366/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gellén Gabriella
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10079791

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gutay-Tóth, Z., **Gellén, G.**, Doan-Xuan, Q. M., Eliason, J. F., Vincze, J., Sente, L., Fenyvesi, F., Goda, K., Vecsernyés, M., Szabó, G., Bacsó, Z.: Cholesterol-Depletion-Induced Membrane Repair Carries a Raft Conformer of P-Glycoprotein to the Cell Surface, Indicating Enhanced Cholesterol Trafficking in MDR Cells, Which Makes Them Resistant to Cholesterol Modifications.
Int. J. Mol. Sci. 24 (15), 1-23, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241512335>
IF: 5.6 (2022)
2. **Gellén, G.**, Klement, É., Biwott, K., Schlosser, G., Kalló, G., Csósz, É., Medzihradszky-Fölkl, K., Bacsó, Z.: Cross-Linking Mass Spectrometry on P-Glycoprotein.
Int. J. Mol. Sci. 24 (13), 1-24, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241310627>
IF: 5.6 (2022)

További közlemények

3. Nagy, K., **Gellén, G.**, Papp, D., Schlosser, G., Révész, Á.: Optimum collision energies for proteomics: The impact of ion mobility separation.
J. Mass Spectrom. Epub, 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jms.4957>
IF: 2.3 (2022)
4. Mammadova, R., Maggio, S., Fiume, I., Bokka, R., Moubarak, M., **Gellén, G.**, Schlosser, G., Adamo, G., Bongiovanni, A., Trepiccione, F., Guescini, M., Pócsfalvi, G.: Protein Biocargo and Anti-Inflammatory Effect of Tomato Fruit-Derived Nanovesicles Separated by Density Gradient Ultracentrifugation and Loaded with Curcumin.
Pharmaceutics. 15 (2), 1-21, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15020333>
IF: 5.4 (2022)





5. Sárvári, É., **Gellén, G.**, Sági-Kazár, M., Schlosser, G., Solymosi, K., Solti, Á.: Qualitative and quantitative evaluation of thylakoid complexes separated by Blue Native PAGE.
Plant Methods. 18 (23), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1186/s13007-022-00858-2>
IF: 5.1
6. Mammadova, R., Fiume, I., Bokka, R., Kralj-Iglič, V., Božič, D., Kisovec, M., Podobnik, M., Zavec, A. B., Hočevár, M., **Gellén, G.**, Schlosser, G., Pócsfalvi, G.: Identification of Tomato Infecting Viruses That Co-Isolate with Nanovesicles Using a Combined Proteomics and Electron-Microscopic Approach.
Nanomaterials. 11 (8), 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nano11081922>
IF: 5.719
7. Bulyáki, É., Kun, J., Molnár, T., Papp, A., Micsonai, A., Vadászi, H., Márialigeti, B., Kovács, A. I., **Gellén, G.**, Yamaguchi, K., Lin, Y., So, M., Józsi, M., Schlosser, G., Lee, Y. H., Liliom, K., Goto, Y., Kardos, J.: Pathogenic D76N Variant of beta(2)-Microglobulin: Synergy of Diverse Effects in Both the Native and Amyloid States.
Biology (Basel). 10 (11), 1-22, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biology10111197>
IF: 5.168

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,887

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,2**

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

Debrecen, 2023.08.03.

