

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu



**Molekularne podstawy selektywnego transportu
fenylopropanoidów przez białko ABCG46 z
*Medicago truncatula***

mgr inż. Konrad Mateusz Pakuła

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin
pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Jasińskiego

Promotor pomocniczy: Dr Jacek Kolanowski

Poznań 2022

Serdecznie dziękuję:

*Promotorowi, prof. dr hab. Michałowi Jasińskiemu,
za opiekę i możliwość rozwoju, dzielenie fascynacji nauką oraz zaufanie.*

*Całemu Zakładowi Fizjologii Molekularnej Roślin, a w szczególności dr inż. Wandzie Białej-
Leonhard, dr Joannie Banasiak, dr Aleksandrze Paweli i mgr Tomaszowi Jamruszce,
za wspólną pracę, życzliwość i pomocną dłoń.*

*Dr Jackowi Kolanowskiemu,
za służenie radą i gotowość do pomocy.*

*Współpracownikom, w szczególności prof Janowi Brezovskiemu, mgr Carlosowi Eduardo
Sequeiros Borjy, dr Markusowi Geislerowi i Jianowi Xia,
za wkład w prowadzone badania i rozwój naukowy.*

*Rodzicom
Za wychowanie, możliwość studiowania i rozwoju, wiarę we mnie.*

*I kochanej Julce,
za wsparcie, troskę, poświęcenie i wyrzeczenia.
Za bycie głównym źródłem siły i szczęścia w czasie doktoratu.*

*Pracę dedykuję moim babciom – Marysi i Czesi
Oraz ś.p. dziadkom Andrzejowi i Bronkowi.*

Praca została sfinansowana z następujących środków:

- Projekt POWER „Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii”, NCN, nr POWR.03.02.00-00-I032/16
- „Molekularne determinanty selektywnego transportu będącego udziałem roślinnych transporterów ABCG”, NCN OPUS 2017/27/B/NZ1/01090
kierownik: prof. dr hab. Michał Jasiński
- „Związek pomiędzy stymulacją aktywności ATPazowej a transportem na przykładzie selektywnego transportera ABCG z *Medicago truncatula*”, NCN PRELUDIUM 2021/41/N/NZ1/04030
kierownik: Mgr inż. Konrad Mateusz Pakuła

Publikacje powstałe w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

- Hao P, Xia J, Liu J, Di Donato M, **Pakuła K**, Bailly A, Jasiński M, Geisler, M. (2020). Auxin-transporting ABC transporters are defined by a conserved D/EP motif regulated by a prolylisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 13094-13105. (doi: 10.1074/jbc.RA120.014104)

Publikacje w trakcie recenzji, dostępne w formie „preprint”:

- **Pakuła K**, Sequeiros-Borja C, Biała-Leonhard W, Pawela A, Banasiak J, Bailly A., Radom M, Geisler M, Brezovsky J, Jasiński, M. (2022). A key residue of plant ABC transporter modulates access path geometry and phenylpropanoid substrate selectivity. *bioRxiv*. (doi: 10.1101/2022.08.16.503940)
- Aryal B, Xia J, Hu Z, Tsering T, Liu J, Huynh J, Fukao Y, Glöckner N, Huang H, Sáncho-Andrés G, **Pakuła K**, Gorzolka K, Zwiewka M, Nodzyński T, Harter K, Sánchez-Rodríguez C, Jasiński M, Rosahl S, Geisler M. (2022). A phospho-switch provided by LRR receptor-like kinase, ALK1/QSK1/KIN7, prioritizes ABCG36/PEN3/PDR8 transport toward defense. *bioRxiv*. (doi: 10.1101/2022.05.11.491457)

Streszczenie

Historycznie badania nad transporterami ABC (ATP binding cassette transporter – z ang. transportery z kasetą wiążącą ATP), prowadzone były głównie w kontekście oporności wielolekowej i ich roli jako molekularnych pomp, odpowiedzialnych za usuwanie szerokiej gamy związków chemicznych z komórek. Pomimo tego, że transportery ABC stanowią jedną z największych rodzin białkowych, molekularne podstawy ich działania wciąż nie zostały dobrze poznane. Białka te, obecne w każdym organizmie, są szczególnie liczne w królestwie roślin. Obserwowane w genomach roślin zwiększenie ilości genów kodujących białka ABC łączy się z przystosowaniem tych organizmów do osiadłego trybu życia na lądzie. Roślinne transportery ABC zaangażowane są w procesy fizjologiczne związane z rozwojem, a także z odpowiedzią na stres biotyczny i abiotyczny. Ich adaptacja do pełnienia zadań w zróżnicowanym i wyspecjalizowanym tle chemicznym przejawia się między innymi w selektywności względem transportowanych molekuł. Przykładem takiego selektywnego transportera jest białko ABCG46 z *Medicago truncatula*, odpowiedzialne za dystrybucję ściśle określonych prekursorów tj. kwasu *para*-kumarowego i likwiritigeniny w szlaku biosyntezy medikarpiny. MtABCG46 posłużył jako układ modelowy w przedstawionych w tej dysertacji badaniach, których celem była identyfikacja molekularnych podstaw selektywnego transportu będącego udziałem tego białka.

Wykorzystując analizy filogenetyczne i modelowanie *in silico* uzyskano trójwymiarową strukturę białka MtABCG46. Informacje strukturalne były podstawą do celowanej mutagenety, a przeprowadzone następnie eksperymenty biochemiczne i dynamika molekularna pozwoliły zidentyfikować elementy strukturalne kluczowe dla selektywnego transportu fenylopropanoidów z udziałem MtABCG46.

Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie korelacji między transportem a stymulacją aktywności ATPazowej dla roślinnych pełnych transporterów ABCG przez transportowane molekuly. Korelację taką można potencjalnie wykorzystać w badaniach przesiewowych jako metodę poszukiwania i powiązywania transporterów z ich endogennymi substratami.

Summary

Although ABC (ATP Binding Cassette) transporters form one of the largest protein family present in all of the known organisms, the molecular details of their functioning are still not fully understood. Historically the research concerning ABC proteins was focused on the context of the so called multidrug resistance phenomena, in which certain ABCs contribute as a membrane pumps extruding wide range of chemically diverse drugs outside the cell. Notably plants are especially rich in ABC transporters comparing to other organisms, which is postulated to be a consequence of adaptation to the sessile life style. In order to fulfill their role in various physiological processes, such as growth or response to biotic and abiotic stresses, some plant ABC transporters exhibit higher selectivity towards translocated molecules. An example of such is ABCG46 from *Medicago truncatula*, which is involved in distribution of highly specific precursors from the medicarpin pathway, namely liquiritigenin and *para*-coumaric acid. The aim of this work was identification of molecular determinants behind the MtABCG46 transport selectivity.

Combination of phylogenetic analyses and *in silico* modeling of the MtABCG46 structure enabled the rationally designed site directed mutagenesis. Next, based on the biochemical evaluation and molecular dynamics of MtABCG46 variants, amino acids and structural features crucial for selective transport of liquiritigenin and *para*-coumaric acid were successfully identified.

An additional aim of the work was to investigate the potential correlation between transport and ATPase activity stimulation of the full size ABCG transporters by translocated molecules. Such correlation could be potentially used as a method for identification of their endogenous substrates.

Wykaz skrótów

ABA – kwas abscysynowy (z ang. abscisic acid)

ACMA – 9-amino-6-chloro-2-metoksyakrydyna

ATP – adenozynotrifosforan

BCRP – białko odporności raka piersi (ABCG2) (z ang. Breast Cancer Resistance Protein)

Białka ABC – białka posiadające kasetę wiążącą ATP (z ang. ATP-binding cassette)

BNF – biologiczne wiązanie azotu (z ang. biological nitrogen fixation)

BSA – surowicza albumina bydłęca (z ang. Bovine serum albumine)

BY2 – *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2

CDR1 – białko oporności lekowej *Candida* (z ang. Candida Drug Resistance)

CFTR - błonowy regulator przewodnictwa związany z mukowiscydozą (z ang. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

Cryo-EM – mikroskopia krioelektronowa (z ang. Cryogenic Electron Microscopy),

DMSO - dimetylosulfotlenek

EV – pusty wektor (z ang. empty vector)

GFP – białko zielonej fluorescencji (z ang. Green Fluorescent Protein)

HPLC/MS – wysokosprawna chromatografia cieczowa/ spektrometria mas (z ang. High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)

IAA – kwas indolilo-3-octowy

IBA – kwas indolilo-3-masłowy

IF – konformacja skierowana do wewnątrz (z ang. Inward Facing)

LC/ESI/MS – chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ang. Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Mass Spectrometer)

MRP1 – białko odporności wielolekowej (z ang. Multidrug Resistance-associated Protein 1)

NBD – domena wiążąca nukleotyd białek ABC (z ang. Nucleotide Binding Domain)

NBS – miejsce wiązania nukleotydu (z ang. Nucleotide Binding Site)

OD – gęstość optyczna

OF – konformacja skierowana na zewnątrz (z ang. Outward Facing)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. Polymerase Chain Reaction)

PDR – białka pleiotropowej oporności lekowej (z ang. Pleiotropic Drug Resistance),

PEG – glikol polietylenowy (z ang. polyethylene glycol)

POPC – fosfatydylocholina palmitynowo-oleinowa

PVP – poliwinylpolipirrolidon (Polyclar ®)

RMSD – pierwiastek ze średniego kwadratu odległości pomiędzy odpowiadającymi sobie elementami optymalnie nałożonych struktur przestrzennych; miara używana do oceny podobieństwa struktur białkowych (z ang. Root Mean Square Deviation)

RMSF – pierwiastek ze średniego kwadratu fluktuacji, zależnego od czasu odchylenia pozycji atomu od wartości średniej (z ang. Root Mean Square Fluctuation)

SDS – Dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących (ang. SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TH – helisa transbłonowa (z ang. Transmembrane Helix)

TMD – domena transbłonowa (z ang. Transmembrane Domain)

TM-score – miara podobieństwa pomiędzy dwiema strukturami przestrzennymi białek (z ang. Template Modeling score)

Spis treści

1. WSTĘP	11
1.1. Białka ABC- wprowadzenie	11
1.2. Budowa transporterów ABC	14
1.2.1. Domeny i miejsca wiążące ATP	14
1.2.2. Domeny transbłonowe	17
1.2.3. Klasyfikacja strukturalna transporterów ABC	18
1.3. Mechanizm transportu	22
1.3.1. Cykl katalityczny	22
1.3.2. Aktywność ATPazowa	24
1.4. Badania nad transporterami ABCG	25
1.4.1. Białka ABCG i oporność wielolekowa	25
1.4.2. Strukturalne badania białek ABCG	26
1.4.3. Roślinne pełne transportery ABCG	30
1.4.4. Specyficzność substratowa transporterów ABCG	32
1.5. ABCG46 z <i>Medicago truncatula</i>	34
1.5.1. <i>Medicago truncatula</i> jako modelowa roślina bobowata	34
1.5.2. Szlak fenylpropanoidowy <i>Medicago truncatula</i>	35
1.5.3. Identyfikacja i charakterystyka MtABCG46	37
2. MATERIAŁY I METODY	38
2.1. Heterologiczny system ekspresji i uzyskanie hodowli zawieszinowych komórek BY2 do izolacji błon (MtABCG46)	38
2.1.1. Konstrukty genetyczne	38
2.1.2. Transformacja bakterii <i>Escherichia coli/ Agrobacterium tumefaciens</i> metodą elektroporacji	38
2.1.3. Hodowla i transformacja komórek kalusa tytoniu BY2	41
2.1.4. Mikroskopia konfokalna	43
2.1.5. Potwierdzenie poprawności sekwencji wariantów <i>MtABCG46</i> w liniach BY2	43
2.2. Heterologiczny system ekspresji i agroinfiltracja liści <i>Nicotiana benthamiana</i> do izolacji błon (AtABCG36)	47
2.2.1. Uprawa roślin <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
2.2.2. Agroinfiltracja liści tytoniu z użyciem <i>A. tumefaciens</i>	47
2.3. Otrzymywanie izolatów błon komórkowych i ocena jakości	49
2.3.1. Izolacja błon komórkowych	49
2.3.2. Wzbogacanie frakcji błony komórkowej	50
2.3.3. Analiza western blot	52
2.4. Biochemiczne eksperymenty transportu	55
2.4.1. Ocena szczelności pęcherzyków błonowych (test ACMA)	55
2.4.2. Eksperymenty transportu	56
2.4.3. Analiza HPLC/MS	57
2.5. Testy aktywności ATPazowej	59
2.6. Analizy filogenetyczne i modelowanie <i>in silico</i>	61

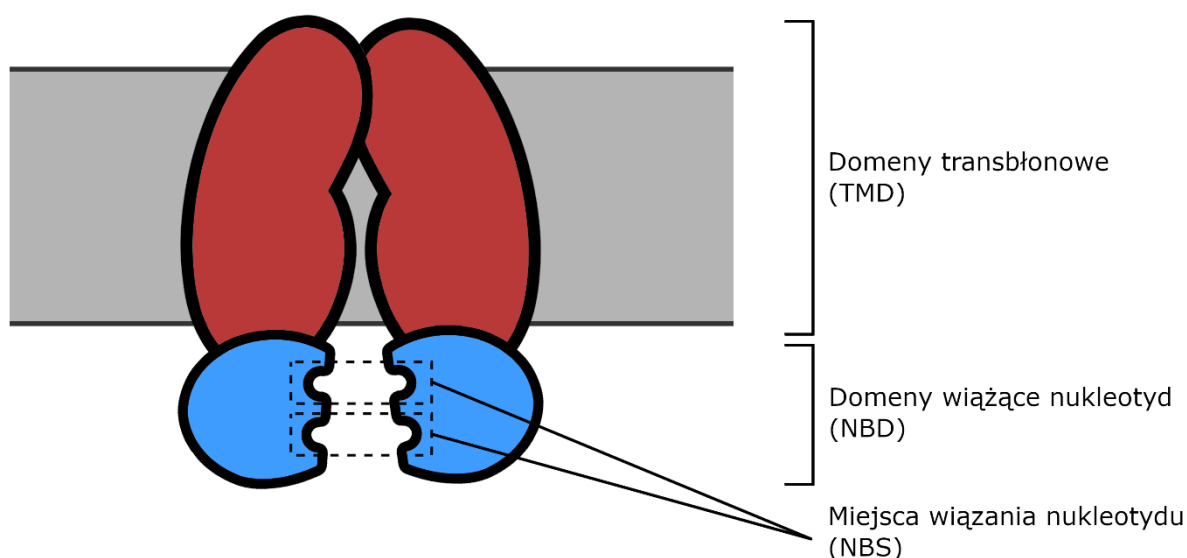
2.6.1.	Stworzenie zbioru sekwencji	61
2.6.2.	Analizy oparte o zbiór sekwencji	61
2.6.3.	Modelowanie z wykorzystaniem serwera I-TASSER	63
2.7.	Eksperymenty w oparciu o dynamikę molekularną	64
2.7.1.	Model AlphaFold2	64
2.7.2.	Dynamika molekularna	65
2.7.3.	Analizy <i>in silico</i> wariantów modelu MtABCG46	66
2.8.	Spis wykorzystanego oprogramowania i narzędzi internetowych	68
3.	CEL PRACY	69
4.	WYNIKI	70
4.1.	Modelowanie <i>in silico</i> MtABCG46	71
4.1.1.	Identyfikacja kieszeni centralnej w obrębie domen transbłonowych modelu MtABCG46	72
4.2.	Analizy filogenetyczne aminokwasów tworzących kieszeń centralną	76
4.3.	Heterologiczna ekspresja wariantów MtABCG46 w komórkach kalusa tytoniu BY2	79
4.4.	Eksperymenty biochemiczne transportu	82
4.4.1.	Izolacja błon i wzbogacanie frakcji błony komórkowej	82
4.4.2.	Eksperymenty transportu <i>in vitro</i> wybranych fenylopropanoidów <i>Medicago truncatula</i>	83
4.4.3.	Eksperymenty kompetycji transportu	86
4.5.	Symulacje Dynamiki molekularnej z wykorzystaniem modelu MtABCG46	87
4.5.1.	Uzyskanie modelu przy użyciu AlphaFold2	87
4.5.2.	Identyfikacja tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej MtABCG46	89
4.5.3.	Wpływ modyfikacji fenyloalaniny 562 na tunel prowadzący do kieszeni centralnej	91
4.5.4.	Analiza dostępu do kieszeni centralnej z wykorzystaniem fenylopropanoidów	93
4.5.5.	Wpływ modyfikacji w obrębie fenyloalaniny 562 na strukturę MtABCG46 i kieszeń centralną	96
4.6.	Stymulacja aktywności ATPazowej MtABCG46 przez molekuly transportowane	98
4.6.1.	Wykorzystanie stymulacji aktywności ATPazowej w badaniach nad ABCG36 z <i>A. thaliana</i>	100
5.	DYSKUSJA	102
6.	BIBLIOGRAFIA	112
7.	ZAŁĄCZNIKI	134

1. Wstęp

1.1. Białka ABC- wprowadzenie

Dwukierunkowa wymiana molekuł między komórką a środowiskiem jest dynamicznym procesem warunkującym jej istnienie i jednocześnie kontrolowanym przez swoiste bariery jakimi są błony biologiczne. Skalę tej wymiany ilustruje fakt, iż jedna, aktywna metabolicznie komórka *Escherichia coli* pochłania nawet $\sim 10^6$ molekuł glukozy na sekundę (Phillips & Stephen, 2006). Dla prawidłowego funkcjonowania i życia komórki muszą nie tylko nieustannie pobierać z otoczenia substancje odżywcze, ale również celowo uwalniać molekuły sygnałowe, a także pozbywać się toksycznych produktów własnego metabolizmu jak i ksenobiotyków. Poza kilkoma wyjątkami - jak na przykład cząsteczki tlenu - transport jonów, molekuł, a czasami nawet makromolekuł przez błony biologiczne odbywa się przy pomocy wyspecjalizowanych białek. Białka uczestniczące w transporcie stanowią znaczącą porcję wszystkich obecnych w komórce. Przykładowo, około 10% genomu *E. coli* zostało funkcjonalnie zakwalifikowanych jako geny kodujące białka transportujące (Blattner et al., 1997). Tę liczną grupę podzielono, biorąc za kryterium funkcje oraz filogenezę, na blisko 400 różnych rodzin (Busch & Saier, 2002). Wśród nich jedną z największych stanowi rodzina białek ABC (ATP Binding Cassette proteins – z ang. kasetta wiążąca ATP). Transportery ABC obecne są w każdym organizmie i warunkują jego prawidłowe funkcjonowanie. Dla przykładu, wspomniana już bakteria *E. coli* posiada 79 genów kodujących białka ABC, co odpowiada 5% jej genomu (Linton & Higgins, 1998). Choć wśród rodziny ABC znane są przykłady białek globularnych, to w zdecydowanej większości grupę tę tworzą białka transbłonowe, uczestniczące aktywnie w imporcie i eksporcie (Verrier et al., 2008). Wykorzystują one energię z wiązania i hydrolizy ATP do zmian konformacyjnych, których celem jest translokacja molekuł transportowanych (potocznie określanych jako substraty) na drugą stronę błony. Co ciekawe, w królestwie roślin transportery ABC są szczególnie liczne. Podczas gdy u człowieka zidentyfikowano ich 49, to rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*) - roślina modelowa o małym genomie - posiada ich 130, a u gatunków uprawnych takich jak chociażby soja (*Glycine max*), rzepak (*Brassica napus*), czy ziemniak (*Solanum tuberosum*) można znaleźć ich ponad 200 (Almén et al., 2009; Andolfo et al., 2015; Banasiak & Jasiński, 2022; Lopez-Ortiz et al., 2019; Mishra et al., 2019; Ye et al., 2014; X. D. Zhang et al., 2018).

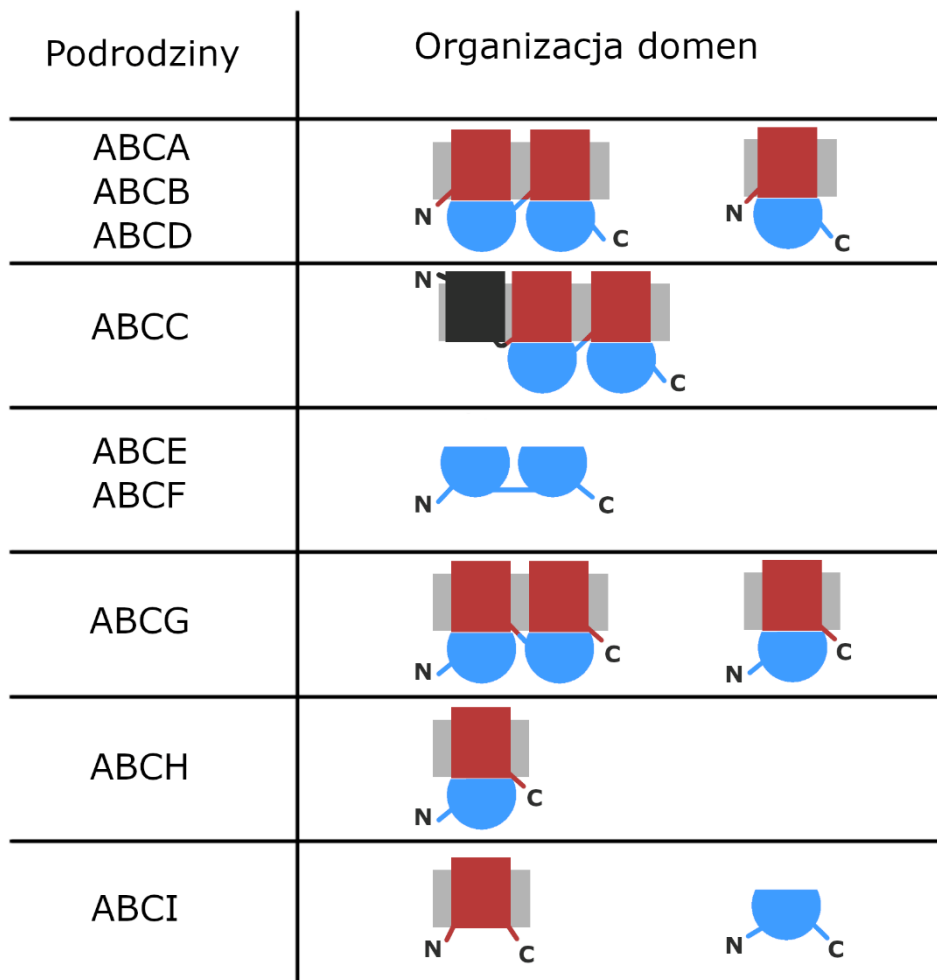
Białka ABC zbudowane są z dwóch rodzajów domen: (i) obecnej w cytozolu domeny NBD (Nucleotide Binding Domain – z ang. domena wiążąca nukleotydy) biorącej udział w wiązaniu ATP, oraz (ii) domeny transbłonowej TMD (Transmembrane Domain – z ang. domena transbłonowa). Funkcjonalny transporter zbudowany jest z dwóch TMD i dwóch NBD (Verrier et al., 2008). Domeny transbłonowe lokują białko w błonie i umożliwią translokację molekuł przez nią. Z kolei NBD tworzą część białka, która napędza zmiany konformacyjne wykorzystując energię pozyskaną poprzez wiązanie i hydrolizę ATP. Domeny tworzące funkcjonalny transporter ABC mogą być w postaci jednego łańcucha polipeptydowego - taki transporter nazywany jest wtedy „pełnym”, lub w postaci dwóch łańcuchów, zawierających po jednej domenie każdego rodzaju, które tworzą następnie homo- lub heterodimery (tzw. połowiczne transportery). W przypadku prokariotów występują również transportery, które tworzone są przez cztery jednodomenowe białka (Higgins, 2001; Licht & Schneider, 2011). Schematyczna organizacja domenowa transportera ABC została ukazana na rycinie 1.1.



Rycina 1.1. Schemat przedstawiający budowę kanonicznego transportera ABC. Dwuwarstwa lipidowa zaznaczona kolorem szarym, TMD – czerwonym, NBD – niebieskim.

Biorąc jako kryterium organizację domen a także ogólne podobieństwo sekwencyjne, białka ABC podzielono na dziewięć podrodzin – od ABCA do ABCI. U roślin zidentyfikowano jak dotąd białka ze wszystkich podrodzin poza ABCH (Hwang et al., 2016). Przyjęto,

iż organizacja domen, w której TMD jest pierwszą domeną tworzonego łańcucha polipeptydowego (tj. TMD-NBD-TMD-NBD, licząc od końca aminowego) nazwana zostanie „forward”, a odwrotna kolejność (NBD-TMD-NBD-TMD) – „reverse” (Verrier et al., 2008). Schematyczna organizacja poszczególnych podrodziny transporterów ABC została zilustrowana na rycinie 1.2. Należy wspomnieć, iż pomimo zwyczajowego nazywania białek z podrodziny ABCE i ABCF „transporterami”, nie są one zaangażowane w transport z racji nieposiadania domen transbłonowych. Biorą one udział w innych procesach takich jak chociażby regulacja translacji (Xiong et al., 2015).

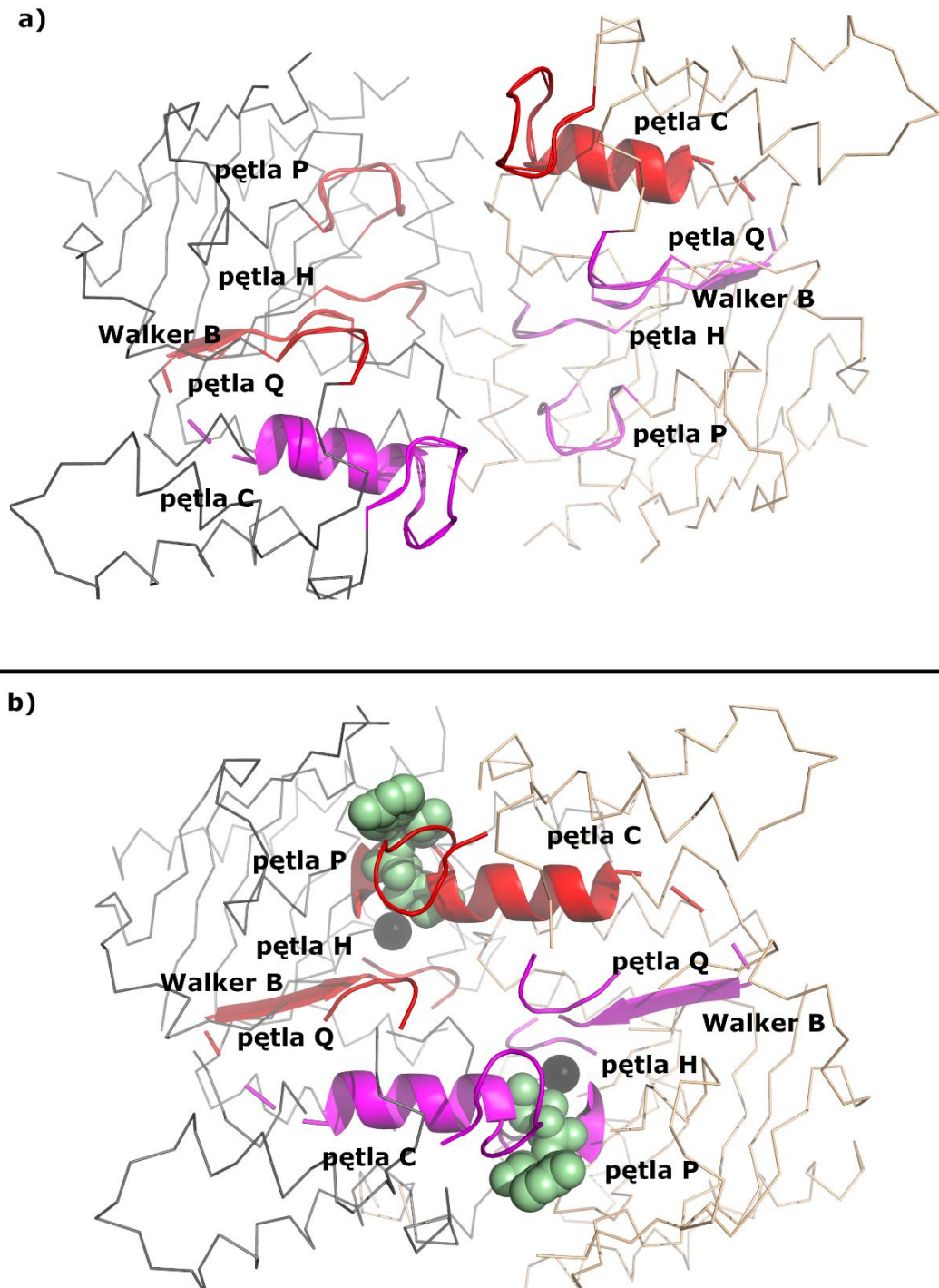


Rycina 1.2. Schematyczna organizacja domenowa poszczególnych podrodziny białek ABC. Domeny transbłonowe zostały przedstawione przy pomocy czerwonych prostokątów (dodatkowa, charakterystyczna dla ABCC dodatkowa domena TMD0 została oznaczona na czarno), a domeny wiążące nukleotydy zostały zaznaczone na niebiesko. Przy pomocy liter „N” i „C” zaznaczono kolejno N-koniec i C-koniec łańcucha polipeptydowego. Na podstawie Verrier et al., 2008 i Kang et al., 2011.

1.2. Budowa transporterów ABC

1.2.1. Domeny i miejsca wiążące ATP

Domeny wiążące ATP (NBD) charakteryzują się dużo większym niż TMD stopniem zachowawczości sekwencji – około 30 - 40% identyczności pomiędzy odległymi sekwencjami w obrębie podrodzin (Xiong et al., 2015). Wynika to z faktu, iż w większości budują one zachowawcze ewolucyjnie miejsce wiązania i hydrolizy ATP, tzw. NBS (Nucleotide Binding Site, z ang. miejsce wiązania nukleotydu). W domenach wiążących ATP wyróżnić można dwie podjednostki – poddomenę katalityczną („RecA-like”) oraz helikalną. W obrębie części katalitycznej zlokalizowane są charakterystyczne, zachowawcze motywy takie jak chociażby „pętla P” (ang. P-loop), zwana inaczej Walkerem A (GXXGXGK[ST]), Walker B (ϕ^4 [DE], gdzie ϕ oznacza aminokwas alifatyczny), oraz pętla Q i pętla H. W obrębie bardziej zróżnicowanej sekwencyjnie części helikalnej znajduje się natomiast tzw. sygnatura ABC nazywana również motywem/pętlą C lub sekwencją LSGGQ (XS[SG]GX³[RKA]X³[AG]). Domeny wiążące ATP ustawione są naprzeciw siebie w taki sposób, że Walker A jednej domeny ustawiony jest naprzeciw sygnatury ABC drugiej domeny tworząc miejsce wiązania cząsteczki ATP a także jej hydrolizy katalizowanej przez kwas glutaminowy w obrębie Walkera B (ryc. 1.3). Wiązanie cząsteczek ATP powoduje odwracalną dimeryzację domen, czego konsekwencją jest naprzemienne przyjmowanie przez białko tzw. konformacji skierowanej do wewnątrz (ang. Inward Facing - IF) oraz skierowanej na zewnątrz komórki (ang. Outward Facing – OF)(Locher, 2016). Dodatkowo, zachowawcze motywy takie jak wspomniane wcześniej pętla H i Q są odpowiedzialne za stabilizację, kontakt z domenami transbłonowymi czy wiązanie jonu magnezowego, będącego kofaktorem w hydrolizie (Jones et al., 2009; Licht & Schneider, 2011; Locher, 2016; Oswald et al., 2006).



Rycina 1.3. Widok od strony części transbłonowej transportera w kierunku cytozolu na organizację przestrzenną motywów tworzących miejsca wiązania nukleotydu (NBS): (a) w konformacji skierowanej do wewnątrz (IF) oraz (b) w konformacji do zewnątrz (OF), ze związanymi cząsteczkami ATP i jonami Mg^{2+} . Ilustracja stworzona na podstawie struktur ludzkiego transportera ABCG2 (numery PDB: 6VXF i 6HBU dla kolejno IF i OF). Poszczególne NBD zostały oznaczone na kolor szary i kremowy, motywy tworzące poszczególne NBS – kolor czerwony i fioletowy; ATP – kolor zielony; jony Mg^{2+} na czarno.

Sekwencje motywów tworzących NBS wybranych transporterów umieszczono w tabeli 1.1. Symetryczny układ domen tworzy dwa miejsca wiązania umożliwiające hydrolizę dwóch cząsteczek ATP. W tym miejscu warto zaznaczyć, iż znane są liczne przykłady funkcjonalnych transporterów posiadających mutacje kluczowych aminokwasów w obrębie jednego miejsca wiązania (NBS) (tab. 1.1). Są to na przykład ludzkie CFTR i MRP1 (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator oraz Multidrug Resistance-associated Protein 1 z ang. kolejno: błonowy regulator przewodnictwa związany z mukowiscydozą i białko odporności wielolekowej; należące do podrodziny ABCC) czy wiele z występujących u grzybów transporterów PDR (Pleiotropic Drug Resistance, z ang. Plejotropowa Oporność Lekowa; nazwa ta używana była historycznie/jest dla pełnych transporterów ABCG) takich jak chociażby PDR5 u *Saccharomyces cerevisiae* czy CDR1 (Candida Drug Resistance, z ang. odporność lekowa *Candida*) u *Candida albicans* (Golin & Ambudkar, 2015; Payen et al., 2005; Tsai et al., 2010). W efekcie te tzw. asymetryczne transportery posiadają wyłącznie jedno efektywne miejsce hydrolizy ATP, podczas gdy drugie jest zdegenerowane i do tego niezdolne.

Tabela 1.1. Sekwencje motywów NBD wybranych transporterów: ABCG46 z *Medicago truncatula*, PDR5 z *Saccharomyces cerevisiae* i homodimer ABCG2 z *Homo sapiens*. Domeny ponumerowano w kolejności występowania w łańcuchu polipeptydowym licząc od N-końca. Litery aminokwasów niezgodne z konsensusem zostały pogrubione i podkreślone.

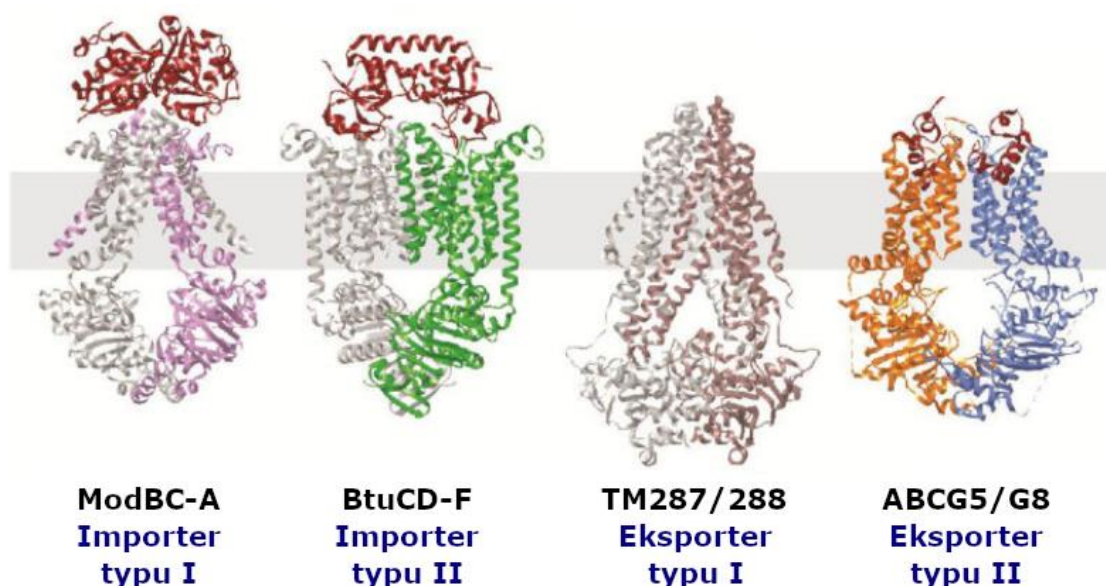
Białko	Domena	Pętla P (Walker A)	Pętla Q	pętla C (sygnatura ABC)	Walker B	Pętla H
MtABCG46	NBD1	GPPGSGKT	ISQHD	ISGGQRKR	ALFMDE	SL <u>L</u> QP
MtABCG46	NBD2	GVSGAGKT	CEQND	LSTEQRKR	ILFLDE	TIHQP
ScPDR5	NBD1	GRPGSG <u>C</u> T	NA <u>E</u> AD	VSGGERKR	<u>FQC</u> WDN	AI <u>Y</u> QC
ScPDR5	NBD2	GASGAGKT	CQQQD	LNVEQRKR	LVFLDE	TIHQP
HsABCG2		GPTGGGKS	VVQDD	VSGGERKR	ILFLDE	SIHQP

1.2.2. Domeny transbłonowe

W przeciwieństwie do NBD - domeny transbłonowe charakteryzują się znacznie większym zróżnicowaniem zarówno sekwencji jak i struktury. Postuluje się, iż w ich obrębie zlokalizowane są miejsca wiązania transportowanych substratów, oraz że tym samym domeny te odpowiadają za specyficzność substratową transporterów (Lefèvre & Boutry, 2018; Licht & Schneider, 2011). Co więcej, analizy ewolucyjne, pokazały iż domeny transbłonowe są polifiletyczne, powstając niezależnie na drodze ewolucji co najmniej trzykrotnie (Wang et al., 2009). Głównym elementem budującym te domeny są α helisy transbłonowe (TH, z ang. Transmembrane Helix). Helisy połączone są ze sobą poprzez pętle wewnątrz i zewnątrz komórkowe. W centralnej pętli wewnątrzkomórkowej zlokalizowana jest helisa łącznikowa, która oddziałuje z poddomeną helikalną NBD, łącząc tym samym domenę transbłonową z domeną wiążącą nukleotyd. To połączenie jest niezbędne w przekazywaniu energii wiązania i hydrolizy ATP pochodzącej z części cytozolowej do napędzenia zmian konformacyjnych w obrębie części transbłonowej białka (Khunweeraphong et al., 2017; Rees et al., 2009). Z uwagi na fakt, iż zróżnicowanie TMD stosowane jest jako kryterium do klasyfikacji strukturalnej transporterów ABC, budowa domen transbłonowych została opisana bardziej szczegółowo w kolejnej sekcji.

1.2.3. Klasyfikacja strukturalna transporterów ABC

Pierwszymi strukturalnie opisanymi białkami ABC były te pochodzące z prokariotów. Na podstawie ich struktur wyszczególniono początkowo 3 różne typy fałdowania transporterów ABC i były to importer typu I, importer typu II i eksporter typu I. Białkami, na podstawie których wyróżniono typy struktur importera I i II były kolejno - transporter molibdenu ModBC-A i transporter maltozy MalFGK dla typu I, oraz transportery witaminy B12 – BtuCD-F oraz Hi1471 dla typu II (Hollenstein et al., 2007; Locher et al., 2002; Oldham et al., 2007; Pinkett et al., 2007). Różnice pomiędzy tymi białkami występują przede wszystkim w obrębie części transbłonowej, którą tworzy od 10 do 20 helis. Prekursorem grupy nazwanej eksporterami typu I była struktura bakteryjnego białka Sav1866 – należąca do podrodziny ABCB (Dawson & Locher, 2006). Każda domena transbłonowa eksportera typu I posiada po 6 helis, które przeplatają się ze sobą - obszar transbłonowy rozdzielony jest na dwie symetryczne części, w której każda tworzona jest przez TH1 i 2 jednej podjednostki i TH3-6 drugiej. Domeny transbłonowe transporterów tego typu charakteryzują się również długimi wewnątrzkomórkowymi pętlami. Na rycinie 1.4 zilustrowano przykłady odpowiadające różnym rodzajom budowy transporterów.

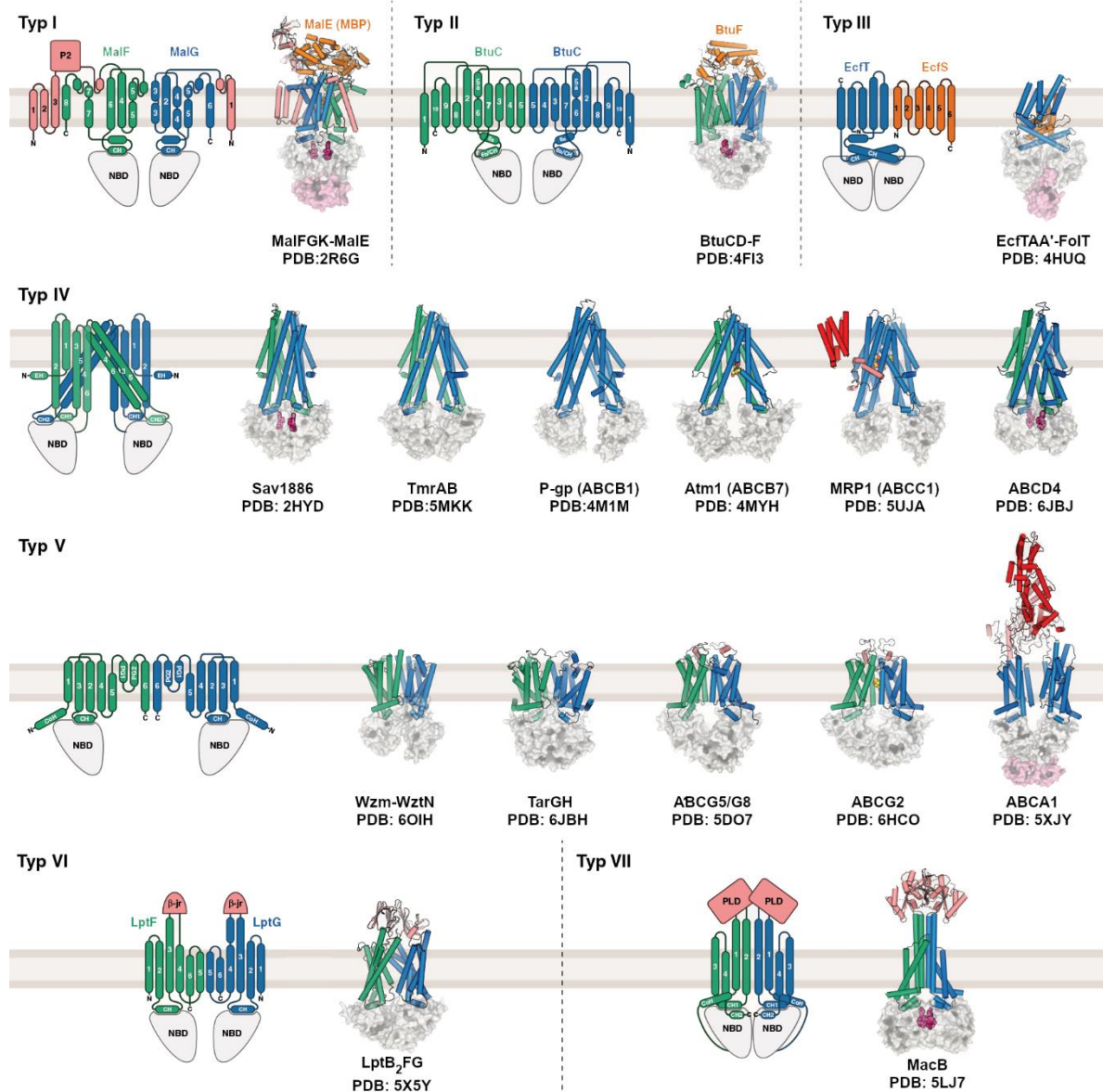


Rycina 1.4. Pierwotny podział typów struktur transporterów ABC. Za przykłady posłużyły białka: ModBC-A (ModB na szaro, ModC różowy, białko wiążące substrat na czerwono; PDB: 2ONK), BtuCD-F (BtuC na szaro, BtuD na zielono, białko wiążące substrat na czerwono; PDB: 2QI9), TM287(na szaro)/TM288(na różowo) (PDB:4Q4H) i ABCG5 (na pomarańczowo)/ABCG8 (na niebiesko)(PDB: 5D07). Źródło: Lee et al., 2016.

Początkowo wśród transporterów o poznanej strukturze było jedynie kilka pochodzących z organizmów eukariotycznych. Wszystkie z nich charakteryzowały się fałdowaniem typu eksportera I i były to 3 ortologi białka ABCB1 pochodzące z myszy, *Caenorhabditis elegans* oraz algi *Cyanidioschyzon merolae*, mitochondrialny transporter Atm1 (z ang. ABC Transporter of Mitochondria 1) z *S. cerevisiae* a także ludzki ABCB10 (Aller et al., 2009; Jin et al., 2012; Kodan et al., 2014; Shintre et al., 2013; Srinivasan et al., 2014). Pierwszą uzyskaną strukturą eukariotycznego transportera z podrodziny ABCG była ta należąca do ludzkiego heterodimeru połowicznych białek ABCG5/G8 (J. Y. Lee et al., 2016). Jego domeny transbłonowe różniły się znacząco od opisanych dla ABCB, w związku z czym klasyfikacja strukturalna transporterów ABC została rozszerzona o eksporter typu II (ryc. 1.4). Pomimo, iż część transbłonowa transportera ABCG tworzona jest – podobnie jak w przypadku ABCB – przez dwie domeny po 6 transbłonowych helis każda, to te nie przeplatają się, tylko tworzą dwie wydzielone podjednostki. Widoczną różnicą są też krótsze w przypadku typu II pętle wewnątrzkomórkowe.

Główną przeszkodą w badaniu struktur hydrofobowych białek błonowych jest trudność w ich krystalizacji (E. P. Carpenter et al., 2008). Swoistą rewolucję w tej dziedzinie przyniosła technika kriomikroskopii elektronowej (Cryo-EM, z ang. Cryogenic Electron Microscopy), która nie wymaga uzyskiwania kryształów do analizy struktur białkowych. Dodatkowo Cryo-EM pozwala na obserwowanie makromolekuł w warunkach bliższych do natywnych, oraz badanie zmian konformacyjnych poprzez analizę heterogenności obiektów (Murata & Wolf, 2018). Przy pomocy tej techniki udało się poznać struktury szeregu transporterów ABC, w tym ważnych klinicznie i badanych od lat, takich jak chociażby pochodzące z człowieka CFTR (ABCC7), ABCG2, ABCA1 czy MRP1 (ABCC1) z *Bos taurus* (Johnson & Chen, 2017; Liu et al., 2017; Qian et al., 2017; Taylor et al., 2017). Co więcej, zalety kriomikroskopii elektronowej umożliwiły także poznanie pełnego spektrum konformacyjnego TmrAB (*Thermus thermophilus* Multidrug Resistance proteins A and B) – transportera z podrodziny ABCB. Dzięki uzyskaniu 8 wysokorozdzielczych struktur tego białka w różnych konformacjach stworzono kompleksowy, strukturalny zarys funkcjonalnego cyklu transportera ABC (Hofmann et al., 2019). W 2021 roku opublikowano pierwszą strukturę pełnego transportera ABCG, mianowicie PDR5 z *S. cerevisiae* (Harris et al., 2021). Porównanie łańcuchów głównych pokazało, iż pełne białka ABCG charakteryzują się wysokim stopniem zachowawczości strukturalnej w stosunku do ich połowicznych homologów (np. ABCG5/G8). Jest to znaczący postęp, gdyż jak dotąd dla pełnych transporterów ABCG (określanych również

historycznie jako PDR) występujących wyłącznie w obrębie królestw roślin i grzybów, brak było jak dotąd wysokorozdzielczych danych strukturalnych. Lista poznanych struktur stale rośnie, szczególnie dynamicznie w ostatnich latach, w związku z czym zaproponowano nową, rozszerzoną ich klasyfikację, która eliminuje jednocześnie problematyczne, funkcjonalne rozróżnienie na eksport i import. Bazując na podobieństwie sekwencyjnym i strukturalnym TMD transportery ABC podzielono ostatecznie na 7 typów fałdowania (I – VII). Schematy poszczególnych typów w proponowanej uaktualnionej klasyfikacji umieszczono na rycinie 1.5. Typy od I do III określają głównie struktury prokariotycznych importerów, fałdowanie typu IV (odpowiadające w poprzedniej klasyfikacji typowi eksportera I) charakterystyczne jest dla podrodzin ABCB, ABCC i ABCD, a z kolei do typu V zaliczają się struktury transporterów ABCA i ABCG (określane poprzednio jako eksportery typu II). Typ VI i VII zarezerwowany jest dla tzw. ekstraktorów (VI) i mechanotransmitterów (VII) (Thomas et al., 2020).



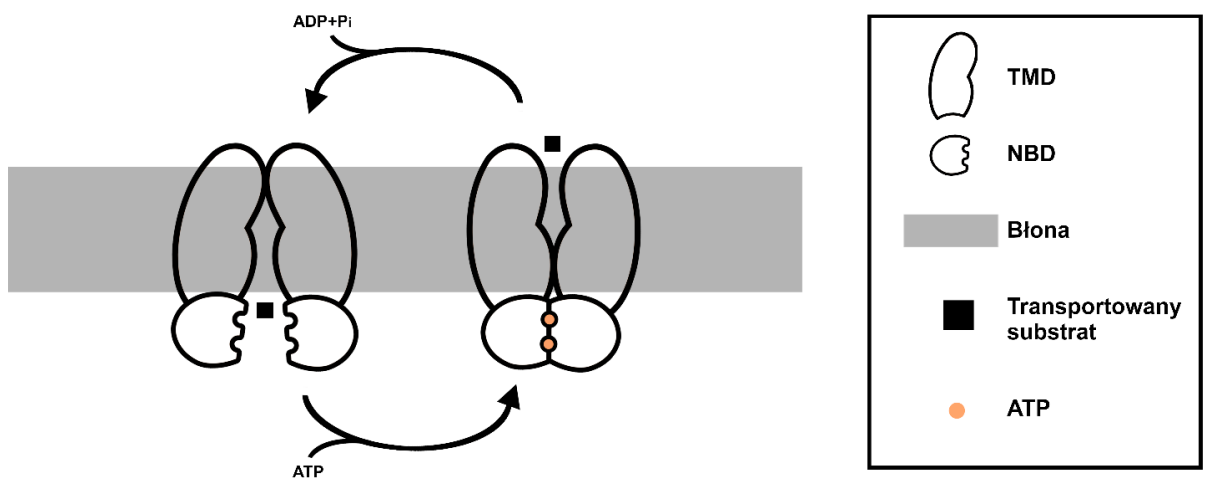
Rycina 1.5 Uaktualniona klasyfikacja strukturalna transporterów. Transportery ABC podzielono ze względu na fałdowanie TMD na 7 typów. Pierwsza struktura w każdym typie to schematyczne przedstawienie topologii. Kolejne struktury to przykłady białek klasyfikujące się do danego typu; nazwy i numery PDB umieszczono na rycinie. Domeny transbłonowe przedstawiono na zielono i niebiesko, w przypadku pełnych transporterów obie są na niebiesko. W przypadku typów I-III na pomarańczowo zaznaczono dodatkowe białka wiążące substrat. Dodatkowe domeny zostały zaznaczone na kolor czerwony lub łososiowy. Źródło: Thomas et al., 2020, z modyfikacjami.

1.3. Mechanizm transportu

1.3.1. Cykl katalityczny

Różne typy domen transbłonowych - powstałe niezależnie w toku ewolucji - znacząco różnią się między sobą, co w konsekwencji powoduje również rozbieżności w mechanizmie ich działania. Co więcej, rozbieżności zostały opisane nawet w przypadku transporterów z tej samej podrodziny. Przykładowo badania nad homologami ABCB takimi jak - MsbA u bakterii oraz ABCB1 u myszy – wykazały różnice w przyjmowanych przez te białka stanach konformacyjnych (Moeller et al., 2015). Pomimo różnic, tym co łączy transportery ABC to wykorzystanie cząsteczek ATP oraz zachowawczych motywów tworzących miejsce ich wiązania do naprzemiennego zbliżania i oddalania od siebie NBD a w konsekwencji sprzężonych z tym ruchów TMD. Obecnie proponowany, ogólny sposób działania transporterów ABC opiera się głównie na tzw. modelu zmiennego dostępu (ryc. 1.6) (Ernst et al., 2010; Locher, 2016; Wagner et al., 2017). Zakłada on naprzemienne występowanie dwóch stanów: (i) skierowanego do wewnątrz (ang. Inward Facing - IF) oraz (ii) skierowanego na zewnątrz komórki (ang. Outward Facing – OF). W pierwszym przypadku, NBD są rozdzielone, a w obrębie domen transbłonowych dla substratu dostępne jest miejsce wiązania. Molekuła transportowana ma dostęp do wspomnianej kieszeni zarówno z cytoplazmy jak również z wewnętrznej warstwy błony komórkowej, do której przenikają związki hydrofobowe. W wyniku wiązania ATP obie podjednostki NBD dimeryzują ze sobą co w efekcie skutkuje przejściem do konformacji OF, w której następuje zamknięcie kieszeni substratowej od strony cytoplazmy oraz uwolnienie molekuły transportowanej na zewnątrz. Hydroliza ATP destabilizuje dimer NBD-NBD i w konsekwencji przywraca białko do konformacji IF, umożliwiając rozpoczęcie kolejnego cyklu. Istotnym aspektem dotyczącym cyklu katalitycznego jest rozróżnienie transporterów na asymetryczne (posiadające tylko jedno enzymatycznie aktywne miejsce wiązania ATP) i symetryczne. Analizy sekwencji białek ABC sugerują, że ponad połowa znanych transporterów charakteryzuje się asymetrią NBD (Khunweeraphong & Kuchler, 2021). Badania strukturalne nad białkami TmrAB oraz PDR5, będącymi przykładami transporterów asymetrycznych, pokazały, że hydroliza jednej cząsteczki ATP jest wystarczająca do napędzenia cyklu, podczas którego druga cząsteczka na stałe ułożona jest w obrębie zdegenerowanego NBS (Harris et al., 2021; Hofmann et al., 2019). Co więcej, podobna asymetryczność w cyklu katalitycznym została opisana dla transporterów

takich jak ludzkie ABCB1 oraz zaproponowana dla ABCG2, u których sekwencje wszystkich motywów wykazują zgodność z konsensusem, tym samym sugerując, iż oba miejsca wiązania są zdolne do hydrolizy ATP (Kapoor et al., 2018; Siarheyeva et al., 2010; Verhalen et al., 2017). Z kolei w przeciwieństwie do licznie występujących u grzybów asymetrycznych białek PDR, wśród licznej grupy roślinnych pełnych transporterów ABCG jak dotąd nie znaleziono takich przykładów (Toussaint et al., 2017).



Rycina 1.6. Schemat modelu alternatywnego dostępu. Na podstawie Ernst et al., 2010; Locher, 2016; Wagner et al., 2017.

1.3.2. Aktywność ATPazowa

Aspektem nierozdzielnie związanym z funkcjonowaniem białek ABC jest ich aktywność ATPazowa, która przez wiązanie i hydrolizę ATP napędza translokację molekuł przez błony. Niektóre transportery ABC posiadają bazową aktywność, co oznacza, że stale hydrolizują ATP. Przykładem takiego białka może być PDR5 z *S. cerevisiae*. Jego bazowa aktywność hydrolityczna jest niezależna od obecności molekuły transportowanej (Ernst et al., 2008; Wagner et al., 2019). Z kolei u innych transporterów hydroliza ATP jest całkowicie lub częściowo zależna od i indukowana przez transportowane molekuły. Taka stymulacja może mieć różną skalę. Przykładowo u CDR1 z *Candida albicans* zaobserwowano umiarkowaną stymulację wahającą się między 20 a 40%, natomiast w przypadku ludzkiej glikoproteiny P (ABCB1) stymulacja może prowadzić do wielokrotnego zwiększenia aktywności ATPazowej (Al-Shawi et al., 2003; Shukla et al., 2006; Urbatsch et al., 2000). Znane są również przypadki, w których nie wykryto aktywności bazowej, a do hydrolizy dochodziło wyłącznie w obecności transportowanych molekuł (innymi słowy aktywność była bezpośrednio powiązana z transportem), a nawet przypadki w których wysokie stężenie substratów powodowało inhibicję hydrolizy ATP (Chloupková et al., 2007; Davidson et al., 1992; Sharom, 2011).

1.4. Badania nad transporterami ABCG

1.4.1. Białka ABCG i oporność wielolekowa

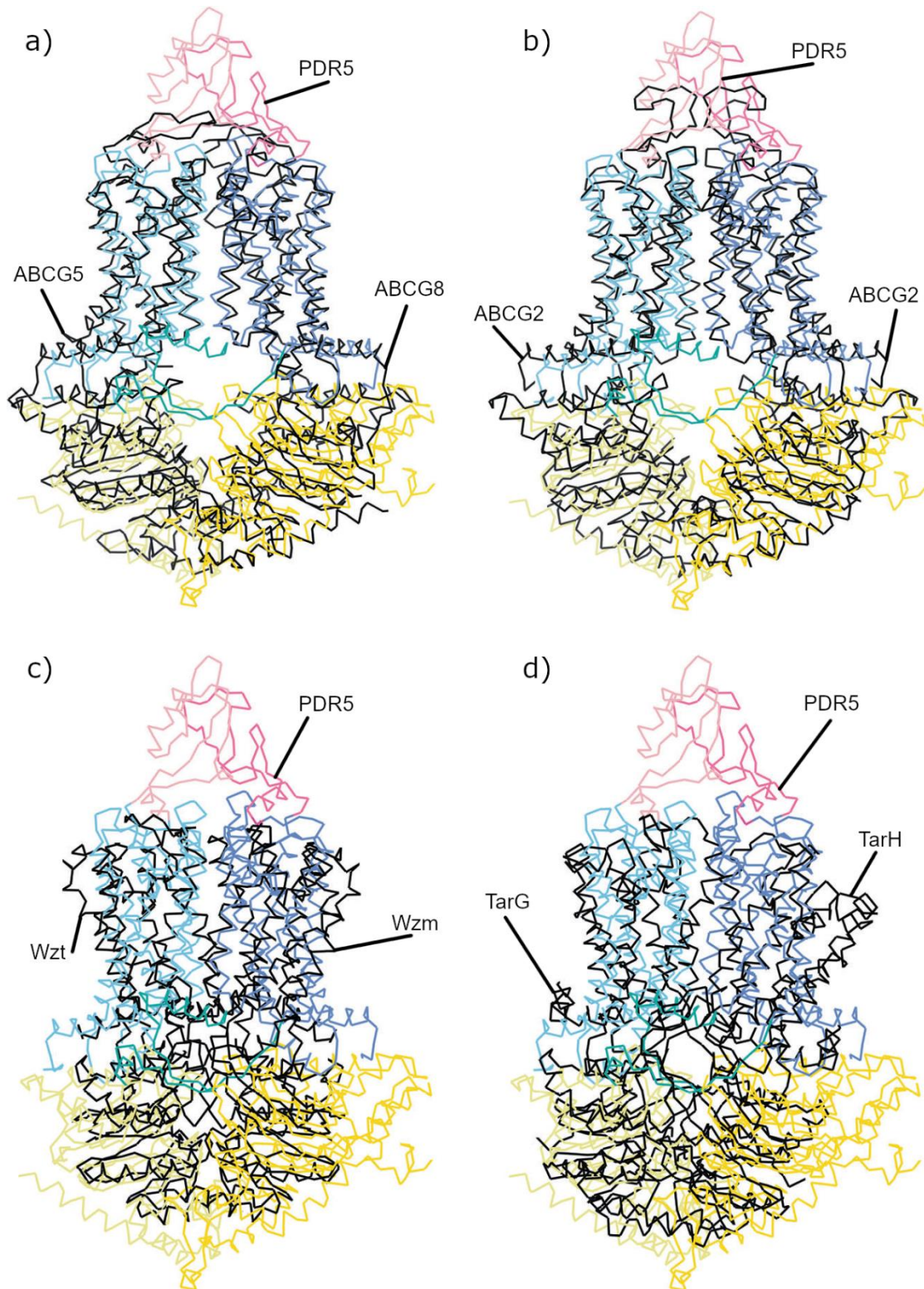
Historycznie badania nad transporterami ABCG prowadzone były głównie w kontekście zjawiska oporności wielolekowej tj. powiązania ich aktywności z usuwaniem ksenobiotyków dostarczanych do komórek w różnego rodzaju terapiach. Genom człowieka zawiera pięć genów kodujących połowiczne białka ABCG, które jako (homo lub hetero) dimer tworzą funkcjonalny transporter. Wśród nich cztery są odpowiedzialne za transport lipidów (Tarr et al., 2009). Wyróżniającym się z tej grupy jest HsABCG2, nazywane również BCRP (z ang. Breast Cancer Resistance Protein – białko oporności raka piersi), które zostało odkryte za sprawą lekooporności w linii komórkowej raka piersi pozbawionej glikoproteiny-P (ABCB1) (Austin Doyle et al., 1998; J. S. Lee et al., 1997). HsABCG2 wraz z ABCB1 oraz ABCC1 odpowiedzialny jest za oporność wielolekową komórek nowotworowych podczas chemioterapii. Ze względu na swoje duże znaczenie kliniczne ABCG2 stało się przedmiotem intensywnych badań. W przeciwieństwie do swoich paralogów, u których transportowane molekuly ograniczone są do steroli, ABCG2 transportuje szeroką gamę różnorodnych molekuł, która tylko częściowo pokrywa się z profilem charakterystycznym dla ABCB1 i ABCC1. Lista substratów tego białka przekracza 200 związków, do których należą leki, ksenobiotyki powszechne w diecie, toksyny środowiskowe, czy metabolity i witaminy (van Herwaarden et al., 2007; W. Robey et al., 2011). Poza swoim udziałem w oporności wielolekowej, ABCG2 posiada ważne fizjologiczne funkcje związane z transportem kwasu moczowego oraz porfiryn, kluczowych dla działania hemoglobiny (Matsuo et al., 2009; Saison et al., 2012; Woodward et al., 2009).

Pełne transportery ABCG (tzw. PDR), charakterystyczne dla genomów roślin i grzybów, są homologami zwierzęcych połowicznych transporterów ABCG. Z analiz filogenetycznych wynika, iż geny tych białek powstały na drodze duplikacji wspólnego dla połowicznych ABCG genu- przodka (Crouzet et al., 2006). Genom *S. cerevisiae* posiada 9 genów kodujących białka PDR, które pełnią szeroki wachlarz funkcji, takich jak chociażby obrona przed toksynami, czy transport steroli, fosfolipidów i jonów (Prasad & Goffeau, 2012). Podobnie jak opisywany wyżej ludzki transporter ABCG2, niektóre z nich są również związane są opornością wielolekową. Przykładowo *ScPDR5* został początkowo zidentyfikowany jako gen, którego nadekspresja powodowała zwiększoną odporność drożdży na fungicydy w postaci cykloheksymidu i sulfometuronu metyloвого (Leppert et al., 1990). Choć fizjologiczne

substraty tego transportera wciąż nie są znane, to obecnie wiadomo, że transportuje szeroką gamę związków chemicznych takich jak azole, antybiotyki i inne ksenobiotyki (Kolaczowski et al., 1996; Rogers et al., 2001). Ortologi tego białka powszechne są u grzybów patogennych i przyczyniają się między innymi do obniżonej skuteczności terapii podczas zakażeń *Candida albicans* czy warunkują oporność na fungicydy roślinnych patogenów takich jak *Botrytis cinerea* (Golin & Ambudkar, 2015; Leroux et al., 2002; Martínez et al., 2002). Ze względu na znaczenie kliniczne, CDR1 z *Candida albicans* jest drugim po PDR5 obszernie badanym białkiem z podrodziny pełnych transporterów ABCG.

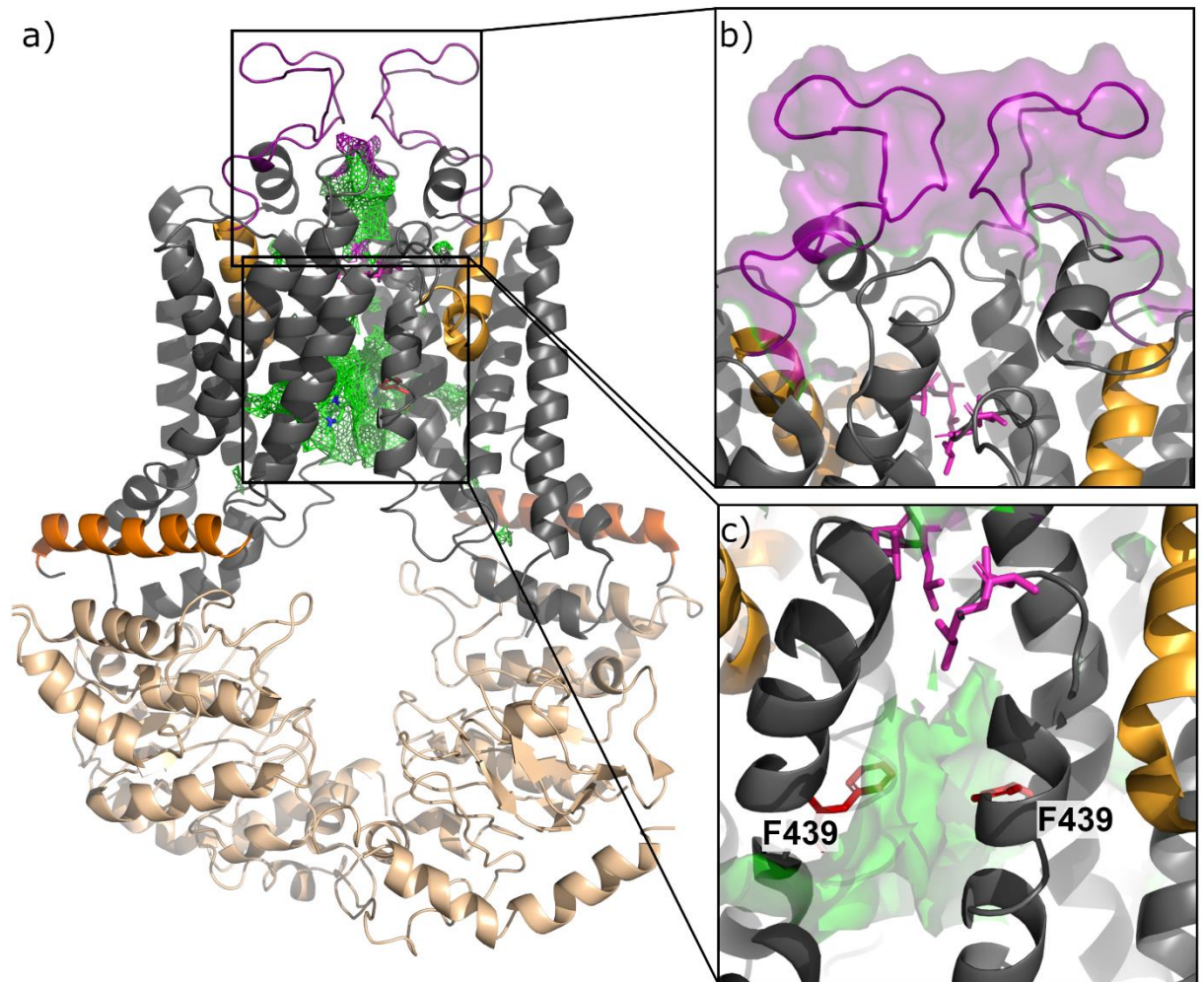
1.4.2. Strukturalne badania białek ABCG

Pomimo ich znaczenia i potencjału klinicznego, struktury eukariotycznych transporterów ABCG zostały poznane stosunkowo niedawno, co wynika z trudności opisywanych w rozdziale 1.2.3. Uzyskane struktury heterodimeru ABCG5/G8 oraz homodimeru ABCG2 są do siebie bardzo zbliżone i ukazują unikalny dla transporterów z eukariotycznej podrodziny ABCG typ budowy (określony w klasyfikacji jako typ V) (J. Y. Lee et al., 2016; Taylor et al., 2017). Co więcej, obecnie w bazie danych PDB (www.rcsb.org) dostępnych jest aż 18 wysokorozdzielczych struktur HsABCG2 w różnych konformacjach oraz z szeregiem substratów związanych z białkiem (Jackson et al., 2018; Kowal et al., 2021; Manolaridis et al., 2018; Orlando & Liao, 2020; Taylor et al., 2017; Q. Yu et al., 2021). W ostatnim czasie dane pochodzące z (I) analiz porównawczych sekwencji aminokwasowych grzybowych transporterów ABCG, (II) modelowania homologicznego takich białek jak CDR1 z *Candida albicans*, oraz (III) uzyskanej struktury PDR5 z *Saccharomyces cerevisiae* pokazały, że białka te charakteryzują się wysoką homologią strukturalną w stosunku do transporterów ABCG2 i ABCG5/G8 (Harris et al., 2021; Khunweeraphong & Kuchler, 2021). Co więcej, białka eukariotyczne różnią się od prokariotycznych, z tej samej podrodziny. Podobieństwo strukturalne zostało ukazane na rycinie 1.7.



Rycina 1.7. Porównanie strukturalne ScPDR5 z innymi białkami ABCG. Na strukturę ScPDR5 (NBD w kolorze żółtym, TMD w odcieniach niebieskiego, pętle zewnątrzkomórkowe w kolorze różowym) nałożono struktury (w kolorze czarnym): (a) ludzkiego heterodimeru ABCG5/G8 (PDB:5DO7), (b) ludzkiego homodimeru ABCG2 (PDB: 6XVI) (c) prokariotycznego transportera z *Aquifex aeolicus*, Wzm-Wzt (PDB: 7K2T) (d) prokariotycznego transportera z *Alicyclobacillus herbarius*, TarGH (PDB: 6JBH). Źródło: Harris et al., 2021.

Do charakterystycznych elementów należą chociażby unikalne dla typu V horyzontalne helisy umiejscowione przy obu powierzchniach błony – tzw. helisy „Elbow” w pobliżu NBD, oraz helisy „Re-entry” w zewnętrznej warstwie błony. Są one ważne dla funkcjonowania transportera, stabilizując go w błonie i ograniczając jego ruch w trakcie zmian konformacyjnych. Dodatkowo helisy „elbow” stabilizują pętle odpowiadające za komunikację TMD z NBD (Khunweeraphong et al., 2017, 2019). W ostatnim czasie dane strukturalne uzyskane dla ludzkich ABCG1, ABCG2, ABCG5/G8 oraz drożdżowego PDR5 ukazały tzw. kieszeń centralną, zlokalizowaną pomiędzy domenami transbłonowymi, w obrębie której związane były transportowane przez te transportery molekuly (Harris et al., 2021; Jackson et al., 2018; Kowal et al., 2021; Manolaridis et al., 2018; Sun et al., 2021; Q. Yu et al., 2021). Zarówno u ludzkich dimerów ABCG jak i u PDR5 kieszeń tworzona była przez analogiczne helisy transbłonowe 2 i 5 (w przypadku PDR5 odpowiadające im TH 2, 5, 8 i 11). Jednocześnie, wyniki niektórych eksperymentów przeprowadzonych w przeszłości dla ABCG2, CDR1 czy PDR5, sugerowały istnienie wielu różnych miejsc wiązania dla transportowanych molekuł. Brak jest więc ostatecznego konsensusu dotyczącego lokalizacji i ilości miejsc wiązania dla transportowanych przez białka ABCG molekuł (Golin et al., 2003; Khunweeraphong et al., 2020; Rawal et al., 2013; Tanabe et al., 2011). Kieszeń centralna jest otwarta od strony cytozolowej w konformacji IF, a przestrzeń zakończona jest od drugiej strony hydrofobowymi pętlami będącymi kontynuacją transbłonowych helis 5 i 5'. Ten element, nazywany potocznie „zaworem” (ang. Valve) jest strukturalnie zachowawczy i stanowi przegrodę dla molekuł wody oraz reguluje uwalnianie molekuly transportowanej (Khunweeraphong et al., 2019; Khunweeraphong & Kuchler, 2021). W obrębie omawianej kieszeni, w przypadku ludzkiego białka ABCG2 zidentyfikowano też ważną i zachowawczą ewolucyjnie fenyloalaninę (F439). Analizy biochemiczne przy wykorzystaniu punktowej mutagenyzy wykazały, iż tworzona w dimerze przez ten aminokwas para fenyloalanin jest kluczowa dla transportu i pełni ważną rolę w stabilizowaniu molekuł transportowanych w obrębie kieszeni translokacyjnej (Gose et al., 2020). Kolejną ważną i jednocześnie unikalną dla typu V częścią struktury jest tzw. pokrywa, którą tworzą długie pętle zewnątrzkomórkowe. Pełni ona funkcję bariery, regulując uwalnianie molekuly transportowanej jednocześnie zapobiegając jej cofaniu (Harris et al., 2021; Khunweeraphong et al., 2019). Opisane elementy strukturalne zostały wyróżnione na rycinie 1.8.



Rycina 1.8. Schemat opisanych w literaturze elementów strukturalnych dla transporterów ABCG na przykładzie struktury ABCG2 (PDB: 6VXH). (a) lokalizacja elementów w odniesieniu do całej struktury; (b) zbliżenie na pokrywę i zawór, (c) zbliżenie na kieszeń centralną. Domeny transbłonowe w kolorze szarym, domeny wiążące nukleotyd zaznaczone na kremowo; Zaznaczone elementy: helisy „elbow” – pomarańczowy, helisy „re-entry” jasnopomarańczowy, kieszeń centralna – zielony, zawór – różowy (ukazano reszty aminokwasowe), pokrywa – fioletowy, z ukazaną powierzchnią. Reszty aminokwasowe fenyloalanin 439 zostały zaznaczone na czerwono.

1.4.3. Roślinne pełne transportery ABCG

Analizy filogenetyczne wskazują, iż w genomach roślin lądowych doszło do ekspansji genów ABC, ze szczególnym uwzględnieniem podrodzin ABCB, ABCC oraz ABCG. Przykładowo - liczba genów kodujących transportery ABC jest niemalże dwukrotnie wyższa u mszaków niż u glonów. Postuluje się, iż białka te były ważnym elementem adaptacji roślin do życia na lądzie (Banasiak & Jasiński, 2022; Hwang et al., 2016). Również roślinne pełne transportery ABCG, początkowo postrzegane głównie przez pryzmat oporności wielolekowej, pełnią ważne i sprecyzowane role w aspektach fizjologicznych związanych z przystosowaniem roślin lądowych. Są to między innymi takie procesy jak formowanie kutikuli, sekrecja wosków, translokacja wyspecjalizowanych (tzw. wtórnych) metabolitów, uwalnianie fitoaleksyn czy transport fitohormonów (Aryal et al., 2019; Bessire et al., 2011; Biała et al., 2017; Jarzyniak et al., 2021; Jasinski et al., 2001; Kang et al., 2010; Kretschmar et al., 2012; Matern et al., 2019; Mcfarlane et al., 2010). Co więcej, można podejrzewać, iż rozwój wyspecjalizowanego, unikalnego w obrębie różnych linii rozwojowych metabolizmu, tworzył równolegle potrzebę wykształcenia dedykowanych mechanizmów transportu.

Pierwszym pełnym roślinnym białkiem ABCG powiązaniem z wyspecjalizowanym metabolizmem był NpABC1 (NpPDR1) z *Nicotiana plumbaginifolia*. Eksperymenty wykazały, iż NpABC1 jest transporterem sklareolu – diterpenu o właściwościach przeciwgrzybiczych, wydzielanego przez trichomy liści (Jasinski et al., 2001). Wyciszenie genu *NpABC1* powoduje obniżenie odporności *N. plumbaginifolia* na infekcję *Botrytis cinerea* (Stukkens et al., 2005). Podobne transportery, powiązane z dystrybucją związków terpenowych w reakcji obronnej opisano również dla pokrewnych gatunków takich jak *Nicotiana tabacum* (NtABCG1) czy *Nicotiana benthamiana* (NbPDR1 i NbPDR2) (Crouzet et al., 2013; Shibata et al., 2016). Przykładów roślinnych pełnych transporterów ABCG zaangażowanych w odpowiedź na stres biotyczny znanych jest obecnie znacznie więcej. Rośliny *Petunia hybrida* pozbawione transportera PhPDR2 były znacząco bardziej podatne na atak ze strony insekta *Spodoptera littoralis* co skorelowano z obniżonym poziomem petuniasteronu i petuniolidu w trichomach (Sasse et al., 2016). Funkcję obrony przed szkodnikami przypisuje się również transporterom CrABCG1 (CrTPT2) oraz VmABCG1 (VmTPT2) z kolejno *Catharantus roseus* i *Vinca minor*. Wykorzystując drożdże jako heterologiczny system ekspresji udało się powiązać te białka z eksportem alkaloidów, których sekrecja na powierzchnię liści jest odpowiedzią roślin na ataki ze strony szkodników (Demessie et al., 2017; F. Yu & de Luca, 2013). Wspomniane alkaloidy

są również wykorzystywane terapeutycznie, co podkreśla potencjał badań nad transporterami ABCG dla biotechnologii. Innym transporterem, który powiązano z endogennymi substratami i jednocześnie scharakteryzowano w eksperymentach biochemicznych jest MtABCG46 z *Medicago truncatula* (pierwotnie opisywany w literaturze jako MtABCG10) (Banasiak et al., 2013; Biała et al., 2017). MtABCG46 jest zaangażowany w dystrybucję prekursorów w szlaku biosyntezy fitoaleksyny *Medicago*- medikarpiny, co zostało szczegółowo opisane w sekcji 1.5. Prominentnym przykładem pokazującym, że transportery ABC kontrolują u roślin wiele cech o dużym znaczeniu chociażby dla rolnictwa jest gen *Lr34* z pszenicy (*Triticum aestivum*), warunkujący odporność na szereg infekcji grzybiczych. *Lr34* koduje pełny transporter ABCG i może występować w dwóch wariantach: (i) *Lr34sus* – podatności na choroby oraz (ii) *Lr34res*, będący allelem zwiększającym odporność na patogeny grzybowe (Krattinger et al., 2009). *Lr34res* jest obecnie powszechnie wykorzystywany przy wyprowadzaniu nowych odmian pszenicy. Co więcej został on również wprowadzony do innych zbóż takich jak ryż, kukurydza, jęczmień czy sorgo, skutecznie podnosząc odporność u uzyskanych odmian (Krattinger et al., 2016; Risk et al., 2013; Schnippenkoetter et al., 2017; Sucher et al., 2017). Warto również wspomnieć iż podobnie jak w przypadku podrodzin ABCB, ABCC czy ABCI, wśród ABCG zidentyfikowano pełne transportery, które przyczyniają się do wyższej tolerancji roślin na metale ciężkie takie jak ołów czy kadm, a przykładami mogą być AtABCG36 i AtABCG40 z *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2007; M. Lee et al., 2005; Song et al., 2014).

Pełne transportery ABCG biorą udział w translokacji fitohormonów. Badania nad AtABCG36 i AtABCG37 z *Arabidopsis thaliana* wykazały ich rolę w dystrybucji auksyn takich jak kwas indolilo-3-masłowy (IBA), z kolei AtABCG40 transportując kwas abscysynowy (ABA) reguluje reakcję rośliny na suszę (Aryal et al., 2019; Kang et al., 2010; Růžička et al., 2010; Strader & Bartel, 2009). Inne, należące do tej podrodziny białka, jak np. MtABCG59 czy PhPDR1 biorą również udział w dystrybucji strigolaktonów. (Banasiak et al., 2020; Kretschmar et al., 2012). Co więcej, wśród pełnych transporterów ABCG *Medicago truncatula* zidentyfikowano gen *MtABCG56*, który w obecności symbiotycznych bakterii *Ensifer meliloti* jest indukowany w korzeniach i brodawkach roślin. Kodowane przez *MtABCG56* białko okazało się być eksporterem cytokinin, krytycznym dla regulacji brodawkowania u tej rośliny (Jarzyniak et al., 2021).

Warto podkreślić, iż pomimo ich dużego znaczenia dla fizjologii roślin, endogenne substraty dla większości transporterów ABCG są wciąż nieznanne. Wynika to po części z faktu, iż uzyskanie ekspresji tych błonowych, relatywnie dużych białek w heterologicznym systemie

ekspresji stanowi wyzwanie, co w konsekwencji uniemożliwia przeprowadzenie bezpośrednich eksperymentów transportu (Lefèvre & Boutry, 2018). Jednocześnie specyficzność substratowa często nie jest powiązana z podobieństwem sekwencyjnym transporterów, a przynajmniej jak dotąd nie udało się znaleźć takiej zależności (Banasiak & Jasiński, 2022).

1.4.4. Specyficzność substratowa transporterów ABCG

Pomimo prób identyfikacji aminokwasów potencjalnie stojących za specyficznością substratową/selektywnością białek ABC, jej molekularne podstawy wciąż są nieznane. Analizy polimorfizmów oraz szeroko zakrojone wprowadzanie mutacji punktowych pozwoliły z jednej strony odkryć wiele aminokwasów ważnych dla roli danego białka w biologii organizmu czy samego procesu transportu poszczególnych substratów, z drugiej strony nie dając odpowiedzi pozwalających precyzyjnie zrozumieć ten fenomen. Przykładem może być fenyloalanina 431 (F431), potencjalnie znajdująca się w obrębie miejsca wiązania substratów ludzkiego transportera ABCG2. Odkryty w liniach zarodkowych polimorficzny wariant F431L charakteryzował się zmniejszoną - względem dzikiego typu białka - wrażliwością na związki takie jak Ko143, fumitremorgin C czy sunitynib, które inhibują ABCG2- zależny transport, przypuszczalnie blokując miejsce wiązania (Jackson et al., 2018; Kowal et al., 2021). Jednocześnie rola tego aminokwasu w mechanizmie transportu jest nieznana. Przesiewowe badania polegające na losowym zamienianiu pojedynczych aminokwasów w obrębie domen transbłonowych transportera CDR1 na alaninę lub glicynę ujawniły ponad 100 aminokwasów, których zmiana wpływała na CDR1-zależną oporność *Candida albicans* na jeden lub więcej fungicydów. Pomimo obszernej analizy nie udało się jednoznacznie zidentyfikować miejsca wiązania substratów czy nawet ilości takich miejsc (Rawal et al., 2013). W przypadku PDR5 z *S. cerevisiae* wykazano związek pomiędzy rozmiarem molekuly (mierzonym w Å³) a transportem będącym jego udziałem (Golin et al., 2003). Warto zaznaczyć, iż także w obrębie domen wiążących nukleotydy zidentyfikowano aminokwas, którego zmiana (H1068A) selektywnie wpłynęła na transport rodaminy 6G przez PDR5 (Ernst et al., 2008).

Przyjmuje się, iż specyficzny tryb życia, bogactwo wyspecjalizowanego metabolizmu zaangażowanego w adaptację roślin do życia na lądzie miały ogromny wpływ na ewolucję białek ABC i wykształcenie większej specyficzności substratowej. Przykładem obrazującym tę adaptację jest wybiórczy charakter transportu kwasu abscysynowego (ABA) przez AtABCG40.

Eksperymenty wykazały, iż białko to rozpoznaje i translokuje jedynie aktywny fizjologicznie (S)-enancjomer, a spośród testowanych związków takich jak (S)-ABA, (R)-ABA, IAA, ester glukozowy ABA i kwas benzoesowy jedynie ten pierwszy miał wpływ na AtABCG40- zależny transport znakowanego ABA jako kompetytor (Kang et al., 2010). Innym przykładem ilustrującym specyficzność substratową roślinnych transporterów jest ABCG46 z *Medicago truncatula*. MtABCG46 jest transporterem, który spośród prekursorów w szlaku biosyntezy medikarpiny transportuje jedynie kwas *para*-kumarowy i likwiritigeninę, ale nie inne, pokrewne chemicznie molekuly jak na przykład izolikwiritigeninę, naryngeninę czy 7,4'-dihydroksyflawon (Biała et al., 2017). Należy jednak pamiętać iż roślinne pełne transportery ABCG mogą również być odpowiedzialne za dystrybucję kilku, różnych chemicznie molekuł. Przykładowo AtABCG36 (znany również jako AtPDR8/PEN3) przyczynia się do odpowiedzi obronnej powiązanej ze specyficznymi dla rzędu *Brassicales* glukozynolanami indolowymi, a także jest zaangażowany w mechanizmy oczyszczania rośliny z metali ciężkich (Lu et al., 2015; Matern et al., 2019; Stein et al., 2006; Strader & Bartel, 2009). Jednocześnie AtABCG36 jest transporterem kwasu indolilo-3-masłowego (IBA), ale nie pokrewnej chemicznie auksyny - kwasu indolilo-3-octowego (IAA)(Aryal et al., 2019).

Jak dotąd molekularne determinanty/podstawy selektywnej natury roślinnych transporterów ABCG nie były szczegółowo badane. Jedynym przykładem w obrębie tej grupy białek są analizy fenotypowe dotyczące alleli pełnego transportera ABCG36 z *A. thaliana*. Warianty *pen3-5* oraz *pen3-6* posiadają pojedyncze substytucje, kolejno L704F oraz A1357V zlokalizowane w obrębie helis transbłonowych. Analizy fenotypowe roślin oparte na procesach, w które zaangażowane jest ABCG36 takich jak odporność na patogeny zaadaptowane i niezaadaptowane, depozycja kalozy pod wpływem infekcji, czy reakcja na egzogennie podany IBA wykazały rozdzielenie funkcji transportera spowodowane punktowymi mutacjami w allelach *pen3-5* i *pen 3-6*. Wyniki fenotypowe sugerują, iż zmiany L704F oraz A1357V mogły wpłynąć na specyficzność substratową transportera, na przykład poprzez uniemożliwienie prawidłowego wiązania części substratów (Lu et al., 2015). Ta hipoteza wymaga jednak potwierdzenia w badaniach biochemicznych z udziałem transportera.

1.5. ABCG46 z *Medicago truncatula*

1.5.1. *Medicago truncatula* jako modelowa roślina bobowata

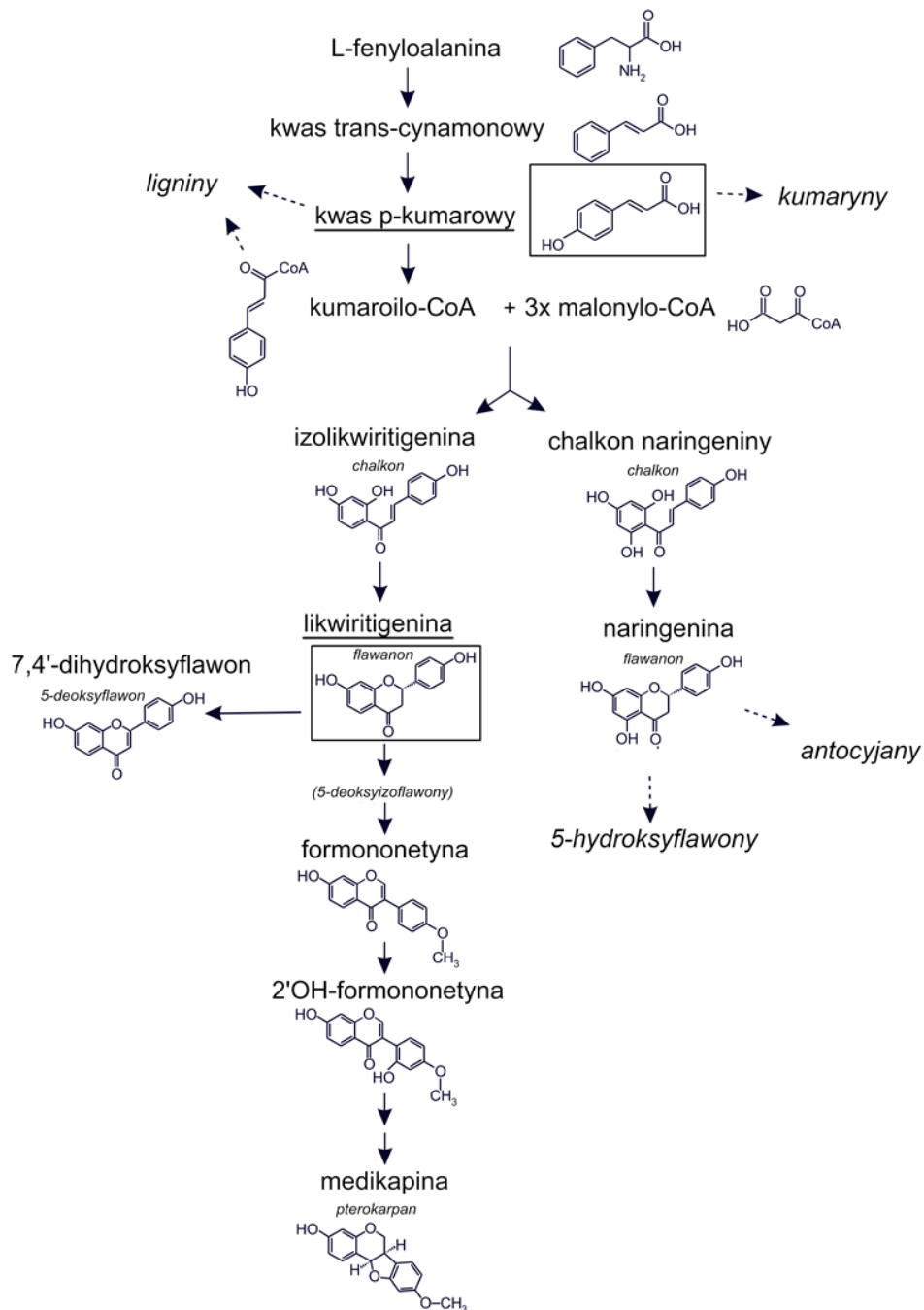
Rośliny bobowate (*Fabaceae*) stanowią drugą pod względem znaczenia gospodarczego rodzinę roślin nasiennych (Young & Bharti, 2012). Dzięki nawiązywaniu przez nie relacji symbiotycznych z bakteriami brodawkowymi uczestniczą w procesie nazywanym biologicznym wiązaniem azotu (BNF, z ang. Biological Nitrogen Fixation), który polega na redukcji azotu atmosferycznego (N_2) do przyswajalnego biologicznie amoniaku (NH_3). Są one także zdolne do bardziej powszechnej u roślin symbiozy z grzybami mikoryzowymi. Dodatkowo bobowate są źródłem wielu niskocząsteczkowych związków, takich jak flawonoidy, wśród których zidentyfikowano liczne molekuly aktywne biologicznie, znajdujące zastosowanie na przykład jako terapeutyki (Mutha et al., 2021). Do najważniejszych gatunków modelowych w obrębie *Fabaceae* należą *Lotus japonicus* oraz *Medicago truncatula*. Ze względu na bliskie pokrewieństwo z powszechnie uprawianymi w Europie gatunkami, takimi jak lucerna siewna, koniczyna, groch, bób czy fasola to *M. truncatula* stała się wiodącym modelem w Europie (Young & Udvardi, 2009).

M. truncatula jest gatunkiem lucerny wywodzącym się z obszaru basenu Morza Śródziemnego. Jest rośliną jednoroczną, o stosunkowo krótkim cyklu życiowym (10-12 tygodni) i niskich wymaganiach uprawnych. Nawiązuje interakcje z bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Ensifer* (dawniej *Sinorhizobium*) tworząc brodawki korzeniowe, oraz z grzybami mikoryzowymi *Glomus intraradices*. W odróżnieniu od wielu bobowatych posiada stosunkowo mały (500 – 550 Mbp), diploidalny genom (2n=16 chromosomów), który został zsekwencjonowany w 2011 roku (Young et al., 2011). Powszechność prowadzonych badań z wykorzystaniem tego gatunku umożliwiła powstanie baz danych, w których dostępne są sekwencje genomowe i ich adnotacje, a także informacje dotyczące ekspresji genów (<https://medicago.toulouse.inra.fr/>). Opracowano szereg protokołów dla efektywnego wykorzystania *M. truncatula* w *in vitro*, zawartych m.in. w podręczniku „*Medicago truncatula Handbook*” (*Medicago truncatula Handbook*, 2006). Dodatkowo jej wyspecjalizowany metabolizm (nazywany wcześniej metabolizmem wtórnym), obejmujący między innymi różnorodne związki z grupy fenylopropanoidów, może być źródłem związków o dużym potencjale farmaceutycznym czy agrobiotechnologicznym (Kapusta, 2009; Mutha et al., 2021).

1.5.2. Szlak fenylopropanoidowy *Medicago truncatula*

Szlak fenylopropanoidowy jest źródłem wyspecjalizowanych metabolitów, które pełnią u roślin wiele funkcji, takich jak tworzenie ligniny, ochrona przed promieniowaniem UV, warunkowanie barwy oraz zapachu kwiatów i owoców, regulacja interakcji symbiotycznych czy reakcje obronne (Dixon et al., 2013; Nadal & Paszkowski, 2013; Naoumkina et al., 2007; Nguyen et al., 2013; Vogt, 2010; J. Zhang et al., 2009). Szereg przemian chemicznych prowadzących do powstania głównych klas fenylopropanoidów jest dobrze poznany i opisany (Naoumkina et al., 2010). Biogeneza fenylopropanoidów rozpoczyna się konwersją L-fenylalaniny do kwasu *trans*-cynamonowego przez amoniakolizację fenyloalaninową (PAL, z ang. Phenylalanine Ammonia-Lyase). W wyniku hydroksylacji jest on przekształcony w kwas *para*-kumarowy, który służy kolejno do uzyskania *para*-kumaroilokoenzymu A (*p*-kumaroilo-CoA). Te trzy reakcje tworzą tzw. centralny szlak fenylopropanoidowy, będący źródłem prekursorów dla wszystkich odgałęzień szlaku prowadzących do biosyntezy monolignoli, stilbenów, kumaryn oraz (izo)flawonoidów (Dixon & Pasinetti, 2010). Związki z tej ostatniej grupy pełnią ważne funkcje w interakcji roślin ze środowiskiem chociażby jako atraktanty czy fitoaleksyny. Bobowate są niezwykle zasobne we flawonoidy, w szczególności w 5-deoksy(izo)flawonoidy, które są charakterystyczne dla roślin z tej rodziny. Pierwszym prekursorem odgałęzienia 5-deoksy(izo)flawonów jest izolikwiritigenina, będąca produktem reakcji z udziałem syntazy i reduktazy chalkonowej, która może być następnie przekształcona za sprawą izomerazy chalkonowej do likwiritigeniny. Ta ostatnia jest prekursorem zarówno dla biosyntezy 5-deoksyflawonoidów oraz 5-deoksyizoflawonoidów (Dixon et al., 2002). Większość fitoaleksyn produkowanych przez bobowate to właśnie izoflawonoidy (Hassan & Mathesius, 2012). Przykładowo częściowa odporność soi na infekcje *Fusarium solani* jest zależna od indukowanej przez patogen produkcji glyceoliny w korzeniach soi (Lozovaya et al., 2004). U *Medicago truncatula* końcowym produktem w szlaku 5-deoksyizoflawonoidów jest medikarpina, będąca główną fitoaleksyną tego gatunku (Dixon et al., 2002). Schemat szlaku fenylopropanoidowego u *M. truncatula* został umieszczony na rycinie 1.9. U bobowatych flawonoidy pełnią również rolę molekuł sygnałowych w interakcjach symbiotycznych z bakteriami brodawkowymi. Uwalnianie przez korzenie gatunkowo specyficznej mieszaniny flawonoidów moduluje rozpoznanie przez szczep bakteryjny właściwego gospodarza roślinnego i warunkuje specyficzność interakcji (Hassan & Mathesius, 2012; J. Zhang et al., 2009). Warto podkreślić iż ze względu na przestrzenne rozdzielanie miejsc biosyntezy, magazynowania i efektywnego działania fenylopropanoidów w roślinach, poznanie

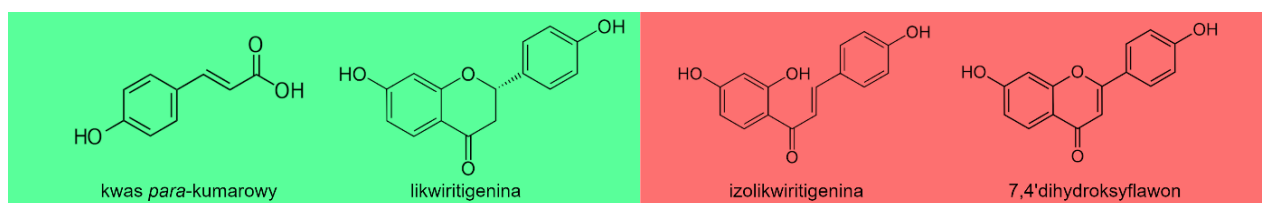
mechanizmów ich translokacji jest nie mniej ważne niż poznanie poszczególnych etapów biosyntezy (Hassan & Mathesius, 2012).



Rycina 1.9. Schemat szlaku fenylopropanoidowego u *Medicago truncatula*. Nazwy molekuł transportowanych przez MtABCG46 zostały podkreślone, a ich wzory strukturalne zostały zaznaczone w prostokacie.

1.5.3. Identyfikacja i charakterystyka MtABCG46

W genomie *M. truncatula* zidentyfikowano jak dotąd 184 geny kodujące białka ABC. Spośród nich 30 to pełne transportery ABCG, a jednym ze scharakteryzowanych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN jest MtABCG46. *MtABCG46* ulega ekspresji w korzeniach, liściach, kwiatach i owocach, głównie w obrębie ich wiązek przewodzących i jest indukowany w obecności patogenów oraz elicytorów grzybowych. Wyciszenie ekspresji *MtABCG46* skutkuje zmniejszeniem akumulacji medikarpiny i jej prekursorów w korzeniach (Banasiak et al., 2013). Badania nad MtABCG46 pozwoliły opisać to białko jako transporter błonowy kwasu *para*-kumarowego oraz likwiritigeniny (związki zostały zaznaczone na rycinie 1.9). Co więcej, eksperymenty transportu w heterologicznym systemie ekspresji - jakim były kultury zawiesinowe BY2 - pokazały, że MtABCG46 wykazuje selektywność w stosunku do molekuł ze szlaku fenylopropanoidowego i nie transportuje innych, pokrewnych chemicznie molekuł takich jak chociażby izolikwiritigenina, czy 7,4'-dihydroksyflawon (Biała et al., 2017). Wzory strukturalne wybranych fenylopropanoidów zostały ukazane na rycinie 1.10. Ta obserwacja wspiera hipotezę, że roślinne transportery ABCG charakteryzują się większą specyficznością substratową w porównaniu do ich drożdżowych homologów (Bailly et al., 2014). Co więcej, przypadek MtABCG46 pokazuje, iż transportery ABC mogą być zaangażowane nie tylko sekrecją produktów końcowych metabolizmu, ale również transportować prekursory, a tym samym być zaangażowane w regulację szlaków biosyntezy.



Rycina 1.10. Wzory strukturalne wybranych molekuł ze szlaku fenylopropanoidowego. Molekuły transportowane i nietransportowane przez MtABCG46 umieszczono kolejno na zielonym i czerwonym tle.

2. Materiały i metody

2.1. Heterologiczny system ekspresji i uzyskanie hodowli zawiesinowych komórek BY2 do izolacji błon (MtABCG46)

2.1.1. Konstrukty genetyczne

W Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin opracowano system heterologiczny ekspresji *MtABCG46* w oparciu o kultury kalusa *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* (BY2) (Nagata et al., 1992), oraz konstrukcję genetyczną zawierającą hybrydową sekwencję *MtABCG46* (Biała et al., 2017). Sekwencja hybrydowa (5026pz) złożona jest z fragmentu sekwencji genomowej zawierającej pięć pierwszych intronów (1575pz), połączonego w egzonie piątym z fragmentem sekwencji cDNA (3054pz). W celu ujednoliconego podejścia zamówiono syntezę sekwencji a także jej mutagenezę w firmie Genscript (www.genscript.com). Celem mutagenezy było stworzenie wariantów białka MtABCG46, różniących się w obrębie dwóch aminokwasów, tj. fenyloalaniny 562 (wymiana na tyrozynę, leucynę, izoleucynę i alaninę) oraz tyrozyny 1213 (wymiana na alaninę i fenyloalaninę). Gotowe konstrukcje bazowały na wektorze pMDC43, zawierającym hybrydową sekwencję genu *MtABCG46*, z przyłączoną na 5' końcu sekwencją kodującą białko zielonej fluorescencji (GFP, z ang. Green Fluorescent protein). Poprawność sekwencji potwierdzono przez sekwencjonowanie.

2.1.2. Transformacja bakterii *Escherichia coli*/ *Agrobacterium tumefaciens* metodą elektroporacji

Wykorzystane szczepy bakterii: *Escherichia coli* DH5a oraz *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Hellens et al., 2000) pochodziły z kolekcji instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

- Przygotowanie bakterii elektrokompetentnych

Bakterie *E. coli* oraz *A. tumefaciens* wysiano na podłoże stałe, wykorzystując pożywki odpowiednio LB lub YEP (tab. 2.1). W przypadku *A. tumefaciens* do pożywki dodano

antybiotyk selekcyjny - karbencylinę 50 µg/ml. Następnie bakterie inkubowano: 18h w temperaturze 37°C w przypadku *E.coli*, lub 48h w temperaturze 28°C w przypadku *A. tumefaciens*. Z kolonii bakteryjnej wyprowadzono płynną hodowlę w objętości 2 ml, którą wykorzystano do propagacji i założenia 25 ml hodowli która z kolei posłużyła do uzyskania hodowli o objętości 500 ml (rozcieńczenie 1:100). W momencie, gdy hodowla charakteryzowała się gęstością optyczną w przedziale wartości od 0,5 do 0,8 (OD₆₀₀, długość fali λ=600 nm) kolbę z bakteriami schłodzono na lodzie. Bakterie odseparowano od pożywki (usunięto supernatant) poprzez wirowanie z prędkością 5000 rpm przez 15 min, w temperaturze 4°C (Beckman J2-21, rotor wychylny). Uzyskany osad zawieszono w 125 ml schłodzonej wody MQ i ponownie zwirowano (5000 rpm, 15 min, 4°C). Osad zawieszono w 5 ml schłodzonego 10% glicerolu i zwirowano. Końcowy osad zawieszono w 10% glicerolu w objętości zależnej od OD hodowli wyjściowej (przykładowo, OD hodowli 0,6 zawieszono w 0,6 ml). Uzyskaną zawiesinę porocjowano po 40 µl w probówkach typu Eppendorf i schłodzono w ciekłym azocie. Bakterie przechowywano w temperaturze -80°C.

Tabela 2.1. Skład pożywek LB i YEP

	Pożywka LB	Pożywka YEP
Składnik	Ilość g/l	Ilość g/l
Ekstrakt drożdżowy	5 g	10 g
Pepton	10 g	10 g
NaCl	10 g	5 g
Agar (w przypadku pożywek stałych)	15 g	15 g
Ustalono pH 7 i auktoklawowano		

- Transformacja bakterii metodą elektroporacji

10ng plazmidowego DNA dodano do 40 µl umieszczonych w schłodzonej kuwecie do elektroporacji (Gene Pulser 1652086, Bio-Rad), rozmrożonych komórek elektrokompetentnych. Bakterie poddano działaniu pola elektrycznego o napięciu 2,5 kV przez 5ms przy użyciu elektroporatora Gene Pulser (Bio-Rad). Następnie komórki przeniesiono do 900 µl pożywki (LB w przypadku *E. coli* lub YEP w przypadku *A. tumefaciens*) w próbówce typu Eppendorf i inkubowano z wytrząsaniem (300 rpm) przez 45 min w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 75 min w temperaturze 28°C (*A. tumefaciens*). W kolejnym etapie bakterie wysiano

na stałe podłoże zawierające odpowiednie antybiotyki selekcyjne i inkubowano 18 h w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 48 h w temperaturze 28°C (*A. tumefaciens*).

Identyfikację pozytywnych kolonii bakteryjnych przeprowadzono za pomocą kolonijnej reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do sekwencji w obrębie *MtABCG46* (polimeraza GoTaq, Promega). Warunki reakcji oraz sekwencje starterów zawarto w tabelach 2.2.1 – 2.2.3.

Tabela 2.2.1. Skład mieszaniny kolonijnej reakcji PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca*	5 µl	-
starter 1 (10 µM)	1,25 µl	0,5 µM
starter 2 (10 µM)	1,25 µl	0,5 µM
bufor Go Taq (5x)	5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
H ₂ O MQ	9,9 µl	-
polimeraza Go Taq (5 U/µl)	0,1 µl	0,02 U/µl
objętość końcowa	25 µl	
*Pobrane z szalki i dodane do 5 µl komórki bakteryjne poddane denaturacji (98°C 10 min)		

Tabela 2.2.2. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas	
Denaturacja wstępna	98°C	3 min	
Denaturacja	95°C	30 s	x 30 cykli
Przyłączanie starterów	52°C	30 s	
Wydłużanie	72°C	30 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min	

Tabela 2.2.3. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji PCR

Nazwa	Sekwencja	T _m [°C]
571_ABCG46_F	5'- ATG GTA TGA TGG CTG TGG -3'	48,0
538_ABCG46_R	5'- CTA TCT CTT TTG GAA GTT AAA GG -3'	49,9

- Przygotowanie stoków glicerolowych bakterii

Kolonie bakteryjną zaszczepiono do 2 ml płynnej pożywki LB (*E. coli*) lub YEP (*A. tumefaciens*), zawierającej odpowiednie antybiotyki selekcyjne. Hodowlę prowadzono z wytrząsaniem (300 rpm) 18 h w temperaturze 37°C w przypadku *E. coli* lub 48 h w temperaturze 28°C w przypadku *A. tumefaciens*. Hodowlę zmieszano w proporcjach 1:1 z 50% schłodzonym glicerolem a następnie zamrożono przy wykorzystaniu ciekłego azotu. Uzyskane stoki przechowywano w temperaturze -80°C.

2.1.3. Hodowla i transformacja komórek kalusa tytoniu BY2

Hodowle i transformacje komórek kalusa tytoniu BY2 prowadzono w Pracowni Kultur Komórkowych i Tkankowych ICHB, z pomocą dr inż. Wandy Białej-Leonhard z Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB.

Tkanka kalusa *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* (BY2) (Nagata et al., 1992) była hodowana w ciemności na pożywce stałej BY2 (Tab 2.3), w temperaturze 24°C. Komórki pasażowano na świeżą pożywkę co 4 tygodnie.

Tabela 2.3 Skład pożywki BY2

Składnik	Ilość (na 1 l)
MS (M5524 Sigma)	4,3 g
Mioinozytol	100 mg
KH ₂ PO ₄	370 mg
Tiamina	1 mg
2,4-D	200 mg
Sacharoza	30 g
Agar (Kalys) (w przypadku pożywki stałej)	8 g
Ustalono pH 5,125 i autoklawowano	

- Hodowla zawieszinowa komórek BY2

Hodowle zawieszinowe komórek tytoniu BY2 inicjowano poprzez umieszczenie fragmentów grudek kalusa w 3 ml płynnej pożywki BY2 na płytce 6-dołkowej, którą następnie inkubowano w ciemności, w temperaturze 26°C, z wytrząsaniem 130 rpm (inkubator Innova 42, Incubator Shaker Series). Po trzech dniach połączoną mieszaninę z trzech dołków wymieszano ze świeżą pożywką w proporcjach 1:1 i przeniesiono do kolby stożkowej o pojemności 100 cm³. Po pięciu dniach przeprowadzono kolejny pasaż w stosunku 1:1 przenosząc hodowlę do kolby o pojemności 300cm³. Po upływie następnych 5 dni mieszaninę rozdzielano do kolb dodając świeżą pożywkę w proporcjach 10ml zawiesiny : 50ml pożywki. Po 7 dniowym okresie wzrostu hodowlę zbierano jako materiał do izolacji poprzez odfiltrowanie pożywki a następnie mrożenie w ciekłym azocie.

- Transformacja hodowli zawieszinowych BY2 z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteriami *A. tumefaciens* posiadającymi odpowiednią konstrukcję genową inokulowano 2 ml pożywki płynnej YEP z antybiotykami selekcyjnymi, tworząc hodowlę wstępną, którą następnie wykorzystano do propagacji 30 ml hodowli właściwej, którą inkubowano do uzyskania OD₆₀₀= 0,6. Bakterie zwirowano z prędkością 5000G przez 10 min, w temperaturze 4°C przy wykorzystaniu wirówki z uchylnym rotorem (Eppendorf 5804R). Następnie osad bakteryjny zawieszono w 1ml sterylnej pożywki BY2.

Do płytki 6-dołkowej dodano pięciodniową płynną hodowlę BY2 (5ml/dołek) oraz przygotowane bakterie *A. tumefaciens* (50 µl/dołek). Płytki inkubowano przez 48h w ciemności, w temperaturze 24°C i z wytrząsaniem 130 rpm (inkubator Innova 42, Incubator Shaker Series). Po tym czasie mieszaniny przeniesiono po 15 ml do probówek typu Falcon o objętości 50ml i wirowano z prędkością 2000 rpm przez 5 minut, w temperaturze pokojowej. Następnie osad płukano trzykrotnie świeżą, sterylną pożywką BY2. W kolejnym etapie komórki wylano na szalki ze stałą pożywką BY2 zawierającą antybiotyki selekcyjne (higromycynę 75 mg/l oraz taromentin 400 mg/l). Komórki na szalkach hodowano w ciemności w 24°C. Po około 3 tygodniach obserwowano wzrost grudek transgenicznego kalusa, które

pasażowano na świeżą stałą pożywkę z antybiotykami selekcyjnymi. Uzyskane linie transgeniczne pasażowano co 4 tygodnie.

2.1.4. Mikroskopia konfokalna

Wszystkie obserwacje mikroskopowe zostały wykonane w Pracowni Analizy Struktur Subkomórkowych ICHB PAN z pomocą Dr Joanny Banasiak z Zakładu Molekularnej Fizjologii Roślin ICHB PAN.

Przy pomocy mikroskopu (mikroskop konfokalny Leica TCS SP5 II wyposażony w kamerę cyfrową Leica DFC450C) analizowano lokalizację sygnału fluorescencyjnego białka fuzyjnego GFP:MtABCG46 w komórkach BY2 (długość fali światła lasera $\lambda=488\text{nm}$, maksimum emisji $\lambda=510\text{nm}$). Preparaty przygotowano z 5 dniowych hodowli zawiesinowych. Barwienie fluorescencyjnym znacznikiem błon komórkowych FM4-64 (ThermoFisher Scientific) przeprowadzono zgodnie z instrukcjami załączonymi przez producenta (długość fali światła lasera $\lambda= 558 \text{ nm}$, pomiar emisji $\lambda= 690 - 750 \text{ nm}$). Podczas obserwacji korzystano z oprogramowania Leica LAS AF.

2.1.5. Potwierdzenie poprawności sekwencji wariantów *MtABCG46* w liniach BY2

- Izolacja całkowitego RNA z hodowli zawiesinowych BY2

Izolację całkowitego RNA z komórek BY2 przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Aby ograniczyć zanieczyszczenia prób genomowym DNA zastosowano RNase-Free DNase Set (Qiagen). Wyizolowany RNA przechowywano w temperaturze -20°C .

- Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen), zgodnie z załączoną przez producentów instrukcją.

- Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR

Do reakcji amplifikacji fragmentów DNA wykorzystano polimerazę KOD DNA Polymerase (Millipore). Mieszaninę reakcyjną wzbogacono dodatkiem roztworu betainy (Sigma-Aldrich), zapobiegającej formowaniu się struktur II rzędowych ssDNA (ang. *single stranded DNA*) w rejonach bogatych w guaninę i cytozynę oraz poprawia wydajność ich amplifikacji (Henke et al., 1997). W zależności od wariantu MtABCG46 w linii, startery zostały dobrane tak, aby amplifikowany fragment zawierał sekwencję kodonu tłumaczonego na aminokwas w pozycji 562 (dla linii/wariantów F562A, F562L, F562I oraz F562Y) lub na aminokwas w pozycji 1213 (dla linii/wariantów Y1213A i Y1213F). Dla linii zawierającej sekwencję kodującą natywne białko sprawdzono sekwencje dla obu pozycji. Skład mieszaniny reakcyjnej, profil temperaturowo-czasowy oraz sekwencje oligonukleotydów przedstawiono w tabelach 2.4.1 – 2.4.3. Gotowe produkty PCR poddano oczyszczaniu za pomocą zestawu DNA Clean & Concentrator™ (D4005, Zymo Research), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Uzyskane produkty zostały przesekwencjonowane przez firmę Genomed. Do analizy wyników sekwencjonowania wykorzystano narzędzie Seqman oprogramowania LaserGene7.

Tabela 2.4.1. Skład mieszaniny kolonijnej reakcji PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca	2 µl	-
starter 1 (10 µM)*	0,75 µl	0,3 µM
starter 2 (10 µM)*	0,75 µl	0,3 µM
bufor KOD (10x)	2,5 µl	1x
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
MgSO ₄ (25mM)	1,5 µl	1,5 mM
H ₂ O MQ	9,5 µl	-
polimeraza KOD Hot start (1U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
betaina (5M)	5 µl	1 M
objętość końcowa	25 µl	

*Para starterów 570 i 242 dla wariantów F562X oraz wariantu natywnego; końcowy produkt 1116pz.
Para starterów 96 i 100 dla wariantów Y1213X oraz wariantu natywnego; końcowy produkt 1138pz.

Tabela 2.4.2. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas	
Denaturacja wstępna	95°C	2 min	
Denaturacja	95°C	20 s	x 30 cykli
Przyłączanie starterów	60/61°C*	10 s	
Wydłużanie	70°C	22 s	
Wydłużanie końcowe	70°C	5 min	

* 60°C dla pary starterów 570 i 242; 61°C dla par sstarterów 96 i 100

Tabela 2.4.3. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji PCR

Nazwa	Sekwencja	T _m [°C]
570_ABCG46_R	5'- GGA GCA AGG TGT TAC AGA -3'	56,7
242_ABCG46_F	5'- CGT ACC ATT TGA CAA GAC G -3'	59,7
96_ABCG46_R	5'- CCA ATA TGG TGG AGA TCG TA -3'	60,2
100_ABCG46_F	5'- CTC TAG TTG GTT TGC CTG G -3'	60,4

- Ilościowa i jakościowa analiza otrzymanego DNA i RNA

Analizę ilościową kwasów nukleinowych przeprowadzono przy pomocy spektrofotometru Nano Drop One (Thermo Scientific). Na podstawie współczynnika absorbancji A_{260}/A_{280} określono stopień zanieczyszczenia prób białkami. Wartość współczynnika A_{260}/A_{230} informowała o zanieczyszczeniu prób m. in. etanolem lub polisacharydami. Jakość wyizolowanego RNA oraz poprawną długość produktów PCR oceniano również za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym, zawierającym barwnik fluorescencyjny Gel View (1,5 μ l/100 ml, Novazym), w buforze 1x TAE (Tab. 2.5). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V. Do analizy rozdziału wykorzystano transiluminator ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Do oceny wielkości amplifikowanych produktów użyto marker Gene Ruler 1kb (Fermentas).

Tabela 2.5. Skład buforu do elektroforezy TAE 1x

Składnik	Ilość (na 1 l)	Stężenie końcowe
Tris	4,84 g	40 mM
Kwas octowy	1,2 ml	20 mM
EDTA	0,372 g	1 mM
Wykorzystano 0,5 M roztwór EDTA o pH 8,0 – 2 ml/1 l		

2.2. Heterologiczny system ekspresji i agroinfiltracja liści *Nicotiana benthamiana* do izolacji błon (AtABCG36)

Wykorzystane bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, nasiona *Nicotiana benthamiana*, oraz konstrukcje genetyczne zawierające: (i) sekwencje cDNA *AtABCG36* z przyłączoną sekwencją kodującą GFP lub (ii) sekwencję kodującą wirusowe białko p19, tłumiące postranskrypcyjne wyciszanie genów (nazywane dalej wektorem RK19) (Silhavy et al., 2002) pochodziły z kolekcji odwiedzanego laboratorium Dr Markusa Geislera na Wydziale Biologii Uniwersytetu we Fryburgu, w Szwajcarii. Badania skupione na transporterze ABCG36 z *Arabidopsis thaliana* prowadzono w ramach stażu zagranicznego, we współpracy z doktorantem Jianem Xia.

2.2.1. Uprawa roślin *Nicotiana benthamiana*

Nasiona *Nicotiana benthamiana* wysiano do doniczek o pojemności 0,5 l, zawierających ziemię i umieszczono w pomieszczeniach fitotronowych w kontrolowanych warunkach: temperatura 25°C, natężenie światła 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wilgotność 60%, fotoperiod - 16h dzień/8h noc. Po 2 tygodniach pojedyncze siewki przeniesiono indywidualnych doniczek i hodowano przez kolejne 3 tygodnie.

2.2.2. Agroinfiltracja liści tytoniu z użyciem *A. tumefaciens*

Do szklanych kolb dodano 30ml pożywki płynnej YEP z antybiotykami selekcyjnymi i zaszczepiono bakteriami *A. tumefaciens* z konstrukcją genową zawierającą cDNA *AtABCG36* lub antywyciszający wektor RK19 (Silhavy et al., 2002). Hodowlę prowadzono przez noc w temperaturze 28°C. Po tym czasie komórki bakteryjne przeniesiono do probówek typu Falcon (50 ml) i zwirowano z prędkością 5 000 rpm przez 15min, w temperaturze pokojowej. Uzyskany osad zawieszono w buforze do agroinfiltracji (tab. 2.6) tak, aby uzyskać $\text{OD}_{600} = 0,8$ w objętości około 30ml. W kolejnym etapie bakterie inkubowano z mieszaniem przez 3h w temperaturze pokojowej. Po inkubacji bakterie posiadające *AtABCG36* wymieszano

z bakteriami posiadającymi wektor Rk19 w proporcji 2:1, zostawiając część bakterii z wektorem RK19 jako kontrolę. Mieszaninę przeniesiono do strzykawki pozbawionej igły, za następnie wstrzyknięto ją do liści od ich spodu tak, aby wniknęła do całości liścia (2 – 3 liście na roślinę). Po 3 dniach nastrzykiwane liście zebrano.

Tabela 2.6. Skład buforu do agroinfiltracji

Składnik	Ilość (na 100 ml)	Stężenie końcowe
MgCl ₂ (3 M)	0,333 µl	10 mM
MES-KOH (pH5,6 ; 1M)	1 ml	10 mM
Acetosyringon (150 mM, w DMSO)	100 µl	150 µM

Ekspresję *AtABCG36* potwierdzano rutynowo poprzez mikroskopię konfokalną oraz Western blot z przeciwciałami anty-*AtABCG36* (Agrisera, AS09 471) (Aryal et al., 2019; Matern et al., 2019).

2.3. Otrzymywanie izolatów błon komórkowych i ocena jakości

Izolacje przeprowadzano z pomocą dr inż. Wandy Białej-Leonhard.

2.3.1. Izolacja błon komórkowych

Fracje błonowe izolowano z komórek *Nicotiana tabacum* BY2 uzyskanych poprzez płynne hodowle zawiesinowe lub agroinfiltrowanych liści *Nicotiana benthamiana*. 12g zamrożonego materiału wstępnie roztarto przy pomocy młynka, w obecności ciekłego azotu. Następnie kontynuowano ucieranie na lodzie, wlewając do młynka 40 ml buforu do homogenizacji (tab. 2.7), do którego uprzednio dodano koktajl inhibitorów proteaz (cOmplete™; Roche) oraz PMSF (Fluorek fenylometylosulfonylu), aż do uzyskania płynnego, homogennego roztworu. Homogenat przeniesiono do probówki typu Falcon (50ml) i wirowano z prędkością 5 000 G przez 5min, w temperaturze 4°C (Eppendorf 5804R). Następnie supernatant przeniesiono do nowej probówki i wirowano 10 000 G przez 5min, w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie supernatant przeniesiono do probówek Beckman i wirowano z prędkością 75 000 G przez 1,5h, w temperaturze 4°C (Beckman Coulter Avanti JXN-26, rotor JA-25.50). Uzyskany osad zawieszono przy pomocy pędzelka w 2 ml buforu do zawieszania frakcji błonowej (tab. 2.8).

Tabela 2.7. Skład buforu do homogenizacji

Składnik	Stężenie końcowe
Sorbitol	250 mM
Tris-HCl	50 mM
EDTA	2 mM
DTT*	0,1%
PVP*	0,6%
PMSF w etanolu 0,1 M*	1 mM
Inhibitory proteaz (cOmplete™; Roche)*	1 tabletka na 100ml buforu
Ustalono pH 8,0 i autoklawowano	
* dodawane bezpośrednio przed izolacją	

Tabela 2.8. Skład buforu do zawieszania frakcji błonowej

Składnik	Stężenie końcowe
Sacharoza	0,33 M
KH ₂ PO ₄	5 mM
KCl	3 mM
sacharoza	10%
Ustalono pH 7,8 i sterylizowano przez filtrację	

2.3.2. Wzbogacanie frakcji błony komórkowej

W celu zwiększenia udziału frakcji błony komórkowej, a tym samym również ilości badanego białka w preparatach zastosowano dodatkowo etap frakcjonowania błon oparty o układ dwufazowy glikol polietylenowy – dekstran (Larsson et al., 1987). Przygotowano mieszaninę dwufazową (tab. 2.9), którą po dokładnym wymieszaniu rozporcjowano po 6 g w probówkach typu Falcon (15 ml) i zostawiono na noc z ciągłym mieszaniem w temperaturze 4°C. Do każdej probówki dodano 2 g świeżo uzyskanego izolatu błonowego i dobrze wymieszano, a następnie wirowano z prędkością 1500 rpm przez 10min w temperaturze 4°C (Eppendorf 5804R). Następnie przeniesiono górną fazę do nowej probówki typu Falcon (50ml) i rozcieńczono czterokrotnie z wykorzystaniem buforu do rozcieńczania (tab. 2.10). Uzyskaną mieszaninę przeniesiono do probówek Beckman i wirowano z prędkością 75 000 G przez 2h, w temperaturze 4°C (Beckman Coulter Avanti JXN-26, rotor JA-25.50). Uzyskany osad zawieszono pędzelkiem w 100 – 300 µl buforu do zawieszania frakcji błonowej (tab. 2.7), lub buforu STED10, w zależności od przeznaczenia materiału (tab. 2.11). Wzbogacanie przeprowadzono jedynie dla izolatów z komórek BY2.

Tabela 2.9. Skład mieszaniny dwufazowej

Składnik	Ilość (na 100g)	Stężenie końcowe %(w/w)
Dekstran 20%	42,67 g	8,5%
Glikol polietylenowy 40%	21,33 g	8,5%
Sacharoza	11,3 g	11,3%
KH ₂ PO ₄ (0,2M, pH 7,8)	2,5 ml	0,068%
KCl (1M)	303,7 µl	0,023%
woda	Do 100 g	-

Tabela 2.10. Skład buforu do rozcieńczania

Składnik	Stężenie końcowe
Sacharoza	0,33 M
Tris	0,1 M
Ustalono pH 7,8 i sterylizowano przez filtrację	

Tabela 2.11. Skład buforu STED10

Składnik	Stężenie końcowe
Sacharoza	10% (w/v)
Tris-HCl pH 7,6	10 mM
EDTA	10 mM
DTT	1 mM
Ustalono pH 7 i autoklawowano	

- Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda

Stężenie białka w uzyskanych z izolacji frakcji błonowych próbach oznaczono na podstawie reakcji z odczynnikiem Bradford (Bio-Rad 5000205). W tym celu sporządzono krzywą wzorcową z wykorzystaniem roztworu surowiczej albuminy bydlęcej (ang. *Bovine serum albumine*, BSA) w 7 stężeniach: 0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml. Próby przygotowano, dodając do 798 μ l wody 2 μ l analizowanej próby oraz 200 μ l odczynnika Bradford (5X). Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=595$ nm za pomocą spektrofotometru Nano Drop One (Thermo Scientific). Próby rozcieńczono w zależności od przeznaczenia (1 μ g/ μ l dla testów aktywności ATPazowych i analizy western blot, 4 μ g/ μ l dla eksperymentów transportu).

2.3.3. Analiza western blot

- Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Do 20 μ l próby o stężeniu 1 μ g/ μ l dodano 3x stężony bufor do rozpuszczania prób białkowych SBB (Tab. 2.12) a następnie inkubowano przez 15min w temperaturze 37°C. Po tym czasie próby zwirowano z prędkością 13 000 rpm przez 5min. Supernatanty oraz marker wielkości wprowadzono w kieszonki przygotowanego wcześniej żelu poliakrylamidowego (Tab. 2.13) i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Elektroforezę prowadzono w buforze elektroforetycznym Laemmli'ego (Tab. 2.14), przy napięciu 240 V przez około 45 min (do momentu wypłynięcia barwnika z żelu). Elektroforezę przeprowadzono przy użyciu zestawu Mini Protean firmy Bio-Rad.

Tabela 2.12. Skład buforu do rozpuszczania prób białkowych SBB (3x)

Składnik	Ilość (na 20 ml)
1M Tris-HCl pH 6,8	4,8 ml
SDS	1,2 g
Glicerol 100%	6 g
Błękit bromofenolowy	0,003 g
Bezpośrednio przed użyciem dodano DTT	

Tabela 2.13. Skład żelu poliakrylamidowego

Składnik	Żel rozdzielający 10%	Żel zagęszczający 5%
Poliakrylamid (roztwór 40% 19:1; Roth)	2,5 ml	500 μ l
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	500 μ l
10% APS	100 μ l	40 μ l
10% SDS	100 μ l	40 μ l
TEMED	4 μ l	4 μ l
H ₂ O MQ	4,8 ml	2,92 ml

Tabela 2.14. Skład buforu Laemmli (1x)

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	0,025 M
Glicyna	0,192 M
SDS	0,1%

- Elektrotransfer typu Semi-Dry (półsuchy)

Dwie bibuły do elektrotransferu (Bio-Rad) zanurzone w pojemniku z buforem do elektrotransferu (Tab. 2.15). Membranę PVDF (Immobilon P, Millipore) aktywowano poprzez przepłukanie w 100% metanolu a następnie umieszczono w buforze do elektrotransferu. W urządzeniu do elektrotransferu (Bio-rad Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell) ułożono kolejno: bibułę, membranę, żel, bibułę. Stos polano niewielką ilością buforu i dociśnięto wałeczkiem aby usunąć pęcherzyki powietrza. Elektrotransfer prowadzono przy napięciu 22 V przez 1 h.

Tabela 2.15. Skład buforu do elektrotransferu

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	48 mM
Glicyna	39 mM
Metanol	10%
SDS	0,0375%

- Hybrydyzacja Western blot

Po elektrotransferze membranę umieszczono w buforze do przemywania (Tab. 2.17) i płukano przez 15 min, w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem 30 rpm. Kolejnym krokiem była inkubacja membrany w buforze do blokowania (Tab. 2.18), przez noc w temperaturze 4°C. Następnie znów przepłukano membranę przy pomocy buforu do przemywania. Tak przygotowaną membranę inkubowano w roztworze z poliklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi dla MtABCG46 (Eurogentec)(Banasiak et al., 2013) (rozcieńczone 1:5000 w buforze 1x TBS, Tab. 2.16), lub pierwszorzędowymi przeciwciałami

specyficznymi dla H⁺ATPaz (rozcieńczone 1:10000) (Morsomme et al., 1998), przez 1 h w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem 30 rpm. Po dwukrotnym przepłukaniu buforem do przemywania, membranę inkubowano w roztworze z przeciwciałami drugorzędowymi antykróliczymi IgG (rozcieńczenie 1:15000)(Sigma), sprzężonymi z alaliczną fosfatazą. Po inkubacji membranę przepłukano czterokrotnie w buforze do przemywania. Membranę umieszczono w roztworze zawierającym substraty dla alkalicznej fosfatazy BCIP oraz NBT (SigmaFAST) i inkubowano w ciemności do momentu pojawienia się barwnych prążków. Reakcję zatrzymano poprzez przeniesienie membrany do pojemnika z wodą.

Tabela 2.16. Skład buforu TBS (10x)

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	200 mM
Glicyna	1,37 M
pH 7,6	

Tabela 2.17. Skład buforu do przemywania

Składnik	Stężenie końcowe
TBS 10x	1x
Tween 80	0,1%

Tabela 2.18. Skład buforu do blokowania

Składnik	Stężenie końcowe
TBS 10x	1x
Tween 80	0,5%
odtłuszczone mleko w proszku	3%

2.4. Biochemiczne eksperymenty transportu

Eksperymenty transportu oraz analizę HPLC/MS przeprowadzono we współpracy z dr inż. Wandą Białą-Leonhard, wykorzystana aparatura HPLC/MS została udostępniona w ramach Pracowni Spektrometrii Mas ICHB PAN.

2.4.1. Ocena szczelności pęcherzyków błonowych (test ACMA)

Szczelność spontanicznie formujących się w wyniku izolacji pęcherzyków błonowych sprawdzono za pomocą testu ACMA. Odczynnik 9-amino-6-chloro-2-metoksyakrydyna (ACMA, Invitrogen A1324), wykorzystywany podczas reakcji, jest fluorescencyjnym związkiem przenikającym błony komórkowe, którego fluorescencja gaszona jest w przypadku występowania gradientu pH po dwóch stronach błony. Dodanie ATP do mieszaniny reakcyjnej uruchamia pompy protonowe obecne w błonach komórkowych, co w przypadku szczelnych pęcherzyków prowadzi do zakwaszenia środowiska wewnętrznego, a tym samym do wygaszenia sygnału fluorescencji ACMA (Wielandt et al., 2016). Test polegał na pomiarze fluorescencji mieszaniny reakcyjnej (Tab. 2.19), przy wzbudzeniu 419 nm, a następnie dodaniu do próby ATP (5 mM). Ponownie wykonano pomiar fluorescencji przy zachowaniu tych samych parametrów (wzbudzenie 419 nm, typ widma EM, zakres skanowania 439-318 nm, przesłona 10 nm) (spektrofluorofotometr Shimadzu RF5301PC).

Tabela 2.19. Skład mieszaniny reakcyjnej testu ACMA

Składnik	Stężenie końcowe
(NH ₄)SO ₄	25 mM
MgCl ₂	6 mM
ACMA	4 μM
frakcja błonowa (OD=5)	50 μl

2.4.2. Eksperymenty transportu

Transport likwiritigeniny, kwasu *p*-kumarowego, izolikwiritigeniny oraz 7,4'-dihydroksyflawonu (extrasynthase) zbadano w oparciu o izolaty frakcji błonowej komórek BY2 nadekspresjonujących warianty *MtABCG46*. Schematyczny przebieg doświadczenia zilustrowano na rycinie 4.10. Dla każdego analizowanego związku przygotowano dwie mieszaniny reakcyjne: (i) zawierającą ATP oraz (ii) pozbawioną ATP (tab. 2.20). Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie pęcherzyków o końcowym stężeniu 0,52 mg/ml do mieszaniny reakcyjnej zawierającej potencjalny substrat o stężeniu 750 μ M, a także kinazę kreatynową i fosfokreatynę, które zapewniały stałość stężenia ATP w czasie poprzez regenerację ADP do ATP. W przypadku konkurencji transportu mieszanina zawierała jednocześnie likwiritigeninę jak i kwas *p*-kumarowy (w równym stężeniu 750 μ M). Po 3 minutach inkubacji w 24°C z wytrząsaniem 300 rpm, próby w objętości 300 μ l zebrano poprzez odfiltrowanie na filtry nitrocelulozowym (0,45 μ m, Millipore) i przepłukanie 10 ml schłodzonego buforu do transportu pozbawionego ATP (tab. 2.21). Filtry suszono na bibule przez godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie przeniesiono do indywidualnych butelek zawierających po 1ml 80% metanolu z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego i inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej.

Aby wyekstrahować analizowane związki, 680 μ l próby przeniesiono do próbek typu Eppendorf (2ml), dodano mieszaninę chloroform:woda w proporcjach 1:0,25 objętości próby, zworteksowano a następnie wirowano przez 30 min z prędkością 13 200 rpm. W kolejnym etapie supernatant przeniesiono do szklanych probówek i wysuszono (Thermo Scientific Savant SPD121P SpeedVac Concentrator). Wysuszone próby rozpuszczano w 80% metanolu i poddawano analizie HPLC/MS.

Tabela 2.20. Skład mieszaniny reakcyjnej w eksperymentach transportu

	+ATP	-ATP
Składnik	Stężenie końcowe	Stężenie końcowe
Bufor do transportu	1 x (+ATP)	1 x
MgCl ₂	1 mM	1 mM
Analizowany związek	750 μ M	750 μ M
Kinaza kreatynowa	0,1 mg/ml	100 mg/ml
Fosfokreatyna	10 mM	10 mM
pęcherzyki błonowe	0,52 mg/ml	0,52 mg/ml

Tabela 2.21. Skład buforu do transportu

Składnik	Stężenie końcowe
Sacharoza	10% (w/v)
Tris-HCl	10 mM
EDTA	10 mM
ATP*	4 mM
Ustalono pH5	
*Tylko dla prób +ATP	

2.4.3. Analiza HPLC/MS

Analizy LC/MS zostały przeprowadzone z wykorzystaniem systemu LC/ESI/MS. System chromatograficzny UPLC Aquity firmy Waters był sprzężony ze spektrometrem mas micrOTof-QII firmy Bruker Daltonics. Parametry pracy układów przedstawiono w tabelach 2.22 i 2.23.

Tabela 2.22. Waters UPLC Aquity- parametry pracy

Układ Waters UPLC Aquity	
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzyku
Kolumna	Poroshell 120-EC-C18 (Agilent)
Wymiary kolumny	2,1 x 100 mm, średnica ziaren 2,7 μm
Temperatura kolumny	35°C
Objętość nastrzyku	5 μl
Przepływ	0,6 ml/min
Temperatura próby	10°C
Czas rozdziału	25 min

Tabela 2.23. Bruker Daltonics micrOToF-QII – parametry pracy

Układ micrOToF-QII	
Źródło jonów	ESI
Analizator	Qo-ToF
Napięcie w źródle jonów	+/- 4,5 kV
Temperatura źródła	220°C
Gaz nebulizujący	Azot 1,2 bara
Przepływ gazu suszącego	8 l/min
Rozdzielczość układu	15000 FWHM (przy 200 m/z)
Zakres rejestrowanych mas	50-1200 m/z
Kalibracja aparatu	Zewnętrzna i wewnętrzna – klastrami mrówczanu sodu
Program do analizy danych	Data Analysis 4.0

Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny:

- Faza A – 99,5% H₂O, 0,5% kwas mrówkowy (v/v)
- Faza B – 99,5 % acetonitryl, 0,5% kwas mrówkowy (v/v)

Gradient fazy ruchomej umieszczono w tabeli 2.24.

Tabela 2.24. Gradient fazy ruchomej wykorzystany przy analizach HPLC/MS

Minuty	% A	% B
0	90	10
5	70	30
12	70	30
13	5	95
15	5	95
18	90	10
25	90	10

Objętość wycieku z kolumny została rozdzielona w stosunku 3:2 (split postkolumnowy), do źródła jonów próba była wprowadzana z prędkością przepływu 0,2 ml/min.

2.5. Testy aktywności ATPazowej

Do testów aktywności ATPazowej wykorzystano izolaty błonowe posiadające badany transporter (MtABCG46 lub AtABCG36), zawieszony w buforze STED10 (tab. 2.11) i stężeniu białka 1mg/ml. Przygotowano świeże roztwory A i B, które inkubowano na lodzie przez co najmniej godzinę (tab. 2.25). Następnie w probówce typu Eppendorf (1 ml) sporządzono mieszaninę reakcyjną (tab. 2.26) poprzez dodanie do buforu podstawowego (tab. 2.27) pęcherzyków błonowych, substancji, której wpływ na aktywność badano oraz zestawu fosfoenolopirogronian – kinaza pirogronianowa, który zapewniał stałość stężenia ATP w czasie poprzez regenerację ADP do ATP. Bezpośrednio przed startem połączono roztwory A i B i rozpieptowano do umieszczonej na lodzie płytki 96 dołkowej numer 1 (po 100 μ l na dołek). Do dołków płytki 96 dołkowej numer 2 dodano po 100 μ l buforu wywołującego (tab. 2.28). reakcję rozpoczynano dodając do 1 ml mieszaniny reakcyjnej 50 μ l 0,33M roztworu ATP (pH 7,0) do mieszaniny reakcyjnej. Próby inkubowano w 24°C z wytrząsaniem 300 rpm. Pomiaru dokonywano w 3 czasach (0 min, 15 min i 30 min) poprzez dodanie 100 μ l mieszaniny do 3 dołków płytki numer 1 dla każdego punktu pomiarowego. Do wyznaczenia stężenia jonów fosforanowych sporządzono krzywą wykorzystując roztwory KH_2PO_4 o znanym stężeniu. Po 10 minutach inkubacji próby na lodzie 133 μ l mieszaniny z płytki 1 przenoszono na płytkę 2. Pomiaru absorbancji o długości fali ($\lambda=840$ nm) dokonywano po inkubowaniu prób przez godzinę na płytce numer 2 (Hidex Sense microplate reader). Wynik dla każdego punktu pomiarowego uśredniano z trzech dołków. Z 3 punktów czasowych wyznaczano krzywą, na podstawie której ustalano aktywność ATPazową ($\text{nmol jonów fosforanowych} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka).

Tabela 2.25. Skład roztworów A i B

Roztwór	Składnik	Stężenie końcowe
Roztwór A (25ml)	Kwas askorbinowy	0,17 M
	HCl	0,5 M
	SDS	0,1%
Roztwór B (2,5 ml)	Heptamolibdenian amonu	60 mM
Inkubowano na lodzie		

Tabela 2.26. Skład mieszaniny reakcyjnej testów ATPazowych

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor podstawowy	1 x
pęcherzyki błonowe	0,06 mg/ml
Analizowany związek*	0 - 100 μ M
Ortowanadan sodu (inhibitor)*	1 mM
fosfoenolopirogronian	10 mM
kinaza pirogronianowa	0,44 mg/ml
* W zależności od próby	

Tabela 2.27. Skład buforu podstawowego do testów ATPazowych

Składnik	Stężenie końcowe
MOPS	20 mM
MgSO ₄	8mM
KNO ₃	10 mM
NaN ₃	4 mM
Na ₂ MoO ₄	0,25 mM
Ustalono pH 7,0	

Tabela 2.28. Skład buforu wywołującego

Składnik	Stężenie końcowe
Metaarsenian sodu	150 mM
Cytrynian sodu	0,75 mM
Kwas octowy (lodowaty)	5% (v/v)

2.6. Analizy filogenetyczne i modelowanie *in silico*

2.6.1. Stworzenie zbioru sekwencji

Zbiory sekwencji utworzono z pomocą Dr Joanny Banasiak z Zakładu Fizjologii Molekularnej ICHB, oraz Dr Marcina Radoma z Zakładu Bioinformatyki Strukturalnej ICHB.

Do stworzenia zbioru sekwencji pełnych roślinnych transporterów ABCG wykorzystano algorytm tBLASTn (Altschul et al., 1990) oraz sekwencję aminokwasową MtABCG46 do przeszukania transkryptomowej bazy projektu tysiąca roślinnych transkryptomów (1KP – 1000 transcriptomes project) (E. J. Carpenter et al., 2019). Dobierając parametr *E-value* na poziomie $1e-5$ wyszczególniono 26 889 sekwencji o długości powyżej 1000 aminokwasów w obrębie wszystkich 6 ramek odczytu analizowanych przez algorytm. Następnie usunięto powtarzające się sekwencje i wybrano najdłuższe wyniki, rozpoczynające się kodonem ATG do dalszej analizy. Stosując algorytm BLATp (Altschul et al., 1990) i wykorzystując znane sekwencje transporterów ABC z różnych podrodziny zidentyfikowano sekwencje należące do podrodziny ABCG. Uzyskano zbiór tworzony przez 1839 sekwencji, pokrywających się w co najmniej 70% z sekwencjami pełnych transporterów ABCG (*E-value* 0,0), które wykorzystano do dalszych analiz.

2.6.2. Analizy oparte o zbiór sekwencji

Celem dalszych analiz na zbiorze sekwencji wykonano dopasowanie sekwencji (MSA, z ang. Multiple Sequence Alignment) wykorzystując algorytm MUSCLE (Edgar, 2004), dostępny w ramach programu MEGA X (Kumar et al., 2018).

- Przewidywanie struktury drugorzędowej

Do przewidywania struktury drugorzędowej pełnych roślinnych transporterów ABCG wykorzystano serwer JPred4 (Drozdetskiy et al., 2015) oraz utworzone dopasowanie sekwencji

roślinnych pełnych transporterów ABCG w formacie .fasta. Serwer dostępny jest pod adresem http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index_up.html. Aby porównać otrzymany wynik ze strukturą drugorzędową dostępnej struktury ludzkiego homodimeru ABCG2, plik PDB 5nj3 (Taylor et al., 2017) poddano analizie lokalną wersją algorytmu Stride (Heinig & Frishman, 2004). Uzyskane w ten sposób informacje na temat struktury drugorzędowej zestawiono na podstawie dopasowania sekwencji (algorytm MUSCLE) pełnych transporterów ABCG *Medicago truncatula* (w tym MtABCG46) oraz ludzkich dimerów ABCG (w tym homodimeru ABCG2).

Przewidywanie helis transbłonowych w obrębie sekwencji MtABCG46 przeprowadzono przy użyciu serwera CCTOP (wersja s.1.00) (Dobson et al., 2015), dostępnego pod adresem <http://cctop.ttk.hu/>.

- Analizy zachowawczości i koewolucji

Ze zbioru sekwencji po dopasowaniu algorytmem MUSCLE wyodrębniono mniejsze zbiory, tworzone przez sekwencje przypisane gatunkom z grup filogenetycznych: zielone algi - 66 sekwencji, *Bryophytes* - 205 sekwencji, *Pteridophytes* - 91 sekwencji, jednoliścienne - 388 i dwuliścienne - 725 sekwencji. Analizę zachowawczości przeprowadzono zarówno dla pełnego zbioru jak i wyodrębnionych mniejszych zbiorów wykorzystując serwer ConSurf, dostępny na stronie <https://consurf.tau.ac.il>, z domyślnymi ustawieniami (statystyka bayesowska, automatyczny dobór modelu ewolucyjnego) (Ashkenazy et al., 2016; Celniker et al., 2013). Drzewo filogenetyczne do analizy uzyskano w ramach serwera.

Analizę koewolucyjną przeprowadzono w oparciu o algorytm GREMLIN dostępny na stronie <http://gremlin.bakerlab.org>, z domyślnymi ustawieniami (Kamisetty et al., 2013; Ovchinnikov et al., 2014). Do tego celu wykorzystano pełny zbiór 1839 sekwencji po dopasowaniu algorytmem MUSCLE.

Częstotliwość występowania aminokwasów na danej pozycji ustalono przy wykorzystaniu zbioru sekwencji po dopasowaniu oraz narzędzia WebLogo3 (Crooks et al., 2004).

2.6.3. Modelowanie z wykorzystaniem serwera I-TASSER

Na podstawie analizy struktury drugorzędowej (JPRED4) i porównania z dostępnymi w tym czasie strukturami ludzkich połowicznych transporterów ABCG - heterodimeru ABCG5/G8 (PDB: 5DO7)(J. Y. Lee et al., 2016) i homodimeru ABCG2 (PDB: 5NJ3)(Taylor et al., 2017), sekwencję MtABCG46 podzielono na dwie części tak, aby odzwierciedlała dwa połowiczne transportery. Każda część posiadała przewidywane sekwencje tworzące po jednej domenie wiążącej i jednej domenie transbłonowej. Z uwagi na brak analogicznych elementów w dostępnych strukturach białek ABCG, będących źródłem informacji dla modelowania, na tym etapie w sekwencji białka pominięto pierwsze od N końca 110 aminokwasów łańcucha, aminokwasy 784 – 803 budujące pętlę łączącą TMD1 z NBD2 (łącznik), oraz aminokwasy 137 – 159 tworzące wydłużoną pętlę pomiędzy dwiema pierwszymi harmonijkami β NBD1 (i całego białka). Tym samym do pierwszej serii modelowania wykorzystano sekwencje kolejno od 111 do 783 dla pierwszej połowy i od 803 do 1428 dla drugiej połowy. Następnie, wyniki analizy koewolucyjnej (GREMLIN) przekonwertowano do formy ograniczeń kontaktów (ang. contact restraints) przy pomocy własnego skryptu. Wykorzystując sekwencje oraz ograniczenia kontaktu jako dane dla serwera I-TASSER (Yang et al., 2014; Yang & Zhang, 2015) uzyskano modele struktur obu części modelowanego białka. W kolejnym etapie obie części nałożono na eksperymentalnie uzyskaną strukturę homodimeru ABCG5/G8 (PDB: 5DO7) przy pomocy algorytmu TM-align (Y. Zhang & Skolnick, 2004). W drugiej serii modelowania ponownie wykorzystano serwer I-TASSER, tym razem wprowadzając uzyskaną strukturę jako szablon dla sekwencji MtABCG46 zawierającej łącznik i wydłużoną pętlę w obrębie NBD1 (111 – 1428). Jakość uzyskanego modelu przeanalizowano wykorzystując narzędzie PROCHECK (Laskowski et al., 1993), dostępne na stronie <https://services.mbi.ucla.edu/>.

2.7. Eksperymenty w oparciu o dynamikę molekularną

Wyniki oparte na dynamice molekularnej z zastosowaniem Modelu AlphaFold2 uzyskano na podstawie eksperymentów przeprowadzonych we współpracy z dr Janem Brezovskim prof. UAM oraz mgr. Carlosem Eduardo Sequeiros Borją z Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu na Uniwersytecie Adama Mickiewicza. Do przeprowadzania analiz wykorzystano zaplecze Poznańskiego Centrum Superkomputerowo-Sieciowego (PCSS), afiliowanego przy ICHB PAN.

2.7.1. Model AlphaFold2

Wykorzystując sekwencję MtABCG46 i narzędzie AlphaFold2 (wersja 2.1.0) (Jumper et al., 2021), wygenerowano model struktury białka. Jakość przewidywania przeanalizowano na podstawie wbudowanego w AlphaFold2 testu lokalnej różnicy odległości (LDDT, z ang. Local Distance Difference Test) (Mariani et al., 2013) oraz wykorzystując narzędzie PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Aby ustalić położenie jonów Mg^{2+} oraz cząsteczek ATP, model nałożono na eksperymentalnie uzyskane struktury PDR5 z *S. cerevisiae* (PDB: 6hbu) oraz ludzki homodimer ABCG2 (PDB: 6hbu) przy pomocy algorytmu TM-align (Y. Zhang & Skolnick, 2004) a następnie skopiowano koordynaty jonów Mg^{2+} . W przypadku ATP dodatkowo zastosowano narzędzie AutoDock Vina (wersja 1.1.2) (Trott & Olson, 2009), i przeprowadzono dokowanie *in silico*, aby możliwie najlepiej dopasować cząsteczki w obrębie domen wiążących nukleotydy modelu MtABCG46. Warianty modelu uzyskano zamieniając fenyloalaninę w pozycji 562 na alaninę, leucynę i tyrozynę za pomocą narzędzia tleap dostępnego w ramach pakietu Amber20 (D.A. Case et al., 2020).

2.7.2. Dynamika molekularna

Modele białka uprotonowano z użyciem serwera H⁺⁺ (Anandkrishnan et al., 2012) (<http://newbiophysics.cs.vt.edu/H++/>), zakładając pH 7,0. Następnie struktury ulokowano w dwuwarstwie lipidowej utworzonej z fosfatydylocholinoi palmitynowo-oleinowej (POPC) za pomocą serwera CHARMM-GUI (Brooks et al., 2009; Jo et al., 2008; J. Lee et al., 2016, 2020; Wu et al., 2014) (<https://www.charmm-gui.org/>). Parametry symulowanego układu oraz symulacji zawarto w tabeli 2.29. Pierwszym etapem symulacji była minimalizacja energii układu (5000ns), w trakcie której nadano energetyczne ograniczenia pozycyjne białku, ATP i jonom Mg²⁺ oraz dwuwarstwie lipidowej, dodatkowo ograniczonej dwuściennie. Następnie przeprowadzono serię krótkich etapów (1ns), w trakcie których stopniowo zmniejszono początkowe ograniczenia w celu zrównoważenia symulowanego układu. Po tym czasie system poddano symulacji przez kolejne 100ns, w trakcie których jedynie jony Mg²⁺ i cząsteczki ATP zostały ograniczone pozycyjnie. Ostatnim etapem było docelowe 400 ns symulacji bez nadanych ograniczeń, które posłużyły do analiz. Dla każdego wariantu przeprowadzono 5 powtórzeń docelowej fazy symulacji. W tabeli 2.30 zawarto poszczególne etapy symulacji i nadane ograniczenia.

Tabela 2.29. Parametry symulowanego układu i symulacji

Parametry symulowanego układu i dynamiki molekularnej	
Przestrzeń symulacji	Sześcian o długości boku 130 Å
Grubość warstwy wody	15 Å
Stężenie KCl	0,1 M
Model obliczeniowy wody	OPC (Izadi et al., 2014)
Silnik symulacji	Amber20 (D.A. Case et al., 2020) z implementacją GPU (le Grand et al., 2013)
Model obliczeniowy pola siłowego dla białka	Ff19SB (Tian et al., 2020)
Model obliczeniowy pola siłowego dla warstwy POPC	lipid17 (D.A. Case et al., 2020)
Parametry dla molekuł ATP	Na podstawie (Meagher et al., 2003)
Klatka symulacji	Co 0,2 ns

Tabela 2.30. Etapy symulacji i nadane ograniczenia energetyczne

Etap symulacji	Czas symulacji [ns]	Pozycyjne ograniczenia energetyczne [Kcal/mol]		Dwuścienne ograniczenie energetyczne [Kcal/mol]
		Białko	Dwuwarstwa lipidowa	Dwuwarstwa lipidowa
Minimalizacja	5000	10	2,5	250
Równoważenie 1	1	10	2,5	250
Równoważenie 2	1	5	2,5	100
Równoważenie 3	1	2,5	0	50
Równoważenie 4	1	1	0,5	50
Równoważenie 5	1	0,5	0,1	25
Równoważenie 6	1	0,1	-	-
Końcowe równoważenie	100	-	-	-
Etap analizy	400	-	-	-

2.7.3. Analizy *in silico* wariantów modelu MtABCG46

- Identyfikacja tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej

Do identyfikacji tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej wykorzystano narzędzie CAVER (wersja 3.0)(Chovancova et al., 2012), ustalając punkt w równej, najmniejszej odległości od pozycji 562, 566, 1213 i 1217 białka jako miejsce startowe dla kulistej sondy o promieniu 0,9 Å. Następnie wykorzystano narzędzie TransportTools (wersja 0.9.0)(Brezovsky et al., 2022) do analizy porównawczej otrzymanych sieci tuneli. Otrzymane w natywnym białku tunele zgrupowano (ang. clustering) z parametrem punktu odcięcia ustawionym na 0,5Å. W przypadku porównywania wszystkich wariantów białka parameter punktu odcięcia zmieniono na 2Å. Tunele z grupy wybranej na podstawie lokalizacji wyjścia, długości i szerokości największego zwężenia (ang. Bottleneck) posortowano według największego zwężenia. 100 najszerszych wyników wybrano do analizy barier energetycznych dla migrujących molekuł.

- Analiza dostępu molekuł do kieszeni centralnej wariantów

Przy pomocy narzędzia CaverDock (wersja 1.1)(Vavra et al., 2019) zmierzono możliwość dostępu likwiritigeniny, kwasu *p*-kumarowego, izolikwiritigeniny i 7,4'dihydroksyflawonu do kieszeni centralnej wszystkich badanych wariantów MtABCG46 (natywne białko, F562A, F562L i F562Y). Struktury molekuł pobrano z bazy PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)(tab. 2.31). Następnie wykorzystywane w eksperymencie związki oraz modele białka przygotowano poprzez zestaw narzędzi MGLTools (wersja 1.5.6) (Morris et al., 2009) oraz skrypt `prepare_receptor4.py` (https://www3.mpibpc.mpg.de/groups/de_groot/dseelig/adplugin.html) z ustawieniami domyślnymi. Wyniki CaverDock przeanalizowano wykorzystując skrypty własne Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu UAM.

Tabela 2.31. Numer akcesyjne wykorzystanych molekuł w bazie PubChem

Molekuła	Numer akcesyjny CID
Likwiritigenina	114829
Kwas <i>p</i> -kumarowy	637542
Izolikwiritigenina	638278
7,4'dihydroksyflawon	5282073

- Pozostałe analizy

Do uzyskania wyników RMSD oraz RMSF (z ang. Root Mean Square Fluctuation, pierwiastek ze średniego kwadratu fluktuacji, zależnego od czasu odchylenia pozycji atomu od wartości średniej) dla ciężkich atomów obu wariantów MtABCG46 (uzyskany przy pomocy serwera I-TASSER oraz model AlphaFold2), symulacje przeanalizowano modulem `cpptraj` (Roe & Cheatham, 2013), będącego częścią zestawu Amber20.

Do analizy transbłonowych helis 2, 5, 8 i 11, tworzących wejście tunelu wykorzystano HELANAL będącego modulem narzędzia MDAnalysis (wersja 2.0.0) (Gowers et al., 2016; Michaud-Agrawal et al., 2011).

2.8. Spis wykorzystanego oprogramowania i narzędzi internetowych

Nazwa narzędzia	Strona internetowa	Referencje
AlphaFold2(wersja 2.1.0)	https://alphafold.ebi.ac.uk/	Jumper et al 2021
Amber20	https://ambermd.org	D.A. Case et al., 2020
Autodock Vina(wersja 1.1.2)	https://vina.scripps.edu/	Trott and Olson 2010
BLASTp	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov	Altschul et al., 1990
CAVER 3.0	https://www.caver.cz/	Chovancova et al., 2012
CaverDock (wersja 1.1)	https://loschmidt.chemi.muni.cz/caverdock/	Vavra et al., 2019
CCTOP wersja s1.0.0	http://cctop.ttk.hu	Dobson et al., 2015
CHARMM-GUI	https://www.charmm-gui.org/	Brooks et al., 2009; Jo et al., 2008; J. Lee et al., 2016, 2020; Wu et al., 2014
ConSurf	https://consurf.tau.ac.il	Ashkenazy et al., 2016; Celniker et al., 2013
GREMLIN	http://gremlin.bakerlab.org	Kamisetty et al., 2013; Ovchinnikov et al., 2014
H++	http://newbiophysics.cs.vt.edu/H++/	Anandakrishnan et al., 2012
ITASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/	Yang et al., 2014; Yang & Zhang, 2015
Jpred4	http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index_up.html	Drozdetskiy et al., 2015
LaserGene7	https://www.dnastar.com/software/lasergene/	
LDDT	https://swissmodel.expasy.org/lddt	Mariani et al., 2013
MDAnalysis(wersja 2.0.0)	https://www.mdanalysis.org/	Gowers et al., 2016; Michaud-Agrawal et al., 2011
MegaX	https://www.megasoftware.net/	Kumar et al., 2018
MGLTools (wersja 1.5.6)	https://ccsb.scripps.edu/mgltools/	Morris et al., 2009
MUSCLE		Edgar, 2004
PROCHECK	https://saves.mbi.ucla.edu/	Laskowski et al., 1993
Pymol	https://pymol.org	Delano, 2002
Stride	http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/	Heinig & Frishman, 2004
tBLASTn	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov	Altschul et al., 1990
TM-align	https://zhanggroup.org/TM-align/	Y. Zhang & Skolnick, 2004
TransportTools	https://github.com/labbit-eu/transport_tools	Brezovsky et al., 2022
WebLogo3	https://weblogo.threeplusone.com/	Crooks et al., 2004

3. Cel pracy

Głównym celem pracy była identyfikacja molekularnych determinant stojących za selektywnym transportem kwasu *p*-kumarowego i likwiritigeniny przez białko ABCG46 z *Medicago truncatula*. Jego realizację podzielono na następujące etapy:

- Stworzenie modelu struktury MtABCG46 metodami *in silico*
- Wykorzystanie informacji strukturalnych oraz analiz filogenetycznych do wyodrębnienia aminokwasów potencjalnie kluczowych dla selektywnego transportu
- Ukierunkowana mutageneza i analiza biochemiczna wariantów mutacyjnych MtABCG46
- Zbadanie wpływu modyfikacji MtABCG46 na to białko i pełniony przez nie transport z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej we współpracy z Laboratorium Bimolekularnych Interakcji i Transportu na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dodatkowym celem mojej pracy było sprawdzenie korelacji między transportem a stymulacją aktywności ATPazowej u roślinnych pełnych transporterów ABCG w oparciu o MtABCG46 oraz ABCG36 z *Arabidopsis thaliana*.

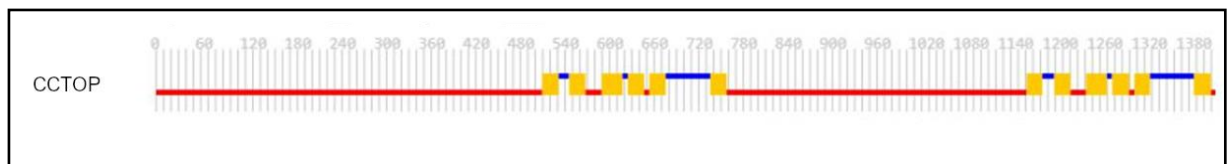
4. Wyniki

Prowadzone wcześniej w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN (Banasiak et al., 2013; Biała et al., 2017) badania pokazały, że MtABCG46 transportuje kwas *p*-kumarowy i likwiritigeninę, jednocześnie nie transportując innych, pokrewnych chemicznie molekuł ze szlaku fenylopropanoidowego, takich jak np. izolikwiritigenina czy 7,4'-dihydroksyflawon.

Specyficzność substratowa roślinnych pełnych transporterów ABCG jest zagadnieniem, które nie było jak dotąd badane na poziomie molekularnym. W niniejszej pracy postanowiono wykorzystać kompleksowe połączenie metod bioinformatycznych do racjonalnego zaprojektowania mutacji, a następnie przeprowadzenia eksperymentów biochemicznych i dynamiki molekularnej do identyfikacji i próby zrozumienia molekularnych podstaw selektywnego transportu kwasu *p*-kumarowego i likwiritigeniny przez MtABCG46.

4.1. Modelowanie *in silico* MtABCG46

W momencie rozpoczynania prac niedostępne były żadne wysokorozdzielcze dane strukturalne dotyczące pełnych transporterów ABCG. Przeprowadzono analizy struktury drugorzędowej oparte o zbiór 1856 sekwencji pełnych roślinnych transporterów ABCG uzyskanych poprzez ekstrakcję z bazy danych projektu „1K transcriptomes project” (Lebens-Mack et al., 2019), które pokazały, iż ta grupa białek charakteryzuje się wysokim podobieństwem strukturalnym do ludzkich połowicznych transporterów ABCG takich jak heterodimer ABCG5/G8 (PDB: 5DO7), czy homodimer ABCG2 (PDB: 5NJ3) będące w tamtym czasie jedynym źródłem informacji dotyczących struktury eukariotycznych transporterów ABCG (J. Y. Lee et al., 2016; Taylor et al., 2017)(ryc. 4.1, załącznik 1). Co więcej, na podstawie heterodimeru ABCG5/G8 zaobserwowano, iż pomimo niskiego stopnia identyczności pomiędzy sekwencjami ABCG5 oraz ABCG8 (~28%), oba monomery charakteryzują się dużym podobieństwem strukturalnym (RMSD = 2Å; RMSD – Root Mean Square Deviation, z ang. pierwiastek ze średniego kwadratu odległości pomiędzy odpowiadającymi sobie elementami optymalnie nałożonych struktur przestrzennych; miara używana do oceny podobieństwa struktur białkowych) (J. Y. Lee et al., 2016). Na tej podstawie przyjęto, iż opublikowane struktury połowicznych transporterów ABCG mogą zostać wykorzystane do modelowania *in silico*, czyli wykorzystania dedykowanych algorytmów i sekwencji aminokwasowej do uzyskania trójwymiarowej struktury białka.



Rycina 4.1. Topologia MtABCG46 przewidywana na podstawie sekwencji. Do przewidywania wykorzystano algorytm CCTOP (Dobson et al., 2015). Reprezentując sekwencję MtABCG46 (z N- końcem po lewej stronie) kolorem czerwonym zaznaczono obszary wewnątrzkomórkowe białka, żółtym helisy transbłonowe, a niebieskim obszary zewnątrzkomórkowe.

4.1.1. Identyfikacja kieszeni centralnej w obrębie domen transbłonowych modelu MtABCG46

Wstępnie, na podstawie przewidywania struktury drugorzędowej przy pomocy algorytmu jpred (Drozdetskiy et al., 2015) sekwencję MtABCG46 podzielono na dwie części tak, aby odzwierciedlała dwa połowiczne transportery (załącznik 1.). Następnie dla każdej części przeprowadzono analizę koewolucyjną GREMLIN, w oparciu o zbiór sekwencji pełnych roślinnych transporterów ABCG (Kamisetty et al., 2013; Ovchinnikov et al., 2014). Pozwala ona na podstawie kowariancji zmienności aminokwasów w dużych zbiorach sekwencji białek z tej samej rodziny, wskazać potencjalną interakcję pary aminokwasów, tym samym bliskość ich położenia w ramach struktury białka (de Juan et al., 2013; Ovchinnikov et al., 2014). Do modelowania obu części wykorzystano serwer I-TASSER (Yang et al., 2014; Yang & Zhang, 2015), wprowadzając sekwencję aminokwasową oraz dane uzyskane z analizy GREMLIN. Uzyskane modele obu części nałożono na strukturę heterodimeru ABCG5/G8 uzyskując w ten sposób pełny transporter. RMSD łańcuchów głównych w porównaniu do ABCG5 (PDB: 5DO7, łańcuch 1) wyniosło 0,57Å i 0,335Å kolejno dla pierwszej i drugiej części. Analizy porównawcze sekwencji, oraz przewidywania struktury drugorzędowej wykazały, że roślinne pełne transportery ABCG posiadają kilka elementów odróżniających je od połowicznych transporterów. Jednym z tych elementów jest pętla łącząca TMD1 z NBD2 (potocznie nazywana łącznikiem) stanowiąca strukturalne połączenie dwóch części białka (ryc. 4.3). Inną zaobserwowaną rozbieżnością strukturalną były znacząco wydłużona pętla pomiędzy dwoma pierwszymi harmonijkami β pierwszej domeny wiążącej nukleotydy (nazywana dalej PN1, Pętla NBD1). Z powodu dużej dynamiki ten fragment jest niewidoczny w strukturach ABCG5/G8 oraz ABCG2 (J. Y. Lee et al., 2016; Taylor et al., 2017). Przewidywanie struktury drugorzędowej (jpred) wskazało z dużą pewnością na występowanie helisy w pętli, nieobecnej u połowicznych transporterów ABCG, ani w obrębie drugiej domeny wiążącej nukleotydy pełnych roślinnych ABCG (ryc. 4.2). Brakujące w modelu pętle uzupełniono przez ponowne zastosowanie serwera I-TASSER przy wykorzystaniu pełnej sekwencji MtABCG46 i modelu pozbawionego pętli jako strukturalny szablon.


```

MtABCG46 NBD1      110 VGLDIP-TIEVRYNNLKIDAEAFVGSRALPSFINAATNVIIEGVLNFLHIIPTKKRHVAILKDVSGIVKPRRM
jpred -----EEE-EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEHHH-----EE
pewność przewidywania -----8820288537887612899999999999998541028876023212117413477037

MtABCG46 NBD2      820 MVLPE-PhsITFDDIVYSVDMpAEMKEQGV-----TEDRLVLLKGVSGAFRPGVL
jpred -----EEEE---EEEE-HHHHH-----HHHHHH-----
pewność przewidywania 983363-113972770488821234431367-----73413333131033678899

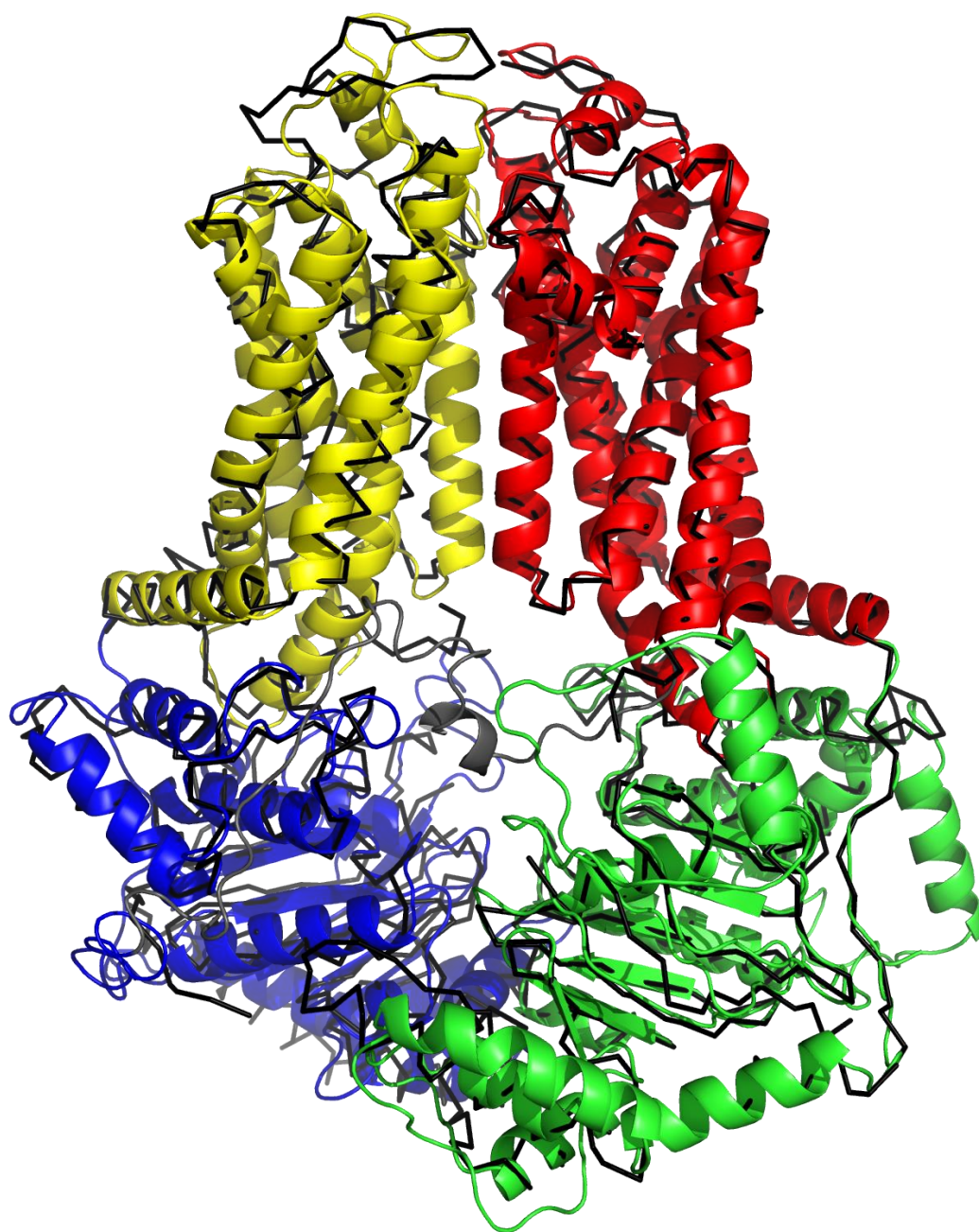
AtABCG1           59 YMRTPVFVLSFDNLTYNVS-----VRPKLDFRNLFPRRRTEDPEIAQTARPKT--KTLNNSGETRDGEI
jpred -----EEEEEEEEEEEE-----E-----EEEE-----E-----
pewność przewidywania 9988713675200258998-----203577766777777777652257773--5771367700177889

HsABCG2           29 KAFTEGAVLSFHNIYRVK-----LKSGFLP--CRKPVE-----KEILSNINGIMKPG-L
jpred -----EEEEEEEE-----EE-----HHH-----HHHHH---EE-----
pewność przewidywania 5525677458998888731-----5771111--764268-----7786318730021341

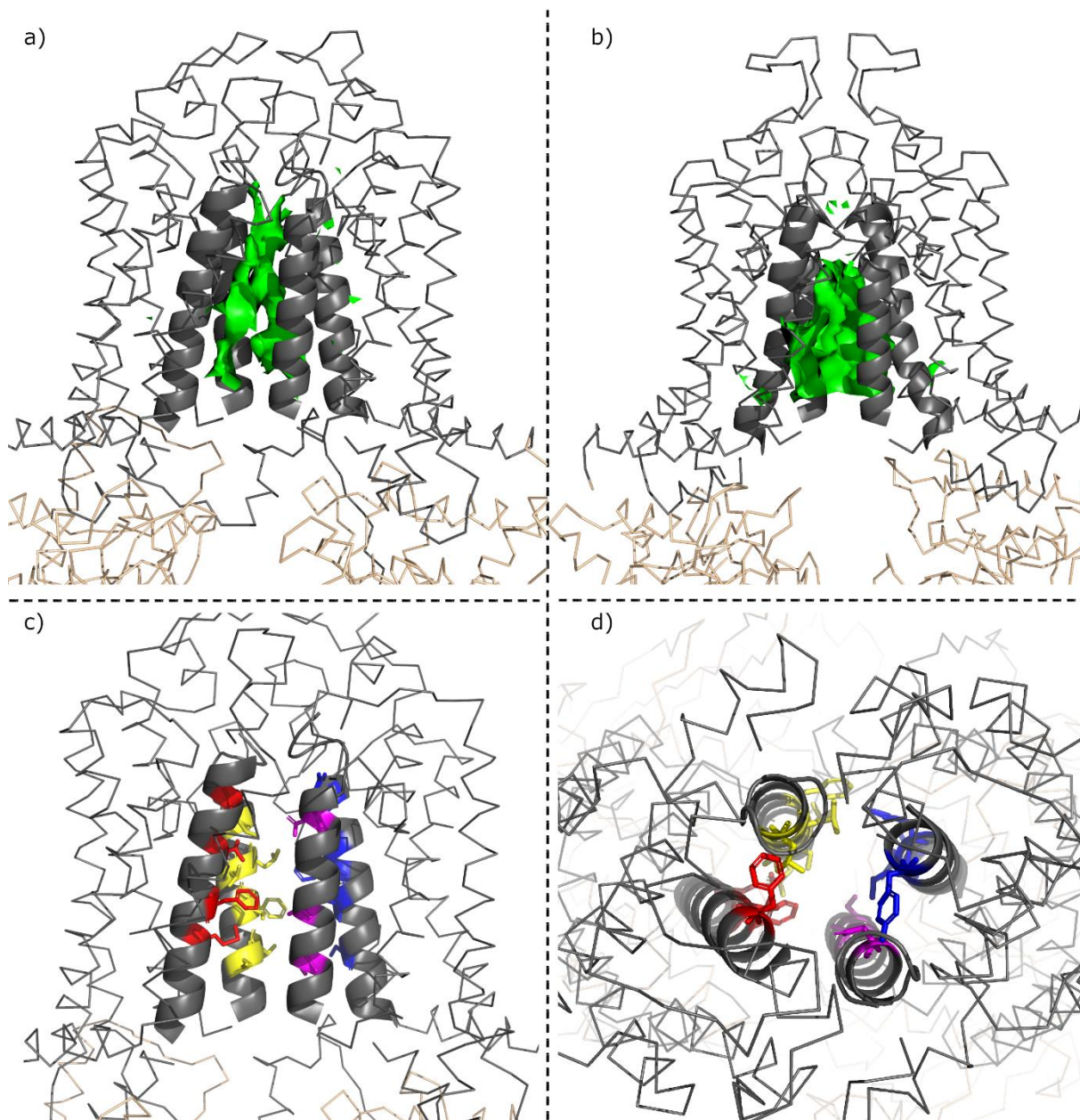
```

Rycina 4.2. Unikalna struktura pętli NBD1 pełnych transporterów ABCG. a) dopasowane sekwencyjnie wyniki przewidywania struktury drugorzędowej jpred (Drozdetkiy et al., 2015) dla pętli NBD1 i NBD2 pełnych roślinnych transporterów ABCG (reprezentowane przez sekwencję MtABCG46), roślinnych połowicznych transporterów ABCG (reprezentowane przez sekwencję AtABCG1) oraz ludzkich połowicznych transporterów ABCG (reprezentowane przez sekwencję HsABCG2). Aminokwasy tworzący strukturę harmonijki β i α helisy zostały oznaczone kolejno żółtą literą „E” i czerwoną literą „H”, pozostałe typy oznaczone przez „-”. Pewność przewidywania jpred w skali 0-9, gdzie 9 oznacza najwyższą pewność.

Uzyskany model charakteryzuje się fałdowaniem bardzo zbliżonym do struktury ABCG5/G8 (PDB: 5DO7) – RMSD wyniosło 1,67Å (ryc. 4.3). Zaobserwowano, że model przewiduje istnienie kieszeni centralnej tworzonej głównie przez aminokwasy znajdujące się w obrębie helis transbłonowych 2, 5, 8 i 11 (ryc. 4.4). Analogiczną kieszeń odnaleziono w obrębie struktury homodimeru HsABCG2, co więcej, w jej obrębie związane były cząsteczki cholesterolu (Taylor et al., 2017). Aby zbadać znaczenie zaobserwowanej kieszeni centralnej oraz tunelu do niej prowadzącego dla transportu kwasu *p*-kumarowego i likwiritigeniny zmapowano aminokwasy, które bezpośrednio je tworzą. W tym celu wygenerowano przy pomocy programu Pymol powierzchnię wewnętrznych przestrzeni dostępnych dla rozpuszczalnika pomiędzy helisami 2, 5, 8 i 11, a następnie zidentyfikowano poszczególne aminokwasy je tworzące (ryc. 4.4, tab. 4.1.) (Delano, 2002).

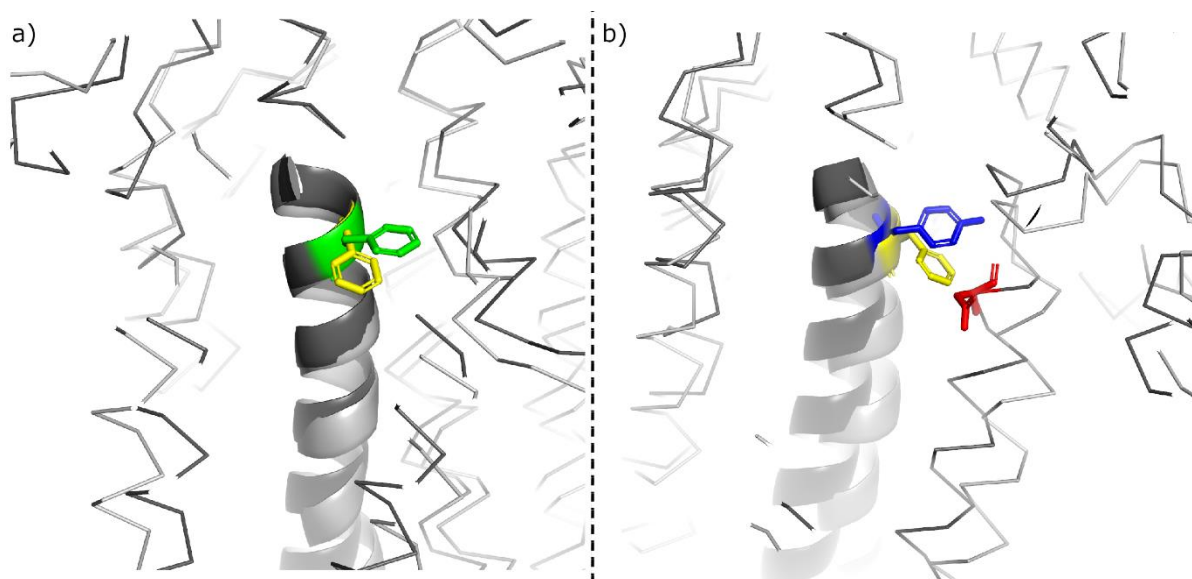


Rycina 4.3. Model MtABC46 uzyskany przy wykorzystaniu serwera I-TASSER. Na utworzony model nałożono strukturę HsABC5/G8 (PDB: 5DO7, czarna cienka linia). Poszczególne domeny MtABC46 zaznaczono kolorami: NBD1 zielonym, TMD1 czerwonym, NBD2 niebieskim, TMD2 żółtym. Łącznik pomiędzy TMD1 a NBD2 zaznaczono kolorem szarym.



Rycina 4.4. Kieszka centralna w modelu MtABCG46. (a, b) Powierzchnia kieszeni centralnej dostpna dla rozpuszczalnika w modelu MtABCG46 (a) oraz HsABCG2 (b) (PDB: 5NJ3) (Taylor et al., 2017). (c, d) Widok boczny (a) i od góry (od strony zewntrzkomórkowej w kierunku wewntrzkomórkowej) (b) na aminokwasy w transbłonowych helisach 2, 5, 8 i 11 tworzące powierzchnię kieszeni centralnej w modelu MtABCG46. Domeny transbłonowe zaznaczone na szaro, domeny wiążące nukleotydy zaznaczone na kremowo, powierzchnia kieszeni centralnej zaznaczona na zielono. Aminokwasy tworzące kieszeń, będące częścią helis 2, 5, 8 i 11 zostały zaznaczone na kolejno kolory: czerwony, żółty, niebieski i fioletowy.

ABCG2, która została opisana jako aminokwas potencjalnie znajdujący się w obrębie miejsca wiązania substratów i inhibitorów transportu tego transportera (ryc. 4.5) (Jackson et al., 2018).



Rycina 4.5. Nałożenie pozycji F562 oraz Y1213 w modelu MtABCG46 na pozycję F431 w strukturze HsABCG2 (PDB: 5NJ3). MtABCG46 zaznaczono kolorem ciemnoszarym a ABCG2 jasnoszarym. Na strukturze zaznaczono helisę 2 (a) oraz 8 (b) modelu ABCG46 oraz helisę 2 i 2' modelu ABCG2 a także uwidoczniło aminokwasy F431 i F431' w ABCG2 (żółty), oraz F562 (zielony), Y1213 (niebieski) i N1331 (czerwony) w ABCG46.

Co ciekawe, w przeciwieństwie do F431, który jest aminokwasem silnie zachowawczym u ludzkich białek ABCG oraz zwierzęcych ortologów ABCG2, sekwencje roślinnych pełnych transporterów ABCG charakteryzują się większym zróżnicowaniem w pozycji analogicznej do F562 u MtABCG46. Poza fenyloalaniną występują tam aminokwasy takie jak tyrozyna, leucyna czy izoleucyna (tab. 4.2), a częstotliwość występowania aminokwasów innych niż fenyloalanina w tej pozycji znacząco wzrosła u roślin jednoliściennych i dwuliściennych w porównaniu do starszych ewolucyjnie grup filogenetycznych takich jak zielone algi, *Bryophyta* czy *Pteridophyta* (ryc. 4.6). Zakładając potencjalne powiązanie pomiędzy różnorodnością chemiczną wyspecjalizowanego metabolizmu roślin jedno i dwuliściennych z większą zmiennością aminokwasową pozycji analogicznych do F562 u roślinnych ABCG, postanowiono zbadać wpływ tego aminokwasu na selektywny transport fenylopropanoidów będący udziałem MtABCG46. Z uwagi na to, że HsABCG2 jest homodimerem, pozycja odpowiadająca F431 występuje również w obrębie drugiej domeny transbłonowej i jest nią tyrozyna 1213 (Y1213), która również została wybrana do dalszych badań (ryc. 4.5). W porównaniu do F562 charakteryzuje się większym stopniem zachowawczości u roślinnych

transporterów ABCG (ryc. 4.6), a analiza GREMLIN wykazała powiązanie tej pozycji z silnie zachowawczą asparaginą 1331 (N1331) (tab. 4.1).

Tabela 4.2. Dopasowanie fragmentów sekwencji przypadających okolicom F431 w HsABCG2 i (a) ludzkim paralogom ABCG oraz (b) ortologom HsABCG2 u różnych zwierząt, a także (c) przypadającym F562 w MtABCG46 i wybranym roślinnym pełnym transporterem ABCG.

a) Ludzkie paralogi ABCG

HsABCG2	G V L	F F
HsABCG1	G F L	F F
HsABCG4 isoform a	G C L	F F
HsABCG4 isoform b	G C L	F F
HsABCG5	G L L	Y Q
HsABCG8	A L L	F M

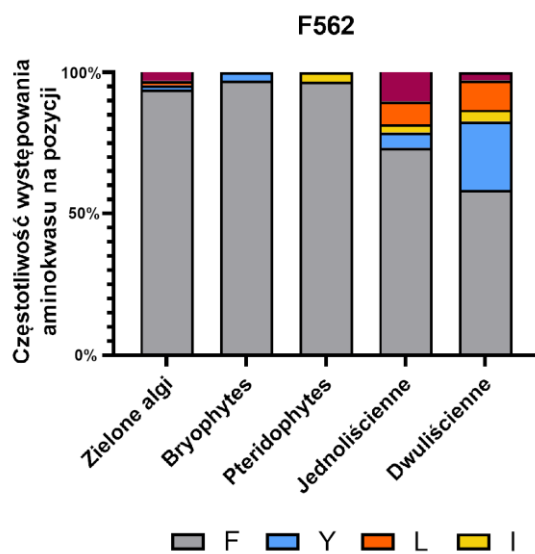
b) Ortologi HsABCG2 u różnych zwierząt

Homo sapiens (HsABCG2)	G V L	F F
Pan troglodytes	G V L	F F
Macaca mulatta	G V L	F F
Canis lupus familiaris	G V L	F F
Bos taurus	G V L	F F
Mus musculus	G V L	F F
Rattus norvegicus	G V F	F F
Gallus gallus	G S L	F F
Danio rerio	G A L	F F
Drosophila melanogaster	G A I	F L
Xenopus tropicalis	G S L	F F

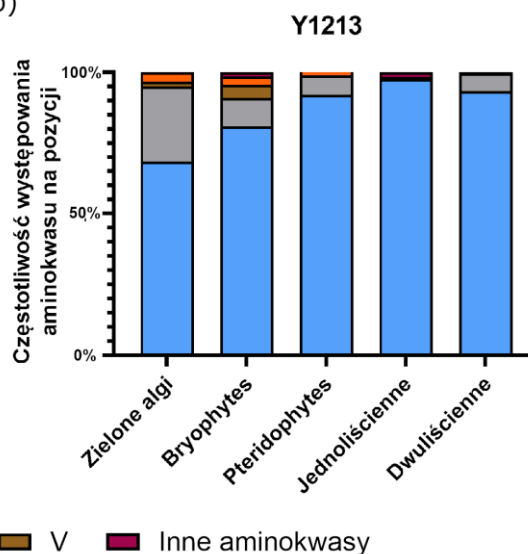
c) Wybrane roślinne pełne białka ABCG

MtABCG46	G A L	F F
CrTPT2	G A L	Y F
HvABCG31	G A L	Y F
OsABCG31	G A L	Y F
AtABCG32	G S L	Y F
AtABCG35	G S L	L F
AtABCG36	G A L	L F
VmABCG1/VmTPT2	G A L	Y F
NtPDR3	G A L	F Y
NbABCG1	G A L	F F
NbABCG2	G A L	F F
NtPDR1	G A L	F F
MtABCG52	G A I	L F
MtABCG54	G A I	L F
MtABCG56	G A L	F F

a)



b)



Rycina 4.6. Częstotliwość występowania aminokwasów na pozycji F562 (a) i Y1213 (b) w sekwencjach pełnych transporterów ABCG w obrębie różnych grup filogenetycznych.

4.3. Heterologiczna ekspresja wariantów MtABCG46 w komórkach kalusa tytoniu BY2

W celu zbadania znaczenia F562 oraz Y1213 dla transportu z udziałem MtABCG46, zaprojektowano zmodyfikowane warianty białka. Sekwencje zmieniono tak, aby aminokwasy wymienić na inne, najczęściej występujące u roślinnych transporterów ABCG na tych pozycjach, tj. tyrozyna, leucyna i izoleucyna w przypadku F562, oraz fenyloalanina w przypadku Y1213 (ryc. 4.6). Dodatkowo zaprojektowano warianty, u których w pozycjach 562 i 1213 wstawiono alaninę. Taka zamiana eliminuje łańcuch boczny nie wpływając bezpośrednio na konformację głównego łańcucha tworzącego polipeptyd (Cunningham & Wells, 1989). Listę zaprojektowanych wariantów MtABCG46 umieszczono w tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Lista zaprojektowanych wariantów MtABCG46

Pozycja zmiany	Aminokwas w pozycji	Zmieniony aminokwas	Wariant
-	F562, Y1213	-	ABCG46
562	Fenyloalanina (F)	Tyrozyna (Y)	F562Y
562	Fenyloalanina (F)	Leucyna (L)	F562L
562	Fenyloalanina (F)	Izoleucyna (I)	F562I
562	Fenyloalanina (F)	Alanina (A)	F562A
1213	Tyrozyna (Y)	Fenyloalanina (F)	Y1213F
1213	Tyrozyna (Y)	Alanina (A)	Y1213A

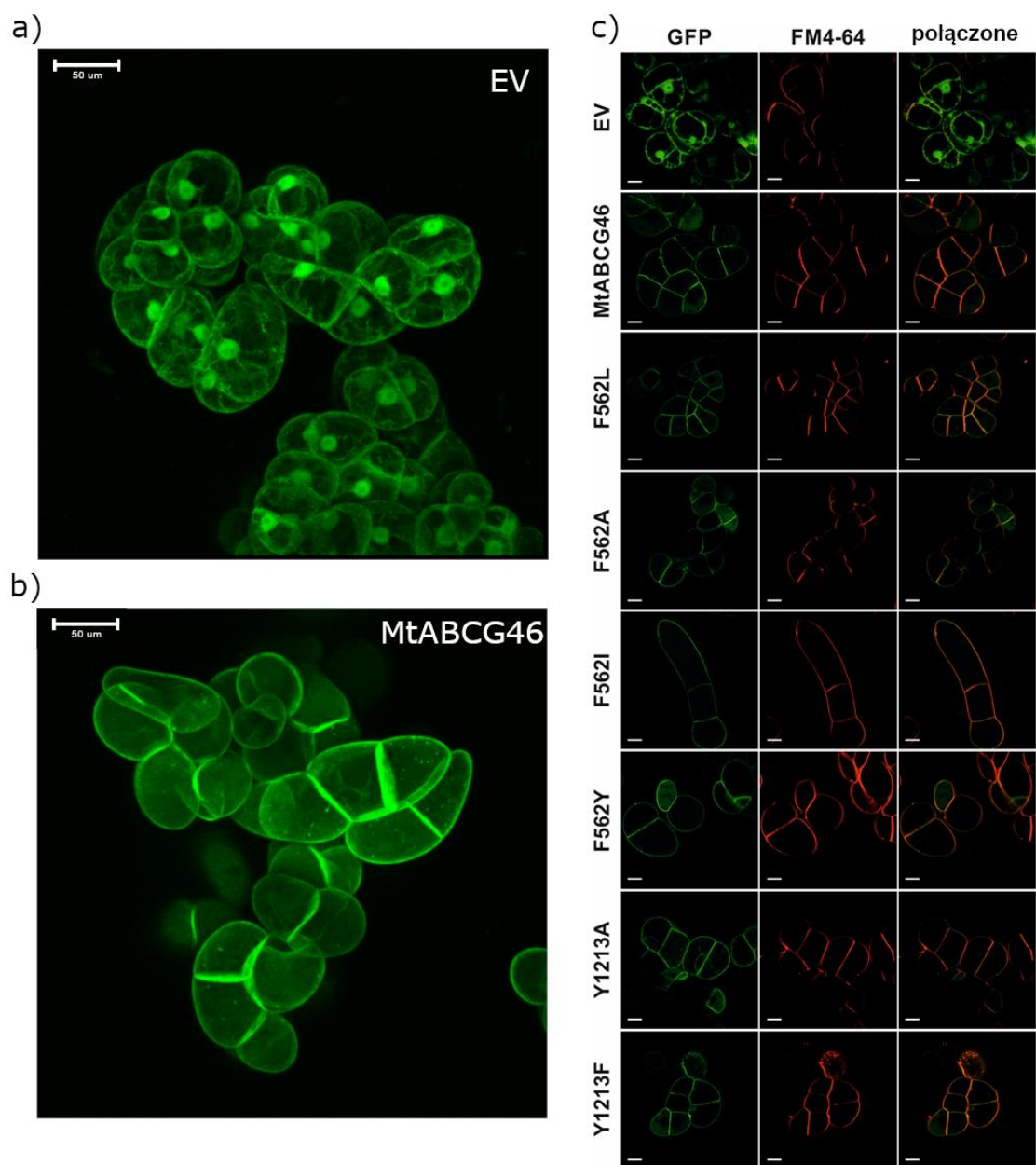
Wektory pMDC43 (Curtis & Grossniklaus, 2003), zawierające warianty *MtABCG46* z przyłączoną na 5' końcu sekwencją kodującą białko zielonej fluorescencji (GFP – Green Fluorescent Protein), oraz służący jako kontrolny wektor nie posiadający sekwencji *MtABCG46* (EV) a tylko wolne GFP, wprowadzono do bakterii *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Hellens et al., 2000) przy pomocy elektroporacji. Uzyskane szczepy wykorzystano następnie do transformacji komórek kalusa tytoniu BY2. Przebieg procedury opisano w sekcji 2.1. Obecność wariantów białka *MtABCG46* w liniach potwierdzono metodą Western blot z wykorzystaniem przeciwciał anti-MtABCG46 (ryc. 4.7). Wyselekcjonowane linie wykorzystywane były jako materiał do izolacji błon komórkowych używanych

w eksperymentach biochemicznych. Dodatkowo poprawność sekwencji poszczególnych mutantów potwierdzono przez sekwencjonowanie transkryptów *MtABCG46*.



Rycina 4.7. Przykładowa analiza Western blot białek błony komórkowej wyizolowanych z komórek BY2 transformowanych pustym wektorem (EV) oraz BY2 ekspresjonujących warianty *MtABCG46* z użyciem przeciwciał anti-MtABCG46 i anti-H⁺-ATPazom (użytych jako markerom błon komórkowych).

Poprzez obserwacje transformowanych komórek BY2 przy użyciu mikroskopu konfokalnego zarejestrowano sygnał GFP w błonie komórkowej u linii posiadających warianty *MtABCG46*. Poprawną lokalizację potwierdzono porównując go do sygnału fluorescencyjnego barwnika błon komórkowych FM4-64 (ThermoFisher Scientific). Lokalizacja u wspomnianych linii znacząco różniła się od linii kontrolnej EV, u której sygnał zielonej fluorescencji obserwowany był w cytoplazmie (ryc. 4.8). Co więcej, w przypadku żadnego z wariantów nie dostrzeżono znaczących różnic w sygnale, w porównaniu do niemodyfikowanego białka *MtABCG46*.

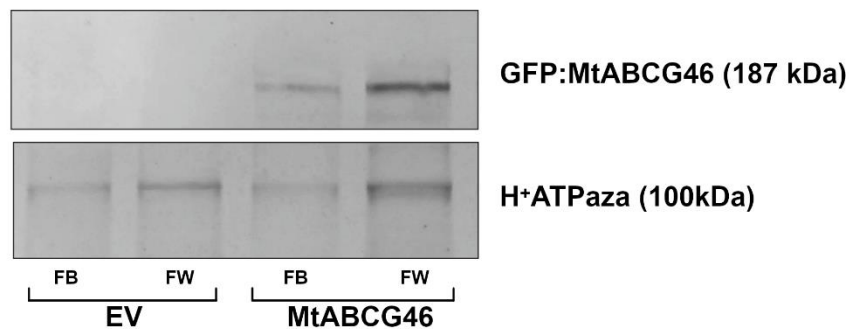


Rycina 4.8. Lokalizacja subkomórkowa wariantów MtABCG46 w komórkach BY2. Obrazy mikroskopowe wykonane w technice poszerzonej głębi ostrości (a) linii kontrolnej EV, gdzie sygnał GFP obserwowany jest w cytoplazmie oraz (b) linii MtABCG46, u której sygnał GFP zlokalizowany jest w błonie komórkowej. (c) Kolokalizacja sygnału GFP z barwnikiem błony komórkowej FM4-64 dla wszystkich linii.

4.4. Eksperymenty biochemiczne transportu

4.4.1. Izolacja błon i wzbogacanie frakcji błony komórkowej

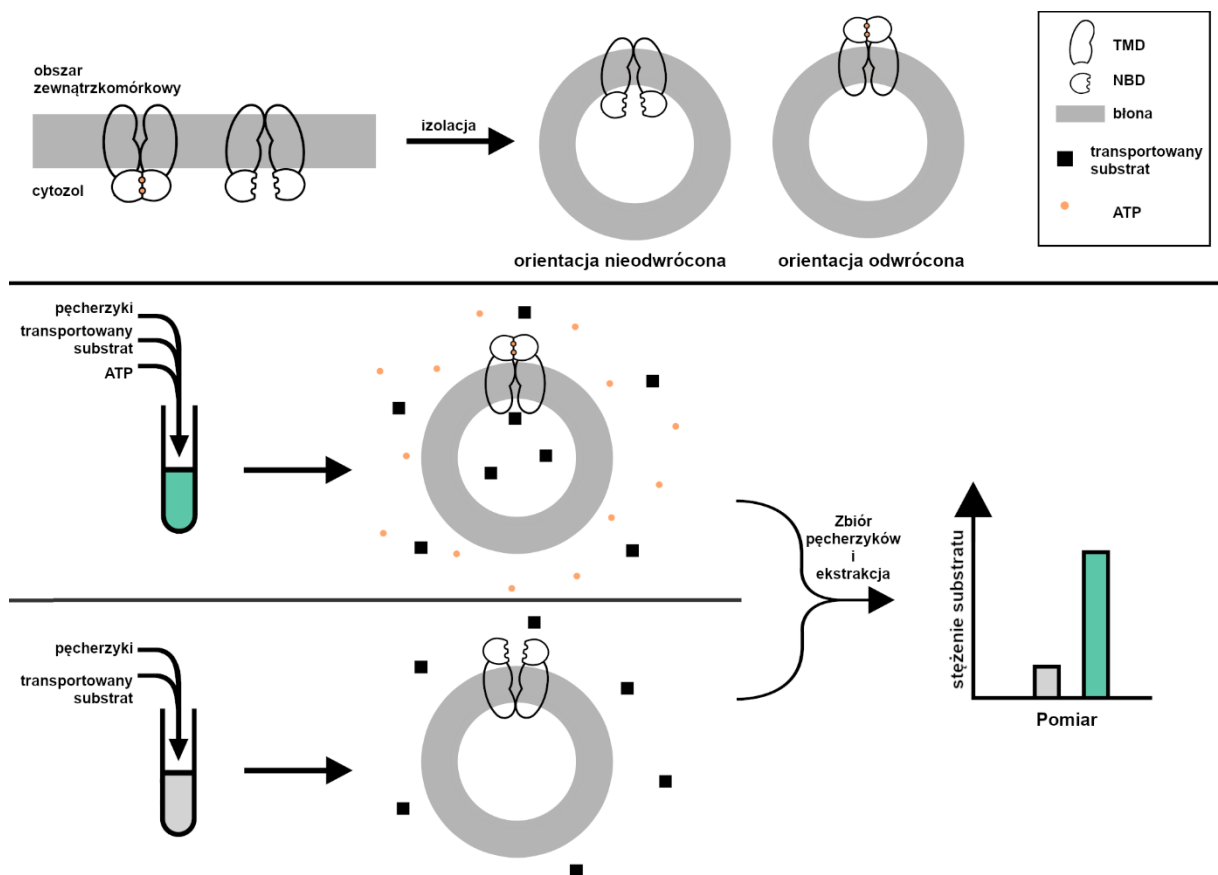
Jedną z bezpośrednich metod transportu molekuł poprzez błony biologiczne, są eksperymenty w układzie *in vitro*, oparte na pęcherzykach błonowych (nazywanych również mikrosomami), uzyskanych poprzez izolację frakcji błonowych z komórek posiadających badany transporter. Do tego celu wykorzystano wyżej wymienione linie transgeniczne komórek BY2. W trakcie prowadzenia badań do procedury izolacji dodano etap frakcjonowania błon (Larsson et al., 1987), w celu zwiększenia udziału frakcji błony komórkowej, a tym samym również ilości badanego białka w preparatach. Wzbogacenie frakcji błony komórkowej analizowano przy wykorzystaniu techniki Western blot oraz poprzez pomiar sygnału GFP (ryc. 4.9). Procedura izolacji została szczegółowo opisana w sekcji 2.3.



Rycina 4.9. Wzbogacenie frakcji błony komórkowej ukazane przy pomocy analizy Western blot białek preparatów błony komórkowej przed (FB – frakcja błonowa) i po wzbogaceniu (FW – frakcja wzbogacona). Wykorzystano linie transformowane pustym wektorem (EV) i wektorem zawierającym natywną sekwencję *MtABCG46* przeciwciała anti-MtABCG46 i anti-H⁺-ATPazom (użyte jako marker błon komórkowych).

4.4.2. Eksperymenty transportu *in vitro* wybranych fenylopropanoidów *Medicago truncatula*

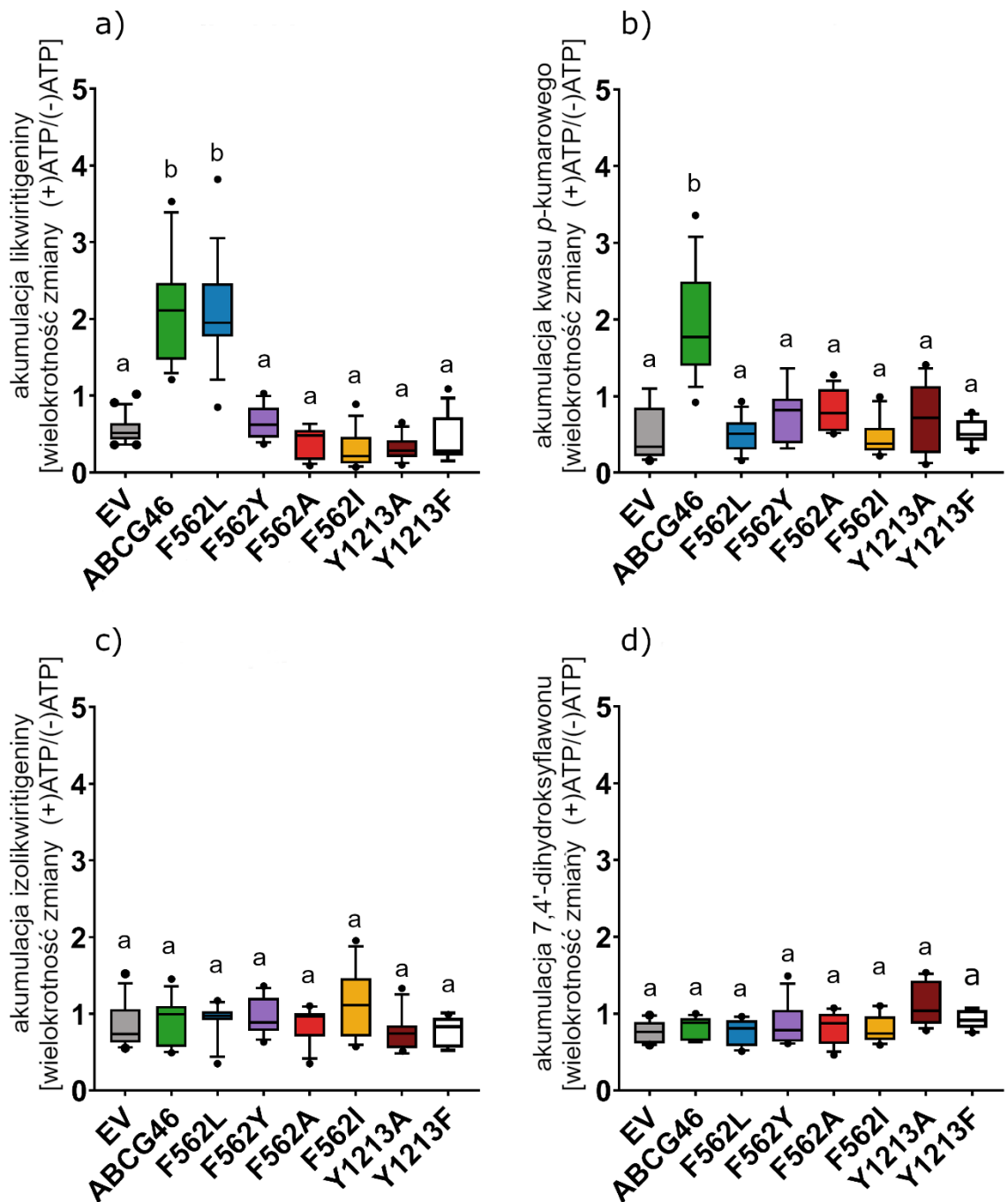
Aby sprawdzić wpływ wprowadzonych zmian w pozycji 562 oraz 1213 w MtABCG46 na transport, przeprowadzono szereg eksperymentów, wykorzystując endogenne fenylopropanoidy *Medicago truncatula* tj. likwiritigeninę, kwas *p*-kumarowy, izolikwiritigeninę oraz 7,4'-dihydroksyflawon. Biochemiczne eksperymenty transportu polegają na wykorzystaniu spontanicznie tworzących się w izolatach błonowych pęcherzyków. Część z nich ma orientację odwróconą, w której domeny wiążące nukleotyd występują na zewnątrz dwuwarstwy lipidowej. W ten sposób eksporter, jakim jest MtABCG46, może wykorzystywać dostarczone w buforze reakcji ATP jako źródło energii, a w wyniku aktywnego transportu akumulować molekuly wewnątrz pęcherzyków. Jednocześnie w pęcherzykach o orientacji nieodwróconej, domeny wiążące nukleotyd są odizolowane od źródła ATP błoną, tym samym czyniąc transportery nieaktywnymi. Następnie, poprzez odfiltrowanie pęcherzyków z buforu, ekstrakcję i oznaczenie ilości molekuly, zarejestrować można ATP – zależny transport. Do oznaczenia ilości badanych fenylopropanoidów w ekstraktach



Rycina 4.10. Schemat eksperymentu transportu opartego na pęcherzykach o orientacji odwróconej.

z pęcherzyków wykorzystano technikę HPLC/MS. Proces został schematycznie przedstawiony na rycinie 4.10.

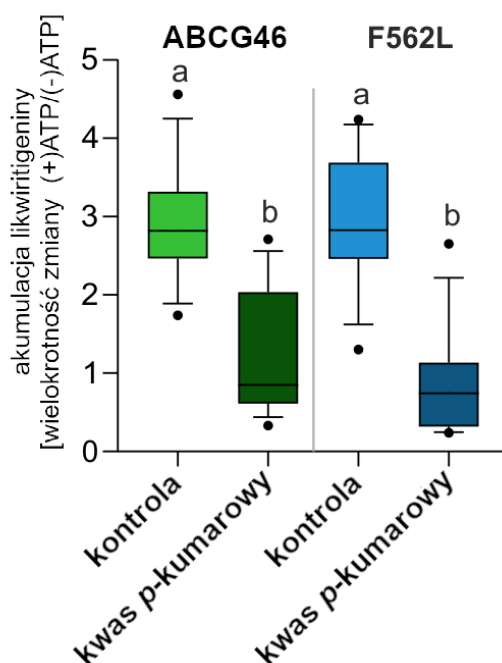
Analizy wykazały zależną od ATP akumulację likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego w pęcherzykach błonowych otrzymanych z linii posiadających natywne MtABCG46. Jednocześnie nie zaobserwowano podobnej akumulacji dla izolikwiritigeniny czy 7,4'-dihydroksyflawonu (ryc. 4.11). Obserwacje te są w zgodzie z poprzednimi badaniami (Biała et al., 2017). Eksperymenty z wykorzystaniem frakcji błon komórkowych pochodzących z linii BY2 posiadających zmodyfikowane wersje MtABCG46, pokazały iż zarówno zmiany w obrębie fenyloalaniny 562 jak i tyrozyny 1213 miały znaczący wpływ na transport tych molekuł. W przypadku wariantów F562A, F562Y, F562I oraz Y1213A i Y1213F nie zaobserwowano ATP-zależnej akumulacji likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego. Co ciekawe, w mikrosomach posiadających wariant F562L zaobserwowano zbliżony do natywnego MtABCG46 transport likwiritigeniny przy jednoczesnym braku transportu kwasu *p*-kumarowego (ryc. 4.11). Zarówno izolikwiritigenina jak i 7,4'-dihydroksyflawon nie były transportowane przez żaden z testowanych wariantów MtABCG46 (ryc. 4.11). Wyniki eksperymentów są w zgodzie z hipotezą zakładającą rolę kieszeni centralnej w rozpoznaniu i transporcie molekuł przez badane białko. Co więcej, zamiana fenyloalaniny w pozycji 562 na leucynę wpłynęła na specyficzność substratową, sprawiając iż wariant F562L MtABCG46 jest transporterem likwiritigeniny ale nie kwasu *p*-kumarowego.



Rycina 4.11. Transport likwiritigeniny (a), kwasu *p*-kumarowego (b), izolikwiritigeniny (c), oraz 7,4'-dihydroksyflawonu (d) z wykorzystaniem pęcherzyków błonowych uzyskanych z linii ekspresjonującej pusty wektor (EV, szary), oraz posiadających warianty MtABCG46: natywne (zielony), F562L (niebieski), F562Y (fioletowy), F562A (czerwony), F562I (pomarańczowy), Y1213A (brązowy) lub Y1213F (biały). Przedstawione wartości to wielokrotność zmiany pod wpływem obecności ATP [(+)ATP/(-)ATP]. Wartości i \pm odchylenie standardowe zostały uzyskane w co najmniej 3 powtórzeniach technicznych dla 3 powtórzeń biologicznych. Wysokość słupków wyznaczają wyniki między 25 a 75 percentylem; linia środkowa w każdym słupku reprezentuje medianę; powtórzenia wykraczające za 10 i 90 percentyl oznaczone kropką; małe litery a i b przedstawiają istotną statystycznie różnicę ($P < 0,001$ (a), $P < 0,01$ (b), $P < 0,05$ (c,d) na podstawie testu Kruskala-Wallisa i testu Dunna.

4.4.3. Eksperymenty kompetycji transportu

Wcześniejsze badania wykazały, iż likwiritigenina jest kompetytorem dla kwasu *p*-kumarowego w transporcie będącym udziałem MtABCG46 (Biała et al., 2017). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów ustalono, że również kwas *p*-kumarowy jest kompetytorem dla transportu likwiritigeniny (ryc. 4.12). W doświadczeniach z wykorzystaniem pęcherzyków zawierających wariant F562L zaobserwowano, iż pomimo faktu nietransportowania kwasu *p*-kumarowego, wciąż ma on negatywny efekt na akumulację likwiritigeniny podobnie jak w przypadku natywnego MtABCG46 (ryc. 4.12).



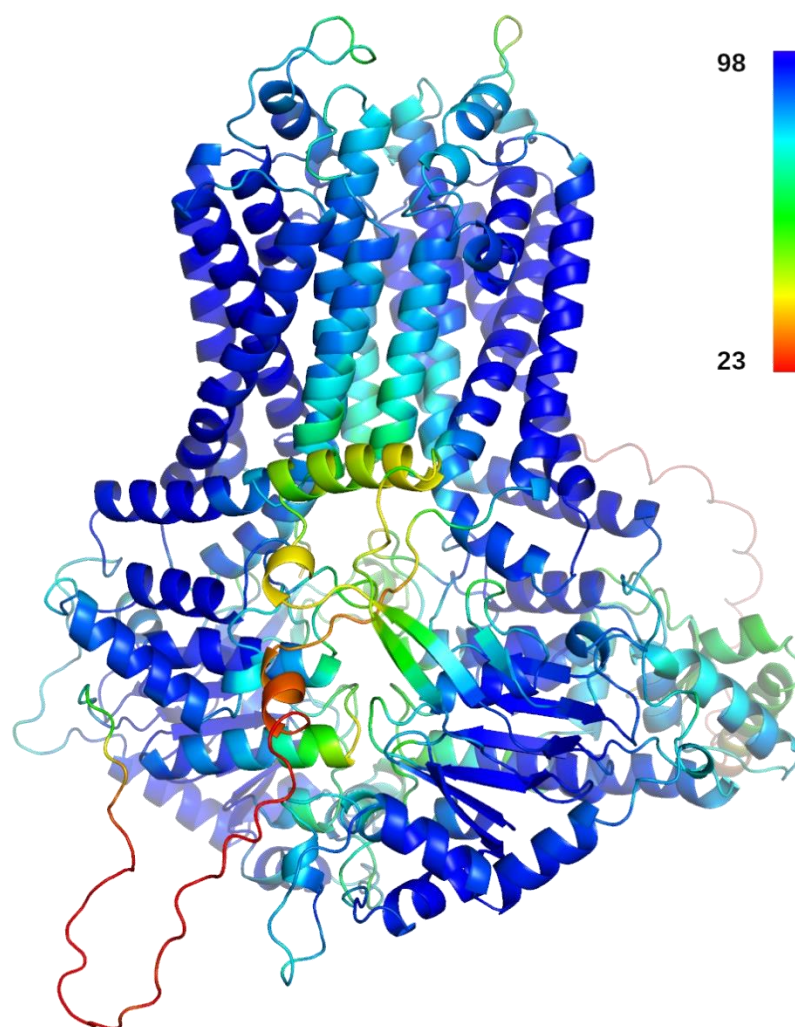
Rycina 4.12. Transport kompetycyjny likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego. Przedstawione wartości to wielokrotność zmiany ilości likwiritigeniny pod wpływem obecności ATP [(+)ATP/(-)ATP]. Wartości \pm odchylenie standardowe zostały uzyskane w co najmniej 3 powtórzeniach technicznych dla 3 powtórzeń biologicznych. Wysokość słupków wyznaczają wyniki między 25 a 75 percentylem; linia środkowa w każdym słupku reprezentuje medianę; powtórzenia wykraczające za 10 i 90 percentyl oznaczone kropką; małe litery a i b przedstawiają istotną statystycznie różnicę ($P < 0,001$) na podstawie testu Manna-Whitneya.

4.5. Symulacje Dynamiki molekularnej z wykorzystaniem modelu MtABCG46

W celu próby lepszego zrozumienia efektu wprowadzonych mutacji na strukturę i funkcjonowanie białka nawiązano współpracę z dr Janem Brezovskim prof. UAM oraz mgr. Carlosem Eduardo Sequeiros Borją z Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu na Uniwersytecie Adama Mickiewicza. Dzięki ich ekspertyzie przeprowadzono szereg eksperymentów *in silico* z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej. W tym rozdziale zostały opisane wyniki dotyczące 4 wariantów badanego białka – natywne MtABCG46, F562L, F562Y oraz F562A. Prowadzone badania *in silico* są obecnie kontynuowane dla pozostałych wariantów.

4.5.1. Uzyskanie modelu przy użyciu AlphaFold2

W 2021 roku opublikowana została pierwsza struktura pełnego transportera ABCG – ScPDR5 (Harris et al., 2021). Co więcej, społeczności naukowej zostało udostępnione narzędzie oparte o technikę uczenia maszynowego - AlphaFold2, służące do przewidywania struktur białkowych (Jumper et al., 2021). Potwierdzono także wysoki stopień poprawności generowanych struktur 3D na podstawie sekwencji aminokwasowej także w przypadku dużych białek transbłonowych (Hegedűs et al., 2022). Postanowiono wykorzystać AlphaFold2 do wygenerowania modelu MtABCG46 mającego posłużyć do dalszych analiz *in silico* (nazywany dalej modelem AF2). W przeciwieństwie do pierwotnego podejścia, w którym modelowano a następnie połączono dwie części, AlphaFold2 generuje całą strukturę jednocześnie, co powinno skutkować przewagą tego modelu, w postaci lepszej optymalizacji przestrzeni stykowej domen transbłonowych. Wyniki wbudowanego w narzędzie testu lokalnej różnicy odległości (LDDT, z ang. Local Distance Difference Test) pokazują, że AF2 prezentuje wysoką pewność poprawności przewidywania z wyjątkami w przypadku jedynie kilku rejonów (ryc. 4.13)(Mariani et al., 2013). Wskazane rejony odpowiadają jednak elementom o większej



Rycina 4.13. Model AlphaFold2 białka MtABCG46 (AF2). Kolor odpowiada wartości IDDT dla pozycji aminokwasowej, rejony o mniejszej pewności przewidywania są w kolorze czerwonym, pomarańczowym i żółtym.

dynamice w eksperymentalnie uzyskanych strukturach białek ABCG (Harris et al., 2021; Orlando & Liao, 2020; Sun et al., 2021). Podobnie jak ta uzyskana przy pomocy serwera I-TASSER, struktura prezentuje typowy dla eukariotycznych transporterów ABCG typ fałdowania określany jako V (Thomas et al., 2020). Analiza z wykorzystaniem algorytmu TM-score (z ang. Template Modeling score; miara podobieństwa pomiędzy dwiema strukturami przestrzennymi białek) potwierdziła, że otrzymany model charakteryzuje się fałdowaniem bardzo zbliżonym do pierwotnie uzyskanego modelu ABCG46, jak również pierwszej eksperymentalnie uzyskanej struktury pełnego transportera ABCG, ScPDR5, a także do homodimeru HsABCG2 (tab. 4.4) (Y. Zhang & Skolnick, 2004). Następnie porównano model AF2 z pierwotnym modelem MtABCG46 przy zastosowaniu dynamiki molekularnej. Uzyskane wyniki wykazały większą stabilność nowego modelu w symulacjach, w związku

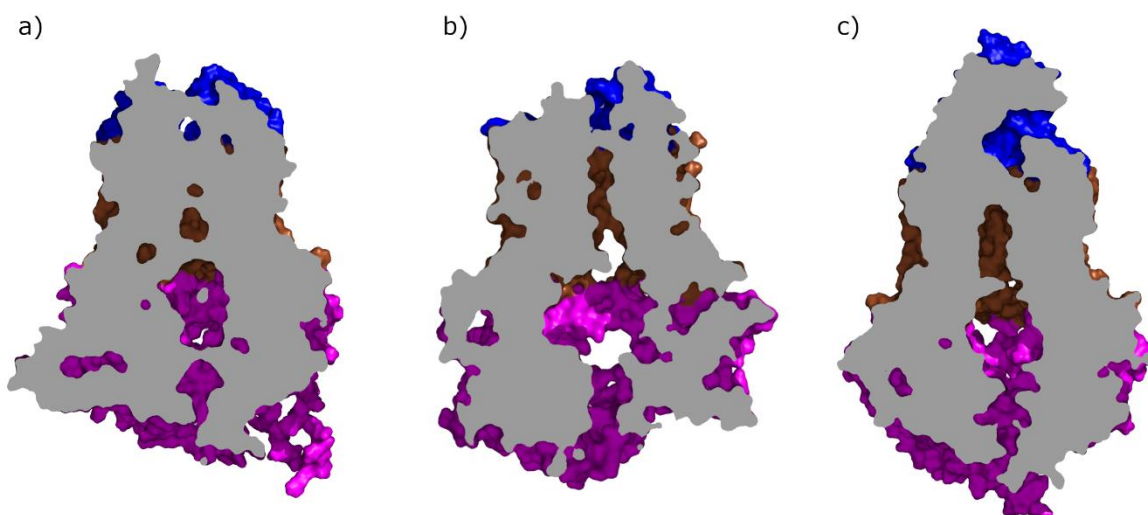
z czym do dalszych analiz wykorzystano strukturę uzyskaną za pomocą algorytmu AlphaFold2 oraz oparte na niej warianty MtABCG46 (F562A, F562L oraz F562Y) (załącznik 2).

Tabela 4.4. Porównanie struktury modelu z innymi białkami ABCG. Wynik TM-score zawiera się w wartościach między 0 a 1; wartości powyżej 0,5 uzyskiwane są przy porównaniu struktur o zbliżonym fałdowaniu.

Struktura porównawcza	TM-score
pierwotna struktura MtABCG46	0,81
ScPDR5 (PDB id: 7P04)	0,82
HsABCG2 (PDB id: 6VXH)	0,66

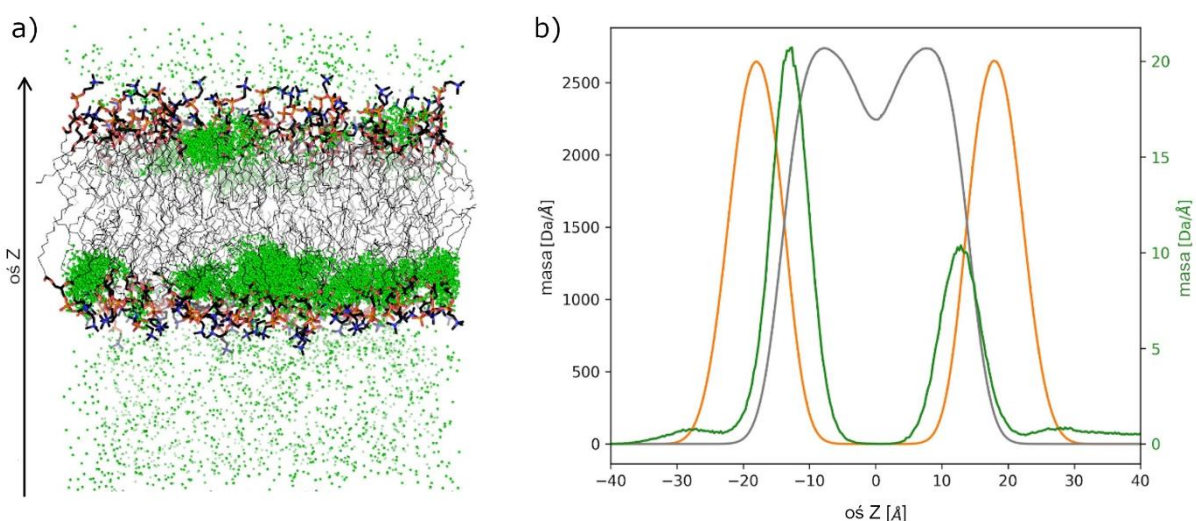
4.5.2. Identyfikacja tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej MtABCG46

Tworzona głównie przez transbłonowe helisy 2,5,8 i 11 - kieszeń centralna modelu AF2 jest znacząco zredukowana w porównaniu do kieszeni obserwowanej w pierwotnym modelu, ale również ScPDR5 (ryc. 4.14). Dodatkowo tunel prowadzący do wspomnianej kieszeni nie posiada szerokiego wejścia od strony cytozolowej, obecnego w ScPDR5 jak i strukturze uzyskanej przy pomocy serwera I-TASSER.



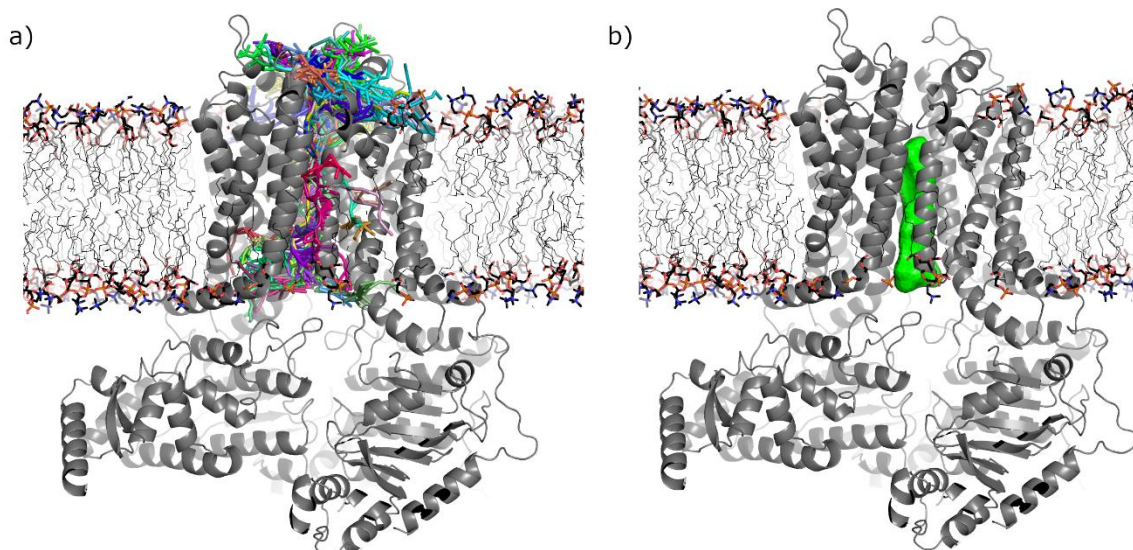
Rycina 4.14. Porównanie kieszeni centralnych. Przekrój poprzeczny powierzchni (a) modelu AF2, (b) pierwotnego modelu MtABCG46, (c) struktury Cryo-EM ScPDR5 (PDB ID: 7p04). Obszar zewnątrzkomórkowy został zaznaczony na niebiesko, obszar transbłonowy na brązowo, a obszar wewnątrzkomórkowy na różowo.

Aby zidentyfikować możliwe tunele umożliwiające substratom dostęp do kieszeni centralnej, wyniki dynamiki molekularnej przeanalizowano przy użyciu narzędzi CAVER 3.0 oraz TransportTools (Brezovsky et al., 2022; Chovancova et al., 2012). Analiza uwidoczniła sieć potencjalnych połączeń prowadzących do kieszeni zarówno z przestrzeni wewnątrz i zewnątrz – komórkowych, oraz od strony błony komórkowej. Aby wyodrębnić najbardziej prawdopodobną drogę dla substratów przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej z udziałem jednego z substratów MtABCG46 – likwiritigeniny oraz modelu dwuwarstwy lipidowej utworzonej z fosfatydylocholiny palmitynowo-oleinowej (POPC). Symulacje wykazały tendencję likwiritigeniny do akumulacji w warstwie pomiędzy głowami a ogonami fosfolipidów tworzących błonę (ryc. 4.15).



Rycina 4.15. Lokalizacja likwiritigeniny w symulacjach. (a) Zieloną kulką zaznaczono lokalizację molekuly likwiritigeniny w każdej klatce symulacji z błoną. (b) Wykres zagęszczenia masy wzdłuż osi Z przestrzeni symulacji. Głowy i ogony cząsteczek POPC zaznaczano kolejno pomarańczową i szarą linią z korespondującą osią po lewej stronie. Zagęszczenie masy likwiritigeniny zaznaczono zieloną linią, z osią po prawej stronie.

Spośród wykrytych w MtABCG46 tuneli prowadzących z tego obszaru do kieszeni centralnej wybrano najczęściej występujący (~9% całkowitego czasu symulacji) (ryc. 4.16). Wyselekcjonowany tunel charakteryzował największym przewężeniem o promieniu 0.97 ± 0.06 Å. Pozostałe tunele w tym rejonie nie zostały przeanalizowane z uwagi na ich znacznie mniejszą częstotliwość występowania i skomplikowaną geometrię.

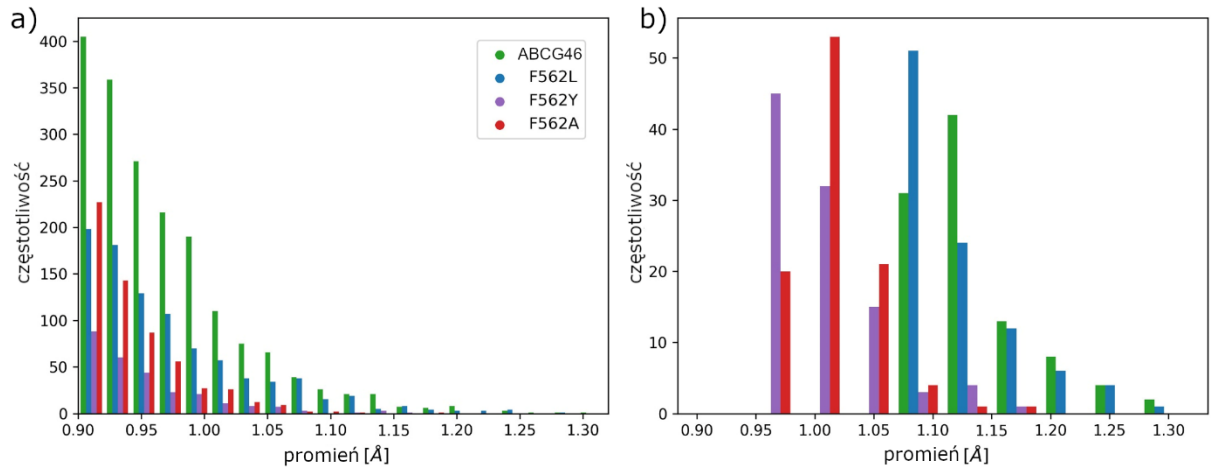


Rycina 4.16. Identyfikacja tuneli prowadzących do kieszeni centralnej modelu MtABCG46 (AF2). (a) Zgrupowane na podstawie lokalizacji tunele (poszczególne grupy w odmiennych kolorach), zidentyfikowane w obrębie transbłonowej części modelu. (b) Całkowita objętość tunelu wybranego do analizy w symulacji (kolor zielony).

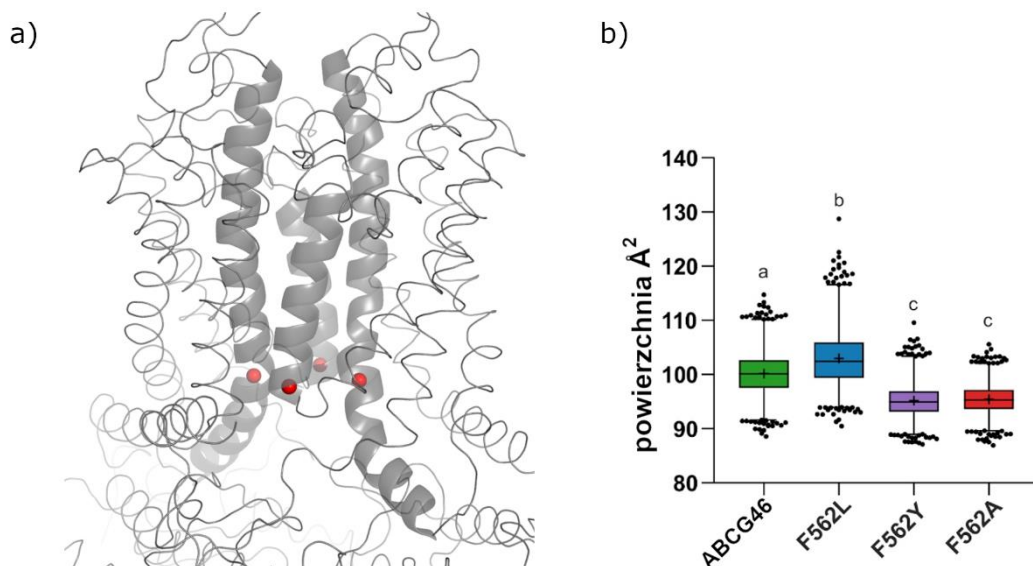
4.5.3. Wpływ modyfikacji fenyloalaniny 562 na tunel prowadzący do kieszeni centralnej

Symulacje dynamiki molekularnej przeprowadzone z wykorzystaniem modelu dwuwarstwy lipidowej utworzonej z fosfatydylocholiny palmitynowo-oleinowej (POPC) oraz wariantów MtABCG46 (natywne, F562L, F562Y oraz F562A) nie wykazały znaczących różnic w stabilności mutantów w porównaniu do natywnego białka (załącznik 3). W kolejnym etapie przeprowadzono analizę ścieżki prowadzącej do kieszeni centralnej z wykorzystaniem CAVER 3.0, które jest narzędziem umożliwiającym identyfikację i charakteryzację tuneli w obrębie białek (Chovancova et al., 2012). Eksperymenty wykazały, iż każda z badanych zmian wpływa negatywnie na częstotliwość występowania tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej w symulacjach (ryc. 4.17). Częstotliwość występowania rozumiana jest jako procent czasu symulacji w której obecny jest tunel. Analizując szerokość stu najszerszych ścieżek, to znaczy klatek symulacji zawierających tunel (szerokość wyznaczana jest przez najmniejsze przewężenie), pojawiających się w symulacjach dla każdego wariantu MtABCG46 zaobserwowano, iż F562L nie różni się znacząco w tym aspekcie od natywnego białka. Jednocześnie, w przypadku mutacji fenyloalaniny na tyrozynę lub alaninę (F562Y, F562A) doszło do zwężenia tunelu, w szczególności w obrębie wejścia do niego (ryc. 4.18). Zakładając, że zwężenie może spowodować ograniczenie dostępu substratów do kieszeni centralnej,

obserwacje te stoją w zgodzie z uzyskanymi dla F562Y oraz F562A wynikami transportu (ryc. 4.11).



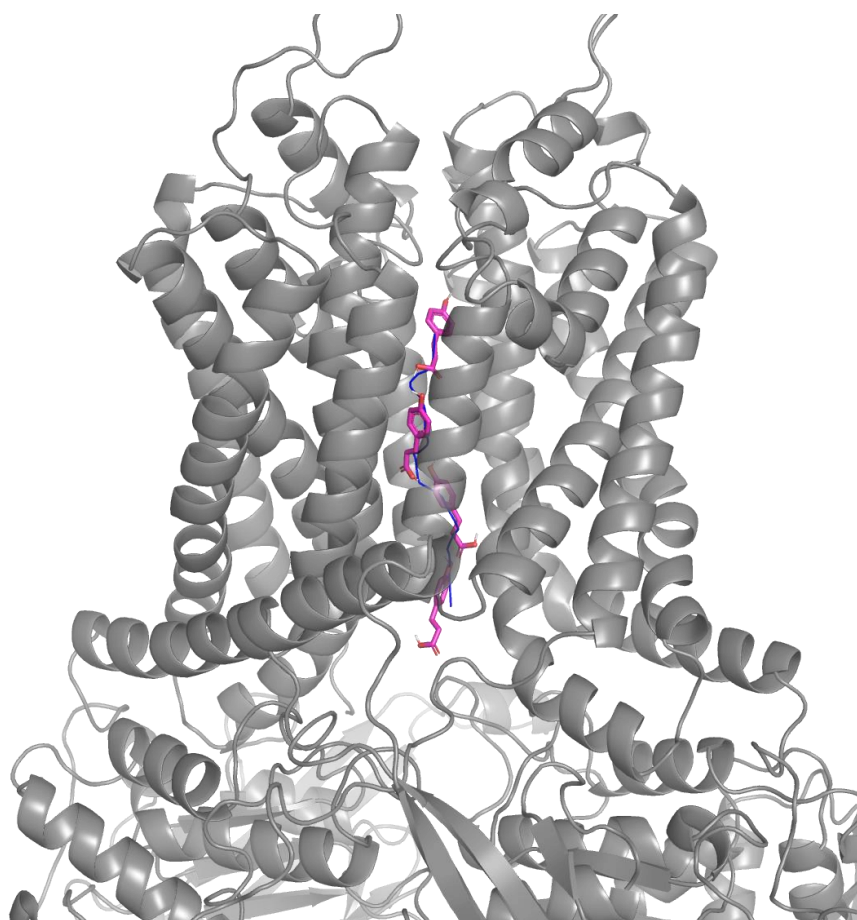
Rycina 4.17. Wpływ modyfikacji na tunel prowadzący do kieszeni centralnej. Wykres pokazuje populację tuneli o poszczególnych szerokościach (promieniu) w wariantach, (a) dla wszystkich wykrytych tuneli oraz (b) dla 100 najszerszych.



Rycina 4.18. Wejście do tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej. (a) Miejsce wejścia przedstawione na strukturze poprzez 4 czerwone punkty, będące na centralnej osi 4 helis transbłonowych – 2, 5, 8 i 11 (wyznaczone przy pomocy narzędzia HELANAL (Gowers et al., 2016; Michaud-Agrawal et al., 2011)). (b) powierzchnia wejścia u badanych wariantów. Wartości i \pm odchylenie standardowe dla każdego wariantu zostały uzyskane w 400 pomiarach z 5 niezależnych symulacji. Wysokość słupków wyznaczają wyniki między 25 a 75 percentylem; linia środkowa w każdym słupku reprezentuje medianę; powtórzenia wykraczające za 10 i 90 percentyl oznaczone kropką; małe litery a i b przedstawiają istotną statystycznie różnicę ($P < 0,0001$) na podstawie testu Kruskala-Wallisa i testu Dunna.

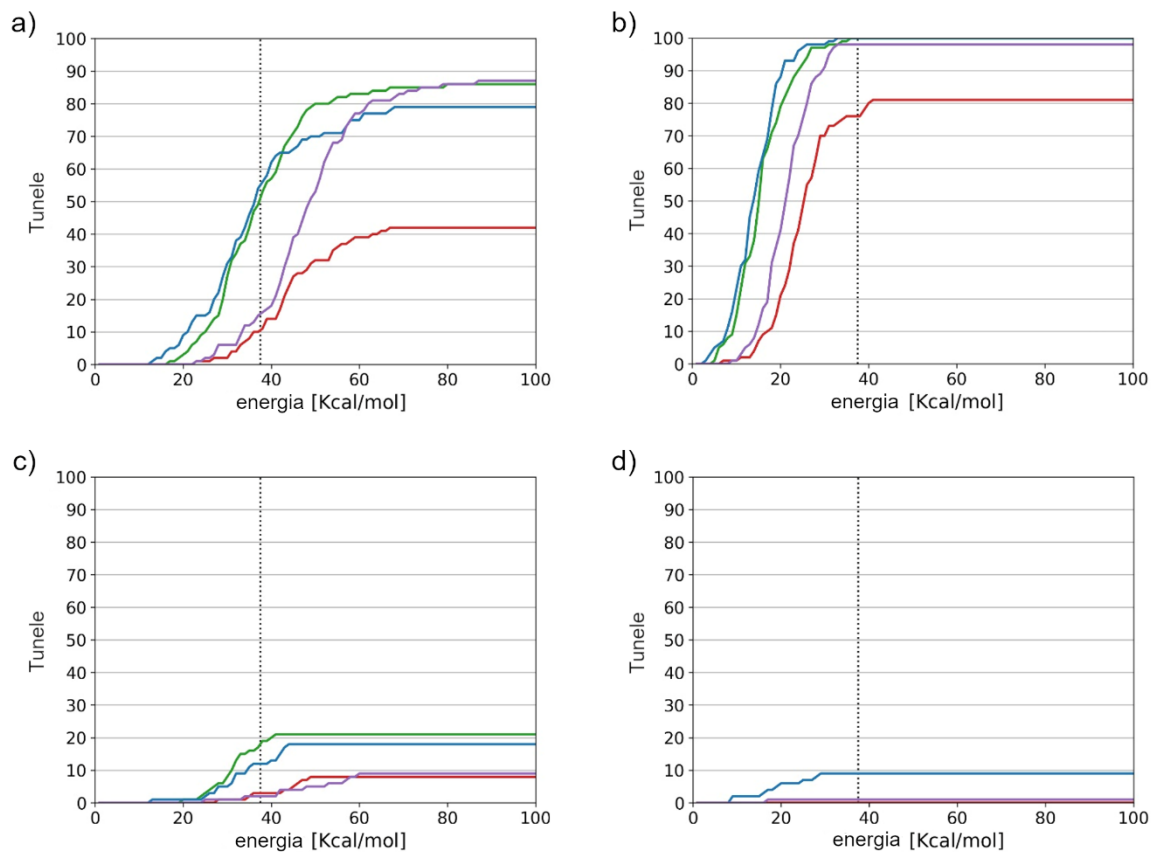
4.5.4. Analiza dostępu do kieszeni centralnej z wykorzystaniem fenylopropanoidów

Aby zweryfikować hipotezę dotyczącą ograniczenia dostępu do kieszeni centralnej, zbadano możliwość dotarcia do niej z przestrzeni wewnątrzkomórkowej przez transportowane z udziałem MtABCG46 likwiritigeninę i kwas *p*-kumarowy oraz nietransportowane, lecz pokrewne chemicznie izolikwiritigeninę i 7,4'-dihydroksyflawon. W tym celu wykorzystano uzyskane wcześniej 100 najszerszych tuneli dla każdego wariantu i poddano je analizie CaverDock (Vavra et al., 2019). To narzędzie tworzy profil energetyczny w postaci energii wiązania badanej molekuly z białkiem mierzonym na kolejnych etapach drogi zadanej molekule do przebycia (ryc 4.19). Taki profil informuje o barierach energetycznych jaką potencjalny substrat/ligand musi pokonać aby przedostać się do kieszeni białka. CaverDock był skutecznie zastosowany w badaniach jako narzędzie w inżynierii białkowej oraz do pokazania korelacji pomiędzy barierami energetycznymi a kinetyką reakcji (Brodsky et al., 2020; Marques et al., 2019; Papadopoulou et al., 2021).



Rycina 4.19. Transport molekuly z przestrzeni wewnątrzkomórkowej do kieszeni centralnej MtABCG46. Ukazano nałożone 4 klatki przykładowej analizy, w której kwas *p*-kumarowy (różowy) migruje do kieszeni MtABCG46 (szary) ścieżką wyznaczoną przez środek tunelu (niebieska linia).

Jednocześnie przyjęto założenie, że połowa ze 100 najlepszych powtórzeń (tuneli z najniższymi barierami energetycznymi) dla likwiritigeniny i natywnego białka wyznacza energetyczną granicę dla skutecznego zdarzenia transportu (mediana barier energetycznych równa 38,5 kcal·mol⁻¹). Eksperymenty z wykorzystaniem likwiritigeniny pokazały, iż podczas gdy wyniki uzyskane dla wariantu F562L nie różnią się znacząco od tych dla natywnego białka, w przypadku F562Y oraz F562A ilość powtórzeń, w których molekula skutecznie dotarła do kieszeni centralnej była drastycznie mniejsza i wyniosła odpowiednio 16% i 11% (ryc. 4.20). Co więcej, w przypadku F562A w ogóle nie udało się uzyskać skuteczności zbliżonej do niemodyfikowanego MtABCG46, a w przypadku F562Y molekuly musiałyby pokonać bariery energetyczne wynoszące ponad 50 kcal·mol⁻¹. Obserwacje te są w zgodzie z wynikami biochemicznych eksperymentów transportu, w których transport likwiritigeniny zarejestrowano tylko dla MtABCG46 oraz wariantu F562L (ryc. 4.20). Wyniki uzyskane dla kwasu *p*-kumarowego, pokazały, iż związek ten skutecznie migrował do kieszeni centralnej we wszystkich badanych wariantach białka, co można powiązać z jego mniejszym rozmiarem w porównaniu do pozostałych analizowanych fenylopropanoidów (ryc. 4.20). W przeciwieństwie do kwasu *p*-kumarowego, w przypadku natywnego MtABCG46 jak i badanych mutantów, kieszeń centralna była bardzo trudno dostępna dla izolikwiritigeniny i 7,4'-dihydroksyflawonu, co dobrze koresponduje z faktem iż oba związki nie są transportowane przez badany transporter (ryc. 3.20, ryc. 3.11).

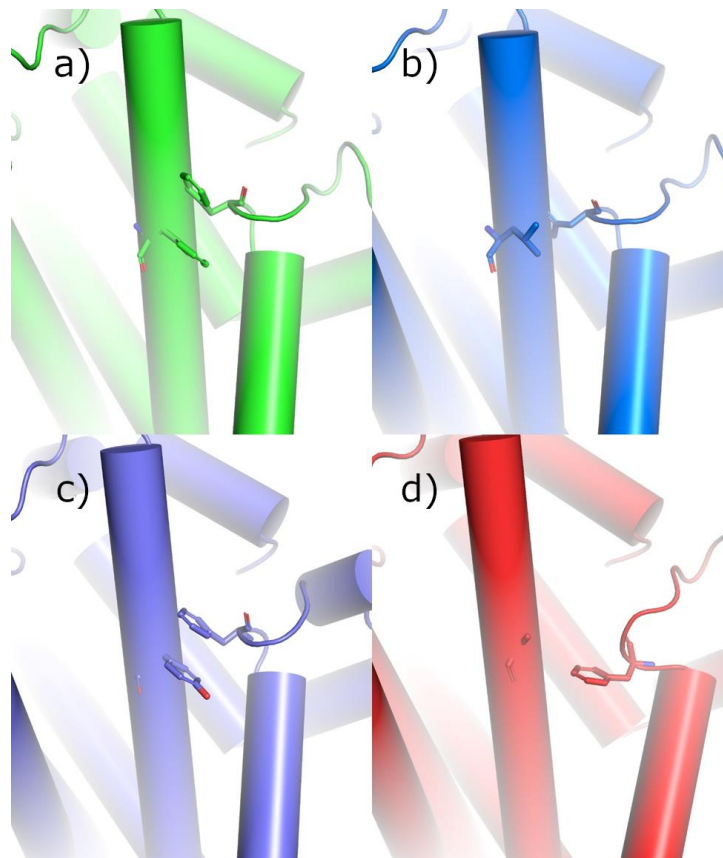


Rycina 4.20. Sumaryczny rozkład barier energetycznych w drodze do kieszeni centralnej przez 100 najszerszych tuneli dla likwiritigeniny (a), kwasu *p*-kumarowego (b), 7,4'-dihydroksyflawonu (c) oraz izolikwiritigeniny (d). Dla wyników poszczególnych wariantów użyto kolorów: zielony dla ABCG46, niebieski dla F562L, fioletowy dla F562Y i czerwony dla F562A. Czarną przerywaną linią zaznaczono medianę barier energetycznych dla likwiritigeniny i ABCG46.

4.5.5. Wpływ modyfikacji w obrębie fenyloalaniny 562 na strukturę MtABCG46 i kieszeń centralną

Wykorzystanie dynamiki molekularnej umożliwiło zbadanie skutków wprowadzonych mutacji na poziomie strukturalnym. Na podstawie analiz *in silico* zaobserwowano, iż modyfikacje w obrębie pozycji 562 zaburzyły oddziaływania niekowalencyjne, tworzone w natywnym białku przez fenyloalaninę, czego konsekwencją były zmiany strukturalne helis tworzących kieszeń centralną. Fenyloalanina 562 tworzy niekowalencyjne oddziaływanie typu π -stacking z fenyloalaniną 684 (F684), które z racji posiadanego pierścienia aromatycznego obecne jest również w wariancie F562Y (ryc. 4.21). Utrata tego wiązania w wyniku zamiany F562A doprowadziła do przemieszczenia transbłonowej helisy 5, czego konsekwencją było zaburzenie struktury innych, tworzących kieszeń helis. W przeciwieństwie do alaniny, wprowadzona w pozycji 562 leucyna nie doprowadziła do destabilizacji TH5 pomimo braku pierścienia aromatycznego w obrębie łańcucha bocznego leucyny. Przepuszczalnie wynika to z pozostałych słabych oddziaływań łańcucha bocznego.

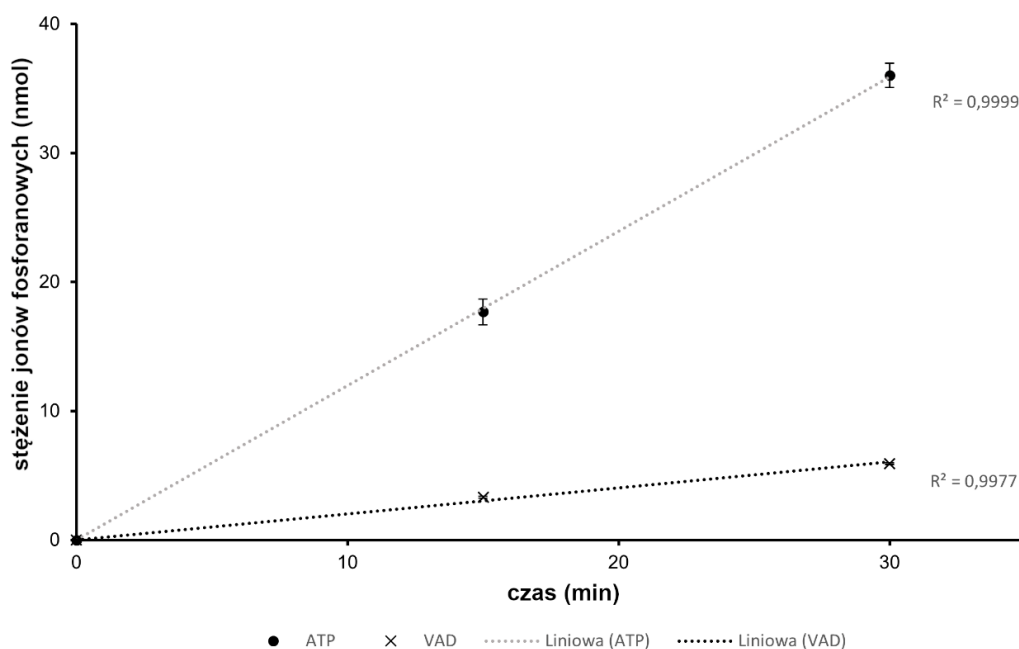
Zmiany w obrębie helis transbłonowych spowodowane wprowadzonymi mutacjami miały wpływ nie tylko na kształt kieszeni centralnej, ale również na szerokość wejścia tunelu do niej prowadzącego. Zwężenie zostało zaobserwowane zarówno dla wariantów F562A oraz F562Y (ryc. 4.21). W mutancie F562Y dodatkowa grupa hydroksylowa tworzyła wiązanie wodorowe ze znajdującą się w obrębie TH8 tyrozyną 1213 (Y1213) przez cały czas trwania symulacji.



Rycina 4.21. Wpływ modyfikacji na oddziaływanie pozycji 562 z F684. Zbliżenie w obrębie struktury przedstawia interakcje F684 pomiędzy F562 w natywnym białku (a), L562 w wariacie F562L (b), Y562 w F562Y (c) oraz A562 w F562A.

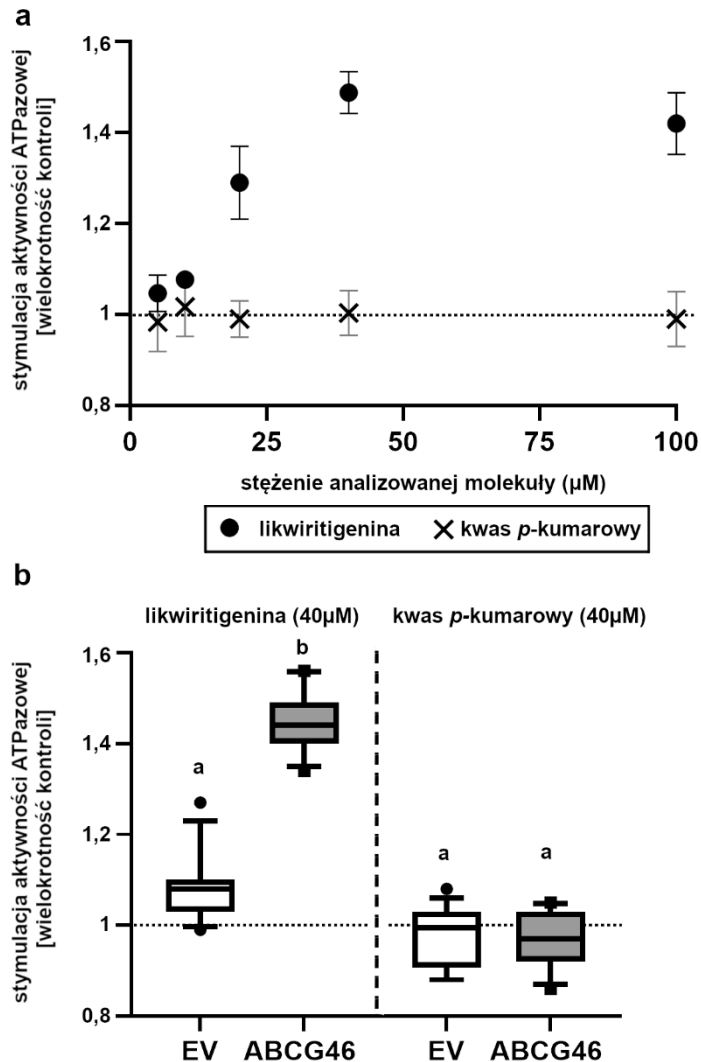
4.6. Stymulacja aktywności ATPazowej MtABCG46 przez molekuly transportowane

W przypadku niektórych białek ABC aktywność ATPazowa transportera jest indukowana obecnością transportowanej molekuly (patrz sekcja 1.3.2.). Wykorzystując modelowy układ reprezentowany przez MtABCG46, postanowiono sprawdzić czy zjawisko stymulacji aktywności ATPazowej można potencjalnie wykorzystać jako pośrednią metodę identyfikacji molekuł transportowanych. W tym celu opracowano test aktywności ATPazowej, oparty na kolorymetrycznym oznaczeniu ilości jonów fosforanowych (P_i). Eksperymenty wykazały liniową w czasie hydrolizę ATP przez białka obecne w izolatach błon komórkowych linii BY2 (ryc. 4.22). Co więcej, aktywność ATPazowa prób uległa znaczącemu zmniejszeniu pod wpływem ortowanadanu sodu, będącego inhibitorem m.in. transporterów ABC (Hunke et al., 1995; Pierman et al., 2017). Następnie sprawdzono czy obecność likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego indukują hydrolizę ATP w próbach zawierających MtABCG46. Wyniki wykazały zależną od stężenia likwiritigeniny stymulację aktywności (ryc. 4.23). Jednocześnie nie zaobserwowano żadnego wpływu wywołanego dodaniem kwasu *p*-kumarowego. Aby



Rycina 4.22. Aktywność ATPazowa białek błony komórkowej wyizolowanych z komórek BY2 ekspresjonujących *MtABCG46*. Na wykresie pokazano wartości uzyskane w ramach przykładowego, reprezentatywnego powtórzenia biologicznego dla próby z dodatkiem ATP (ATP) oraz z dodatkiem ATP i ortowanadanu sodu (VAD). Wartości i \pm odchylenia standardowe zostało otrzymane z co najmniej 3 powtórzeń technicznych. Na wykresie umieszczono wartość R^2 dla wyznaczonych linii trendu

potwierdzić, że za efekt obserwowany w obecności likwiritigeniny odpowiada MtABCG46, a nie pozostałe białka w izolacie, eksperyment przeprowadzono również dla linii kontrolnej (EV). W porównaniu do kontroli, w próbach zawierających MtABCG46 obecność substratu poskutkowała znacząco większą stymulacją (ryc. 4.23).



Rycina 4.23. Stymulacja aktywności ATPazowej MtABCG46 zależnej od ortowanadanu sodu przez likwiritigeninę i kwas *p*-kumarowy. Przedstawione wartości to wielokrotność zmiany aktywności pod wpływem obecności molekuly badanej w porównaniu do kontroli (linią przerywaną zaznaczono wartość 1 oznaczającą brak zmiany). (a) Stymulacja aktywności ATPazowej białek błony komórkowej wyizolowanych z komórek BY2 ekspresjonujących *MtABCG46* zależna od stężenia substratów. Przedstawiono krzywą uzyskaną w co najmniej 4 powtórzeniach technicznych dla pojedynczego powtórzenia biologicznego celem doboru właściwego stężenia. (b) Stymulacja przez likwiritigeninę i kwas *p*-kumarowy białek błony komórkowej wyizolowanych z komórek BY2 transformowanych pustym wektorem (EV; biały) oraz BY2 ekspresjonujących *MtABCG46* (ABCG46; szary). Wartości i \pm odchylenie standardowe zostały uzyskane w co najmniej 3 powtórzeniach technicznych dla 3 powtórzeń biologicznych. Wysokość słupków wyznaczają wyniki między 25 a 75 percentylem; linia środkowa w każdym słupku reprezentuje medianę; powtórzenia wykraczające za 10 i 90 percentyl oznaczone kropką; małe litery a i b przedstawiają istotną statystycznie różnicę ($P < 0,0001$ dla likwiritigeniny) na podstawie testu Manna-Whitneya.

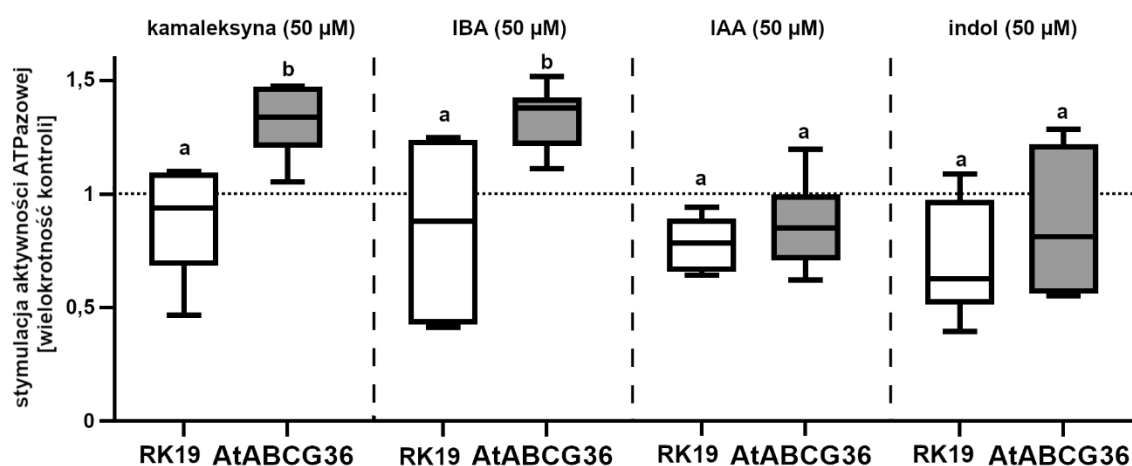
4.6.1. Wykorzystanie stymulacji aktywności ATPazowej w badaniach nad ABCG36 z *A. thaliana*

W trakcie doktoratu odbyto staż naukowy w grupie badawczej Dr. Markusa Geislera na Wydziale Biologii Uniwersytetu we Fryburgu, w Szwajcarii. W jego trakcie wykorzystano opracowaną metodykę dotyczącą aktywności ATPazowej do badań nad pełnym transporterem ABCG36 z *Arabidopsis thaliana*.

AtABCG36 jest zaangażowany w równowagę hormonalną i rozwój rośliny jako transporter kwasu indolilo-3-masłowego (IBA), nie translokując jednocześnie kwasu indolilo-3-octowego (IAA) (Aryal et al., 2019; Růžička et al., 2010). Mutanty ABCG36 *A. thaliana* charakteryzowały się zaburzeniami w reakcjach obronnych przeciwko patogenom niezaadaptowanym, sugerując udział białka w takich procesach jak depozycja kalozy indukowana flg22 (22-aminokwasowy fragment białka bakteryjnego białka flageliny, powszechnie używany jako elicytor mechanizmów obronnych roślin) czy akumulacją glukozynolanów indolowych (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009). W wyniku badań mających na celu identyfikację substratów tego transportera zaproponowano molekuły ze szlaku glukozynolanów indolowych takie jak prekursor/y 4-*O*- β -glukozylo-indolilo-3-formamidu (4OGlcI3F), 4-metoksy-indolilo-3-metanol (4MeOI3M) czy *S*-(4-metoksy-indolilo-3-metylo) cysteinę (4MeOI3Cys) (Lu et al., 2015; Matern et al., 2019). Jednakże związki te nie wpływały na zależną od ABCG36 inhibicję wzrostu patogennego grzyba *Phytophthora infestans* a jedynie zwiększały indukowane flg22 odkładanie się kalozy (Matern et al., 2019). Co więcej, w ostatnim czasie wykazano, że białko, i jego bliskie homologi tj. ABCG34 i ABCG40 są zaangażowane w sekrecję głównej fitoaleksyny *A. thaliana*, kamaleksyny (He et al., 2019; Khare et al., 2017). W związku z tym postanowiono wykorzystać testy aktywności ATPazowej jako dodatkową metodę podkreślającą związek pomiędzy kamaleksyną a AtABCG36.

W celu uzyskania materiału do badań wykorzystano metodykę odwiedzanego Laboratorium, której opis zawarto w sekcji 2.2 (Aryal et al., 2019; Hao et al., 2020; Matern et al., 2019). Wyniki eksperymentów wykazały, że - podobnie jak w przypadku MtABCG46 i likwiritigeniny – aktywność ATPazowa prób zawierających AtABCG36 wzrosła w obecności

IBA oraz kamaleksyny (ryc. 4.24). Podobnego efektu nie zaobserwowano w próbach kontrolnych (RK19), czy w obecności podobnych strukturalnie, ale nietransportowanych przez badany transporter IAA, czy indol (ryc. 4.24).



Rycina 4.24. Stymulacja aktywności ATPazowej AtABCG36 zależnej od ortowanadanu sodu przez kamaleksynę, IBA, IAA i indol. Przedstawione wartości to wielokrotność zmiany aktywności pod wpływem obecności molekuly badanej w porównaniu do kontroli (linią przerywaną zaznaczono wartość 1 oznaczającą brak zmiany). Stymulacja białek błony komórkowej przez badane molekuly, wyizolowanych z komórek liści tytoniu agroinfiltrowanych wektorem antywyciszającym RK19 oraz konstrukcją genetyczną zawierającą *AtABCG36* (*AtABCG36*; szary) lub agroinfiltrowanych tylko wektorem antywyciszającym i służących jako kontrola (RK19; biały). Wartości \pm odchylenie standardowe zostały uzyskane w co najmniej 2 powtórzeniach technicznych dla 3 powtórzeń biologicznych. Wysokość słupków wyznaczają wyniki między 25 a 75 percentylem; linia środkowa w każdym słupku reprezentuje medianę; małe litery a i b przedstawiają istotną statystycznie różnicę ($P < 0,01$ dla kamaleksyny; $P < 0,05$ dla IBA) na podstawie testu Manna-Whitneya.

5. Dyskusja

Molekularne podstawy specyficzności substratowej transporterów ABC są wciąż stosunkowo słabo zrozumiane. W kontraście do tego stoi chociażby dobrze poznany zachowawczy mechanizm wiązania i hydrolizy ATP przez te białka. W wyniku badań obejmujących analizę polimorfizmów oraz wprowadzania punktowych zmian w obrębie sekwencji nieselektywnych transporterów takich jak CDR1 z *C. albicans*, czy PDR5 z *S. cerevisiae* zidentyfikowano liczne aminokwasy, których zmiana obniżała zależną od tych białek odporność grzybów na różne fungicydy (Egner et al., 1998; Ernst et al., 2008; Rawal et al., 2013). W przypadku PDR5 znaleziono również aminokwas w obrębie domeny wiążącej nukleotyd, którego zmiana (H1068A) selektywnie wpłynęła na zależny od PDR5 transport rodaminy 6G (Ernst et al., 2008). Zaproponowano, że szerokie spektrum selektywności transporterów ABCG może wynikać nie tylko z powinowactwa substratu do miejsca wiązania ale również z kinetyki zmian konformacyjnych białka, które w przypadku substratów potrzebujących różny czas na związanie z białkiem warunkowałyby transport (Ernst et al., 2010). Interpretacja wyników uzyskanych w oparciu o analizę wielu translokowanych przez transporter molekuł jednocześnie stanowi wyzwanie. Ciekawą alternatywę w kontekście tego typu badań stanowią roślinne transportery ABCG, charakteryzujące się potencjalnie wyższą specyficznością substratową - co wykazano niejednokrotnie eksperymentalnie (Biała et al., 2017; Crouzet et al., 2013; Kang et al., 2010). Warto zaznaczyć, że jak dotąd takich białek nie wykorzystano jako układ modelowy w tego typu badaniach.

Znajomość wysokorozdzielczej struktury białka jest niezwykle użyteczna w badaniach molekularnych, ponieważ nadaje kontekst sekwencji, ułatwiając tym samym identyfikację ważnych dla funkcji białka aminokwasów (Roy et al., 2010). W ostatnich latach rozwój technik biologii strukturalnej spowodował znaczący postęp w odniesieniu do dużych hydrofobowych białek błonowych w tym białek ABC. Opisano m.in. unikalny dla transporterów ABCG typ budowy (Harris et al., 2021; Jackson et al., 2018; J. Y. Lee et al., 2016; Manolaridis et al., 2018; Sun et al., 2021; Taylor et al., 2017). Zaproponowano także, że zarówno połowiczne jak i pełne eukariotyczne białka ABCG cechuje zachowawczość struktury (Harris et al., 2021). Jednocześnie rozwój metod obliczeniowych pomaga ominąć wyzwania związane z wydajną produkcją, oczyszczaniem białka i eksperymentalnym wyznaczeniem struktury poprzez modelowanie *in silico*. Ta metoda umożliwia uzyskanie danych strukturalnych na podstawie

sekwencji aminokwasowej. Do uzyskania modelu MtABCG46 w tej pracy wykorzystano serwer I-TASSER (ryc. 4.3) (Yang et al., 2014; Yang & Zhang, 2015). Narzędzie to zostało wielokrotnie uznane za jedną z najlepszych metod w odbywającym cyklicznie eksperymencie krytycznej oceny metod przewidywania struktury białek (CASP, z ang. Critical Assessment of methods of protein Structure Prediction) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/about.html>). Wyniki eksperymentów pokazują, iż dostępne obecnie zautomatyzowane metody są w stanie generować struktury o jakości przewidywania porównywalnej z modelowaniem przeprowadzonym przez specjalistów (Battey et al., 2007; Huang et al., 2014; Tai et al., 2014). Uzyskana struktura transportera ABCG46 prezentowała budowę bardzo zbliżoną do struktury ludzkiego heterodimeru ABCG5/G8 w konformacji skierowanej do wewnątrz (PDB: 5DO7) (ryc. 4.3). Na tym etapie analiz przewidywania struktury drugorzędowej zaobserwowano obecność dodatkowych, unikalnych dla pełnych transporterów ABCG elementów takich jak łącznik pomiędzy TMD1 a NBD2 oraz ustrukturyzowana pętla w obrębie NBD1 (ryc. 4.2 oraz 4.3). Połowiczne transportery nie posiadają łącznika, który w pełnych transporterach łączy obie połowy (tj. pary NBD-TMD). Wysokie zróżnicowanie łącznika pozwala zakładać iż jego sekwencja aminokwasowa nie ma dużego znaczenia dla funkcji białka. Dzięki wykorzystaniu narzędzia heliquest (Gautier et al., 2008) poczyniono ciekawą obserwację dotyczącą unikalnej pętli w NBD1 – obecna z dużym prawdopodobieństwem w jej obrębie helisa charakteryzuje się amfifilowością, to znaczy zbudowana jest w taki sposób, że po jednej jej stronie znajdują się aminokwasy hydrofobowe, a po drugiej polarne i obdarzone ładunkiem. Miarą amfifilowości jest moment hydrofobowy (Eisenberg et al., 1982), który dla sprawdzanej helisy wyniósł 0,556. Innym parametrem określającym właściwości helisy jest hydrofobowość, która wyniosła 0,642. Wykorzystując oba parametry oraz diagram stworzony na podstawie scharakteryzowanych eksperymentalnie helis (Phoenix & Harris, 2002), można przypuszczać, że jest to element aktywny powierzchniowo, występujący na granicy błony, podobnie do innych- opisywanych w obrębie struktur ABCG- horyzontalnych helis „elbow”, które stabilizują białko w błonie oraz współtworzą region odpowiadający za komunikację TMD z NBD (Khunweeraphong et al., 2017, 2019). W 2021 roku opublikowano pierwszą eksperymentalnie uzyskaną strukturę pełnego transportera ABCG – PDR5 z *S. cerevisiae*. Obserwowany typ fałdowania bardzo przypominał ten opisany dla połowicznych ludzkich białek ABCG, potwierdzając tym samym wysoki stopień zachowawczości strukturalnej w obrębie podrodziny eukariotycznych białek ABCG. Co ciekawe, w obrębie pętli NBD1, pomiędzy dwoma pierwszymi harmonijkami β zaobserwowano przewidzianą u MtABCG46 amfifilową helisę lokalizującą na powierzchni błony (Harris et al., 2021).

W ostatnim czasie udostępniono nowe narzędzie – AlphaFold2, które w oparciu o metodę uczenia maszynowego zostało zaprojektowane do przewidywania struktur białkowych (Jumper et al., 2021). W niedawnych badaniach wykazano, że wygenerowane przy użyciu tego algorytmu struktury zarówno białek globularnych jak i dużych białek błonowych takich jak transportery ABC, charakteryzują się wysokim stopniem poprawności (Hegedűs et al., 2022). Wykorzystując AlphaFold2 w tej pracy uzyskano model (AF2) o fałdowaniu bardzo zbliżonym zarówno do PDR5 jak i uzyskanej przy pomocy serwera I-TASSER struktury MtABCG46 (tab. 4.4). Uzyskanie zbliżonego wyniku przy pomocy dwóch niezależnych metod wzmacnia założenie poprawności przewidywania i jednocześnie podkreśla użyteczność współczesnych algorytmów modelowania na podstawie sekwencji w badaniach molekularnych. Nie jest to rozwiązanie idealne ale pozwalające przy wszystkich ograniczeniach eksperymentalnego wyznaczania struktury na dalszą pracę. Wygenerowany model AF2 posłużył do analiz bioinformatycznych opartych od dynamikę molekularną.

W modelu zaobserwowano kieszeń pomiędzy domenami transbłonowymi, tworzoną przez aminokwasy znajdujące się w obrębie helis transbłonowych 2, 5, 8 i 11 (ryc. 4.4). Kieszenie w analogicznym miejscu zostały zidentyfikowane również w strukturach homologów, takich jak homodimery HsABCG1, HsABCG2 czy pełny transporter ScPDR5. Co ciekawe, w przypadku tych białek, w obrębie ich kieszeni stwierdzono obecność odpowiadających im substratów, kolejno cholesterolu, mitoksantronu i rodaminu 6G, co wskazuje na potencjalne znaczenie tego elementu strukturalnego dla transportu tych molekuł (Harris et al., 2021; Orlando & Liao, 2020; Sun et al., 2021). Znaczenie kieszeni podkreślają także przedstawione w tej pracy badania, w ramach których wprowadzono modyfikacje aminokwasów współtworzących ją w MtABCG46 tj. fenyloalaniny 562 (F562) oraz tyrozyny 1213 (Y1213) znajdujących się kolejno w 2 i 8 helisie transbłonowej. Wybór F562 oparto na założeniu, że rozpoznanie i transport różnych molekuł przez transportery wynikać może ze zmienności sekwencji aminokwasów tworzących kieszeń oraz tunel do niej prowadzący (tab. 4.1). Z kolei symetryczna do F562, w drugiej domenie transbłonowej – tyrozyna 1213, jest aminokwasem bardziej zachowawczym i koewolucyjnie powiązany z wysoce zachowawczą asparaginą 1331 (tab. 4.1). Obie pozycje odpowiadają silnie zachowawczej fenyloalaninie 431 ludzkiego homodimeru ABCG2 (ryc. 4.5). Przypuszcza się, że aminokwas ten współtworzy miejsce wiązania dla transportowanych substratów u ABCG2. Wniosek ten wynika jednak tylko z obserwacji fenotypowych, w których polimorficzny wariant F431L ABCG2

charakteryzował się niewrażliwością na inhibitory blokujące potencjalne miejsce wiązania. Trzeba jednak zaznaczyć, że nie wyjaśniono roli tego aminokwasu w mechanizmie transportu na poziomie molekularnym. Fenyloalanina w tej pozycji jest silnie zachowawcza nie tylko u ludzkich białek ABCG ale także zwierzęcych ortologów. W obrębie kieszeni centralnej ABCG2 znajduje się również inna zachowawcza ewolucyjnie fenyloalanina w pozycji 439. Tworzona w homodimerze para F439 – F439' stabilizuje transportowane molekuly w obrębie kieszeni przez oddziaływania typu π -stacking (Gose et al., 2020). Biorąc pod uwagę presję ewolucyjną, której konsekwencją jest zachowawczość aminokwasu na danej pozycji, można przypuszczać, że choć aminokwasy te pełnią ważne role w mechanizmie transportu, to raczej w mniejszym stopniu decydują o specyficzności substratowej. Z kolei w przypadku roślinnych pełnych białek ABCG zaobserwowano, że na pozycji odpowiadającej F562 częściej występują inne aminokwasy, takie jak leucyna, izoleucyna czy tyrozyna (tab. 4.2). Zmiany aminokwasów na tej pozycji mogą odzwierciedlać adaptacje białek je posiadających do pełnionych funkcji. I tak np. ABCG31 z *Oriza sativa* (Garroum et al., 2016), ABCG31 z *Hordeum vulgare* (Chen, Komatsuda, Ma, Nawrath, et al., 2011), oraz ABCG32 z *Arabidopsis thaliana* (Bessire et al., 2011; Fabre et al., 2016) tworzą grupę ortologów zaangażowanych w dystrybucję kutyn. U wszystkich z tych białek - potencjalnie odpowiedzialnych za translokację podobnego lub tego samego substratu - na tej pozycji obecna jest rzadziej występująca tyrozyna, co może oznaczać jej znaczenie dla specyficzności substratowej. Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż odpowiadające sobie pozycje w 1 i 2 domenie transbłonowej jakimi są F562 i Y1213 różnią się zachowawczością i powiązaniem koewolucyjnymi (tab. 4.1, ryc. 4.6). Uwidacznia to różne pochodzenie domen oraz asymetrię ich ewolucji, która stanowi unikalną cechę organizacji pełnego transportera ABCG. Taka asymetria może stanowić o plastyczności adaptacyjnej oraz zwiększać jej możliwość w porównaniu do tworzących dimery połowicznych transporterów.

W porównaniu do modelu uzyskanego przy wykorzystaniu serwera I-TASSER, w modelu AF2 rozmiar badanej kieszeni centralnej był zredukowany (ryc. 4.13). Co więcej, tworzący do niej dostęp z przestrzeni cytozolowej tunel, obserwowany chociażby w strukturach ScPDR5 czy HsABCG2 (Harris et al., 2021; Orlando & Liao, 2020), został uwidoczony dopiero w przeprowadzonych symulacjach dynamiki molekularnej.

Wszystkie testowane biochemicznie modyfikacje białka w obrębie kieszeni centralnej, a dokładniej na pozycjach F562 i Y1213 (F562L, F562I, F562Y, F562A oraz Y1213F i Y1213A) miały istotny wpływ na zależny od MtABCG46 transport kwasu *p*-kumarowego

i likwiritigeniny, potwierdzając znaczenie badanego obszaru dla funkcjonowania białka i jego roli w dystrybucji fenylopropanoidów u *Medicago truncatula* (ryc. 4.11). Jednocześnie żaden z wariantów nie był zdolny do translokacji izolikwiritigeniny i 7,4'-dihydroksyflawonu. Pomimo podobieństwa do likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego oraz wspólnego pochodzenia ze szlaku fenylopropanoidowego, oba te związki nie są substratami MtABCG46. Wyniki eksperymentów są w zgodzie z hipotezą zakładającą rolę kieszeni centralnej w rozpoznaniu i transporcie molekuł przez badane białko. Biorąc pod uwagę stosunkowo wysoki stopień zachowawczości Y1213, jego powiązanie z silnie zachowawczą asparaginą 1331, a także fakt, że oba aminokwasy należą do stosunkowo nielicznych w obrębie kieszeni aminokwasów polarnych, można podejrzewać ich znaczenie w wiązaniu lub stabilizacji substratów. Zamiana fenyloalaniny w pozycji 562 na leucynę wpłynęła na specyficzność substratową, sprawiając iż wariant F562L MtABCG46 jest transporterem likwiritigeniny ale nie kwasu *p*-kumarowego. Jednocześnie zamiana na podobną do leucyny izoleucynę doprowadziła – podobnie jak w wariantach F562A i F562Y – do braku transportu obu znanych substratów. Oznacza to, że aminokwas występujący w tej pozycji ma duże znaczenie dla pełnionej przez białko funkcji.

Wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* opartych o izolikwiritigeninę i 7,4'-dihydroksyflawon były zgodne z eksperymentami biochemicznymi pokazując, że dostęp tych związków do kieszeni centralnej MtABCG46 jest utrudniony i wysoce nieprawdopodobny (ryc. 4.19). W przypadku natywnego modelu AF2 jak i wariantu F562L bariery energetyczne napotymane przez likwiritigeninę były zbliżone i wystarczająco niskie dla skutecznego transportu w obu przypadkach. Z kolei zamiana zarówno na tyrozynę jak i alaninę (F562Y, F562A) doprowadziła do częściowego zapadnięcia się tunelu, co w konsekwencji znacząco zmniejszyło możliwość dotarcia likwiritigeniny do kieszeni centralnej, tym samym uniemożliwiając transport (ryc. 4.20). Wyniki te, będące w zgodzie z rezultatami biochemicznych eksperymentów transportu pozwalają przypuszczać, że ograniczenie dostępu do badanej kieszeni stanowi zarówno ważny element i jednocześnie jeden z pierwszych etapów selektywnego transportu. Co zaskakujące przeprowadzone eksperymenty pokazały, iż ten mechanizm umożliwia nawet rozróżnienie molekuł o bardzo zbliżonym wzorze strukturalnym, takich jak likwiritigenina i 7,4'-dihydroksyflawon (ryc. 1.10). Można podejrzewać również, że szerokość i geometria tunelu prowadzącego do kieszeni - a szczególnie jego wejścia - determinować będzie rozmiar substratów transportera. Takie rozwiązanie - w postaci selekcji na wstępnym etapie - wydaje się praktyczne i efektywne, ponieważ w przeciwnym razie niepożądane związki dostające się do kieszeni centralnej mogłyby prowadzić do spowolnienia

lub inhibicji transportu. Elementy strukturalne w postaci tuneli prowadzących do ukrytych wewnątrz białek miejsc aktywnych oraz ograniczających dostęp tzw. bram zostały zidentyfikowane chociażby w grupie enzymów tworzonej przez cytochromy P450 (Cojocar et al., 2007; Schleinkofer et al., 2005; Winn et al., 2002). Tunele i bramy pełnią ważną rolę w enzymach, regulując dostęp substratów i rozpuszczalników do kieszeni, umożliwiając tym samym kontrolę katalizowanych reakcji. Z drugiej strony, wspomniane bramy są często przestrzennie oddalone od miejsca aktywnego, co zwiększa prawdopodobieństwo, że mutacje w ich obrębie nie uszkodzą katalitycznej funkcji białka, umożliwiając tym samym szybsze tempo ewolucji (Góra et al., 2013; Zawaira et al., 2011). Biorąc pod uwagę uzyskane w pracy wyniki, dokładna analiza tworzących wejście do tunelu aminokwasów stanowi obiecującą opcję kontynuacji badań. Co ciekawe, polimorficzny allel *pen3-6* koduje wariant białka AtABCG36 z pojedynczą zmianą silnie zachowawczej alaniny 1357 na walinę (A1357V), która znacząco wpływa na fenotyp roślin, przypuszczalnie poprzez zaburzenie transportu z udziałem tego transportera (Lu et al., 2015). A1357 odpowiada alaninie 1319 (A1319) w MtABCG46, która jest zlokalizowana na wewnątrzkomórkowym końcu helisy 11. Pomimo, iż aminokwas ten nie jest skierowany do środka, gdzie znajduje się tunel i kieszeń centralna, to podejrzewać można, że zmiana w obrębie tej pozycji wpłynęłaby na położenie helisy, zaburzając tym samym strukturę wejścia tunelu.

Przyjmując możliwość przeniknięcia molekuly do kieszeni centralnej za jedyny warunek skutecznego rozpoznania i translokacji, wyniki analizy dostępu z udziałem kwasu *p*-kumarowego sugerowałyby zdolność do transportowania tej molekuly przez wszystkie analizowane warianty MtABCG46 (natywne, F562L, F562A i F562Y). W rzeczywistości jedynie w przypadku wariantu białka o oryginalnej sekwencji zaobserwowano transport (ryc. 4.11). Z drugiej strony fakt, że nietransportowany przez F562L kwas *p*-kumarowy jest kompetytorem dla likwiritigeniny w takim samym stopniu jak w typie dzikim MtABCG46 (ryc. 4.12) pozwala przypuszczać, iż kwas *p*-kumarowy jest w stanie dotrzeć do kieszeni – co można powiązać z jego mniejszym rozmiarem w porównaniu do pozostałych analizowanych związków, a brak transportu spowodowany jest faktem, iż fenyloalanina 562 ma znaczenie również na dalszych etapach procesu rozpoznania i translokacji molekuł. Taka obserwacja sugeruje tym samym, iż selektywność transporterów ABCG jest aspektem wieloetapowym. Przeprowadzone analizy *in silico* pokazały, iż zmiana pojedynczego aminokwasu w obrębie kieszeni centralnej może wpłynąć na interakcje i wzajemną organizację tworzących ją wewnętrznych helis, tym samym zaburzając funkcjonowanie innych aminokwasów

kluczowych dla mechanizmu translokacji. Warto również pamiętać, iż obserwacje poczyniono jedynie w ramach konformacji skierowanej do wewnątrz.

Dzięki zastosowaniu dynamiki molekularnej zdołano zaobserwować również molekularne konsekwencje wprowadzonych modyfikacji w obrębie F562. W natywnym MtABCG46 wspomniana fenyloalanina tworzy niekowalencyjne oddziaływanie typu π -stacking z fenyloalaniną 684 (F684) (ryc. 4.21). F684 zlokalizowane jest w pętli nad TH5, która w HsABCG2 została opisana jako tzw. zawór. Postulowaną rolą tego elementu strukturalnego jest regulacja uwalniania molekuly transportowanej na zewnątrz (Khunweeraphong et al., 2019; Khunweeraphong & Kuchler, 2021). Co więcej, na podstawie dopasowania sekwencji ustalono, że kodowana przez polimorficzny allel *pen3-5* zmiana pojedynczego aminokwasu względem natywnego AtABCG36, L704F również zlokalizowana jest we wspomnianej pętli. Fenotyp roślin *pen3-5* wskazywał na rozłączenie zależnych od AtABCG36 funkcji, co można wyjaśnić zmianą specyficzności substratowej transportera (Lu et al., 2015). Tym samym, zidentyfikowane w obrębie MtABCG46 interakcje pomiędzy aminokwasami mogą stanowić potencjalne wyjaśnienie dla zaobserwowanego efektu tej mutacji. Brak oddziaływania typu π -stacking wiązania w wariancie F562A doprowadziło do reorganizacji helis tworzących kieszeń centralną. Pomimo braku pierścienia aromatycznego na tej pozycji w przypadku wariantu F562L, zmiana nie doprowadziła do destabilizacji TH5, co przypuszczalnie wynika z pozostałych słabych oddziaływań łańcucha bocznego. Co ciekawe, również w przypadku wariantu F562Y doszło do zmiany organizacji wewnętrznych helis transbłonowych. Wynikało to z tworzonego z Y1213 wiązania wodorowego, którego konsekwencją było między innymi zwężenie tunelu prowadzącego do kieszeni. Dodatkowo, we wszystkich przeprowadzonych symulacjach dynamiki molekularnej zaobserwowano wiązanie wodorowe tworzące się pomiędzy Y1213 a asparaginą w pozycji 1331. Biorąc pod uwagę iż wspomniana asparagina 1331 jest silnie zachowawczym (tab. 3.1) u roślinnych pełnych transporterów ABCG i zlokalizowanym w kieszeni centralnej polarnym aminokwasem przypuszczać można, iż zaburzenie jej funkcjonowania będzie miało wpływ na wiązanie się substratów w obrębie badanej kieszeni.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów biochemicznych oraz analiz filogenetycznych można przypuszczać, że adaptacja roślinnych białek ABCG znajduje odzwierciedlenie w zmienności w obrębie ważnych aminokwasów takich jak np. F562. Taka zmienność umożliwia ukształtowanie transporterów do pełnienia roli w zróżnicowanych

chemicznie scenariuszach umożliwiającym życie roślin na lądzie. Takim scenariuszem jest chociażby selektywna dystrybucja prekursorów w szlaku metabolicznym, czego przykładem jest zależny od MtABCG46 transport kwasu *p*-kumarowego i likwiritigeniny (Biała et al., 2017). Ponieważ w obrębie szlaku fenylopropanoidowego występują zarówno flawonoidy pełniące role w inicjacji i kontroli oddziaływań symbiotycznych (J. Zhang et al., 2009), jak również dedykowane reakcjom obronnym (np. szlak biosyntezy medikarpiny będącej fitoaleksyną *M. truncatula*) (Dixon et al., 2002), ewolucja precyzyjnych mechanizmów translokacji pokrewnych chemicznie związków jest istotna. Warto podkreślić, iż enzymy katalizujące reakcje w obrębie poszczególnych odgałęzień szlaków metabolicznych mogą być zorganizowane w postaci oddzielonych przestrzennie metabolonów tj. tymczasowych, funkcjonalnych kompleksów enzymatycznych, składających się z niekowalencyjnie związanych enzymów w danym szlaku metabolicznym. Przykładowo w roślinach maku lekarskiego (*Papaver somniferum*) wykazano komórkowo - specyficzną lokalizację kluczowych enzymów reprezentujących różne szlaki biosyntezy alkaloidów (Weid et al., 2004). Podobnie u *A. thaliana* poszczególne reakcje w biosyntezie glukozyolanów przeprowadzane są w obrębie różnych komórek (Fuchs et al., 2016; Nintemann et al., 2018). Biorąc to pod uwagę, modyfikacje selektywności białek ABCG odpowiedzialnych za dystrybucję prekursorów mają duży potencjał biotechnologiczny jako metody regulacji szlaków biosyntezy.

Wyspecjalizowany metabolizm roślinny jest źródłem związków chemicznych wykorzystywanych także jako fungicydy czy leki (Khan et al., 2022), co czyni bezpośrednio powiązane z nim transportery ABCG przedmiotem zainteresowania ze strony biotechnologów. Obecnie dla roślin wykorzystywanych do biosyntezy takich metabolitów prowadzone są badania, których celem jest identyfikacja transporterów zaangażowanych w poszczególne szlaki biosyntezy. Przykładem takiego transportera jest np. ABCG40 u *Artemisia annua*. Nadekspresja genu kodującego to białko wpływa na zawartość artemizyny - leku antymalarycznego – w roślinie (Fu et al., 2020). Poszukiwania białek ABCG są obecnie prowadzone chociażby w liniach zawieszinowych *Lithospermum erythrorhizon*, której kultury *in vitro* wykorzystywane są do produkcji alkaniny (H. Li et al., 2022; Yazaki et al., 1999). Potencjał mają także badania, których celem jest analizowanie skutków mutacji takich jak np. ta zidentyfikowana w ABCG37 z *A. thaliana*, skutkująca zmianą pojedynczego aminokwasu w obrębie drugiej domeny wiążącej nukleotyd (A1034T). Jej efektem jest zwiększona stabilność tego białka, a tym samym jego większa ilość w komórkach roślin, a w konsekwencji wydajniejszy transport będący udziałem takiego transportera (Ito & Gray, 2006). Efekt tej

mutacji jest powtarzalny i został wykorzystany dla zmiany stabilności transportera tryptolidu, PDR1 z *Tripterygium wilfordii* (Miao et al., 2021).

Warto pamiętać jednak iż, w przypadku większości zidentyfikowanych roślinnych transporterów ABCG wciąż nie poznano/opisano translokowanych przez nie endogennych substratów. To duże wyzwanie dla badań podstawowych. Analizy ekspresji genów lub dane metabolomiczne mogą pozwolić na wyłonienie potencjalnych kandydatów, metody te należy jednak traktować z ostrożnością (Lefèvre & Boutry, 2018). Przykładowo nadekspresja *ABCG40* u *Artemisia annua* pozytywnie wpłynęła na zawartość artemizyniny w roślinie, związku stosowanego w leczeniu malarii (Fu et al., 2020). Dalsze badania wykazały jednak, że transporter ten zaangażowany jest także w dystrybucję kwasu absycynowego, co pośrednio wpłynęło na biosyntezę tego metabolitu. Z kolei bezpośrednie badanie transportu z wykorzystaniem komórek lub pęcherzyków błonowych stanowi wyzwanie eksperymentalne. Pośrednio wynika to z faktu, iż większość substratów transporterów ABCG ma charakter hydrofobowy co w konsekwencji często stwarza trudności w analizie (Lefèvre & Boutry, 2018). Co ciekawe w przypadku części transporterów zaobserwowano stymulację aktywności ATPazowej pod wpływem obecności transportowanych molekuł (Herget et al., 2009; Kaur et al., 2016; Nyathi et al., 2010). W ostatnim czasie obserwacja ta została zaproponowana jako użyteczna metoda identyfikacji substratów ABCG1 z *Nicotiana tabacum* (Pierman et al., 2017). Pomiar aktywności ATPazowej jest prostszy w porównaniu do eksperymentów transportu i nie wymaga znacznych modyfikacji protokołu przy wykorzystywaniu różnych molekuł w związku z czym metoda potencjalnie może zostać wykorzystana do badań przesiewowych o dużej przepustowości. Powiązanie transportu ze stymulacją aktywności ATPazowej w przypadku podrodziny ABCG jak dotąd nie zostało jednak bezpośrednio zweryfikowane w oparciu o eksperymenty transportu. W związku z tym wykorzystano opracowany wokół MtABCG46 warsztat do zbadania tej relacji. W eksperymentach wykazano stymulację aktywności ATPazowej transportera w obecności likwiritigeniny. Co ciekawe, podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku kwasu *p*-kumarowego (ryc. 4.23). Na podstawie tych wyników można wnioskować, że translokacja molekuly nie jest w 100% skorelowana ze stymulacją aktywności transportera, a tym samym, że przy pomocy metody nie można w pełni wykluczyć, że badana molekula jest substratem. Nie mniej jednak opracowana metodyka z sukcesem posłużyła w badaniach nad innym pełnym roślinnym transporterem – ABCG36 z *Arabidopsis thaliana* (ryc. 4.24). Stymulację aktywności AtABCG36 zaobserwowano w obecności znanego substratu – kwasu indolilo-3-masłowego (IBA) oraz kamaleksyny, dostarczając pośredni

dowód na dystrybucję tej fitoaleksyny przez badane białko. Jednocześnie w obecności podobnych strukturalnie ale nietransportowanych kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz indolu nie zaobserwowano zwiększenia aktywności. W tym wypadku korelacja między indukcją a transportem jest duża. Warto w tym miejscu zaznaczyć iż badania skupione na wykorzystaniu testów stymulacji aktywności ATPazowej jako przesiewowej metody identyfikacji substratów transportu z udziałem białek ABCG są nadal kontynuowane w ramach projektu PRELUDIUM20 „Związek pomiędzy stymulacją aktywności ATPazowej a transportem na przykładzie selektywnego transportera ABCG z *Medicago truncatula*”.

6. Bibliografia

- Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., & Chang, G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, *323*(5922), 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1168750>
- Almén, M. S., Nordström, K. J. V., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2009). Mapping the human membrane proteome: A majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology*, *7*, 50. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-50>
- Al-Shawi, M. K., Polar, M. K., Omote, H., & Figler, R. A. (2003). Transition State Analysis of the Coupling of Drug Transport to ATP Hydrolysis by P-glycoprotein *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(52), 52629–52640. <https://doi.org/10.1074/JBC.M308175200>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. v. (2012). H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, *40*(1), 537–541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>
- Andolfo, G., Ruocco, M., di Donato, A., Frusciante, L., Lorito, M., Scala, F., & Ercolano, M. R. (2015). Genetic variability and evolutionary diversification of membrane ABC transporters in plants. *BMC Plant Biology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/S12870-014-0323-2>
- Aryal, B., Huynh, J., Schneuwly, J., Siffert, A., Liu, J., Alejandro, S., Ludwig-Müller, J., Martinoia, E., & Geisler, M. (2019). ABCG36/PEN3/PDR8 is an exporter of the auxin precursor, indole-3-butyric acid, and involved in auxin-controlled development. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00899>
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, *44*(1), 344–350. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW408>
- Austin Doyle, L., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.26.15665>

- Bailly, A., Bailly, A., Reckenholz-Tänikon, A., & Geisler, M. (2014). *Structure–Function of Plant ABC-Transporters*. 219–240. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06511-3_12
- Banasiak, J., Biała, W., Staszaków, A., Swarcewicz, B., Kępczyńska, E., Figlerowicz, M., & Jasiński, M. (2013). A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *Journal of Experimental Botany*, *64*(4), 1005–1015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers380>
- Banasiak, J., Borghi, L., Stec, N., Martinoia, E., & Jasiński, M. (2020). The Full-Size ABCG Transporter of *Medicago truncatula* Is Involved in Strigolactone Secretion, Affecting Arbuscular Mycorrhiza. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00018>
- Banasiak, J., & Jasiński, M. (2022). ATP-binding cassette transporters in nonmodel plants. *New Phytologist* *233*(4), 1597–1612. <https://doi.org/10.1111/nph.17779>
- Battey, J. N. D., Kopp, J., Bordoli, L., Read, R. J., Clarke, N. D., & Schwede, T. (2007). Automated server predictions in CASP7. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *69*(8), 68–82. <https://doi.org/10.1002/prot.21761>
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., & Schulze-Lefert, P. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, *323*(5910), 101–106. <https://doi.org/10.1126/science.1163732>
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraç, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.-C., Mé, J.-P., & Nawrath, C. (2011). A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters Is Required for the Formation of a Functional Cuticle in *Arabidopsis* W. *The Plant Cell*, *23*(5), 1958–1970. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083121>
- Biała, W., Banasiak, J., Jarzyniak, K., Pawela, A., & Jasiński, M. (2017). *Medicago truncatula* ABCG10 is a transporter of 4-coumarate and liquiritigenin in the medicarpin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, *68*(12), 3231–3241. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx059>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). *The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12*. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Brezovsky, J., Thirunavukarasu, A. S., Surpeta, B., Sequeiros-Borja, C. E., Mandal, N., Sarkar, D. K., Dongmo Fomthum, C. J., & Agrawal, N. (2022). TransportTools: A library for high-throughput analyses of internal voids in biomolecules and ligand transport through them. *Bioinformatics*, *38*(6), 1752–1753. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab872>

- Brodsky, K., Kutý, M., Pelantová, H., Cvačka, J., Rebroš, M., Kotik, M., Smatanová, I. K., Křen, V., & Bojarová, P. (2020). Dual substrate specificity of the rutinoidase from *Aspergillus niger* and the role of its substrate tunnel. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21165671>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., ... Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Busch, W., & Saier, M. H. (2002). The Transporter Classification (TC) system, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* *37*(5), 287–337. <https://doi.org/10.1080/10409230290771528>
- Carpenter, E. J., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Wu, S., Sun, J., Yu, J., Jimenez Vieira, F. R., Bowler, C., Dorrell, R. G., Gitzendanner, M. A., Li, L., Du, W., Ullrich, K., Wickett, N. J., Barkmann, T. J., Barker, M. S., Leebens-Mack, J. H., & Wong, G. K. S. (2019). Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). *GigaScience*, *8*(10). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz126>
- Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(5), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>
- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2013). ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. *Israel Journal of Chemistry*, *53*(3–4), 199–206. <https://doi.org/10.1002/ijch.201200096>
- Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J. F., Li, C., Yamaji, N., & Nevo, E. (2011). A functional cutin matrix is required for plant protection against water loss. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(9), 1297–1299. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.17507>
- Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J. F., Nawrath, C., Pourkheirandish, M., Tagiri, A., Hu, Y. G., Sameri, M., Li, X., Zhao, X., Liu, Y., Li, C., Ma, X., Wang, A., Nair, S., Wang, N., Miyao, A., Sakuma, S., Yamaji, N., ... Nevo, E. (2011). An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(30), 12354–12359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108444108>
- Chloupková, M., Pickert, A., Lee, J. Y., Souza, S., Trinh, Y. T., Connelly, S. M., Dumont, M. E., Dean, M., & Urbatsch, I. L. (2007). Expression of 25 human ABC transporters in the yeast *Pichia pastoris* and characterization of the purified ABCC3 ATPase activity. *Biochemistry*, *46*(27), 7992–8003. <https://doi.org/10.1021/bi700020m>

- Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., Gora, A., Sustr, V., Klvana, M., Medek, P., Biedermannova, L., Sochor, J., & Damborsky, J. (2012). CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Computational Biology*, *8*(10), e1002708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708>
- Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G., & Ausubel, F. M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, *323*(5910), 95–101. <https://doi.org/10.1126/science.1164627>
- Cojocaru, V., Winn, P. J., & Wade, R. C. (2007). The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1770*(3), 390-401. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.005>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, *14*(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Crouzet, J., Roland, J., Peeters, E., Trombik, T., Ducos, E., Nader, J., & Boutry, M. (2013). NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Molecular Biology*, *82*(1), 181–192. <https://doi.org/10.1007/S11103-013-0053-0>
- Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, Å. S., & Boutry, M. (2006). Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Letters*, *580*(4), 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.12.043>
- Cunningham, B. C., & Wells, J. A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, *244*(4908), 1081–1085. <https://doi.org/10.1126/science.2471267>
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, *133*(2), 462–469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>
- D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozel, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T. A. D., R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, Y. H., S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. J., Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R., Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. S.-, & Ferrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D. M. Y. and P. A. K. (2020). *AMBER 20*. University of California. <http://ambermd.org/>
- Davidson, A. L., Shuman, H. A., & Nikaido, H. (1992). Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: Transmembrane signaling by periplasmic binding proteins (ATPase/uncoupling). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(6), 2360-2364. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2360>
- Dawson, R. J. P., & Locher, K. P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, *443*(7108), 180–185. <https://doi.org/10.1038/NATURE05155>

- de Juan, D., Pazos, F., & Valencia, A. (2013). Emerging methods in protein co-evolution. *Nature Reviews Genetics*, *14*(4), 249–261. <https://doi.org/10.1038/nrg3414>
- Delano, W. L. (2002). *The PyMOL molecular graphics system*. <http://www.pymol.org>.
- Demessie, Z., Woolfson, K. N., Yu, F., Qu, Y., & de Luca, V. (2017). The ATP binding cassette transporter, VmTPT2/VmABCG1, is involved in export of the monoterpenoid indole alkaloid, vincamine in *Vinca minor* leaves. *Phytochemistry*, *140*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2017.04.019>
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, *3*(5), 371–390. <https://doi.org/10.1046/J.1364-3703.2002.00131.X>
- Dixon, R. A., Liu, C., & Jun, J. H. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.07.004>
- Dixon, R. A., & Pasinetti, G. M. (2010). Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiology*, *154*(2), 453–457. <https://doi.org/10.1104/PP.110.161430>
- Do, T. H. T., Martinoia, E., Lee, Y., & Hwang, J. U. (2021). 2021 update on ATP-binding cassette (ABC) transporters: How they meet the needs of plants. *Plant Physiology*, *187*(4), 1876–1892. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab193>
- Dobson, L., Reményi, I., & Tusnády, G. E. (2015). CCTOP: A Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Research*, *43*(1), 408–412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, *43*(1), 389–394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Egner, R., Rosenthal, F. E., Kralli, A., Sanglard, D., & Kuchler, K. (1998). Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast PDr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Molecular Biology of the Cell*, *9*(2), 523–543. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.2.523>
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, *299*(5881), 371–374. <https://doi.org/10.1038/299371a0>
- Ernst, R., Kueppers, P., Klein, C. M., Schwarzmüller, T., Kuchler, K., Schmitt, L., & Kaback, H. R. (2008). A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(13), 5069–5074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800191105>

- Ernst, R., Kueppers, P., Stindt, J., Kuchler, K., & Schmitt, L. (2010). Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps—first come, first served? *FEBS Journal*, 277(3), 540–549. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.07485.X>
- Fabre, G., Garroum, I., Mazurek, S., Daraspe, J., Mucciolo, A., Sankar, M., Humbel, B. M., & Nawrath, C. (2016). The ABCG transporter PEC1/ABCG32 is required for the formation of the developing leaf cuticle in Arabidopsis. *New Phytologist*, 209(1), 192–201. <https://doi.org/10.1111/nph.13608>
- Fu, X., Liu, H., Hassani, D., Peng, B., Yan, X., Wang, Y., Wang, C., Li, L., Liu, P., Pan, Q., Zhao, J., Qian, H., Sun, X., & Tang, K. (2020). AaABCG40 Enhances Artemisinin Content and Modulates Drought Tolerance in *Artemisia annua*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 950. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00950>
- Fuchs, R., Kopsischke, M., Klapprodt, C., Hause, G., Meyer, A. J., Schwarzländer, M., Fricker, M. D., & Lipka, V. (2016). Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(1), 130–145. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00887>
- Garroum, I., Bidzinski, P., Daraspe, J., Mucciolo, A., Humbel, B. M., Morel, J.-B., & Nawrath, C. (2016). Cuticular Defects in *Oryza sativa* ATP-binding Cassette Transporter G31 Mutant Plants Cause Dwarfism, Elevated Defense Responses and Pathogen Resistance. *Plant and Cell Physiology*, 57(6), 1179–1188. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw066>
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
- Golin, J., & Ambudkar, S. v. (2015). The multidrug transporter Pdr5 on the 25th anniversary of its discovery: An important model for the study of asymmetric ABC transporters. *Biochemical Journal*, 467(3), 353–363. <https://doi.org/10.1042/BJ20150042>
- Golin, J., Ambudkar, S. v., Gottesman, M. M., Habib, A. D., Sczepanski, J., Ziccardi, W., & May, L. (2003). Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5963–5969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210908200>
- Gose, T., Shafi, T., Fukuda, Y., Das, S., Wang, Y., Allcock, A., Gavan McHarg, A., Lynch, J., Chen, T., Tamai, I., Shelat, A., Ford, R. C., & Schuetz, J. D. (2020). ABCG2 requires a single aromatic amino acid to “clamp” substrates and inhibitors into the binding pocket. *FASEB Journal*, 34(4), 4890–4903. <https://doi.org/10.1096/fj.201902338RR>
- Gowers, R., Linke, M., Barnoud, J., Reddy, T., Melo, M., Seyler, S., Domański, J., Dotson, D., Buchoux, S., Kenney, I., & Beckstein, O. (2016). MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Proceedings of the 15th Python in Science Conference*, 98–105. <https://doi.org/10.25080/majora-629e541a-00e>

- Hao, P., Xia, J., Liu, J., diDonato, M., Pakula, K., Bailly, A., Jasinski, M., & Geisler, M. (2020). Auxin-transporting ABC transporters are defined by a conserved D/EP motif regulated by a prolyl isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(37), 13094–13105. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014104>
- Harris, A., Wagner, M., Du, D., Raschka, S., Nentwig, L. M., Gohlke, H., Smits, S. H. J., Luisi, B. F., & Schmitt, L. (2021). Structure and efflux mechanism of the yeast pleiotropic drug resistance transporter Pdr5. *Nature Communications*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25574-8>
- Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3429–3444. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERR430>
- He, Y., Xu, J., Wang, X., He, X., Wang, Y., Zhou, J., Zhang, S., & Meng, X. (2019). The arabidopsis pleiotropic drug resistance transporters PEN3 and PDR12 mediate camalexin secretion for resistance to botrytis cinerea. *Plant Cell*, *31*(9), 2206–2222. <https://doi.org/10.1105/TPC.19.00239>
- Hegedűs, T., Geisler, M., Lukács, G. L., & Farkas, B. (2022). Ins and outs of AlphaFold2 transmembrane protein structure predictions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*(1), 73. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04112-1>
- Heinig, M., & Frishman, D. (2004). STRIDE: A web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, *32*(WEB SERVER ISS.), W500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh429>
- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, *5*(10), 446–451. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01740-4)
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., & Loening, S. A. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, *25*(19), 3957–3958. <https://doi.org/10.1093/nar/25.19.3957>
- Herget, M., Kreißig, N., Kolbe, C., Schölz, C., Tampe, R., & Abele, R. (2009). Purification and reconstitution of the antigen transport complex TAP. A prerequisite determination of peptide stoichiometry and ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(49), 33740–33749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047779>
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Research in microbiology*, *152*(3-4), 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01193-7)
- Hofmann, S., Janulienė, D., Mehdipour, A. R., Thomas, C., Stefan, E., Brüchert, S., Kuhn, B. T., Geertsma, E. R., Hummer, G., Tampé, R., & Moeller, A. (2019). Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions. *Nature*, *571*(7766), 580–583. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1391-0>
- Hollenstein, K., Frei, D. C., & Locher, K. P. (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, *446*(7132), 213–216. <https://doi.org/10.1038/nature05626>

- Huang, Y. J., Mao, B., Aramini, J. M., & Montelione, G. T. (2014). Assessment of template-based protein structure predictions in CASP10. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(2), 43–56. <https://doi.org/10.1002/prot.24488>
- Hunke, S., Dröse, S., & Schneider, E. (1995). Vanadate and bafilomycin A1 are potent inhibitors of the ATPase activity of the reconstituted bacterial ATP-Binding Cassette transporter for maltose (MalFGK2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216(2), 589–594. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2663>
- Hwang, J. U., Song, W. Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K., Palmgren, M., Yoon, H. S., Martinoia, E., & Lee, Y. (2016). Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. *Molecular Plant*, 9(3), 338–355. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.02.003>
- Ito, H., & Gray, W. M. (2006). A gain-of-function mutation in the arabidopsis pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiology*, 142(1), 63–74. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084533>
- Izadi, S., Anandkrishnan, R., & Onufriev, A. v. (2014). Building Water Models: A Different Approach. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5(21), 3863–3871. <https://doi.org/10.1021/jz501780a>
- Jackson, S. M., Manolaridis, I., Kowal, J., Zechner, M., Taylor, N. M. I., 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. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(4), 333–340. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0049-1>
- Jarzyniak, K., Banasiak, J., Jamruszka, T., Pawela, A., di Donato, M., Novák, O., Geisler, M., & Jasiński, M. (2021). Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins. *Nature Plants*, 7(4), 428–436. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00873-6>
- Jasinski, M., Stukkens, Y., Degand, H., Purnelle, B., Marchand-Brynaert, J., & Boutry, M. (2001). A Plant Plasma Membrane ATP Binding Cassette-Type Transporter Is Involved in Antifungal Terpenoid Secretion. *The Plant Cell*, 13(5), 1095–1107. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.5.1095>
- Jin, M. S., Oldham, M. L., Zhang, Q., & Chen, J. (2012). Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 490(7421), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature11448>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Johnson, Z. L., & Chen, J. (2017). Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell*, 168(6), 1075–1085.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.01.041>

- Jones, P. M., O'Mara, M. L., & George, A. M. (2009). ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences*, *34*(10), 520–531. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2009.06.004>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kamisetty, H., Ovchinnikov, S., & Baker, D. (2013). Assessing the utility of coevolution-based residue–residue contact predictions in a sequence- and structure-rich era. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(39), 15674–15679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314045110>
- Kang, J., Hwang, J. U., Lee, M., Kim, Y. Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 2355–2360. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909222107>
- Kapoor, P., Horsey, A. J., Cox, M. H., & Kerr, I. D. (2018). ABCG2: Does resolving its structure elucidate the mechanism? *Biochemical Society Transactions*, *46*(6), 1485–1494. <https://doi.org/10.1042/BST20180145>
- Kapusta, I. (2009). Medicago truncatula-model plant for the study of legume metabolomics (Fabaceae). *Biotechnologia*, *1*(84), 119–131.
- Kaur, H., Lakatos-Karoly, A., Vogel, R., Nöll, A., Tampé, R., & Glaubitz, C. (2016). Coupled ATPase-adenylate kinase activity in ABC transporters. *Nature Communications*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms13864>
- Khan, A., Moni, S. S., Ali, M., Mohan, S., Jan, H., Rasool, S., Kamal, M. A., Alshahrani, S., Halawi, M., & Alhazmi, H. A. (2022). Antifungal Activity of Plant Secondary Metabolites on *Candida albicans*: An Updated Review. *Current Molecular Pharmacology*, *15*. <https://doi.org/10.2174/1874467215666220304143332>
- Khare, D., Choi, H., Huh, S. U., Bassin, B., Kim, J., Martinoia, E., Sohn, K. H., Paek, K. H., Lee, Y., & Chrispeels, M. J. (2017). Arabidopsis ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(28), E5712–E5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702259114>
- Khunweeraphong, N., & Kuchler, K. (2021). Multidrug resistance in mammals and fungi—from mdr to pdr: A rocky road from atomic structures to transport mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22094806>
- Khunweeraphong, N., Mitchell-White, J., Szöllösi, D., Hussein, T., Kuchler, K., Kerr, I. D., Stockner, T., & Lee, J. Y. (2020). Picky ABCG5/G8 and promiscuous ABCG2 - a tale of fatty diets and drug toxicity. *FEBS Letters*, *594*(23), 4035–4058. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13938>

- Khunweeraphong, N., Stockner, T., & Kuchler, K. (2017). The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>
- Khunweeraphong, N., Szöllösi, D., Stockner, T., & Kuchler, K. (2019). The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid. *Nature Communications*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13302-2>
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *The Plant Journal*, 50(2), 207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03044.x>
- Kobae, Y., Sekino, T., Yoshioka, H., Nakagawa, T., Martinoia, E., & Maeshima, M. (2006). Loss of AtPDR8, a Plasma Membrane ABC Transporter of Arabidopsis thaliana, Causes Hypersensitive Cell Death Upon Pathogen Infection. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 309–318. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj001>
- Kodan, A., Yamaguchi, T., Nakatsu, T., Sakiyama, K., Hipolito, C. J., Fujioka, A., Hirokane, R., Ikeguchi, K., Watanabe, B., Hiratake, J., Kimura, Y., Suga, H., Ueda, K., & Kato, H. (2014). Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4049–4054. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1321562111>
- Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillion, J. P., Konings, W. N., & Goffeau, A. (1996). Anticancer Drugs, Ionophoric Peptides, and Steroids as Substrates of the Yeast Multidrug Transporter Pdr5p *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31543–31548. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.49.31543>
- Kowal, J., Ni, D., Jackson, S. M., Manolaridis, I., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2021). Structural Basis of Drug Recognition by the Multidrug Transporter ABCG2. *Journal of Molecular Biology*, 433(13). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166980>
- Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L. L., & Keller, B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919), 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Krattinger, S. G., Sucher, J., Selter, L. L., Chauhan, H., Zhou, B., Tang, M., Upadhyaya, N. M., Mieulet, D., Guiderdoni, E., Weidenbach, D., Schaffrath, U., Lagudah, E. S., & Keller, B. (2016). The wheat durable, multipathogen resistance gene Lr34 confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 14(5), 1261–1268. <https://doi.org/10.1111/PBI.12491>
- Kretschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J. B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H. J., & Martinoia, E. (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483(7389), 341–344. <https://doi.org/10.1038/nature10873>
- Kuhlman, B. (2019). Designing protein structures and complexes with the molecular modeling program Rosetta. *Journal of Biological Chemistry*, 294(50), 19436–19443. <https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.008144>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larsson, C., Widell, S., & Kjellbom, P. (1987). Preparation of High-Purity Plasma Membranes. *Methods in Enzymology*, 148, 558–568. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0076687987480543>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- le Grand, S., Götz, A. W., & Walker, R. C. (2013). SPFP: Speed without compromise - A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications*, 184(2), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2012.09.022>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Lee, J., Hitzengerger, M., Rieger, M., Kern, N. R., Zacharias, M., & Im, W. (2020). CHARMM-GUI supports the Amber force fields. *Journal of Chemical Physics*, 153(3), 035103. <https://doi.org/10.1063/5.0012280>
- Lee, J. S., Scala, S., Matsumoto, Y., Dickstein, B., Robey, R., Zhan, Z., Altenberg, G., & Bates, S. E. (1997). *Reduced Drug Accumulation and Multidrug Resistance in Human Breast Cancer Cells Without Associated P-Glycoprotein or MRP Overexpression*.
- Lee, J. Y., Kinch, L. N., Borek, D. M., Wang, J., Wang, J., Urbatsch, I. L., Xie, X. S., Grishin, N. v., Cohen, J. C., Otwinowski, Z., Hobbs, H. H., & Rosenbaum, D. M. (2016). Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature*, 533(7604), 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature17666>
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E. W., & Lee, Y. (2005). AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 827–836. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058107>
- Leebens-Mack, J. H., Barker, M. S., Carpenter, E. J., Deyholos, M. K., Gitzendanner, M. A., Graham, S. W., Grosse, I., Li, Z., Melkonian, M., Mirarab, S., Porsch, M., Quint, M., Rensing, S. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Stevenson, D. W., Ullrich, K. K., Wickett, N. J., DeGironimo, L., ... Wong, G. K. S. (2019). One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature*, 574(7780), 679–685. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1693-2>
- Lefèvre, F., & Boutry, M. (2018). Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. In *Plant Physiology*, 178(1), 18–39. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00325>

- Leppert, G., Mcdevitt, R., Falco, S. Carl, van Dyk, T. K., Ficke, M. B., & Golin, J. (1990). Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics*, *125*(1), 13-20. <https://doi.org/10.1093/genetics/125.1.13>
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, *58*(9), 876–888. <https://doi.org/10.1002/PS.566>
- Li, H., Matsuda, H., Tsuboyama, A., Munakata, R., Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2022). Inventory of ATP-binding cassette proteins in *Lithospermum erythrorhizon* as a model plant producing divergent secondary metabolites. *DNA Research*, *29*(3). <https://doi.org/10.1093/dnares/dsac016>
- Li, L., Li, D., Liu, S., Ma, X., Dietrich, C. R., Hu, H.-C., Zhang, G., Liu, Z., Zheng, J., Wang, G., & Schnable, P. S. (2013). The Maize glossy13 Gene, Cloned via BSR-Seq and Seq-Walking Encodes a Putative ABC Transporter Required for the Normal Accumulation of Epicuticular Waxes. *PLoS ONE*, *8*(12), e82333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082333>
- Licht, A., & Schneider, E. (2011). ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology*, *6*(5), 785–801. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0054-4>
- Linton, K. J., & Higgins, C. F. (1998). *The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins*. *Molecular microbiology*, *28*(1), 5-13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00764.x>
- Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D. C., & Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*, *169*(1), 85-95.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.024>
- Locher, K. P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. In *Nature Structural and Molecular Biology*, *23*(6), 487–493. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3216>
- Locher, K. P., Lee, A. T., & Rees, D. C. (2002). The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, *296*(5570), 1091–1098. <https://doi.org/10.1126/science.1071142>
- Lopez-Ortiz, C., Dutta, S. K., Natarajan, P., Peña-Garcia, Y., Abburi, V., Saminathan, T., Nimmakayala, P., & Reddy, U. K. (2019). Genome-wide identification and gene expression pattern of ABC transporter gene family in *Capsicum* spp. *PLoS ONE*, *14*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0215901>
- Lozovaya, V. v., Lygin, A. v., Zernova, O. v., Li, S., Hartman, G. L., & Widholm, J. M. (2004). Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(7–8), 671–679. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2004.06.007>

- Lu, X., Dittgen, J., Pislewska-Bednarek, M., Molina, A., Schneider, B., Svatos, A., Doubsky, J., Schneeberger, K., Weigel, D., Bednarek, P., & Schulze-Lefert, P. (2015). Mutant allele-specific uncoupling of penetration3 functions reveals engagement of the ATP-binding cassette transporter in distinct tryptophan metabolic pathways. *Plant Physiology*, *168*(3), 814–827. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00182>
- Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., 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*(7731), 426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0680-3>
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., & Schwede, T. (2013). IDDT: A local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*, *29*(21), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>
- Marks, D. S., Hopf, T. A., & Sander, C. (2012). Protein structure prediction from sequence variation. In *Nature Biotechnology*, *30*(11), 1072–1080. <https://doi.org/10.1038/nbt.2419>
- Marques, S. M., Bednar, D., & Damborsky, J. (2019). Computational study of protein-ligand unbinding for enzyme engineering. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 650. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00650>
- Martínez, M., López-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., Bachmann, S. P., Perea, S., Ruesga, M. T., & Patterson, T. F. (2002). Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(3), 515–524. <https://doi.org/10.1093/JAC/49.3.515>
- Matern, A., Böttcher, C., Eschen-Lippold, L., Westermann, B., Smolka, U., Döll, S., Trempel, F., Aryal, B., Scheel, D., Geisler, M., & Rosahl, S. (2019). A substrate of the ABC transporter PEN3 stimulates bacterial flagellin (flg22)-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(17), 6857–6870. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007676>
- 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., ... Shinomiya, N. (2009). Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: A function-based genetic analysis in a Japanese population. *Science Translational Medicine*, *1*(5). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000237>
- Mcfarlane, H. E., Shin, J. J. H., Bird, D. A., & Samuels, A. L. (2010). Arabidopsis ABCG Transporters, Which Are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations W. *The Plant Cell*, *22*(9), 3066–3075. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077974>
- Meagher, K. L., Redman, L. T., & Carlson, H. A. (2003). Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, *24*(9), 1016–1025. <https://doi.org/10.1002/jcc.10262>

- Miao, G., Han, J., Huo, Y. bo, Wang, C. run, & Wang, S. chang. (2021). Identification and functional characterization of a PDR transporter in *Tripterygium wilfordii* Hook.f. that mediates the efflux of triptolide. *Plant Molecular Biology*, *106*(1–2), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01134-y>
- Michaud-Agrawal, N., Denning, E. J., Woolf, T. B., & Beckstein, O. (2011). MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *32*(10), 2319–2327. <https://doi.org/10.1002/jcc.21787>
- Mishra, A. K., Choi, J., Rabbee, M. F., Baek, K. H., & Shavrukov, Y. (2019). In Silico Genome-Wide Analysis of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene Family in Soybean (*Glycine max* L.) and Their Expression Profiling. *BioMed Research International*, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/8150523>
- Moeller, A., Lee, S. C., Tao, H., Speir, J. A., Chang, G., Urbatsch, I. L., Potter, C. S., Carragher, B., & Zhang, Q. (2015). Distinct Conformational Spectrum of Homologous Multidrug ABC Transporters. *Structure*, *23*(3), 450–460. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2014.12.013>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morsomme, P., Dambly, S., Maudoux, O., & Boutry, M. (1998). Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(52), 34837–34842. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34837>
- Murata, K., & Wolf, M. (2018). Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1862*(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.07.020>
- Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
- Nadal, M., & Paszkowski, U. (2013). Polyphony in the rhizosphere: presymbiotic communication in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.06.005>
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *International Review of Cytology*, *132*(C), 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62452-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62452-3)
- Naoumkina, M., Farag, M. A., Sumner, L. W., Tang, Y., Liu, C. J., & Dixon, R. A. (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(46), 17909–17915. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0708697104>

- Naoumkina, M., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, *11*(6), 829–846. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2010.00648.X>
- Nguyen, K. H., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., & Tomasi, S. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural Product Reports*, *30*(12), 1490–1508. <https://doi.org/10.1039/C3NP70064J>
- Nintemann, S. J., Hunziker, P., Andersen, T. G., Schulz, A., Burow, M., & Halkier, B. A. (2018). Localization of the glucosinolate biosynthetic enzymes reveals distinct spatial patterns for the biosynthesis of indole and aliphatic glucosinolates. *Physiologia Plantarum*, *163*(2), 138–154. <https://doi.org/10.1111/ppl.12672>
- Nyathi, Y., Lousa, C. D. M., van Roermund, C. W., Wanders, R. J. A., Johnson, B., Baldwin, S. A., Theodoulou, F. L., & Baker, A. (2010). The Arabidopsis peroxisomal ABC transporter, comatose, complements the *Saccharomyces cerevisiae* pxa1 pxa2Δ mutant for metabolism of long-chain fatty acids and exhibits fatty Acyl-CoA-stimulated ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(39), 29892–29902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151225>
- Oldham, M. L., Khare, D., Quijcho, F. A., Davidson, A. L., & Chen, J. (2007). Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, *450*(7169), 515–521. <https://doi.org/10.1038/nature06264>
- Orlando, B. J., & Liao, M. (2020). ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16155-2>
- Oswald, C., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters: What can structures tell us? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *372*(6), 385–399. <https://doi.org/10.1007/S00210-005-0031-4>
- Ovchinnikov, S., Kamisetty, H., & Baker, D. (2014). Robust and accurate prediction of residue-residue interactions across protein interfaces using evolutionary information. *eLife*, *2014*(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.02030>
- Papadopoulou, A., Meierhofer, J., Meyer, F., Hayashi, T., Schneider, S., Sager, E., & Buller, R. (2021). Re-Programming and Optimization of a L-Proline cis-4-Hydroxylase for the cis-3-Halogenation of its Native Substrate. *ChemCatChem*, *13*(18), 3914–3919. <https://doi.org/10.1002/cctc.202100591>
- Payen, L., Gao, M., Westlake, C., Theis, A., ... S. C.-M., & 2005, undefined. (2005). Functional interactions between nucleotide binding domains and leukotriene C4 binding sites of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Molecular pharmacology*, *67*(6), 1944–1953. <https://doi.org/10.1124/mol.104.007708>
- Phillips, R., & Stephen R. Quake. (2006). The biological frontier of physics. *Physics Today*, *59*(5), 38–43.
- Phoenix, D. A., & Harris, F. (2002). The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures (review). *Molecular Membrane Biology*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09687680110103631>

- Pierman, B., Toussaint, F., Bertin, A., Lévy, D., Smargiasso, N., de Pauw, E., & Boutry, M. (2017). Activity of the purified plant ABC transporter NtPDR1 is stimulated by diterpenes and sesquiterpenes involved in constitutive and induced defenses. *Journal of Biological Chemistry*, 292(47), 19491–19502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811935>
- Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K. P., & Rees, D. C. (2007). An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science*, 315(5810), 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1133488>
- Prasad, R., & Goffeau, A. (2012). Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance. *Annual review of microbiology*, 66, 39-63. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-092611-150111>
- Qian, H., Zhao, X., Cao, P., Lei, J., Yan, N., & Gong, X. (2017). Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell*, 169(7), 1228-1239.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.05.020>
- Rawal, M. K., Khan, M. F., Kapoor, K., Goyal, N., Sen, S., Saxena, A. K., Lynn, A. M., Tyndall, J. D. A., Monk, B. C., Cannon, R. D., Komath, S. S., & Prasad, R. (2013). Insight into pleiotropic drug resistance ATP-binding cassette pump drug transport through mutagenesis of Cdr1p transmembrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), 24480–24493. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.488353>
- Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: The power to change. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>
- Rin, S., Mizuno, Y., Shibata, Y., Fushimi, M., Katou, S., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K., & Takemoto, D. (2017). EIN2-mediated signaling is involved in pre-invasion defense in *Nicotiana benthamiana* against potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Plant Signaling and Behavior*, 12(4), e1300733. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1300733>
- Risk, J. M., Selter, L. L., Chauhan, H., Krattinger, S. G., Kumlehn, J., Hensel, G., Viccars, L. A., Richardson, T. M., Buesing, G., Troller, A., Lagudah, E. S., & Keller, B. (2013). The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. *Plant Biotechnology Journal*, 11(7), 847–854. <https://doi.org/10.1111/PBI.12077>
- Roe, D. R., & Cheatham, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., & Goffeau, A. (2001). The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), 207-214.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>

- Ruocco, M., Ambrosino, P., Lanzuise, S., Woo, S. L., Lorito, M., & Scala, F. (2011). Four potato (*Solanum tuberosum*) ABCG transporters and their expression in response to abiotic factors and *Phytophthora infestans* infection. *Journal of Plant Physiology*, *168*(18), 2225–2233. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.07.008>
- Růžicka, K., Strader, L. C., Bailly, A., Yang, H., Blakeslee, J., Langowski, Ł., Nejedlá, E., Fujita, H., Itoh, H., Syono, K., Hejác̃ko, J., Gray, W. M., Martinoia, E., Geisler, M., Bartel, B., Murphy, A. S., & Friml, J. (2010). Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(23), 10749–10753. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1005878107>
- Saison, C., Helias, V., Ballif, B. A., Peyrard, T., Puy, H., Miyazaki, T., Perrot, S., Vayssier-Taussat, M., Waldner, M., le Pennec, P. Y., Cartron, J. P., & Arnaud, L. (2012). Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nature Genetics*, *44*(2), 174–177. <https://doi.org/10.1038/ng.1070>
- Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Inagaki, Y., & Ichinose, Y. (2002). cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Letters*, *518*(1–3), 164–168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02697-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02697-2)
- Sasse, J., Schlegel, M., Borghi, L., Ullrich, F., Lee, M., Liu, G. W., Giner, J. L., Kayser, O., Bigler, L., Martinoia, E., & Kretschmar, T. (2016). *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes. *Plant Cell and Environment*, *39*(12), 2725–2739. <https://doi.org/10.1111/PCE.12828>
- Schleinkofer, K., Winn, P. J., Lüdemann, S. K., & Wade, R. C. (2005). Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling?. *EMBO reports*, *6*(6), 584–589. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400420>
- Schnippenkoetter, W., Lo, C., Liu, G., Dibley, K., Chan, W. L., White, J., Milne, R., Zwart, A., Kwong, E., Keller, B., Godwin, I., Krattinger, S. G., & Lagudah, E. (2017). The wheat Lr34 multipathogen resistance gene confers resistance to anthracnose and rust in sorghum. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(11), 1387–1396. <https://doi.org/10.1111/PBI.12723>
- Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry*, *50*(1), 161–178. <https://doi.org/10.1042/BSE0500161>
- Shibata, Y., Ojika, M., Sugiyama, A., Yazaki, K., Jones, D. A., Kawakita, K., & Takemoto, D. (2016). The full-size ABCG transporters Nb-ABCG1 and Nb-ABCG2 function in pre- and postinvasion defense against *phytophthora infestans* in *nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, *28*(5), 1163–1181. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00721>
- Shintre, C. A., Pike, A. C. W., Li, Q., Kim, J. I., Barr, A. J., Goubin, S., Shrestha, L., Yang, J., Berridge, G., Ross, J., Stansfeld, P. J., Sansom, M. S. P., Edward, A. M., Bountra, C., Marsden, B. D., von Delft, F., Bullock, A. N., Gileadi, O., Burgess-Brown, N. A., & Carpenter, E. P. (2013). Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- And nucleotide-bound states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 9710–9715. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1217042110>

- Shukla, S., Rai, V., Banerjee, D., & Prasad, R. (2006). Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: Purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis. *Biochemistry*, *45*(7), 2425–2435.
<https://doi.org/10.1021/bi0519147>
- Siarheyeva, A., Liu, R., & Sharom, F. J. (2010). Characterization of an Asymmetric Occluded State of P-glycoprotein with Two Bound Nucleotides: IMPLICATIONS FOR CATALYSIS *. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7575–7586.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109.047290>
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., & Burgyán, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*, *21*(12), 3070–3080.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf312>
- Song, W.-Y., Park, J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., & Martinoia, E. (2014). *ABC Transporters and Heavy Metals* (1–17). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06511-3_1
- Srinivasan, V., Pierik, A. J., & Lill, R. (2014). Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science*, *343*(6175), 1137–1140. <https://doi.org/10.1126/science.1246729>
- Stein, M., Dittgen, J., Sánchez-Rodríguez, C., Hou, B. H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., & Somerville, S. (2006). Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *The Plant Cell*, *18*(3), 731–746.
<https://doi.org/10.1105/TPC.105.038372>
- Strader, L. C., & Bartel, B. (2009). The Arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP Binding Cassette Transporter Modulates Sensitivity to the Auxin Precursor Indole-3-Butyric Acid C W. *The Plant Cell*, *21*(7), 1992–2007.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.065821>
- Stukkens, Y., Bultreys, A., Grec, S., Trombik, T., Vanham, D., & Boutry, M. (2005). NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiology*, *139*(1), 341–352. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062372>
- Sucher, J., Boni, R., Yang, P., Rogowsky, P., Büchner, H., Kastner, C., Kumlehn, J., Krattinger, S. G., & Keller, B. (2017). The durable wheat disease resistance gene Lr34 confers common rust and northern corn leaf blight resistance in maize. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(4), 489–496. <https://doi.org/10.1111/PBI.12647>
- Sun, Y., Wang, J., Long, T., Qi, X., Donnelly, L., Elghobashi-Meinhardt, N., Esparza, L., Cohen, J. C., Xie, X. S., Hobbs, H. H., & Li, X. (2021). Molecular basis of cholesterol efflux via ABCG subfamily transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(34) e2110483118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2110483118>

- Tai, C.-H., Bai, H., Taylor, T. J., & Lee, B. (2014). Assessment of template-free modeling in CASP10 and ROLL. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82, 57–83. <https://doi.org/10.1002/prot.24470>
- Tanabe, K., Lamping, E., Nagi, M., Okawada, A., Holmes, A. R., Miyazaki, Y., Cannon, R. D., Monk, B. C., & Niimi, M. (2011). Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Molecular Microbiology*, 82(2), 416–433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07820.x>
- Tarr, P. T., Tarling, E. J., Bojanic, D. D., Edwards, P. A., & Baldán, Á. (2009). Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 584–593. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2009.01.007>
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Thomas, C., Aller, S. G., Beis, K., Carpenter, E. P., Chang, G., Chen, L., Dassa, E., Dean, M., Duong Van Hoa, F., Ekiert, D., Ford, R., Gaudet, R., Gong, X., Holland, I. B., Huang, Y., Kahne, D. K., Kato, H., Koronakis, V., Koth, C. M., ... Tampé, R. (2020). Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters. *FEBS Letters*, 594(23), 3767–3775. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13935>
- Tian, C., Kasavajhala, K., Belfon, K. A. A., Raguette, L., Huang, H., Miguez, A. N., Bickel, J., Wang, Y., Pincay, J., Wu, Q., & Simmerling, C. (2020). Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(1), 528–552. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>
- Toussaint, F., Pierman, B., Bertin, A., Lévy, D., & Boutry, M. (2017). Purification and biochemical characterization of NpABCG5/NpPDR5, a plant pleiotropic drug resistance transporter expressed in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension cells. *Biochemical Journal*, 474(10), 1689–1703. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170108>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsai, M. F., Jih, K. Y., Shimizu, H., Li, M., & Hwang, T. C. (2010). Optimization of the degenerated interfacial ATP binding site improves the function of disease-related mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) channels. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37663–37671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172817>
- Urbatsch, I. L., Gimi, K., Wilke-Mounts, S., & Senior, A. E. (2000). Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 39(39), 11921–11927. <https://doi.org/10.1021/bi001220s>

- 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. *Molecular and Cellular Biology*, 27(4), 1247–1253. <https://doi.org/10.1128/MCB.01621-06>
- Vavra, O., Filipovic, J., Plhak, J., Bednar, D., Marques, S. M., Brezovsky, J., Stourac, J., Matyska, L., & Damborsky, J. (2019). CaverDock: a molecular docking-based tool to analyse ligand transport through protein tunnels and channels. *Bioinformatics*, 35(23), 4986–4993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz386>
- Verhalen, B., Dastvan, R., Thangapandian, S., Peskova, Y., Koteiche, H. A., Nakamoto, R. K., Tajkhorshid, E., & McHaourab, H. S. (2017). Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature*, 543(7647), 738–741. <https://doi.org/10.1038/nature21414>
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., & Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.001>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/MP/SSP106>
- W. Robey, R., Ierano, C., Zhan, Z., & E. Bates, S. (2011). The Challenge of Exploiting ABCG2 in the Clinic. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 595–608. <https://doi.org/10.2174/138920111795163913>
- Wagner, M., Doehl, K., & Schmitt, L. (2017). Transmitting the energy: Interdomain cross-talk in Pdr5. In *Biological Chemistry*, 398(2), 145–154. Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0247>
- Wagner, M., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2019). In vitro NTPase activity of highly purified Pdr5, a major yeast ABC multidrug transporter. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44327-8>
- Wang, B., Dukarevich, M., Sun, E. I., Yen, M. R., & Saier, M. H. (2009). Membrane porters of ATP-binding cassette transport systems are polyphyletic. *Journal of Membrane Biology*, 231(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9200-6>
- Weid, M., Ziegler, J., & Kutchan, T. M. (2004). The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38), 13957–13962. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405704101>
- Wielandt, A. G., Palmgren, M. G., Fuglsang, A. T., Günther-Pomorski, T., & Justesen, B. H. (2016). Measuring H⁺ pumping and membrane potential formation in sealed membrane vesicle systems. *Methods in Molecular Biology*, 1377, 171–180. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3179-8_17

- Winn, P. J., Lüdemann, S. K., Gauges, R., Lounnas, V., & Wade, R. C. (2002). Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(8), 5361-5366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.082522999>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(25), 10338–10342.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0901249106>
- Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B., & Im, W. (2014). CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *35*(27), 1997–2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>
- Xiong, J., Feng, J., Yuan, D., Zhou, J., & Miao, W. (2015). Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific Reports*, *5*.
<https://doi.org/10.1038/srep16724>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, *12*(1), 7–8.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, *43*(1), 174–181.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yazaki, K., Matsuoka, H., Ujihara, T., & Sato, F. (1999). Shikonin Biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: Light-induced Negative Regulation of Secondary Metabolism. *Plant Biotechnology*, *16*(5), 335-342.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.16.335>
- Ye, A. Y., Liu, Q. R., Li, C. Y., Zhao, M., & Qu, H. (2014). Human transporter database: Comprehensive knowledge and discovery tools in the human transporter genes. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088883>
- Young, N. D., & Bharti, A. K. (2012). Genome-enabled insights into legume biology. *Annual Review of Plant Biology* *63*, 283-305.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103754>
- Young, N. D., Debelle, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., de Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., ... Roe, B. A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, *480*(7378), 520–524.
<https://doi.org/10.1038/nature10625>

- Young, N. D., & Udvardi, M. (2009). Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current opinion in plant biology*, *12*(2), 193-201.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.11.005>
- Yu, F., & de Luca, V. (2013). ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(39), 15830–15835.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1307504110>
- Yu, Q., Ni, D., Kowal, J., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2021). Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism. *Nature Communications*, *12*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24651-2>
- Zawaira, A., Coulson, L., Gallotta, M., Karimanzira, O., & Blackburn, J. (2011). On the deduction and analysis of singlet and two-state gating-models from the static structures of mammalian CYP450. *Journal of structural biology*, *173*(2), 282-293.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.09.026>
- Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal*, *57*(1), 171–183. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03676.X>
- Zhang, X. D., Zhao, K. X., & Yang, Z. M. (2018). Identification of genomic ATP binding cassette (ABC) transporter genes and Cd-responsive ABCs in *Brassica napus*. *Gene*, *664*, 139–151. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.04.060>
- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2004). Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *57*(4), 702–710.
<https://doi.org/10.1002/prot.20264>

7. Załączniki

Lista załączników:

1. Dopasowanie sekwencji MtABCG46 i HsABCG2 wraz z przewidywaniem struktury drugorzędowej dla pełnych roślinnych transporterów ABCG i jego porównaniem ze strukturą drugorzędową HsABCG2 (PDB: 5NJ3).
2. Porównanie parametrów (RMSD i RMSF) modeli MtABCG46: (I) uzyskanego z wykorzystaniem serwera I-TASSER i (II) wygenerowanego przez AlphaFold2 w symulacjach.
3. Porównanie parametrów (RMSD i RMSF) wariantów modelu AF2 MtABCG46 w symulacjach.

Publikacje powstałe w trakcie realizacji pracy doktorskiej są dostępne w ramach „Open Access” pod wymienionymi adresami internetowymi:

- Hao P, Xia J, Liu J, Di Donato M, **Pakuła K**, Bailly A, Jasiński M, Geisler, M. (2020). Auxin-transporting ABC transporters are defined by a conserved D/EP motif regulated by a prolylisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 13094-13105.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014104>

Publikacje w trakcie recenzji, dostępne w formie „preprint”:

- **Pakuła K**, Sequeiros-Borja C, Biała-Leonhard W, Pawela A, Banasiak J, Bailly A., Radom M, Geisler M, Brezovsky J, Jasiński, M. (2022). A key residue of plant ABC transporter modulates access path geometry and phenylpropanoid substrate selectivity. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2022.08.16.503940>
- Aryal B, Xia J, Hu Z, Tsering T, Liu J, Huynh J, Fukao Y, Glöckner N, Huang H, Sáncho-Andrés G, **Pakuła K**, Gorzolka K, Zwiewka M, Nodzyński T, Harter K, Sánchez-Rodríguez C, Jasiński M, Rosahl S, Geisler M. (2022). A phospho-switch provided by LRR receptor-like kinase, ALK1/QSK1/KIN7, prioritizes ABCG36/PEN3/PDR8 transport toward defense. *bioRxiv*.
<https://doi.org/doi: 10.1101/2022.05.11.491457>