

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A P-glikoprotein szerkezetének és fehérje
interakcióinak vizsgálata keresztkötéses
tömegspektrometriával**

Dr. Gellén Gabriella

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2023

**A P-glikoprotein szerkezetének és fehérje interakcióinak vizsgálata keresztkötéssel
tömegspektrometriával**

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

Írta: **Dr. Gellén Gabriella** okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológia
doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt

Az értekezés bírálói:

Dr. Drahos László, PhD

Dr. Mótyán János András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora

tagok: Dr. Drahos László, PhD

Dr. Mótyán János András, PhD

Prof. Dr. Janáky Tamás, az MTA doktora

Dr. Penyige András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme
2024. január 26. 13:00 óra.

1. Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján 2020-ban az összes haláleset körülbelül 17 %-a valamilyen rákos megbetegedésből fakad. A terápiás módszerek nagy részét különböző kemoterápiás szerek és azok kombinációja képezi, melyeket sebészeti eljárásokkal és sugárterápiával kiegészítve gyakran alkalmaznak sikereket elérve. Hagyományos citosztatikumok önmagukban is hatékonyak lehetnek főleg vérképzőszervi daganatok (leukémiák, limfómák) esetén. A rákos sejtek azonban képesek nemcsak a szervezet természetes védekező mechanizmusai során szelektálódni és ellenállóvá válni, de a citosztatikus kezelésekkel szemben is fel tudják venni a küzdelmet. Az úgynevezett multidrog rezisztencia (MDR) során az elváltozott sejtek érzéketlenné válnak számos különböző típusú kemoterapeutikummal szemben.

A rezisztenciához nagyban hozzájárulnak az transzmembrán ATP-kötő kazetta (*ATP-Binding Cassette*, ABC) transzporterek, melyek közül a legtöbbet tanulmányozott az *mdr1* gén által kódolt P-glikoprotein (Pgp) vagy más néven ABCB1, MDR1 fehérje, valamint az ABCC1 vagy MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) és az ABCG2 vagy BCRP (mellrák rezisztencia fehérje, *breast cancer resistance protein*). A soktényezős multidrog rezisztencia kialakulásában egyértelműen szerepet játszik a Pgp, azáltal, hogy hozzájárul a hidrofób és amfipatikus kemoterapeutikumok eltávolításához. A Pgp prognosztikus faktor is lehet bizonyos tumor típusok esetén, mivel expressziós szintje gyakran korrelál a betegség stádiumával. A Pgp funkciójával, szerkezetével és potenciális Pgp működést befolyásoló anyagok fejlesztésével kapcsolatban intenzív kutatások folynak, ám olyan specifikus gátlószert, mely a gyakorlatban terápiásan használható lenne MDR esetén, egyelőre nem találtak.

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

1.1. A Pgp szerkezete és katalitikus ciklusa

A 170 kDa-os humán Pgp, 12 transzmembrán hélixet (TMH) tartalmaz, melyek 2 transzmembrán domént (TMD), 6 extracelluláris hurkot (loop) (ECL) formáznak. A TMD-k közvetlenül és közvetve is kapcsolódnak az ATP-kötő doménekhez (*nucleotide-binding domain*, NBD). Közvetlen összeköttetés a TMH6 és az NBD1, illetve a TMH12 és az NBD2 alfa-hélixeken keresztül alakul ki. Közvetett, nem kovalens kapcsolódás jön létre a membránból a citoplazmába irányuló 4 intracelluláris kapcsoló hélixek (*intracellular coupling helices*, ICH1-4) mentén. Az ICH-k fontos szerepet játszanak a membránban bekövetkező változások szignáljainak közvetítésében az NBD-k felé, s ilyen módon befolyásolhatják az ATP megfelelő kötődését és hidrolízisét. Az ATP-kötő zsebeket (kazettákat) (*nucleotide-binding site*, NBS) a két szemközti NBD intracelluláris loopjai és hélicei alakítják ki. Az egyik NBD-n lévő Walker régiók, Q-loop és A-loop, a másik NBD-n található D-loop és C-loop (*signature motif*) között

alakítja ki az ATP-kötő zsebet, egy vízmolekula és Mg^{2+} interkalációjával. Ezen specifikus ATP kötéshez szükséges régiók szekvenciája evolúciósan konzervált. A fehérje két homológ felét egy rendezetlen kapcsoló régió (linker) köti össze, mely flexibilitása révén könnyen létesít kapcsolatot fehérjepartnerekkel és a Pgp katalitikus ciklusa során összeköttetést hozhat létre a két NBD között. Mozgékonyasága miatt a linker régió gyakran hiányzik a fehérjeszerkezeti modellekből és különböző konformációs állapotai egyelőre nem tisztázottak.

A TMD-k belső üregében, körülbelül a membrán kettős réteg belső lemezének magasságáig, a TMH-k mindegyikének részvételével alakul ki a szubsztrát-kötő zseb, melyben több helyen is bekötődhetnek a különböző szerkezetű komponensek. A kötés kialakításában főként hidrofób interakciók vesznek részt, de bizonyos esetekben specifikus hidrogén kötések részvételét is leírták. A bekötődő szubsztrátok transzportjának mechanizmusával, és a Pgp szerkezetében bekövetkező változások dinamikájával kapcsolatosan számos tanulmányt publikáltak, ám egységes molekuláris modellt még nem sikerült felállítani. Ennek okai a nagyméretű transzmembrán fehérjék kristályosításának nehézségei és izolációjuk során bekövetkező térszerkezetbeli változások. Amit biztosan tudunk, hogy szubsztrát kötés hatására az ATP-hidrolízise fokozódik, és a hidrolízis hatására megtörténik a szubsztrát-transzlokáció; az ICH-k és a konzervált nukleotid-kötő motívumok szükségesek az NBD-k dimerizációjához; a dimerizáció ATP kötés hatására jön létre; és hogy az ATP hidrolízisét követően a nukleotid kötő zseb nyitott állapotban van. Az egyirányú transzport mechanizmus során az NBD-k, ICH-k és a membrán közötti szerkezeti jelátvitel történik. Korábbi eredményekkel ellentétben, melyek a Pgp működését annak natív környezetéből kivonva vizsgálták, az újabb, fiziológiás körülmények között végzett vizsgálatok szerint egyetlen funkcionális NBS elegendő az ATPáz aktivitáshoz, és szubsztrát-transzporthoz.

Térszerkezeti modellek alapján a Pgp két fő konformációt vesz fel, a szubsztrát-kötő befele néző (*inward-facing*, IF) konformációt, és a szubsztrát-kiengedő kifelé-néző (*outward-facing*, OF) konformációt. Egy újabb, köztes domináns szerkezet, a pre-hidrolitikus (okkludált) szerkezet alapján a Pgp kifelé és befele is zárt állapotot vesz fel. A fő konformációk mellett számos kisebb és lassabban kialakuló szerkezeti elmozdulást is megfigyeltek, amit főként a membrán és annak lipid összetétele befolyásol.

1.2. A membrán-mikrokörnyezet hatása a Pgp-re

Az integráns membránfehérjék megfelelő működését és szerkezetét egyértelműen meghatározza a membrán összetétele és fizikai állapota. A membránfehérjék, s így a Pgp esetén is a hidrofób transzmembrán régiót körülvevő lipid gyűrű (annuláris lipidek) közvetlenül befolyásolják a fehérje megfelelő működését. A lipidek detergenssekkel való eltávolítása gátolja a Pgp ATPáz aktivitását. Ezzel szemben a lipid kettős réteget stabilizáló koleszterin jelenléte a Pgp aktivitásához nem nélkülözhetetlen, de módosítja annak alap és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását, drog kötő- és transzportáló képességét, illetve flippáz funkcióit.

A jellemzően szfingolipidben és koleszterinben gazdag speciális fehérje összetételű membrán-mikrodomének, a lipidtutajok (*raft*) és annak egy változata, a kaveolák fontos szerepet játszanak például különböző jelátviteli folyamatokban, membránfehérjék és szubsztrátok transzportjában. A Pgp mind *raft* és *nem-raft* membrán-mikrodoménekben megtalálható, melynek megoszlása sejttípustól függhet. A Pgp kaveolákban kevésbé fordul elő, s a kaveolák befűződését stabilizáló „hajtú-szerű” kaveolinnal nagy valószínűséggel csak közvetett interakcióban van. A lipidtutajok összerendeződésében és stabilizálásában fontos szerepe van a citoskeletális fehérjéknek, melyek összeköttetést létesíthetnek membránfehérjék között is, befolyásolva azok működését. A Pgp funkciói és szubsztrátspecifitása a különböző membrán mikrodomének esetén eltérő lehet. Mindemellett laboratóriumunkban korábban azt találták, hogy a szubsztrát-kötő, IF Pgp konformer nagyobb mértékben fordul elő a lipidtutajokban.

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

MDR sejtekben a raft-asszociált Pgp-k aránya, sejtípustól függően, körülbelül 22-40 %-az összes Pgp mennyiségnek. Mindemellett, általánosságban elmondható, hogy MDR esetén a raft- és kaveola-asszociált fehérjék és lipidek mennyisége emelkedett. Ennek oka lehet, hogy a tumorterápiában alkalmazott kemoterápiás szerek sok esetben megváltoztathatják a membrán lipidösszetételét. A Pgp lipid flippáz funkciója révén stabilizálhatja a membrán mikrodoméneket, bár koleszterin-transzport valószínűleg nem jellemző a Pgp-re. Munkacsoportunk vizsgálatai szerint, a plazmamembrán-koleszterin szintjének csökkenése esetén a raft-konformer Pgp szelektív transzportja a plazmamembránba emelkedett MDR sejtekben, a kontroll sejtekhez képest. Az eredmények megerősítik, hogy a Pgp és a kapcsolódó koleszterinek, a sejtek vezikuláris *trafficking* folyamatai (Golgiról lefűződő vezikulák, endoszómák és lizoszómák exocitózisa) révén segítik a membrán javító (*repair*) mechanizmusait, így egy ellenállóbb fenotípust kialakítva MDR esetén.

1.3. Pgp-t felismerő antitestek

A Pgp szerkezetét és az ECL-ek orientációját gyakran vizsgálják monoklonális antitestekkel (mAb), melyek segítségével lehetséges a Pgp szerkezetváltozásainak követése *in vivo* fiziológiás körülmények között. Az antitestek általában az összes sejtfelszíni Pgp-t képesek jelölni, függetlenül annak fő konformációs változásaitól. Azonban a konformációs epitópot felismerő UIC2 IgG_{2a} mAb az ATP-hiányos, szubsztrát kötő IF konformációt részesíti előnyben. Az UIC2 nem egybefüggő epitópját az 1., 3. és 4. ECL-en lévő régiók állítják össze, melyek az IF konformációban közel kerülnek egymáshoz. Szubsztrát hiányában az UIC2 a sejtfelszíni Pgp-k körülbelül 10–40 %-át jelöli (*Pool 1*), szubsztrátkötődés hatására viszont az összes fennmaradó Pgp is jelölődik (*Pool 1 + Pool 2*). Ez az ún. *UIC2 shift* jelenség tehát a több kötőhely kialakulása miatt jön létre, mely akár 10-szeresére is emelheti a kötőhelyek számát. A *Pool 1* és *Pool 2* sejtfelszíni Pgp-ket egyaránt jelölő 15D3 IgG₁ mAb kötődési affinitása β -ciklodextrinnek való koleszterin kivonás hatására csökken. Ennek oka, hogy a Pgp-hez szorosan kapcsolódó szerkezeti koleszterinek szükségesek az ECL-ek azon orientációjának megtartásához, melyet a 15D3 antitest felismer. A 15D3 antitest epitópját, és a koleszterin-érzékeny ECL-eket korábban még nem határozták meg. Ismert, hogy a 15D3 és az UIC2 kompetícióban vannak egymással, tehát feltételezhetően epitópjaik részben átfednek. Mindemellett, az UIC2 kötődését a koleszterin kivonás nem befolyásolja, illetve korábbi kísérleteink alapján a 15D3 kötődési helye is konformációs epitóp, azaz nem egy egybefüggő peptidszakasz. Tehát a 15D3 a teljes katalitikus ciklus során képes kötődni a Pgp-hez, míg az UIC2 inkább az IF szerkezetet kedveli, amikor az 1. és 4. ECL közel vannak egymáshoz. Szerkezeti adatok alapján az 1. és 6. ECL a teljes katalitikus ciklus során közel marad egymáshoz, illetve az 1. ECL részben átfed az UIC2 antitesttel, így felmerülhet annak a lehetősége, hogy a 15D3 ezekhez a régiókhoz kötődik.

1.4. Fehérjeszerkezet-vizsgáló proteomikai módszerek

A fehérjék 3D szerkezetének vizsgálatára leggyakrabban fehérjekrisztallográfiai módszereket alkalmaznak, ám ezekkel a módszerekkel a membránfehérjék, illetve a rendezetlen fehérjék (*intrinsically disordered protein*, IDP) vagy rendezetlen régiót (*intrinsically disordered region*, IDR) tartalmazó fehérjék csak nehezen, vagy egyáltalán nem vizsgálhatók. Ennek oka, hogy a membránfehérjék amfipatikusak, és eredeti szerkezetük megtartásához a

fiziológiás membránkörnyezet szükséges. Tisztításuk és analízisük ilyen módon kihívásokkal teli. Az IDP és IDR fehérjék nem kristályosíthatók, így röntgendiffrakciós vizsgálatuk nem lehetséges. Mozgékonyaságuk miatt ezen fehérjék térszerkezete konformációs sokaságként (*ensemble*) jellemezhető, vizsgálatuk krio-elektronmikroszkópiával (krio-EM) és NMR-spektroszkópiával is nehézkes, a rendezetlen régiók gyakran hiányoznak is a szerkezeti adatokból. A fehérjék szerkezetének és mozgásának leírásában egyre fontosabb szerepet töltenek be az elméleti számítások és predikciók. A neurális hálózaton alapuló AlphaFold (DeepMind) gépi tanulási algoritmusai lehetővé teszi olyan fehérje típusok (mint például a membránfehérjék) szerkezetének megbízható jóslását is, melyek a betanításra felhasznált adatbázisban nem voltak jelen. Azonban a flexibilis régiók analízise ezen algoritmusokkal továbbra is limitált és több kísérletesen meghatározott adatra van szükség ahhoz, hogy megfelelő térszerkezeteket tudjunk generálni. Ilyen információkat nyerhetünk például a szerkezeti proteomika különböző módszereivel.

Az utóbbi 30 évben a tömegspektrometria (*mass spectrometry*, MS) folyamatos fejlődése révén egyre több lehetőség nyílik a fehérjék magasabb rendű szerkezetének vizsgálatára ezen módszerrel. Tömegspektrometriás vizsgálatához nem szükséges a fehérjeminta fagyasztása vagy kristályosítása és a fehérje mérete általában nem korlátozza az analízist. MS alkalmazásával a konformációs sokaságok elkülöníthetők egymástól, tehát nem csak sokaságátlagot tudunk vizsgálni, lehetséges a konformációs állapotok közötti átmenetek és a fehérje mozgásának követése, illetve különböző ligandumok, lipidek vagy fehérje partnerek kötőhelye és a kötődés dinamikája is leírható tömegspektrometriás módszerekkel. A tömegspektrometriás fehérje-térszerkezet vizsgálati eredmények kiválóan alkalmasak a hagyományos szerkezeti biokémiai módszerek kiegészítésére, betekintést nyújtva a fehérjék olyan tulajdonságaiba, melyeket hagyományos módszerekkel nem tudunk detektálni.

1.4.1. Keresztkötéses tömegspektrometria (XL-MS)

Az utóbbi években az XL-MS technika a hagyományos fehérje-térszerkezet vizsgáló eljárások széles körben bevett kiegészítő módszerévé vált, különösen a nehezen vizsgálható fehérjék, mint a membránfehérjék, vagy az IDP és IDR fehérjék esetén.

A keresztkötési reakció jellemzően fiziológiás körülmények között zajlik *in vitro* izolált fehérjén oldatban, gélben vagy immunprecipitációs gyöngyön, de *in vivo*, élő sejtekben, szövetekben is lehetséges. A keresztkötő molekulák kovalens kötést alakítanak ki két, egymáshoz megfelelő közelségben lévő aminosav oldallánc között. Ezután a fixációs lépés után, a kialakított kötés stabil marad az akár erélyes mintapreparálási lépések alatt és a tömegspektrométerben történő ionizáció során is. A kémiai keresztkötő ágensek általában két reaktív csoportot tartalmaznak, amelyeket egy meghatározott hosszúságú ún. távtartó rész (*spacer*) kapcsol össze. A távtartó hossza információt szolgáltat egy fehérjén belül lévő vagy különböző fehérje-fehérje partnerek adott aminosav oldalláncai között lévő távolságról (*distance constraint*). A fehérje polipeptidláncán keresztkötött aminosavakat ezután jellemzően bottom-up proteomikai megközelítésekkel határozzák meg, tehát származékképzés (denaturálás, redukálás, alkilálás) és enzimatisz emésztést követően LC/ESI-MS/MS technikával történnek a mérések.

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

tartalmaznak, így csökkentve az adatkiértékelés számításigényét és a fals pozitív találatok mértékét.

A keresztkötési reakció hatékonysága körülbelül 1-5 % és az egymáshoz képest megfelelő távolságban lévő lizin oldalláncok mennyisége is limitált. Tehát a minta jelentős hányada módosítatlan peptideket tartalmaz, illetve a keresztkötési reakció során keletkező egyéb termékeket. Nagy számban fordulnak elő, az ún. mono-linkek, melyek úgy jönnek létre, hogy a keresztkötőnek csak az egyik vége reagál a fehérje egy lizin oldalláncán, a másik vége jellemzően a vizes közegben elhidrolizál, vagy a reakciót leállító (quench) pufferral (pl. Trisz, glicin) elreagál. A mono-linkek hasznos információt szolgáltathatnak a fehérje hidrofíl régióiról, és hogy mely lizinek a leginkább reaktívak. Ritkábban fordulnak elő az egy peptiden belül kialakuló intrapeptid keresztkötések (loop-link), ezek jellemzően α -hélix vagy hurkok esetén képződnek. Keresztkötéseket továbbá megkülönböztetünk az alapján is, hogy egy fehérjén belül (intraprotein) vagy két különböző fehérje között (interprotein) alakultak-e ki.

A kereskedelembe számos különböző oldhatóságú és hosszúságú NHS-észter keresztkötő létezik, melyek egymást kiegészítő információkat szolgáltatnak a fehérje szerkezetéről. Az egyik leggyakrabban használt vízzel oldékony keresztkötő a BS2G (bisz-szulfoszukcinimidil-glutarát, 7.7 Å), a nem hasadó keresztkötők közé tartozik, mert gázfázisban történő fragmentációja esetén (CID) csak magasabb elektromos feszültség mellett fragmentálódik. Ilyen keresztkötések esetén az MS/MS spektrum mindkét keresztkötött peptid, plusz a linker fragmentjeit tartalmazza, ami így négyzetesen növeli a lekeresési teret (n^2 probléma), jelentősen fokozva ezzel a kiértékelés számításigényét és a hibás azonosítások valószínűségét. Annak érdekében, hogy a lekeresési tér ne növekedjen négyzetesen (n), kifejlesztették a hasadó keresztkötőket, melyek a peptidgerinc hasadásához szükséges feszültségnél alacsonyabb feszültségértékeken fragmentálódva karakterisztikus spektrumokat adnak. A leggyakrabban használt DSSO (diszukcinimidil-szulfoxid) például MS2-ben fragmentálva 2 intenzív jelző ionpárt ad 32 Da eltolódással. A jelző ionok alapján, arra alkalmas tömegspektrométerben, kiválaszthatjuk a peptidpár egy-egy tagját, majd ezeket tovább fragmentálva MS3-ban már csak egy peptid darabjai lesznek egy spektrumon belül (n lekeresési tér). A nem hasítható keresztkötők esetén az egyértelmű keresztkötés-azonosítás érdekében használnak olyan keresztkötőket, melyeket deutériummal jelölnek. Így a jelölt és jelöletlen keresztkötőt 1:1 arányban adva, karakterisztikus tömegeltolódást kaphatunk az MS1 és MS2 tömegspektrumokban.

Transzmembrán fehérjék esetén nehézséget jelent az intramembrán régióra eső hidrofób aminosavak jelölődése, illetve a membrán szterikus takaró hatása. Így gyakran olyan membránfehérjékre alkalmazták az XL-MS technikát sikerrel, melyek nagyobb része a membránon kívül esik. *In vivo* keresztkötési reakció során igen komplex adathalmazban keletkezik, így a relatíve ritka keresztkötött peptideket azonosítása kihívásokkal teli. Intenzív kutatások zajlanak olyan specifikusan membránfehérjét célzó és dúsítható keresztkötők kifejlesztése érdekében, melyek *in vivo* is hatékonyan alkalmazhatók.

2. Célkitűzések

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

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

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejttenyésztés

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

3.2. Monoklonális antitestek előállítás

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

3.3. Keresztkötés élő sejteken

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

Az NIH 3T3 MDR1 sejteket T75-ös sejttenyésztő edényben, teljes tenyésztő folyadékban növesztettük. A ~90 % konfluencia elérésekor a felülethez tapadó sejteket 2 percre tripszinnel kezeltük (0,05 % tripszin és 0,02 % EDTA pH 7,4-es PBS-ben), majd a sejteket teljes médiumban szuszpendálva állítottuk le a tripszint. A sejteket kétszer mostuk szérummentes, 0,1 % molekuláris biológiai minőségű BSA-val kiegészített tenyésztő folyadékkal a PNGáz-F kezelés előkészítéséhez. ~8x10⁷ sejt/mL koncentrációjú sejtszuspenziót bakteriális Petri-csészében 100 U/mL PNGáz-F-fel (New England Biolabs) kezeltünk, amelyet 0,1 % molekuláris biológiai minőségű BSA-val kiegészített szérummentes médiummal hígítottunk. A sejteket 4 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk 5 % CO₂-t és 95 %-os páratartalmat biztosító inkubátorban. A sejteket 15 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és kétszer mostuk glükóz-PBS-sel (8 mM glükózzal kiegészített foszfát-pufferelt sóoldat). Az extracelluláris antitest-keresztkötéses mintákhoz 10⁷ sejt/mL koncentrációjú mintákat inkubáltunk 100 µg/mL 15D3-mal vagy UIC2-vel 30 percig 37 °C-on, enyhe keverés mellett. Kétszeri glükóz-PBS mosás után RT-n (szobahőmérsékleten), mintánként 3x10⁷ sejtet pH 7,0-es PBS-ben reszuszpéndáltunk, és 1:1 arányban adtunk hozzá a BS2Gd₀/d₄ (Thermo Fisher Scientific) keverékét 5 mM-os végső koncentráció eléréséhez, pH 7,0-es PBS-ben oldva 1 mL végső térfogatban. A keresztkötési reakciót 60 percig, 37 °C-on hagytuk lejátszódni, majd 5 percig RT-n 1 M pH 7,5-ös Trisz pufferrel állítottuk le, a reakcióelegyben 20 mM-os végkoncentrációban.

3.3.2. DSSO (diszukcinimidil-szulfoxid)

Az élő sejteket a fent leírtak szerint PNGáz-F-fel kezeltük, és mintánként 3x10⁷ sejtet reszuszpéndáltunk pH 7,0-es PBS-ben. 50 mM DSSO (Thermo Fisher Scientific) törzsoldatot készítettünk DMSO-ban, és tovább hígítottuk a mintákkal úgy, hogy 0,5 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM és 10 mM végső koncentrációt érjünk el 1 mL végső térfogatban. A keresztkötési

reakciót 60 percig hagytuk 37 °C-on végbemenni, majd a mintákat a fent leírtak szerint kezeltük.

3.4. Gyöngyös keresztkötés

A Protein G redukív metilezését nátrium-cianoborohidriddel (NaBH_3CN) végeztük Dynabeads mágneses gyöngyökön, az immunprecipitációt és a keresztkötést megelőzően. 500 μl gyöngyöt háromszor mostunk pH 6-os PBS-sel, majd 0,1 M metanol mentes paraformaldehiddel, végül 0,1 M NaBH_3CN -t adtunk hozzá. Az elegyet 30 percig inkubáltuk RT-n, enyhe keverés mellett. A gyöngyöket háromszor mostuk pH 7,4-es PBS-sel, majd új csőbe helyeztük. A membránfehérje preparálást és a 15D3, illetve az UIC2 antitestekkel történő immunprecipitációt az alábbiakban leírtak szerint végeztük. RIPA pufferrel történő mosást követően a gyöngyöket kétszer mostuk pH 7,0-es PBS-sel, majd a második mosást egy új csőben végeztük. A mintákhoz 1 mM DSSO-t adtunk, amelyet előzőleg 50 mM-os DMSO törzskoncentrációban oldottunk fel. A keresztkötési reakciót 60 percig hagytuk RT-n, enyhe keverés mellett. Ezután 5 percig 1 M-os, pH 7,5-ös ammónium-hidrogén-karbonáttal (AMBIC) állítottuk le a keresztkötési reakciót, a reakcióelegyhez adva 20 mM-os végkoncentrációt elérve. Ezután a gyöngyöket kétszer mostuk 25 mM AMBIC-kal. (Biztonsági és környezetvédelmi megfontolásokból ezeket a kísérleteket elszívó vegyifülke alatt végeztük, és minden felülűsöt és NaBH_3CN -t tartalmazó maradék oldószert nátrium-hipoklorit oldattal semlegesítettünk.)

3.5. Membránfehérje preparálás és immunprecipitációs dúsítás

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

3.6. Western Blot analízis

A membránpreparátumokat és az immunprecipitációs gyöngyöket (7 μg fehérje/minta) SDS mintapufferrel hígítottuk (0,31 M Tris-HCl, pH 6,8, 50 % glicerín, 10 % SDS, 100 mM DTT, 0,01% brómfenol-kék, 1 M β -merkaptotanol), majd 65 °C-on, 10 percig, rázatva inkubáltuk. 7 %-os SDS-poliakrilamid gélen Laemmli pufferben elektroforézissel választottuk el, majd Towbin pufferben elektro-transzferáltuk nitrocellulóz membránra (BioRad), 100 V-on, 1,5 órán keresztül, 4 °C-on. A membránt PBS-ben oldott 5 %-os tejpörrel blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A Pgp-t D3H1Q (Cell Signaling Technology) humán Pgp ellenes nyúl monoklonális elsődleges antitesttel (1:1000-hez, 5 %-os tejpörös PBS oldatban hígítva) jelöltük 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. A nem kötődött antitesteket 0,1 % Tween-20 tartalmú PBS-sel mostuk 3-szor 10 percig szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. Ezután nyúl ellenes, torna-peroxidázzal konjugált kecske IgG másodlagos antitesttel (1:5000-hez, 5 %-os tejpörös PBS oldatban hígítva) jelöltük, 60 percen keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatosan rázatva. A nem kötődött antitesteket ismét 3-szor mostuk, majd az előhívást SuperSignal West Femto ECL reagenssel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A kép rögzítését Chemidoc Imaging (Bio-Rad Hungary Ltd, Budapest, Hungary) gél dokumentációs rendszer segítségével végeztük.

3.7. Áramlási citometria

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

3.8. Tripszines emésztés és LC-MS/MS analízis

A gyöngyöket 25 mM-os AMBIC-ban reszuszpendáltuk, és a fehérje-diszulfidkötéseket 1 mM trisz(2-karboxietil)foszfínnal (TCEP) redukáltuk 10 percig, RT, majd a keletkező szulfhidrilcsoportokat 2,4 mM S-metil-metánetszulfonáttal (MTS) derivatizáltuk 10 percig, RT. A fehérjeemésztés oldallánc-védett sertés tripszinnel (Promega) egy éjszakán át zajlott 37 °C-on, majd az emésztést a minták 0,2 %-os trifluorecetsavval (TFA) való savanyításával állítottuk le. Az emésztmények analízisét LC-MS/MS módszerrel végeztük egy Orbitrap Fusion Lumos Tribid (Thermo Fisher Scientific) tömegspektrométerben, amely *on-line* ACQUITY UPLC M-Class rendszerhez (Waters) vagy Evosep One HPLC rendszerhez (Evosep) csatlakozott. Az ACQUITY UPLC M-Class berendezésben a mintákat egy Symmetry C18 Trap oszlopra (100 Å, 5 µm, 180 µm × 20 mm, 2D, V/M) töltöttük 5 µL/perc áramlási sebességgel 5 percig 1 % B oldószer mellett, majd egy Peptid BEH 130 C18 oszlopon (130 Å, 1,7 µm, 100 µm × 100 mm) vagy egy Peptid CSH C18 oszlopon (130 Å, 1,7 µm, 75 µm × 250 mm) 400 nL/perc áramlási sebességgel és B oldószer gradienssel 5-10 % 2 perc alatt, 10-35 % 50 perc alatt, 35-50 % 15 perc alatt, majd 90 %-ig 8 perc alatt, 45 °C-os oszlophőmérséklet tartása mellett. Az Evosep One berendezésben a mintákat az Evotip Pure hegyekre töltöttük, és az Extended 15 SPD (*samples per day*) módszerrel választottuk szét az EV-1106 analitikai oszlopon (C18, 1,9 µm, 150 µm × 150 mm). Mindkét beállításban az A oldószer 0,1 %-os hangyasav volt vízben, a B oldószer 0,1 %-os hangyasav volt acetonnitrilben. Az MS-adatgyűjtés adatfüggő módon történt többszörösen töltött prekursor ionokon. A nem kereszt kötött és a BS2G kereszt kötött mintákat csak MS2-HCD fragmentációval elemeztük. A DSSO kereszt kötött minták esetében célzott MS3-HCD spektrumokat gyűjtöttünk, amikor az MS2-CID-ben specifikus DSSO fragmentáció tömegkülönbséget detektáltunk, itt az adatgyűjtést MS2-ETHCD és MS2-HCD fragmentációval egészítettük ki. Az MS1 és MS2-CID adatokat az orbitrapban mértük 60k, illetve 30k felbontással, az MS2-HCD adatokat vagy az orbitrapban 15k felbontással, vagy az ioncsapdában gyors szkenneléssel, míg az MS3-HCD és MS2-ETHCD adatokat az ioncsapdában gyors szkenneléssel mértük.

3.9. Az adatok kiértékelése és értelmezése

A nyers adatokból a Proteome Discoverer (v1.4 vagy v2.4) szoftver segítségével csúcslistákat generáltunk, majd a ProteinProspector (v5.24.0, v6.2.1 vagy v6.3.1) adatbázisban végeztünk fehérje lekeresést. Első lépésként az adatokat az Uniprot 2017.11.01 adatbázisban (83889 *entry*), illetve SwissProt 2021.06.18 adatbázisban (17089 *entry*) található egér proteomban kerestük le, a mintában jelen lévő fehérjék azonosítása érdekében. A humán Pgp, a protein G, az UIC2 és a 15D3 antitestek ismert szakaszainak szekvenciáit és a gyakori szennyeződések (pl. humán keratinok vagy szarvasmarha-szérumfehérjék) is figyelembe

vettük. A prekursor ionok esetén 5 ppm tömeg tolerancia, a fragmens ionok esetén pedig 20 ppm (orbitrap adatok) vagy 0,6 Da-ra (ioncsapda adatok) volt megengedett. Csak teljesen triptikus peptideket vettünk figyelembe, legfeljebb két kihagyott hasadással. Rögzített módosításként a ciszteinek metiltio-módosítását állítottuk be. Nem rögzített, változó módosításként a következőket állítottuk be: metionin oxidáció, fehérje *N*-terminálisának acetilálása, peptidek *N*-terminális Gln-reziduumainak piroglutaminsav-képzése, lizinek hidrolizált DSSO vagy BS2G_{d0/d4} származékai. Csak a legfeljebb 1 % FDR értékkel rendelkező, és fehérjénként legalább két egyedi peptiddel rendelkező találatokat fogadtuk el. A második lépésben a legalább 2 (gyöngyös minták esetén) vagy 5 (élő sejtes minták esetén) peptiddel biztosan azonosított fehérjék között kerestünk le lizin reziduumok közötti DSSO, illetve BS2G keresztkötéseket Protein Prospector szoftver, illetve a Proteome Discoverer v3.0.1.27 XlinkX csomagjának segítségével. A DSSO keresztkötött mintákban változó módosításként állítottuk be az alkén-, telítetlen tiol- és szulfénsav-származékokat (amelyek a fragmentáció során keletkeznek) az MS3-HCD mérések esetén, a tripszin által kihagyott lizin hasítóhelyeken. Végül az MS2 és MS3 spektrumokat egymáshoz rendeltük, és a keresztkötéseket manuálisan értékeltük.

3.10. Molekuladokkolás

A 15D3 antitest szerkezetét az ABodyBuilder2 (*root-mean-square deviation*, RMSD a CDR-H3 esetében 2,81 Å) webes alkalmazással modelleztük az Egyesült Államok US5849877 szabadalmából származó 15D3 variábilis nehéz- és könnyűlánc szekvencia felhasználásával. Az 5 Å küszöbérték alatti RMS predikciós hibákat az ImmuneBuilder *deep learning* algoritmusával számoltuk ki. A fehérje-fehérje dokkolást a ClusPro 2.0 webszerveren végeztük Antibody módban és automatikus non-CDR maszkolással. A 15D3 ABodyBuilder2 segítségével létrehozott PDB-szerkezetét és a humán MDR1 PDB-szerkezetét (6qex), egy PyMOL-ban létrehozott maszkoló PDB-fájllal együtt töltöttünk be, azért, hogy a dokkoláshoz csak a humán MDR1 extracelluláris hurkait vegye figyelembe a szoftver. A továbbiakban az eredmények megjelenítéséhez, a ClusPro 2.0 szerint legjobban illeszkedő, 177 tagot tartalmazó 0. klasztert használtuk.

4. Eredmények

4.1. Mintaelőkészítési módszerek kidolgozása transzmembrán fehérjék XL-MS analíziséhez

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

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

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

Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb keresztkötést tudjuk azonosítani és az artefaktum képződést minimalizáljuk, többféle keresztkötő koncentrációt és keresztkötési időt teszteltünk, melyeket Western Blot analízissel ellenőriztünk. A keresztkötő ágensek koncentrációjának és a reakcióidőnek az emelésével fokozatosan megjelent a Pgp jele a magasabb (250 kDa) molekulatömegű tartományokban. Ezzel párhuzamosan a 15D3 mAb jele fokozatosan eltűnik, feltehetően azért, mert keresztkötött komplexbe kerül. Azt tapasztaltuk, hogy a keresztkötő 5 mM-os koncentrációja felett a fehérjék túlzott keresztkötése miatt az azonosított módosítások száma lecsökken. Így az élő sejt kísérleteinkhez az 5 mM-os koncentrációt választottuk a továbbiakban. A gyöngyös DSSO kísérletekhez 1 mM-os koncentrációt alkalmaztunk, mivel itt a Pgp-t és annak fehérje partnereit direkter eléri a keresztkötő molekulák, így túlzott keresztkötés már alacsonyabb koncentrációnál is bekövetkezhet.

Az immunoprecipitációs dúsítások hatékonyságát is ellenőriztük Western Blotton. A 15D3-mal való dúsítás során kevesebb Pgp-t tudtunk jelölni az UIC2-vel való dúsításhoz képest. Ennek oka valószínűleg a 15D3 koleszterin-érzékenysége, mivel a membránpreparáció után a sejtmembránban fiziológiánál előforduló koleszterin szintje némileg csökkenhet.

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

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

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

A glikoziláció következtében a Pgp SDS-PAGE módszerrel való elválasztása során, a Pgp vándorlása az elektroforetikus térben megváltozik, és gyakran egy diffúz foltot ad Western Blot analízis során. A Pgp-t Western Blotton, Pgp elleni D3H1Q monoklonális antitest jelöléssel vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az általunk élő sejteken elvégzett sejtfelszíni PNGáz-F kezelés következtében a kontrollhoz képest a PNGáz-F-kezelt minták foltjai az alacsonyabb molekulatömeg irányába mozdulnak el. Ezen elmozdulás körülbelül a 140 kDa-os molekulatömegnél jelentkezett, ami összeeseng korábban publikált adatokkal. A Western Blot analízis, az áramlási citometriás mérések mellett bizonyította, hogy a PNGáz-F kezelés valóban lehasította a Pgp-n található N-glikánokat.

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

4.1.3. Protein G gyöngyök reduktív metilezése

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

4.2. Azonosított mono-linkek a Pgp-n

A mono-linkek sokkal nagyobb koncentrációban keletkeznek a keresztkötésekhez képest, és segítségükkel lehetséges a fehérje hidrofób és hidrofil szegmenseinek feltérképezése, hasonlóan a hidrogén-deutérium cseréhez (HDX), ezáltal segítve a fehérje térszerkezetének feltérképezését.

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

4.3. Azonosított keresztkötések a Pgp-n

A két általunk használt keresztkötő különböző hidrofóbicitással és távtartó hosszal rendelkezik. Míg a DSSO 7.7 Å hosszú és inkább egy hidrofób, membrán permeabilis vegyület, addig a BS2G 10.3 Å hosszúságú és könnyen vízzoldható. Ezek, és a bevezetésben említett

fragmentációs különbségek hozzájárulhatnak a különböző mintapreparálási módokkal kapott eltérő eredményeket.

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

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

Nem azonosítottunk egyértelmű keresztkötést a Pgp és az antitestek között, és közülük egyik sem alakított ki interprotein keresztkötést fehérje interakciós partnerekkel. Továbbá interprotein keresztkötést különböző Pgp molekulák között sem azonosítottunk, amit megerősítenek a Western Blottos vizsgálataink, ahol nem azonosítható dimer képződés. Tehát jelen dolgozatban minden keresztkötés intraprotein keresztkötésre utal.

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

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

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

Kísérleteinkben keresztkötést találtunk a belső üregben lévő K826 és K786-os lizinek között és a K826 és az ICH3 loopen lévő K808-as lizinek között, mely utóbbi az NBD2 felett közvetlenül helyezkedik el, és azzal szoros szerkezeti és funkcionális kapcsolatban áll. Mindemellett a K808-as lizint keresztkötésben találtuk az NBD1-en lévő C-motívum mellett

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

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

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

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

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

4.5. A P-glikoprotein fehérjepartnereinek azonosítása keresztkötéssel és immuno-affinitás kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriával

A Pgp számos ismert fehérjepartnerét azonosítottuk tömegspektrometrián immunoprecipitációs kísérleteinkben.

Noha keresztkötést nem azonosítottunk a Pgp és egyéb fehérjék között, mivel a dúsítás után kilencszer mostuk intenzíven a mágneses gyöngyöket RIPA pufferrel, feltételezhetően nem sok szennyező és gyenge interakciós partner maradt a gyöngyökön. Ezt bizonyítja, hogy a szarvasmarha szérum albumint (BSA), amivel a protein G mágneses gyöngyöket blokkoltuk az immunoprecipitáció előtt, a mosást követően csak relatíve alacsony SPC-vel detektáltuk a mosást követően.

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

A gyöngyön keresztkötött minták esetén egy nagyságrenddel több fehérjét azonosítottunk az élősejtes mintákhoz képest, mivel a gyöngyös minták esetén a protein G fehérje zavaró hatását csökkentettük a redukív metilezéssel.

Gyöngyös mintáink esetén a 15D3 antitesttel való dúsítás esetén 368 fehérjét, az UIC2-vel pedig 222 fehérjét azonosítottunk tömegspektrometrián legalább 10 SPC-vel. Ezek közül 208 fehérje mindkét fajta mintában azonosításra került. A 15D3 antitest, mivel a katalitikus ciklustól függetlenül kötődik a Pgp-hez, valószínűleg többféle fehérjepartneret tud dúsítani még úgy is, hogy az UIC2 körülbelül 7-szer több Pgp-t tudott dúsítani az azonosított SPC-k alapján. Ez utóbbi jelenség oka lehet, hogy a 15D3 antitest kötődési affinitását csökkentette az alapvetően koleszterin-depletált közeg, a membránpreparált mintában. Ezzel ellentétben az UIC2-t nem

befolyásolta a membránpreparáció következtében kialakult koleszterinszint változás, mindazonáltal csak a befele néző szubsztrát kötött konformációt ismeri fel, ezért csak azokat a fehérjéket tudtuk így tisztítani, amelyek ehhez a konformációhoz kötődnek.

A fehérjelisták alapján hálózatelemzést végeztem a STRING adatbázis és a Cytoscape szoftver felhasználásával. A hálózatok megrajzolása kísérleti és predikciós adatok alkalmazásával igazolt, vagy adat- és szövegbányászati technikákkal becsült fehérje-fehérje interakciók alapján történik, a kapcsolat meglétét vagy hiányát megjelenítve. A hálózati csomópontok az általunk megadott listában jelen lévő fehérjék, a csomópontok közötti élek pedig a fehérje-fehérje interakciók ismerete.

A 15D3-mal és UIC2-vel dúsított, Protein G gyöngyön DSSO-val keresztkötött mintákban azonosított egér fehérjék humán ortológjainak interaktóm hálózatát a STRING adatbázis alapján a Cytoscape szoftver segítségével elemeztem. Az elemzés alapján a találatok körülbelül 2 %-a nem kapcsolódik a hálózattal. A 15D3 antitesttel való dúsítás esetén 8 darab, az UIC2 esetén pedig 5 darab fehérje különálló.

A Cytoscape a hálózatmegjelenítésen kívül alkalmas a funkcionális, illetve sejtkompartment-eloszlás elemzésre is, melyekre különböző applikációk állnak rendelkezésre. Az általam használt ClueGO program a megadott fehérjelistát génontológiai (*gene ontology*, GO) besorolás (*The Gene Ontology Consortium* 2013) alapján rendezi csoportokba azok sejten belüli lokalizációja (*cellular component*) szerint. A szoftver a csoportokban leginkább feldúsult, statisztikailag szignifikánsan gyakrabban előforduló fehérjéknek megfelelő GO sejtkompartment elnevezéseket listázza, és opcionálisan megjeleníti a csoportokhoz rendelt gének (fehérjék) százalékos arányát az összes lekérdezett és csoportosított fehérjéhez képest. Egy fehérje több GO sejtkompartment csoportosításhoz is tartozhat, ezért mivel viszonylag egy nagy adatbázisban kívántam dolgozni, a kiértékeléshez felhasználtam a program redundancia csökkentésére szolgáló statisztikai számításait.

5. Megbeszélés

A membránba ágyazott Pgp szerkezete és működése nagyban befolyásolt a membránkörnyezetben lévő lipidek és koleszterinek által. A Pgp-hez direkt módon kötődik koleszterin nem csak a lipid tutajok és kaveolák közelében, és befolyásolja annak intracelluláris és extracelluláris térszerkezetét is.

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

Az általunk alkalmazott módszerekkel (élősejtes és gyöngyös) előállított minták lipidösszetétele számottevően eltérő. Az élősejtes keresztkötés esetén a sejt kultúra tápfolyadék eltávolítása után keresztkötéssel fixáljuk a sejteket, így a membránfehérjék lipidkörnyezete lényegében változatlan marad a keresztkötési reakció alatt. Tehát ebben az esetben a sejtmembrán koleszterinszintje nem változik. Ezzel szemben a gyöngyös keresztkötés esetén először izoláltuk a hidrofób transzmembrán doménnel rendelkező membránfehérjéket egy enyhe ikerionos tenzid oldattal és a keresztkötést csak ezután végeztük el. Így itt a fehérjék lipidprofilja némileg megváltozhat, például elveszhetnek koleszterint, továbbá a közegben található nem membrán-asszociált fehérjék szintje szignifikánsan lecsökken. Ilyen módon a két módszer alkalmazásával lehetőségünk nyílik arra, hogy összehasonlítsuk a csökkent koleszterinszinttel vagy a megváltozott lipidösszetétellel rendelkező környezet hatásait a fehérje szerkezeti változásaira, a teljesen fiziológiás koleszterin környezetben lévő Pgp szerkezetéhez képest.

A mono-link módosítások, mivel információt nyújtanak a víz számára hozzáférhető lizinekről, segíthetik a Pgp szerkezetváltozásainak tanulmányozását a fiziológiás körülmények megtartása mellett. A Walker A régiók — ahol találtunk mono-linkeket az élő sejt és gyöngyös minták esetén is — szerkezetének és funkcióinak megértése céljából intenzív kutatások folynak. Az

általunk azonosított mono-linkelt lizinek többségét korábban már leírták, hogy HDX során deuterizálódtak, ami alátámasztja, hogy a mono-linkek valóban információt szolgáltatnak a vízhozzáférhetőségről. Mindemellett azonosítottunk olyan módosított lizin reziduumokat is (K411, K550, K1093, K1099 és K1212), melyekkel kapcsolatosan HDX módszer segítségével megállapították, hogy vízhozzáférhetőségük, tehát térbeli orientációjuk, a membránban jelenlévő koleszterin által befolyásolt. Továbbá a mono-linkelt K1002-es lizin, mely összeköttetésben van az ECL6-tal közel helyezkedik el egy CRAC-szerű doménhez, ahol krio-EM-val valóban meghatároztak kötődő koleszterint. Bár a HDX és krio-EM technikákkal már betekintést nyerhettünk a Pgp szerkezetének működésébe, de ezen módszerek nem adnak információt a reziduumok elmozdulásának egymáshoz viszonyított kapcsolatáról, illetve teljesen hiányoznak a flexibilis régiók, tehát nincs információ azok dinamikájáról. Ezen kívül ezeket a kísérleteket gyakran rekombináns egér Pgp-n végzik el humán Pgp helyett, mely utóbbit nehezebb úgy izolálni, hogy megmaradjon annak eredeti feltekeredése. Még ha lipid nanodiszkekbe építik is ezen rekombináns fehérjéket, csak egy közelítő modellt állít a fiziológiás lipid és koleszterin közege. Az általunk használt módszerek az előbb említetteknél jóval robusztusabbak, tehát egyszerűen követhetők, és viszonylag gyorsan elvégezhetők, így könnyebben reprodukálhatók válnak eredményeink. Ilyen módon egy közel fiziológiás közeget fenntartva tudunk módosított reziduumokat azonosítani, melyek, mint világítótornyok jelzik a lipidkörnyezet modulációjára jelentkező szerkezetváltozás pontjait.

Az általunk detektált keresztkötések a Pgp intracelluláris oldalán helyezkednek el, számos közülük a nehézkesen vizsgálható ATP-kötő zsebeket kialakító régiókon és a linker peptiden található. A K536-os és K685-ös lizinek közötti keresztkötés kiegészítheti a linker orientációjával kapcsolatos kutatásokat, segítheti a Pgp szerkezetével kapcsolatos predikciós számításokat, melyek eredményei egyelőre ellentmondásosak. A linker régióról ismert, hogy számos konzervált foszforilációs helyet tartalmaz, nagy affinitással kötődik a tubulinhoz, illetve valószínűleg szerepe van a katalitikus ciklusban is. Mivel a K536-os lizin közvetlenül az NBD2-n lévő C-loop mellett helyezkedik el, ez a keresztkötés megerősíti azt az elképzelést mely szerint a linker kapcsolatban van az NBD-kel és szabályozza az ATP-hidrolízist és a szubsztrát specificitást.

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

Érdekes módon, a D-loop térszerkezete is koleszterin érzékeny, aminek a közelében lévő K1220-as lizin keresztkötésben volt a K1150-es lizinnel, ami a legkönnyebben

hozzáférhető volt az általunk használt keresztkötők számára. A kísérleteink során azonosított keresztkötött lizinek mindegyikéről leírták korábban, hogy deuterizálható HDX kísérletek során, ezek alapján ezen lizinek valóban hozzáférhetőek a vizes pufferben oldott keresztkötők számára is.

Az élő sejtes kísérletek esetén a natív lipidkörnyezet érintetlenül fennmarad a keresztkötéses reakció alatt, de a keresztkötő reagensek hamarabb elhidrolizálnak, mintsem, hogy elérjenek egy lizint a vizsgálni kívánt fehérjén. Így ebben az esetben kevesebb információt tudunk kinyerni. A gyöngyös keresztkötéses módszer kevésbé tartja meg a natív környezetet, bár az általunk használt ikerionos detergens valamennyi lipid molekulát meghagy a Pgp körül, így az nem veszi el ATPáz aktivitását. A kétféle eljárással kapott mono-link és keresztkötés azonosítások hasonlósága arra enged következtetni, hogy a gyöngyön történő keresztkötéses eljárás is ugyanúgy alkalmas membránfehérje-szerkezet vizsgálatra.

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

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

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

Eredményeink alapján tehát feltételezhetően egy vertikális átrendeződés zajlik le membrán koleszterinszintjének csökkenése esetén, a linker és az ICH3-mas és ICH4-es citoplazmatikus régiók mentén, kapcsolódva az ECL4-hez, ECL5-höz és ECL6-hoz a rigid transzmembrán hélixeken keresztül. Ez az átrendeződés az ECL5-öt és ECL6-ot vertikálisan behúzhatja a membrán irányába, míg koleszterin jelenlétében ezek a loopok inkább kiemelkednek a membránból. Mivel az ECL4-es hurok hosszabb, mint az ECL5 és az ECL6, ezért annak relatív mozgása kevésbé szignifikáns lehet. A koleszterin hatása kialakulhat a felületi feszültséghez hasonló módon, a koleszterin kötő motívumokon keresztül, melyek az ECL4-en és ECL6-on bőségesen megtalálhatók. Koleszterin-telítettségben a koleszterin molekulák „felkúszhatnak” a fehérje koleszterin kötő motívumai mentén, ami deformálhatja a transzmembrán fehérje szerkezetét a membrán horizontális síkjában. Mindez szolgálhat egyfajta magyarázattal a 15D3 antitest koleszterin-függő kötődésére.

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

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

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

Mindemellett a Hsp90-es és Hsp70-es hősokkfehérjéről, amik szintén nagy mennyiségben előfordultak mintáinkban ismert, hogy kapcsolatban vannak a Pgp-vel. Ezek a hősokkfehérjék gyakran a lipidtutajok közelében helyezkednek el, továbbá a Hsp90 koleszterin-függő módon aktiválhatja a Pgp-t.

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

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

6. Összefoglalás

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

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

7. Publikációk



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

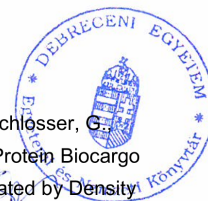
Jelölt: Gellén Gabriella
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10079791

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,887

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

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

Debrecen, 2023.08.03.

