

ABCG2 membrán transzporter fehérje sejten belüli közlekedésének vizsgálata: a vad típusú és SNP-t hordozó variánsok összehasonlítása

Doktori értekezés

Bartos Zsuzsa

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Homolya László, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Csanády László, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Goda Katalin, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottsága:

Elnök: Dr. Csala Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Rónai Zsolt, egyetemi docens
Dr. László Lajos, egyetemi docens

Budapest
2021

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| 2. BEVEZETÉS | 7 |
| 2.1 <i>Az ABC transzporterek világa</i> | 7 |
| 2.2 <i>Az ABCG2 fehérje</i> | 12 |
| 2.3 <i>Az ABCG2 trafficking-je.....</i> | 18 |
| 2.4 <i>Gyakori ABCG2 variánsok.....</i> | 20 |
| 2.5 <i>Az ABCG2 variánsok patofiziológiás szerepe a kőszvény betegségben.....</i> | 22 |
| 2.6 <i>Új transzporter variánsok felfedezése.....</i> | 24 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK | 25 |
| 4. MÓDSZEREK | 26 |
| 4.1 <i>DNS konstrukciók létrehozása</i> | 26 |
| 4.2 <i>Emlős sejtvonalak fenntartása és transzfektálása.....</i> | 27 |
| 4.3 <i>qPCR az ABCG2 mRNS szintek kvantitatív meghatározásához.....</i> | 27 |
| 4.4. <i>Western blot.....</i> | 28 |
| 4.5 <i>Sf9 rovarsejtek fenntartása, transzfektálása és membránpreparálás</i> | 29 |
| 4.6 <i>ATPáz módszer.....</i> | 30 |
| 4.7 <i>A RUSH rendszer</i> | 31 |
| 4.8 <i>Immunfluoreszcens jelölések.....</i> | 32 |
| 4.8.1 <i>Immunfestés fixált mintákon.....</i> | 32 |
| 4.8.2 <i>Élő sejtek jelölése ER-Tracker Red festékkel</i> | 33 |
| 4.8.3 <i>ABCG2 jelölése a plazmamembránban 5D3 antitesttel</i> | 34 |
| 4.9 <i>RUSH-ABCG2-t kifejező minták kezelése, fixálása mikroszkópos vizsgálatokhoz .</i> | 35 |
| 4.10 <i>Mikroszkópos képalkotás.....</i> | 36 |
| 4.11 <i>Képanalízis és kolokalizációs mérés</i> | 36 |
| 4.12 <i>Statisztika</i> | 37 |
| 5. EREDMÉNYEK..... | 38 |
| 5.1 M71V: egy új ABCG2 variáns in vitro jellemzése | 38 |
| 5.1.1 <i>ABCG2 fehérje expressziójának vizsgálata emlős sejtekben</i> | 38 |
| 5.1.2 <i>ABCG2 variánsok tranziens expressziójának ellenőrzése qPCR-rel</i> | 41 |
| 5.1.3 <i>M71V variáns lokalizációjának vizsgálata emlős sejtekben</i> | 42 |

| | |
|--|------------|
| 5.1.4 ABCG2 variánsok funkcionális vizsgálata Sf9 membránpreparátumokon..... | 43 |
| 5.1.5 Farmakológiai kismolekulák hatása az ABCG2 variánsokra..... | 45 |
| 5.2 Az ABCG2 trafficking-jének nyomában..... | 47 |
| 5.2.1 A RUSH-ABCG2 konstrukciók létrehozása és tesztelése..... | 47 |
| 5.2.2 Az ABCG2 fehérjék N-glikozilációjának és expressziójának vizsgálata a RUSH rendszerben..... | 50 |
| 5.2.3 ABCG2 variánsok sejten belüli útjának vizsgálata..... | 54 |
| 5.2.4 ABCG2 variánsok kolokalizációs analízise..... | 60 |
| 5.2.5 Trafficking-et befolyásoló anyagok hatása az ABCG2 fehérjék érésére és lokalizációjára a RUSH rendszerben..... | 62 |
| 6. MEGBESZÉLÉS..... | 66 |
| 6.1 Az ABCG2-M71V variáns jellemzése..... | 66 |
| 6.2 ABCG2 trafficking vizsgálatok..... | 71 |
| 7. KÖVETKEZTETÉSEK..... | 77 |
| 7.1 Az ABCG2-M71V jellemzése..... | 77 |
| 7.2 ABCG2 variánsok sejten belüli közlekedésének vizsgálata..... | 78 |
| 8. ÖSSZEFOGLALÁS..... | 80 |
| 9. SUMMARY..... | 81 |
| 10. IRODALOMJEGYZÉK..... | 82 |
| 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE..... | 110 |
| 11.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:..... | 110 |
| 11.2 Disszertációtól független közlemények:..... | 110 |
| 12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS..... | 112 |

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-------------|--|
| 3'UTR | 3'untranslated region; 3' nemtranszlálódó régió |
| 4-PBA | 4-phenylbutyric acid; 4-fenilbutirát |
| ABC | ATP-binding cassette; ATP-kötő kazetta |
| ADME | absorption, distribution, metabolism, excretion; felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztás |
| AHR | aryl hydrocarbon receptor; aril-szénhidrogén receptor |
| ALL | akut lymphocytás leukémia |
| AML | akut mielogén leukémia |
| ATP | adenozin trifoszfát |
| BAF | Bafilomycin A1 |
| BCRP | breast cancer resistance protein; emlőkarcinóma rezisztencia fehérje |
| BSA | bovine serum albumin; szarvasmarha szérum albumin |
| CAD | conditional aggregation domain |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| Chn | colchicine; kolhicin |
| CMV | citomegalovírus |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DTT | ditrio-treitol |
| ECL | extracellular loop; extracelluláris hurok |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein; fokozott zöld fluoreszcens fehérje |
| EGTA | etilén-glikol-tetraecetsav |
| EndoH | Endoglycosidase H |
| ER | endoplazmatikus retikulum |
| ERQC | endoplasmic reticulum protein quality control; endoplazmatikus retikulum fehérje minőségellenőrzés |
| ER α | estrogen-receptor alpha; ösztrogén-receptor alfa |
| FAP | fluorogen activating protein; fluorogén aktiváló fehérje |
| FBS | fetal bovine serum; magzati borjú szérum |

| | |
|---------------|---|
| GFP | green fluorescent protein; zöld fluoreszcens fehérje |
| GLUT | glükóz transzporter |
| GPI | glycophosphatidylinositol; glikofoszfatidil.inozitol |
| HBSS | Hank's Balanced Salt solution |
| HDACI | histone deacetylase inhibitor; hiszton-deacetiláz inhibitor |
| HDL | high density lipoprotein; nagy sűrűségű lipoprotein |
| HEK | human embryonic kidney; humán embrionális vese |
| HMG-CoA | β -hidroxi- β -metil-glutaril-koenzim A |
| HRP | horseradish peroxidase; torma-peroxidáz |
| ICL | intracellular loop; intracelluláris hurok |
| Ii | invariant chain; invariáns lánc |
| IRES | internal ribosomal entry site; belső riboszóma belépési hely |
| IVS | intervening sequence; mesterséges intron |
| MAF | minor allele frequency; allél frekvencia |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney |
| MDR | multidrug resistance; multidrog rezisztencia |
| NBD | nucleotide binding domain; nukleotid-kötő domén |
| PBS | phosphate buffered saline; foszfát pufferelt sóoldat |
| PFA | paraformaldehid |
| P-gp | permeabilitás-glikoprotein |
| PGR | progeszteron receptor |
| PM | plazmamembrán |
| PMSF | phenylmethylsulfonyl fluoride; fenil-metil-szulfonil-fluorid |
| PNGáz F | peptide-N-glycosidase F |
| PPAR γ | peroxiszóma proliferátor aktivált gamma receptor |
| RPLP0 | ribosomal protein lateral stalk subunit P0; ribosomális fehérje laterális szár P0 elgység |
| RUSH | retention using selective hooks; megakasztás szelektív horgonyfehérjék segítségével |
| SBP | substrate-binding protein; szubsztrát-kötő fehérje streptavidin binding peptide; sztreptavidin-kötő peptid |

| | |
|------|---|
| SDS | sodium dodecyl sulfate; nátrium-dedocil-szulfát |
| Sf9 | Spodoptera frugiperda |
| SNP | single nucleotide polymorphism; egy pontos nukleotid-polimorfizmus |
| Str | sztreptavidin |
| SUR | szulfonilurea-receptor |
| TAP | transporter associated with antigen processing; antigén feldolgozáshoz kapcsolódó transzporter |
| TMD | transzmembrán domén |
| URAT | urate transporter; húgysav transzporter |
| VSVG | vezikuláris sztomatitisz vírus glikoprotein |
| vvt | vörösvértet |
| WGA | wheat germ agglutinin; búzacsíra agglutinin |
| wt | wild type; vad típus |

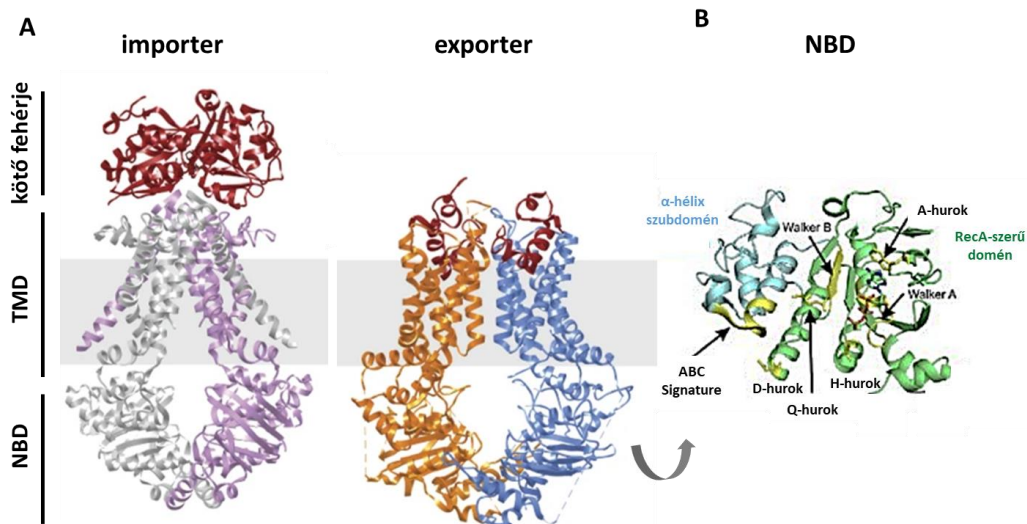
2. BEVEZETÉS

2.1 Az ABC transzporterek világa

Az ABC (ATP-binding cassette, ATP-kötő kazetta) transzmembrán fehérjéket először az 1970-es években írták le prokarióták esetében. Kezdetben, mint szubsztrát-kötő fehérjéket (SBP, substrate-binding protein) azonosították, melyeknél megfigyelték, hogy a transzporter a transzporthoz szükséges energiát ATP kötésén és hidrolízisén keresztül biztosítja (1), ezáltal ezek a fehérjék az elsődleges aktív transzporterek közé sorolhatók. A baktériumokban elsőként tanulmányozott transzporterekkel (*Salmonella typhimurium*: hisztidin-permeáz, *Escherichia coli*: maltóz-permeáz) (2,3) párhuzamosan eukarióta rendszerekben is felfedezték a hasonló elven működő permeabilitás-glikoprotein (P-gp/ ABCB1) membránfehérjét, amely emlős sejtekben számos gyógyszerrel szembeni rezisztenciáért felelős (4). A következő évtizedben számos ABC transzporter szekvenciáját azonosították, amelyeknél megfigyelték, hogy a nukleotid-kötő motívum mind a bakteriális, mind az emlős rendszerekben erősen konzervált, mely a transzporterek közös evolúciós eredetére utal (5). Az ABC transzporter kifejezést csak később hozták létre (6), azonban már korábban felismerték, hogy ezek a fehérjék az ATP-kötő alegységük alapján egy nagy szuperfamilia alkotnak (7-10). Azóta tudjuk, hogy az ABC fehérjék alkotják a legnagyobb ismert fehérjecsaládot az élő szervezetekben, melynek génjei a prokarióta genom mintegy 1-3%-át teszik ki (11).

A kanonikus ABC transzporterek alapvetően négy konzervált funkcionális egységből: két NBD-ből (nucleotide-binding domain, nukleotid-kötő domén) és két TMD-ből (transmembrane domain, transzmembrán domén) állnak (12). Míg a prokarióta ABC-k között importörök és exportörök is találhatóak (13), addig az eukarióta transzporterekre a sejtől kifelé történő pumpálás a jellemző. Az importörök esetében a négy alegységen kívül szükséges még egy úgynevezett kötő fehérje (binding protein), mely felismeri és befogadja a sejten kívüli szubsztrátokat és a transzporter külső felszínéhez szállítja őket (14). A baktériumoknál a domének egyedi, különálló egységekből, vagy páronként szintetizálódó alegységek kombinációjából is szerveződhetnek (15), azonban az eukariótáknál az ABC

transzportereket rendszerint egyetlen polipeptidlánc alkotja (pl.: ABCC7/CFTR), mely mind a négy funkcionális egységet tartalmazza. Ugyanakkor itt is megfigyelhetők úgynevezett féltranszporterek, melyek homodimer (ABCG2), vagy heterodimer (ABCG5/G8) formában alkotnak egy funkcionális egységet (16-19). A TMD-t rendszerint 6-10 transzmembrán hélix alkotja, mely a szubsztrátok felismeréséért, kötődéséért és továbbításáért felelős, ezért a különböző típusú ABC transzporterek TMD szekvenciája nem mutat nagymértékű konzerváltságot a szállítandó szubsztrátok sokszínűségének köszönhetően (20). Ezzel szemben, mivel az NBD-k feladata az transzporthoz szükséges energia biztosítása az ATP kötése és hidrolízise révén, így az azonos funkció ellátása miatt ezek a domének nagy hasonlóságot mutatnak (prokarióták és eukarióták között is 30-50%), melyben általában megtalálhatóak bizonyos konzervált motívumok: RecA-szerű domén, mely tartalmazza a Walker A (GXXGXXGKS/T) és Walker B motívumot ($\Phi\Phi\Phi\Phi$ D, A-, D-, H- és Q-hurok és az α -hélixben található ABC Signature szekvencia (LSGGQ) (5,21-25) (1. ábra).



1. ábra: ABC transzporterek általános felépítése. (A) Egy importer (MobBC-A) és egy exporter (ABCG5/G8) szerkezete: a citoszólikusan elhelyezkedő nukleotid-kötő domén (NBD), a membránba ágyazott transzmembrán domén (TMD), valamint az importerek esetében az extracellulárisan elhelyezkedő kötő fehérje. (B) Az NBD-ben található konzervált régiók helye: Walker A és B motívum a RecA-szerű doménben, ABC Signature motívum (LSGGQ), A-, D-, H- és Q-hurok. *Kép forrása: Croe és munkatársai (26), valamint Mächtel és munkatársai (27) alapján, módosítva.*

Jelenleg 48 humán ABC transzportert ismerünk, melyek további hét alcsoportba sorolhatóak A-G-ig jelölve (16,28-30). Az ABC transzporter család rendkívül változatos szubsztrát specificitással rendelkezik, általában különféle ionokat, aminosavakat, cukrokat, polipeptideket, toxikus metabolitokat, toxinokat, valamint endo- és xenobiotikumokat továbbítanak (28) (1. táblázat).

Az ABCA család tagjai a sejtek lipid- és koleszterin forgalmában vesznek részt különböző szervekben. A fehérje mutációi súlyos lipid-anyagcsere rendellenességekhez vezethetnek, mint: familiáris HDL-deficiencia, vagy Tangier-betegség (31). Az ABCA4 fehérje a fotoreceptor sejtekben az A-vitamin szállításáért felelős, mely által fontos szerepe van a látásban. Ennek a transzporternek a meghibásodása Stargardt-betegséget, öregkori makuladegenerációt és retinitis pigmentosa-t eredményezhet (32,33).

Az ABCB transzporterek közül az ABCB1-ről (MDR1, P-gp) ismert, hogy nagy szerepe van a daganatsejtek multidrog rezisztenciájának kialakulásában (16). Az ABCB4 és ABCB11 transzporterek a májban találhatóak, ahol a foszfatidilkolin és az epesavak szekrécióját végzik (34,35). Az ABCB2 és ABCB3 (TAP1 és TAP2, transporter associated with antigen processing) fehérjék az antigén prezentáláshoz szükséges peptidek transzportját végzik az endoplazmatikus retikulumba (ER) (36-38). A család más tagjai a mitokondrium membránjában helyezkednek el, ahol a vas metabolizmusában játszanak szerepet, vagy a lizoszómákba lokalizálódnak (39,40).

Az ABCC család számos tagja (ABCC1-3 és ABCC10-12) toxinok és gyógyszerek transzportjában és multidrog rezisztencia kialakulásában játszanak szerepet (41). Az ABCC6-ről ismert, hogy szerves anionokat transzportál, mely révén a fehérje mutációi súlyos szerv- és szövet-meszesedést eredményezhetnek (Pseudoxanthoma elasticum betegség) (42,43). A család egy sokat tanulmányozott tagja a CFTR vagy más néven ABCC7, amely egy szelektív kloridion csatorna, mely hibás működése, vagy nem megfelelő lokalizációja esetén szerepet játszik az igen súlyos cisztás fibrózis kialakulásában (44). Továbbá ide tartoznak a szulfonilurea-receptort képező ABCC8 (SUR1) és ABCC9 (SUR2), melyek ATP-szenzitív káliumcsatornákat képeznek (45).

Az ABCD családhoz négy gén tartozik, melyek alternatív splicing révén összesen 49 fehérjét kódolnak (30). Mindegyik transzporter a peroxiszóma membránjában található, ahol a hosszú láncú zsírsavak transzportját végzik. A fehérjék mutációi a rendkívül súlyos ALD-szindrómát (adenoleukodisztrófia) okozhatják (46).

Azonban nem minden ABC fehérje működik transzporterként. Például az eukarióta ABCE a ribonukleázok gátlásában, míg az ABCF pedig a transláció szabályozásában vesz részt (47,48). A két alcsalád tagjai rendelkeznek ugyan ATP-kötő doménnel, azonban a TMD-jük hiányzik (16).

Az ABCG alcsalád tagjai mind féltranszporter. Az ABCG1 a koleszterin transzportot irányítja makrofágokban és a lipid homeosztázist szabályozza egyéb sejttípusokban (49). Az ABCG4 túlnyomórészt a szemben és az agyban (asztrociták és neuronok) expresszálódik, ahol feltehetően a szterol homeosztázisban játszik szerepet (50). Az ABCG4 fehérje szintjét emelkedettnek találták Alzheimer-kórban szenvedők agyában, így lehetséges hogy szerepet játszik a betegség kialakulásában is (51). Az ABCG5 és ABCG8 a májban lokalizálódik, ahol heterodimert alkotva elősegíti a szterolok epével történő kiválasztását. E két transzporter mutációja hyperkoleszterinémiához és korai érrelmeszesedéshez vezethet (52,53). Az ABCG2 fehérjéről a következő fejezetekben kívánok hosszabban értekezni.

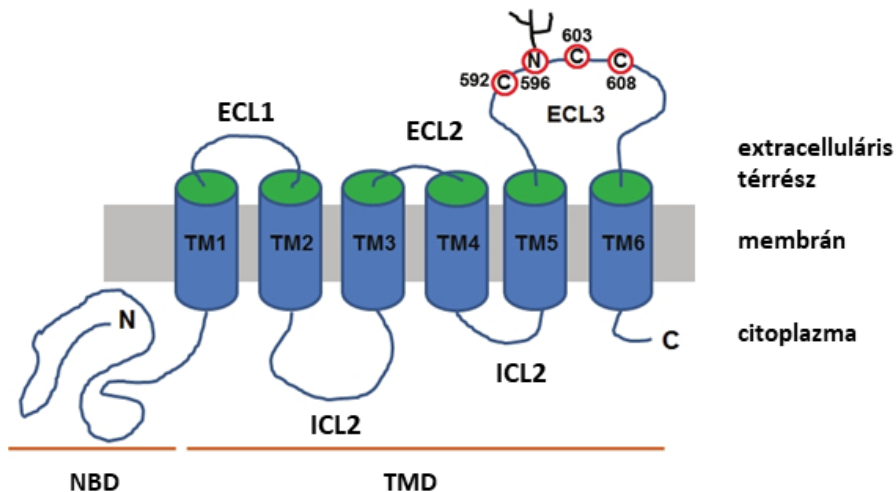
1. táblázat: A humán ABC transzporterek szerepe. Az ABC transzportercsalád tagjai és a hozzájuk kapcsolható funkciók. *Táblázat forrása: Vasiliou és munkatársai (28) alapján, módosítva.*

| transzporter | funkció |
|--------------|---|
| ABCA1 | koleszterin transzport a HDL-be |
| ABCA2 | gyógyszer rezisztencia |
| ABCA3 | multi drog rezisztencia |
| ABCA4 | A-vitamin származék transzportja a fotoreceptorokhoz |
| ABCA5 | prostatata intraepithelialis neoplázia marker |
| ABCA6 | multi drog rezisztencia |
| ABCA7 | koleszterin transzport |
| ABCA8 | lipofil gyógyszerek transzportja |
| ABCA9 | monocita differenciálódás és makrofág lipid homeosztázisának szabályozása |
| ABCA10 | koleszterin-válaszoló gén |
| ABCA12 | prenatális diagnosztikai marker |
| ABCA13 | hasnyálmirigyét érintő örökletes betegségben játszhat szerepet |
| ABCB1 | multi drog rezisztencia |
| ABCB2 | peptid transzport |
| ABCB3 | peptid transzport |
| ABCB4 | foszfát/dilkolin transzport |
| ABCB5 | melanin-képződés |
| ABCB6 | vas-transzport |
| ABCB7 | vas-kén-kotranszport |
| ABCB8 | intracelluláris peptid transzport |
| ABCB9 | lizozómákban található, funkciója nem ismert |
| ABCB10 | mitochondriális transzporter |
| ABCB11 | epesav transzport |
| ABCC1 | gyógyszer rezisztencia |
| ABCC2 | szerves anionok transzportja |
| ABCC3 | gyógyszer rezisztencia |
| ABCC4 | nukleozid transzport |
| ABCC5 | nukleozid transzport |
| ABCC6 | szerves anionok transzportja |
| ABCC7 | klorid-ion csatorna |
| ABCC8 | szulfonilurea receptor |
| ABCC9 | a szívben lévő ATP-szenzitív K ⁺ - csatorna szabályozása (SUR2A alegység) |
| ABCC10 | multi drog rezisztencia |
| ABCC11 | gyógyszer rezisztencia mellrákban |
| ABCC12 | multi drog rezisztencia |
| ABCC13 | funkciója ismeretlen |
| ABCD1 | nagyon hosszú-láncú zsírsavak transzportja |
| ABCD2 | nagyon hosszú-láncú zsírsavak transzportja, X-koromoszóma-hoz kapcsolt ALD fő okozója |
| ABCD3 | zsírsavak és/vagy zsírsav-CoA transzportja a peroxisómába |
| ABCD4 | módosíthatja az ALD fenotípusát |
| ABCE1 | oligoadenilát-kötő fehérje |
| ABCF1 | autoimmun hasnyálmirigy-gyulladás indukál |
| ABCF2 | hiányzik a transzmembrán domén így nem vesz részt transzportban |
| ABCF3 | vírusellenes védekezésben játszhat szerepet |
| ABCG1 | koleszterin transzport |
| ABCG2 | endo- és xenobiotikumok transzportja |
| ABCG4 | szerepe lehet a koleszterin transzportban |
| ABCG5 | sterol transzport |
| ABCG8 | sterol transzport |

2.2 Az ABCG2 fehérje

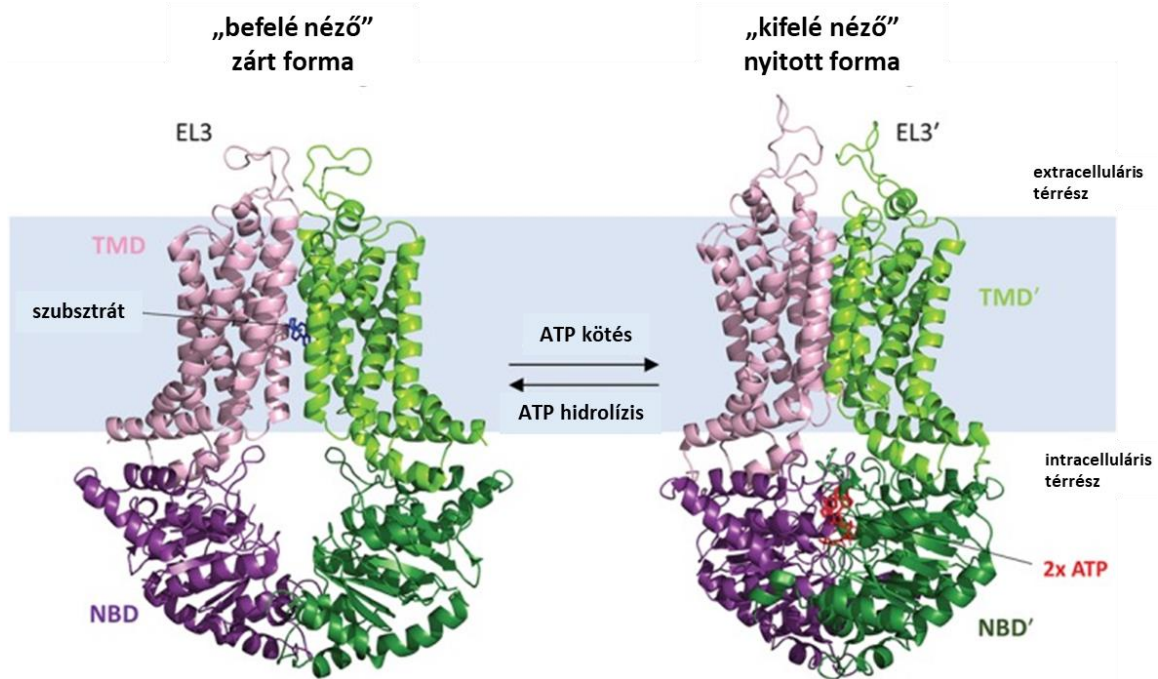
Az ABCG2 gént először 1998-ban fedezte fel Ross és csoportja MCF7 humán emlőrák sejtvonalonban. Így a transzportert először BCRP-nek (breast cancer resistance protein, emlőrák rezisztens fehérje) nevezték el, mivel csökkentette az antraciklin rákellenes szerek akkumulációját a multidrog rezisztens emlőrák sejtekben (54). A ABCG2 génje a humán genomban a 4. kromoszóma 4q21-4q22 helyén található, hossza közel 66 kb, mely 16 exont és 15 intront tartalmaz, a róla átíródó fehérje 655 aminosav hosszú (55,56).

A humán ABCG2 fehérje a féltranszporterek közé tartozik, mely egy NBD-ből és egy TMD-ből áll. A TMD-t 6 transzmembrán α -szegmens alkotja, melyeket 2 intracelluláris (ICL, intracellular loop) és 3 extracelluláris hurok (ECL, extracellular loop) köt össze (57). A G-család többi tagjához hasonlóan az NBD itt is a fehérje N-terminálisán található. Az ABCG2 esetében egyedi strukturális jellemző a viszonylag hosszú ECL3 az 5. és a 6. transzmembrán szegmens között, amely három ciszteint tartalmaz, amelyek intra- (C592-C608) és intermolekuláris (C603-C603) diszulfid kötésekkel alkotnak (58). Továbbá az ECL3-on belül található egy N-glikozilációs hely is (N596) (59) (2. ábra).



2. ábra: Az ABCG2 membrán topológiai modellje. Az ábra jelöli a fél-transzporter nukleotid-kötő doménjét (NBD), transzmembrán doménjét (TMD) és annak szegmenseit (TM1-6), intra- (ICL) és extracelluláris (ECL) hurkait, valamint az ECL3-ban található ciszteineket és az N-kapcsolt glikozilációs helyet. *Kép forrása: Mo és munkatársa alapján (60), módosítva.*

Az ABCG2 féltranszporter révén homodimer formában funkcionál (20,61). Kevés kivételtől eltekintve az ABC transzporterek a szubsztrátokat kémiai gradienssel szemben továbbítják, mely folyamathoz szükséges energiát ATP kötése és hidrolízise biztosítja. Az NBD-ben számos konzervált motívum található, melyek közösek a legtöbb ABC transzporternél. Ezek a szekvenciák az ATP foszfátját hidrogén kötéssel képesek megkötni. Az ATP kötését a Signature-motívum (LSGGQ) segíti, az ATP-hez kapcsolódó magnézium-iont és az ATP hidrolíziséhez szükséges vízmolekulát töltött aminosavak kötik a Q-hurokban és a Walker B motívumban. Új strukturális adatok szerint az ABCG2-ből hiányzik az A-hurok, mely az ATP nukleobázisát köti meg. A hidrolízis során megkötött víz molekulát a Walker B, a H- és D-hurok, valamint egy konzervált glutamin a Q-hurokhoz továbbítják, mely révén az ATP-ről egy foszfát lehasad, ADP és szabad foszfát keletkezik (62-65). Az ATP molekula teljes megkötéséhez a két NBD dimerizálódása szükséges, így összesen két ATP a két NBD közé kötődik be. Az ATP-kötés által indukált NBD-dimerizáció 35°-os elfordulásra kényszeríti az NBD-eket, melyek konformáció változást a transzmembrán hélix 1 (TM1) továbbítja a dimerizált TMD-re. A TMD konformáció változása következtében az ECL3-ak eltávolodnak egymástól, így kinyílik a transzporter extracelluláris rekesze és a szubsztrát felszabadul (65,66). Egyes elméletek szerint a TMD az NBD ATP-kötésétől függően úgynevezett „befelé néző” (zárt állapot, nem köt ATP-t) és „kifelé néző” (ATP-kötött, nyitott állapot) konformációs állapot között változik, mely a szubsztrát továbbítását biztosítja (67,68) (3. ábra). A TMD-n belül az ABC transzporterek szubsztrátkötő helye általában a 12 membrán-hélix citoszólikus oldalán helyezkednek el (20). A legújabb Cryo-EM eredmények alapján tudjuk, hogy az ABCG2 fehérjének két ürege van a szubsztrát továbbítására. Az első zseb a transzporter citoszól felé eső részén található az TMD-k között, melyet a második zsebtől egy leucin-dugó választ el. Az ATP-bekötődése indukálta konformáció változás lazítja a leucin-dugót, így a szubsztrát a második üregbe továbbítódik, majd az ECL3 konformáció változása révén felszabadul. Az ABCG2 transzporternek ez az átmeneti strukturális elváltozása perisztaltikus mozgásra hasonlít (65).



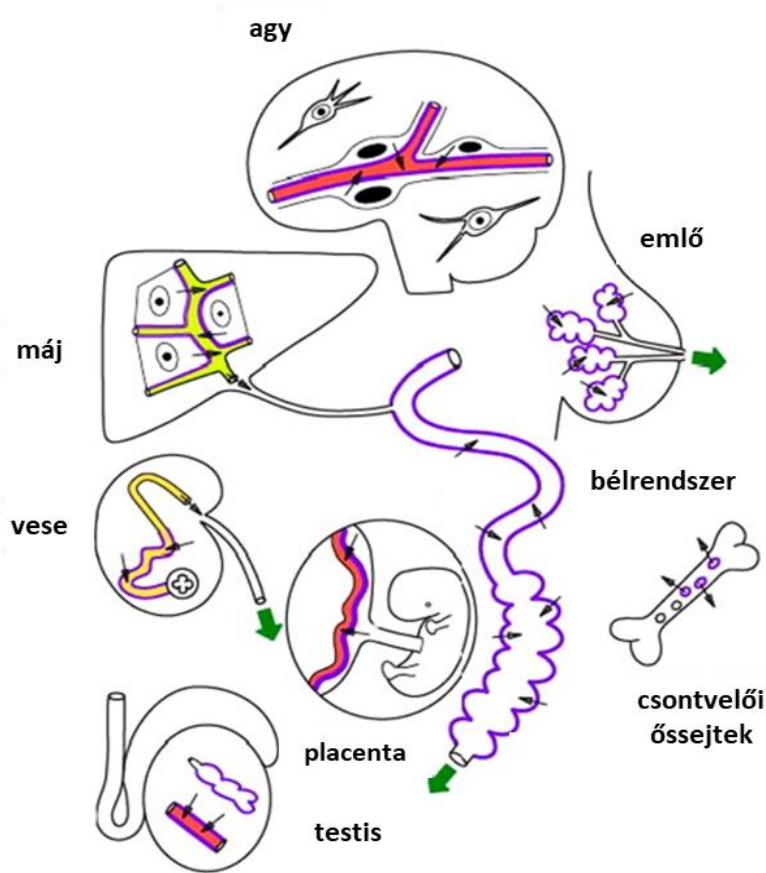
3. ábra: Az ABCG2 3D szerkezete szubsztát kötött és ATP-kötött formában. Az ABCG2 két fél-transzporter (lila és zöld) dimerizált alakban látható. A szubsztát molekula megkötése a TMD üregében történik, ebben az állapotban az NBD-k egymással szemben helyezkednek el („befelé néző” konformáció). Az ATP-kötése indukálja az NBD-k dimerizációját és konformációváltozás révén kialakul „kifelé néző”, nyitott forma, ahol a szubsztát felszabadulhat. Az ATP hidrolizálása révén a transzporter ismét a zárt konformációba rendeződik. *Kép forrása: Manolaridis és munkatársai alapján (65), szerkesztve.*

Az ABCG2 szubsztátkötő helye poliszpecificitást mutat, mely szerint többféle szubsztát megkötésére és transzportjára képes (69). A transzporter szubsztátjainak listája felfedezése óta folyamatosan bővül. Az ABCG2 szubsztátjai közé tartoznak kemoterápiás szerek, antibiotikumok, antivirális szerek, szulfát- és glükuronid-konjugált szterolok és xenobiotikumok, rákkeltő anyagok, fluoreszcens festékek, fényérzékenységet fokozó szerek, HMG-CoA reduktáz inhibitorok, vitaminok és a húgysav (39,60,70,71). Egyes ABCG2 variánsok a vad típustól eltérő szubsztátspecificitást mutathatnak, például megfigyelték, hogy az R482D és R482T mutációt hordozó ABCG2 nagyobb affinitással transzportál antraciklineket (doxorubicin, daunorubicin) és egyes fluoreszcens festékeket (rodamin-123,

LysoTracker-Green) mint a vad típus (72,73). Ezek alapján az R482 aminosavnak kulcsfontosságú szerepe van a fehérje szubsztrátspecifitása szempontjából. Habár klinikai mintákban R482 mutációkat még nem azonosítottak, ezek a variánsok kiváló lehetőséget nyújtanak új ABCG2 szubsztrátok tesztelése és inhibitorok fejlesztése szempontjából (74-76).

Ugyan az ABCG2-t először rákos sejtekben mutatták ki, azóta bebizonyosodott, hogy expressziója és eloszlása a normál szövetekben is jelentős, ahol fontos védelmi funkciókat biztosít a szervezet számára. Legtöbbször a szervezet határfelületein a hámsejtek plazmamembránjának apikális felszínén helyezkedik el (4. ábra). A humán ABCG2 megtalálható a gyomor-bél traktus hámsejtjeinek apikális szegmensében. Magas expressziója a patkóbélben és a vékonybélben figyelhető meg, majd a végbél felé kifejeződése fokozatosan csökken (77). A transzporter a gasztrointesztinális traktusban a húgysav és xenobiotikumok kiválasztásában játszik fontos szerepet (78-80). A fehérje megtalálható a máj epekanalikulusaiban is, ahol xenobiotikumok, toxinok és gyógyszer metabolitok extrahálását végzi az epe csatornába (81). Az ABCG2 a vese proximális tubulusaiban is megtalálható, ahol szerepet játszik a húgysav, szerves szulfátok és számos gyógyszer-metabolit kiválasztásában (82-84). A transzporter konstitutív módon megtalálható a vér-agy gát sejtjeiben, jelentős mértékben a mikropilláris endotél sejtjek lumenális oldalán. Itteni jelentősége az agy védelme a xenobiotikumokkal szemben, ugyanakkor negatív hatása, hogy akadályozza a terápiás szerek bejutását agydaganatok és egyéb központi idegrendszeri betegségek kezelésében (85-87). Az ABCG2 fehérje a vér-ereg gáton is megtalálható, ahol szintén védelmi funkciót tölt be (88), ugyanakkor itt különösen fontos lehet az ösztrogén exportjában (89). Az ösztrogén a fehérje egyik ismert szubsztrátja, mely magas koncentrációban a reprodukciós funkciót befolyásolhatja a herék tömegének és a spermiumszám csökkenésének révén (90). A transzporter a placenta chorion villusaiban is jelentős mértékben jelen van, ahol fontos szerepet tölt be a magzat védelmében az anya által bevitt mérgező anyagokkal szemben (91,92). Az ABCG2 őssejtjeiben való előfordulása is fontos, ahol expressziója a primitív csontvelői őssejtpopulációban a legmagasabb, majd a sejtek differenciálódása során (pl.: hematopoézis) a fehérje mennyisége folyamatosan

csökken. A transzporternek itt kettős szerepe van: az őssejtek védelme gyógyszerekkel és toxinokkal szemben, valamint az őssejtek differenciálatlan állományának megőrzése (93-95). A fehérje az emlőmirigy hámsejtjeinek apikális felszínén is előfordul, ahol expressziója fokozódik a terhesség késői szakaszában és a laktáció alatt. A transzporter egyik fő funkciója az emlőben, különböző vitaminok szállítása az anyatejbe, mint például: ribofavin (B12) és biotin (H-vitamin) (96). A másik feladata, a „védelmi funkció” itt paradox módon működik, ugyanis az ABCG2 itt is xenobiotikumokat transzportál és juttat az anyatejbe, mellyel az anyát igyekszik védeni, ugyanakkor a mérgező anyagokat az anyatejjel az újszülött felveszi (79,83,97).



4. ábra: Az ABCG2 expressziója az emberi szervezetben. Sematikus rajz az ABCG2 (lila vastag vonal) elhelyezkedéséről a különböző szervekben. A kis fekete nyilak az ABCG2 által közvetített transzport irányát jelzik, a zöld nyilak az ABCG2 szubsztrátok szervezetből történő kiválasztásának irányát mutatják. *Kép forrása: van Herwaarden és munkatársai alapján (98), módosítva.*

Noha az ABCG2 számos szövetben expresszálódik fiziológias körülmények között, a fehérje nagyfokú kifejeződést mutat gyógyszerekkel szelektált rákos sejtekben, ahol a kemoterápiás szerekkel szemben multidrog rezisztencia (MDR, multidrug resistance) kialakulásához vezet (54). Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy az ABCG2 fokozott expressziója olyan daganatellenes szerek csökkent akkumulációját eredményezi, mint például a mitoxantron, topoizomeráz inhibitorok (topotekán, irinotekán), metotrexát, flavopiridol, vagy bizantrén (99-102). Az ABCG2 fokozott expressziója szilárd tumorok esetében a mellrák mellett az emésztőrendszeri adenokarcinómákban (hasnyál, vastagbél, máj), endometrium-, petefészek-, méh,- prosztata- és különféle tüdő daganatokban lehet jelentős (103). Az ABCG2 a rosszindulatú vérképzőszervi elváltozásknál is nagy jelentőséggel bír, melyeknél az akut mieloid leukémia (AML) és akut limfocitás leukémia (ALL) esetében írták le, hogy a transzporter kifejeződésének a mértéke hatást gyakorolhat a prognózisra (104,105). Figyelembe kell venni, hogy az ABCG2 nemcsak a daganatsejtekben, hanem még azok elérése előtt korlátozza az orálisan alkalmazott rákellenes gyógyszerek biológiai hasznosulását a farmakon korai kiválasztása révén. Ezáltal a transzporter befolyásolja a daganatellenes szerek felszívódását, eloszlását, metabolizmusát és kiválasztódását is (ADME, absorption - distribution - metabolism - excretion), melyet mind mérlegelni kell a kezelések során az egészséges szövetek védelmében (103). Az ABCG2 okozta multidrog rezisztencia ilyen szempontból nagy problémát jelent a daganatok elleni küzdelemben.

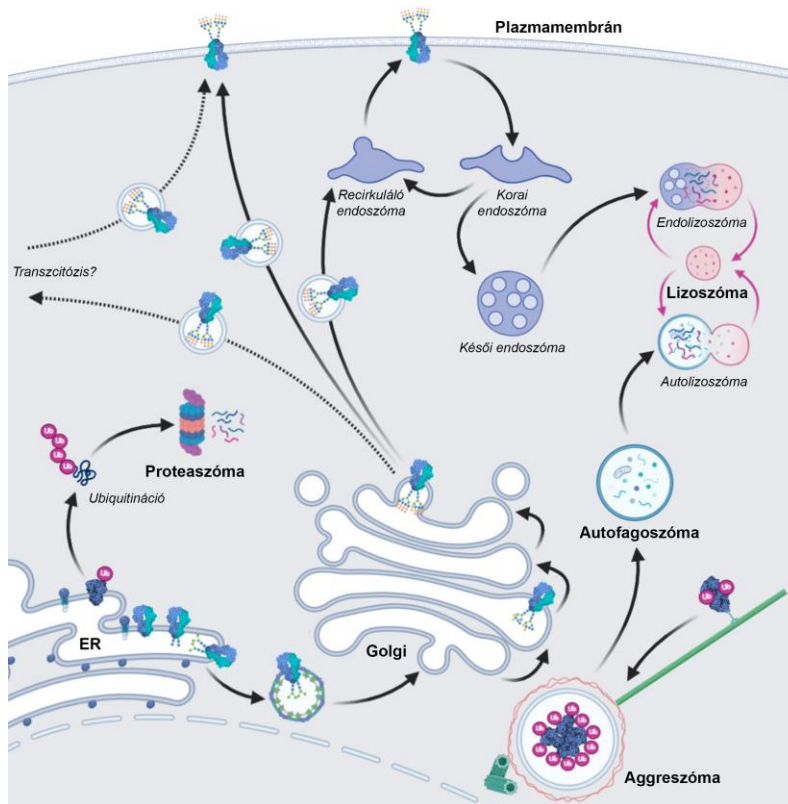
Az ABCG2 expressziója a normális és a daganat sejtekben eltérő szabályozás alatt állhat. A gyógyszerekkel szelektált rákos sejtvonalakban megfigyelték, hogy az ABCG2 fokozott expressziója az *ABCG2* gén amplifikációjának és kromoszóma transzlokációjának köszönhető, mely a tumor sejtek védelmét szolgálja a kemoterápiás szerekkel szemben (55,106-108). A transzporter egyéb epigenetikai módosítása a promóter régióban lévő hiszton acetilálása révén, valamint a promóter DNS metilálása révén történhet, mely a fehérje fokozott expresszióját eredményezi (109,110). Az irodalomból ismert, hogy az ABCG2 expresszióját különböző nemi hormonok (ösztrogén, progeszteron, tesztoszteron) jelentősen képesek fokozni a gén 1. exonja előtt található ösztrogén-receptor-kötő motívumon (ER α)

keresztül (111,112). Ezen a mechanizmuson keresztül indukálódik az ABCG2 expresszió például az emlőben laktáció alatt, vagy a placentában a progeszteron hatására. Az ABCG2 mRNS expressziójának fokozódását oxigénhiányos állapotban, valamint endoplazmatikus retikulum stressz indukálta állapotban is kimutatták, mellyel a sejtek a védekező funkcióikat igyekeznek aktiválni (113,114). Ezen kívül a transzporter transzkripciójának szabályozásában a peroxiszóma proliferátor aktivált gamma receptor (PPAR γ), a progeszteron receptor (PGR) és az aril-szénhidrogén receptor (AHR) transzkripció faktorok vehetnek részt (115-117). Az ABCG2 poszttranszkripció szabályozása mikro-RNS-ek segítségével történik. Bizonyos mikro-RNS-ek gátolhatják őssejtekben az ABCG2 expressziót, mely elősegíti azok differenciációját (118). Más esetekben megfigyelték, hogy egyes tumorokban a mikro-RNS válasz elem (MRE, miRNA response element) eltűnt a gén 3'-UTR végéről, mellyel a rákos sejtek elkerülték az ABCG2 mRNS-ének lebontását és így még fokozottabb multidrog rezisztencia kialakítására lettek képesek (119,120).

2.3 Az ABCG2 trafficking-je

Az ABC transzporterek sejten belüli közlekedése (trafficking) eltérő útvonalakon történhet. Az ABCG2 fehérje bioszintézise, feltekeredése és dimerizációja, valamint kezdeti poszttranszlációs módosításai (például: core-glikozilációja) az endoplazmatikus retikulumban mennek végbe. Az ER-ben zajló minőségellenőrzést követően (ERQC, ER protein quality control) a fehérje áthalad a Golgi-komplexen, ahol teljesen glikozilálódik (mely lépéssel kialakul a fehérje érett, teljesen glikozilált alakja), majd a fehérje kihelyeződik a plazmamembránba (59). Az ABCG2 sejt felszínre vezető útja még nem teljesen ismert, elképzelhető, hogy a Golgiból közvetlenül a plazmamembránba jut, vagy a sejt felszínre egy endoszómális kompartmenten, azaz endoszómális vezikula pool-on keresztül éri el, de az is lehetséges, hogy a transzporter először a bazolaterális membránba jut, majd onnan transzcitózissal kerül az apikális membránba (121-124). A sejt felszínről a transzporter endocitózist követően a korai endoszómákba kerül, ahonnan recirkulálhat a plazmamembránba, vagy a beszedődött feleslegessé vált fehérjék a lizoszómákban

kerülhetnek lebontásra. A nem megfelelően feltekeredett (misfold) fehérjék az ER-ben és a citoszolban ubiquitinálódhatnak, majd a proteaszómában degradálódhatnak, azonban a proteaszómák túlterheltsége esetén az ubiquitinnel jelölt fehérjék a mikrotubulusok mentén retrográd transzporttal az aggreszómában halmozódhatnak fel, majd ezt követően az autofág útvonalon keresztül kerülhetnek lebontásra (125-129). Az ilyen a korai lebontási folyamatok a mutáns változatok alacsonyabb expresszióját eredményezhetik a plazmamembránban (5. ábra).



5. ábra: Az ABCG2 fehérje lehetséges sejten belüli útvonalai. A megfelelő konformációt felvett ABCG2 membrántranszporter fehérje az ER-ből a Golgi-komplexbe jut. Onnan közvetlenül szállítható a plazmamembránba, vagy a Golgiból először egy endoszómális pool-ba kerülhet. Polarizált sejtekben az is elképzelhető, hogy a transzporter először a bazolaterális membránt éri el, majd onnan transzcitózissal jut az apikális membránba. A sejt felszínen feleslegessé vált fehérjék endocitózist követően a lizoszómákban bomlanak le. A nem megfelelően feltekeredett fehérjék ubiquitinálódhatnak és degradálódhatnak a proteaszómákban, vagy az aggreszómában halmozódhatnak fel. *Kép forrása: Sarkadi és munkatársai alapján (130), módosítva.*

2.4 Gyakori ABCG2 variánsok

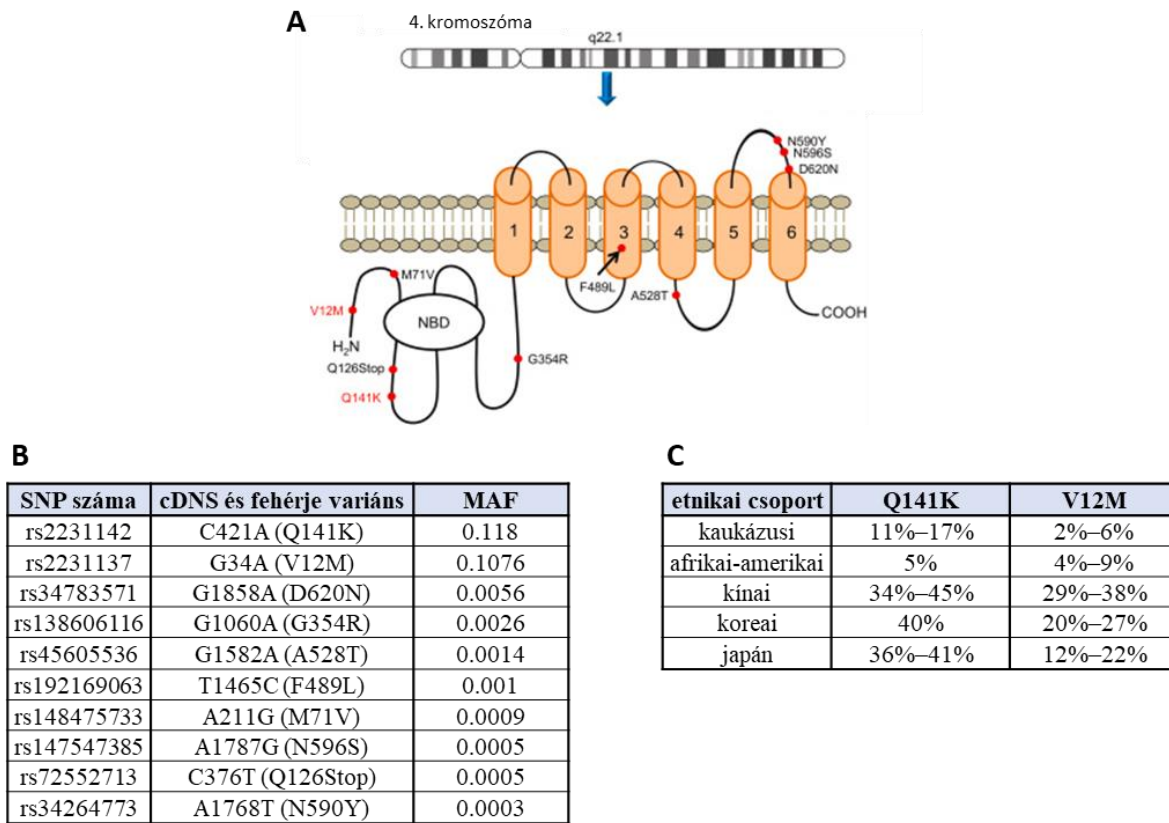
Az ABCG2-nek számos genetikai polimorfizmusa létezik a populációban, melyek 90%-a SNP (single nucleotide polymorphism, egyetlen nukleotidot érintő mutáció) (131). Ezek az allélvariánsok eltérő gyakorisággal fordulhatnak elő a különböző etnikai csoportokban. A transzporter két leggyakoribb változata a Q141K és a V12M, melyek allélgyakorisága 10% fölött van a globális populációban (6. ábra).

A V12M mutáció a transzporter intracelluláris oldalán helyezkedik el, közel a polipeptid N-terminális végéhez. Erről a variánsról kimutatták, hogy az SNP-nek nincs jelentősebb hatása a fehérje expressziójára, lokalizációjára és transzport funkciójára (132). Az ABCG2-V12M változat a kelet-ázsiai populációban gyakoribb (kb. 20%), míg a kaukázusi populációban alacsonyabb valószínűséggel fordul elő (kb. 4-5%) (133-135).

A legtöbbet tanulmányozott ABCG2 változat a Q141K, mely mutáció az NBD Walker A (80-86. aminosav) és Signature (186-200. aminosav) motívuma között található (128). Az ABCG2-Q141K előfordulásának gyakorisága a kelet-ázsiai populációban eléri a 20-40%-ot, míg az kaukázusi és afroamerikai populációban 2-10% körül van jelen (136,137). A mutációt hordozó változatról ismert, hogy funkcionálisan aktív transzportert kódol, habár a fehérje transzport funkciója körülbelül a fele a vad típusénak. A Q141K variáns expressziója a plazmamembránban szintén jóval alacsonyabbnak bizonyul az *in vitro* és *in vivo* mérésekben egyaránt (132,138,139).

A Q126X változat is a leggyakoribb SNP-k egyike. A Q126X esetében a korai stop-kodon miatt nem képződik fehérje termék. Érdekes módon ez a változat csak az ázsiai populációban van jelen, a kaukázusi és az afroamerikai etnikumban nem találták meg (134,140).

Az alacsonyabb allélgyakorisággal előforduló ABCG2 SNP-k esetenként alacsonyabb fehérje expressziót és csökkent transzport aktivitás mutathatnak (141,142), azonban a ritkább változatokkal kapcsolatban jelenleg kevés információ áll rendelkezésre, valamint az idáig publikált eredmények is sokszor ellentmondásosak lehetnek.

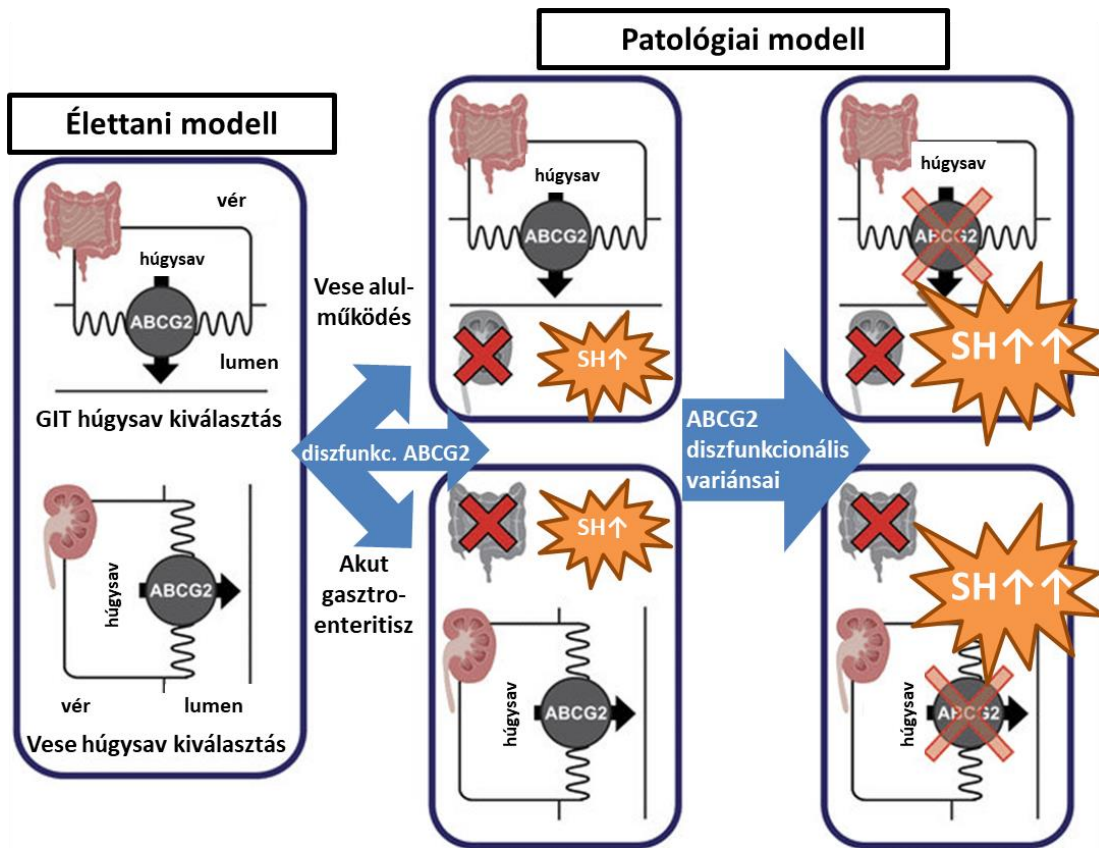


6. ábra: ABCG2 variánsok. (A) A globálisan előforduló tíz leggyakoribb ABCG2 SNP helye a topológiai modellen. (B) A tíz leggyakoribb SNP globális gyakoriságuk, sorrendjében (MAF, minor allele frequency). (C) A két leggyakoribb SNP: a Q141K és a V12M előfordulásának gyakorisága a különböző etnikai csoportokban (jobbra lent). *Kép és az adatok forrása: Chen és munkatársai (143), valamint az Exome Aggregation Consortium ExAC és az 1000 Genom Projekt adatok alapján, ábra módosítva.*

A különböző mutációk, vagy SNP-k az ABCG2 diszfunkcióját eredményezhetik. Ha a transzporter nem képes a feladatát megfelelően ellátni, például: alacsonyabb expresszió, korai degradáció, csökkent aktivitás, vagy esetleg a fehérje nem megfelelő lokalizációja, azaz trafficking problémája esetén, az számos betegség kialakulásában szerepet játszhat.

2.5 Az ABCG2 variánsok patofiziológiás szerepe a köszvény betegségben

Bizonyos ABCG2 variánsoknak nagy szerepet tulajdonítanak a köszvény kialakulásában. A köszvény egy gyakori, a populáció 1-3%-át érintő, a purin lebontásának túlterheltségéből származó betegség, melyet hiperurikémia és az ízületekben nátrium-urát kristályok lerakódása jellemez, ami igen fájdalmas ízületi gyulladással jár. Fiziológiás körülmények között a húgysav kétharmada a veséken keresztül, míg egyharmada a bélrendszeren át ürül. Mivel az ABCG2 kritikus szerepet játszik a húgysav eliminációjában, a transzporter nem megfelelő működése a húgysav kiválasztásának csökkenéséhez és a vér húgysav szintjének emelkedéséhez vezet (144,145). Az amerikai, japán és kínai populációt vizsgáló nagy mintaszámú eset-kontroll elemzésekből tudjuk, hogy az ABCG2-Q126X és -Q141K variánsai jelentős összefüggést mutatnak a köszvény kockázatának kialakulásával (145,146). Megállapították azt is, hogy a nem és az etnikai hovatartozás további társfaktorok lehetnek, amelyek befolyásolják a köszvényre való hajlamot (147-149). Leírták azt is, hogy akut gasztroenteritiszben szenvedő betegeknél a különböző vírusfertőzések (pl. rotavírus) bélgyulladást és a bélhámsejtek pusztulását indukálják, mely rontja a bélben a húgysav ABCG2-n történő eliminációját, így szintén hiperurikémiához vezet. Amennyiben a kórkép vesebetegséggel, vagy az ABCG2 valamelyik diszfunkcionális SNP-jével is társul (pl.: Q126X, Q141K), aminek következtében a húgysav a veséken át sem képes megfelelő mértékben távozni, akkor a szérum húgysav szintje még fokozottabban megemelkedhet (150). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy ABCG2 fontos szerepet játszik a húgysav mind a renális, mind az extra-renális kiválasztásának mechanizmusában (7. ábra). Továbbá, az ABCG2 transzporter alulműködésének következtében megemelkedett szérum húgysav szintje a köszvény mellett jelentősen megemelheti a vesebetegség, magas vérnyomás, valamint kardiovaszkuláris és agyi érrendszeri betegségek kockázatát is (151).



7. ábra: Az ABCG2 által közvetített húgysav kiválasztás patofiziológiája. Az ABCG2 fiziológiai körülmények között a vesében és a bélben a húgysav kiválasztásában játszik szerepet. Az ABCG2 alulműködése mind a renális, mind az extra-renális húgysav ürítését csökkenti. Veseelégtelenségben szenvedő betegeknél a renális ürítés szinte teljesen megszűnik, a húgysav kiválasztás ilyenkor teljes mértékben a beleken történő exkréciótól függ. Akut gastroenteritisben szenvedő betegeknél a bélgyulladás súlyosan rontja a bél húgysav kiválasztását, ezért az urát ürítése kizárólag a veséken keresztül történik. Az ABCG2 diszfunkciója jelentősen befolyásolja a hiperurikémia súlyosságát veseelégtelenségekben és bélbetegségekben egyaránt (GIT: gasztrointesztinális traktus, SH: szérum húgysav). *Kép forrása: Matsuo és munkatársai alapján (150), módosítva.*

2.6 Új transzporter variánsok felfedezése

Dr. Sarkadi Balázs és kutatócsoportja régóta vizsgálják a klinikailag fontos membránfehérjék (pl.: GLUT-1, ABCA1, ABCB6, ABCG2, URAT-1) expressziós szintjeit humán vörösvértesteken (vvt), mellyel igyekeznek biomarkereket találni a membrántranszporterekkel összefüggő betegségeknel (pl.: Alzheimer-kór, 2-es típusú diabétesz, köszvény) (152). Munkájuk során antitest alapú, áramlási citometriás módszerrel kvantitatívan képesek meghatározni az eritrocitákon található membránfehérjék expressziós szintjét (153,154). Ennek előnye, hogy akár már egy csepp vérből (ujjbegyszúrás), gyorsan képesek kimutatni a vizsgálni kívánt membrántranszporterek mennyiségi szintjét, valamint ugyanezen mintából qPCR segítségével TaqMan alapú genotipizálást is végeznek, mellyel a gyakoribb SNP-k a specifikus próbákkal könnyen beazonosíthatók.

Kutatásaik során az egyik jelentős húgysav transzporter, az ABCG2 membránfehérje vörösvértest felszíni expressziós szintjét is vizsgálták köszvényes és hyperurikémiás betegcsoport, valamint életkorban azonos, egészséges kontrollcsoport vérmintáin. Ahogy azt már korábban mások is leírták a köszvényes, vagy hyperurikémiás betegekben gyakrabban figyelhető meg az ABCG2 alacsonyabb expressziója, mint a kontrollcsoportban (155-157). A Sarkadi csoport is hasonló eredményekre jutott a magyar populáció vizsgálata során, majd az alacsonyabb expresszáló minták esetében ellenőrizték a fehérje genetikai hátterét is (TaqMan analízis és Sanger szekvenálás). Az eddig ismert hazai populációban gyakran előforduló ABCG2 mutációk mellett (Q141K, R236X, R383C) találtak egy új, eddig nem ismert ABCG2 változatot (211 A>G, rs148475733), mely a 71-es aminosav pozícióban metionin>valin cserét eredményez (M71V). A betegekben és az egészséges kontrollcsoportban összesen 5 egyént találtak, akinél megtalálható volt az ABCG2-M71V változat. Az M71V variáns a vad típussal heterozigóta formában a fehérje expressziót a vvt-k membránjában körülbelül a felére csökkentette, a Q141K változattal heterozigóta formában pedig a fehérje kifejeződése a sejtfelszínen ennél is alacsonyabb volt. Eredményeik alapján az ABCG2-M71V a magyar populáció 1%-ában fordul elő heterozigóta formában, mely által a mutáció, gyakorisága alapján SNP-nek tekinthető (155).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az ABCG2 transzporterhez köthető kórképeknél elengedhetetlenek a mutációt hordozó változatok *in vivo* és *in vitro* molekuláris biológiai, valamint biokémiai vizsgálatai, melyek hozzájárulnak a genotípus-fenotípus minél jobb megértéséhez és a hatékonyabb terápiás beavatkozások fejlesztéséhez. Ezért PhD munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

1. Egy újonnan felfedezett ABCG2 mutációt, az M71V-t kívántam *in vitro* körülmények között jellemezni molekuláris biológiai módszerekkel: fehérje expresszió, lokalizáció és funkció tekintetében.

2. Az vad típusú ABCG2 transzmembrán transzporter célkompartementbe történő kihelyeződésének kinetikai paramétereit szerettem volna meghatározni. Ehhez a fehérje sejten belüli útját kívántam nyomon követni a fehérje termelődésének helyétől, az endoplazmatikus retikulumtól, a Golgi-komplexen keresztül a plazmamembránig.

3. Vizsgálni kívántam továbbá a patológiásan releváns mutációt hordozó ABCG2 variások (M71V és Q141K) sejten belüli mozgását is, melyek bizonyos kórképekben (például köszvény betegségben) alacsonyabb fehérje szintet és sejt felszíni expressziót mutatnak a vad típushoz képest. Szerettem volna feltárni ezeknek a mutációknak a transzporter trafficking-jére gyakorolt hatását, mellyel az ABCG2 változatok csökkent plazmamembrán lokalizációjának molekuláris mechanizmusát igyekeztem pontosabban megérteni és az esetleges kihelyeződés során fellépő gátló, illetve sebességmeghatározó lépéseket feltárni.

4. MÓDSZEREK

4.1 DNS konstrukciók létrehozása

Az ABCG2-M71V jellemzéséhez használt pcDNA3.1, pEGFP és pIRES-GFP plazmid konstrukciókat Zámbo Boglárkával (Dr. Sarkadi Balázs egykori PhD hallgatója) együtt készítettük, és az ezzel kapcsolatos metodikai részleteket Bogi már publikálta disszertációjában, így ezt a folyamatot a dolgozatomban nem mutatom be (158).

Az Sf9-bakulovírus rendszerben történő ATPáz mérésekhez szükséges membrán preparátumok előállításához a pAcUW-21-L plazmid alapú vad típusú, K86M- és Q141K-ABCG2 konstrukciókat Dr. Laczka Csillától kaptam (159). A vad típusú ABCG2 szekvenciát tartalmazó vektorba a NotI és PstI restriktions enzimek (New England BioLabs) segítségével szubklónoztam az M71V mutációt tartalmazó szekvenciát a korábban elkészített pcDNA3.1 vektorból (160).

A RUSH-ABCG2 konstrukciók elkészítéséhez az Str-Ii_SBP-EGFP-Golgin84 (Adgene #65303), ER horgonyt tartalmazó plazmidot használtam alapul. A korábban létrehozott pEGFP-ABCG2 konstrukciókból Gibson-féle klónozással raktam be az EGFP-ABCG2-wt, M71V és Q141K szekvenciákat a RUSH-vektor EGFP-Golgin84 szekvenciájának helyére NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix reakciókittel (New England BioLabs) a gyártó utasításai alapján.

A Gibson-féle klónozáshoz használt primerek:

forward: 5'- ATGGACGAGCTGTACAAGGGACTCAGATCTCGAG -3'

reverse: 5'- GGCTGATTATGATCAGTTATCAGTTATCTAGATCCGGTGGATC -3'

Az összes plazmid konstrukció szekvenciáját Sanger szekvenálással ellenőriztem (Microsynth AG).

4.2 Emlős sejtvonalak fenntartása és transzfektálása

A HeLa, HEK293 és MDCKII sejteket DMEM/GlutaMAX (Gibco) komplettált médiumban (10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco)) tenyésztettem 37 °C-on 5% CO₂ mellett. A letapadó sejtek passzálásakor PBS-t és tripszint (TripLE, Gibco) használtam. A HEK293 és HeLa sejtek transzfekcióját Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagens segítségével, az MDCKII sejtek transzfekcióját Magnetofection Kit (OzBioscience, #MTX0750) reagenssel végeztem Opti-MEM médiumban (Gibco) a gyártók előírása szerint.

4.3 qPCR az ABCG2 mRNS szintek kvantitatív meghatározásához

Az mRNS minták készítéséhez a sejteket előzetesen 12-well plate-re (Greiner) ültettem ki 2,5 x 10⁵ sejt/well sejtszámmal, majd 24 órát követően transzfektáltam. A pIRES-ABCG2-GFP transzfektált HEK293 sejtekből 48 óra elteltével, míg a RUSH-ABCG2 konstrukciókkal transzfektált HeLa sejtekből 24 óra elteltével izoláltam az RNS mintákat. Az mRNS izolálását és tisztítását PureLink RNA MiniKit (Thermo Fisher) segítségével végeztem a gyártó utasításainak megfelelően. Ezt követően a mRNS átírását cDNS-sé High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel végeztem a gyári protokollnak megfelelően (Thermo Fisher). A cDNS mintákból az ABCG2 variánsok expressziós szintjét specifikus ABCG2 próba (Thermo Fisher, #01053790 és #00184979) segítségével határoztam meg TaqMan Gene Expression MasterMix-el (Thermo Fisher, #4369016) és StepOnePlus™ Real-Time PCR készülékkel a gyári ajánlásoknak alapján. Az ABCG2 mRNS szinteket először a belső kontroll RPLP0 (riboszomális fehérje P0, Thermo Fisher, #99999902) szintekhez normalizáltam, majd az ABCG2 vad típusú mintához viszonyítottam a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmazva.

4.4. Western blot

A fehérje preparátumok készítéséhez a sejteket előzetesen 12-well plate-re (Greiner) ültettem ki $2,5 \times 10^5$ sejt/well sejtszámmal, majd 24 óra elteltével transzfektáltam. Az ABCG2-M71V jellemzéséhez végzett kísérletekhez a sejtekből 48 óra elteltével, illetve kezeléseken még további 24 óra kezelő médiummal való inkubálás után preparáltam a fehérje mintákat. Ezekben az esetekben 1 mM 4-PBA-t (Sigma) vagy 1 μ M kolhicint (Sigma) tartalmazó médiummal kezeltem a sejteket. A RUSH-ABCG2 konstrukciókat kifejező sejtekből 24 óra elteltével preparáltam a fehérje mintákat, illetve az itt alkalmazott 1 mM 4-PBA, 2 μ M MG132 (Sigma) és 10 nM BAF (Sigma) kezeléseket közvetlenül a transzfekciót követően végeztem egy éjszakán át történő inkubálással.

A sejteket PBS-sel mostam, majd a fehérjeminták extrahálásához az alábbi összetételű lízis / mintafelvívő puffert használtam: 0,1 M TRIS- PO₄, 4% SDS, 4 mM Na-EDTA, 40% glicerol, 0,04% brómfenol-kék, 0,04% β -merkaptotanol (ezek az anyagok mind a Sigma gyártótól származnak), melyet proteáz inhibitor koktéllal egészítettem ki (Roche). A sejt-lízátumokat szonikáltam, majd a fehérje koncentráció meghatározását módosított Lowry-módszerrel végeztem. Ezen módszer során a minták azonos mennyiségéhez (5 μ l) 10 μ l 2%-os DOC oldatot adtam, vortexeltem, majd 15 perc inkubálás után 375 μ l 25%-os TCA oldat hozzáadásával kicsaptam a fehérjét. A kicsapott fehérjét centrifugálással üleptettem (10 °C, 14000 rpm, 15 perc), majd a felülúszó leöntését követően a pelletet 1,5 ml Lowry-reagensben (0,1 M NaOH, 0,19 M Na₂CO₃ oldat kiegészítve 1% (v/v) 2%-os Na-tartarát és 1% (v/v) 1%-os CuSO₄-oldattal) vettem fel. Az oldatokhoz 150 μ l 2x híg Folin (Fenol-Ciocalteu) reagenst adtam, majd 45 perc inkubációt követően a minták abszorbanciáját 660 nm-en olvastam le két csatornás Perkin Elmer Lambda12 spektrofotométeren. Sztenderdként BSA-oldatsor használtam.

A glikozidáz kezelésekhöz mintánként 20 μ g mennyiségű sejt-lízátumot EndoH (Sigma, #11088726001) és PNGáz F (Roche, #113651855001) glikozidáz enzimes kezelésnek vettem alá a gyártó által ajánlott protokoll alapján.

A mintákat azonos összfehérje mennyiséggel 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattam meg. A gélből a fehérjét nedves blottoló segítségével vittem át PVDF (Millipore) membránra. A membránokat 5%-os sovány tejporos TBS-Tween (10 mM Tris, 0,17 M NaCl, 0,1 v/v% Tween 20) oldatban blokkoltam (1 óra) majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam blokkolóban beoldott elsődleges antitesttel (2. táblázat). Másnap a mosási lépéseket követően a membránokat HRP-konjugált másodlagos antitesttel (anti-mouse / anti-rabbit HRP, 1:10000, Jackson) inkubáltam szobahőmérsékleten 1 órán át. Az antigén-antitest kapcsolatot Immobilion ECL Luminol (Millipore) reagenssel hívtam elő és a fehérje sávokat röntgenfilmen (Thermo Fisher) detektáltam hívó és fixír segítségével (Tetenal). A röntgenfilmek denzitometriás elemzését ImageJ szoftverrel végeztem.

2. táblázat: Western blothoz használt elsődleges antitestek. Az ellenanyagokat a feltüntetett hígításban használtam.

| fehérje | antitest | hígítás | katalógusszám |
|----------------|----------------------|---------|---------------|
| ABCG2 | Bxp-21 | 1:500 | Abcam, ab3380 |
| GFP | anti-GFP | 1:5000 | Abcam, ab290 |
| β -actin | anti- β -actin | 1:8000 | Sigma, A1978 |

4.5 Sf9 rovarsejtek fenntartása, transzfektálása és membránpreparálás

Az Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) sejteket szuszpenziós kultúrában TNM-FH (Sigma) médiumban (kiegészítve: 5% FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel és 100 μ g/ml sztreptomocinnel) tenyésztettem 27 °C-on 5% CO₂ mellett.

A rovarsejteket a pAcUW-21-L-ABCG2 plazmid konstrukciókkal a FlashBAC ULTRA Kit (Oxford Expression Technologies) és FuGENE HD (Promega) segítségével transzfektáltam a gyártó ajánlásának megfelelően, majd a létrejött vírus felülúszókkal fertőztem tovább az Sf9 sejteket. Ezt követően 3 nap elteltével a sejtekből differenciál centrifugálással membránpreparátumot készítettem.

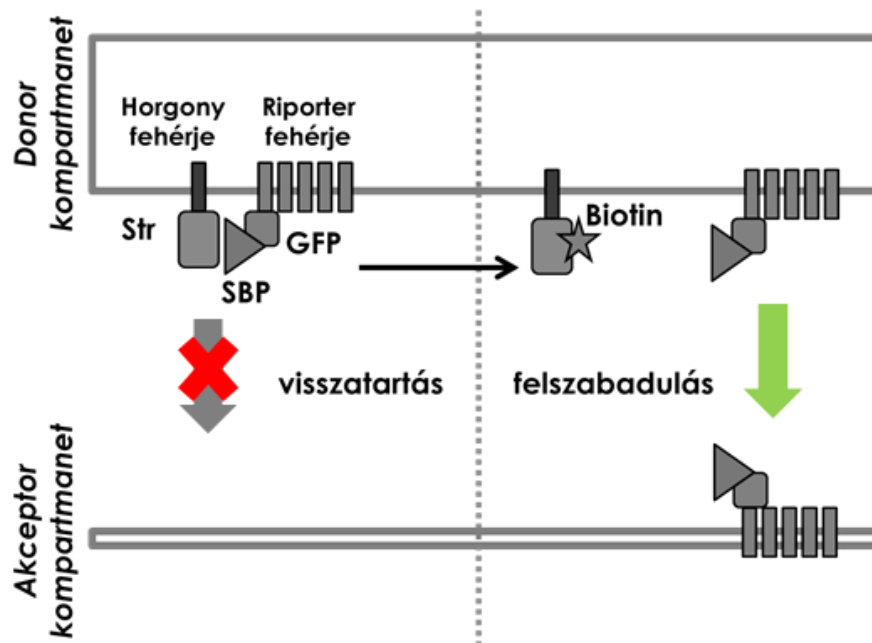
Ehhez a sejteket Tris-mannitol (50 mM Tris, 300 mM mannitol, 0,1 mM PMSF proteáz inhibitor) pufferben vettem fel és 10 percig, 1000 g-vel 4 °C-on centrifugáltam. Ezt követően a sejtfraekciót Tris-mannitol pufferrel mostam, majd a mintákat hipotóniás pufferben (50 mM Tris, 50 mM mannitol, 2 mM EGTA, 8 µg/ml aprotinin, 0,01 µg/ml leupeptin 0,26 mM PMSF, 2 mM DTT) vettem fel és manuálisan lizáltam üveg homogenizátorral. A lizátum centrifugálásával elválasztottam a felesleges sejtalkotókat (10 perc, 1000 g, 4 °C), majd a felülúszó újabb centrifugálásával ülepittem le a membrán frakciót (1 óra, 25000 g, 4 °C). A membránmintákat -80 °C-on tároltam felhasználásig. A membránpreparátumok fehérje koncentrációját módosított Lowry-módszerrel mértem meg, majd a membránminták ABCG2 tartalmát Western-blot módszerrel ellenőriztem (lásd fentebb).

4.6 ATPáz módszer

Az ABCG2 variánsokat tartalmazó Sf9 membránpreparátumokon vanadát szenzitív ATPáz aktivitás méréseket végeztem (161). Az azonos ABCG2 fehérje mennyiségeket tartalmazó mintákhoz az alábbi tartalmú reakciómixet adtam: 40 mM Mops-Tris, 50 mM KCl, 500 mM EGTA-Tris, 5 mM Na-azid, 1 mM ouabain és 1 mM Na-orthovanadát. A reakciót 2 mM MgATP hozzáadásával indítottam, majd 20 perc elteltével 2 v/v% SDS-sel állítottam le. Az alapaktivitás mérése mellett, bizonyos mintákat 5 µM quercetin (ABCG2 aktivátor, Sigma), vagy 1 µM Ko143 (ABCG2 inhibitor, Sigma) mellett mértem. A kísérleteket koleszterin töltött membránpreparátumokon is elvégeztem, melyet előzetesen 0,6 mM RAMEB-koleszterinnel (Cyclolab) való inkubálással értem el (10 perc, jégen). Az ATPáz mérés során keletkezett anorganikus foszfát mennyiségét klorimetriás módszerrel határoztam meg. A mintákhoz P_i-reagenst (2,5 M H₂SO₄, 1 % ammónoum-molibdenát, 0,014 % kálium-antimon-tartarát), 20 %-os ecetsavat és a reakció elindításához 1 %-os aszkorbinsavat mértem, majd 30 perces 37 °C-on történő inkubálást követően 880 nm-en határoztam meg a minták P_i-mennyiségét Perkin Elmer Lambda12 két csatornás fotométer segítségével. A minták azonos ABCG2 tartalmát előzetesen Western blottal állítottam be.

4.7 A RUSH rendszer

A RUSH (retention using selective hooks, megakasztás szelektív horgonyfehérjék segítségével) rendszer alapja egy bicisztronos vektor, melyről két fúziós fehérje expresszálódik egyidejűleg: keletkezik egy kompartment rezidens sztreptavidin-konjugált (Str) horgony fehérje, valamint a vizsgálni kívánt riporter fehérje, amihez egy sztreptavidin kötő peptid (SBP, streptavidin binding peptide) és egy fluoreszcens fehérje, GFP (green fluorescent protein) van kapcsolva. A horgony fehérje a riportert az Str-SBP kölcsönhatás révén a neki megfelelő donor kompartmentben visszatartja, mely kapcsolat biotin hozzáadásával megszüntethető, így a riporter szinkronizált felszabadulása következik be. Ezt követően a vizsgálni kívánt, riporter fehérje sejten belüli útja a hozzá kapcsolt GFP jele alapján mikroszkópos képalkotással monitorozható (8. ábra) (162).



8. ábra: A RUSH rendszer működési elve. A horgony fehérje a sztreptavidin (Str) / sztreptavidin-kötő peptid (SBP) kapcsolat révén a donor kompartmentben visszatartja a vizsgálni kívánt riporter fehérjét. Biotin hozzáadásával a riporter fehérje leválik a horgony fehérjéről és kijut a neki megfelelő akceptor, azaz célkompartmentbe.

4.8 Immunfluoreszcens jelölések

4.8.1 Immunfestés fixált mintákon

A HEK293 sejteket 8-well LabTek kamrára (Thermo Fisher) ültettem ki 5×10^4 sejt/well sejtszámmal, majd transzfekeciót követően 48 órán át növesztettem a sejteket. Bizonyos mintákat további 24 órán át kezeléseknak vettem alá (1 mM 4-PBA, 1 μ M kolhicin). Ezt követően gyengéd PBS-es mosást alkalmaztam, majd 4%-os PFA-val (10 perc, szobahő) és $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -ra előhűtött metanollal (5 perc, szobahő) fixáltam és permeabilizáltam a sejteket. A mintákat 1 órán át blokkoltam 2 mg/ml BSA-t, 1% halzselatint, 5% kecskeszérumot és 0,1% Triton-X 100-at (Sigma) tartalmazó DPBS pufferben (0,138 M NaCl, 8,5 mM Na_2HPO_4 , 6,4 mM KH_2PO_4 , 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2) (blokkoló puffer). Majd a sejteket egy éjszakán át jelöltem $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on specifikus ABCG2 elleni Bxp-21 antitesttel (Abcam, ab3380), 1:200 hígításban blokkolópufferben. Másnap a mosási lépéseket követően Alexa Fluor 549 anti-mouse IgG (H + L) másodlagos antitesttel (Thermo Fisher, #A11005) inkubáltam a mintákat 1:250 hígításban (1 óra, szobahő). A sejtmagokat 1 μ M DAPI-val (Sigma) jelöltem (5 perc, szobahő).

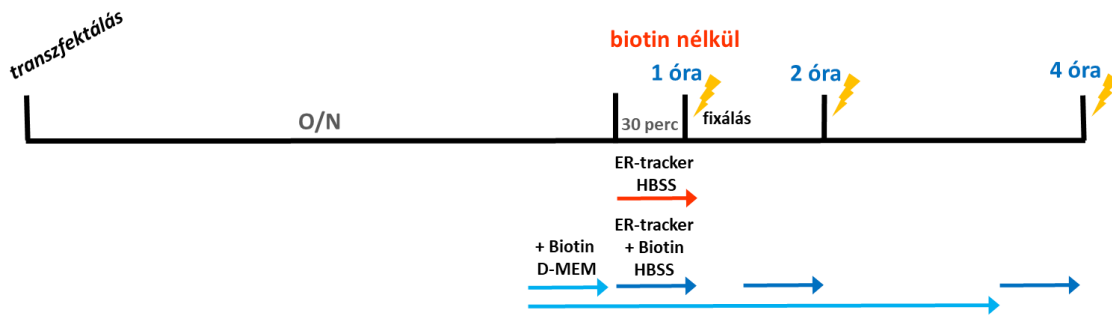
Az MDCKII sejteket 6-well plate-be (Geiner) helyezett Snapwell (Corning, Costar) inzertekre tömény sejtuszpenzióból ültettem ki. Másnap a felúszó többlet sejteket PBS-sel lemostam. A konfluencia elérése után Magnetofection Kit (OzBioscience, #MTX0750) segítségével transzfekektáltam a sejteket a Snapwell inzerteken. Ezt követően a sejteket további 6 napig növesztettem polarizáltatás céljából. Az immunfluoreszcens festésnél hasonló protokollt követtem, mint a HEK293 sejteknél, azonban itt a sejtek erőteljes PBS-es mosást igényeltek, valamint a fixáláshoz nem alkalmaztam metanolt, mely az a Snapwell membránt roncsolhatja. Továbbá ezen minták esetében még a Bxp-21 ellenanyag mellett anti- Na^+/K^+ -ATPáz elsődleges antitestet (Abcam, ab353) is használtam 1:500 hígításban. Ezekben a mérésekben Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (H + L) és Alexa Fluor 594 anti-chicken IgG (H + L) (Thermo Fisher, #A32723, #A11042) másodlagos antitesteket használtam (1:250). Az immunfestést követően a Snapwell membránokat szikével óvatosan kivágtam az inzertekből és egy tárgylemezre helyeztem a sejtek apikális oldalával felfelé, majd a mintákat

Vectashield HardSet Antifade médiummal (Vector Laboratories, #H-1400) és üveg fedőlemezzel rögzítettem a tárgylemezhez.

A HeLa sejteket 8-well IbidiT kamrára (Ibidi) ültettem ki 2×10^4 sejt/well sejtszámmal, majd 24 óra tenyésztést követően transzfektáltam. A sejteket a RUSH típusú plazmidokkal való transzfekció után 24 órán át növesztettem. Másnap, egyes mintákon a tenyésztő médiumot $100 \mu\text{M}$ biotint (Sigma) tartalmazó DMEM-re cseréltem le, majd meghatározott inkubációs idő elteltével (1, 2 és 4 óra, valamint 20-120 percig 20 perces időközönként) PBS-sel mostam és 4%-os PFA-val fixáltam (10 perc, szobahő) a sejteket. A biotinnal nem kezelt minták fixálását rendszerint az első biotinos minták fixálásával egy időben végeztem. A mintákat ezt követően blokkoló pufferrel inkubáltam (1 óra, szobahő), majd anti-Giantin elsődleges antitesttel (BioLegend, #924302) jelöltem (1:1000 hígításban) egy éjszakán át 4°C -on. A mintákat másnap a mosási lépéseket követően Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG (H + L) másodlagos antitesttel (Thermo Fisher, #A11012) jelöltem 1:250 hígításban (1 óra, szobahő).

4.8.2 Élő sejtek jelölése ER-Tracker Red festékkel

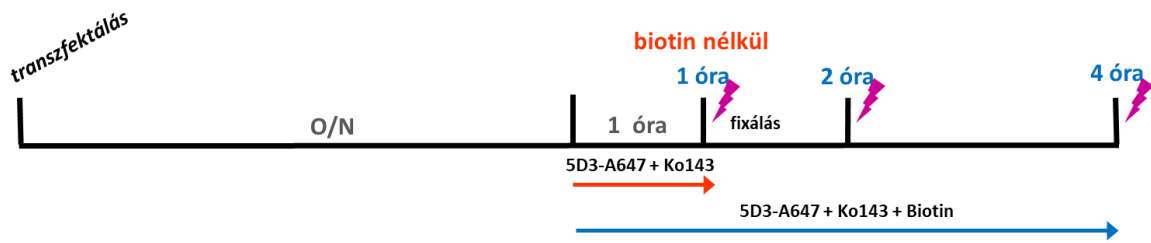
Az ER jelöléséhez a fentiekben, a HeLa sejtek immunfestésénél leírt módszer szerint jártam el a sejtek kirakása és a transzfekciót követő inkubálás tekintetében. Másnap egyes mintákon a médiumot $100 \mu\text{M}$ biotint tartalmazó DMEM-rel cseréltem, majd a fixálásokat megelőzően az utolsó 30 percre lecseréltem az inkubáló és kezelő médiumokat ER-Tracker Red (Thermo Fisher, #E34251) fluoreszcens festéket 1:1000 hígításban tartalmazó HBSS médiumra (Sigma), majd így inkubáltam tovább a sejteket 37°C -on fél órán keresztül. Végül a meghatározott időpontokban (0, 1, 2 és 4 óra, valamint 0-120 percig 20 perces időközönként) PBS-sel mostam és 4%-os PFA-val fixáltam a sejteket (10 perc, szobahő). A biotinnal nem kezelt minták is fixálás előtt 30 perces ER-jelölésen estek át (9. ábra).



9. ábra: Az ER-Tracker Red jelölés protokollja. A transzfektált HeLa sejteket másnap biotinos indítás után, vagy a nélkül jelöltem ER markerrel, 30 percet 37 °C-on inkubálva. Piros nyíl: biotin nélküli minta, ER-Tracker-rel HBSS médiumban inkubálva. Világoskék nyíl: biotinos inkubáció DMEM-ben. Sötétkék nyíl: biotin kezelés és ER-Tracker jelölés HBSS médiumban. A sejtek fixálása a megadott időpontokban 4%-os PFA-val történt (sárga villám).

4.8.3 ABCG2 jelölése a plazmamembránban 5D3 antitesttel

Az ABCG2 sejtfelszíni jelöléséhez a fentiekben, a HeLa sejtek immunfluoreszcens jelöléseinel leírt metódus szerint jártam el a sejtek kirakása és a transzfekeciót követő növesztés, inkubáció tekintetében. Másnap a mintákon a lecseréltem a médiumot 1 mg/ml Alexa Fluor 647 konjugált 5D3 antitestet (Novus Biological and Biotech, #FAB995R), valamint 1 μ M Ko143 (Sigma) ABCG2 inhibitort tartalmazó DMEM-re, amely bizonyos mintáknál 100 μ M biotint is tartalmazott. Az antitestet tartalmazó médiummal meghatározott ideig (1, 2 és 4 óra) inkubáltam tovább a sejteket 37 °C-on. Ezt követően a mintákat PBS-sel mostam, majd enyhe fixálást alkalmaztam 1%-os PFA-val (5 perc, szobahő). A biotinnal nem kezelt minták fixálását rend szerint az első biotinos minták fixálásával egy időben végeztem. A kíméletes fixálás az 5D3 antitest intracelluláris jelölésének megakadályozása végett történt, azonban megjegyzendő, hogy így a sejtek kevésbé eltarthatók, ezért a fixálást követően ezeket a mintákat azonnal mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá (10. ábra).



10. ábra: Protokoll a RUSH-ABCG2 sejtfelszíni 5D3 jelöléséhez. A transzjektált HeLa sejteket másnap 1 mg/ml Alexa Fluor 647 konjugált 5D3 antitestet és 1 μ M Ko143-at tartalmazó DMEM médiumban inkubáltam biotinos kezelés mellett (kék nyíl), vagy biotin nélkül (piros nyíl) 37 °C-on. A sejteket enyhe fixálásnak vettem alá a megadott időpontokban 1%-os PFA-t alkalmazva (lila villám).

4.9 RUSH-ABCG2-t kifejező minták kezelése, fixálása mikroszkópos vizsgálatokhoz

A HeLa sejteket 8-well IbidiT kamrára (Ibidi) ültettem ki 2 x 10⁴ sejt/well sejtszámmal, majd 24 óra tenyésztést követően transzjektáltam a RUSH-ABCG2 plazmid konstrukciókkal. Másnap a sejteket biotin nélküli, vagy 100 μ M biotint tartalmazó médiummal inkubáltam meghatározott ideig (1, 2 és 4 óra), majd a PBS-es mosási lépéseket követően 4%-os PFA-val fixáltam (5 perc, szobahő). A trafficking-et befolyásoló anyagok vizsgálatához a sejteket közvetlenül a transzekciót követően kezeltem 1 mM 4-PBA, 2 μ M MG132 és 10 nM BAF tartalmazó médiumokkal egy éjszakán át, majd másnap a sejteket biotin nélküli, vagy 100 μ M biotint tartalmazó médiummal inkubáltam további 4 órán keresztül. A mintákat ezt követően fixáltam 4%-os PFA-val (5 perc, szobahő). A biotinnal nem kezelt mintákat rend szerint az első biotinos minták fixálásával egy időben végeztem. Ezeknél a mintáknál nem alkalmaztam immunfestés, vagy más típusú jelöléseket, így ezekben az esetekben az ABCG2-t csupán a hozzá kapcsolt EGFP jel alapján detektáltam konfokális mikroszkóppal.

4.10 Mikroszkópos képalkotás

Vizsgálataimat Zeiss LSM 710 konfokális pásztázó fluoreszcens mikroszkóppal, Plan-Apochromat 40x (N.A. =1,4) olaj immerziós objektívvel végeztem. A különböző másodlagos jelöléseket, a fúziós partner és a markerek fluoreszcens jelét szekvenciálisan vettem fel az 3. táblázatban feltüntetett gerjesztési és detektálási paramétereknek megfelelően. Mikroszkópos felvételeimet a ZEN 2012 szoftver segítségével készítettem. Az MDCKII polarizáltatott sejtek 3D vizsgálatához Z-stack optikai képsorozatot készítettem 1 µm-es léptékkal és a szeletek közötti 0,5-0,5 µm-es átfedéssel. A sorozatfelvételeket végül a ZEN 2012 szoftver segítségével illesztettem egymásra.

3. táblázat: A mikroszkópos vizsgálatoknál használt fluoreszcens jelölések. A fluorofórok gerjesztési és detektálási paraméteri.

| másodlagos jelölés / fúziós marker / marker | gerjesztő lézer | detektálási tartomány |
|---|-----------------|-----------------------|
| DAPI | 405 nm | 420 - 500 nm |
| Alexa Fluor 488 | 488 nm | 500 - 540 nm |
| Alexa Fluor 594 | 543 nm | 560 nm → |
| GFP-tag | 488 nm | 500 -540 nm |
| ER-Tracker Red | 543 nm | 560 nm → |
| 5D3 konjugált Alexa Fluor 647 | 633 nm | 640 nm → |

4.11 Képanalízis és kolokalizációs mérés

A kolokalizációs mérésekhez a ABCG2 variánsokat (RUSH plazmid konstrukció) tranziensen kifejező HeLa sejtekről, minden mérési pontban 6-6 látómezőről készítettem konfokális felvételeket. Minden látómező átlagosan 15-20 transzfektált sejtet tartalmazott. A konfokális képeket ZEN 2012 szoftverrel elemeztem, mellyel a kolokalizációs koeficiens (CC) számítása az alábbi képlettel történt:

$$CC = \frac{\Sigma N_{G,kolokalizált}}{\Sigma N_{G,totál}}$$

ahol az $N_{G, \text{kolokalizált}}$ a kolokalizált pixelek számát jelöli (egyszerre zöld és piros), valamint $N_{G, \text{totál}}$ a teljes pixelszám, amely a zöld csatornában detektálható. A kolokalizációs koefficiens azért volt alkalmas a méréseim elemzéséhez, mert a Pearson's és Manders koefficiensekkel ellentétben ez az együththató nem veszi számításba a pixelintenzitásokat, csupán a pozitív pixelek számát. Ezzel tudtam kiküszöbölni a vad típusú és mutáns ABCG2 variánsok közötti expressziós különbségeket, mely a konfokális felvételeken markáns intenzitásbeli különbségként jelentkezett. A kolokalizációs koefficiens számításához az automatikus Costes-threshold módszert alkalmaztam a háttér intenzitás meghatározásánál.

4.12 Statisztika

A qPCR, Western blot és ATPáz méréseket három független párhuzamos kísérletben végeztem. Az egyes mérések közötti különbségeket az átlag standard hibájával jellemeztem. A kolokalizációs elemzéseket szintén három független párhuzamos kísérletben végeztem, melyeknél egy mérési paraméterben összesen 100-120 sejtet vizsgáltam párhuzamosonként. A kolokalizációs mérések közötti eltérések mértékét összevont standard szórással (SD pooled) határoztam meg Excel szoftverben. A statisztikai analíziseket Statistica 6.4 és Microsoft Excel szoftverrel végeztem. Az egyes mintákhoz tartozó eredményeket páros t-próbával hasonlítottam össze. Szignifikáns különbségeket állapítottam meg, ha: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ volt.

5. EREDMÉNYEK

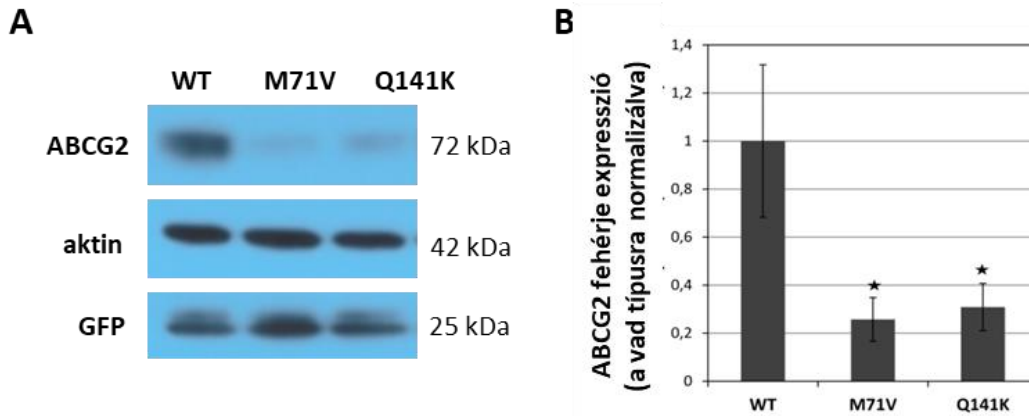
5.1 M71V: egy új ABCG2 variáns *in vitro* jellemzése

Dr. Sarkadi Balázs és munkatársai régóta foglalkoznak különböző transzmembrán transzporterek expressziós vizsgálatával humán vörösvértest mintákon. Munkájuk során találtak egy új természetes ABCG2 variánst, az M71V-t. Mivel eddig az ABCG2-M71V mutációt még nem írták le, ezért kooperációban a Sarkadi csoporttal szerettük volna *in vitro* körülmények között kísérletesen is jellemezni azt. Vizsgálatainkhoz többféle vektor konstrukciót is létrehoztunk: a címke nélküli formákhoz pcDNA3.1 és pIRES-GFP plazmidokat használtunk (mely utóbbi tartalmaz egy IRES – internal ribosomal entry site, belső riboszóma belépési hely – szekvenciát az ABCG2 fehérje és a GFP között), a fluorofórral címkézett (tagelt) változathoz pEGFP vektorba klónoztuk az ABCG2 változatokat, valamint a funkcionális ATPáz mérésekhez pAcUW-21-L vektorokat alkalmaztunk. Az ABCG2 vad típusú és M71V változatok mellett, egyes kísérleteinknél a K86M és Q141K variánsokat is vizsgáltuk kontrollként, összehasonlítás céljából (a K86M egy funkcionálisan inaktív mutáns, míg a Q141K változat működőképes, azonban jelentősen alacsonyabb fehérje expressziót eredményez).

5.1.1 ABCG2 fehérje expressziójának vizsgálata emlős sejtekben

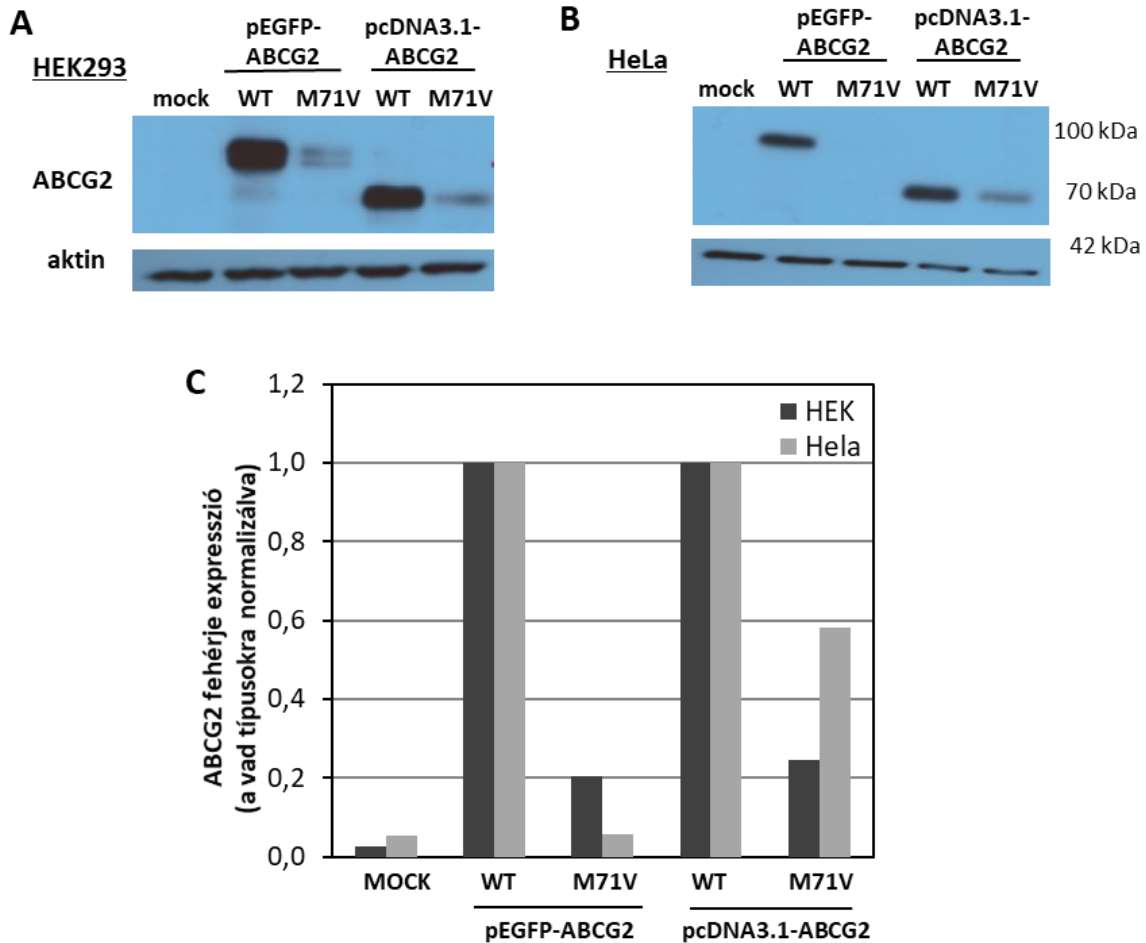
Az ABCG2 fehérje kifejeződését először pIRES-ABCG2-GFP konstrukciókkal transzfektált HEK293 sejtekben vizsgáltam. A transzfekeciót követő két nap elteltével fehérjemintákat preparáltam, majd Western blot technikát alkalmazva mértem a fehérje expressziós szinteket. A vad típusú ABCG2 megfelelően expresszálódott (a bloton a fehérje 72 kDa molekulatömegnél látható, mely a transzporter teljesen glikozilált alakjának felel meg a címke nélküli változat esetén). Ezzel szemben az M71V variáns kifejeződése sokkal alacsonyabb volt, a vad típusúhoz képest mindössze 20-40%-os expressziós szintet tapasztaltam. A kontrollként használt Q141K változat szintén csökkent expressziót mutatott

a vad típushoz képest. A kísérletekhez használt plazmid IRES-t követően tartalmazott egy GFP-t kódoló szekvenciát, mely így az ABCG2-től külön transzlálódik. A GFP fehérje expressziójában nem volt megfigyelhető számottevő eltérés a vad típusú és mutációt hordozó ABCG2 változatok között (11. ábra).



11. ábra: ABCG2 variánsok fehérje expressziós vizsgálata Western blot analízissel. (A) Repräsentatív immunoblot az ABCG2 variánsokat (WT: vad típus, M71V, Q141K, pIRES-GFP konstrukcióval) tranziensen kifejező HEK293 sejtekből. **(B)** Három független párhuzamos Western blot denzitometriás kiértékelése. Az eredmények a relatív expressziós szinteket ábrázolják a vad típushoz viszonyítva, az ABCG2 mennyiségeket az aktinra normalizáltam (hibázászló: az átlag standard hibája; t-próba: * $p < 0,05$, viszonyítva a WT-hez).

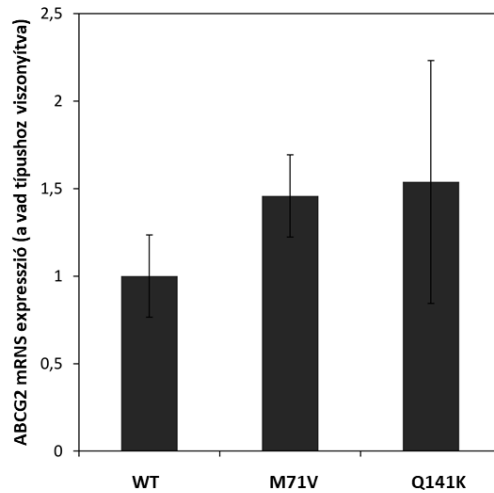
Ezt követően megvizsgáltam a címke nélküli (pcDNA3.1) és EGFP címkét tartalmazó vektorokról átíródó ABCG2 fehérje expressziós szinteket is HEK293 és HeLa sejtekben (tranziensen kifejezve). Ezekben az emlős sejtvonalakban is az M71V mutáns esetében szintén jelentősen alacsonyabb fehérje expresszió volt megfigyelhető a vad típushoz képest mindkét típusú plazmid esetében (12. ábra).



12. ábra: Különböző típusú ABCG2 konstrukciók Western blot analízise emlős sejtvonalkban. Fehérje expressziós vizsgálat az ABCG2 vad típusú (WT) és M71V variánsokat transziensen kifejező HEK293 (A) és HeLa (B) sejtpreparátumokból (pEGFP és pcDNA3.1 konstrukciókkal transzfektálva). (C) A blotok denzitometriás kiértékelése, aktinra normalizálva. Az eredmények a relatív expressziós szinteket mutatják, viszonyítva a vad típushoz képest.

5.1.2 ABCG2 variánsok tranziens expressziójának ellenőrzése qPCR-rel

Annak érdekében, hogy ellenőrizzem, hogy az eltérő fehérje expressziós szinteket esetleg a mutációt hordozó változatokról átíródó alacsonyabb mRNS szintje eredményezi-e, a pIRES-ABCG2-GFP plazmidokkal transzfektált HEK293 sejtekből RNS-t preparáltam (két nappal a transzfekciót követően), majd kvantitatív qPCR segítségével vizsgáltam az ABCG2 mRNS szinteket. A kapott eredményekből megállapítható, hogy az ABCG2 vad típusú és SNP-t hordozó variánsai mRNS expresszió tekintetében nem mutattak szignifikáns különbséget (és semmiképpen sem alacsonyabb mRNS kifejeződést) a kísérletekhez használt pIRES vektorok esetében (13. ábra)

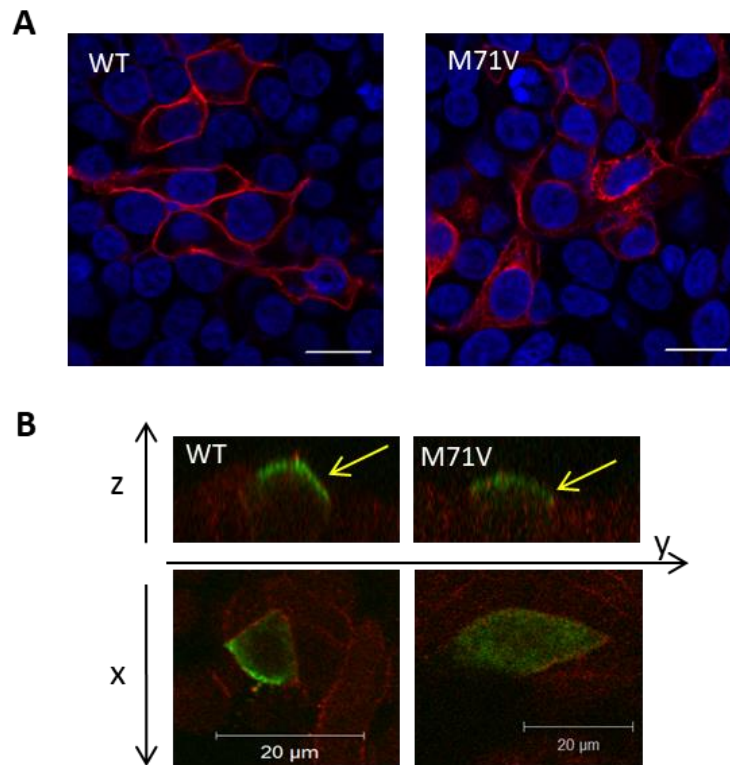


13. ábra: ABCG2 mRNS expresszió mérése. pIRES-ABCG2 konstrukciókkal transzfektált HEK293 sejtekben 48 óra elteltével qPCR-el vizsgáltam az ABCG2 vad típusú, M71V és Q141K változatok mRNS szintjét. Az expressziós szintek egy belső referencia génhez (RPLP0, riboszomális fehérje P0) és a vad típusú ABCG2 szintjéhez normalizáltam (n=3; hibazászló: az átlag standard hibája).

5.1.3 M71V variáns lokalizációjának vizsgálata emlős sejtekben

Az ABCG2 transzporter sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatát konfokális mikroszkóppal végeztem. A kísérletekhez a fehérje változatokat (vad típus és M71V) tranziensen kifejező HEK293 sejteket használtam (pcDNA3.1 plazmid konstrukciókkal), melyeket a transzfekciót követő második napon fixáltam és Bxp-21, egy ABCG2-specifikus antitesttel immunfluoreszcens festést alkalmaztam. Az 14. ábra A paneljén látható, hogy míg a vad típusú fehérje a sejtek plazmamembránjában lokalizál, addig az M71V variáns kisebb mértékű sejt felszíni elhelyezkedést mutat, ugyanakkor megfigyelhető a mutáns fehérje intracelluláris felhalmozódása is.

A következőkben kíváncsi voltam, hogy az M71V esetében esetleg tapasztalható-e membrán szegmens orientáció (ugyanis, mint ismert a vad típusú ABCG2 polarizált sejtekben az apikális membránban található). Ezekhez a mérésekhez MDCKII sejteket polarizáltam és transzfektáltam Snapswell-en (lásd Módszerek), majd immunfluoreszcens jelölést alkalmaztam, melyhez az ABCG2-t Bxp-21 antitesttel jelöltem, valamint a bazolaterális membránt Na^+/K^+ -ATPáz elleni specifikus antitesttel festettem. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltam és Z-stack felvételeket készítettem. E mérés eredményeként azt találtam, hogy mind a vad típusú ABCG2, mind az M71V variáns megfelelő, apikális lokalizációt mutat, habár a mutáns változatnál az immunfluoreszcens jel alacsonyabb intenzitással volt megfigyelhető (14. ábra B).



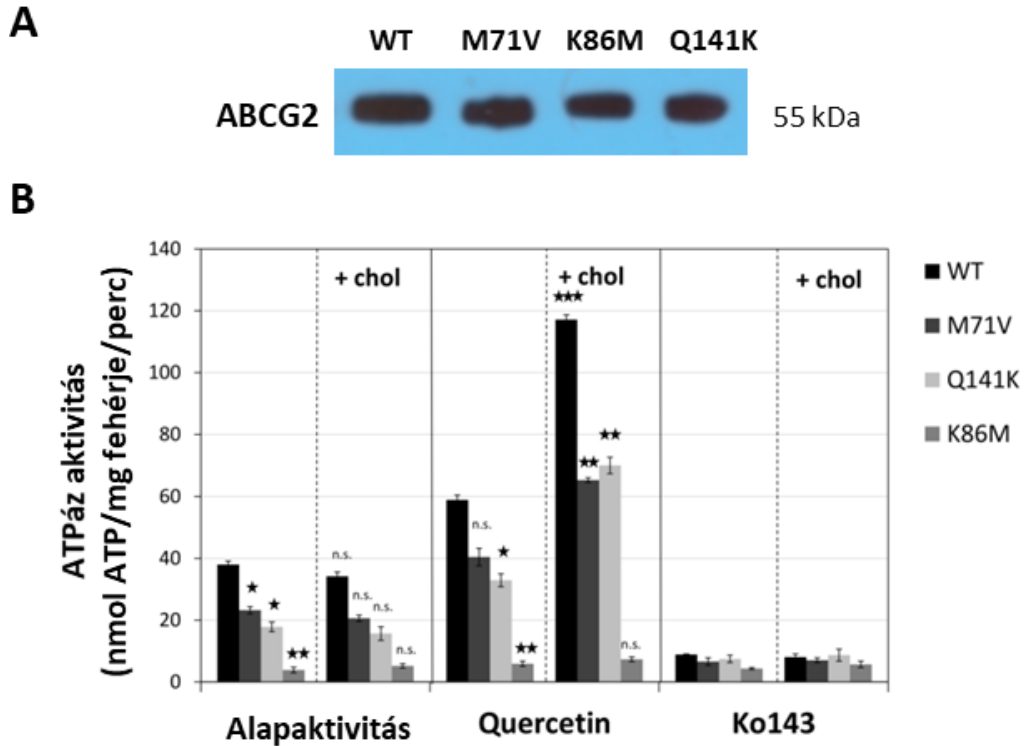
14. ábra: ABCG2-M71V variáns lokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkóppal.

(A) Az ABCG2 vad típusú és M71V változat transziensen kifejező HEK293 sejtekben. Immunfestés során az ABCG2-t Bxp-21 ellenanyaggal (piros), a sejtmagokat DAPI-val jelöltem (kék). Méretarány: 20 μm . (B) ABCG2 vad típusú és M71V változat polarizáltatott MDCKII sejtekben. Immunfestés során az ABCG2-t Bxp-21 ellenanyaggal (zöld), a bazolaterális membránt pedig anti- Na^+/K^+ -ATPáz-ra specifikus ellenanyaggal (piros) jelöltem. A sárga nyilak az apikális membránra mutatnak.

5.1.4 ABCG2 variánsok funkcionális vizsgálata Sf9 membránpreparátumokon

Az ABCG2-M71V funkcionális méréséhez különböző ABCG2 variánsokat bakulovírus-Sf9 rovarsejt-rendszerben expresszáltattam. Az Sf9 sejtekből membránpreparátumot készítettem és ezeken végeztem ATPáz aktivitás mérést a transzporter működőképességének tesztelésére. A mérésekhez azonos mennyiségű ABCG2 fehérjét tartalmazó membrán preparátumot használtam, melyek ABCG2 fehérje mennyiségét

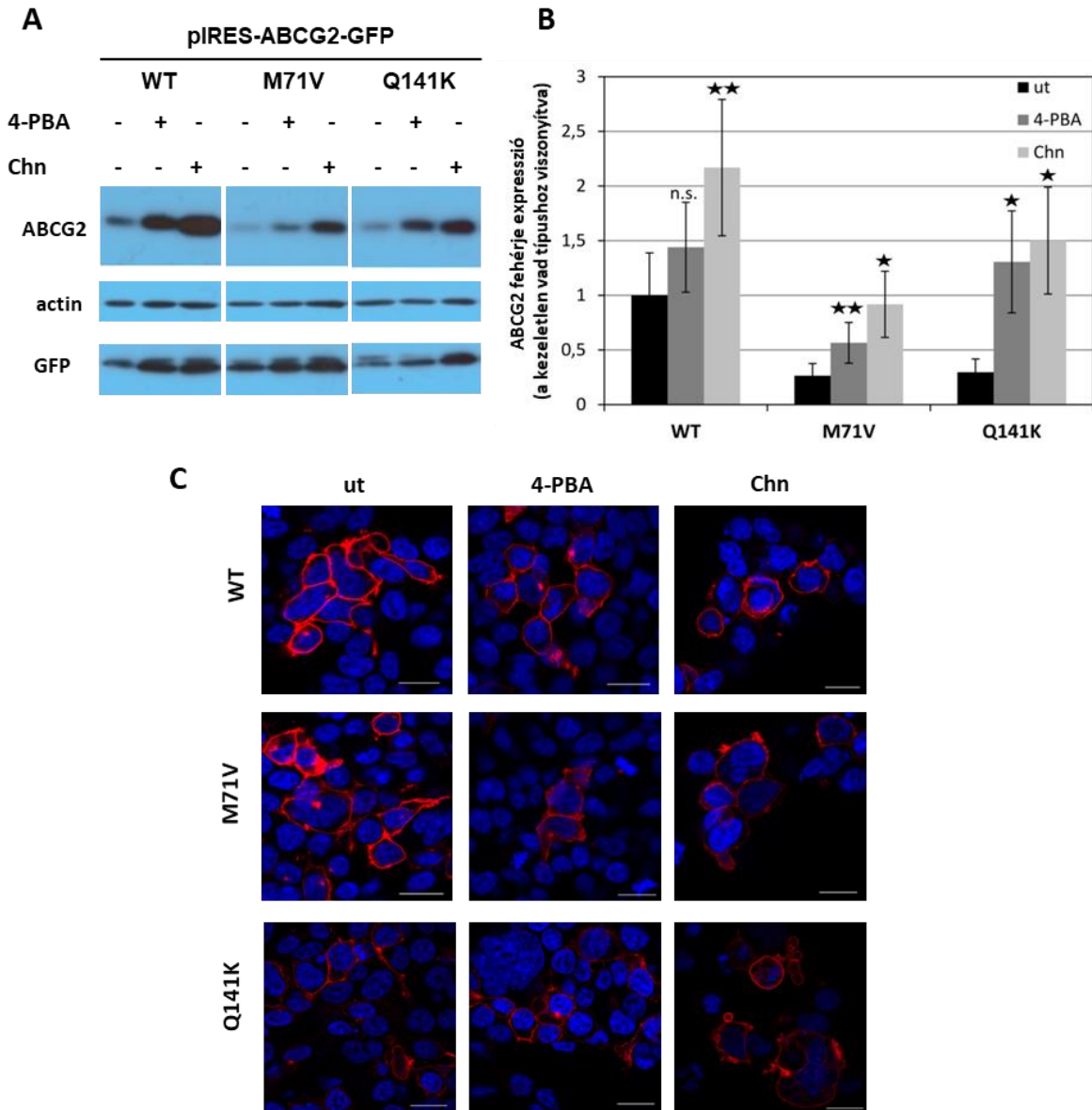
a kísérleteket megelőzően Western bloton állítottam be és ellenőriztem (15. ábra A). Mivel a humán ABC fehérjéket az Sf9 rovarsejtek „core”- glikozilált formában expresszálják, ezért az ABCG2 a Western bloton 55 kDa magasságban figyelhető meg (159). A funkcionális kísérleteknél az alapaktivitás mellett ABCG2 szubsztrát (quercetin) által indukált ATPáz aktivitást is vizsgáltam, melyek eredményeként megfigyelhető volt, hogy mind az M71V, mind a Q141K változat jelentős ATPáz aktivitással rendelkezik, bár ezen értékek valamivel alacsonyabbak, mint a vad típus esetében. A K86M (katalitikusan inaktív mutáns) esetében, melyet negatív kontrollnak összehasonlításként alkalmaztam nem volt megfigyelhető ATPáz aktivitás. Korábbi publikációk alapján ismert, hogy koleszterinnel töltött Sf9 membránok szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitása megnő a vad típusú ABCG2 esetében (163), melyet az M71V és a Q141K variánsokat expresszáló koleszterinnel töltött membránok esetében is sikerült kimutatnom quercetin stimuláló szubsztrát jelenlétében. Specifikus ABCG2 inhibitor, Ko143 kezelés hatására azonban az ATPáz aktivitás egyik minta esetében sem volt megfigyelhető (15. ábra B).



15. ábra: ABCG2 variánsok ATPáz aktivitásának vizsgálata bakulovírus-Sf9 rendszerben. (A) Az ATPáz méréshez használt Sf9 membránpreparátumok azonos ABCG2 fehérje tartalma Western bloton ellenőrizve. (B) Az ABCG2 variánsok ATPáz aktivitása kezeletlen mintákon (alapaktivitás), aktiváló szubsztát (10 μ M quercetin), vagy specifikus inhibitor (5 μ M Ko143) jelenlétében, koleszterinnel töltött (+chol), vagy a nélküli membránpreparátumokon (n=3; hibaszó: az átlag standard hibája; t-próba: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). A statisztikai számolás során a bal oldali oszlopoknál (koleszterin nélküli minták) a mutáns variánsokat hasonlítottam össze a vad típusú mintákkal. míg a jobb oldali oszlopoknál (+chol) a koleszterinnel kezelt mintákat hasonlítottam a variánsnak megfelelő kezeletlen mintákhoz.

5.1.5 Farmakológiai kismolekulák hatása az ABCG2 variánsokra

Végezetül az M71V mutánsnál felmerült a kérdés, hogy esetlegesen valamilyen farmakológiai korrekttal lehet-e javítani a fehérje expressziójának és helyes lokalizációjának a mértékét. Ezért két anyag hatását teszteltem: a 4-fenilbutirátét (4-PBA), mely kémiai chaperonként működik a nem megfelelően feltekeredett fehérjék esetében és a kolhicinét (Chn), melyet a köszvény kezelésében is széleskörűen alkalmaznak. A kísérletekhez a pIRES-ABCG2-GFP konstrukciókkal transzfektált HEK293 sejteket 24 órán át kezeltem 1 mM 4-PBA-val vagy 1 μ M kolhicinnel. Majd ezt követően Western bloton vizsgáltam az ABCG2 fehérje mennyiségét és azt tapasztaltam, hogy a 4-PBA kezelés szignifikánsan emelte a mutációt hordozó változatok fehérje expresszióját, míg a kolhicin kezelés esetében minden variánsnál szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a fehérje termelés tekintetében (16. ábra A és B). Hasonló kezeléseket követően fixált mintákon immunfestést végeztem, melyeket aztán konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. A kapott eredményekből nem állapítható meg egyértelműen, hogy a 4-PBA és a kolhicin kezelések jelentős mértékben befolyásolták-e a plazmamembrán lokalizációt az ABCG2 variánsok esetében (16. ábra C).

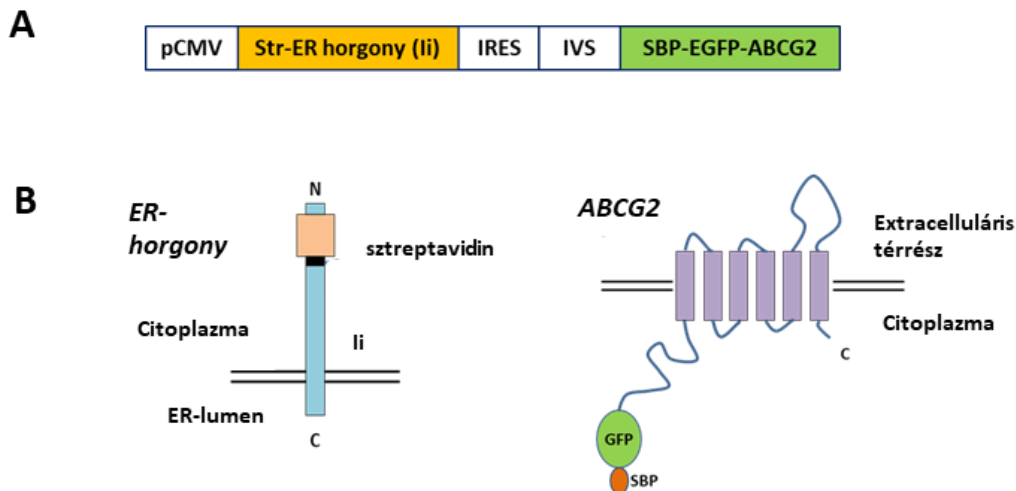


16. ábra: 4-PBA és kolhicin hatásának vizsgálata az ABCG2 fehérje expressziójára és lokalizációjára. (A) ABCG2 variánsok fehérje expressziójának meghatározása Western blot technikával 24 órás 4-fenilbutirát (4-PBA, 1 mM), illetve kolhicin (Chn, 1 μ M) kezelést követően HEK293 sejtekben. (B) A relatív fehérje expressziós szintek átlaga három független kísérletből a kezeletlen vad típusú mintára normalizálva (hibázászló: az átlag standard hibája; t-próba: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (C) Az ABCG2 változatok lokalizációjának vizsgálata a fentiekkel megegyező kezeléseket követően HEK293 sejtekben. Immunfestés során az ABCG2-t Bxp-21 ellenanyaggal (piros), a sejtmagot DAPI-val (kék) jelöltem. Méretarány: 20 μ m.

5.2 Az ABCG2 trafficking-jének nyomában

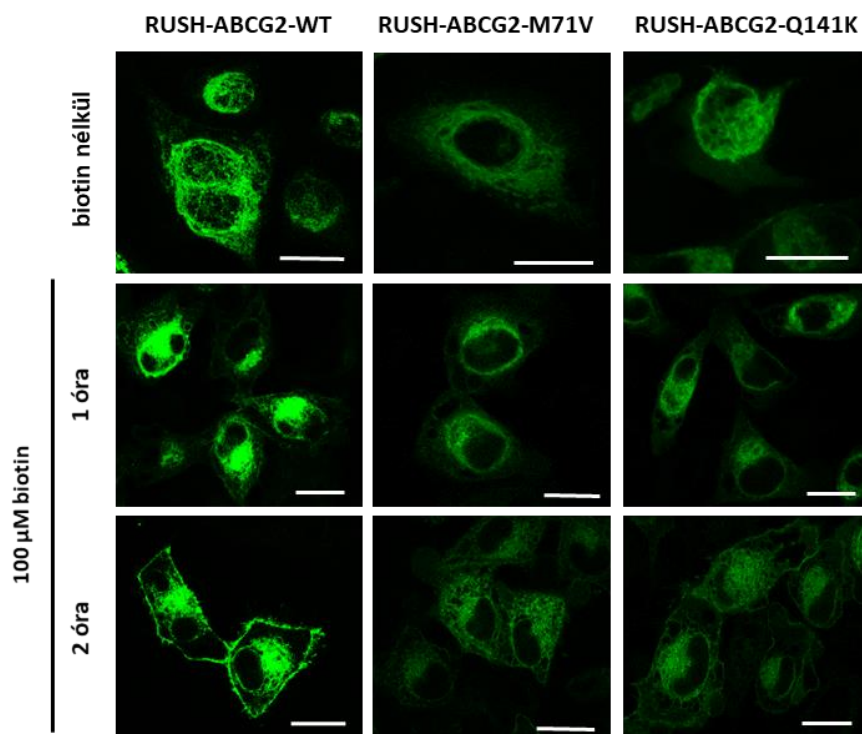
5.2.1 A RUSH-ABCG2 konstrukciók létrehozása és tesztelése

Az ABCG2 transzporter sejten belüli útját és kihelyeződését a plazmamembránba a RUSH rendszerben vizsgáltam (lásd Módszerek) (162). Korábbról ismert, hogy az ABCG2 N-terminális végén megbízhatóan címkézhető különböző fluoreszcens tagekkel, annak jelenléte nem befolyásolja a fehérje aktivitását és lokalizációját, így olyan konstrukciót terveztem, ahol a SBP-EGFP az ABCG2 N-terminális végén van. A transzporter úgy helyezkedik el a különféle membránokban (ER, vezikula, vagy plazmamembrán), hogy N-terminális vége a citoplazmába nyúlik, ezért egy olyan horgony fehérjét kellett választanom, ahol a Str domén szintén a citoplazma felé néz. Vizsgálataimhoz a fenti szempontok alapján Ii (invariant chain, invariáns lánc) ER horgonyt tartalmazó plazmid-konstrukciókat hoztam létre, melyben a riporter helyen ABCG2 változatok szerepeltek (vad típus, M71V és Q141K) (17. ábra).



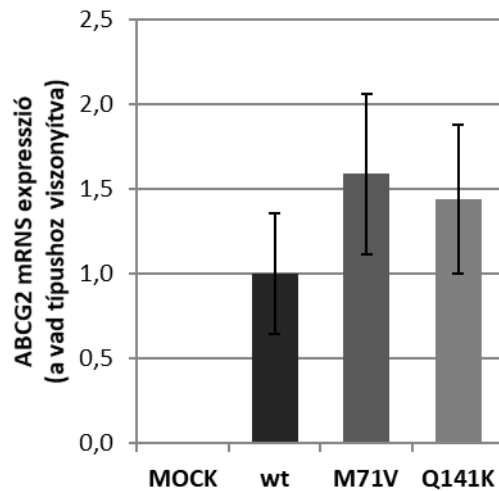
17. ábra: A RUSH-ABCG2 rendszer elemei. (A) RUSH konstrukció felépítése: CMV promóter (pCMV), ER horgony fehérje (szterptavidin-Ii), IRES (internal ribosomal entry site, belső riboszóma belépési hely), IVS (intervening sequence, mesterséges intron), SBP-EGFP-ABCG2 riporter. (B) Az ER horgony és az ABCG2 fehérje sematikus ábrája.

Annak érdekében, hogy teszteljem a RUSH konstrukcióim megfelelő működését, HeLa sejteket transzfektáltam a plazmidokkal, majd másnap konfokális mikroszkóppal vizsgáltam az ABCG2 lokalizációját a hozzá kapcsolt EGFP fluoreszcencia jele alapján. Az ABCG2 fehérje ER-ből történő felszabadításához 100 μ M biotint tartalmazó kezelést alkalmaztam. Az ABCG2 szubsztrátjai közé tartozik a H-vitamin (biotin) is, ezért előzetesen több biotin koncentrációt is kipróbáltam (40, 60, 100 μ M), melyeknél a fehérje ER-ből történő felszabadulás minden esetben sikeresen működött (az adatok nem kerülnek bemutatásra), azonban végül a RUSH szabadalom által megadott maximális 100 μ M-os dózist alkalmaztam a kísérleteimben (164). A biotinnal nem kezelt minták esetében az ABCG2 fehérje hatékony ER-ben történő visszatartása volt megfigyelhető. Az ABCG2 variánsok biotin hozzáadása után 1 óra elteltével túlnyomórészt perinukleárisan (feltehetően a Golgi-komplexben) voltak láthatók. A vad típus esetében 2 óra elteltével megfigyelhető volt a sejtfelszíni lokalizáció. Ezzel szemben az M71V és Q141K variánsok nagyrész intracellulárisan voltak megtalálhatók 2 óra elteltével is, és csak kevés fehérje volt látható a periférián. A mutációt hordozó változatok a korábbi eredményeknek megfelelően ebben a rendszerben is alacsonyabb fluoreszcencia intenzitást mutattak, mely az alacsonyabb fehérje expressziós szint következménye (18. ábra).



18. ábra: A RUSH-ABCG2 rendszer tesztelése. RUSH-ABCG2 konstrukciókkal transzfektált HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvétele: biotin kezelés nélkül, illetve 1 és 2 órás biotin kezelés után. Az ABCG2 fehérje detektálása a hozzá kapcsolt EGFP fluoreszcencia jele alapján történt (zöld). A mintákat fixálást követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Méretarány: 20 μm.

Annak érdekében, hogy ellenőrizzem a RUSH vektorokról expresszálódó ABCG2 variánsok mRNS szintjét, qPCR analízist végeztem, mellyel nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a vad típusú és a mutáns ABCG2 változatok között az mRNS kifejeződésének tekintetében (19. ábra).

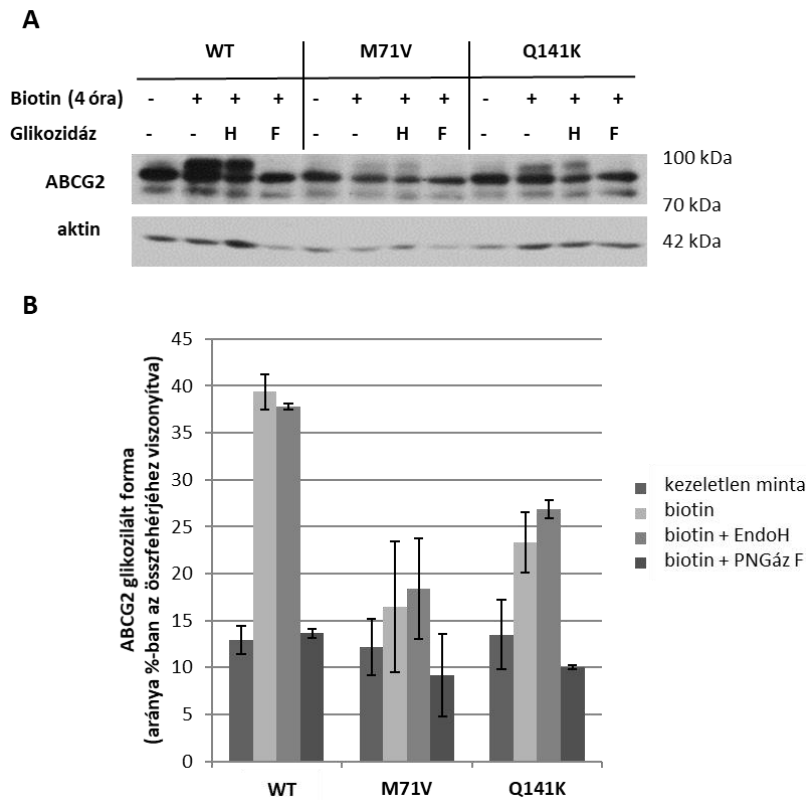


19. ábra: RUSH-ABCG2 variánsok mRNS expressziós szintje. HeLa sejtekben, transzfekciót követően (24 óra) mértem a RUSH konstrukciókról expresszázó ABCG2 variánsok mRNS szintjét qPCR segítségével. Az expressziós szinteket egy belső referencia génhez (RPLP0, riboszomális fehérje P0) és a vad típusú ABCG2 szintjéhez normalizáltam (n=3; hibaszó: az átlag standard hibája).

5.2.2 Az ABCG2 fehérjék N-glikozilációjának és expressziójának vizsgálata a RUSH rendszerben

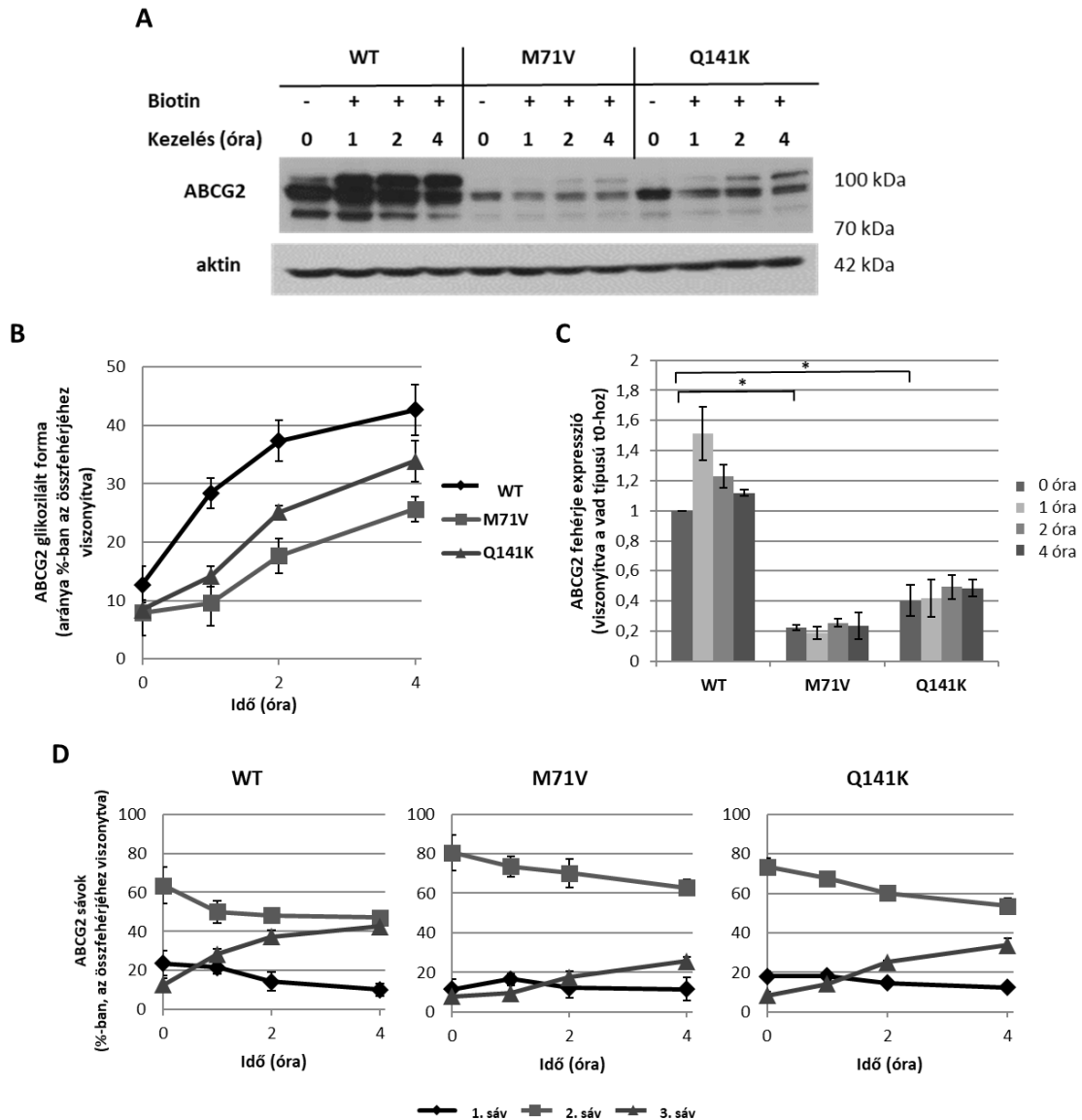
A RUSH plazmidokról kifejeződő ABCG2 fehérjék mennyiségét Western blot technikával határoztam meg, mely a kísérletekhez transzfektált HeLa sejtizátumokat használtam. Az első mérésektől kezdve megfigyelhető volt a blotokon, hogy a biotinnal nem kezelt minták esetében kettő, míg biotinnal kezelt fehérjeminták esetében három markáns sávot jelenít meg a Bxp-21 antitest (specifikus ABCG2 ellenanyag). A három fehérjesáv alaposabb vizsgálatához a mintákat EndoH és PNGáz F glikozidáz enzimekkel kezeltem, hogy az ABCG2 N-glikozilált formájának megfelelő sávot azonosítsam. Az enzimes emésztéshez használt sejtizátumokat, előzetesen 4 órán át biotinnal kezelt, az ABCG2 variánsokat tranziensen expresszázó HeLa sejtekből izoláltam (ugyanis az ily módon kezelt mintáknál a vad típusú és mutáns variánsok esetében is megtalálható volt a három különálló sáv). Amint az 20. ábrán A paneljén látható, a PNGáz F enzimes kezelés hatására a legfelső

(3.) sáv eltűnt, míg az EndoH-val emésztett mintáknál mind a három különböző molekulatömegű sáv megmaradt. A biotinnal nem kezelt mintáknál a két alsó sáv volt látható. A denzitometriás kiértékelés során a három sávot külön-külön értékeltem ki, majd a felső sávot az összfehérjéhez (a három sáv feketedésének összegéhez) viszonyítottam (20. ábra B). A vad típus esetében a biotin nélküli (kezeletlen) mintákban a felső sáv aránya 10-15% volt, míg a biotinnal kezelt sejtekből származó mintáknál ez az arány 40% volt. Az EndoH kezelés hatására nem volt megfigyelhető változás (a felső sáv aránya változatlanul 40% körüli értéket mutatott), azonban a PNGáz F enzim esztés hatására a felső sáv aránya ismét 10-15% volt az összfehérjéhez képest. Ezek alapján az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a harmadik (legfelső) sáv az ABCG2 fehérje érett, teljesen glikozilált formája.



20. ábra: RUSH-ABCG2 variánsok N-glikozilációjának tesztelése. Az ABCG2 változatokat expresszáló HeLa sejteket biotin nélküli, vagy 4 órás biotinos inkubáció után izoláltam és a 4 órás biotinos fehérjepreparátumokat EndoH (H) és PNGáz F (F) glikozidáz enzimekkel kezeltem. **(A)** Reprezentatív Western blot. **(B)** Az ABCG2 fehérje glikozilált formájának aránya az összfehérjéhez képest (n=3; hibaszázl: az átlag standard hibája).

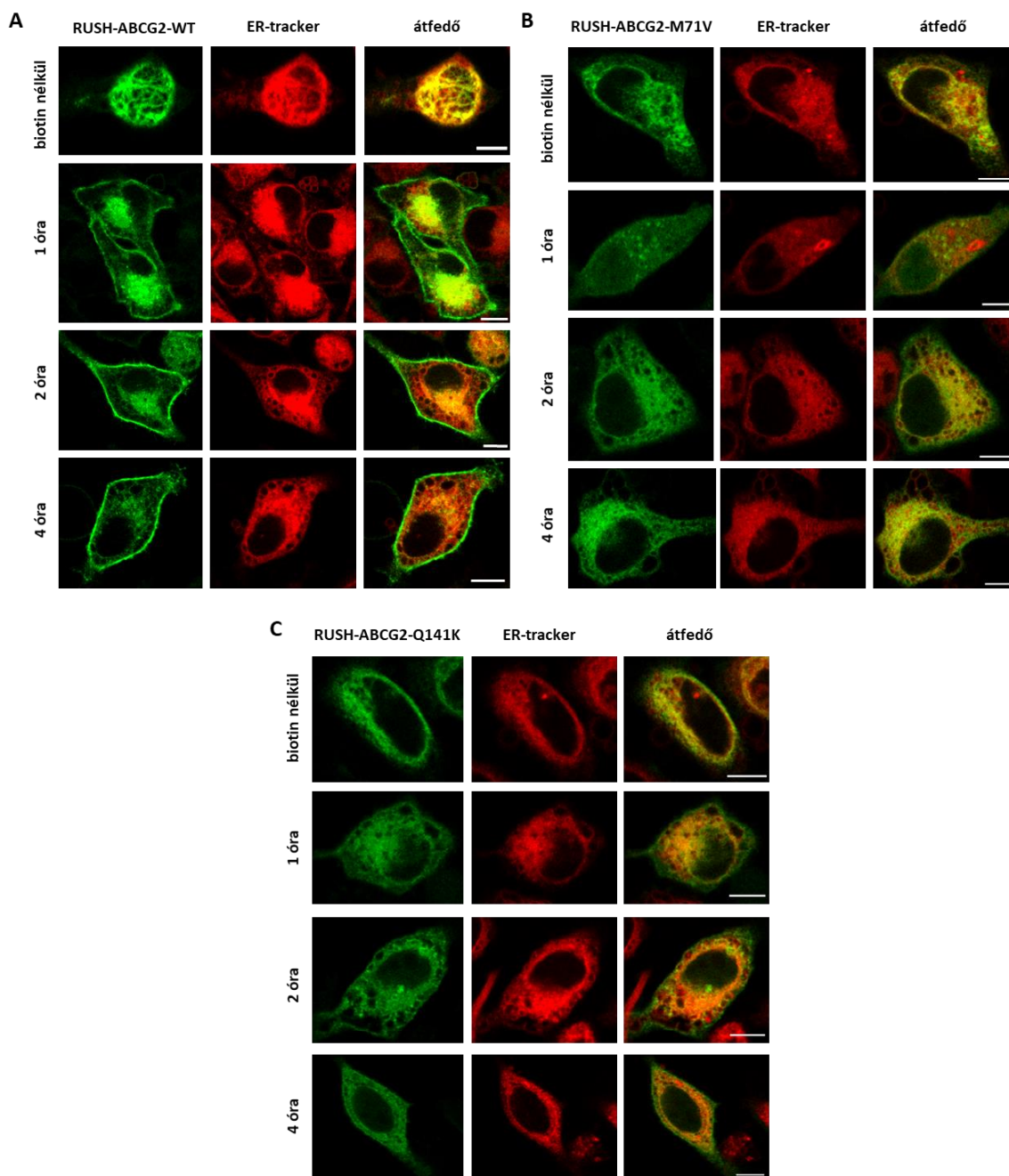
Ezek után feltételeztem, hogy az ABCG2 fehérje érését/glikozilációját, mely az ER-ben kezdődik, majd a Golgi-ban fejeződik be a RUSH rendszer segítségével vizsgálni lehet. A kísérletekhez biotinnal nem kezelt, valamint 1, 2 és 4 óráig biotinnal inkubált mintákat Western blottal analizáltam (21. ábra A). A vad típusú ABCG2-nél a biotinnal kezelt mintáknál a fehérje glikozilált formája (felső sáv) már az 1 órás biotin kezelés után határozottan megjelent, míg az M71V és Q141K variánsok esetében az érett fehérjeforma a hosszabb (2, 4 órás) biotinnal való inkubáció után volt csak megfigyelhető (21. ábra B). Összességében a RUSH plazmidokról expresszálo ABCG2 összfehérje mennyisége az M71V és a Q141K mutánsok esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típushoz képest (21. ábra C). Továbbá azt is megfigyeltem, hogy a legalsó, 1. sáv mennyisége idővel fokozatosan csökkent a biotinnal kezelt mintáknál, ez különösen a vad típus esetében volt látványos (21. ábra D).



21. ábra: ABCG2 variánsok fehérje érésének és expressziójának analízise. (A) RUSH-ABCG2 konstrukciókat kifejező HeLa mintákból származó reprezentatív Western blot, ahol a sejteket előzetesen biotin nélküli, vagy 100 μ M biotint tartalmazó médiummal kezeltem meghatározott ideig (1, 2 és 4 óra). **(B)** Az ABCG2 fehérjék glikozilált formájának aránya az összfehérjéhez képest, különböző ideig tartó biotin kezeléseket követően. **(C)** Az ABCG2 változatok összfehérje expressziója különböző biotin kezeléseket során. **(D)** A Western blotokon detektálható ABCG2 sávok (1. alsó, 2. középső, 3. felső sáv) arányainak változása az ER-ből történő felszabadulást követően. A diagramok három független kísérlet denzitometriás kiértékelését mutatják (hibaszó: az átlag standard hibája; t-próba: * $p < 0,05$).

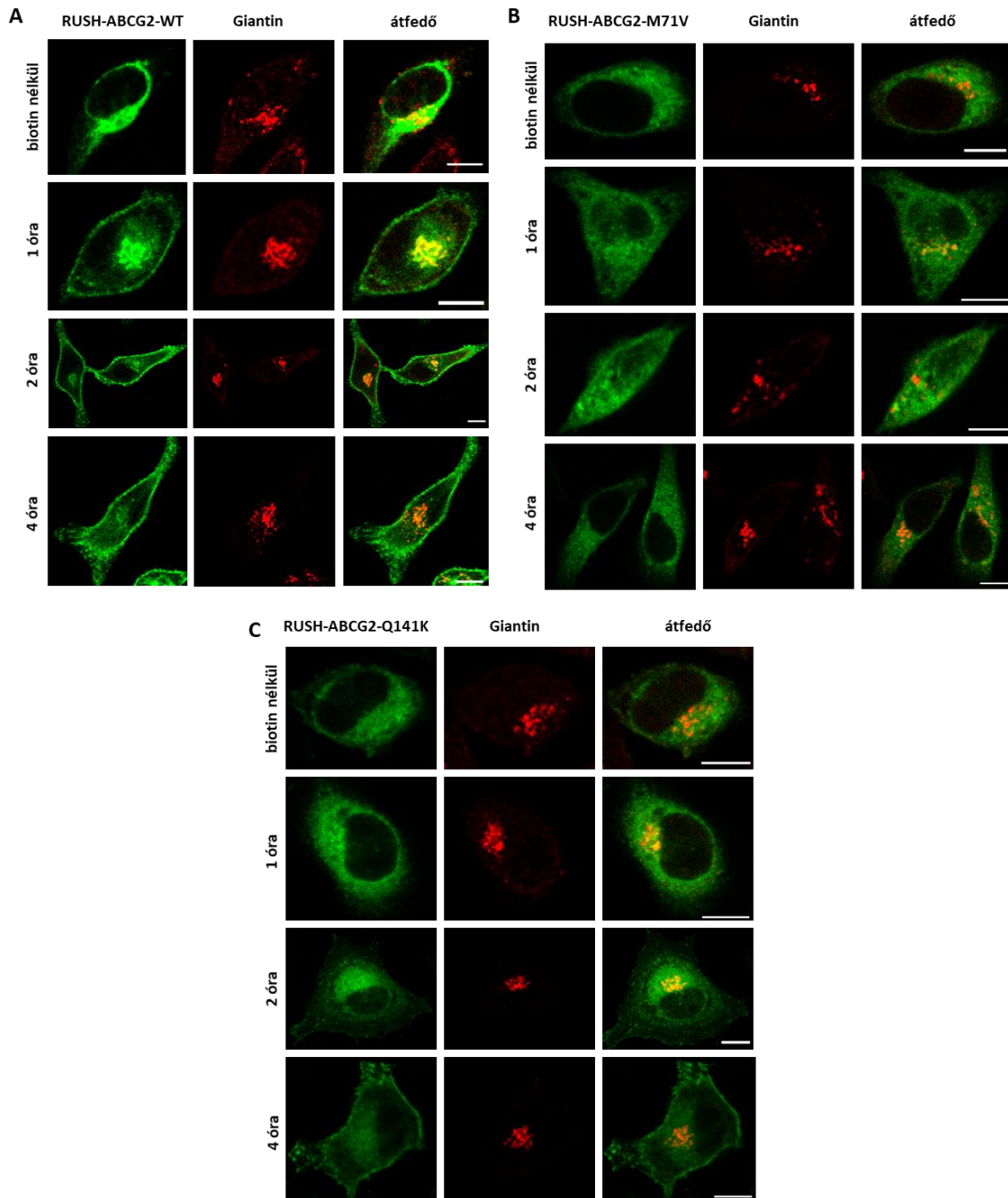
5.2.3 ABCG2 variánsok sejten belüli útjának vizsgálata

Az ABCG2 transzporter sejten belüli útjának monitorozásához különböző sejt-kompartment markereket alkalmaztam. A RUSH-ABCG2 konstrukciókkal transzfektált HeLa sejteket biotin nélkül, illetve biotint tartalmazó médiummal különböző ideig inkubáltam (1, 2 és 4 óra), majd az adott festésnek megfelelő módszerrel fixálás előtt, vagy fixálás után jelöltem a sejteket. A fehérje endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulásának vizsgálatához ER-Tracker Red fluoreszcens festéket használtam, mellyel az élő sejteket jelöltem (lásd Módszerek), majd fixálást követően konfokális mikroszkóppal értékeltem az ABCG2 variánsok sejtszintű lokalizációját. Amint, az 22. ábrán is látható a biotin nélküli minták (vad típus, M71V és Q141K) nagymértékű kolokalizációt mutattak az ER markerrel. Biotin hozzáadása után a vad típusú ABCG2 esetében megfigyelhető volt, hogy a fehérje ER-Trackerrel való kolokalizációja fokozatosan csökken (22. ábra A). Az M71V és Q141K esetében nem volt tapasztalható a vad típusnál észlelt látványos eltérés a biotin nélküli és a biotinnal kezelt minták esetében, a mutációt hordozó variánsok biotin kezelést követően is nagyrészt intracellulárisan voltak megfigyelhetők (22. ábra B és C).



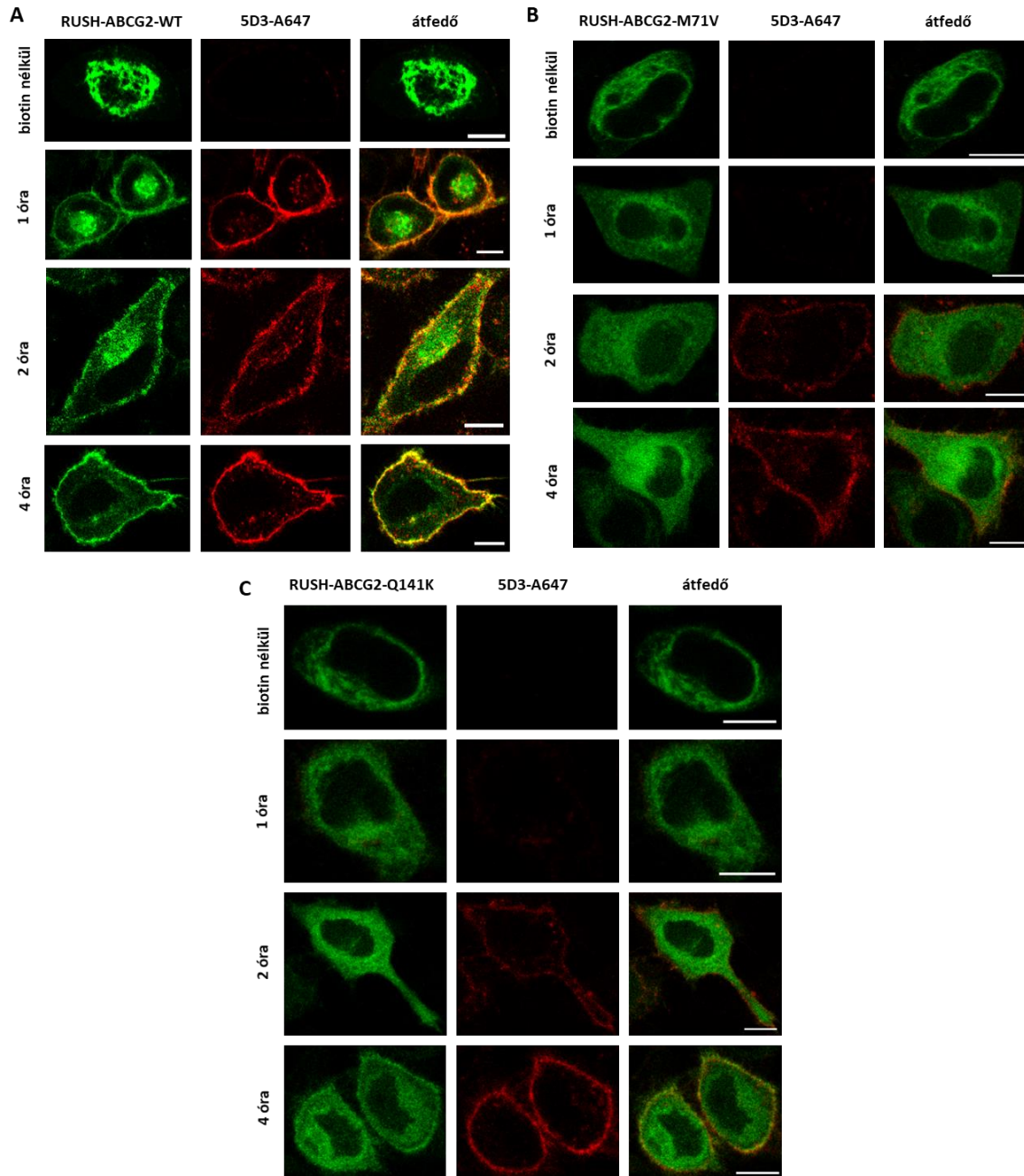
22. ábra: ABCG2 sejten belüli útvonalának vizsgálata ER marker mellett. A vad típusú (A), az M71V (B) és a Q141K (C) ABCG2 variánsokat tranziensen kifejező (RUSH plazmid konstrukció) HeLa sejteket biotin nélküli, illetve biotint tartalmazó médiummal kezeltem (1, 2 és 4 óra). Az endoplazmatikus retikulumot ER-Tracker Red markerrel jelöltem (piros), az ABCG2 fehérje detektálása a hozzá kapcsolt EGFP fluoreszcencia jele alapján történt (zöld). A mintákat fixálást követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Méretarány: 10 μm .

A fehérje Golgi-komplexhez való elérésének és azon történő áthaladásának vizsgálatához az ABCG2 variánsokat tranziensen expresszáló HeLa sejteket 100 μ M biotinnal kezeltem, majd adott időpontban (1, 2 és 4 óra) fixáltam a mintákat és immunfestést végeztem. A minták jelöléséhez specifikus Golgi markerként Giantin elleni ellenanyagot használtam, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltam a kettős jelölést mutató sejteket. A biotinnal nem kezelt mintáknál az ABCG2 EGFP jele és a Golgi marker között nem volt megfigyelhető átfedés, azonban biotin hozzáadása után 1 óra elteltével a vad típusú ABCG2 és az anti-Giantin ellenanyag kolokalizációt mutatott. A hosszabb ideig kezelt minták esetében (2 és 4 óra) kolokalizáció a két jel között már kisebb arányban volt tapasztalható, mely arra utal, hogy a transzporter trafficking-je során áthaladt a Golgi kompartmenten (23. ábra A). Az M71V és Q141K esetében a nagyfokú intracelluláris stagnálás miatt ilyen dinamikus változás a Golgi markerrel végzett vizsgálatoknál sem volt megfigyelhető (23. ábra B és C). Az alacsonyan expresszáló és nem megfelelően elhelyezkedő fehérjék mozgásának ilyen mértékű változásai csupán szoftveres analízist követően elemezhető.



23. ábra: ABCG2 sejten belüli útvonalának vizsgálata Golgi marker mellett. A vad típusú (A), az M71V (B) és a Q141K (C) ABCG2 variánsokat tranziensen kifejező (RUSH plazmid konstrukció) HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvételei biotin nélkül, illetve biotinnal történő kezelés után (1, 2 és 4 óra). A fixált mintákon immunfestés során Giantin elleni antitesttel jelöltem a Golgi-komplexet (piros). Az ABCG2 fehérje detektálása a hozzá kapcsolt EGFP fluoreszcencia jele alapján történt (zöld). Méretarány: 10 μ m.

ABCG2 fehérjék plazmamembránba való kihelyeződésének vizsgálatához első megközelítésben valamilyen plazmamembrán markert kívántam alkalmazni. Ehhez több lehetséges jelölést is teszteltem: WGA (wheat germ agglutinin, búzacsíra-agglutinin; ez a lektin típusú fehérje glükokonjugátumok, pl.: N-acetil-glükózamin, vagy N-acetil-neuraminsav kimutatására alkalmas, így széles körben alkalmazzák sejtmembránok jelölésére) immunfestésével, valamint fluorofórral címkézett GPI (glycophosphatidylinositol anchor, glikofoszfátidil-inozitol horgony; a plazmamembrán extracelluláris oldalán található fehérje) tranziens expresszáltatásával. Azonban ezek a markerek nem voltak alkalmasak kizárólagosan a sejt felszín membránjának a jelölésére, mivel a WGA a sejten belül más membrán típusokban is megtalálható, valamint a *de novo* szintetizálódó GPI intracellulárisan is jelentős mennyiségben megfigyelhető volt (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Ezt követően, olyan technikát kerestem, ami alkalmas lehet az ABCG2 fehérje plazmamembránban való megjelenésének specifikus detektálására. Áramlási citometriás vizsgálatokban régóta rutinszerűen alkalmazzák az 5D3 antitestet az ABCG2 sejt felszíni jelölésére (165). Az ellenanyag a fehérjét konformációspecifikus állapotban (melyet Ko143 inhibitorral érnek el) egy extracelluláris loop-ján ismeri fel és a minták permeabilizálása nélkül a sejt felszínen lévő ABCG2 mennyiségi kimutatására szolgál (166,167). A saját kísérleteimhez ezt a technikát igyekeztem átültetni és továbbfejleszteni, hogy a mikroszkópos analízisemhez is alkalmazható legyen a RUSH rendszerben. A mérésekhez Alexa Fluor 647 fluoreszcens festékkel konjugált 5D3 antitestet használtam, melyet a kezelő médiummal (biotin nélkül, vagy biotinnal, + Ko143) adtam a sejtekhez, majd a meghatározott inkubációs időket követően mostam és enyhén fixáltam a mintákat és konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettem. Ezzel a módszerrel sikerült jelölni az ABCG2 fehérjék azon részét, amely az ER-ből felszabadulva kijutott a plazmamembránba. Az 24. ábra reprezentatív felvételein látható, hogy a biotinnal nem kezelt mintáknál nem figyelhető meg 5D3 jelölődés, míg a vad típusú ABCG2 esetében a fehérje már a biotin hozzáadását követően 1 órával fokozatosan megtalálható a sejt felszínen. Az M71V és Q141K változatok esetében a specifikus antitest bekötődése a biotin hozzáadást követően csak 2 és 4 óra után volt megfigyelhető, valamint a mutáns variánsoknál alacsonyabb intenzitású 5D3 festődést tapasztaltam (24. ábra B és C).



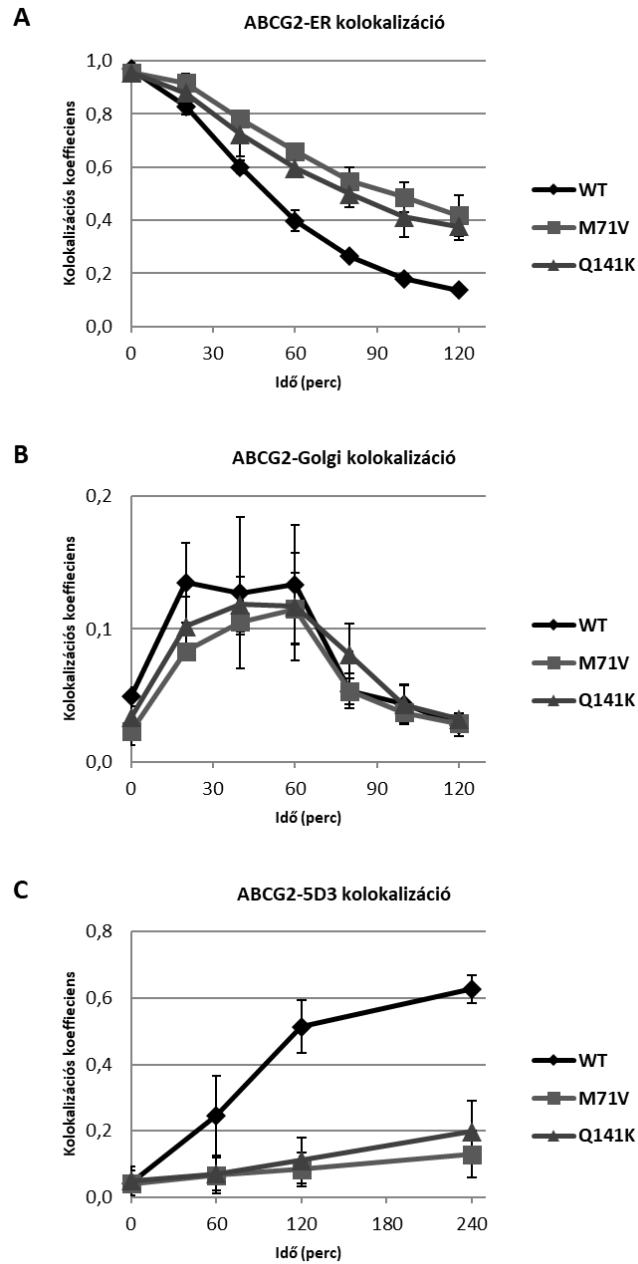
24. ábra: ABCG2 plazmamembránba való kihelyeződésnek vizsgálata 5D3 antitesttel. A vad típusú (A), az M71V (B) és a Q141K (C) ABCG2 (zöld) variánsokat tranziensen kifejező (RUSH plazmid konstrukció) HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvételei biotin nélkül, illetve biotinnal történő kezelés után (1, 2 és 4 óra). A sejt felszínre kijutott ABCG2 fehérjét az inkubáló médiumokhoz adott Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált 5D3 antitesttel jelöltem (piros). A mintákat alapos mosást és enyhe fixálást követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Méretarány: 10 μ m.

5.2.4 ABCG2 variánsok kolokalizációs analízise

Az ABCG2 transzmembrán fehérje különböző kompartmentekben való elhelyezkedésének kvantitatív elemzéséhez Manders által kifejlesztett kolokalizációs koefficiens alkalmaztam (lásd Módszerek), mely megadja a két csatornában (zöld - ABCG2 és piros - marker) kolokalizáló pixelek arányát a zöld csatornában mért teljes pixelszámhoz képest. A kolokalizációs mérésekben az ER- és Golgi markerrel, valamint az 5D3 antitesttel jelölt minták konfokális mikroszkópos képeit vizsgáltam (6-6 látótér / RUSH konstrukció / 4-7 időpontban) három független párhuzamos kísérletben.

Az ER és a Golgi markerrel való méréseket a biotin hozzáadását követő első két órában végeztem 20 perces felbontásban, ugyanis a korábbi mérésekből feltételezhető volt, hogy ennyi idő alatt a fehérje eléri és túljut a Golgi komplexen. Az így kapott eredményekből látható, hogy a vad típusú ABCG2 fehérje kolokalizációja az ER-markerrel gyorsan csökkent a biotin hozzáadását követően, míg az M71V és Q141K variánsok szintén felszabadultak az ER-ből, azonban bizonyos hányaduk (körülbelül 40%) 2 óra elteltével is ER lokalizációt mutatott (25. ábra A). A Golgi markerrel történő kolokalizációs mérés eredményeiből az látható, hogy mind a vad típusú, mind a polimorf variáns ABCG2 fehérjék az ER-ből történő felszabadulás után 20-60 perc elteltével elérik a Golgi-komplexet, majd ezt követően a Golgival való kolokalizáció csökken (25. ábra B).

Az ABCG2 plazmamembránba való megérkezésének vizsgálatához az 5D3 antitesttel jelölt minták mikroszkópos felvételeit elemeztem. A kapott eredményekből megállapítható, hogy a vad típusú ABCG2 egy része (24 %) már 1 óra elteltével eléri a sejtfelszít, majd 2 és 4 óra elteltével a plazmamembrán lokalizációt mutató fehérje arány folyamatosan nő (51%, illetve 62%). Ellentétben az M71V és Q141K variánsokkal, melyek esetében a fehérjének 13 és 20%-a mutatott kolokalizációt az 5D3 antitesttel 4 órás biotinnal való inkubálást követően (25. ábra C).



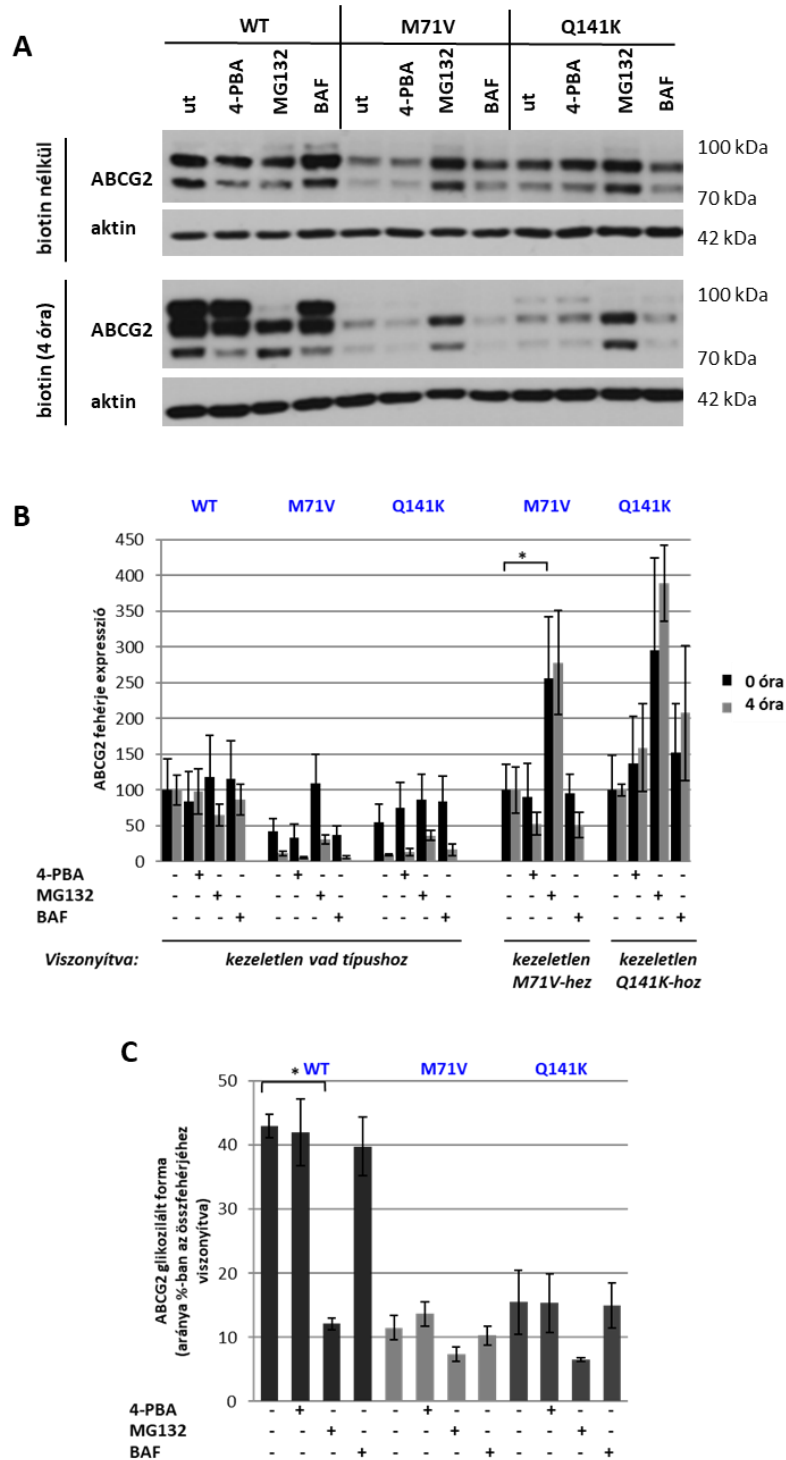
25. ábra: Az ABCG2 változatok kolokalizációjának elemzése különböző szubcelluláris markerekés 5D3 antitest mellett. A korábban leírt konfokális mikroszkópos felvételekből kolokalizációs koefficiens határoztam meg, ahol az ABCG2 fehérjék arányát vizsgáltam különböző időpontokban, különféle sejt-kompartimentumokban: **(A)** endoplazmatikus retikulum, **(B)** Golgi, **(C)** plazmamembrán/sejtfelszín (5D3 jelölődés). Az adatok három független kísérlet átlagát ábrázolják, melyhez mérésenként az egyes kísérleti pontokban 100-120 sejtet analizáltam párhuzamosonként ($n=3$; hibaszó: összevont standard szórás).

5.2.5 Trafficking-et befolyásoló anyagok hatása az ABCG2 fehérjék érésére és lokalizációjára a RUSH rendszerben

A korábbi ABCG2-M71V variánssal kapott eredmények alapján kíváncsi voltam, hogy különböző anyagok, melyek befolyásolhatják a proteinek feltekeredését és sejten belüli útvonalait, milyen hatást gyakorolnak az ABCG2 vad típusára és mutáns változataira a RUSH rendszerben. A vizsgálatokhoz 1 mM 4-PBA, 2 μ M MG132 és 10 nM Bafilomycin A1 (BAF) kezeléseket használtam, mely utóbbi kettő különböző fehérje degradációs útvonalak gátlószere. Az MG132 egy proteaszóma inhibitor, míg a BAF a lizoszómális lebontást gátolja. Az anyagokkal történő kezelési idők beállításához több stratégiát is teszteltem. A hasonló, *in vitro* kísérleteknél általában használt kezelési stratégia, mely során a transzfekciót követő 24 óra elteltével újabb 20-24 órán át inkubálják adott anyaggal a sejteket a RUSH rendszer esetében nem volt következetesen megoldható. Két nap elteltével ugyanis olyan mértékű lesz a fehérje expresszió (különösen a vad típusú ABCG2 esetében), hogy a transzmembrán fehérje ER-ben való visszatartás már nem garantálható. Így a saját kísérleteimben a HeLa sejteket közvetlenül a transzfektálást követően egy éjszakán át (20-24 óra) inkubáltam a különböző vegyületekkel, majd biotin hozzáadásával (4 órás inkubáció) szabadítottam fel az ABCG2 variánsokat az ER-ből (lásd Módszerek).

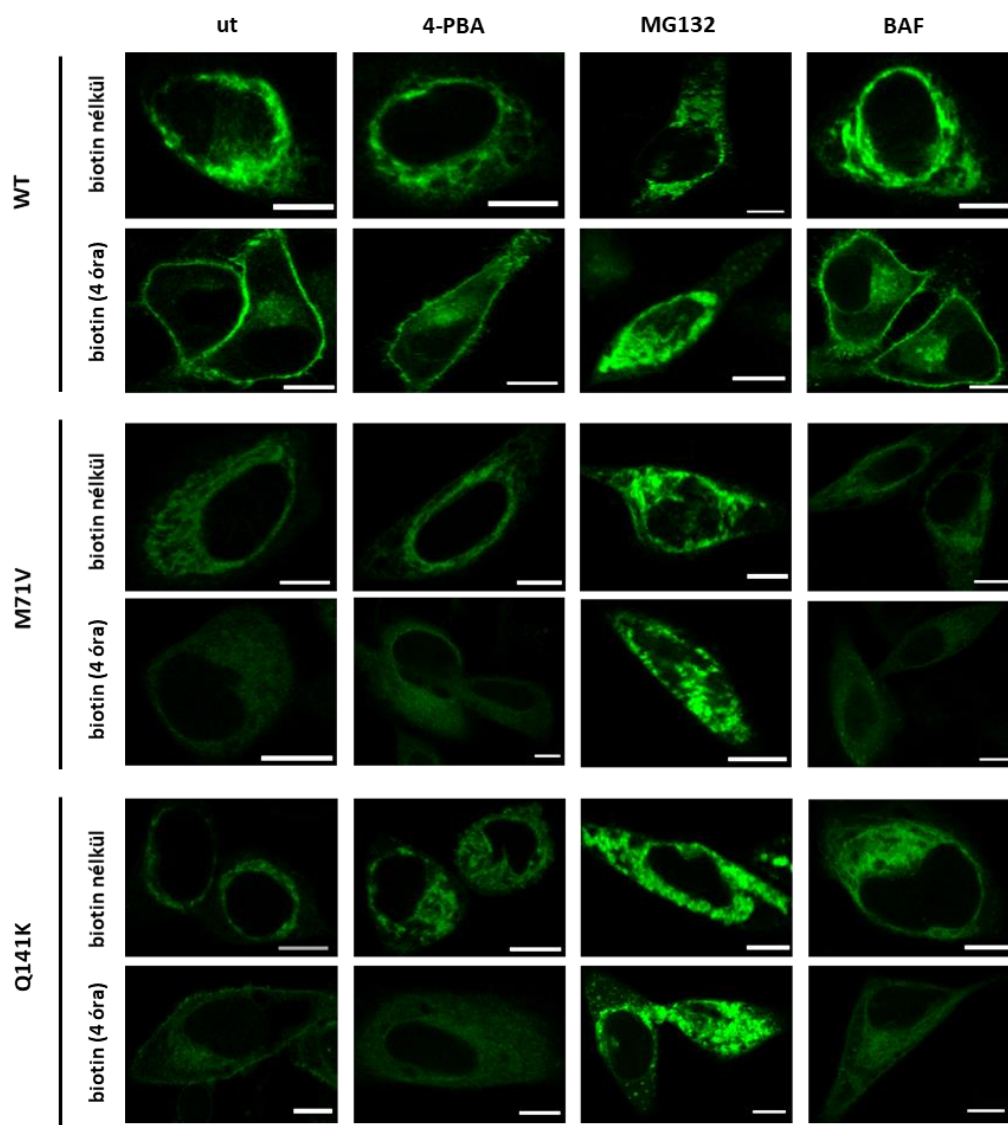
A fent említett kezelések a RUSH rendszerben kifejeződő ABCG2 fehérjék expressziójára és érésére gyakorolt hatását Western blot technikával mértem (26. ábra A). A kapott eredményekből megállapítható, hogy a 4-PBA és a BAF nem befolyásolta jelentős mértékben egyik ABCG2 változat (vad típus, M71V és Q141K) összfehérje szintjét sem. Ugyanakkor, az MG132 kezelés hatására az M71V polimorf variáns protein expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a kezeletlen mintához képest biotin jelenlétében. A vad típusú ABCG2-re az MG132-nek nem volt megfigyelhető hasonló, számottevő hatása (26. ábra B). Az érett, glikozilált ABCG2 forma vizsgálatához, ismét a harmadik (felső sáv) arányát értékeltem az összfehérjéhez képest. Az 26. ábra C paneljén szereplő elemzésből megállapítható, hogy a 4-PBA és a BAF kezeléseknél nem volt hatása a fehérjék

glikozilezettségére, azonban az MG132 kezelés hatására a fehérjék érett alakja csökkent mindhárom ABCG2 variáns esetében.



26. ábra: Az ABCG2 fehérjék vizsgálata farmakológiai kezelések hatására a RUSH rendszerben. (A) A vad típusú, M71V és Q141K ABCG2 variánsok Western blot analízise 1 mM 4-PBA, 2 μ M MG132 vagy 10 nM Bafilomycin A1 (BAF) kezelés után, biotin nélküli vagy 4 órán át biotinnal inkubált HeLa mintákból. (B) Az ABCG2 változatok összfehérje expressziójának kvantitatív kiértékelése a különböző kezelések mellett. Az ABCG2 fehérje mennyiségeket a vad típusú kezeletlen mintákhoz (balra), valamint a mutáns változatok kezeletlen mintáihoz hasonlítottam (jobbra). (C) Az ABCG2 fehérjék glikozilált formájának aránya az összfehérjéhez képest 4-PBA, MG132 vagy BAF kezelések hatására 4 órás biotinnal történő inkubációt követően. A diagramok három független kísérlet denzitometriás kiértékelését mutatják (hibázászló: az átlag standard hibája; t-próba: * $p < 0,05$).

A különböző kezelések hatását az ABCG2 sejten belüli lokalizációjára és plazmamembránba való kihelyeződésére konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Az ABCG2 variánsokat tranziensen expresszáló HeLa sejteket a fentiekkel megegyező kezeléseket követően biotin nélküli vagy biotint tartalmazó médiummal 4 órán át inkubáltam, majd fixáltam és az ABCG2 fehérjét a hozzá kapcsolt EGFP címke jele alapján detektáltam. A 4-PBA és BAF kezelések során nem tapasztaltam eltérést az ABCG2 variánsok sejten belüli elhelyezkedésében a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. Az MG132 hatására azonban úgy tűnt, hogy az ABCG2 minden esetben intracellulárisan maradt és biotinos kezelést követően sem volt megtalálható a plazmamembránban még a vad típus esetében sem (27. ábra).



27. ábra: Az ABCG2 lokalizációjának vizsgálata farmakológiai kezelések hatására a RUSH rendszerben. ABCG2 változatok expresszáló HeLa sejtek reprezentatív konfokális mikroszkópos képei 1 mM 4-PBA, 2 μ M MG132 vagy 10 nM Bafilomycin A1 (BAF) kezelést követően biotin nélkül vagy biotinnal történő 4 órás inkubálás után. Az ABCG2 fehérjék detektálása a hozzá kapcsolt EGFP fluoreszcencia jele alapján történt (zöld). A mintákat fixálás után konfokális mikroszkóppal vizsgáltam. Méretarány: 10 μ m.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 Az ABCG2-M71V variáns jellemzése

A fenotípusosan is nagy jelentőséggel bíró új mutációk esetében, melyekhez patológiás kórképek is társulhatnak érdemes megvizsgálni a mutáció okozta elváltozás molekuláris hátterét. Az ABCG2 SNP-i befolyásolhatják a fehérje expresszióját, transzport funkcióját és szubsztrát specificitását, vagy akár a sejten belüli közlekedését is. A közelmúltban köszvényes betegek mintáiban találtak egy új ABCG2 változatot, az M71V-t (rs148475733), mely a transzporter szignifikánsan alacsonyabb expresszióját okozta a vörösvértetek membránjában. Annak érdekében, hogy feltárjam az M71V pontmutáció hozzájárulását az alacsonyabb fehérje és sejtfelszíni expresszióhoz *in vitro* vizsgálatokat végeztem.

Kísérleteimhez olyan emlős sejtvonalakat használtam, melyekben az endogén ABCG2 expressziója extrém alacsony, így a kísérleteimhez HEK293, HeLa és MDCKII sejteket használtam. A mérésekhez EGFP címkézett, és címke nélküli fehérjét kódoló (pcDNA3.1 és pIRES-GFP) vektort-konstrukciókat használtam, melyek az ABCG2 vad típusú, M71V, K86M és Q141K változatait tartalmazták. Azért használtam fluoreszcens fehérjével kapcsolt és címke nélküli konstrukciókat is, mert korábbi tapasztalatok alapján megfigyelhető volt, hogy a GFP tagelt vad típusú változat bizonyos esetekben magasabb expressziót mutat a címke nélküli konstrukciókhoz képest. Erről a jelenségről azt feltételezzük, hogy a GFP feltekeredése segítheti az utána lévő, hozzá kapcsolt ABCG2 feltekeredést is. A pIRES-GFP vektorral is ezt az eshetőséget igyekeztem kiküszöbölni, melynél a vizsgálni kívánt fehérje és a fluoreszcens protein külön transzlálódik a közöttük lévő riboszóma belépési helynek köszönhetően. Mindemellett a citoszólba szintetizálódó GFP jel alapján információt kapunk a transzfecció hatékonyságáról.

A fehérje expressziós mérések alapján, az ABCG2-M71V változat, hasonlóan a Q141K-hoz, jelentősen alacsonyabb (~25%) kifejeződést mutatott a vad típushoz képest HEK293 sejtekben, míg a pIRES-es plazmidokról ugyancsak szintetizálódó GFP szintje

mindhárom ABCG2 variáns esetében közel azonos volt. Ezek az adatok összhangban állnak az eritrocitákon mért expressziós vizsgálatokkal, bár ezekben az esetekben az M71V változat csak az egyik allélon (heterozigóta formában) volt jelen a vad típusú allél mellett. Mivel az ABCG2 esetében a funkcionális dimer forma már az ER-ben létrejön ezért feltételezhető, hogy a M71V/M71V, vagy a wt/M71V dimer változatok is már olyan konformáció változást okoznak, mely a fehérje idő előtti lebontásához vezethet. Az EGFP tagelt és címke nélküli változatoknál az M71V esetében szintén markánsan alacsonyabb fehérje expresszió volt látható a vad típushoz viszonyítva mind HEK293, mind HeLa sejtekben. A GFP tag pozitívan nem befolyásolta a mutáns fehérje expresszióját, továbbá a fluoreszcens fehérjével kapcsolt polimorf változat HeLa sejtekben a transzfekciót követően nem volt kimutatható. A Western blotok analízise során az M71V változat a vad típusú ABCG2-vel azonos molekulásúly magasságában volt megfigyelhető, mely igazolja, hogy a mutáns fehérje is képes megfelelően glikozilálódni. Ugyanis korábban az ABCG2 glikozilációs helyét érintő N596Q mutáció esetén már kimutatták, hogy a nem glikozilált fehérje forma esetében egy körülbelül 10 kDa nagyságú molekulatömeg csökkenés figyelhető meg a Western bloton (59,168). Más ABCG2 variánsok esetében (F208S, S441N) leírták, hogy ezek a mutációk habár távolabb helyezkednek el a glikozilációs helytől, mégis a fehérje hibás feltekeredése révén valamilyen konformáció változás érintheti az aszparagin-596 orientációját, így ezekben az esetekben a teljesen glikozilált és éretlen forma mellett, a részlegesen glikozilált (core-glikozilált) fehérje is megjelenhet (125).

Az M71V csupán egy misszensz mutáció, mely az RNS érését és stabilitását elvileg nem befolyásolja, azért qPCR-rel ellenőriztem a pIRES-es plazmid konstrukciókról átíródó mRNS szinteket. Az eredmények alapján nem volt megfigyelhető mRNS szintbeli különbség a vad típusú és a mutációt hordozó változatok között, mely arra utal, hogy a 211A>G csere a transzkripciót nem befolyásolja. Ezek a megfigyelések azonban az *in vivo* körülményekre már nem vetíthetők ki teljes bizonyossággal, hiszen az *in vitro* kísérletekben többnyire a cDNS-re koncentrálnak, mely nem tartalmaz intronokat és egyéb szabályozó régiókat. A Q141K variáns esetében korábban már leírták, hogy az ABCG2 gén 3'UTR (untranslated region, nem transzlálódó régió) mikroRNS-ekkel történő szabályozása révén képes

befolyásolni a transzkriptum stabilitását és ez által a mutáns fehérje mennyiségét is, azonban az M71V esetében erre vonatkozó *in vivo* eredmény még nem ismert (169).

A vad típusú ABCG2 transzmembrán fehérjéről ismert, hogy a sejtek plazmamembránjában, határfelületeket alkotó polarizált sejtek esetében pedig a membrán apikális felszínén helyezkedik el. Az általam végzett mikroszkópos kísérletekből megállapítható, hogy az M71V változat, bár valamilyen mértékben kijut a plazmamembránba HEK293 sejtekben, azonban a fehérje egy jelentős része intracellulárisan marad, hasonlóan a Q141K-hoz (127,128,138,140,146,170). Azonban, a polarizáltatott MDCKII sejteken végzett 3D konfokális elemzés alapján az M71V is a vad típushoz hasonlóan az apikális membrán szegmensben helyezkedik el, bár expressziója alacsonyabb a vad típushoz képest. Számos olyan ABCG2 SNP-t ismerünk, melyek egyáltalán nem, vagy csak kis arányban találhatóak meg a plazmamembránban. A Q141K, R147W, R236X, F373C és R383C ABCG2 változatoknál is hasonló, jelentős mértékben intracelluláris lokalizációt tapasztaltak. Ezek a mutációk az NBD-ben, vagy az ún. konnektor-hélix környékén helyezkednek el (mely fontos szerepet játszik az NBD-k és a TMD-k összekapcsolásában és a domének közötti kommunikációban), valamint az R236X esetében a korai STOP kodon révén trunkált fehérje képződik (141,171,172). A leggyakrabban vizsgált Q141K esetében leírták, hogy a nem megfelelően feltekeredett fehérje ubiquitinálódik és a proteaszómában lebontásra kerül (128), mások azt találták, hogy a hibás fehérje az aggreszómában is felhalmozódhat, majd onnan az autofagoszómába kerülve degradálódik (127). Az R147W-nél az arginin>triptofán csere miatt az E199-el alkotott stabilizáló elektrosztatikus kölcsönhatás megszűnik, amely megbontja a fehérje stabil szerkezetét (172). Az R236X a korai stop-kodon révén idő előtt terminálódik, mely a fehérje degradációját indukálja (173). Az R383C mutáció következtében, a könyök-hélixben egy stabilizáló só-híd hiánya miatt a fehérje instabillá válik (174). Az ABCG5/G8 homológia modell alapján az M71V az ABCG2 nukleotid-kötő doménjében helyezkedik el, közel a transzporter ATP-kötő helyéhez (155). Feltételezéseink szerint ez a mutáció szintén olyan szerkezeti változásokat okozhat, melyek instabillá tehetik a fehérjét és annak idő előtti lebomlása vezethet az alacsony expressziójához és nem

megfelelő lokalizációjához. Az ilyen, a sejtben részlegesen megakadt, esetlegesen degradációs útvonalra irányított fehérjéket ún. trafficking mutánsnak is nevezhetjük.

Az ABC transzporterek funkcionális vizsgálatának egyik módszere az ATPáz -mérés, mellyel a transzport aktivitásra az ATP bontás mértékéből következtetünk. Az ABCG2-M71V változattal végzett ATPáz aktivitás vizsgálatokból úgy tűnik, hogy a mutáns transzporter bár valamivel alacsonyabb ATP-hasító képességgel rendelkezik (hasonlóan a Q141K-hoz), mint a vad típusú ABCG2, azonban a K86M inaktív variánshoz képest mégis jelentős aktivitás mutat. Ezt a körülbelül 50%-os ATPáz aktivitást specifikus ABCG2 inhibitorral, Ko143-al az inaktív mutáns szintjére sikerült csökkenteni. Az ABCG2-ről ismert, hogy a membránban való elhelyezkedés és aktivitása szempontjából fontos a lipidkörnyezet és a fehérje előnyben részesíti a koleszterinben gazdag lipid-tutajokat (163,175-177). Mivel az Sf9-rovarsejt membránoknak jóval alacsonyabb a koleszterin tartalma mint az emlős sejteké (178), ezért a méréseket koleszterinnel töltött membránpreparátumokon is elvégeztem, mellyel az alapaktivitásban, a korábban a vad típusú ABCG2 esetében megfigyeltekhez hasonlóan nem tapasztaltam különbséget a koleszterinnel nem dúsított mintákhoz képest. Azonban stimuláló ABCG2 szubsztrát, quercetin jelenlétében az ABCG2-M71V ATPáz aktivitása jelentős emelkedést mutatott, melyet a membránok koleszterin töltése tovább fokozott. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy az M71V mutáció, habár közel helyezkedik el az ATP-kötő helyhez, a transzporter funkcióját teljes mértékben nem károsítja.

Azoknál a trafficking mutánsoknál, amelyek funkcionálisan aktív transzporterek, azonban a fehérje valamilyen oknál fogva nem tud megfelelő mennyiségben kijutni arra a helyre, ahol feladatát el kellene látni, megoldást jelenthet olyan farmakológiai ágensek alkalmazása, melyek segítik a proteinek megfelelő feltekeredését és mérsékelik azok lebontását. Egy ilyen típusú ABCG2 változat a Q141K, ami a köszvényes betegekben gyakran előfordul, és amelyről számos adat áll már a rendelkezésre a hibás fehérje expresszió helyreállításának vonatkozásában. Gyakran használnak kémiai chaperonokat és hiszton-deacetiláz inhibitorokat (HDACI, histone deacetylase inhibitor), melyek segíthetik a fehérje megfelelő konformációba történő hajtogatását (127,138). Ide tartozik a 4-fenilbutirát (4-

PBA), amelyről kimutatták, hogy a Hsp70 és Hsp90 hősokk fehérjék expresszióját is fokozza, mely chaperonok aztán a nem megfelelően feltekeredett (misfold) fehérjékhez kapcsolódva elősegítik azok stabilizálását (179). Egy másik, a Q141K esetében alkalmazott kismolekula a kolhicin, melyről leírták, hogy gátolja a fehérje aggregációjában történő felhalmozódását, valamint a plazmamembránból történő beszedődés gátlásával elősegíti a transzporter sejt felszíni expresszióját (127).

Ezek alapján az M71V változatra ennek a két anyagnak a hatását igyekeztem tesztelni. A fehérje expressziós, Western blotos vizsgálatokban megfigyelhető, hogy mind a 4-PBA, mind a kolhicin kezelés hatására szignifikánsan megemelkedik az M71V típusú fehérje szintje, ugyanakkor ugyanez a növekedés a vad típusnál is hasonló mértékű volt. Továbbá a pIRES-es vektorról expresszázó szolubilis GFP esetében is expressziós növekedés volt megfigyelhető a kezelt minták esetében. Mindez arra utalhat, hogy a kezelések nem specifikusan a mutáns fehérjéket segítik, hanem általánosan a fehérje expressziót fokozzák. A kezelések hatásait az ABCG2 fehérje lokalizációjának tekintetében is vizsgáltam. A mikroszkópos felvételek alapján azt tapasztaltam, hogy a 4-PBA kezelés a fehérjék intracelluláris szintjének emelkedésében mutat enyhe hatást, amely szintén az expresszió fokozására utal. A kolhicin kezelésnél, a sejtek morfológiai megváltozása miatt (a sejtek kerekesebbek és kevésbé letapadtak lettek, ami a sejtpusztulás egyik kezdeti jele lehet) az ABCG2 fehérje plazmamembránba való kissegítésének mértékét jelen esetben nem lehet egyértelműen megállapítani. Ez annak tulajdonítható, hogy a kolhicin mikrotubulus gátlószerként működik, mellyel a sejtben lévő trafficking nagy része gátolt, így a felhalmozódott rakományok apoptózist indukálhatnak.

6.2 ABCG2 trafficking vizsgálatok

Fehérjék lokalizációjának vizsgálatára evidensnek tűnhet az ellenanyag alapú immunfestés, amely azonban csak a jelölt elemek egyensúlyi állapotáról (steady state) képes információt nyújtani fixált sejteken, ezáltal nem alkalmas dinamikus mérésekre. Szerencsére, a proteinek sejten belüli mozgásának és útvonalának vizsgálatára manapság már számos módszer a rendelkezésünkre áll. Ide sorolható például a fluoreszcens fehérjékkal, vagy fotokonvertálható címkével való kovalens jelölés, vagy a sejtek egyes részeinek fotoelhalványítása (photobleaching) (180-182). Ezeket a technikákat gyakran úgy alkalmazzák, hogy a sejteket először alacsony hőmérsékleten növesztik, mely hatására a sejten belüli fehérje mozgás (trafficking) meglehetősen lelassul, vagy teljesen megakad, majd a hőmérséklet megemelésével indítják útjára a vizsgálni kívánt fehérjéket (183-185). Ahhoz, hogy a fehérjék visszamaradjanak az ER-ben 15 °C-ot, a Golgiban való megakasztáshoz pedig 20 °C-ot szoktak alkalmazni, azonban ezek az alacsony hőmérsékletek egyidejűleg az összes bioszintetikus útvonalat is blokkolják az emlős sejtekben. Egy másik klasszikus módszer során a riporter fehérjéhez egy hőérzékeny vírus-glikoproteint (VSVGtsO45) kapcsolnak, amely 39,5 °C-on az ER-ben reked, majd a hőmérsékletet 32 °C-ra való csökkentésével felszabadul az endoplazmatikus retikulumból (186-189). Ugyanakkor ezek az inkubációs körülmények sem teljesen fiziológiásak az emlős sejtek számára. Alternatív megoldást jelenthet a vizsgálni kívánt fehérje CAD (conditional aggregation domain, feltételes aggregációs domén) egységgel való fúziója, ami a riporter összekapcsolódását és felhalmozódását eredményezi az ER-ben, mely aggregáció reverzibilis és egy kis ligandum hozzáadásával gyorsan feloldható (190-193). Ez a módszer azonban csak olyan fehérjék vizsgálatára alkalmas, melyeket az ER-lumenbe benyúló részén lehet címkézni. Az újabb generációs technikák közé tartozik a fluorogén aktiváló fehérjén (FAP, fluorogen activating proteins) és különböző tulajdonságú riporter festékeken alapuló módszer, amely során transzmembrán fehérjék plazmamembránba történő kijutása úgy vizsgálható, hogy az extracelluláris oldalra néző FAP-ot először a nem permeabilizáló riporter festékekkel telítik, majd egy permeabilis riporter festékekkel az intracellulárisan rekedt fehérjéket jelölik

(194,195). Azonban ez a technika is csak az olyan fehérjék esetében megfelelő, melyeket valamilyen extracelluláris régióban címkézni lehet.

Korábbi tapasztalatok alapján tudjuk, hogy az ABCG2-t, annak N-terminális részén lehet biztonságosan címkézni (ez a régió a fehérje citoszólikus oldalán található), ami a transzmembrán transzporter lokalizációját és funkcióját nem befolyásolja (196). Továbbá leírták, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten való inkubáció a Q141K variáns fehérje expresszióját fokozhatja megmentve azt a degradációtól (138). Mindezek miatt, az ABCG2 sejten belüli útvonalának vizsgálatához a RUSH rendszer használata mellett döntöttem, mely leginkább tükrözheti a természetes körülményeket a vad típusú és a mutáns ABCG2 változatok esetében is (162). Méréseimhez, olyan RUSH vektorokat hoztam létre, amelyeknél az ABCG2-t az N-terminálisán jelöltem egy sztreptavidin-kötő peptiddel (SBP) és egy EGFP címkével. Az SBP egy ER horgony fehérjéhez kötött sztreptavidinhez képes kapcsolódni annak intracelluláris, citoszólikus oldalán, így megakasztva az ABCG2-t az endoplazmatikus retikulumban. Ennél a módszernél nem szükséges a minták alacsony hőmérsékleten való inkubálása a fehérje visszatartásához, és az ER-ből való felszabadítás csupán biotin hozzáadást igényel, így az egész kísérlet az emlős sejteknek optimális 37 °C-on történik. Az ilyen bicisztronos plazmid konstrukciók tervezésénél fontos szempont, hogy a visszatartást szolgáló horgony szekvenciája szerepeljen elől (a CMV promóter mögött) és az *ABCG2* riporter szekvencia pedig a két cDNS-t elválasztó IRES-t követően. Ez az elrendezés azért lényeges, mert az IRES előtti első szakasz nagyobb arányban expresszálódik (197), így a horgony fehérje többlete biztosítja az ABCG2 megfelelő visszatartását az endoplazmatikus retikulumban.

A RUSH-ABCG2 variánsokkal végzett Western blotos méréseknél érdekes megfigyelésnek bizonyult, hogy az ER-ben megtartott (biotin kezelés nélküli) mintáknál kettő, az ER-ből felszabadított (4 órás biotin kezelt) mintáknál három fehérje sáv detektálható. A három sáv körülbelül 75 kDa, 90 kDa és 100 kDa molekulatömegnél látható, melyek közül tudjuk, hogy az ABCG2 GFP címkével ellátott fehérje 100 kDa magasságában jelentkezik. A szakirodalomban található Western blotokon megfigyelhető, hogy bizonyos esetekben kettő sáv jelenik meg az ABCG2-nél (125,127), melyet korábban a GFP-ABCG2-

nél esetenként én is tapasztaltam. Valamint egyes tanulmányokban az is fellelhető, hogy tunikamicin, vagy glikozidáz enzimes kezelés hatására a bloton három sáv jelenik meg az ABCG2 vizsgálata estén (198,199). Ezek az anyagok mind a fehérjék N-glikoziláltságát befolyásolják. A tunikamicin kezelés a fehérjék glikozilációját a dolicol molekulán keresztül gátolja, mely az endoplazmatikus retikulumban a fehérje glikolizációjának kezdeti lépését végzi (200). Az EndoH olyan oligoszacharid-láncokat képes lehasítani két N-acetil-glükózamin között, melyek még nagy mennyiségben mannóz-csoportot tartalmaznak (ER-specifikus cukorlánc), ezzel szemben a PNGáz F enzim a teljes glikozilcsoportot képes eltávolítani a fehérjéről azáltal, hogy az aszparagin és az első N-acetil-glükózamin között hasít (ER- és Golgi-specifikus cukorláncok) (201). Az ABCG2 glikozilációs mutánsáról (N596Q) tudjuk, hogy az a fehérje expresszióját, lokalizációját és transzport aktivitását nem befolyásolja, azonban ez a változat körülbelül 10-15 kDa-val alacsonyabb sávban jelenik meg a bloton mint a vad típus (168). A RUSH rendszerrel kifejezett ABCG2 mintákkal végzett glikozidáz enzimes kezeléseknél azt találtam, hogy a PNGáz F eltávolította a felső sávot a biotinnal felszabadított fehérjemintáknál. Ezzel igazolható, hogy a harmadik felső sáv a fehérje érett, teljesen glikozilált alakja. Korábban a CFTR-nél (ABCC7) figyelték meg, hogy az a bloton három sávot mutathat, melyek közül a felső sávot tekintik a fehérje érett alakjának, a középső sávot a mag-glikozilált, ER-specifikus formának, az alsó sáv pedig olyan polimorf variánsok esetében detektálható leginkább (pl.: $\Delta F508$), amelyek korai lebontásra hajlamosak (202). Ezek alapján feltételeztem, hogy a RUSH-ABCG2 konstrukciók esetében is hasonló mintázat figyelhető meg: miszerint az alsó sáv valamilyen degradációs, vagy éretlen forma, a középső az ER-ben lévő éretlen, vagy mag-glikozilált forma, a felső sáv pedig az ER-ből történő felszabadulás után a Golgit elért teljesen glikozilált fehérje. A továbbiakban ezzel a módszerrel vizsgáltam az ABCG2 variánsok fehérje érésének kinetikáját. Biotinnal való felszabadítás nélkül rendszerint csak a két alsó sáv volt megfigyelhető, bár a vad típus esetében egy halvány felső sáv is megjelent, amit a fehérje nagyobb mennyiségben való túltermelésének és ez által a donor kompartmentből való szivárgásnak tulajdonítottam. Az ER-ből való, biotinnal történő felszabadítás után a harmadik sáv mindegyik változat esetében fokozatosan megjelent, azonban az M71V és Q141K variánsok fehérje érése lassabbnak bizonyult, mint a vad típusé. Érdekes módon a

vad típusú ABCG2 összfehérje szintje biotin hozzáadása után átmenetileg megemelkedett, ellentétben a polimorf változatokkal, melyek szintje minden időpontban közel azonos volt. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a mutánsok az ER-ből történő felszabadulás után nagyobb arányban kerülnek lebontásra, míg a vad típusú ABCG2 a membránba való kijutás és beszedődés után degradálódhat.

Az ABCG2 sejtben belüli útjának elemzéséhez a szekréción membránrendszer különböző állomásain (ER, Golgi, plazmamembrán) vizsgáltam a transzmembrán fehérjét a szinkronizált elengedést követően. Az endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulás vizsgálatához ER-Tracker-t használtam, a Golgin keresztül való áthaladás követésére pedig Giantint jelölő ellenanyaggal immunfestést végeztem. Az ABCG2 plazmamembránban való megjelenésének detektálásához egy új metodikát dolgoztam ki, amely során az ABCG2-t egy extracelluláris loop-on felismerő fluorofórral konjugált 5D3 antitestet alkalmaztam az inkubációs médiumban (biotinnal vagy biotin nélkül Ko143 jelenlétében). Az antitest kötődés az ABCG2 internalizációja után is megmarad, így lehetőséget nyújt arra is, hogy a sejt felszínre kiérkező összes fehérjét azonosítsuk, valamint hosszabb mérési körülmények között a transzporter beszedődéséről és reciklizációjáról is információt adhat (jövőbeli tervek). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az 5D3 antitest az ABCG2 internalizációját felgyorsítja, míg normál esetben az ABCG2 félélet ideje a plazmamembránban meghaladja a 60 órát, addig 5D3 jelenlétében ez 1-3 órára csökken (203,204). Azonban az általam végzett mérések során ennek nem volt jelentősége, mivel az ABCG2 a sejt felszínre való megérkezését kívántam megfigyelni egy 4 órás időablakban. A kolokalizációs mérésekből megállapítható, hogy a vad típusú ABCG2 gyorsan felszabadul az ER-ből és körülbelül egy óra elteltével áthalad a Golgin, majd fokozatosan egyre nagyobb mennyiségben kijut a plazmamembránba (4 óra után 60%). Az M71V és Q141K variánsok esetében a fehérje egy jelentős része biotin hozzáadása után is az ER-ben maradt (2 óra után 40%). A Golgi markerrel végzett kolokalizációs vizsgálatnál a mutáns változatok áthaladása a Golgi-komplekxén hasonló kinetikát mutatott, mint a vad típusú fehérje. Ugyanakkor a polimorf variánsok a sejt felszínen csak 2 és 4 óra elteltével jelölődtek 5D3 antitesttel. Mindez arra utal, hogy az ABCG2-M71V és -Q141K variánsok plazmamembránban való megjelenésének

sebessége lényegesen alacsonyabb, mely feltehetően az intracelluláris megrekedés és az idő előtti lebomlás következménye. Más ABC transzporterek (ABCB11/BSEP, ABCB1/MDR1) esetében leírták, hogy a fehérjék az plazmamembránba való szállítás előtt az endoszómákban halmozódhatnak fel és onnan jutnak a sejt felszínre (121-123,205-207). Így az is lehetséges, hogy az ABCG2 polimorf változatok is valamilyen intracellulárisan kompartmentben várakoznak sorsukra. Mindenesetre az M71V és a Q141K egy része végül mindenképpen képes kijutni a sejt felszínre.

Az SNP-t hordozó variánsok sejten belüli útjának pontosabb feltárása érdekében farmakológiai korrektor (4-PBA) és fehérje degradációs útvonalakat gátló vegyületeket (MG132 proteaszóma inhibitor, Bafilomycin A1 lizoszóma inhibitor) alkalmaztam az ER-ből való felszabadítást megelőzően. Furukawa és munkatársai ABCG2-t stabilan expresszáló sejt vonalon kimutatták, hogy míg a vad típusú fehérje a plazmamembránból való beszedődés után a lizoszómában bomlik, addig a Q141K egy része a transzlációt követően ubiquitinálódik és a proteaszómában degradálódik, ugyanakkor a mutáns fehérje szintje lizoszómális gátlás mellett is megemelkedik (128). A RUSH rendszerrel történő kezelések korlátja, hogy a biotinnal együtt való inkubálás túl rövid lehet a farmakológiai anyagok hatásának kifejtéséhez (4 óra), valamint hogy a transzfekciót követő egy nap pihentetés majd egy újabb 24 órás kezelés alatt a vad típusú változat esetében nem biztosított teljes mértékben az ER-ben való visszatartás. Ezért a transzfekciót követően közvetlenül végeztem a kezeléseket, és másnap a méréseket. A 4-PBA és Bafilomycin A1 kezelések hatására nem tapasztaltam változást az ABCG2 variánsok fehérje expressziós szintjében és a glikozilált forma arányában, valamint nem volt megfigyelhető különbség a plazmamembrán lokalizáció tekintetében sem. Ez az eredmény a Bafilomycin A1 esetében lehetséges, hogy a rövid ideig tartó mérésnek köszönhető, mely alatt az ABCG2 fehérje még nem feltétlenül szedődik be a membránból és éri el a lizoszómákat. A 4-PBA esetében nagyobb elvárásokkal indultam, hiszen a kezelés az ABCC6 esetében a súlyosan sérült mutánsokat is kiegészíti a sejt felszínre (208), azonban az ABCG2-re a RUSH rendszerben nem volt szignifikáns hatása. Az MG132 proteaszóma gátlónak a vad típusú ABCG2 expressziójára nem volt hatása, ugyanakkor az M71V változat összfehérje szintje a kezelés következtében szignifikánsan megnőtt.

Mindemellett meglepő módon a fehérje glikozilált, érett alakjának a kialakulását (4 órás biotin kezelésnél) az MG132 kezelés a vad típusú és a polimorf variások esetében is gátolta. Azonban mások által vizsgált, a transzportert stabilan expresszáló rendszerekben is az MG132 a nem-glikozilált ABCG2 fehérje mennyiségét növelte meg, illetve egyes publikációkban ezt a kérdést kikerülendő, az inhibitor hatását PNGáz F kezelés után mutatták meg, melyből szintén csak az összfehérjére lehet következtetni (128,171). Szintén stabil sejtvonalakban úgy találták, hogy az MG132 kezelés a Q141K változat mennyiségét megnöveli a sejtfelszínen, miközben a vad típusú változat lokalizációjára nincs hatással (128). A RUSH rendszerrel történő vizsgálat esetében ez a hatás elmaradt, továbbá sem a vad típusú, sem a mutációt hordozó ABCG2 változatoknál nem volt megfigyelhető plazmamembrán lokalizáció az MG132 és biotin kezelést követően. Ez a jelenség feltehetően proteaszóma inhibitor ER-stresszt indukáló hatásának a következménye, amely valójában meggátolja a fehérjék endoplazmatikus retikulumból való kijutást (209). Ezek alapján vitathatónak tartom az MG132 hatásának eredményeit azokban az esetekben, amikor azt stabilan expresszáló sejtvonalakon, vagy éppen tranziensen kifejező mintákon vizsgálják (azonban a fehérje felszabadulás nem szinkronizált, és már kialakult a plazmamembránban egy egyensúlyi állapot még a proteaszóma kezelést megelőzően), hiszen az MG132 az ER-ből kijutott ABCG2-re már nincs hatással, azonban a *de novo* szintetilázólódó és megakasztott fehérjék ER-ből való felszabadulását és glikozilációját gátolhatja.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

7.1 Az ABCG2-M71V jellemzése

A humán vérmintákban azonosított új ABCG2 variáns *in vitro* vizsgálata során azt találtam, hogy:

- az M71V fehérje mennyisége *in vitro* expressziós rendszerben, hasonlóan a vörösvértesteken tapasztalt megfigyelésekhez, jelentősen alacsonyabb expressziót mutat a vad típusú ABCG2 fehérjéhez képest;
- a kísérletekhez használt plazmidokról expresszálo mRNA szintekben nem tapasztalható különbség a vad típusú és mutációt hordozó ABCG2 változatok között;
- az M71V mutációt hordozó membránfehérje túlnyomó részt intracelluláris lokalizációt mutat HEK293 sejtekben, azonban egy kis hányada, a plazmamembránban is megtalálható. Polarizált MDCKII sejtekben pedig az M71V apikális membránban való elhelyezkedését sikerült igazolnom;
- bakulovírus-Sf9 rendszerben az ABCG2-M71V variáns ATPáz aktivitása valamivel alacsonyabb, mint a vad típusú transzporteré, azonban a teljes inaktívnak tekinthető K86M-hez képest mégis egy jelentős ATPáz aktivitással rendelkezik;
- farmakológiai kismolekulák (4-PBA és kolhicin) segítségével az M71V változat teljes fehérje expresszióját növelni lehet, azonban a mutáns fehérje lokalizációjának aránya a kezelések hatására döntően nem változik.

Ezek alapján megállapítható, hogy az ABCG2-M71V csökkent fehérje expresszióval rendelkezik, ugyanakkor funkcionálisan aktív transzporternek tekinthető (hasonlóan a Q141K variánshoz). Mivel az M71V változat egy része nem képes kijutni a plazmamembránba, mely feltehetően a mutáció okozta feltekeredési probléma következménye, lehetséges, hogy a protein valamely fehérje-ellenőrző ponton a sejten belül megreked, majd a degradációs útvonalak egyikén lebomlik.

7.2 ABCG2 variánsok sejten belüli közlekedésének vizsgálata

Az ABCG2 transzmembrán transzporter változatok plazmamembránba való kijutásának tanulmányozása során az alábbi következtetésekre jutottam:

- a RUSH rendszer használata potenciális lehetőséget nyújt az ABCG2 vad típusú, M71V és Q141K variánsok különböző sejt-kompartmentekben (Golgi, plazmamembrán) való vizsgálatához az ER-ből történő szinkronizált felszabadulást követően. A RUSH vektor konstrukciókról átíródó transzkriptum (ABCG2 mRNS) mennyiségében nincs szignifikáns különbség a vad típusú és mutációt hordozó változatok között, így azok nem befolyásolhatják az ABCG2 fehérjék expresszióját ezen a szinten;
- a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan, a RUSH konstrukciókkal is alacsonyabb fehérje expresszió figyelhető meg az M71V és a Q141K esetében, mely azonban az ER-ből való felszabadulást követő 4 órás vizsgálati ablakban arányaiban nem változik. Ugyanakkor a RUSH rendszer alkalmazásával lehetőség nyílik az ABCG2 fehérje érésének, glikoziláltsági szintjének időbeli követésére is;
- ER markerrel végzett kolokalizációs mérések alapján megállapítható, hogy a vad típusú ABCG2 viszonylag gyorsan felszabadul az endoplazmatikus retikulumból, míg a M71V és Q141K változatok egy része az ER-ben marad. A Golgi markerrel mért kolokalizációs eredményekből az látszik, hogy mind a vad típusú és mind a mutációt hordozó variánsok hasonló kinetikával haladnak át a Golgi komplexen az ER-ből való felszabadulást követően;
- a RUSH rendszert kombinálva az ABCG2-t extracelluláris epitópon felismerő 5D3 antitesttel olyan mérési technikát dolgoztam ki, mellyel az ABCG2 plazmamembránba való megérkezése időben detektálható az ER-ből való elengedés után. Ezzel a módszerrel megfigyelhető, hogy a vad típusú ABCG2 fehérje viszonylag gyorsan eléri a sejt felszínt, ellentétben az M71V és a Q141K változatokkal, melyek esetében a plazmamembránba történő kijutás jóval lassabbnak bizonyult. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ABCG2-M71V és -Q141K polimorf variánsok plazmamembránba való kijutása valamilyen módon

gátolt a sejten belüli útjuk a Golgi és a sejtfelszín közötti szakaszán, hiszen az ER-ből való felszabadulás és a Golgin való áthaladás sebességében nem figyelhető meg jelentős eltérés;

- a RUSH rendszerben alkalmazott farmakológiai kezeléseknél a 4-PBA (farmakológiai chaperon) és a Bafilomycin A1 (lizoszóma inhibitor) nem voltak hatással az ABCG2 fehérjék expressziójára és a plazmamembránban való elhelyezkedésére. Az MG132 proteaszóma inhibitor szignifikánsan megnövelte az M71V változat összfehérje expresszióját, azonban a fehérje érett, glikozilált formájának a kialakulását és a transzporter plazmamembránba való kijutását a vad típus esetében is gátolta. Mindazonáltal a RUSH-ABCG2 rendszert alkalmasnak tartom a fehérje trafficking-jét befolyásoló anyagok tesztelésére, hiszen a kezelések pontos hatása egy ilyen dinamikus rendszerben sokkal inkább vizsgálható.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A humán ABCG2 egy transzmembrán transzporter, melynek legfőbb feladata a szervezet és a sejtek endo- és xenobiotikumokkal szembeni védelme. Az ABCG2 számos élettani határfelületen megtalálható a hámsejtek apikális plazmamembránjában, megfelelő elhelyezkedése elengedhetetlen funkciója ellátásához. Az ABCG2-nek kulcsszerepe van a húgysav transzportjában, így a fehérje diszfunkciója hiperurikémiához vagy köszvény kialakulásához vezethet.

Egy újonnan azonosított ABCG2 variáns az M71V, mely a humán vörösvértestek felszínén jelentősen csökkent expressziót mutat. Kutatómunkám során az ABCG2-M71V *in vitro* jellemzését végeztem el klasszikus molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel. Eredményeim alátámasztották *in vitro* rendszerben is e variáns alacsonyabb kifejeződését, ugyanakkor megmutatták, hogy funkcionálisan aktív maradt. Az M71V erős intracelluláris lokalizációja a sejten belüli közlekedésének hibájára utal, habár kis mennyiségben kimutatható volt a plazmamembránban is, polarizált sejtekben pedig specifikusan az apikális szegmensben.

Az ABCG2 vad típusú és a köszvényben releváns polimorf (M71V, Q141K) variánsainak sejten belüli közlekedését a RUSH rendszerben vizsgáltam. Az ABCG2 variánsok plazmamembránban való megjelenésének detektálásához kifejlesztettem egy módszert, mely során egy külső epitópot felismerő, fluorofórral kapcsolt ellenanyaggal (5D3) jelöltem meg a sejt felszínre érkező transzportert. Megállapítottam, hogy a mindkét polimorf változat sejten belüli közlekedése hibás: a variánsok egy jelentős része az ER-ben marad; glikozilációjuk és plazmamembránba való kijutásuk a vad típushoz viszonyítva jóval lassabb. Az ABCG2 variánsok expresszióját és lokalizációját a szokásos farmakológiai kezelésekkel (4-PBA, MG132, Bafilomycin A1) nem lehetett javítani a dinamikus RUSH rendszerben.

Kutatási eredményeim közelebb vittek a trafficking mutáns ABCG2 fehérjék sejten belüli közlekedésének jobb megértéséhez. Ezen felül ez a módszer alkalmas olyan további hatóanyagok tesztelésére, melyek elősegíthetik a polimorf ABCG2 variánsok sejt felszínre történő kihelyeződését.

9. SUMMARY

The human ABCG2 is a transmembrane transporter, the main function of which is protecting the body and the cells from endo- and xenobiotics. ABCG2 is expressed in the apical plasma membrane of epithelial and endothelial cells constituting various physiological barriers. Proper localization of ABCG2 is required for correct transport function. ABCG2 plays a key role in uric acid elimination; therefore, its dysfunction may lead to hyperuricemia or gout.

The recently identified ABCG2 variant M71V exhibits markedly lower cell surface expression levels in human erythrocytes. As the first part of my research, I have accomplished the *in vitro* characterization of the ABCG2-M71V variant using classical biochemical and molecular biology approaches. My results confirmed the reduced expression of this variant in an *in vitro* system, as well as demonstrated its preserved functionality. The major intracellular localization of M71V suggests impaired trafficking; however, a small portion of this variant was also detected in the plasma membrane and specifically in the apical membrane domain of polarized cells.

To explore the trafficking of the wild type ABCG2 and its two polymorphic variants associated with gout (M71V and Q141K), I have employed the RUSH system. I have developed a method for detecting the cell surface appearance of the ABCG2 variants using a fluorophore-conjugated antibody recognizing an extracellular epitope of ABCG2 (5D3). I found that both polymorphic ABCG2 variants have major trafficking problems: a substantial portion of the variants retained in the ER; their glycosylation and plasma membrane delivery are delayed as compared to the wild type. Conventional pharmacological treatments (4-PBA, MG132, Bafilomycin A1) were unable to improve the expression and localization of these polymorphic ABCG2 variants in the RUSH system.

My results contribute to better understanding of the cellular routing of the trafficking mutants of ABCG2. In addition, I have demonstrated the applicability of my method for testing agents that potentially improve cell surface delivery of polymorphic ABCG2 variants.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Berger, E.A., Heppel, L.A. (1974) Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 249, 7747-7755.
2. Higgins, C., Haag, P., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G., Ames, G.F.-L. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*, 298, 723-727.
3. Gilson, E., Higgins, C.F., Hofnung, M., Ames, G.F.-L., Nikaido, H. (1982) Extensive homology between membrane-associated components of histidine and maltose transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 257, 9915-9918.
4. Juliano, R.L., Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 455, 152-162.
5. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1, 945-951.
6. Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F. (1990) Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346, 362-365.
7. Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V. (1986) Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, 324, 485-489.

8. Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323, 448-450.
9. Gros, P., Croop, J., Housman, D. (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47, 371-380.
10. Chen, C.-j., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47, 381-389.
11. Tomii, K., Kanehisa, M. (1998) A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res*, 8, 1048-1059.
12. Ferro-Luzzi Ames, G., Mimura, C.S., Holbrook, S.R., Shyamala, V. (1992) Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *Escherichia coli* to humans. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 65, 1-47.
13. Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 317-364.
14. Hollenstein, K., Frei, D.C., Locher, K.P. (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, 446, 213-216.
15. Holland, I.B., Blight, M.A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*, 293, 381-399.
16. Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2002) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11, 1156-1166.

17. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-s., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.C., Tsui, L.-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066-1073.
18. Graf, G.A., Yu, L., Li, W.-P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*, 278, 48275-48282.
19. Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D.D., Miyake, K., Resau, J.H., Bates, S.E. (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci*, 113, 2011-2021.
20. Wilkens, S. (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14.
21. Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113.
22. Hung, L.-W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, G.F.-L., Kim, S.-H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, 396, 703-707.
23. Hopfner, K.-P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., Tainer, J.A. (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, 101, 789-800.
24. Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, 10, 139-149.

25. Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L., Quioco, F.A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, 12, 651-661.
26. Crow, A., Greene, N.P., Kaplan, E., Koronakis, V. (2017) Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. *Proc Natl Acad Sci*, 114, 12572-12577.
27. Mächtel, R., Narducci, A., Griffith, D.A., Cordes, T., Orelle, C. (2019) An integrated transport mechanism of the maltose ABC importer. *Res Microbiol*, 170, 321-337.
28. Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D.W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3, 1-10.
29. Klein, I., Sarkadi, B., Váradi, A. (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1461, 237-262.
30. Dean, M., Allikmets, R. (2001) Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*, 33, 475-479.
31. Albrecht, C., Vitorro, E. (2007) The ABCA subfamily—gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflügers Archiv/European Journal of Physiology*, 453, 581-589.
32. Quazi, F., Lenevich, S., Molday, R.S. (2012) ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nat Commun*, 3, 1-9.
33. Tsybovsky, Y., Molday, R.S., Palczewski, K. (2010) The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv Exp Med Biol*, 703, 105-125.

34. Elferink, R.P.O., Paulusma, C.C. (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflügers Archiv/European Journal of Physiology*, 453, 601-610.
35. Thompson, R., Strautnieks, S. (2001) BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis.* 21, 545-550.
36. Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G.J. (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, 261, 769-771.
37. Shepherd, J.C., Schumacher, T.N., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway Jr, C.A., Tonegawa, S. (1993) TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell*, 74, 577-584.
38. Androlewicz, M.J., Anderson, K.S., Cresswell, P. (1993) Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 9130-9134.
39. Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G., Schuetz, J.D. (2006) Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*, 443, 586-589.
40. Demirel, Ö., Jan, I., Wolters, D., Blanz, J., Saftig, P., Tampé, R., Abele, R. (2012) The lysosomal polypeptide transporter TAPL is stabilized by interaction with LAMP-1 and LAMP-2. *J Cell Sci*, 125, 4230-4240.
41. Choudhuri, S., Klaassen, C.D. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol*, 25, 231-259.
42. Váradi, A., Szabó, Z., Pomozi, V., de Boussac, H., Fulop, K., Arányi, T. (2011) ABCC6 as a target in pseudoxanthoma elasticum. *Curr Drug Targets*, 12, 671-682.

43. Jansen, R.S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Váradi, A., Plomp, A., Bergen, A.A., Oude Elferink, R.P., Borst, P. (2014) ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation—Brief report. *Arterio Thromb Vasc Biol*, 34, 1985-1989.
44. Cant, N., Pollock, N., Ford, R.C. (2014) CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Mol Biol*, 52, 15-25.
45. Bryan, J., Muñoz, A., Zhang, X., Düfer, M., Drews, G., Krippel-Drews, P., Aguilar-Bryan, L. (2007) ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels. *Pflügers Archiv/European Journal of Physiology*, 453, 703-718.
46. Morita, M., Imanaka, T. (2012) Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1822, 1387-1396.
47. Kerr, I.D. (2004) Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 166-173.
48. Zhao, Z., Fang, L.L., Johnsen, R., Baillie, D.L. (2004) ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 323, 104-111.
49. Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W.E., Porsch-Özcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., Schmitz, G. (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 817-822.
50. Bojanic, D.D., Tarr, P.T., Gale, G.D., Smith, D.J., Bok, D., Chen, B., Nusinowitz, S., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., Edwards, P.A. (2010) Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J Lipid Res*, 51, 169-181.

51. Uehara, Y., Yamada, T., Baba, Y., Miura, S.-i., Abe, S., Kitajima, K., Higuchi, M.-a., Iwamoto, T., Saku, K. (2008) ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. *Brain Res*, 1217, 239-246.
52. Lee, M.-H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, G., Dean, M., Patel, S.B. (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*, 27, 79-83.
53. Yu, X.-H., Qian, K., Jiang, N., Zheng, X.-L., Cayabyab, F.S., Tang, C.-K. (2014) ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 428, 82-88.
54. Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 15665-15670.
55. Knutsen, T., Rao, V.K., Ried, T., Mickley, L., Schneider, E., Miyake, K., Ghadimi, B.M., Padilla-Nash, H., Pack, S., Greenberger, L., Cowan, K., Dean, M., Fojo, T., Bates, S. (2000) Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosom Cancer*, 27, 110-116.
56. Bailey-Dell, K.J., Hassel, B., Doyle, L.A., Ross, D.D. (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr*, 1520, 234-241.
57. Wang, H., Lee, E.-W., Cai, X., Ni, Z., Zhou, L., Mao, Q. (2008) Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry*, 47, 13778-13787.

58. Henriksen, U., Fog, J.U., Litman, T., Gether, U. (2005) Identification of intra-and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Biol Chem*, 280, 36926-36934.
59. Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiba, S., Ishikawa, T. (2009) Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J*, 276, 7237-7252.
60. Mo, W., Zhang, J.-T. (2012) Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol*, 3, 1-27.
61. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y. (2002) Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer*, 97, 626-630.
62. ter Beek, J., Guskov, A., Slotboom, D.J. (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*, 143, 419-435.
63. Locher, K.P. (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 487-493.
64. Jackson, S.M., Manolaridis, I., Kowal, J., Zechner, M., Taylor, N.M., Bause, M., Bauer, S., Bartholomaeus, R., Bernhardt, G., Koenig, B., Buschauer, A., Stahlberg, H., Altmann, K.-H., Locher, K.P. (2018) Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nat Struct Mol Biol*, 25, 333-340.
65. Manolaridis, I., Jackson, S.M., Taylor, N.M., Kowal, J., Stahlberg, H., Locher, K.P. (2018) Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*, 563, 426-430.

66. McDevitt, C.A., Crowley, E., Hobbs, G., Starr, K.J., Kerr, I.D., Callaghan, R. (2008) Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *FEBS J*, 275, 4354-4362.
67. Eckenstaler, R., Benndorf, R.A. (2020) 3D structure of the transporter ABCG2—What's new? *Br J Pharmacol*, 177, 1485-1496.
68. Khunweeraphong, N., Szöllösi, D., Stockner, T., Kuchler, K. (2019) The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid. *Nat Commun*, 10, 1-14.
69. Wright, J., Muench, S.P., Goldman, A., Baker, A. (2018) Substrate polyspecificity and conformational relevance in ABC transporters: new insights from structural studies. *Biochem Soc Trans*, 46, 1475-1484.
70. Robey, R.W., To, K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., Bates, S.E. (2009) ABCG2: a perspective. *Adv Drug Del Rev*, 61, 3-13.
71. Xia, C.Q., Yang, J.J., Gan, L.-S. (2005) Breast cancer resistance protein in pharmacokinetics and drug–drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1, 595-611.
72. Robey, R., Honjo, Y., Morisaki, K., Nadjem, T., Runge, S., Risbood, M., Poruchynsky, M., Bates, S. (2003) Mutations at amino-acid 482 in the ABCG 2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer*, 89, 1971-1978.
73. Alqawi, O., Bates, S., Georges, E. (2004) Arginine482 to threonine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 inhibits rhodamine 123 transport while increasing binding. *Biochem J*, 382, 711-716.
74. Özvegy-Laczka, C., Köblös, G., Sarkadi, B., Váradi, A. (2005) Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1668, 53-63.

75. Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.-W., Medina-Pérez, W.Y., Robey, R.W., Van De Laar, A., Litman, T., Dean, M., Bates, S.E. (2001) Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res*, 61, 6635-6639.
76. Honjo, Y., Morisaki, K., Huff, L.M., Robey, R.W., Hung, J., Dean, M., Bates, S.E. (2002) Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther*, 1, 696-702.
77. Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C., Drewe, J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem Pharmacol*, 70, 695-699.
78. Takada, T., Ichida, K., Matsuo, H., Nakayama, A., Murakami, K., Yamanashi, Y., Kasuga, H., Shinomiya, N., Suzuki, H. (2014) ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 33, 275-281.
79. Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plösch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P.O., Rosing, H. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci*, 99, 15649-15654.
80. Dietrich, C., Geier, A., Elferink, R.O. (2003) ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, 52, 1788-1795.
81. Schnepf, R., Zolk, O. (2013) Effect of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 on pharmacokinetics: experimental findings and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 9, 287-306.
82. Hediger, M.A., Johnson, R.J., Miyazaki, H., Endou, H. (2005) Molecular physiology of urate transport. *Physiology*, 20, 125-133.

83. Mizuno, N., Suzuki, M., Kusuhara, H., Suzuki, H., Takeuchi, K., Niwa, T., Jonker, J.W., Sugiyama, Y. (2004) Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5, 7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metab Disposition*, 32, 898-901.
84. Huang, L., Be, X., Tchapanian, E.H., Colletti, A.E., Roberts, J., Langley, M., Ling, Y., Wong, B.K., Jin, L. (2012) Deletion of *Abcg2* has differential effects on excretion and pharmacokinetics of probe substrates in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 343, 316-324.
85. Cooray, H.C., Blackmore, C.G., Maskell, L., Barrand, M.A. (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*, 13, 2059-2063.
86. Zhang, W., Mojsilovic-Petrovic, J., Andrade, M.F., Zhang, H., Ball, M., Stanimirovic, D.B. (2003) Expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J*, 17, 1-24.
87. Aronica, E., Gorter, J.A., Redeker, S., Van Vliet, E.A., Ramkema, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Van Der Valk, P., Leenstra, S., Baayen, J.C., Spliet, W.G.M., Troost, D. (2005) Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia*, 46, 849-857.
88. Enokizono, J., Kusuhara, H., Ose, A., Schinkel, A.H., Sugiyama, Y. (2008) Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab Disposition*, 36, 995-1002.
89. Enokizono, J., Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2007) Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol*, 72, 967-975.

90. Adeoya-Osiguwa, S., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S., Fraser, L. (2003) 17β -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod*, 18, 100-107.
91. Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K.-M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P.R., Horn, T., Skovsgaard, T., Bates, S.E. (2002) Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1565, 6-16.
92. Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van de Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H. (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*, 61, 3458-3464.
93. Scharenberg, C.W., Harkey, M.A., Torok-Storb, B. (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99, 507-512.
94. Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.-M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., Sorrentino, B.P. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7, 1028-1034.
95. Bunting, K.D. (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*, 20, 11-20.
96. van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2007) Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol*, 27, 1247-1253.
97. Vlaming, M.L., Lagas, J.S., Schinkel, A.H. (2009) Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Adv Drug Del Rev*, 61, 14-25.

98. van Herwaarden, A.E., Schinkel, A.H. (2006) The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 10-16.
99. Maliepaard, M., van Gastelen, M.A., de Jong, L.A., Pluim, D., van Waardenburg, R.C., Ruevekamp-Helmers, M.C., Floot, B.G., Schellens, J.H. (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res*, 59, 4559-4563.
100. Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E. (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*, 59, 8-13.
101. Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L.A., Ross, D.D., Kohno, S. (2001) Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 1216-1223.
102. Turner, J.G., Gump, J.L., Zhang, C., Cook, J.M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, M.J., Dalton, W.S., Sullivan, D.M. (2006) ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 108, 3881-3889.
103. Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R., Ross, D.D. (2012) Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*, 83, 1084-1103.
104. Ross, D.D., Karp, J.E., Chen, T.T., Doyle, L.A. (2000) Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia: Presented in part at the Fortieth Annual Meeting of the American Society of Hematology, Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood*, 96, 365-368.

105. Plasschaert, S.L., van der Kolk, D.M., de Bont, E.S., Kamps, W.A., Morisaki, K., Bates, S.E., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Vellenga, E., de Vries, E.G. (2003) The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 9, 5171-5177.
106. Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P., Doyle, L.A. (1999) Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 91, 429-433.
107. Candeil, L., Gourdier, I., Peyron, D., Vezzio, N., Copois, V., Bibeau, F., Orsetti, B., Scheffer, G.L., Ychou, M., Khan, Q.A., Pommier, Y., Pau, B., Martineau, P., Del Rio, M. (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer*, 109, 848-854.
108. Rao, V.K., Wangsa, D., Robey, R.W., Huff, L., Honjo, Y., Hung, J., Knutsen, T., Ried, T., Bates, S.E. (2005) Characterization of ABCG2 gene amplification manifesting as extrachromosomal DNA in mitoxantrone-selected SF295 human glioblastoma cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 160, 126-133.
109. To, K.K., Polgar, O., Huff, L.M., Morisaki, K., Bates, S.E. (2008) Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Mol Cancer Res*, 6, 151-164.
110. Nakano, H., Nakamura, Y., Soda, H., Kamikatahira, M., Uchida, K., Takasu, M., Kitazaki, T., Yamaguchi, H., Nakatomi, K., Yanagihara, K., Kohno, S., Tsukamoto, K. (2008) Methylation status of breast cancer resistance protein detected by methylation-specific polymerase chain reaction analysis is correlated inversely with its expression in drug-resistant lung cancer cells. *Cancer*, 112, 1122-1130.

111. Ee, P.L.R., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X., Ross, D.D., Beck, W.T. (2004) Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res*, 64, 1247-1251.
112. Wang, H., Lee, E.-W., Zhou, L., Leung, P.C., Ross, D.D., Unadkat, J.D., Mao, Q. (2008) Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Mol Pharmacol*, 73, 845-854.
113. Nakamichi, N., Morii, E., Ikeda, J.-i., Qiu, Y., Mamato, S., Tian, T., Fukuhara, S., Aozasa, K. (2009) Synergistic effect of interleukin-6 and endoplasmic reticulum stress inducers on the high level of ABCG2 expression in plasma cells. *Lab Invest*, 89, 327-336.
114. Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., Schuetz, J.D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*, 279, 24218-24225.
115. Nakanishi, T., Ross, D.D. (2012) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer*, 31, 73-99.
116. Szatmari, I., Vámosi, G., Brazda, P., Balint, B.L., Benko, S., Széles, L., Jeney, V., Özvegy-Laczka, C., Szántó, A., Barta, E., Balla, J., Sarkadi, B., Nagy, L. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor γ -regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem*, 281, 23812-23823.
117. Tan, K.P., Wang, B., Yang, M., Boutros, P.C., MacAulay, J., Xu, H., Chuang, A.I., Kosuge, K., Yamamoto, M., Takahashi, S., Wu, A.M.L., Ross, D.D., Harper, P.A., Ito, S. (2010) Aryl hydrocarbon receptor is a transcriptional activator of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Pharmacol*, 78, 175-185.

118. Liao, R., Sun, J., Zhang, L., Lou, G., Chen, M., Zhou, D., Chen, Z., Zhang, S. (2008) MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem*, 104, 805-817.
119. Li, X., Pan, Y.-Z., Seigel, G.M., Hu, Z.-H., Huang, M., Yu, A.-M. (2011) Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328,-519c and-520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 81, 783-792.
120. To, K.K., Robey, R.W., Knutsen, T., Zhan, Z., Ried, T., Bates, S.E. (2009) Escape from hsa-miR-519c enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2. *Mol Cancer Ther*, 8, 2959-2968.
121. Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J., Arias, I.M. (2005) Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 15087-15092.
122. Kipp, H., Arias, I. (2000) Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin Liver Dis*. 20, 339-352.
123. Kipp, H., Pichetshote, N., Arias, I.M. (2001) Transporters on demand intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem*, 276, 7218-7224.
124. Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R.L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., Epstein-Barash, H., Kuchimanchi, S., Peng, C.G., Ruda, V.M., Del Conte-Zerial, P., Hengstler, J.G., Kalaidzidis, Y., Koteliansky, V., Zerial, M. (2012) Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485, 465-470.
125. Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Komada, M., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K., Ishikawa, T. (2008) Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem J*, 411, 623-631.

126. Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143, 1883-1898.
127. Basseville, A., Tamaki, A., Ierano, C., Trostel, S., Ward, Y., Robey, R.W., Hegde, R.S., Bates, S.E. (2012) Histone deacetylase inhibitors influence chemotherapy transport by modulating expression and trafficking of a common polymorphic variant of the ABCG2 efflux transporter. *Cancer Res*, 72, 3642-3651.
128. Furukawa, T., Wakabayashi, K., Tamura, A., Nakagawa, H., Morishima, Y., Osawa, Y., Ishikawa, T. (2009) Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm Res*, 26, 469-479.
129. Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshihara, S., Hoshijima, K., Komada, M., Ishikawa, T. (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J Biol Chem*, 282, 27841-27846.
130. Sarkadi, B., Homolya, L., Hegedűs, T. (2020) The ABCG2/BCRP transporter and its variants—from structure to pathology. *FEBS Lett*, 594, 4012-4034.
131. Kao, S., Chong, S., Lee, C. (2000) The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in understanding complex disorders and pharmacogenomics. *Ann Acad Med Singap*, 29, 376-382.
132. Kondo, C., Suzuki, H., Itoda, M., Ozawa, S., Sawada, J.-i., Kobayashi, D., Ieiri, I., Mine, K., Ohtsubo, K., Sugiyama, Y. (2004) Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res*, 21, 1895-1903.
133. Zamber, C.P., Lamba, J.K., Yasuda, K., Farnum, J., Thummel, K., Schuetz, J.D., Schuetz, E.G. (2003) Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenet*, 13, 19-28.

134. Kobayashi, D., Ieiri, I., Hirota, T., Takane, H., Maegawa, S., Kigawa, J., Suzuki, H., Nanba, E., Oshimura, M., Terakawa, N., Otsubo, K., Mine, K., Sugiyama, Y. (2005) Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Disposition*, 33, 94-101.
135. Poonkuzhali, B., Lamba, J., Strom, S., Sparreboom, A., Thummel, K., Watkins, P., Schuetz, E. (2008) Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Disposition*, 36, 780-795.
136. Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki, Y., Sugimoto, Y. (2002) C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance *Mol Cancer Ther*, 1, 611-616.
137. de Jong, F.A., Marsh, S., Mathijssen, R.H., King, C., Verweij, J., Sparreboom, A., McLeod, H.L. (2004) ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clin Cancer Res*, 10, 5889-5894.
138. Woodward, O.M., Tukaye, D.N., Cui, J., Greenwell, P., Constantoulakis, L.M., Parker, B.S., Rao, A., Köttgen, M., Maloney, P.C., Guggino, W.B. (2013) Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proc Natl Acad Sci*, 110, 5223-5228.
139. Sarankó, H., Tordai, H., Telbisz, Á., Özvegy-Laczka, C., Erdős, G., Sarkadi, B., Hegedűs, T. (2013) Effects of the gout-causing Q141K polymorphism and a CFTR Δ F508 mimicking mutation on the processing and stability of the ABCG2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 437, 140-145.

140. Mizuarai, S., Aozasa, N., Kotani, H. (2004) Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer*, 109, 238-246.
141. Toyoda, Y., Mančíková, A., Krylov, V. (2019) Functional characterization of clinically-relevant rare variants in ABCG2 identified in a gout and hyperuricemia cohort. *Cells* 8: 363.
142. Toyoda, Y., Pavelcová, K., Bohatá, J., Ješina, P., Kubota, Y., Suzuki, H., Takada, T., Stiburkova, B. (2021) Identification of Two Dysfunctional Variants in the ABCG2 Urate Transporter Associated with Pediatric-Onset of Familial Hyperuricemia and Early-Onset Gout. *Int J Mol Sci*, 22, 1935.
143. Chen, L., Manautou, J.E., Rasmussen, T.P., Zhong, X.-b. (2019) Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2. *Acta Pharm Sin B*, 9, 659-674.
144. Woodward, O.M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W.B., Köttgen, M. (2009) Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 10338-10342.
145. Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., Takada, Y., Oikawa, Y., Inoue, H., Suzuki, K., Okada, R., Nishiyama, J., Domoto, H., Watanabe, S., Fujita, M., Morimoto, Y., Naito, M., Nishio, K., Hishida, A., Wakai, K., Asai, Y., Niwa, K., Kamakura, K., Nonoyama, S., Sakurai, Y., Hosoya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., Hamajima, N., Shinomiya, N. (2009) Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med*, 1, 5ra11-15ra11.

146. Cleophas, M., Joosten, L., Stamp, L.K., Dalbeth, N., Woodward, O.M., Merriman, T.R. (2017) ABCG2 polymorphisms in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches. *Pharmacogenomics Person Med* 10, 129-142.
147. Zhang, L., Spencer, K.L., Voruganti, V.S., Jorgensen, N.W., Fornage, M., Best, L.G., Brown-Gentry, K.D., Cole, S.A., Crawford, D.C., Deelman, E., Franceschini, N., Gaffo, A.L., Glenn, K.R., Heiss, G., Jenny, N.S., Kottgen, A., Li, Q., Liu, K., Matise, T.C., North, K.E., Umans, J.G., Kao, W.H.L. (2013) Association of functional polymorphism rs2231142 (Q141K) in the ABCG2 gene with serum uric acid and gout in 4 US populations: the PAGE Study. *Am J Epidemiol*, 177, 923-932.
148. Zhou, D., Liu, Y., Zhang, X., Gu, X., Wang, H., Luo, X., Zhang, J., Zou, H., Guan, M. (2014) Functional polymorphisms of the ABCG2 gene are associated with gout disease in the Chinese Han male population. *Int J Mol Sci*, 15, 9149-9159.
149. Matsuo, H., Nakayama, A., Sakiyama, M., Chiba, T., Shimizu, S., Kawamura, Y., Nakashima, H., Nakamura, T., Takada, Y., Oikawa, Y., Takada, T., Nakaoka, H., Abe, J., Inoue, H., Wakai, K., Kawai, S., Guang, Y., Nakagawa, H., Ito, T., Niwa, K., Yamamoto, K., Sakurai, Y., Suzuki, H., Hosoya, T., Ichida, K., Shimizu, T., Shinomiya, N. (2014) ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. *Sci Rep*, 4, 1-5.
150. Matsuo, H., Tsunoda, T., Ooyama, K., Sakiyama, M., Sogo, T., Takada, T., Nakashima, A., Nakayama, A., Kawaguchi, M., Higashino, T., Wakai, K., Ooyama, K., Hokari, R., Suzuki, H., Ichida, K., Inui, A., Fujimori, S., Shinomiya, N. (2016) Hyperuricemia in acute gastroenteritis is caused by decreased urate excretion via ABCG2. *Sci Rep*, 6, 1-6.
151. Feig, D.I., Kang, D.-H., Johnson, R.J. (2008) Uric acid and cardiovascular risk. *New Engl J Med*, 359, 1811-1821.

152. Várady, G., Szabó, E., Fehér, Á., Németh, A., Zámbó, B., Pákási, M., Janka, Z., Sarkadi, B. (2015) Alterations of membrane protein expression in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement (Amst)*, 1, 334-338.
153. Sarkadi, B., Várady, G., Kasza, I. (2013) Quantitative biomarkers in the erythrocyte membrane. EP2839293A2.
154. Várady, G., Cserepes, J., Németh, A., Szabó, E., Sarkadi, B. (2013) Cell surface membrane proteins as personalized biomarkers: where we stand and where we are headed. *Biomark Med*, 7, 803-819.
155. Zámbó, B., Bartos, Z., Mózner, O., Szabó, E., Várady, G., Poór, G., Pálinkás, M., Andrikovics, H., Hegedűs, T., Homolya, L., Sarkadi, B. (2018) Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Sci Rep*, 8, 1-13.
156. Hoque, K.M., Dixon, E.E., Lewis, R.M., Allan, J., Gamble, G.D., Phipps-Green, A.J., Kuhns, V.L.H., Horne, A.M., Stamp, L.K., Merriman, T.R., Dalbeth, N., Woodward, O.M. (2020) The ABCG2 Q141K hyperuricemia and gout associated variant illuminates the physiology of human urate excretion. *Nat Commun*, 11, 1-15.
157. Morisaki, K., Robey, R.W., Özvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K., Sarkadi, B., Bates, S.E. (2005) Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56, 161-172.
158. Zámbó, B. (2019) Membránfehérjék vizsgálata vörösvértesteken, a kapcsolódó genetikai variánsok azonosítása és jellemzése. Semmelweis University. 99.
159. Özvegy, C., Váradi, A., Sarkadi, B. (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem*, 277, 47980-47990.

160. Polgar, O., Robey, R.W., Morisaki, K., Dean, M., Michejda, C., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Tarasova, N., Bates, S.E. (2004) Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry*, 43, 9448-9456.
161. Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2, 48-58.
162. Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., De Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G., Perez, F. (2012) Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods*, 9, 493-498.
163. Telbisz, Á., Hegedüs, C., Váradi, A., Sarkadi, B., Özvegy-Laczka, C. (2014) Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites. *Drug Metab Disposition*, 42, 575-585.
164. Perez, F. (2010) Methods and kits for regulating intracellular trafficking of a target protein. WO/2010/142785.
165. Özvegy-Laczka, C., Laczkó, R., Hegedüs, C., Litman, T., Várady, G., Goda, K., Hegedüs, T., Dokholyan, N.V., Sorrentino, B.P., Váradi, A., Sarkadi, B. (2008) Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J Biol Chem*, 283, 26059-26070.
166. Özvegy-Laczka, C., Várady, G., Köblös, G., Ujhelly, O., Cervenak, J., Schuetz, J.D., Sorrentino, B.P., Koomen, G.-J., Váradi, A., Németh, K., Sarkadi, B. (2005) Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. *J Biol Chem*, 280, 4219-4227.
167. Taylor, N.M., Manolaridis, I., Jackson, S.M., Kowal, J., Stahlberg, H., Locher, K.P. (2017) Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546, 504-509.

168. Diop, N.K., Hrycyna, C.A. (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry*, 44, 5420-5429.
169. Ripperger, A., Benndorf, R.A. (2016) The C421A (Q141K) polymorphism enhances the 3'-untranslated region (3'-UTR)-dependent regulation of ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Biochem Pharmacol*, 104, 139-147.
170. Sobek, K.M., Cummings, J.L., Bacich, D.J., O'Keefe, D.S. (2017) Contrasting roles of the ABCG2 Q141K variant in prostate cancer. *Exp Cell Res*, 354, 40-47.
171. Zámbo, B., Móznér, O., Bartos, Z., Török, G., Várady, G., Telbisz, Á., Homolya, L., Orbán, T.I., Sarkadi, B. (2020) Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell Mol Life Sci*, 77, 365-378.
172. Stiburkova, B., Pavelcova, K., Zavada, J., Petru, L., Simek, P., Cepek, P., Pavlikova, M., Matsuo, H., Merriman, T.R., Pavelka, K., Pavlikova, M., Suzuki, H., Matsuo, H., Takada, T., Stiburkova, B. (2017) Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology*, 56, 1982-1992.
173. Kasza, I., Várady, G., Andrikovics, H., Koszarska, M., Tordai, A., Scheffer, G.L., Németh, A., Szakács, G., Sarkadi, B. (2012) Expression levels of the ABCG2 multidrug transporter in human erythrocytes correspond to pharmacologically relevant genetic variations. *PLoS One*, 7, e48423.
174. Polgar, O., Ediriwickrema, L.S., Robey, R.W., Sharma, A., Hegde, R.S., Li, Y., Xia, D., Ward, Y., Dean, M., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., Bates, S.E. (2009) Arginine 383 is a crucial residue in ABCG2 biogenesis. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1788, 1434-1443.
175. Storch, C.H., Eehalt, R., Haefeli, W.E., Weiss, J. (2007) Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and

- modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 323, 257-264.
176. Szilagyi, J.T., Vetrano, A.M., Laskin, J.D., Aleksunes, L.M. (2017) Localization of the placental BCRP/ABCG2 transporter to lipid rafts: role for cholesterol in mediating efflux activity. *Placenta*, 55, 29-36.
 177. Telbisz, Á., Müller, M., Özvegy-Laczka, C., Homolya, L., Szente, L., Váradi, A., Sarkadi, B. (2007) Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1768, 2698-2713.
 178. Marheineke, K., Grünewald, S., Christie, W., Reiländer, H. (1998) Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett*, 441, 49-52.
 179. Suaud, L., Miller, K., Panichelli, A.E., Randell, R.L., Marando, C.M., Rubenstein, R.C. (2011) 4-Phenylbutyrate stimulates Hsp70 expression through the Elp2 component of elongator and STAT-3 in cystic fibrosis epithelial cells. *J Biol Chem*, 286, 45083-45092.
 180. Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., Siebert, P. (2000) "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science*, 290, 1585-1588.
 181. Baker, S.M., Buckheit, R.W., Falk, M.M. (2010) Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol*, 11, 1-10.
 182. Klonis, N., Rug, M., Harper, I., Wickham, M., Cowman, A., Tilley, L. (2002) Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur Biophys J*, 31, 36-51.

183. Matlin, K.S., Simons, K. (1983) Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell*, 34, 233-243.
184. Saraste, J., Kuismanen, E. (1984) Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell*, 38, 535-549.
185. Scales, S.J., Pepperkok, R., Kreis, T.E. (1997) Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*, 90, 1137-1148.
186. Kreis, T.E., Lodish, H.F. (1986) Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell*, 46, 929-937.
187. Lafay, F. (1974) Envelope proteins of vesicular stomatitis virus: effect of temperature-sensitive mutations in complementation groups III and V. *J Virol*, 14, 1220-1228.
188. Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., Lippincott-Schwartz, J. (1998) Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of Golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol*, 143, 1485-1503.
189. Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., Lippincott-Schwartz, J. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*, 389, 81-85.
190. Rivera, V.M., Wang, X., Wardwell, S., Courage, N.L., Volchuk, A., Keenan, T., Holt, D.A., Gilman, M., Orci, L., Cerasoli, F., Rothman, J.E., Clackson, T. (2000) Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 287, 826-830.

191. Kuhn, Y., Sanchez, C.P., Ayoub, D., Saridaki, T., Van Dorsselaer, A., Lanzer, M. (2010) Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in *Plasmodium falciparum*. *Traffic*, 11, 236-249.
192. Saridaki, T., Sanchez, C.P., Pfahler, J., Lanzer, M. (2008) A conditional export system provides new insights into protein export in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, 10, 2483-2495.
193. Sawyer, G.W., Ehlert, F.J., Hart, J.P. (2006) Determination of the rate of muscarinic M1 receptor plasma membrane delivery using a regulated secretion/aggregation system. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 53, 219-233.
194. Szent-Gyorgyi, C., Schmidt, B.F., Creeger, Y., Fisher, G.W., Zakel, K.L., Adler, S., Fitzpatrick, J.A., Woolford, C.A., Yan, Q., Vasilev, K.V., Berget, P.B., Bruchez, M.P., Jarvik, J.W., Waggoner, A. (2008) Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins. *Nat Biotechnol*, 26, 235-240.
195. Perkins, L.A., Bruchez, M.P. (2020) Fluorogen activating protein toolset for protein trafficking measurements. *Traffic*, 21, 333-348.
196. Orbán, T.I., Seres, L., Özvegy-Laczka, C., Elkind, N.B., Sarkadi, B., Homolya, L. (2008) Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 367, 667-673.
197. Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Hayakawa, T. (2000) IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 1, 376-382.
198. Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., Sarkadi, B. (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 111-117.

199. Hou, H., Sun, H., Lu, P., Ge, C., Zhang, L., Li, H., Zhao, F., Tian, H., Zhang, L., Chen, T. (2013) Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 12, 2874-2884.
200. Lehle, L., Tanner, W. (1976) The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett*, 71, 167-170.
201. Freeze, H.H., Kranz, C. (2010) Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Curr Protoc Mol Biol*, 89, 17.13 A. 11-17.13 A. 25.
202. Zeitlin, P.L. (2000) Pharmacologic restoration of $\alpha\delta$ F508 CFTR-mediated chloride current. *Kidney Int*, 57, 832-837.
203. Peng, H., Qi, J., Dong, Z., Zhang, J.-T. (2010) Dynamic vs static ABCG2 inhibitors to sensitize drug resistant cancer cells. *PLoS One*, 5, e15276.
204. Studzian, M., Bartosz, G., Pulaski, L. (2015) Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: trafficking mechanisms and intracellular fate. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1853, 1759-1771.
205. Sai, Y., Nies, A.T., Arias, I.M. (1999) Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J Cell Sci*, 112, 4535-4545.
206. De Rosa, M.F., Sillence, D., Ackerley, C., Lingwood, C. (2004) Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem*, 279, 7867-7876.
207. Fu, D., van Dam, E.M., Brymora, A., Duggin, I.G., Robinson, P.J., Roufogalis, B.D. (2007) The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1773, 1062-1072.

208. Pomozi, V., Brampton, C., Szeri, F., Dedinszki, D., Kozák, E., van de Wetering, K., Martin, L., Váradi, A., Le Saux, O. (2017) Functional rescue of ABCC6 deficiency by 4-phenylbutyrate therapy reduces dystrophic calcification in *Abcc6*^{-/-} mice. *J Invest Dermatol*, 137, 595-602.
209. Osowski, C.M., Urano, F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Methods Enzymol*. Elsevier, Vol. 490, pp. 71-92.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Zámbó B, Bartos Z, Mózner O, Szabó E, Várady G, Poór G, Pálinkás M, Andrikovics H, Hegedus T, Homolya L & Sarkadi B. Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Sci. Rep.* 2018;8(1):7487.

IF= 4,011

Bartos Z, Homolya L. Identification of specific trafficking defects of naturally occurring variants of the human ABCG2 transporter. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:615729.

IF=5,186*

11.2 Disszertációtól független közlemények:

Bistakova J, Forgacs Z, Bartos Z, Szivosne MR, Jambor T, Knazicka Z, Tvrda E, Libova L, Goc Z, Massanyi P, Lukac N. Effects of 4-nonylphenol on the steroidogenesis of human adrenocarcinoma cell line (NCI-H295R). *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2017;52(3):221-227.

IF=1,561

Mózner O, Bartos Z, Zámbó B, Homolya L, Hegedűs T, Sarkadi B. Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism. *Cells.* 2019;8(10):1215.

IF=4,366

Zámbó B, Mózner O, Bartos Z, Török G, Várady G, Telbisz Á, Homolya L, Orbán T, Sarkadi B. Cellular expression and function of naturally occurring missense variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell Mol Life Sci*, 2020;77(2):365-378.

IF=6,496*

Becky D, Szabó K, Gajdos T, Gyulai-Nagy S, Al-Gaadi D, Bartos Z, Balind A, Csernoch L, Dux L, Horvath P, Erdelyi M, Homolya L, Szentesi P, Keller-Pinter A. Syndecan-4 expression modulates cell polarity and migration by influencing centrosome positioning and intracellular calcium distribution. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 575227.

IF=5,186*

* Várható IF érték.

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, Dr. Homolya Lászlónak, aki biztosított kutatásaimhoz az anyagi és szakmai háttérrel, munkámhoz rengeteg tanácsot és segítséget nyújtott és támogatta konferenciákon való szerepléseimet.

Köszönettel tartozom továbbá csoportunk többi tagjának: Török Györgynek és Hegyi Zoltánnak, akik segítettek elindulni a mikroszkópozás csodálatos világában, Lilienberg Julinak, akivel mindig támogattuk egymást PhD éveink során, Bézsényi Gyöngyinek, aki a laboratóriumi munkámat segítette és Rieth Katának, aki mindennapi ügyintézésben segíti az életünket.

Nagy köszönettel tartozom Zámbó Boglárkának, akivel a közös elsőszerzős publikációkhoz rengeteget dolgoztunk együtt, mindig párhuzamosan egymást kiegészítve. Nagyon élveztem ezt az időszakot, mert egy szakmai és egy baráti társra találtam Bogi személyében. Továbbá köszönöm Mózner Orsinak, Bogi szakdolgozójának is, aki szorgosan assisztált mindkettőnk kísérleteihez.

Hálásan köszönöm Dr. Sarkadi Baláznak a közös és egyéni munkámhoz való rengeteg tanácsot és szakmai támogatást.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Hegedűs Tamásnak a közös munkáinkhoz való útmutatásért és segítségért.

Szeretném megköszönni az egész Biomembrán közösség minden tagjának a segítségét, hiszen itt mindig mindenki számíthatott egymásra.

Hálás köszönettel tartozom a kitartó támogatásért családomnak: Dr. Bartos Csillának, Tamás Arankának, Bartos Józsefnek és Ila mamának.

Disszertációm nem jöhetett volna létre párom, Tóth András fáradhatatlan támogatása és türelme nélkül, aki mindig segít álmaim megvalósításában.