

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A P-glikoprotein konformáció változásainak és membrán mikrodomén lokalizációjának vizsgálata

Mészáros-Bársony Orsolya

Témavezető: Dr. Goda Katalin



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2019

A P-glikoprotein konformáció változásainak és membrán mikrodomén lokalizációjának vizsgálata

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

Írta: Mészáros-Bársony Orsolya, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Goda Katalin, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
tagok: Dr. Homolya László, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ,
Immunológiai Intézet diszkussziós terme,
2014. május 23., 14.30 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Hegedűs Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Hegedűs Tamás, PhD
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2020. január 13., 13.00 óra

1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések esetén alkalmazott hagyományos kemoterápia sokszor nem bizonyul elég hatékonynak az általánosan alkalmazott növényi eredetű vagy szintetikus gyógyszerekkel (citosztatikumok) szemben fellépő rezisztencia mechanizmusok miatt. A citosztatikus terápia kudarcáért a daganatos sejtek már eleve meglévő „intrinsic” rezisztenciája (elsődleges rezisztencia), vagy a kemoterápia folyamata során kialakuló „szerzett” rezisztencia tehető felelőssé. A metasztatikus daganatok 90%-ában a sejtszintű rezisztencia mechanizmusok okozzák a terápiás válasz elmaradását. Ezen mechanizmusok egyik leggyakoribb formája a hatóanyagok intracelluláris térbe való bejutását csökkentő széles szubsztrát spektrumú energia-függő gyógyszer exporter(ek) fokozott kifejeződése a sejtek plazmamembránjában. Ezen transzporterek legfőbb tulajdonsága, hogy képesek a toxikus vegyületeket a sejtekből eltávolítani, mielőtt azok kifejthetnék intracelluláris hatásaikat. Az esetek többségében további problémát jelent, hogy a tumor nemcsak a citosztatikus terápia során aktuálisan alkalmazott hatóanyagra vagy hatóanyagokra válik rezisztenssé, hanem nagyon sok más, hatásmechanizmusában és szerkezetében teljesen eltérő daganat kemoterápiás vegyületre is. A jelenséget *multidrog rezisztenciának* nevezik, melynek mechanizmusát és megelőzésének lehetőségeit széles körben tanulmányozzák.

In vitro vizsgálatok alapján a tumorsejtekben kialakuló multidrog rezisztencia legfőbb okozójaként három exporter típusú, az ABC transzporterek családjába tartozó fehérjét azonosítottak, nevezetesen a *P-glikoproteint* (*ABCB1*), az *MRP1-et* (*ABCC1*) és a *BCRP-t* (*ABCG2*). Ezen transzporterek fiziológias körülmények között a szervezet számos szövetében, de elsősorban a barrier funkciót betöltő szövetekben fejeződnek ki és a xenobiotikumok elleni védekezésben játszanak szerepet, míg daganatos megbetegedések esetén expressziójuk fokozódásával biztosítják a tumorsejtek túlélését. A transzporterek kifejeződésének mértéke gyakran korrelál a tumor grádusával és kifejeződésük a betegség kimenetelét jelző prognosztikai faktor.

A humán genomban 48 ABC fehérjét kódoló gént azonosítottak, melyeket 7 alcsaládba soroltak ABCA-tól ABCG-ig. A humán ABC fehérjék többsége transzporter szerepet tölt be, de vannak olyanok is melyek ioncsatornaként funkcionálnak vagy ioncsatorna fehérjék működésének szabályozásában vesznek részt. A család elsőként felfedezett tagjának, a *P-glikoproteinnak* a pontos működése a mai napig nem teljesen tisztázott, így intenzív kutatások folynak ennek megértésére.

1.1 A Pgp szerkezete

Az 1280 aminosavból álló glikoprotein egy flexibilis linker régió által összekapcsolt két homológ félből áll, melyek egyenként egy transzmembrán domént (TMD) és egy nukleotid-kötő domént (NBD) tartalmaznak. A Pgp polipeptidláncán belül a 4 domén a TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 sorrendben követi egymást. A két TMD tipikusan 6-6 membránon átvelő alfa-hélixből áll (TM1-TM12), melyek a szubsztrátok megkötésére specializálódva egyetlen funkcionális egységet képeznek. Azonban a szubsztrát kötőhelyek száma, elrendeződése és a szubsztrát felismerés molekuláris mechanizmusa pontosan nem ismert. Az ABC fehérjék nukleotid-kötő doménjei felelősek az ATP kötéséért és hidrolíziséért, az általuk felszabadított és közvetített energia révén valósul meg a szubsztrátok transzportja. Az ABC fehérjék, így a Pgp nukleotid-kötő doménje is számos az evolúció során konzervált szekvencia motívumot tartalmaz: ezek a Walker A és Walker B szekvenciák, az “ABC-signature” elem, valamint az A, D, H és Q-hurkok. Ezek a motívumok szerepet játszanak az azonos (NBD-NBD) vagy a különböző domének (TMD-NBD) közötti interakcióban és közvetlen vagy közvetett módon kapcsolatban állnak a megkötött ATP molekulával is. Feltételezik, hogy a NBD-k két ATP molekula megkötésével egy jellegzetes, ún. “szendvics-dimert” hoznak létre úgy, hogy az egyik NBD Walker A és B szekvenciája a másik NBD “ABC-signature” motívumához kapcsolódik egy ATP molekulán keresztül.

Mint minden membrán transzporter a Pgp is rendkívül nehezen kristályosítható, így szerkezetének pontos megismerése hatalmas kihívást jelent a kutatók számára. A humán Pgp különböző konformációs állapotairól nem állnak rendelkezésre nagy felbontású röntgen-krisztallográfiás szerkezeti modellek, így a fehérje működésének megértésére bakteriális ABC transzporterek vagy egér Pgp kristályszerkezetén alapuló homológia modelleket, illetve újabban krio-EM vizsgálatokon alapuló szerkezeti modelleket alkalmaznak. Ezen eredmények alapján azt feltételezik, hogy a nukleotidok kötődése a transzmembrán hélixek átrendeződéséhez vezet és megváltoztatja a transzporter szubsztrátkötő zsebének elérhetőségét a citoplazmatikus oldal felől nyitott állapotból az extracelluláris tér irányába nyitott konformációba. Ezen modellek azt is valószínűsítik, hogy a fehérje ATP-mentes, a citoplazma felé nyitott konformációs állapota képes a szubsztrátok megkötésére.

1.2 A P-glikoprotein katalitikus ciklusa és konformáció változásainak detektálása az UIC2 monoklonális antitesttel

A citoplazma felé nyitott konformációs állapot és az összekapcsolódott NBD-kkel és az extracelluláris tér felé nyitott TMD-kkel jellemezhető állapotok közötti átmenet

feltehetőleg konformáció változások sorozatát foglalja magában, mely végül a szubsztrát kötő affinitás csökkenését eredményezi és lehetővé teszi a koncentráció grádiens ellenében történő szubsztrát transzportot. Azonban nem teljesen tisztázott, hogy a nukleotidok kötődése, a NBD-k dimerizációja, majd az ATP(k) hidrolízise hogyan kapcsolódik a TMD-k konformáció változásaihoz.

Az aktív transzporterek katalitikus ciklusának hajtóereje az ATP hidrolízis, mely Pgp esetében mindkét funkcionálisan szimmetrikus kompozit ATP-kötőhelyen végbemehet. Azonban a mai napig nem ismert, hogy egy szubsztrát molekula transzportjához hány (egy, kettő esetleg több) ATP molekula hidrolízise szükséges.

Az UIC2 konformáció érzékeny kötődésű monoklonális antitest ép sejteken a sejtfelszíni Pgp molekulák 10-40 %-át ismeri fel. Azonban bizonyos Pgp szubsztrátok, modulátorok (pl. vinblasztin, ciklosporin A (CSA)) jelenlétében, illetve a sejtek ATP depléciója hatására az összes sejtfelszínen kifejeződő Pgp molekula jelölhetővé válik ezen antitesttel. Bakteriális toxinokkal permeabilizált Pgp⁺ sejtekkel végzett kísérletekben azt is igazolták, hogy a különböző nukleotidok (ADP, ATP vagy nem hidrolizáló ATP analógok) adása koncentráció-függő módon csökkenti a sejtek UIC2-reaktivitását. Mindezen eredmények a fehérje katalitikus ciklusa során lejátszódó konformáció változásokra és a különböző konformációs állapotok eltérő UIC2 affinitására utalnak.

1.3 A Pgp mint transzmembrán fehérje megjelenése a „raft” és „nem-raft” membrán mikrodoménekben

A Pgp mint transzmembrán fehérje funkciója szervesen kapcsolódik az őt beágyazó lipid kettősréteghez, ahonnan szubsztrátjait összegyűjti. Ennek megfelelően a membrán mikrokörnyezet tulajdonságai befolyásolják a fehérje konformáció változásait, transzport aktivitását, szubsztrátjainak megoszlását a lipid kettősrétegben, valamint kölcsönhatásukat a transzporter szubsztrát kötőhelyével. Továbbá a membrán összetétele a transzporter ATP kötését és hidrolízisét is befolyásolhatja a nukleotid-kötő doménekkel történő interakció révén vagy a transzporter transzmembrán régióinak stabilizálásával. A Pgp ATPáz aktivitásának drogok általi stimulációját illetve gátlását szintén befolyásolja a fehérje lipid környezete. Az állati sejtek plazmamembránjának koleszterin tartalma csökkenti a membrán permeabilitását a foszfolipidek közötti hézagok kitöltésével. Ennek megfelelően a koleszterin jelenléte csökkenti bizonyos a Pgp-vel kölcsönható vegyületek (pl. a CSA) behatolását a lipid kettősrétegbe, míg annak kivonása metil- β -ciklodextrinnel növeli a vinkrisztin felvételét mind

a Pgp-t expresszáló, mind pedig a Pgp-negatív kontroll sejtekbe. Összességében megállapítható, hogy a membrán tulajdonságai összetett módon befolyásolják a Pgp működését, így a sejtmembrán tulajdonságainak modulálása ígéretes megközelítés lehet a multidrog rezisztencia mérséklésére vagy legyőzésére a klinikai gyakorlatban.

Bizonyos membrán mikrodomének, mint például az ún. „lipid raftok” = lipid tutajok magas GPI-kihorgonyzott fehérje, koleszterin és glikoszfinolipid tartalmuk miatt különböznek a membrán egyéb régióitól. Funkciójukat tekintve a „lipid raftok” és a caveolák részt vesznek a jelátvitelben, a transzportban és a „membrán trafficking” folyamatokban egyaránt. A „lipid raftok” szerkezete egy struktúrált, TX-100 rezisztens központi, valamint egy kevésbé struktúrált TX-100 által oldható, de enyhébb detergensekben (pl. Brij 98) nem oldható külső régióból áll. Korábbi vizsgálatok alapján a Pgp csak részben asszociálódik a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménnel, sokféle sejtben inkább a Brij96 vagy Lubrol rezisztens membrán mikrodoménekben található. Különböző membrán mikrodoménekben való elhelyezkedése a pumpa heterogén működését is okozhatja. Vannak olyan elképzelések is, melyek szerint kizárólag a raft asszociált Pgp molekulák aktívak. Ez utóbbi feltételezés felveti annak a lehetőségét, hogy a „raft” és „nem-raft” környezetben való megoszlásának befolyásolásán keresztül módosítható a Pgp működése.

2. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a Pgp katalitikus ciklusát széles körben tanulmányozzák, nem pontosan ismert, hogy mely katalitikus lépések során, az ATP kötése vagy hasítása hatására képes a fehérje a citoplazma felé nyitott konformációból átbillenni az extracelluláris tér felé nyitott konformációba és véghezvinni a szubsztrát transzlokációját. Az sem tisztázott, hogy egy ciklus során a Pgp által kötött mindkét ATP molekula elhidrolizál-e, valamint, hogy az ATP hidrolízis random módon történik a két kötőhelyen vagy szigorú sorrendiség szerint zajlik.

Ennek megfelelően célul tűztük ki a humán Pgp katalitikus ciklus során bekövetkező konformáció változásainak vizsgálatát, a fehérjét stabilan normál membrán környezetükben kifejező emlős sejteken a korábban *Druley* és munkatársai által bevezetett *Staphylococcus aureus* alfa-toxint használó permeabilizálási protokoll és az UIC2-reaktivitási esszé adaptálásával, tovább fejlesztésével. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Mely katalitikus esemény váltja ki az UIC2-reaktív konformációból az UIC2-t nem kötő konformációba történő átmenetet?
2. Az UIC2 antitesttel átfedő extracelluláris epitópokat felismerő monoklonális antitestek (4E3, 15D3) kötődése érzékeny-e a transzporter ATP-függő konformáció változásaira?
3. Hogyan befolyásolják az UIC2-reaktív és az UIC2-vel nem jelölhető Pgp konformációk közötti átmenet bekövetkezését az egyik (K433M vagy K1076M) vagy mindkét oldali Walker A szekvenciában (K433M/K1076M) előidézett mutációk?
4. Mi jellemzi az ATP hidrolízist követően foszfát analógokkal csapdázott konformer kialakulási és szétesési kinetikáját vad típusú és Walker A mutáns Pgp-k esetében?

Munkánk második szakaszában az élő sejteken detektálható különböző raft és citoszkeleton asszociáltságot mutató UIC2-reaktív és UIC2-t nemkötő Pgp populációk tulajdonságait vizsgáltuk, melynek során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

5. Van-e kapcsolat ép sejteken az intracelluláris ATP koncentráció és az UIC2 antitest kötődése között az ATP szint modulálása során?
6. Az intracelluláris ATP koncentráció változások milyen hatással vannak a Pgp molekulák detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára?
7. A Pgp mindkét oldali ATP-kötőhelyének Walker A szekvenciájában előidézett mutáció befolyásolja-e a fehérje membrán mikrodoménekhez való asszociációját?

8. Milyen az UIC2 konformáció szenzitív kötődésű antitest kötődése alapján megkülönböztetett két Pgp populáció internalizációja és ennek függése a membrán koleszterin tartalmától?

3. Anyagok és módszerek

3.1 Alkalmazott sejtvonalak, sejtenyésztés

Kísérleteinkben az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat, valamint a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat és annak vinblasztinnal történő szelekcióval előállított Pgp⁺ változatát (KB-V1) használtuk. A vad típusú, K433M, K1076M és K433M/K1076M dupla mutáns Pgp-t stabilan expresszáló NIH 3T3 sejtvonalakat a *Sleeping Beauty* transzpozon-alapú génexpressziós rendszer segítségével hozták létre kollaborációs partnereink.

A sejteket hővel-inaktivált főtális szarvasmarha szérumot, L-glutamint és penicillin-streptomycin koktélt tartalmazó DMEM tenyésztő folyadékban növesztettük 37 °C-on, 5 %-os CO₂ atmoszférában, 95 %-os páratartalom mellett. Azokhoz a kísérletekhez, amelyekhez redkívvül magas expressziós szintű sejtekre volt szükség a vad típusú Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejtvonalat a magas expressziós szint fenntartására doxorubicint tartalmazó tápoldatban növesztettük, míg a KB-V1 sejteket vinblasztin mellett tenyésztettük. A sejteket felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő folyadékba helyeztük át. Sejtvonalaink mindegyike a felülethez tapadva növekedett, melyekből tripszines kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót felhasználásuk előtt. A FRET-alapú ATP szenzort tartalmazó plazmidot lentivírus vektor segítségével fejeztük ki a KB-V1 sejteken.

3.2 Sejtek permeabilizálása *Staphylococcus aureus* α -toxinnal

A sejteket *Staphylococcus aureus* α -toxinnal glükóz-mentes foszfát-alapú sóoldatban marha szérum albumin jelenlétében kezeltük 37 °C-on 30 percig. Ilyen körülmények között a kezelés végére a sejtek kb. 50 %-a permeabilizálódott, azaz mutatott propidium-jodid pozitivitást. A reakció PBS-sel történő leállítása után a sejteket szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd a nem-kötődött toxint glükóz-mentes PBS-sel történő mosással távolítottuk el, majd a sejteket glükóz-mentes PBS-ben vettük fel a további kezelésekhez.

3.3 Nukleotid kötődés affinitásának meghatározása

A permeabilizált sejteket nukleotidok széles koncentráció tartományban történő alkalmazásával 20 percig előinkubáltuk, majd mosás nélkül tovább inkubáltuk telítő koncentrációban alkalmazott UIC2-A647 monoklonális antitesttel 37 °C-on 30 percig. Az ATP hidrolízis gátlása érdekében az ATP-t Mg²⁺-mentes körülmények között EDTA jelenlétében adtuk vagy az ATP helyett nem-hidrolizáló ATP analóg AMP-PNP/Mg²⁺-ot alkalmaztunk vagy a kísérletet ATP/Mg²⁺ jelenlétében, de 4 °C-on végeztük. Az utóbbi esetben az A647-konjugált UIC2 monoklonális antitesttel történő 45 perces jelölést is 4 °C-on

hajtottuk végre. Az antitesttel történő jelölést követően a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel. A permeabilizált PI-pozitív sejtek áramlási citométerrel mért UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását a nukleotid koncentráció függvényében ábrázoltuk. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a Pgp nukleotidokhoz való látszólagos affinitását, az ábrázolt mérési pontokat négy-paraméteres Hill-függvény segítségével illesztettük.

3.4 Nukleotid csapdázás („trappelés”)

A Pgp ATP hidrolízist követő katalitikus átmeneti állapotát foszfát analógok (vanadát vagy berillium-fluorid (BeF_x)) segítségével stabilizáltuk. A permeabilizált sejteket ATP/Mg^{2+} -ot és vanadátot vagy BeF_x -ot tartalmazó PBS-ben szubsztrátok jelenlétében vagy azok hiányában inkubáltuk 37 °C-on. A kezelés során meghatározott időközönként mintát vettünk, melyeket kétszer mostunk jéghideg PBS-sel, mely vanadátot vagy BeF_x -ot tartalmazott a korábban alkalmazott koncentrációban, majd UIC2-A647 antitesttel 4 °C-on 45 percig jelöltük. A minták UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását az idő függvényében ábrázoltuk.

3.5 A vanadát-trappelt poszt-hidrolízis állapotból való visszatérés

Az ATP/Mg^{2+} és vanadát kezeléssel a poszt-hidrolízis állapotban csapdázott permeabilizált sejteket 3-szor mostuk jéghideg PBS-sel, majd ATP és szubsztrátok (verapamil, vinblasztin) jelenlétében és hiányában 37 °C-on inkubáltuk N-etil-maleimidet (NEM) tartalmazó PBS-ben. Meghatározott időközönként mintákat vettünk, melyeket NEM-PBS-sel kétszer mostunk és 37 °C-on 15 percig vagy 4 °C-on 45 percig jelöltünk UIC2-A647 antitesttel. Az inkubálás végén a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel, majd jégen tartottuk az áramlási citometriás mérés kezdetéig.

3.6 Detergens elúciós eljárás (FCDR, Áramlási citometriás detergens-rezisztencia teszt)

A különböző Pgp elleni antitestekkel (UIC2-A647, 4E3-A647, 15D3-A647) megjelölt NIH 3T3 MDR1 sejteket két részre osztottuk. A minták egyik feléhez jéghideg TX-100 oldatot adtunk, a másik feléhez pedig jéghideg PBS-t, majd 20 percen keresztül jégen tartottuk a mintákat, végül pedig paraformaldehid oldattal fixáltuk 4°C-on. A sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük. A Pgp molekulák TX-100 rezisztens raftokhoz való asszociációjának jellemzésére a TX-100-zal kezelt minták fluoreszcencia intenzitását a TX-100-zal nem kezelt minták fluoreszcencia intenzitásának százalékos arányában fejeztük ki.

3.7 A sejtek koleszterin tartalmának módosítása

A sejteket különböző antitestekkel (UIC2-A647, 15D3-A647) történő jelölést követően a sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálásához random metilezett- β -ciklodextrinnel vagy ennek koleszterinnel képzett komplexével kezeltük 37 °C-on 20 percig, majd kétszer mostuk PBS-sel.

3.8 Az ATP koncentráció változás hatása a membránban expresszált Pgp szintre és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára

A sejteket különböző ideig éhezettük 2-deoxi-D-glükóz-t tartalmazó PBS-ben, majd kétszer mostuk PBS-sel. A mosást követően telítő koncentrációban alkalmazott 4E3-A647 anti-Pgp antitesttel jelöltük a sejteket 37 °C-on 30 percig, majd az éhezés időtartamának függvényében ábrázoltuk az áramlási citometriás mérésekkel kapott 4E3-A647 fluoreszcencia intenzitásokat.

3.9 A P-glikoprotein UIC2-reaktivitása és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata

Az intakt sejtek i.c. ATP koncentráció változásainak követésére FRET-alapú ATP szenzort kifejező KB-V1 sejteket használtunk. Az intracelluláris ATP szint csökkentésére a sejteket meghatározott időtartamig kezeltük 2-deoxi-D-glükózzal (2DG). Az i.c. ATP szint teljes kimerítéséhez 2DG-zal és kálium-cianiddal kezeltük a sejteket. Kontroll mintákat is készítettünk, melyeket 0 mM illetve 8 mM glükózt tartalmazó PBS-ben inkubáltunk, de nem kezeltünk 2-deoxi-D-glükózzal, míg másokat permeabilizáltunk és vizsgáltuk az UIC2-A647 antitest kötődését. Az UIC2 fluoreszcencia intenzitás meghatározásához a kezelések végén a sejteket UIC2-A647 antitesttel jelöltük 37 °C-on 3 percig, majd a mintákat alaposan mostuk és az antitest kötődését, valamint az ATP szenzor fluoreszcens jelét áramlási citométerben mértük.

3.10 A Pgp molekulák internalizációjának vizsgálata

A Pgp specifikus antitesttel (UIC2-A647, 15D3-A647, 4E3-A647) megjelölt mintákat kettéosztva a minta párok egyikét gl-PBS-sel, a másikat alacsony pH-jú oldattal (0.5 M NaCl, 0.1 M glicin, pH=2.5) mostuk szobahőmérsékleten, majd ismét gl-PBS-ben vettük fel. Az alacsony pH-jú oldat eltávolítja a sejtfelszíni Pgp-khez kötődött antitestet, így az alacsony pH-jú oldattal illetve PBS-sel mosott minták fluoreszcencia intenzitásainak hányadosa megadja az internalizálódott Pgp-k arányát.

3.11 Áramlási citometriás mérés

A sejtek fluoreszcencia intenzitását Becton Dickinson FACS Array áramlási citométerrel mértük, az adatokat BDIS CellQuest szoftver segítségével analizáltuk. Az Alexa-647 festék gerjesztésére a 635 nm-es lézert használtuk és a fluoreszcenciát a vörös csatornában detektáltuk (emisszió: 661/16 nm). A propídium-jodidot (PI) az 532 nm-es lézerrel gerjesztettük és az emissziót 585/42 nm-en detektáltuk. Az FSC és SSC jelek alapján a sejtörmelékot kizártuk az elemzésből. Élő sejteken végzett vizsgálatok esetében a PI negatív sejtpopulációt használtuk, míg permeabilizált sejtekkel végzett kísérletek esetén a PI pozitív sejtpopulációt elemeztük.

Az ATP szenzor és az antitest jelének szimultán detektálására Becton Dickinson FACS Aria áramlási citométert használtunk. A sárga fluoreszcens fehérjét 445 nm-es lézerrel gerjesztettük és az emissziót 530/30 nm-en detektáltuk. Az Alexa-647 festék gerjesztésére a szilárdtest lézer 631 nm-es vonalát használtuk és a fluoreszcenciát a vörös csatornában detektáltuk (660/20 nm).

3.12 Statisztikai analízis

Adatainkat a SigmaStat program segítségével analizáltuk, az ábrákon az átlag $\pm$ SD értékeket mutatjuk. Két csoport összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük, a statisztikai szignifikanciát 3 vagy több csoport esetében variancia-analízissel (ANOVA) állapítottuk meg Holm-Sidak post-hoc teszt alkalmazásával. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $P < 0,05$ volt.

4. Eredmények I.

4.1. Az UIC2 kötődés változások által detektált TMD konformáció változások a NBD-kben végbemenő folyamatokat jeleznek

A sejtmembrán mérsékelt permeabilizálása *Staphylococcus aureus* alfa-toxin vagy streptolizin segítségével lehetővé teszi a sejt intracelluláris környezetének módosítását, de nem zavarja meg a membrán szerkezetét és a benne elhelyezkedő transzporterek működését. Ennek a módszernek köszönhetően képesek voltunk a nukleotidok sejtekből való eltávolítására és a Pgp molekulák ATP-mentes, magas UIC2-affinitású konformációban való szinkronizálására. Ugyanakkor a permeabilizált sejtek ATP/Mg²⁺-mal történő feltöltése koncentráció-függő módon indukálta a Pgp molekulák alacsony UIC2-affinitású konformációs állapotba történő átfordulását. Az ATP kötődés látszólagos affinitására kapott érték megegyezett a korábbi irodalmi adatokkal és hasonló volt az ATP hidrolízis K_M értékéhez, melyet munkacsoportunk Pgp⁺ NIH 3T3 sejtekből preparált membrán mintákon mért.

A 15D3 és 4E3 nem-konformáció érzékeny monoklonális antitestek kötődése nem változott meg magas ATP/Mg²⁺ koncentráció mellett sem, bár ezek az antitestek az UIC2-vel kompetálnak és vele részlegesen átfedő extracelluláris epitópokat ismernek föl a Pgp molekulán. Ezen tulajdonságukat kihasználva kísérleteinkben kontroll antitestként használtuk őket az UIC2 antitest által detektált konformáció változások tényleges bekövetkezésének bizonyítására.

4.2 Kontroll kísérletek

Kontroll kísérleteinkben az adenzin-monofoszfát (AMP) nem idézett elő UIC2 antitesttel detektálható konformáció változást a Pgp molekulákban valószínűleg azért, mert az AMP szerkezetéből adódóan képtelen a nukleotid-kötő domének dimerizációjának kiváltására, illetve a TMD-kben végbemenő UIC2 antitest által detektálható konformáció változás előidézésére. Ellenben az adenzin-difoszfát (ADP) az ATP-hez hasonló konformáció változást indukált.

Az N-etil-maleimid (NEM) kovalensen kötődik a Pgp Walker A motívumában található Cys aminosavhoz, amennyiben a nukleotid kötőhely üres vagy ADP-t tartalmaz, így a Pgp molekulákat ATP-t nem kötő UIC2 reaktív konformációban csapdázza. Az ATP β és γ -foszfátja szintén a Walker A motívummal lép kölcsönhatásba, így a nukleotid kötőhely ATP-vel történő telítése gátolja az NEM kötődését, csökkentve ezzel annak pumpához való látszólagos affinitását, melyet az UIC2 kötődési görbék jobbra tolódása jelzett ATP

jelenlétében. Ezek az eredményeink azt bizonyítják, hogy a nukleotid kötőhelyben bekövetkező változások TMD konformáció változásokat indukálnak, melyeket képesek vagyunk az UIC2 antitesttel detektálni.

4.3 A nukleotid kötődés indukálja a Pgp-k extracelluláris tér felé nyitott konformációs állapotának kialakulását

A nem-hidrolizáló ATP analóg AMP-PNP konformáció változást indukált a TMD-kben, melyet az UIC2 kötődés nukleotid koncentráció-függő csökkenése jelzett. Az ATP hidrolízisét akadályozó kísérleti körülmények esetén: az ATP-t Mg^{2+} hiányában alkalmazva vagy a kísérletet jégen végrehajtva szintén végbement a Pgp-eket az extracelluláris tér felé nyitott állapotba átvivő konformáció változás, de ez magasabb ATP koncentrációk mellett következett be, mint a hidrolízist engedő körülmények között.

A foszfát analóg anionok (ortovanadát, BeF_x) képesek a Pgp transzport funkciójának és ATPáz ciklusának gátlására azáltal, hogy stabilan bekötődnek a hidrolízis során felszabaduló γ -foszfát helyére. Az így kialakuló stabil Pgp-ADP-vanadát komplex kizárólag olyan feltételek mellett jöhet létre, amely megengedi legalább egy ATP molekula hidrolízisét. A Pgp-ADP- V_i stabil komplex létrejöttének következtében, az ATP hidrolízisét lehetővé tevő körülmények között kísérleteinkben a vanadát növelte a nukleotid kötődés látszólagos affinitását, míg ez nem volt megfigyelhető az ATP hidrolízisét kizáró kísérleti körülmények között.

4.4 A Walker A szekvencia lizin aminosavának féloldali mutációja nem gátolja meg az ATP kötődését és a szubsztrát-stimulált ATP hidrolízist

Irodalmi adatok szerint az ATP terminális foszfátjával kiterjedt kötéseket létesítő Walker A szekvenciában található konzervált lizin aminosav metioninra történő cseréje az ATPáz aktivitás gátlását okozza. Ennek tanulmányozására a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli rendszer segítségével olyan emlős sejt vonalakat hoztunk létre, melyek stabilan expresszálják a vad típusú, az egyik Walker A szekvenciában mutáns (K433M vagy K1076M) vagy mindkét oldali Walker A szekvenciában mutációt hordozó Pgp molekulákat (K433M/K1076M). Korábbi tanulmányokkal egyezően eredményeink azt mutatták, hogy kizárólag az egyik nukleotid-kötő domént érintő mutációk nem akadályozták meg a nukleotidok kötődését, melyet a K433M és K1076M Pgp variánsok UIC2-reaktivitásának csökkenése jelzett AMP-PNP és ATP jelenlétében. Kollaborációs partnereink korábbi vizsgálatai kimutatták, hogy az egyik Walker A szekvencia lizin aminosavát érintő mutáció

ellenére a Pgp-k a foszfát analóg fluoroaluminát jelenlétében jelölődtek [α - ^{32}P]-8-azido-ATP-vel, ami ezen mutánsok részleges katalitikus aktivitását jelezheti. Jelen munkánk során azt tapasztaltuk, hogy vanadát jelenlétében az egyetlen lizin mutációt hordozó fehérjék ATP-hez való látszólagos affinitása 5-10-szeresére nőtt a csak ATP-vel kezelt mintákhoz képest. Mivel a vanadáttal vagy BeF_x -dal történő komplex-képződés előfeltétele az ATP hidrolízis bekövetkezése, eredményeinkből arra következtetünk, hogy az egyik molekula-felet érintő lizin mutáció ellenére is bekövetkezik az ATP hidrolízise. Ezzel ellentétben, mindkét molekula-fél Walker A lizinjét érintő szimultán mutáció stabil UIC2-kötő konformációt eredményez, mely nukleotidok jelenlétében is megmarad.

4.5 A féloldali Walker A mutánsok is rendelkeznek szubsztrát-stimulált ATP hidrolízis aktivitással

A Pgp katalitikus ciklusának sebessége transzportált szubsztrátok jelenlétében jelentősen felgyorsul, amit a fehérje ATPáz aktivitásának szubsztrátok jelenlétében mért fokozódása jelez (szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitás). A BeF_x vagy V_i által csapdázott poszt-hidrolitikus komplexek létrejöttének kinetikai analízise során azt tapasztaltuk, hogy a Pgp-k alacsony UIC2-affinitású poszt-hidrolitikus állapotban való progresszív felhalmozódása hasonló kinetikával következik be a vad típusú és az egyik molekula-félben mutációt hordozó Pgp variánsok esetében. Eredményeink azt is bizonyítják, hogy Pgp szubsztrátok (pl. verapamil) jelenlétében szignifikánsan felgyorsul a foszfát analógok által stabilizált átmeneti komplex képződése mind a vad típusú, mind a féloldali mutációt hordozó Pgp molekulák esetében. A szubsztrátok ATP hidrolízist fokozó hatása nem az ATP kötődés affinitásának növekedésével függ össze, mivel az ATP kötés látszólagos affinitása a Pgp-hez még magas szubsztrát koncentrációnál sem változott meg. Eredményeinkből összességében arra következtethetünk, hogy a Walker A szekvenciában található konzervált lizin aminosav mutációja ellenére a katalitikus ciklus képes eljutni a foszfát analógok által stabilizált lépésig, amennyiben a mutáció a fehérje két nukleotid-kötő doménjének csak az egyikét érinti. Mivel viszonylag hosszú idő szükséges a BeF_x és V_i által stabilizált poszt-hidrolitikus komplexek képződéséhez a ciklus teljes időtartamához viszonyítva, feltételezhető, hogy az anionok által stabilizált komplex rendkívül kis valószínűséggel jön létre. Ennek magyarázata az lehet, hogy a foszfát lehasadása és a nukleotid disszociációja közötti foszfát analóg-“szenzitív” állapot nagyon rövid élettartamú a ciklus során. Eredményeinkből megállapítható, hogy mivel a féloldali Walker A mutáns fehérjék a vad-típusú Pgp-hez hasonlóan nemcsak az ATP hidrolízisére képesek, hanem átlagosan ~1200–2500 cikluson is képesek keresztül menni,

mielőtt BeF_x vagy vanadát által csapdázódnak, ezért a Walker A mutánsok is rendelkeznek gyenge, de szignifikáns szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitással.

4.6 A vanadát által csapdázott állapotból való visszatérés vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k esetében

A vanadát (vagy BeF_x) által csapdázott állapot kialakulásának időkinetikája hasonló volt a vad típusú és a féloldali mutáns Pgp-k esetében, ami feltételezi, hogy az az időtartam, melyet a működő transzporter a hidrolízist követő „vanadát-szenzitív” poszt-hidrolitikus állapotban tölt hasonló a vad és féloldali Walker A mutánsoknál.

Bár a foszfát analógokkal csapdázott poszt-hidrolitikus komplex rendkívül stabil, ha a vanadátot eltávolítjuk a médiumból megfigyelhető a komplex szétesése és a vad típusú Pgp-k rendkívül lassú visszatérése az UIC2-reaktív konformációba. Ellenben a vanadát által csapdázott komplex szétesése nem következett be a féloldali mutánsoknál, amit az UIC2-reaktív állapotba történő visszatérés elmaradása jelzett.

4. Eredmények II.

4.7 A Pgp mindkét oldali ATP-kötőhelyének Walker A szekvenciájában előidézett mutáció nem befolyásolja a transzporter membrán mikrodoménekhez való asszociációját.

Különböző szöveti eredetű sejtek plazmamembránjában a vad típusú Pgp molekulák 10-40 %-a („pool-I”) található UIC2-reaktív konformációban, míg a többi Pgp molekula („pool-II”) csak bizonyos szubsztrátok, modulátorok jelenlétében vagy a sejtek ATP depléciója hatására képes megkötni az antitestet. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a katalitikusan inaktív, mindkét ATP-kötőhely Walker A szekvenciájában mutációt hordozó sejtfelszíni Pgp-k a fent említett kezelésektől függetlenül az UIC2 antitest által felismerhető, valószínűleg ATP-mentes konformációs állapotot preferálják az élő sejtek plazmamembránjában.

Korábbi tanulmányok és munkacsoportunk eredményei azt is alátámasztják, hogy különböző szöveti eredetű sejtvonalakon a sejtfelszíni Pgp molekulák 20-50 %-a rezisztens a TX-100 detergenssel történő kezelésre, így valószínűsíthető, hogy a TX-100 rezisztens raft és kaveola membrán mikrodoménekben található. Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy az UIC2-reaktív „pool-I” Pgp molekulák 50-60%-a ellenáll a TX-100 kezelésnek az áramlási citometriás detergens-rezisztencia tesztben. Azonban amikor az összes sejtfelszíni Pgp molekulát láthatóvá tettük 4E3 vagy 15D3 antitesttel, vagy UIC2 antitesttel CsA kezelés mellett, csak a Pgp molekulák 25-30%-a mutatott rezisztenciát a TX-100 kezeléssel szemben, és a detergens rezisztens Pgp hányad nem függött az alkalmazott antitesttől. Mindezekből megállapítottuk, hogy a vad típusú Pgp-k spontán UIC2 reaktív populációja fokozott raft és citoszkeleton asszociáltságot mutat, míg a „pool-II” Pgp-k, inkább a membrán TX-100-zal oldható nem raft régiókban helyezkednek el.

Érdekes módon a mindkét ATP kötőhely Walker A szekvenciájában mutációt hordozó UIC2-reaktív Pgp-k a vad típusú fehérjékhez hasonló mértékű (25-30%) detergens rezisztenciát mutattak. Ha a kétoldali Walker A mutánsokra jellemző UIC2-reaktív konformáció kedvezne a fehérje raft-beli megjelenésének a kétoldali Walker A mutáns Pgp-eket expresszáló sejtek esetében a vad típusúhoz képest nagyobb mértékű detergens rezisztenciát várnánk.

4.8 Az UIC2 antitest Pgp-hez való kötődése és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata élő sejtekben

Kísérleteinkben ép sejteken a nem metabolizálható 2-deoxi-D-glükóz és glükóz alkalmazásával moduláltuk az i.c. ATP szintet, melynek változásait egy sárga-fluoreszcens fehérje alapú intracelluláris ATP szenzor segítségével detektáltuk, valamint mértük a sejtfelszíni Pgp molekulák ATP-mentes UIC2-reaktív és nukleotid-kötött UIC2-t nem-kötő konformációi közötti megoszlását is. Eredményeink alapján a 2-deoxi-D-glükóz a kezelés időtartamának növelésével párhuzamosan csökkenti az i.c. ATP szintet, ezáltal növeli az UIC2-reaktív Pgp-k arányát. Összességében megállapítható, hogy a permeabilizált sejtekhez hasonlóan az intakt sejteken is szoros korreláció van a sejtek ATP szintje és a sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2 reaktivitása között.

4.9 Az intracelluláris ATP koncentráció változások hatása a Pgp molekulák detergens-rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára

Ezekhez a kísérleteinkhez a 4E3 nem konformáció érzékeny anti-Pgp antitestet használtuk, mely telítő koncentrációban alkalmazva valamennyi sejtfelszíni Pgp molekulát képes megjelölni. Eredményeink azt mutatják, hogy a sejtek rövid távú ATP depléciója nem befolyásolta a Pgp molekulák sejtfelszíni expresszióját és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjukat sem. Így ezek a kísérleteink valószínűsítik, hogy nem az UIC2-reaktív konformációs állapot felvétele irányítja a „pool-I” Pgp-ket a raftokba, hanem inkább a raft környezet kedvez a Pgp molekulák ATP-mentes UIC2-reaktív konformációban történő stabilizálódásának.

4.10 A két sejtfelszíni Pgp populáció internalizációja és ennek függése a membrán koleszterin tartalmától

Kísérleteinkben megvizsgáltuk az UIC2 antitest kötődése alapján megkülönböztetett fokozott detergens rezisztenciát mutató „pool-I” és a kevésbé detergens rezisztens „pool-II” Pgp populációk endocitózisát. UIC2-A647 antitesttel megjelöltük a „pool-I” Pgp molekulákat, valamint festékkel nem konjugált UIC2 antitesttel történő lefedést követően CsA és UIC2-A647 antitest együttes alkalmazásával láthatóvá tettük a „pool-II” populációt. Az összes sejtfelszínen kifejeződő Pgp molekulát CsA jelenlétében UIC2-A647-tel vagy 15D3-A647 antitesttel tettük láthatóvá. A jelölést követően a mintákat kettéosztottuk és a mintapárok egyikében savas mosással távolítottuk el a sejtfelszíni Pgp-khez kötődött antitesteket, majd áramlási citometriás méréssel meghatároztuk az internalizálódott Pgp hányadot. Eredményeinkből kiderült, hogy a „pool-I” Pgp-knek szignifikánsan nagyobb hányada

internalizálódott, mint az ugyanazon antitesttel jelölt „pool-II” populációnak, így valószínűsíthető, hogy az eltérő mértékű internalizációjukért különböző molekuláris környezetük/lokalizációjuk tehető felelőssé. Azt is megállapítottuk, hogy a membrán koleszterin tartalmának növelése fokozta a Pgp molekulák internalizációját, míg koleszterin tartalmának kivonása csökkentette a „pool-I” Pgp-k endocitózisának mértékét, így feltételezhető, hogy a Pgp molekulák internalizációja a koleszterin gazdag raftoktól és/vagy kaveoláktól függő folyamat.

A teljes sejtfelszíni Pgp populáció antitesttel történő jelölésekor az UIC2-vel jelölt Pgp-k minden esetben fokozott internalizációt mutattak a 15D3-mal jelölt Pgp-khez képest, ami arra utal, hogy az UIC2 antitest kötődése stimulálja a Pgp-k endocitózisát. Érdekes módon a membrán koleszterin koncentrációjának növelése több mint duplájára fokozta a 15D3-kötött Pgp-k internalizációjának mértékét.

5. Eredmények megbeszélése I.

Kísérletes munkánk során az volt a célunk, hogy az UIC2 konformáció érzékeny monoklonális antitest egyedülálló tulajdonságait hasznosítva nyomon kövessük a Pgp transzmembrán doménjeiben bekövetkező konformáció változásokat. Az UIC2 antitest a pumpa két eltérő konformációját különbözteti meg, melyek közötti ATP-függő átmenet a *Staphylococcus aureus* alfa-toxinnal-permeabilizált sejtekben az i.c. ATP szint módosítása során tanulmányozható a fehérje természetes plazmamembrán környezetében. Kísérleteink során a Pgp konformációját olyan módon vizsgáltuk, hogy a Pgp-t a katalitikus ciklusának különböző pontjain megrekesztettük nem-hidrolizáló nukleotid analógok, inorganikus foszfát analógok alkalmazásával, vagy a fehérje ATP-kötő helyében létrehozott mutációk segítségével. Ezt követően az UIC2 konformáció érzékeny antitest segítségével detektáltuk a Pgp TMD-iben bekövetkező konformáció változásokat. A Pgp konformáció változásainak vizsgálatával párhuzamosan munkacsoportunk más tagjai fluoreszcens Pgp szubsztrát analógok felhasználásával tanulmányozták a nukleotid-függő konformáció változások hatását a pumpa szubsztrát-kötő affinitására.

Az aktív transzporterek katalitikus ciklusának tanulmányozása során az egyik legfontosabb kérdés a szubsztrát-kötő affinitás csökkenését eredményező konformáció változás pontos időzítése a ciklus során. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az ATP hidrolízise vagy a hidrolízist megelőző valamely katalitikus esemény (pl. nukleotidok kötődése vagy „okklúziója”) eredményezi a TMD-kben bekövetkező konformáció változást, mely a szubsztrát-kötés affinitásának csökkenését okozza.

Kísérleteink bizonyítják, hogy a nem hidrolizálódó ATP analóg AMP-PNP kötődése kiváltja a transzporter citoplazma felé nyitott állapotból az extracelluláris tér felé nyitott állapotba történő átfordulását. Hasonló eredményeket kaptunk akkor is, ha az ATP hidrolízisét a sejtek lehűtésével vagy Mg^{2+} -mentes körülmények biztosításával akadályoztuk meg. Munkacsoportunk más tagjai ugyanezen kísérleti beállítást alkalmazva megfigyelték, hogy az AMP-PNP kötődése által kiváltott konformáció változás során a Pgp molekulák alacsony szubsztrát affinitású állapotba kerülnek. Eredményeink tehát alátámasztják, hogy a transzporter szubsztrátok iránti affinitásának csökkenése már az ATP hidrolízisét megelőzően bekövetkezik.

Mindkét nukleotid-kötő domén Walker A motívuma az ellenoldali nukleotid-kötő domén „signature” szekvenciájával együtt közvetlenül részt vesz a két nukleotid-kötő domén

nukleotid-függő dimerizációjában és az ATP hidrolízisben. A két ATP-kötőhely együttműködésének részletei azonban még ismeretlenek, az sem tisztázott, hogy a Pgp egy vagy két (esetleg több) ATP molekulát hidrolizál transzport ciklusonként. Mivel irodalmi adatok szerint a Pgp egyik nukleotid kötőhelyének inaktivációja az ATPáz aktivitás és a transzport aktivitás gátlását eredményezte, mindkét katalitikus centrum épségét szükségesnek tartják a transzport folyamatokhoz.

Kísérleteink megerősítették, hogy mindkét oldali Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának metioninra történő szimultán cseréje inaktiválja a Pgp-t. A dupla mutáns transzporter stabilizálódik az UIC2-reaktív, a citoplazma felé nyitott konformációs állapotban, melyet ugyanakkor magas szubsztát-kötő affinitás is jellemez.

Ezzel ellentétben a nukleotid kötődés a féloldali Walker A mutánsokban is kiváltotta az extracelluláris tér felé nyitott állapotba történő átfordulást, melyet a szubsztát kötés affinitásának csökkenése is kísért hasonlóan a vad típusú Pgp-hez. Kísérleteinkben a vanadát a vad típusú Pgp-hez hasonlóan a féloldali Walker A mutánsokban is megnövelte az ATP kötődés látszólagos affinitását, mely csak úgy magyarázható, hogy a féloldali Walker A mutánsok is képesek ATP hidrolízisre.

További kísérleteinkben a féloldali Walker A mutánsok drog-stimulált nukleotid hidrolízis aktivitást mutattak, valamint munkacsoportunk más tagjainak adatai bizonyították, hogy csökkentették a sejtek intracelluláris calcein akkumulációját, elősegítették az R123 eltávolítását a sejtekből és mérsékelt védelmet nyújtottak a Pgp szubsztátok citotoxikus hatásával szemben. Tehát a féloldali Walker A mutánsok gyenge, de jól mérhető transzport aktivitása nem magyarázható másképp, csak úgy, hogy a vad típusú fehérjéhez hasonlóan képesek újra és újra áthaladni a katalitikus cikluson.

Ezen eredményeink ellentétben állnak azokkal az elképzelésekkel, melyek szerint mindkét nukleotid-kötő domén épsége szükséges a fehérje katalitikus aktivitásához. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a féloldali Walker A mutációk inaktiváló hatását leíró tanulmányok többsége heterológ expressziós rendszerben kifejezett Pgp-t vizsgált, vagy tisztított és rekonstituált fehérjét használt. Fontos tény azonban, hogy a plazmamembrán összetétele, így például a membrán koleszterin tartalma befolyásolja a Pgp aktivitását. Mivel a membrán koleszterin tartalma szignifikánsan kisebb az alacsonyabb rendű eukariótákban, a féloldali Walker A mutánsok alacsony ATPáz aktivitásának hiánya a heterológ expressziós

rendszerekben összefügghet a plazmamembrán különböző összetételével, vagy a fehérjék feloldása, tisztítása, rekonstitúciója során keletkező műterméknek tekinthető.

A vanadát által csapdázott poszt-hidrolitikus konformer keletkezése a vad típusú és féloldali mutáns Pgp-kben hasonló sebességgel történik, melyből arra következtettünk, hogy az az időtartam, melyet a működő transzporter a „vanadát-érzékeny” hidrolízist követő állapotban tölt, közel azonos a vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k esetén. Érdekes módon azonban a „vanadát-csapdázott” komplex szétesése gyakorlatilag nem következik be a féloldali mutánsokban. Ez a megfigyelésünk könnyen megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy a vanadáttal csapdázott fehérje köt egy ATP molekulát a másik oldali ATP-kötőhelyen is, és az UIC2-t nem kötő vanadáttal csapdázott komplex szétesése csak a másik ATP hidrolízisét követően jöhet létre. A féloldali Walker A mutáns transzporterek működőképességét alátámasztó eredményeink összességében arra utalnak, hogy a „vanadát-csapdázott” komplex szétesése igényli a szemközti ATP-kötőhely hidrolitikus aktivitását is. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a vanadát által stabilizált állapot nem reprezentál egy valódi, a ciklus során ténylegesen előforduló katalitikus intermediert, bár a katalitikus ciklus ezen részleteinek teljes megértése még további kutatómunkát igényel.

Összességében elmondható, hogy a vad típusú, teljesen ép katalitikus hely képes az ATP ismételt megkötésére és hidrolízisére anélkül, hogy a másik nukleotid-kötő doménben hidrolízis következne be. Ennek legegyszerűbb magyarázata pedig az, hogy a vad típusú Pgp-ben a két funkcionálisan egyenértékű hely egyike mindig véletlenszerűen köteleződik el a hidrolízis irányába, míg a féloldali mutánsokban az egyedüli funkcionálisan aktív kötőhely kezdeményez minden ciklust, mely csökkent hatékonyságú működést eredményez.

5. Eredmények megbeszélése II.

Munkánk második szakaszában a Pgp molekulák UIC2 reaktivitása, membrán mikrodomén lokalizációja és endocitózisa közötti kapcsolatot vizsgáltuk.

Munkacsoportunk korábbi adatai alapján ismert, hogy az ATP-mentes nukleotid-kötő doménnal jellemezhető UIC2-reaktív „pool-I” Pgp-k fokozott raft-asszociáltságot mutatnak, míg az antitesttel csak ATP deplécio vagy bizonyos gátlószerek, pl. CsA hatására jelölhető „pool-II” Pgp-k legnagyobb hányada (kb. 70%-a) a rafton kívüli membrán környezetben lokalizálódik. Ezért kíváncsiak voltunk, hogy a mindkét oldali NBD konzervált Walker A szekvenciájában mutációt hordozó katalitikusan inaktív és UIC2-reaktív Pgp molekulákra milyen membrán mikrodomén elhelyezkedés jellemző. Áramlási citometriás detergens kioldási kísérleteinkben igazoltuk, hogy ezek a Pgp-k a vad-típusú transzporterekhez hasonló mértékű TX-100 rezisztenciát mutatnak, mely a vad típusú Pgp-khez hasonló mértékű raft és citoszkeleton asszociáltságukra utal.

Vizsgálataink azt is bizonyították, hogy a sejtek 2-deoxi-D-glükóz kezelése időtartamától függő módon csökkentette az intracelluláris ATP koncentrációt, valamint növelte az UIC2-reaktív Pgp konformerek arányát, ugyanakkor nem változtatta meg a membránban kifejeződő Pgp molekulák mennyiségét és a TX-100 rezisztens raftokkal való asszociációjuk mértékét. Eredményeink arra utalnak, hogy nem az UIC2-reaktív Pgp konformerek vándorolnak a raftokba, hanem a raftokban található Pgp-k stabilizálódnak az UIC2-reaktív konformációban.

További kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy az UIC2 jelöléssel láthatóvá tett sejtfelszíni Pgp populációk 4-6-szor gyorsabb endocitózist mutatnak a 15D3-mal jelölt Pgp-khez képest, ami valószínűsíti, hogy az UIC2 antitest által stabilizált konformáció kedvez az internalizációnak. Mivel legnagyobb mértékű internalizációt a raft asszociált “pool-I” Pgp-k esetében tapasztaltunk, arra következtetünk, hogy a Pgp endocitózist elősegíti a raft miliő is. Utóbbi feltételezésünkkel összhangban van az a tapasztalatunk is, hogy a membrán koleszterin tartalmának növelése fokozta a Pgp-k internalizációjának mértékét. Ez a hatás a teljes sejtfelszíni Pgp populáció 15D3-mal történő jelölése esetén volt a legkifejezettebb. A membrán koleszterin tartalmának kivonása ugyanakkor csökkentette az internalizáció mértékét, és ez a hatás a raft-asszociált “pool-I” Pgp-k esetében volt a legkifejezettebb. Tehát a Pgp molekulák internalizációja feltehetőleg a membrán koleszterin gazdag raft és kaveola régióinak közreműködésével történik.

6. Összefoglalás

Munkánk első részében a humán Pgp katalitikus ciklusa során bekövetkező konformáció változásokat vizsgáltuk és a következő megállapításokat tettük:

- A transzporter UIC2-reaktív, intracelluláris tér felé nyitott konformációjából az extracelluláris tér felé nyitott konformációba történő átbillenése és szubsztrátok iránti affinitásának csökkenése már az ATP hidrolízisét megelőzően bekövetkezik a katalitikus ciklus során.
- A nukleotid kötődés a féloldali Walker A mutánsokban is kiváltja a konformáció változást és a szubsztrát-kötés affinitásának csökkenését hasonlóan a vad típusú Pgp-hez. Azonban mindkét oldali Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának szimultán cseréje metioninra inaktiválja a Pgp-t.
- A foszfát analógok a vad típusú Pgp-hez hasonlóan a féloldali Walker A mutánsokat is csapdázzák a poszt-hidrolitikus állapotban, melyet a nukleotid kötődés látszólagos affinitásának jelentős növekedése jelez.
- Vad típusú Pgp esetében a vanadát-csapdázott komplex lassú szétesését figyeltük meg. A féloldali mutánsokban a komplex szétesése nem következett be, ami arra utal, hogy ehhez a folyamathoz mindkét ATP-kötőhely épsége szükséges.

Munkánk második szakaszában az élő sejteken detektálható különböző raft és citoszkeleton asszociáltságot mutató UIC2-reaktív és UIC2-t nem kötő Pgp populációk tulajdonságait vizsgáltuk és a következő megállapításokat tettük:

- Permeabilizált sejtekhez hasonlóan az intakt sejteken is szoros korreláció van a sejtek ATP szintje és a sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2-reaktivitása között.
- A sejtek rövid távú ATP depléciója, mely a Pgp molekulákat UIC2-reaktív konformációban stabilizálja, nem befolyásolja a Pgp molekulák sejtfelszíni expresszióját és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjukat sem.
- A mindkét Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp-k a vad típusú fehérjékhez hasonló mértékű TX-100 rezisztenciát mutatnak. Így valószínűsíthető, hogy a Pgp-k konformációja nem befolyásolja raft és citoszkeleton asszociáltságukat.
- A “pool-I” Pgp-k “pool-II” Pgp-khez képest nagyobb mértékű endocitózist figyeltük meg, mely a két Pgp populáció eltérő membrán mikrokörnyezetére utalhat.



Nyilvántartási szám: DEENK/318/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bársony Orsolya
Neptun kód: B9RM8L
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bársony, O.**, Szalóki, G., Türk, D., Tarapcsák, S., Gutay-Tóth, Z., Bacsó, Z., Holb, I., Székvölgyi, L., Szabó, G., Csanády, L., Szakács, G., Goda, K.: A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein.
Sci. Rep. 6 (24810), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24810>
IF: 4.259
2. Gutay-Tóth, Z., Fenyvesi, F., **Bársony, O.**, Sente, 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. 1861 (3), 188-195, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.007>
IF: 5.547

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,806

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,806

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, 2019.09.09.

