

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Gyöngy Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Goda Katalin



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI
ISKOLA

Debrecen, 2023

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

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

Írta: **Gyöngy Zsuzsanna** okleveles *molekuláris biológus*

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

Témavezető: Dr. Goda Katalin

Az értekezés bírálói:

Dr. Barna Gábor, PhD

Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Dr. Deli Mária, PhD, DSc

Dr. Penyige András, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK

Szemészeti Tanszék tanterme

2023. november 22. 14 óra

Bevezetés és irodalmi áttekintés

I. Az ABCG2 és a P-glikoprotein

Bevezetés

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

Az ABC kazettás fehérjecsalád

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

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

A TMD-k általában 6 membránon átívelő alfa-hélixből épülnek fel. Egy funkcióképes ABC fehérje többnyire legalább két NBD és két TMD egységből áll, mivel a két ATP-kötőhelyet az NBD-k közösen alakítják ki.

Az ABCG2 és Pgp szerkezeti felépítése

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

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

Az ABCG2 és Pgp katalitikus ciklusa

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

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

A katalitikus ciklus hajtóereje az ATP hidrolízis, amely mindkét transzporter esetében végbemehet mindkét ATP-kötőhelyen, azonban a mai napig vitatott, hogy egy szubsztrát molekula transzportjához hány ATP hidrolízise szükséges. Általánosan megfigyelt jelenség néhány ABC transzporter esetében, hogy a különböző szubsztrátjaik szerkezetüktől és koncentrációjuktól függő módon fokozzák a transzporterek ATPáz aktivitását, azonban nem ismert, hogy melyik katalitikus lépés gyorsításával érik el ezt a hatást. Érdekes módon szubsztrátjaik hiányában is megfigyelhető gyengébb ATPáz aktivitás, amelyet bazális ATPáz aktivitásnak neveznek.

Általánosan elfogadott, hogy az ABC transzporterek működéséhez mindkét ATP-kötőhelynek katalitikusan aktívnak kell lennie. Pgp esetében azt is megfigyelték, hogy az egyik katalitikus hely inaktivációja (pl., mutációkkal) megakadályozza a Pgp ATPáz aktivitását. Azonban ezekkel az eredményekkel ellentétben munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az egyik NBD Walker A lizinének metioninra történő cseréje esetén a humán Pgp molekulák jelentős transzport- és ATPáz aktivitást mutatnak, abban az esetben, ha emlős sejtek plazmamembránjában, természetes környezetükben vizsgálják őket. Fontos kiemelni, hogy azon tanulmányok többsége, amelyek arról számolnak be, hogy az egyik katalitikus helyen létrehozott mutációknak is inaktiváló hatása van heterológ expressziós rendszerek (pl., Sf9 vagy *Saccharomyces cerevisiae* vagy tisztított fehérjék felhasználásával készültek. Mivel valószínűsíthető, hogy a korábbi adatok nem relevánsak az NBD-k működése és kooperációja szempontjából, érdemes a mutáns transzporter variánsok funkcionális vizsgálatát emlős sejtek plazmamembránjában megismételni.

Az ABCG2 és a Pgp konformáció változásainak megfigyelése

Léteznek olyan antitestek, amelyek komplex epitópot ismernek fel, mint például a Pgp esetében az MRK16, MRK17, HYB-241, 4E3, 15D3 és az UIC2, az ABCG2 esetében pedig az 5D3. A Pgp-t felismerő MRK16-ről, a HYB-241-ről és az UIC2-ről ismert, hogy gátolják a Pgp transzport aktivitását is.

Az UIC2 egy IgG2a izotípusú egér monoklonális antitest (mAt), amely szelektív módon a humán Pgp nagy szubsztrátkötő affinitású IF konformerét ismeri fel. Az antitest komplex epitópját a humán Pgp 1. 4. és 6. extracelluláris hurkaiban található rövid peptidszekvenciák alkotják, melyek az OF konformerben eltávolodnak egymástól.

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

Az UIC2-höz hasonlóan a komplex extracelluláris epitóphoz kötődő 5D3 is konformáció érzékeny módon ismeri fel az ABCG2-t. A konformációs epitóp kialakításában az 5. és a 6. TM (transzmembrán) hélixeket összekapcsoló extracelluláris hurok (EL3) vesz

részt. Krio-EM vizsgálatok alapján az antitest a fehérje nukleotid mentes IF konformációját ismeri fel, míg az OF konformációban az epitópot alkotó extracelluláris hurkok feltételezhetően eltávolodnak egymástól, így ehhez a konformerhez az antitest nem tud kötődni.

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

A membránkörnyezet hatása a multidrog transzporterek működésére

Általánosságban elmondható, hogy a transzmembrán fehérjék, így az ABCG2 és a Pgp is szoros kapcsolatban állnak a környező membránnal, amely fiziko-kémiai paraméterei jelentős hatással vannak a fehérjék működésére. A membrán tulajdonságai befolyásolhatják a transzporterek konformáció változásait, transzport aktivitásukat, szubsztrátjaik megoszlását a lipid kettősrétegben, vagy akár a kölcsönhatásukat a transzporterek szubsztrát-kötőhelyeivel. A koleszterin az emlősök plazmamembránjainak egyik fő alkotóeleme. Bizonyos mikrodomének, mint például a lipid tutajok és kaveolák koleszterinben gazdag membrán régiók. Az ABCG2-t, valamint a Pgp-t is több sejttypusban, koleszterinben gazdag lipid tutajokban azonosították. Megjegyzendő, hogy a membrán koleszterin tartalmának csökkentése jelentősen csökkenti mindkét fehérje transzport aktivitását, míg a membrán magas koleszterin tartalma fokozza az ABCG2 ATP-áz és transzport aktivitását. Valószínűsíthető, hogy a membrán koleszterin és foszfolipid molekuláival való kölcsönhatások döntő fontosságúak a Pgp és az ABCG2 aktivitása szempontjából. Ezekben a kölcsönhatásokban bekövetkező változások megváltoztathatják a transzporterek konformáció változásait és a szubsztrátok vagy inhibitorok kötődését. Nemrégiben az ABCG2 esetében leírták, hogy a koleszterin (amely nem szubsztrátja az ABCG2-nek) gátolja a foszfolipidek bejutását a szubsztrátkötő-zsebbe, amelyek a szubsztrátok helyére képesek kötődni, ez magyarázhatja a membrán magasabb koleszterintartalmával járó fokozottab transzport aktivitást.

A membrán specifikus lipid összetétele mellett fiziko-kémiai tulajdonságai is befolyásolhatják a membránfehérjék működését. Az ABCG2 és a Pgp szubsztrátok többnyire hidrofób molekulák, amelyek passzív diffúziójának sebessége a sejtmembránon keresztül nagymértékben függ a membrán fiziko-kémiai jellemzőitől.

Az ABCG2 és a Pgp funkcióját különböző kísérleti rendszerekben tanulmányozták, pl. lipid-detergens micellákban, mesterséges lipid kettősrétegekben. Lehetséges, hogy ezek a kísérleti rendszerek nem imitálják megfelelően a fiziológiás membránkörnyezetet és a fiziko-kémiai tulajdonságaik különbségei miatt egymásnak ellentmondó eredményekhez vezethetnek.

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

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

A triploid egyedek jelentősége a halgazdálkodásban

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

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

A tokhalak és hibridizációjuk

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

Az áramlási citometriás DNS-tartalom meghatározás

A megfelelő DNS-specifikus fluoreszcens festékkel végzett áramlási citometriás DNS tartalom meghatározás egy egyszerű, de érzékeny technika a sejtek ploeditási szintjének meghatározására. Más módszerek, mint például a kromoszómaszám meghatározása, munkaigényesebbek és aktívan osztódó sejtek jelenlétét igénylik. Az áramlási citometriás DNS tartalom meghatározást gyakran használják taxonómiai és evolúciós vizsgálatokban is a növények és különféle állatfajok ploeditásának meghatározására. A ploeditás meghatározás a kutatási alkalmazások mellett egyre nagyobb jelentőséggel bír a növénytermesztésben, állattenyésztésben, valamint a halgazdálkodásban is.

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

Mindezek mellett olyan kísérleti protokollok kidolgozására van szükség, ami lehetővé teszi nagyszámú minta gyors preparálását és áramlási citometriás analízisét.

Célkitűzések

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

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

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

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

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

Anyagok és módszerek

Sejtenyésztés

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

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

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

Western-blot analízis

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

Mitoxantron akkumulációs teszt

Az MDCK II sejteken expresszáldó ABCG2 fehérjék transzport aktivitását mitoxantron (MX) akkumulációs teszttel vizsgáltuk. A sejtuszpenziót ($0,5 \times 10^6$ sejt/mL) 8 mM glükózt tartalmazó foszfát pufferben (gl-PBS (150 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 8,6 mM NaH_2PO_4 , 1,69 mM KH_2PO_4 , 8 mM glükózt) 15 percig 37°C-on előinkubáltuk 2 μM ABCG2 inhibitor Ko143 jelenlétében és hiányában, majd a mintákat 5 μM MX-nal festettük további 30 percig. Ezután a sejteket háromszor mostuk ($300\times g$, 5 perc, 4°C) jéghideg, 0,5% FBS tartalmú gl-PBS-sel. A halott sejtek elkülönítésére propidium-jodidos (PI; 3 $\mu\text{g/mL}$) festést alkalmaztunk. A MX intracelluláris felhalmozódását FACS Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

Az ABCG2 direkt immunfluoreszcens jelölése

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

Az UIC2 reaktív konformációban lévő Pgp molekulák arányának meghatározása

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

Sejtek permeabilizálása Streptolizin-O toxinnal

A Streptolysin-O ((SLO) (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország)) a Streptococcus pyogenes pórusképző exotoxinja. A membránban kialakult SLO pórusok átjárhatóak a kis vízoldható molekulák számára, beleértve a nukleotidokat. Az SLO egy oxigén-érzékeny toxin, amelyet a ditioneitol (DTT) reverzibilisen aktivál. A sejteket (1×10^7 sejt/mL) 250 U/mL SLO-val kezeltük 1 mM DTT, Proteáz Inhibitor Cocktail (PIC: (2 mM AEBSF, 0,3 μM aprotinin, 116 μM besztatin, 14 μM E1-14 μM leupeptin), 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-

fluorid (PMSF), valamint 1% FBS jelenlétében gl-PBS-ben 37°C-on 30 percig. Ilyen körülmények között a sejtek körülbelül 50%-a permeabilizálódott, amelyet PI festéssel igazoltunk. A reakciót 20 mL 1% FBS-t tartalmazó PBS-sel állítottuk le, majd a nem-kötődött toxin eltávolítására a sejteket háromszor mostuk (635×g, 5 perc, szobahőmérséklet), végül a mintákat PBS-ben vettük fel a további kezelésekhez.

A konfokális mikroszkópos kísérletekhez nyolc-kamrás fedőlemezekben (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) növesztett sejteket 62,5 U/mL SLO-val permeabilizáltuk 1 mM DTT és PIC jelenlétében 37°C-on, 15 percig 1% FBS-t tartalmazó HEPES pufferban (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂).

Az 5D3 antitest kötődés kinetikájának vizsgálata során a permeabilizált sejteket (1×10⁶ sejt/mL) 5 µg/mL 5D3-A647 antitesttel festettük 0,5 mM ATP/Mg²⁺, 2 µM Ko143, valamint 10 µM quercetin hiányában vagy jelenlétében 37°C-on. Az 5D3-A647 kötődés kinetikájának követésére különböző időpontokban mintákat vettünk, melyeket nagy térfogatú jéghideg PBS-sel mostunk. A nem kötődött antitest eltávolítására a mintákat még kétszer megmostuk jéghideg PBS-sel. Az 5D3-A647 kötődés mértékét FACS Array (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométerrel határoztuk meg.

A nukleotid kötés látszólagos affinitásának meghatározása

A nukleotid kötés látszólagos affinitását (K_A) a korábban leírtak szerint határoztuk meg. A permeabilizált sejteket (1×10⁶ sejt/mL) 10 percig 37°C-on előkezeltük különböző koncentrációban alkalmazott nukleotidokkal, majd az ABCG2 esetében 5 µg/mL 5D3-A647 mAt-tel, míg a Pgp esetében 10 µg/mL UIC2-A647 mAt-tel inkubáltuk a mintákat további 20 percig 37°C-on. Az ATP hidrolízis megakadályozása érdekében az ATP-t Mg²⁺ nélkül 5 mM EDTA jelenlétében adtuk, vagy a teljes kísérletet jégen végeztük. A nukleotid csapdázási kísérletekben a nukleotidot 0,5 mM Vi-tal vagy BeFx-szel (200 µM BeSO₄ és 1 mM NaF) együtt alkalmaztuk 37°C-on 30 percig. Ezt követően a mintákat 5 µg/mL 5D3 mAt-tel vagy 10 µg/mL UIC2 mAt-tel inkubáltuk a fent leírt módon. A mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel (5 perc, 635×g, 4°C). A sejtek 5D3-A647, illetve UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával meghatároztuk, majd a nukleotidkoncentráció függvényében ábrázoltuk. Az ABCG2 és különböző mutáns Pgp variánsok látszólagos nukleotid-affinitásának (K_A) meghatározásához az adatpontokat négyparaméteres Hill-függvénnyel illesztettük, ahol az $F_{\min}$ és $F_{\max}$ értékek a minimális és maximális fluoreszcencia intenzitást jelentik:

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

Nukleotid csapdázás („trappelés”)

A Vi- vagy BeFx csapdázott konformer képződésének vizsgálatához a permeabilizált ABCG2-t kifejező MDCK II sejteket 10 µM quercetinnel vagy ösztron-3-szulfáttal (E1S) kezeltük elő 37°C-on, majd tovább inkubáltuk 0,5 mM ATP/Mg²⁺ vagy ADP/Mg²⁺ mellett 0,5

mM Vi vagy BeFx jelenlétében. Az inkubáció során a csapdázási reakció kinetikájának követésére meghatározott időközönként 500 µL mintát vettünk, amelyeket kétszer mostunk 5 mL jéghideg PBS-sel, mely az alkalmazott foszfát analógot tartalmazta a korábban megadott koncentrációban, majd 5 µg/mL 5D3-A647-tel jelöltük az ABCG2-t kifejező mintákat 4°C-on 45 percig. A sejtek 5D3-A647 fluoreszcencia intenzitását (F) az idő (t) függvényében ábrázoltuk. Az 5D3-reaktív ABCG2 konformáció fél-életidejét reprezentáló $t_{1/2}$ értékeket a mérési pontokra illesztett exponenciális függvény alapján határoztuk meg:

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

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

5D3 disszociációs kinetika vizsgálata

A sejteket SLO toxinnal permeabilizáltuk, majd a nukleotidok kimosásával az ABCG2 molekulákat IF konformációban szinkronizálva jelöltük 5D3-A647 antitesttel 10 µM quercetin vagy 10 µM E1S hiányában vagy jelenlétében 37°C-on 20 percig. A nem kötődött 5D3-A647 mAt eltávolítása után a sejteket nagy térfogatú 37°C-os PBS-ben inkubáltuk tovább 3 mM ATP/Mg²⁺ vagy 3 mM AMP-PNP/Mg²⁺, valamint a fenti szubsztrátok vagy Ko143 jelenlétében vagy távollétében. Az 5D3 disszociáció kinetikájának nyomonkövetéséhez rendszeres időközönként 500 µL-es mintákat vettünk a sejtszuspenzióból, majd a mintákat kétszer mostuk jéghideg PBS-sel. A sejtek 5D3-A647 fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük, és az idő (t) függvényében ábrázoltuk. Az 5D3-reaktív ABCG2 konformáció felezési idejét reprezentáló $t_{1/2}$ értékeket az adatpontok exponenciális illesztéséből számítottuk ki a **2. egyenlet** segítségével.

Áramlási citometria

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

Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

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

A fluoreszcens képeket Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán) Plan Apo 60 $\times$ víz-immersiós objektív segítségével készítettük [NA=1,27]. Az ABCG2-GFP-t 488 nm-es hullámhosszú lézer fénnel, míg a MX-t 647 nm-es lézerrel gerjesztettük, az emittált fluoreszcenciát pedig 500-550 nm-es, illetve 660-740 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az összes felvételt a műszer azonos feszültség és lézerteljesítmény beállításai mellett készítettük. A képeket szekvenciális módban vettük fel, hogy minimalizáljuk a csatornák közötti átvilágítást. Körülbelül 1 μ m vastag, 512 $\times$ 512 pixelt tartalmazó optikai szeleteket vettünk fel, melyekben 1 pixel mérete 200 nm volt. A zajt 3 $\times$ 3 pixel méretű átlagoló szűrővel szűrtük ki. A kolokalizációs elemzést a két detektált csatorna intenzitása közötti Pearson-féle korrelációs együtthatók kiszámításával végeztük a plazmamembránt reprezentáló pixeleken. Csak azokat a pixeleket vontuk be az elemzésbe, ahol mindkét intenzitás magasabb volt, mint az átlagos autofluoreszcencia intenzitás kétszerese. A képelemzést Mocsár Gábor munkatársunk által írt MATLAB szkriptek segítségével valósítottuk meg (Mathworks Inc., Natick, MA).

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

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

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

SymPhoTime64 szoftverrel (PicoQuant, Berlin, Németország) számítottuk ki 200 időpontban, 300 ns és 1 s között, kvázi logaritmikus időskálán.

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

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

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

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

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

Membrán preparálás

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

ATPáz aktivitás mérés

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

DNS-tartalom elemzés

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

Statisztikai analízis

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

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

Eredmények

I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata

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

Western blot kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az ABCG2 és az N-terminálisan GFP-vel jelölt változata (ABCG2-GFP) hasonló mértékben expresszálódik MDCK II sejtekben. Irodalmi adatoknak megfelelően az ABCG2-GFP hasonló transzport aktivitást mutat, mint a GFP-vel nem jelölt párja, amit a MX akkumuláció hasonló mértékű csökkenése jelez az ABCG2-GFP-t és ABCG2-t expresszáló sejteken az ABCG2-negatív sejtvonalhoz képest. A Ko143 kompetitív ABCG2 inhibitor mindkét sejtvonal MX akkumulációját az ABCG2-negatív sejteknél tapasztalt szintre növelte.

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

Streptolizin-O-val permeabilizálhatók az MDCK II sejtek

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

A sejteket különböző koncentrációban alkalmazott SLO-val kezeltük, majd PI festéssel áramlási citométerben meghatároztuk a permeabilizált sejtek arányát. Mivel az SLO oxigén labilis, így oxidatív környezetben a permeabilizálás hatékonysága csökken, ezért redukáló szer (DTT, ditiotritol) mellett is megvizsgáltuk a hatását a sejtekre. Magas SLO koncentráció mellett a sejtek jelentős hányada permeabilizálódott, és ezt tovább fokozta a DTT jelenléte. Azonban azt is megfigyeltük, hogy az 5D3 reaktivitása az ABCG2 fehérjéhez magas DTT koncentráció mellett csökkent, feltehetőleg azért, mert a DTT redukálja az ABCG2 homodimer kialakításában résztvevő diszulfid hidakat. Hogy elkerüljük az ABCG2 fehérje szerkezeti változását a további kísérletekben 1 mM DTT-t alkalmaztunk. Permeabilizálást követően mosással eltávolítottuk a sejtekből a nukleotidokat, majd

feltöltöttük őket a kívánt típusú, illetve koncentrációjú nukleotidokkal vagy nukleotid-analógokkal (pl., ATP, ADP, AMP-PNP).

A nukleotid kötés elégséges az IF-OF konformáció változáshoz

Az ABCG2 nukleotid-függő konformáció változásainak tanulmányozásához szisztematikusan változtattuk az intracelluláris nukleotid koncentrációkat SLO toxinnal permeabilizált sejteken. A TMD konformációban tapasztalható ATP-szabályozott váltásnak megfelelően a növekvő ATP/Mg²⁺ koncentráció fokozatosan csökkentette az ABCG2 5D3-A647 festődését, magas ATP/Mg²⁺ koncentrációnál közel nullára csökkent a fehérje 5D3 reaktivitása. A dózis-hatás görbék illesztésével meghatároztuk az ABCG2 látszólagos ATP/Mg²⁺ affinitását ($K_A=4,07\pm0,76\text{mM}$). Az ATP hidrolízisének megakadályozására az ATP-t Mg²⁺ hiányában (ATP + EDTA) vagy alacsony hőmérsékleten alkalmaztuk, vagy egy nem hidrolizálódó ATP analóggal, az AMP-PNP-vel helyettesítettük. Érdekes módon az ABCG2-t 5D3-nemkötő állapotba hozó konformáció változás ATP hidrolízis hiányában is megtörtént, és hasonló nukleotid koncentráció-függést mutatott, mint a hidrolízist lehetővé tevő körülmények között. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az 5D3-nemkötő, valamint az 5D3-reaktív konformációk megfelelnek az OF és az IF konformációknak.

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

Hasonlóan az MsbA bakteriális ABC transzporterhez, az ADP/Mg²⁺ is indukálhatja az intracelluláris tér felé nyitott konformer extracelluláris tér felé nyitott konformációra váltását, bár valamivel magasabb koncentrációban ($K_A = 7,38 \pm 2,31 \text{ mM}$), mint az ATP/Mg²⁺. Ezen kívül a Vi vagy BeFx alkalmazása a transzporter molekulákat ADP/Mg²⁺ jelenlétében is magas nukleotid-affinitású állapotban csapdázta, amit a látszólagos nukleotid-affinitás körülbelül 10-szeres növekedése jelzett. Az ADP/Mg²⁺-ból kiinduló csapdázási reakciók K_A értékei nem tértek el az ATP/Mg²⁺-ból kiinduló csapdázási reakciók K_A -értékeitől. Az ADP/Mg²⁺ -ból induló csapdázási reakciókban azonban az ABCG2 molekulák körülbelül 30%-a 5D3-reaktív állapotban maradt, még nagyon magas nukleotid koncentrációk mellett is. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy az ADP/Mg²⁺-ból származó komplex kevésbé stabil, valószínűleg rövidebb élettartamú, mint a hidrolitikus ciklusban ATP/Mg²⁺-ból képződő komplex, ezért a csapdázási reakció alacsonyabb hatásfokkal megy végbe. Mivel ép, egészséges sejtekben a citoszol ATP-koncentrációja több mint 10-szer magasabb az ADP-koncentrációhoz képest, ezek az eredmények azt mutatják, hogy élő sejtekben (i) az 5D3-

reaktív intracelluláris tér felé nyitott állapotról az 5D3-nemkötő extracelluláris tér felé nyitott konformerre történő váltást az ATP kötődése indukálja; és (ii) az 5D3-reaktív IF konformáció visszaállítása csak a hidrolízis termékek felszabadulását követően történhet meg.

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

A transzportált szubsztrátok fokozzák számos ABC transzporter, köztük az ABCB1 és az ABCG2 ATP hidrolízis aktivitását. A transzporter molekulák fokozatos felhalmozódása a Vi- vagy BeFx-csapdázott állapotban az ABC transzporterek katalitikus ciklusának egy parciális reakcióját reprezentálja. Ennek megfelelően a szubsztrátok, pl. E1S vagy a quercetin felgyorsították az ABCG2 felhalmozódását a Vi- vagy BeFx-csapdázott poszt-hidrolitikus állapotban. Megfigyeltük, hogy a szubsztrátok kb. ötszörösére csökkentették a csapdázási reakció felezési idejét ($t_{1/2}$ érték), ami összhangban van ezen vegyületek ATP hidrolízist fokozó hatásának mértékével. A viszonylag hosszú $t_{1/2}$ értékek az ATPáz adatokból kiszámítható kb. 100 ms nagyságrendű teljes ciklusidőhöz képest, arra utalnak, hogy a foszfát analógokkal csapdázott poszt-hidrolitikus komplex keletkezése egy nagyon kis valószínűségű esemény. A csapdázási reakció megnövekedett sebessége szubsztrátok jelenlétében az ATP-áz ciklus nagyobb „fordulatszámával”, vagy a Vi-, illetve BeFx-érzékeny állapot hosszabb élettartamával magyarázható.

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

Az ABCG2 ligandjai nem befolyásolják az 5D3 kötődés kinetikáját

A továbbiakban megvizsgáltuk az ATP/Mg^{2+} , a quercetin és a Ko143 hatását az 5D3 mAt kötődésének időkinetikájára. Azt tapasztaltuk, hogy az 5D3 mAt maximális kötődéséhez körülbelül 20-25 perc szükséges. ATP/Mg^{2+} , valamint a szubsztrát quercetin jelenlétében a transzportereknek csökkent az 5D3-reaktivitása, míg az ABCG2 inhibitor Ko143 jelentősen megnövelte a fehérje 5D3 kötését. Érdekes módon az antitest kötődés kinetikáját nem befolyásolták az ABCG2 ligandjai. Így megállapítottuk, hogy az antitest kötődés kinetikáját vizsgálva nem tudunk következtetéseket levonni a transzporter konformáció változásainak kinetikájára vonatkozólag.

A szubsztrátok felgyorsítják az ABCG2 IF-OF konformációs átmenetét

A következő kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szubsztrátok vajon melyik katalitikus lépés befolyásolásán keresztül képesek az ABCG2 ATP hidrolízisét

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

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

A fenti adatok együttesen azt sugallják, hogy a szubsztrátok kötődése a TMD-khez szerkezeti változást indukál a transzporterben, amely elősegítheti a nukleotid-függő NBD dimer képződést és az ezzel járó IF-OF konformációs átmenetet, valószínűleg a fenti konformáció változások energia gátjának csökkentésével.

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

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

Érdekes módon az ATP-depletált sejtek plazmamembránjában is erős MX festődését figyeltük meg, amelyet a kompetitív ABCG2 inhibitor Ko143 együttes alkalmazása teljesen kivédett, ami arra utal, hogy a MX feldúsulása a plazmamembránban valószínűleg az

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

Az IF konformer MX kötését FCS mérések is igazolják

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

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

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

AMP-PNP kötődés által kiváltott IF-OF konformáció változás megakadályozza a MX ABCG2-höz való kötődését.

II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata

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

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

Az NBD mutációk befolyásolják a nukleotid kötés affinitását

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

A féloldali A-hurok mutáns Y401A és Y1044A esetében is megfigyelhető az UIC2-reaktivitás ATP-függő csökkenése, azonban a kapott K_A értékek csökkent ATP affinitásra utalnak a vad típusú fehérjéhez képest. A K_A értékekben tapasztalt csökkenés Vi kezelés

hatására valószínűsíti, hogy az Y401A, Y1044A, E556M és E556Q variánsok képesek ATP-t hidrolizálni legalább az ép katalitikus helyükön. A többi mutáns transzporter variáns esetében (Y401A/Y1044A, D555N, D1200N, D555N/D1200N) nagyon gyenge ATP affinitás értékeket tapasztaltunk ($10\text{ mM} <$), amely V_i kezelés hatására sem változott érdemben, mely alapján feltételezhetjük, hogy ezek a fehérjék nem képesek az ATP megkötésére és hidrolízisére.

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

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az előbbi kísérleteink alapján feltehetőleg ATP hidrolízis kompetens Pgp variánsok (Y401A, E556M, E556Q) mutatnak-e mérhető ATPáz aktivitást. Ehhez megmértük a vad típusú vagy a különböző mutáns Pgp variánsokat hasonlóan magas szinten expresszáló NIH 3T3 sejtekből készített membrán preparátumok Pgp-függő steady-state ATPáz aktivitását. A Pgp-negatív preparátumokhoz képest szignifikánsan magasabb bazális ATPáz aktivitást mértünk a vad típusú Pgp-t kifejező preparátumokban (kb. $2\text{ mmol Pi/mg fehérje/perc}$), amely kb. 3-szorosára nőtt a Pgp szubsztrát verapamil ($40\text{ }\mu\text{M}$) hatására. Bár az Y401A és E556Q mutánsok esetében rendkívül alacsony bazális ATPáz aktivitást tapasztaltunk, mindkét mutáns aktivitását fokozta a szubsztrát adása. Ugyanakkor az E556M variánst kifejező preparátumok ATPáz aktivitása nem különbözött a Pgp-negatív mintákétól. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az Y401A és E556Q mutánsok képesek az ATP hidrolízisére ismétlődő ciklusokban.

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

A diploid és triploid hal vörösvérsejtek jól elkülöníthetők áramlási citometriával

A hal vörösvérsejtek ploiditásának meghatározására a PI DNS festék sztöchiometrikus (DNS-tartalommal arányos) kötődésén alapuló áramlási citometriás módszert állítottunk be. A módszer optimalizálása során a sejtek fixálását 95% etanolos, valamint 70% etanolos kezeléssel is megvizsgáltuk. Az amúr vörösvérsejtek analízise során 95%-os etanol tartalmú fixáló oldat alkalmazása esetén a sejtek fokozott aggregációs hajlamot mutattak, így a továbbiakban a 70% etanol tartalmú oldatot használtunk. Kontrollként ismerten diploid amúr vörösvérsejteket használtunk. A statisztikailag megfelelő elemszám biztosítására mintánként 20 ezer sejt PI fluoreszcencia intenzitását és fényszórási paramétereit határozzuk meg. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a minták egy része körülbelül másfélszer magasabb fluoreszcencia intenzitást mutatott, mint az ismerten diploid minták. A módszert egyéb halfajokon pl., ponty (*Cyprinus carpio*), csapósügér (*Perca fluviatilis*) is validáltuk, amelyek hasonló eredményt hoztak. A sejtek méretével arányos előre irányuló fényszórási (Forward Scatter, FSC) paramétert is megvizsgáltuk. A magasabb PI fluoreszcenciát mutató sejtek

esetében a diploid mintákhoz képest körülbelül másfélszer nagyobb FSC jelet detektáltunk, amely korrelált a PI fluoreszcencia intenzitás növekedésével is.

A hal vörösvérsejtek mérete ploiditással arányos

A továbbiakban a diploid, illetve a triploid amúr vörösvérsejtek méretét fénymikroszkóp segítségével Bürker-kamrában is megvizsgáltuk. A digitalizált képeken Image J program segítségével meghatároztuk a vörösvérsejtek területét. Áramlási citometriás PI fluoreszcencia intenzitás és FSC méréseinkkel összhangban a triploid mintákban a sejtek területe szignifikánsan nagyobb volt, mint a diploid kontrollból származó sejteké.

Amúr embriók DNS-tartalmának vizsgálata

A sikeres vérvételhez az egyedeknek el kell érniük egy bizonyos méretet, ami nagy egyedszámú populációk esetén jelentős többletköltséggel jár a halgazdaságok számára, ezért további kísérleteinkben olyan módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas a néhány napos amúr embriók DNS-tartalmának meghatározására. Ehhez a néhány napos egyedekből proteináz K emésztéssel egyedi sejtekből álló sejtszuspenziót készítettünk, majd PI festés segítségével meghatároztuk a sejtek DNS-tartalmát. Az ismeretlen mintákat diploid kontroll amúr embriók DNS-tartalmához hasonlítottuk. A diploid kontroll mintához képest a valószínűleg triploid egyedből származó minta kb. másfélszeres fluoreszcencia intenzitást mutatott.

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

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

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

Eredmények megbeszélése

I. Az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálata

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

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

Intakt sejteken végzett konfokális mikroszkópos kísérleteink a korábbi szerkezeti vizsgálatokkal összhangban azt mutatják, hogy az ABCG2 IF konformere nagy MX-affinitással rendelkezik, míg a nukleotid kötés és az NBD-k egyidejű dimerizációja olyan konformáció változásokat indukál, amelyek megakadályozzák a MX kötődést. Az 5D3 és MX kötés egyidejű csökkenése azt jelzi, hogy a szubsztrátkötő affinitás csökkenése egybeesik az IF-OF konformációs átmenettel. A korábbi krio-EM vizsgálatokkal összhangban, a kompetitív ABCG2 inhibitor Ko143 kiszoríthatja a MX-t a szubsztrát-kötőhelyről és megakadályozza az ABCG2 IF-OF konformáció változását. Adataink azt is alátámasztják, hogy a MX nagy affinitású kötődéséhez az IF konformáció szükséges, valamint a transzporter nukleotidokkal

történő aktiválása nem szükséges a szubsztrát kötéshez. Nukleotid titrálási kísérleteink azt bizonyítják, hogy a nukleotid kötés (ATP, AMP-PNP és ADP) és az egyidejű NBD dimer képződés elegendő az OF állapotba történő konformációs átmenethez, valamint a szubsztrát-affinitás magasról alacsonyra váltásához. Ezek az eredményeink alátámasztják a „katalitikus” glutamát mutáns ABCG2 variánssal végzett szerkezeti vizsgálatok eredményeit. Megfigyeltük azt is, hogy fiziológias ATP-koncentrációk jelenlétében az élő sejtek plazmamembránjában az ABCG2 molekulák kis hányada MX-kötött állapotban van, készen egy produktív transzportciklus elindítására. A Vi-csapdázott poszthidrolitikus állapot alacsony szubsztrát-affinitással rendelkezik, ami megerősíti, hogy a hidrolízis termékek disszociációja szükséges ahhoz, hogy a transzporter az az OF konformációból visszabilenjen a magas szubsztrát-affinitású IF konformációba.

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

Nukleotidok hiányában végzett 5D3 disszociációs kísérleteik egyértelműen kimutatták, hogy a szubsztrát kötés önmagában is hatással van az ABCG2 konformációs állapotára. Amennyiben szubsztrátokat a nukleotidok előtt adjuk, az IF-OF átmenet felgyorsul. Ezzel szemben, ha az AMP-PNP nukleotid analógot hagyjuk először kötődni, a szubsztrátok nem tudják elősegíteni ezt az átmenetet. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a szubsztrátok felgyorsítják a nukleotid kötés, NBD „szendvics-dimer” képződés és az ezzel járó IF-OF átmenet kumulatív lépését, de csak abban az esetben, ha hozzáférnek az intracelluláris tér felé nyitott szubsztrátkötő helyhez. Feltételezhető, hogy a szubsztrátok által kiváltott konformáció változás nagyon kismértékű lehet, mivel egy közelmúltbeli tanulmány nem tudott kimutatni távolság változást az ABCB1 NBD-i közötti FRET segítségével ATP/Mg²⁺ -depletált permeabilizált sejtekben. Érdekes módon, szubsztrát és ATP/Mg²⁺ jelenlétében végzett krio-EM vizsgálatokban két konformert azonosítottak, amelyek az intracelluláris tér felé nyitott állapotból egy félig zárt állapotba való átmenetet reprezentálják. Ezek a szerkezetek valószínűsítik, hogy a szubsztrátkötő-hely hozzáférhetősége fokozatosan csökken az NBD dimer bezáródásával, ezért a szubsztrátoknak a fehérje IF konformeréhez kell kötődniük.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a nukleotid kötés az ABCG2 konformációjának fő szabályozója. A nukleotid által indukált IF-OF átmenet egybeesik a szubsztrát-affinitás csökkenésével. Az ABC szupercsaládon belül számos transzporter működésének részletes kinetikai elemzésére lesz szükség a katalitikus mechanizmusok közötti különbségek és hasonlóságok pontos feltérképezéséhez. Például az ioncsatorna működésű ABC fehérje a CFTR (ABCC7) esetében az IF-OF konformációs átmenetnek megfelelő a pórusnyitás a kapuzási ciklus leglassabb lépése. Ezzel szemben az ABCC1 és az ABCB1 esetében ez az átmenet nem a katalitikus ciklus sebességmeghatározó lépése. Hasonlóképpen, a hidrolizálható ATP telítő koncentrációinak jelenlétében az ABCG2 molekulák többsége 5D3-nemkötő OF konformációt vesz fel, ami azt jelzi, hogy az IF-OF átmenet nem a katalitikus ciklus leglassabb lépése, és ennek következtében nem a ciklusidő fő meghatározója. Ennek megfelelően élő sejtekben az ABCG2 molekuláknak csak egy kis

hányada van a szubsztrát-kötött IF konformációban, készen arra, hogy az ATP energiáját a szubsztrát transzport folyamatra fordítsa. A sejtek ATP depléciója növeli az IF konformációban lévő ABCG2 molekulák arányát az IF-OF átmenet előtti várakozási idő meghosszabításával. Megfigyeltük azt is, hogy a megkötött szubsztrátok felgyorsítják az IF-OF átmenetet, valószínűleg azért, hogy elősegítik a nukleotid-függő NBD dimer képződését. Mindazonáltal, ennek az átmenetnek a felgyorsítása nem növeli jelentősen a katalitikus ciklus sebességét, ami arra utal, hogy az ATPáz aktivitás szubsztrát által közvetített stimulációja más lépés(ek) felgyorsulásának az eredménye. A bemutatott eredmények ugyanakkor azt mutatják, hogy az alacsony szubsztrát-affinitású OF konformerhez a szubsztrátok már nem tudnak kötődni, így az ATP hidrolízisre és az ezzel járó NBD disszociációra gyakorolt hatásuk kizárható. Ez a látszólagos paradoxon feloldható különböző katalitikus útvonalak és prehidrolitikus intermedierek feltételezésével a szubsztrát transzportához kapcsolódó és a szubsztrát transzport nélkül végbemenő működési ciklus esetén. A szubsztrát transzporthoz kapcsolt ciklusban a szubsztrátok azáltal növelik az ABCG2 katalitikus sebességét, hogy az ABCC1-hez hasonlóan felgyorsítják az IF-OF átmenetet. Szubsztrátok hiányában a transzporter más katalitikus utat követ, amelyben a ciklus leglassabb lépése az IF-OF átmenetet követően van. Azok az ABCG2 molekulák, amelyek szubsztrát kötés nélkül alakították ki az NBD „szendvics-dimert” vagy hidrolízis nélkül disszociálnak, vagy pedig egy szubsztrát transzport nélküli ATP hidrolízis cikluson mennek keresztül, mely visszaállítja a transzportert a magas szubsztrát-affinitással rendelkező IF állapotba. A jövőben egyedi molekulák konformáció változásainak vizsgálata további betekintést nyújthat a fent tárgyalt átmenetek kinetikájába.

II. Az NBD mutáns Pgp variánsok működésének vizsgálata

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

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

Érdekes módon a féloldali A-hurok (Y401A és Y1044A) mutánsokban az ATP kötődése képes az IF-OF átmenetet indukálni mind ép, mind permeabilizált sejtekkel végzett kísérletekben. Hasonlóan a vad típusú sejtekhez a Vi növeli a nukleotid kötődés látszólagos affinitását a féloldali A-hurok mutánsok esetén is. Mivel a Vi-függő csapdázódás rendkívül alacsony valószínűségű esemény, a stabil Vi-csapdázott komplex kialakulása, valamint az UIC2 kötési görbék jelentős balra tolódása Vi jelenlétében valószínűsíti, hogy a mutáns

transzporter variáns is képes az ATP hidrolízisére az ismétlődő ciklusok során. Mindezek mellett jelentős verapamil stimulált ATPáz aktivitást is tapasztaltunk a féloldali A-hurok tirozin mutáns esetében. Ezek az adatok megerősítik a féloldali Walker A mutánsok vizsgálata során levont következtetésünket, miszerint a Pgp egy intakt ATP-kötőhellyel is katalitikusan aktív. Az ATP hidrolízis szigorú váltakozását feltételezve az a két kötőhely között, egyetlen ép kötőhely esetén minden második ATP-hidrolízis esemény az inaktív kötőhelynél következne be, ami a katalitikus ciklus gátlását eredményezné. Ennek ellenére bizonyos féloldali mutációk esetében (Y401A, E556Q) a vad típusú fehérjéhez képest csökkent, azonban jól mérhető ATPáz aktivitást tapasztaltunk, ami alátámasztja a katalitikus centrumok random elköteleződését az ATP hidrolízisre.

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

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

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

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

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

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

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

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

Eredmények összefoglalása

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

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

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

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

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



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,707

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

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

Debrecen, 2023.05.12.

