

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A P-glikoprotein konformáció változásainak és
membrán mikrodomén lokalizációjának vizsgálata**

Mészáros-Bársony Orsolya

Témavezető: Dr. Goda Katalin



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2019**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
1.1. A daganatos megbetegedések előfordulása, terápiás lehetőségei	8
1.2. A daganatsejtek gyógyszer rezisztenciája és a multidrog rezisztencia	8
1.3. Az ABC fehérjék	10
1.3.1. Az ABC fehérjék szerkezete	10
1.3.2. A humán ABC fehérjék	12
1.3.3. A multidrog rezisztenciát kialakító humán ABC transzporterek szöveti megoszlása és fiziológiás szerepe	13
1.4. A Pgp által közvetített drog transzport folyamatok	14
1.4.1. Pgp szubsztrátok, modulátorok	14
1.4.2. A Pgp általi drog transzport mechanizmusát leíró modellek	16
1.5. A Pgp szerkezete	18
1.5.1. Transzmembrán domének és az általuk kialakított szubsztrátkötő zseb	19
1.5.2. Nukleotid-kötő domének	21
1.6. A Pgp katalitikus ciklusa	23
1.6.1. A katalitikus ciklus során megfigyelt jelenségek	23
1.6.2. Katalitikus ciklus modellek	25
1.6.3. A katalitikus ciklus során bekövetkező konformáció változások detektálása: UIC2-kötődés	29
1.7. A Pgp mint transzmembrán fehérje	29
1.7.1. A Pgp membrán mikrokörnyezete	29
1.7.2. A Pgp megjelenése a raft és nem-raft membrán mikrodoménekben	32
2. CÉLKITŰZÉSEK	35
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
3.1. Anyagok	37
3.2. Módszerek	37
3.2.1. Sejttenyésztés	37
3.2.2. Transzgénikus sejtvonalak létrehozása	38
3.2.3. Sejtek permeabilizálása Staphylococcus aureus α -toxinnal	38
3.2.4. Nukleotid és antitest kötődés affinitásának meghatározása	39

3.2.5. Nukleotid csapdázás („trappelés”).....	40
3.2.6. A vanadát által csapdázott poszt-hidrolízis állapotból való visszatérés.....	40
3.2.7. Detergens elúciós eljárás (FCDR, áramlási citometriás detergens- rezisztencia teszt).....	41
3.2.8. A sejtek koleszterin tartalmának módosítása.....	41
3.2.9. Az intracelluláris ATP koncentráció változás hatásának vizsgálata a Pgp molekulák plazmamembrán expressziójára	41
3.2.10. A Pgp UIC2-reaktivitása és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata....	41
3.2.11. A Pgp molekulák internalizációjának vizsgálata	42
3.2.12. Áramlási citometriás mérés	42
3.2.13. Statisztikai analízis.....	43
4. EREDMÉNYEK I.: A Pgp konformáció változásainak vizsgálata	44
4.1. Az UIC2 kötődés változások által detektált TMD konformáció változások a NBD-kben végbemenő folyamatokat jeleznek	44
4.2. A nukleotid kötődés indukálja a Pgp-k extracelluláris tér felé nyitott konformációs állapotának kialakulását	47
4.3. A Walker A szekvencia lizin aminosavának féloldali mutációja nem gátolja meg az ATP kötődését és a szubsztrát-stimulált ATP hidrolízist	49
4.4. A féloldali Walker A mutánsok is rendelkeznek szubsztrát-stimulált ATP hidrolízis aktivitással	51
4.5. A vanadát által csapdázott állapotból való visszatérés vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k esetében.....	54
EREDMÉNYEK II.	56
4.6. A Pgp mindkét oldali ATP-kötőhelyének Walker A szekvenciájában előidézett mutáció nem befolyásolja a transzporter membrán mikrodoménekhez való asszociációját.....	56
4.7. Az UIC2 antitest Pgp-hez való kötődése és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata élő sejtekben.....	57
4.8. Az intracelluláris ATP koncentráció változások hatása a Pgp molekulák detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára.....	59
4.9. A membrán két Pgp populációjának internalizációja és ennek függése a membrán koleszterin tartalmától.....	60
5. DISZKUSSZIÓ	63
5.1. Diszkusszió I.....	63
5.2. Diszkusszió II.	68

6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	70
6.1. Összefoglalás	70
6.2. Summary	72
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	73
7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	73
7.2. Saját közlemények	87
8. TÁRGYSZAVAK	88
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89
10. FÜGGELÉK	90

Rövidítések jegyzéke

A647	Alexa Fluor® 647 (fluorofór)
2DG	2-deoxi-D-glükóz
A488	Alexa Fluor® 488 (fluorofór)
ABC	ATP-kötő kazetta (ATP-Binding Cassette)
ABCB1	lásd Pgp
ABCB1a	Multidrug resistance protein 1a <i>Mus musculus</i> ban. Az <i>Abcb1a</i> gén kódolja
ABCB2	lásd TAP1
ABCB3	lásd TAP2
ABCC1	lásd MRP1
ABCC7	lásd CFTR
ABCC8	lásd SUR1
ABCC9	lásd SUR2
ABCG2	lásd BCRP
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AML	akut myeloid leukémia (acute myeloid leukaemia)
AMP	adenozin-5'-monofoszfát
AMP-PNP	adenozin-5'-(β,γ -imido)-trifoszfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BCRP	mellrák-rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein), szinonímája: <i>ABCG2</i>
BeFx	berillium-fluorid
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
calcein-AM	calcein-acetoxi-metilészter
cDNS	komplementer DNS (complementary DNA)

CFTR	cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), szinonímája: ABCC7
CHAPS detergens	3-[(3-kolamido-propil)-dimetilammonio]-propán-szulfát 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CsA	ciklosporin A
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFP	zöld fluoreszkáló fehérje (enhanced green fluorescent protein)
EPR	elektron paramágneses rezonancia (electron paramagnetic resonance)
ER	endoplazmatikus retikulum
ESR	elektronspin rezonancia
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötális borjú szérum (fetal calf serum)
FRET	Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer
FSC	előre irányuló fényszórás (forward scatter)
gl-PBS	8 mM glükózzal kiegészített PBS
HIV	humán immundeficiencia vírus (human immunodeficiency virus)
i.c.	intracelluláris
KCN	kálium-cianid
Kol-RAMEB	RAMEB koleszterinnel alkotott komplexe
Mdl1p	mitokondriális ABC transzporter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -ben
MDR	multidrog rezisztencia (multidrug resistance)
MDR1	lásd Pgp
MHC1	Fő hisztokompatibilitási komplex 1 (Major Histocompatibility Complex 1)
MM	mindkét oldali Walker A szekvenciában (K433M/K1076M) mutációt hordozó Pgp molekula
MRP1	multidrog rezisztenciához kapcsolódó fehérje 1 (multidrug resistance associated protein 1), szinonímája: <i>ABCC1</i>

MsbA	<i>Escherichia coli</i> lipid A transzporter
NBD	nukleotid-kötő domén (nucleotide binding domain)
NEM	N-etilmaleimid (N-ethylmaleimide)
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline)
PFA	paraformaldehid (paraformaldehyde)
Pgp	P-glikoprotein (P-glycoprotein), szinonímái: <i>ABCB1</i> , <i>MDR1</i>
P_i	inorganikus-foszfát, ortofoszfát-ion, PO ₄ ³⁻
PI	propidium-jodid (propidium iodide)
R123	rodamin 123
RAMEB	random-metilezett-β-ciklodextrin (Randomly Methylated-Beta-Cyclodextrin)
Sav1866	<i>Staphylococcus aureus</i> baktérium ABC transzportere
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> sejtvonat
SSC	oldalirányú fényszórás (side scatter)
SUR1	szulfanilurea receptor 1 (sulfonilurea receptor 1), szinonímája: <i>ABCC8</i>
SUR2	szulfanilurea receptor 2 (sulfonilurea receptor 2), szinonímája: <i>ABCC9</i>
TAP1	antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 1 (transporter associated with antigen processing 1), szinonímája: <i>ABCB2</i>
TAP2	antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 2 (transporter associated with antigen processing 2), szinonímája: <i>ABCB3</i>
TMD	transzmembrán domén (transmembrane domain)
TX-100	Triton X-100 detergens
V_i	ortovanadát-ion, VO ₄ ³⁻

1.Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A daganatos megbetegedések előfordulása, terápiás lehetőségei

A daganatos megbetegedések által okozott mortalitás a második helyen áll a szív- és érrendszeri betegségekkel összefüggő halálozások mögött annak ellenére, hogy a daganatos megbetegedések megelőzésében és kezelésében jelentős előrelépések történtek (World Health Organization, 2018). A halálozás csökkentése elsősorban a daganatok korai diagnosztikától, a korszerűbb diagnosztikai módszerek és a hatékony terápiás eljárások alkalmazásától várható.

A daganatos betegségek típusától és stádiumától függően különböző kezeléseket alkalmaznak a rákos sejtek elpusztítására. A komplex kezelést igénylő daganatok esetén a műtéti beavatkozás, a sugárterápia, kemoterápia, hormonterápia vagy immunterápia, illetve ezek kombinációja sokféle lehetőséget kínál. A kemoterápia fontosságát mutatja az a tény, hogy az immun-, és hormonterápiák egyelőre csak kevés tumor esetében egyenrangú alternatívák, továbbá a hagyományos kemoterápiát kedvező esetekben önállóan alkalmazva is gyógyulás érhető el, főként a vérképzőszervi daganatok (leukémiák, limfómák) esetén. Más esetekben a kemoterápiát kiegészítő terápiaként alkalmazzák a sebészeti beavatkozások és sugárterápiás kezelések mellett, melynek fontos célja a tumor terjedésének megakadályozása a primer tumorból szétszóródott rákos sejtek elpusztítása révén, lehetővé téve a daganatos betegek állapotának stabilizálását vagy végleges gyógyulását.

A kemoterápiában általánosan alkalmazott növényi eredetű és szintetikus gyógyszerek (citosztatikumok) a daganatsejtek osztódását gátolják, vagy elpusztításukat célozzák. A daganatos betegek biológiai jellemzőinek különbsége, valamint genetikai eltéréseik alapvetően befolyásolják a daganatok citosztatikumok iránti érzékenységét. A betegek jelentős hányadát azért veszítjük el, mert a citosztatikus terápia nem bizonyul elég hatékonynak a daganatos sejtek már eleve meglévő „intrinsic” rezisztenciája (elsődleges rezisztencia) vagy a kemoterápia folyamata során kialakuló „szerzett” rezisztenciája miatt [1].

1.2. A daganatsejtek gyógyszer rezisztenciája és a multidrog rezisztencia

A kemoterápiás kezelésnek ellenálló daganatsejtekben számos mechanizmus biztosíthatja a tumorsejtek túlélését: csökkenhet a gyógyszerek célpontjául szolgáló fehérjék mennyisége, gátlódhatnak az apoptotikus útvonalak [2], általános védekező mechanizmusok aktiválódhatnak, mint például a drogok detoxifikációja és a károsodott DNS javítása [3], vagy akár fokozódhat a kemoterápiás szereket lebontó enzimfehérjék működése [4]; [5]. A sejtszintű rezisztencia mechanizmusok egyik leggyakoribb formája a széles

szubsztrátspektrumú energia-függő gyógyszer exporter(ek) fokozott kifejeződése, melyek képesek a toxikus vegyületeket a sejtől eltávolítani, mielőtt azok kifejthetnék intracelluláris hatásukat [6]; [7].

In vitro vizsgálatok alapján a tumor sejtekben kialakuló multidrog rezisztencia legfőbb okozójaként három, az ABC transzporterek (ATP-Binding Cassette) népes családjába tartozó fehérjét azonosítottak. Egy az 1970-es években megjelent publikációban az *in vitro* kolhicinnel, vinblasztinnal, daunorubicinnel vagy más amfipatikus vegyületekkel szelektált kínai hörcsög ovárium sejtekben egy membránfehérje emelkedett expresszióját mutatták ki [8]. Ezt a kb. 170 kDa méretű glikoproteint P-glikoproteinnek (Pgp/MDR1/ABCB1) nevezték el, mivel összefüggésbe hozták a fenti citosztatikumok megváltozott membrán permeabilitásával (a „P” a permeabilitás szóból ered). Az MRP1-et (multidrug resistance protein 1/ABCC1) [9] olyan drogrezisztens kis-sejtes tüdőcarcinóma sejtvonalakban azonosították, melyekben Pgp expresszió nem volt kimutatható. Doyle és munkatársai később humán mellrák sejtvonalakon egy harmadik fontos transzporter fehérje, a BCRP (Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2) jelenlétéről számoltak be, melynek hatására a sejtek számos citosztatikummal szemben – többek között mitoxantron, daunorubicin, doxorubicin – mutattak rezisztenciát [10]. Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy ezen exporter típusú transzporterek a szervezet számos szövetében kifejeződnek, ahol a xenobiotikumok elleni védekezésben is szerepet játszanak [11]; [12]; [13]; [14]; [15].

Bár a multidrog rezisztenciát okozó transzporterek expressziós szintje a terápiára rezisztens betegekből izolált tumor mintákban messze elmarad az *in vitro* körülmények között szelektált sejteken tapasztalt transzporter szintektől, szerepüket a gyógyszer rezisztencia kialakulásában és a betegség kimenetelének meghatározásában egyre több adat támasztja alá. A transzporterek expressziójának fokozódása gyakran korrelál a tumor grádusával [16]; [17] és kifejeződésük a betegség kimenetelét előrejelző független prognosztikai faktor számos daganatos megbetegedés esetében (pl. az MRP1 neuroblasztómában [18]; a Pgp AML-ben [19] vagy az ABCG2 emlőrákban [20]). Az általunk vizsgált Pgp terápiás jelentőségét mutatja, hogy expressziója AML-ben [21] és akut nem-limfoblasztos leukémiában (ANLL) [22] negatív korrelációt mutat a kezelésre adott válasszal [23].

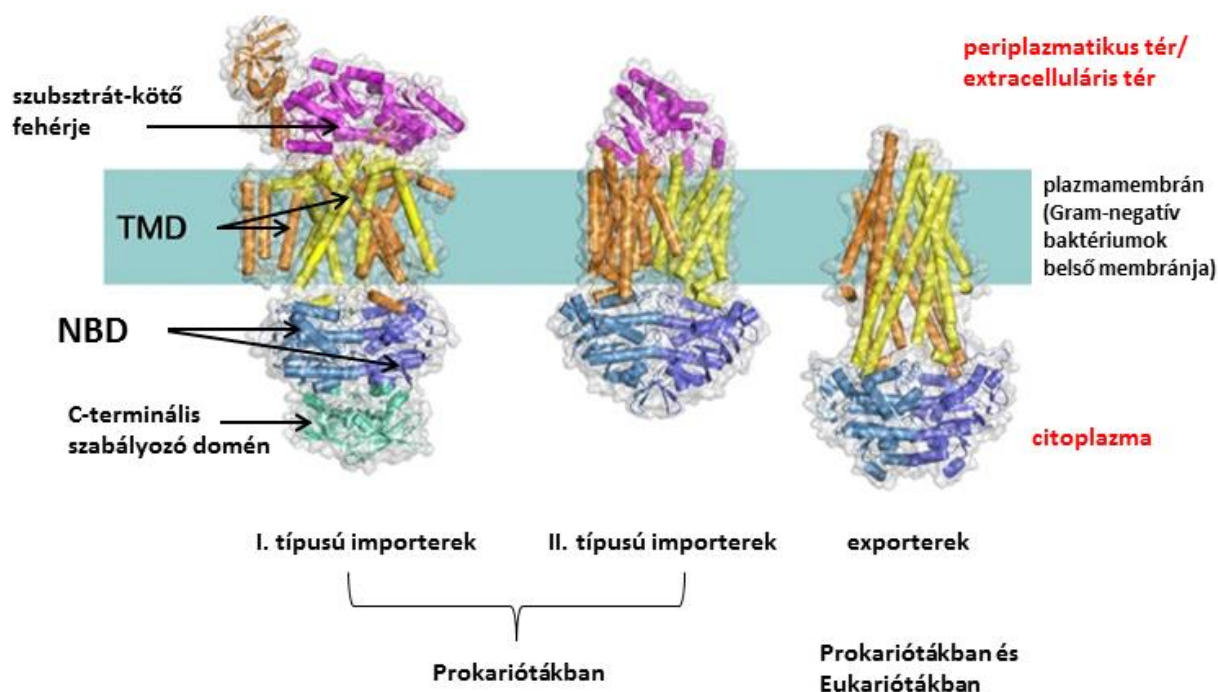
Bár az utóbbi évtizedekben számos próbálkozás történt a Pgp funkciójának gátlására, a klinikumban is sikeresen alkalmazható megoldás még nem született. Azonban a Pgp szerkezete és biológiai funkciója közötti összefüggés megértése új, az eddigieknél

hatékonyabb terápiás eljárások kifejlesztéséhez vezethet, melyek személyre szabott alkalmazása a tumoros betegek gyógyulási esélyének jelentős növekedéséhez vezethet.

1.3. Az ABC fehérjék

1.3.1. Az ABC fehérjék szerkezete

Az ABC fehérjék alkotják az egyik legnagyobb és legősibb fehérjecsaládot, melynek tagjai a baktériumoktól az emberig a legtöbb élőlényben megtalálhatóak [24]. Az ABC fehérjék közös szerkezeti sajátossága, hogy konzervált szekvencia motívumokból felépülő ATP-kötő kazettával (**ATP-Binding Cassette**, ABC) rendelkeznek. Az ABC transzportereket funkciójuk alapján három csoportra oszthatjuk, ezek a bakteriális importerek és exporterek, valamint az eukarióták exporterei [25] (1. ábra):



1. ábra: Az ABC transzporterek főbb csoportjai, alapvető felépítésük és membrán lokalizációjuk Josy ter Beek és munkatársai alapján [44]. NBD: nukleotid-kötő domén, TMD: transzmembrán domén.

Az ABC transzporterek szerkezetére általánosan jellemző, hogy a funkcióképes fehérje két a szubsztrátok megkötéséért felelős transzmembrán doménnel (**Transmembrane Domain** = TMD) és két az ATP megkötéséért és hidrolíziséért felelős ATP-kötő kazettával (**Nucleotide Binding Domain** = NBD) rendelkezik [26]. Azokat a transzportereket, melyek egyetlen polipeptid lánc mind a négy domént tartalmazza, teljes transzportereknek nevezzük. A féltranszporterek két olyan polipeptid lánc dimerizációjával hozzák létre a működőképes

fehérjét, melyek mindegyike egy nukleotid-kötő és egy transzmembrán doménből áll, mint például a Sav1866 (a humán Pgp-vel homológ multidrog efflux transzporter a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus*ban) [27]. Prokarióták esetében gyakori, hogy a négy domént külön gének kódolják, melyekről szintetizálódó fehérjék aztán funkcionálisan aktív transzporter komplexszé oligomerizálódnak a membránban [28]; [29]; [30].

A Gram-negatív baktériumokban található ABC importerek egyedi jellegzetessége a periplazmatikus szubsztrátkötő fehérje, mely a megkötött szubsztrátot elszállítja a belső membránban elhelyezkedő importer komplexhez [31]. A bakteriális importereket két csoportba soroljuk a transzport mechanizmus jellegzetességei és a szállított molekulák mérete alapján [32] (**1. ábra**).

A kis molekulákat szállító ún. egyes típusú importerek 10-14 transzmembrán alfa-hélixzel rendelkeznek, mint például az *E. coli* maltóz transzportere (MalFGK2), a molibdát transzporter, aminosav transzporterek (pl. a hisztidin transzportját végző HisP periplazmatikus hisztidin permeáz a *Salmonella typhimurium*ban), vagy az *E. coli* ribóz felvételéért felelős Rbs transzporter [33]; [34]. A kettes típusú ABC importerek több, maximum 20 transzmembrán alfa-hélixből épülnek fel [35] és nagyobb molekulák szállítására specializálódtak, mint pl. a B12 vitamin (BtuCD transzporter) [35].

A baktériumok ABC exporterei felelősek számos antibiotikum [36], toxin (pl. bakteriocinek) [37], fehérje (pl. a hem felvételében szerepet játszó fehérjék), enzim (pl. proteázok, lipázok, exoglukanázok, hemolizin [38], adenilát-cikláz) periplazmatikus térbe vagy a sejten kívülre történő transzportjáért [39]. A Gram-negatív baktériumok bizonyos ABC exporterei további ún. járulékos alegységekkel is rendelkeznek, melyek egy funkcionális egységként a belső és külső membránhoz kapcsolódva a szekretált termék extracelluláris médiumba történő felszabadulásában játszanak szerepet [40]; [41]. A Gram-negatív baktériumok ABC exportereinek egyik jellegzetes képviselője az *Escherichia coli*-ból izolált HlyB ABC transzporter, mely a hemolizin szekrécióban vesz részt. A HlyB fehérje a belső membránban található, egyik járulékos faktora a periplazmatikus térben transzport csatornát formáló HlyD vagy más néven membrán fúziós fehérje, míg a külső membránban elhelyezkedő járulékos faktor a TolC [42]; [25]; [43].

Az ABC transzporterek harmadik csoportját az eukarióta exporterek alkotják, melyek jellegzetessége, hogy a NBD és a membránban elhelyezkedő TMD egy polipeptidláncon található (**1. ábra**). Az ún. *féltranszporterek* esetében az egy NBD-ből és egy TMD-ből álló egységeknek a membránban történő homo- vagy heterodimerizációjával jön létre a

funkcióképes transzporter (homodimer pl. ABCG2; heterodimer pl. TAP1/TAP2), míg a *teljes transzporterek* két NBD-jét és két TMD-jét egy gén kódolja (pl. ABCB1, ABCC1 stb), feltehetően egy korábban bekövetkezett génduplikációs esemény következtében [45].

1.3.2. A humán ABC fehérjék

A humán genomban 48 ABC fehérjét kódoló gént azonosítottak [46], melyek mutációi sokféle betegség hátterében állnak (**1. táblázat**), mint például a Tangier kór [47]; [48]; [49]; a Dubin-Johnson szindróma [50], vagy a cisztikus fibrózis [51].

ELNEVEZÉS (egységes nevezéktan)	ALTERNATÍV NÉV	MUTÁCIÓ ¹ VAGY OVEREXPRESSZIÓ ² ÁLTAL OKOZOTT BETEGSÉG
ABCA1	ABC1	Tangier-kór, Familiáris HDL hiány, érelmeszesedés, Alzheimer kór (1)
ABCA3	ABC-C	Újszülöttkori RDS (surfactant hiány), tüdőfibrózis, veleszületett szürkehályog (1)
ABCA4	ABCR	Stargardt betegség, retinitisz pigmentóza, időskori makula degeneráció (1)
ABCA7	ABCX	Alzheimer kór (1)
ABCA12	-	Harlequin ichtiózis, lamelláris ichtiózis (1)
ABCB2	TAP1	Inzulinfüggő diabetes, Bechterew-kór, immundeficiencia, arthritis kockázat (1)
ABCB3	TAP2	Inzulinfüggő diabetes, Bechterew-kór, immundeficiencia, arthritis kockázat (1)
ABCB4	PGY3	Progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis-3, a kolesztázis más típusai is (1)
ABCB7	ABC7	szideroblasztos anémia és ataxia (1)
ABCB11	BSEP	2-es típusú progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis, terhességi intrahepatikus kolesztázis, újszülöttkori légzési distressz-szindróma (1)
ABCC2	MRP2	Dubin-Johnson szindróma (1)
ABCC5	MRP5	Öröklött hipertrichózis (1)
ABCC6	MRP6	Pszeudoxantóma elasztikum (1)
ABCC7	CFTR	Cisztikus fibrózis (1)
ABCC8	SUR1	Gyermeckori familiáris hiperinzulinémiás hipoglikémia (1)
ABCC9	SUR2	Cantú szindróma (1)
ABCD1	ALDP	Adrenoleukodisztrófia, adrenomieloneuropátia (1)
ABCD3	PMP70	Hepatosplenomegália, májbetegség (1)
ABCD4	PMP69	A B12 vitamin metabolizmus veleszületett zavara (1)
ABCG2	BCRP	Köszvény, hiperurikémia (1)
ABCG5, ABCG8	-	Szitoszterolémia, szívkoronár-betegség, epekő (1)
ABCB1 ABCC1 ABCG2	Pgp MRP1 BCRP	Multidrog rezisztencia (2)

1. táblázat. A humán ABC transzporterekkel kapcsolatos betegségek [56]; [57].

A 48 fehérjét aminosav szekvencia homológiájuk alapján 7 alcsaládba sorolták ABCA-ABCG-ig [52]; [53]. A humán ABC fehérjék többsége transzporter szerepet tölt be, de vannak olyanok is melyek ioncsatornaként (CFTR = ABCC7) funkcionálnak [54], vagy ioncsatorna fehérjék működésének szabályozásában vesznek részt (SUR1, SUR2) [55].

Számos ABC fehérje a plazmamembránban fejeződik ki, ellenben a TAP1/TAP2 heterodimer az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában expresszálódik, ahol 8-15 aminosavból álló peptideket transzportál a citoplazmából az ER lumenébe, amelyek az MHCI molekulákkal komplexet alkotva az antigén prezentációban játszanak szerepet [58]. A sejtorganellek membránjában expresszálódó ABC fehérjék további példái az ABCB7 [59], az ABCB8 [60] és az ABCB10 [61], melyeket a mitokondriumok membránjában azonosítottak. Az ABCD1 pedig a hosszú szénláncú (24-30C) lipideket szállítja a peroxisómákba, ahol oxidációjuk történik [62]. Utóbbi transzporter működésének kiesése okozza az adrenoleukodisztrófiát [63]; [64]; [65].

1.3.3. A multidrog rezisztenciát kialakító humán ABC transzporterek szöveti megoszlása és fiziológiai szerepe

A klasszikus immunológia a szervezet környezeti kihívásokra adott válaszreakcióival foglalkozik. Ezen válaszreakciók végső célja, hogy megkeressék és eliminálják a testünkbe bejutott mikroorganizmusokat, a rákos sejteket vagy a különböző idegen anyagokat, pl. vízzeloldható toxikus vegyületeket. Azonban ezek a mechanizmusok hatástalanok a szervezet szöveti barrierein gyorsan behatoló kisméretű hidrofób molekulák ellen. A részben átfedő szubsztrát spektrummal bíró Pgp, ABCC1, és ABCG2 transzporterek képesek megvédeni testünket a káros hidrofób vagy amfipatikus molekuláktól [66] együttesen kialakítva egy védelmi rendszert, melyet gyakran „kemoimmunitás”-nak neveznek az irodalomban [67]; [68]. Az említett aktív transzporterek a szervezet számos helyén, de elsősorban a barrier funkciót betöltő szövetekben fejeződnek ki, mint például a vér-agy gát kapilláris endotél sejtjei, a vér-here gát Sertoli sejtjei, a placenta trofoblaszt sejtjei, a májsejtek, a vékonybélhám és a vesekapillárisok sejtjei [66]. Így expressziós mintázatuknak és széles szubsztrát spektrumuknak köszönhetően jelentősen befolyásolják a különböző betegségek kezelésére alkalmazott gyógyszerek felszívódását, szervezeten belüli megoszlását, metabolizmusát, kiválasztását és esetleges toxicitását is (*absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity: ADME-Tox*) [57]; [69]; [70]; [71]. Mindemellett pedig a tumorsejteken kifejeződve multidrog rezisztenciát okozhatnak (lásd **1.2. fejezet**).

A transzporterek (Pgp, ABCG2, MRP1) funkciójának gátlása megnöveli az általuk transzportált gyógyszerek biológiai hozzáférhetőségét (hasznosíthatóságát) [72], míg kifejeződésük indukciója képes a hozzáférhetőségüket csökkenteni [73]; [15].

A Pgp és az ABCG2 a polarizált sejtekben (pl. kapilláris endotél sejtek, hepatociták, enterociták) az apikális membránban fejeződik ki, míg az MRP1 a polarizált sejtek bazolaterális membránjában található meg [57]; [74]; [75].

A Pgp, MRP1 vagy ABCG2 knockout egerek életképesek és nincsenek jelentős patológiás elváltozásai, azonban olyan toxinok sokaságára fokozottan érzékenyek, amelyek általában ártalmatlanok az ezeket a transzportereket kifejező állatokban [76]; [77]; [78]. Bár ezek az adatok alátámasztják, hogy az ABC transzporterek nem esszenciálisak az emlősök alapvető élettani folyamataihoz, de fontos kemoprotektív szerepüket hangsúlyozzák azok az újabb megfigyelések, melyek kapcsolatot találtak ezen transzporterekben azonosított egyetlen nukleotidra kiterjedő polimorfizmusok és bizonyos gyógyszerek mellékhatásai között. Ilyen pl. az MRP1 nukleotid polimorfizmusa és az antraciklinek kardiotoxicitása [79]; [80] vagy a Pgp polimorfizmusa és a taxánok által kiváltott neuropátia között megfigyelt korreláció [81]. Érdekes megfigyelés, hogy egyik ABC transzporter működésének kiesését egy másik, részben átfedő szubsztrát specifitású transzporter kifejeződésének fokozódása kompenzálhatja, ugyanis az ABCG2 molekulák száma és transzport aktivitása jelentősen fokozódik a vér-agy gát mikroereiben az *mdr1a knockout* egerekben [82].

Újabb adatok szerint ezen ABC transzporterek nem csak xenobiotikumokat transzportálnak. Az ABCG2 fiziológias szubsztrátja a húgysav, így a transzporter egyéb transzport mechanizmusokkal együtt részt vesz a húgysav homeosztázis fenntartásában [83]; [84]. Ezzel összefüggésben kimutatták, hogy az ABCG2 működését csökkentő mutációk hajlamosítanak a köszvény kialakulására [85]; [86]. Az MRP1 szubsztrátjai pedig nemcsak a xenobiotikumok glutation-S konjugátumai, hanem a hízósejtek által termelt leukotrién-C4 is [87], ami egy endogén glutation konjugátum, mely fontos szerepet játszik az allergia és az asztma patomechanizmusában [88]; [89].

1.4. A Pgp által közvetített drog transzport folyamatok

1.4.1. Pgp szubsztrátok, modulátorok

A Pgp egyik legjellemzőbb tulajdonsága, hogy képes mind szerkezetében, mind méretében és hatásmechanizmusában eltérő vegyületek széles spektrumának eltávolítására a sejtekből (2. táblázat).

A Pgp által transzportált szubsztrátok többsége semleges vagy gyengén bázikus tulajdonságú, aromás gyűrűket tartalmazó hidrofób vagy amfipatikus molekula [90]. Számos lipofil anyag, melyeket „revertáló szereknek” vagy „modulátoroknak” neveznek képes gátolni a Pgp szubsztrátok exportját, ezáltal kivédi a drog rezisztenciát. A szubsztrátok és modulátorok között nem tudunk éles határvonalat húzni, hiszen vannak olyan modulátorok, melyek maguk is transzportálódnak és gyakran kompetitív módon gátolják más anyagok transzportját [91]. A ciklosporin A (CsA) a szubsztrátokkal átfedő vagy velük azonos kötőhelyet foglal el a pumpa szubsztrát-kötő zsebében és a szubsztrátoknál nagyobb affinitással kötődve megakadályozza azok transzportját és növeli sejten belüli koncentrációjukat [92].

Daganatellenes szerek:	<u>Antraciklinek:</u>	Daunorubicin, Doxorubicin
	<u>Antracének:</u>	Bizantren, Mitoxantron
	<u>Vinca alkaloidok:</u>	Vinblasztin, Vinkrisztin
	<u>Tubulin polimerizációra ható drogok:</u>	Paklitaxel, Kolhicin
HIV proteáz inhibitorok:		Ritonavir, Indinavir, Saquinavir
Fluoreszcens szubsztrátok:		Hoechst 44432, Rodamin 123, calcein-AM
Antibiotikumok:		Valinomycin, Gramicidin D
Immunszuppresszív ágensek:		Ciklosporin A, Valspodar
Kalcium-csatorna blokkolók:		Verapamil, Nifedipin, Azidopin
Polifenolok:		Kurkuminoidok, Flavonoidok

2. táblázat. A Pgp által transzportált vegyületek főbb csoportjai néhány példával [95]; [91].

A szubsztrátok hidrogén akceptor (elektron donor) csoportokat tartalmaznak és egyes elképzelések szerint a szubsztrát kötőhely bizonyos aminosav oldalláncaival hidrogénhíd kötésekkel létesítenek [93], így a Pgp-szubsztrát komplex disszociációját a szubsztrát és a transzporter között kialakuló hidrogénhíd kötések száma határozza meg [94]. Ennek alapján, ha egy vegyület több hidrogénhíd kötés kialakítására képes a Pgp szubsztrát-kötő zsebével (ilyen lehet pl. a ciklosporin A (CsA)), akkor általában inhibitoroként működve gátolhatja annak ATPáz és transzport aktivitását.

Más vegyületek, mint például a kalcium-csatorna blokkoló verapamil, olyan magas passzív membrán permeabilitási állandóval rendelkeznek, hogy viszonylag kis koncentrációban alkalmazva is feldúsulnak a sejtmembránban, kiszorítva a szubsztrátokat a fehérje szubsztrát kötőhelyéről [96]. A cisz-(Z)-flupentixol nevű tioxantén származék pedig allosztérikus módon képes a Pgp-által közvetített drog transzportot akadályozni úgy, hogy nem zavarja a Pgp szubsztrát felismerését, mivel valószínűleg a szubsztrát áthelyezését és a transzporter kötőhelyéről történő disszociációját akadályozza meg [97].

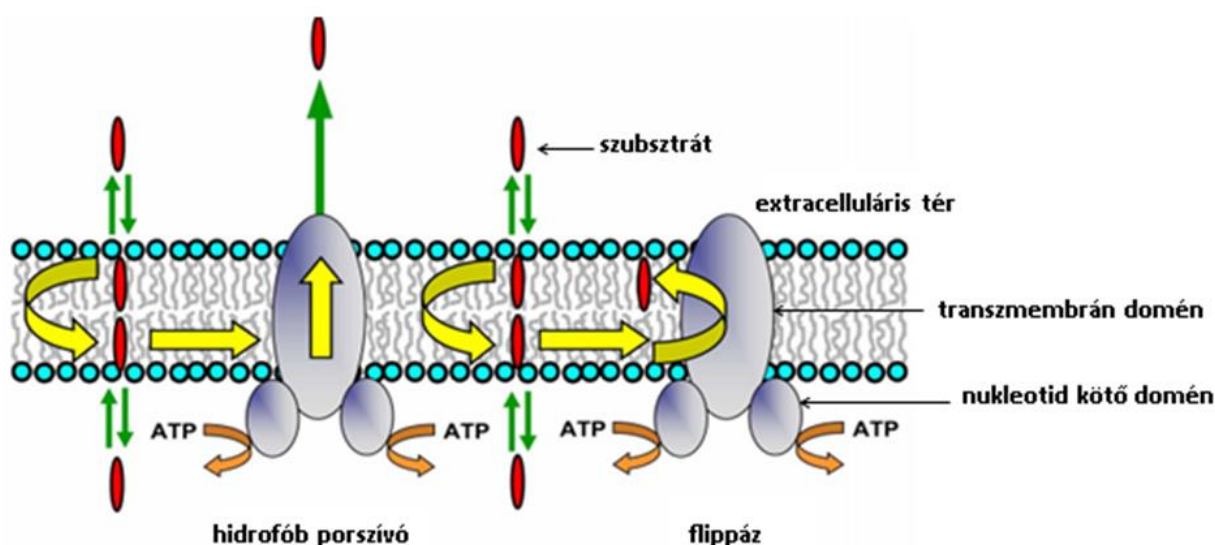
A klinikumban a modulátorok betegségekre specifikus gyógyszerekkel történő kombinált alkalmazása rendkívüli fontosságú lehet, mivel javítható a hatóanyag bélben történő felszívódása és fokozható a szöveti barrieréken át történő bejutása (vér-agy gát, vér-here gát), valamint a tumorszövetben történő feldúsulása. Azonban alkalmazásuk során hátrányaikkal is számolni kell. Specificitásuk és használhatóságuk korlátozottsága szerint három különböző csoportba sorolhatjuk őket [98]; [99]; [100].

Az *első generációs* modulátorok (pl.: verapamil, CsA, reszerpin) klinikai használatát kizárja az a tény, hogy nem-szelektívek, transzportálódnak a Pgp által, valamint egyéb biológiai aktivitásuk révén a Pgp gátlását előidéző koncentrációban elfogadhatatlan mértékű toxicitást okoznak [101]; [102]. A *második generációs* modulátorokat (pl.: valspodar, dexverapamil) magasabb specifitás jellemzi, ellenben megjósolhatatlan farmakokinetikai kölcsönhatásokat okozhatnak a citokróm P450 enzimrendszer gátlásával, valamint a velük együtt alkalmazott kemoterápiás ágensek metabolizmusának és szervezetből történő kiürülésének befolyásolásával [103]. A *harmadik generációs* modulátorok (pl.: laniquidar, tariquidar, elacridar) rendkívül ígéretesnek tűntek, mivel nem rendelkeznek egyéb ismert biológiai aktivitással és hatékonyan gátolják a Pgp funkcióját már alacsony dózisban alkalmazva is. Sajnos a klinikai kipróbálások során mégsem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. A sikertelen klinikai vizsgálatok oka részben a szervezetben fiziológiásan kifejeződő Pgp molekulák gátlása és ennek következtében az alkalmazott citosztatikumok megváltozott farmakokinetikája és megemelkedett toxicitása lehetett [104]; [105].

1.4.2. A Pgp általi drog transzport mechanizmusát leíró modellek

A Pgp általi szubsztrát transzport mechanizmusára vonatkozólag többféle elképzelés létezik (**2. ábra**). Mivel a Pgp szubsztrátok lipofil-amfifil természetű anyagok, ezért jelentősen feldúsulnak a lipid kettősrétegben: a lipid fázisban koncentrációjuk több ezerszerese a vizes fázisban mérhető koncentrációnak [106]; [107].

A lipofil molekulákra a membrán hidrofób szegmensében történő random megoszlás jellemző [108], míg a Pgp szubsztrátok többségét kitevő amfipatikus molekulák a lipid kettősrétegben sokkal specifikusabban oszlanak el, azaz a foszfolipid molekulák tengelyével párhuzamos az orientációjuk, poláros csoportjaik a lipidek feji régiójában helyezkednek el, míg apoláros részeik a lipid kettősréteg belseje felé néznek [109]. Valószínűsíthető, hogy a Pgp már a membránból megköti szubsztrátjait még azelőtt, hogy azok bejutnának a citoplazmába. Ezt támasztja alá az a kísérleti eredmény is, miszerint a calcein-AM (acetoximetilészter származék) már a plazmamembránból kipumpálódik mielőtt a citoplazmában jelen lévő észterázok fluoreszcens calceinné alakítanák [110]; [111], mely nem szubsztrátja a Pgp-nek.



2. ábra: A Pgp lehetséges működését bemutató *hidrofób porszívó* és *flippáz* modellek [108]. A Pgp *hidrofób porszívó*ként működve szubsztrátjait közvetlenül az extracelluláris térbe pumpálja ki, míg *flippáz*ként egyenlőtlen eloszlást idéz elő a plazmamembránban azáltal, hogy a szubsztrátokat a membrán belső lemezéből a külsőbe fordítja át, ahonnan a molekulák az extracelluláris médiumba diffundálhatnak. Valószínűsíthető, hogy a szubsztrátok hidrofóbicitásuk mértékétől függően kerülnek közvetlenül a sejten kívülre vagy a membrán külső rétegébe.

Higgins és Gottesman az ún. *hidrofób porszívó* modellt javasolta a Pgp általi drog transzport magyarázatára, mely szerint a pumpa a membránból összegyűjtött szubsztrát molekulákat közvetlenül az extracelluláris vizes közegbe pumpálja ki (**2. ábra**) [112]; [113]. Egy másik, az ún. *flippáz* modell szerint a transzporter a megkötött szubsztrátokat a membrán belső rétegéből a külső szegmensébe fordítja át (ezért a flippáz megnevezés lenne helyes), melyek aztán diffúzióval a sejten kívüli térbe juthatnak (**2. ábra**) [112]; [113], vagy passzív flip-flop mozgással visszakérülnek a belső membrán lemezbe. Energetikai szempontok

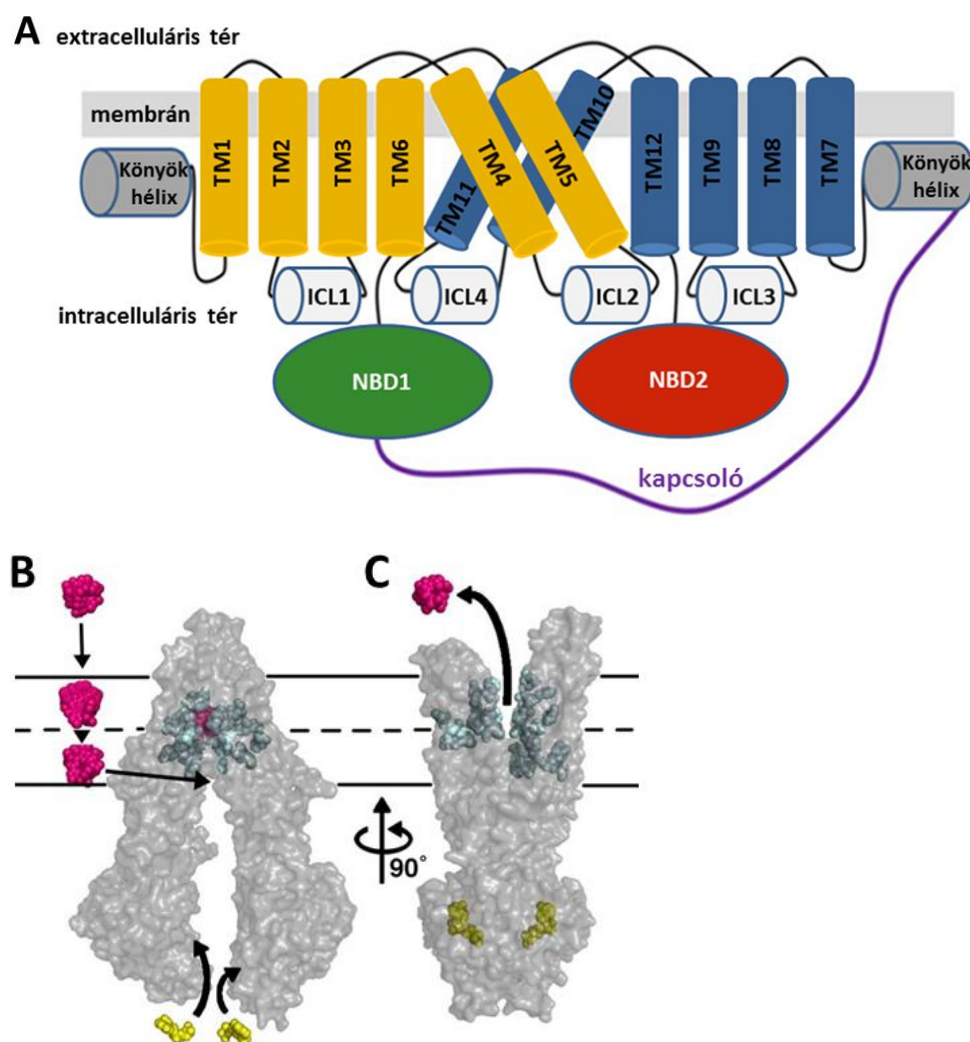
alapján egy dehidrált szubsztrát külső membrán lemezbe történő transzportja sokkal kedvezőbb lehet, mint ugyanennek a molekulának közvetlenül a vizes fázisba történő szállítása [108]. Mivel a két folyamat nem zárja ki egymást és kísérletesen is nehéz őket megkülönböztetni, a legvalószínűbb, hogy mindkét mechanizmus megvalósul a sejtben: a Pgp flippázként/floppázként működhet a lipid kettősréteghez nagy affinitással kötődő szubsztrátok, és transzporterként a kevésbé hidrofób anyagok esetében [108].

1.5. A Pgp szerkezete

A humán P-glikoprotein (ABCB1) az ABCB alcsalád egyik legismertebb és legtöbbet tanulmányozott tagja. Az 1280 aminosavból álló glikoproteint kódoló *MDR1* gén a 7. kromoszóma hosszú karján található. Az egyenként egy TMD-t és egy NBD-t tartalmazó homológ feleket egy flexibilis linker régió kapcsolja össze (**3. ábra A**), melyben létrehozott pontmutációk nem befolyásolják a pumpa működését [114]. Mint minden membrán transzporter a Pgp is rendkívül nehezen kristályosítható, így szerkezetének pontos megismerése hatalmas kihívást jelent az ABC transzporter kutatók számára.

A humán Pgp szerkezetét sejtető korai alacsony felbontású elektronmikroszkópos felvételeket [115]; [116]; [117] követően különös jelentőséggel bírt a Sav1866 *Staphylococcus aureus* bakteriális ABC transzporter kristály szerkezetének meghatározása [118]. A homodimer fehérje 12 transzmembrán hélixszel rendelkezik (**3. ábra A**), mely egyezést mutat a Pgp-re vonatkozó elektronmikroszkópos tanulmányok eredményeivel. A Dawson és Locher által megfigyelt kívülről-nyitott konformációs állapot a Sav1866 fehérje ATP-kötött állapotát reprezentálja, melyben a nukleotid-kötő domének szoros kapcsolatban vannak, és a transzmembrán domének egy központi üreget formálnak (**3. ábra C**). Ebben a konformációs állapotban a transzmembrán domének által körülvelt központi üreg zárt a lipid kettősréteg belső lemeze felől és a citoplazma irányából, ugyanakkor nyitott a külső membrán szegmens felé és az extracelluláris tér irányába [118]. Ward és munkatársai 2007-ben meghatározták az MsbA ABC transzporter kristályszerkezetét nukleotidok hiányában és nukleotid-kötött állapotban is (**3. ábra C**). Eredményeik azt feltételezik, hogy a nukleotidok kötődése a transzmembrán hélixek átrendeződéséhez vezet és megváltoztatja a transzporter feltételezett szubsztrátkötő zsebének elérhetőségét a citoplazmatikus oldal felől nyitott állapotból az extracelluláris médium irányába nyitott konformációba [119]. Pár évvel később Aller és munkatársai meghatározták a humán Pgp-vel 87%-os azonosságot mutató egér Pgp kristályszerkezetét ATP-mentes, a citoplazma felé nyitott állapotban. Munkájukban azt is

bizonyították, hogy ez a konformációs állapot képes szubsztrátok megkötésére (3. ábra B) [120]; [121]:



3. ábra: A Pgp transzmembrán topológiája. (A) Az egyenként 6 hélixből álló transzmembrán doménekben (TMD) a 4. és 5. transzmembrán (TM) alfa-hélixek helyet cserélnek a 10. és 11. TM alfa-hélixekkel [122]. **(B)** A Pgp intracelluláris tér felé nyitott konformációs állapota az *egér ABCB1a* kristályszerkezete alapján [120]. **(C)** A Pgp kívülről nyitott, a szubsztrátok extracelluláris tér felé történő eltávolítására alkalmas konformációs állapota az *MsbA* [119] és a *Sav1866* [118] bakteriális ABC transzporterek kristályszerkezete alapján [120]. (NBD: nukleotid-kötő domén, ICL: intracelluláris loop)

1.5.1. Transzmembrán domének és az általuk kialakított szubsztrátkötő zseb

A két transzmembrán domén (TMD) tipikusan 6-6 membránon átívelő alfa-hélixből áll (TM1-TM12). Kristályszerkezeti adatok alapján a TMD-k két, egyenként 6 hélixből álló köteget formálnak (1. köteg: 1-3., 6., 10. és 11. hélix, 2. köteg: 4., 5., 7-9. és 12. hélix, lásd 3. ábra A). Az *Aller* és munkatársai által meghatározott kristályszerkezeti modellben az ATP-

mentes ún. apo-Pgp belsejében egy tekintélyes, kb. 6000 Å³ méretű üreg található, mely a citoplazma és a plazmamembrán belső rétege felé egyaránt nyitott (**3. ábra B**). A hidrofób szubsztrátok membránból történő bejutását valószínűleg a 4-es és 6-os, valamint a 10-es és 12-es transzmembrán hélixek által formált kapuk teszik lehetővé, melyek a legszélesebb pontnál 9 Å szélesek [120]. A transzporter belsejében található üreg méreténél fogva legalább két szubsztrát molekula szimultán megkötésére alkalmas. A feltételezett drogkötő-zsebet leginkább hidrofób és aromás aminosav oldalláncok hozzák létre, csak néhány poláris aminosav és két töltött vagy potenciálisan töltött aminosav található közöttük. Két szubsztrát-kötött Pgp szerkezetet is azonosítottak, melyekben a pumpához kötődő vegyületek sztereoizomer ciklikus peptid inhibitorok (QZ59-RRR és QZ59-SSS), melyek a térszerkezeti szelektivitásra is képes belső üreg más-más részéhez kötődnek hidrofób és aromás kölcsönhatásokon keresztül [120]. Ez a struktúra összhangban van azon korábbi kísérletek eredményeivel, melyekben cisztein párokat iktattak a cisztein-mentes Pgp-be, hogy a létrejövő keresztkötések segítségével bizonyos molekula részletek közelségét detektálják [123]; [124].

A TMD-k a szubsztrátok megkötésére specializálódva egyetlen funkcionális egységet képeznek, azonban az általuk kialakított szubsztrát kötőhelyek száma, elrendeződése és a szubsztrát felismerés molekuláris mechanizmusa pontosan nem ismert. Mivel a Pgp szokatlanul széles szubsztrát spektruma következtében vegyületek százait képes felismerni és megkötni (330 Da-tól 4000 Da-ig) [125]; [126], ezért a polispecifikus szubsztrát kötőhely szerkezetének és működésének megismerése rendkívül fontos a rákellenes gyógyszerek és MDR inhibitorok észszerű tervezéséhez.

Propafenon-típusú fotoaktiválható szubsztrát analógok alkalmazásával és a jelölt peptid fragmentumok tömegspektrometriás azonosításával (MALDI-TOF technika (mátrix által segített lézer deszorpció ionizáció) - repülési idő detektálás) *Chiba P.* és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a propafenonok kötésében a Pgp 3., 5., 8. és 11. transzmembrán alfa-hélicei vesznek részt [127]. Ugyanakkor mások cisztein mutagenézis segítségével végzett vizsgálatok alapján a 4-6 illetve 9-12 hélixek fontosságát hangsúlyozzák a szubsztrátok megkötésében [123].

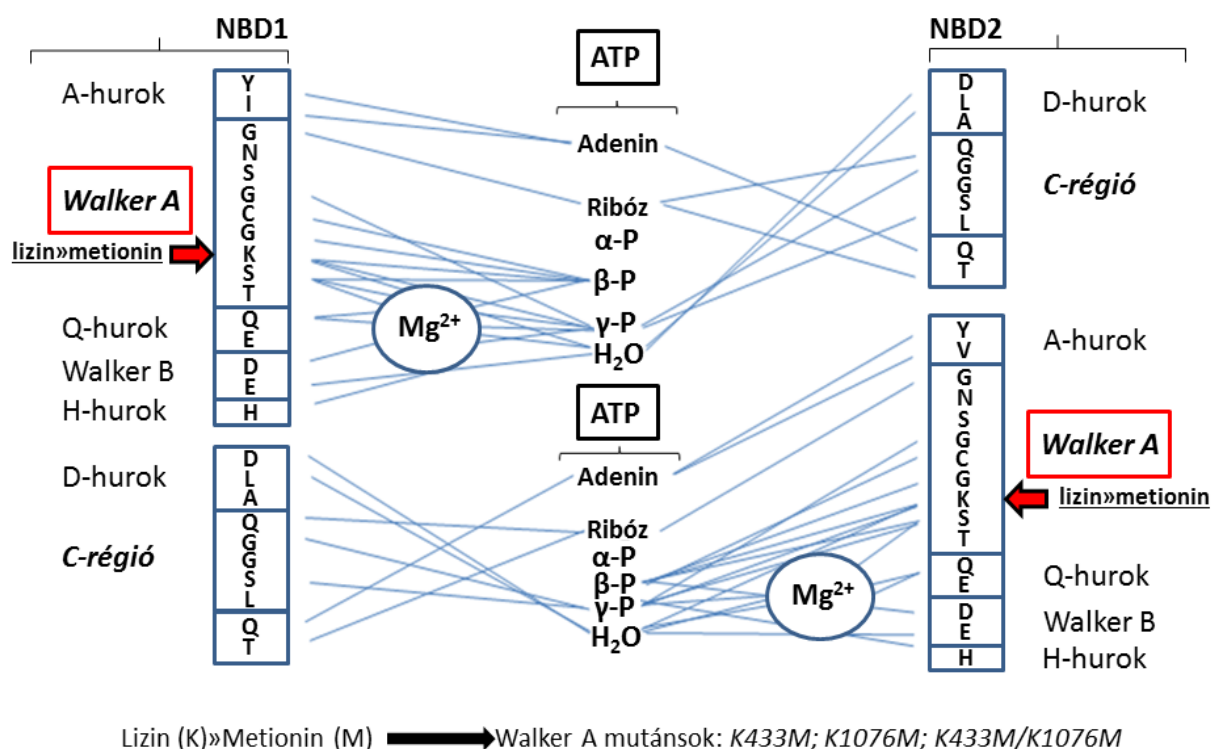
A szubsztrát kötődés és transzport kinetikai paramétereit vizsgáló tanulmányok alapján valószínűsíthető, hogy a Pgp-nek számos (legalább 3 vagy 4) különböző drogkötő helye van a szubsztrátkötő zseben belül, melyek között bonyolult allosztérikus kölcsönhatások valósulhatnak meg [128]. *Lugo* és *Sharom* megfigyelése alapján a rodamin

123 és az LDS-751 is képes szimultán kötődni a Pgp-hez, ahol a két vegyület nem-kompetitív módon hat kölcsön egymással [129], vagyis a komplex szubsztrát kötőhely két szubsztrátot együttesen is képes megkötni. Pozitív allosztérikus hatást feltételeznek a rodamin 123 és a Hoechst 33342 esetében, melyek stimulálják egymás transzportját [130]. Azonban teljesen tisztázatlan, hogy ezeket a kölcsönhatásokat a topológiaiilag elkülönülő drogkötő helyek közötti allosztérikus kölcsönhatás alakítja ki [131], vagy az egységes, komplex drogkötő hely más-más oldalláncához kötődő szubsztrátok közötti közvetlen kölcsönhatás során jönnek létre [123]. A szubsztrátok képesek megváltoztatni a cisztein keresztkötések mintázatát, ami azt feltételezi, hogy a transzmembrán hélixek változtatják alakjukat, elhelyezkedésüket annak érdekében, hogy a struktúráisan különböző vegyületek megkötéséhez alkalmazkodjanak. Egy adott szerkezetű szubsztrát kötődése a drogkötő helyet kialakító transzmembrán szegmensek specifikus (pl. rotációs vagy oldallirányú) elmozdulását okozhatja, ezáltal képes a drogkötésben résztvevő aminosavak számát jelentősen növelni, mely az ún. „indukált-illeszkedési” mechanizmus alapja [132].

1.5.2. Nukleotid-kötő domének

Az ABC fehérjék nukleotid-kötő doménjei olyan katalitikus egységek, melyek az ATP kötéseért és hidrolíziséért felelősek. Az általuk felszabadított és közvetített energia által valósul meg a szubsztrátok transzportja (**4. ábra**) [133].

A Pgp nukleotid-kötő doménje számos az evolúció során konzervált szekvencia motívumot tartalmaz: ezek a Walker A [134] és Walker B szekvenciák, melyeket együttesen “P-loop”-nak (P-huroknak) neveznek [135], az “ABC-signature” elem (C-motívum), valamint az A, D, H és Q-hurkok. Ezek a motívumok szerepet játszanak az azonos (NBD-NBD) vagy a különböző domének (TMD-NBD) közötti interakcióban és közvetlen vagy közvetett módon kapcsolatban állnak a megkötött ATP molekulával (**4. ábra**).



4. ábra: A Pgp két nukleotid-kötő doménjének konzervált szekvencia motívumaival kölcsönhatásba lépő ATP molekula. *Felül:* az ATP az egyes nukleotid-kötő domén (NBD1) Walker A és B motívumai, az A, Q, és H-hurok, valamint a kettes nukleotid-kötő domén (NBD2) D-hurka és C-régiója között foglal helyet, és *Alul:* az ATP az NBD2 Walker A és B motívumai, az A, Q, és H-hurok, valamint az NBD1 D-hurka és C-régiója között helyezkedik el [141].

A Walker A motívumot a GXXGXGKS/T szekvencia alkotja, ahol X bármilyen aminosav lehet. Irodalmi adatok szerint az ezen szekvenciában található lizin (N-terminális: K433, C-terminális: K1076) aminosav kulcsfontosságú. Metioninra történő cseréje az egyik vagy mindkét oldalon a nukleotid-kötő domének ATP iránti affinitását csökkenti és az ATP hidrolízis teljes mértékű gátlását okozza [114].

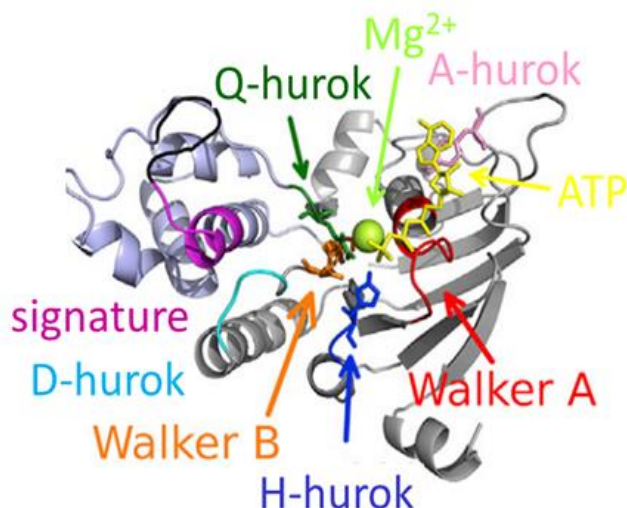
A Walker B szekvencia és a Q-hurok a hidrolízishez szükséges Mg^{2+} -ion koordinálásában vesz részt, valamint hidrogén kötések alakít ki a vízmolekulával, ami az ATP γ -foszfátjával hat kölcsön [136]. A Walker B motívumban ($\Phi\Phi\Phi\Phi$ D, ahol Φ bármilyen hidrofób aminosav lehet) létrehozott mutációk (D555A és/vagy D1200A) megakadályozzák az ATP hidrolízist [137], míg a szomszédos pozícióban előidézett mindkét oldali mutációk (E556A/E1201A vagy E556Q/E1201Q) a nukleotid (elsősorban ATP) csapdázódásához vezetnek foszfát analógok (pl. vanadát vagy BeF_x) hiányában is [138]; [139]; [140].

Az A-hurok az ATP adenin gyűrűjével áll kapcsolatban, melynek épsége az ATP kötéséhez és hidrolíziséhez szükséges [141]. A H- és D-hurkok szintén nagyfokú

konzerváltságot mutatnak. Mutációs analízissel megállapították, hogy a H-hurok az ATP hidrolízisében játszik kritikus szerepet a γ -foszfáttal való interakciója révén, míg a D-hurok a NBD dimerek közötti kölcsönhatást vagy a különböző domének közötti információ átvitelt segíti.

Az ABC signature elem (LSGGQQ/R/KQR) kulcsfontosságát mutatja, hogy a szekvenciájában létrehozott mutációk a csökkent sejtfelszíni expresszió keresztül [143]; [144], az ATP hidrolízis gátlásáig [145] vagy a pumpa nem megfelelő működése következtében kialakuló csökkent szubsztrát rezisztenciáig [143] számos módon képesek befolyásolni a transzporter működését. A fehérje glutamint tartalmazó régiója (Q-hurok) ugyan az ATP hidrolízishez nem esszenciális, de a transzmembrán és nukleotid-kötő domének közötti kommunikációban nagyon fontos szerepet játszik, különösen az ATP kötések és hidrolízisekor felszabaduló energia TMD-ek felé történő közvetítésében [146].

Feltételezik, hogy a NBD-k két ATP molekula megkötésével egy jellegzetes, ún. *sandwich-dimert* hoznak létre úgy, hogy az egyik NBD Walker A és B szekvenciája a másik NBD ABC signature motívumához (C-régió) kapcsolódik egy ATP molekulán keresztül [145] (lásd 4. ábra). Az 5. ábra mutatja az evolúció során konzervált karakterisztikus fehérje motívumok térbeli elrendeződését ATP kötés során az egyik kompozit ATP-kötőhelyben.



5. ábra: A nukleotid-kötő domének (NBD) konzervált fehérje motívumainak együttműködése és térbeli elrendeződése a Pgp ATP kötése során [122].

1.6. A Pgp katalitikus ciklusa

1.6.1. A katalitikus ciklus során megfigyelt jelenségek

A Pgp az ATP kötéséből és hidrolíziséből nyert energiát használja fel szubsztrátjai plazmamembránon keresztül történő exportjához, így a különböző szubsztrátok jelenléte anyagi minőségüktől és koncentrációjuktól függő módon fokozza a fehérje ATPáz aktivitását

[147]. A Pgp (és néhány ABC transzporter) egyedi jellegzetessége, hogy szubsztrátjai távollétében is mutat gyengébb ATPáz aktivitást, melyet az irodalomban gyakran bazális ATPáz aktivitásnak neveznek. A bazális ATPáz aktivitást egyes tanulmányok a plazmamembránban jelenlévő olyan endogén szubsztrátok transzportjával magyarázzák, mint például a koleszterin [148] vagy rövid szénláncú lipidek [149]. Ennek a feltételezésnek azonban ellentmondanak azok az eredmények, melyek szerint a tisztított fehérje CHAPS detergensben oldva hozzáadott lipidek jelenléte nélkül is mutat ATPáz aktivitást [150]; [151]. *Al Shawi* és munkatársai szerint a bazális ATPáz aktivitás nem endogén lipidek vagy egyéb endogén szubsztrátok transzportjának a következménye, hanem a Pgp katalitikus mechanizmusából eredő sajátos tulajdonsága [152]. Feltételezik, hogy a pumpa szubsztrátok nélküli bazális és szubsztrát-stimulált ATPáz ciklusának létezik egy közös pontja, melyből a transzporter a körülményeknek megfelelően elindíthatja bármelyik típusú katalitikus ciklust. Elképzelésük szerint a pumpa mindig köt egy ATP molekulát, ennek következtében amennyiben a szubsztrát kötődést megelőzően egy második ATP is kötődik, a Pgp szubsztrát transzport nélkül is elhidrolizál egy ATP-t, majd visszatér abba a konformációs állapotba, melyben ismételten lehetősége van szubsztrátot kötni. Ugyanakkor a második ATP kapcsolódását megelőzően a szubsztrát kötőhelyre kötődő szubsztrát molekula képes indukálni a pumpa szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását [152].

A mai napig vizsgálatok folynak a Pgp (és a többi ABC transzporter) katalitikus mechanizmusának a részletes megismerésére, melynek során a pumpa az ATP hidrolíziséből felszabaduló energiát a szubsztrátok transzportjára képes hasznosítani.

Elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia illetve fluoreszcencia spektroszkópia segítségével bizonyították, hogy Pgp esetén az ATP hidrolízis esetében mért látszólagos K_M érték, valamint az ATP vagy analógjai kötésére vonatkozó K_d értékek hasonlóak [153]; [154]; [155]; [156]. Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy a Pgp konformáció változásaihoz és transzport aktivitásához elengedhetetlen, hogy mindkét ATP-kötőhely katalitikusan aktív legyen [157]. A két molekulafél közötti szoros kooperáció bizonyítéka, hogy az egyik katalitikus hely inaktivációja kémiai módosítással [158] vagy mutációval [159] megakadályozza a fehérje ATPáz aktivitását. Ezzel összefüggésben foszfát analógokkal (vanadát (V_i), berillium-fluorid (BeF_x) vagy alumínium-fluorid (AlF_3)) történő kezelés során az ATP hidrolízisét követően a fehérje két nukleotid kötőhelyének egyikén létrejövő stabil komplex (pl. Pgp-ADP- V_i) teljesen befagyasztja a fehérje katalitikus ciklusát [160].

Számos ABC transzporter és a Pgp kristályszerkezete alapján a Pgp katalitikus ciklusa során két fő konformációs állapotot feltételeznek, melyet a fehérje nukleotid-mentes, citoplazma felé (belülről) nyitott és a nukleotid-kötött, extracelluláris tér felé (kívülről) nyitott állapota képvisel [161]; [120]; [162]. Feltételezik, hogy a nukleotidok NBD-khez való kötődése kiváltja azok dimerizációját és ezzel együtt az extracelluláris tér felé nyitott TMD konformáció kialakulását eredményezi. A fenti konformáció változásokat a szubsztrát kötőhelyek szubsztrátok iránti affinitásának csökkenése kíséri, ami lehetővé teszi a szubsztrátok koncentráció grádiens ellenében történő transzportját.

A fent jellemzett szubsztrát kötőhelyek váltakozó hozzáférhetőségén és affinitásán alapuló ún. „*alternating access*” modell-t [163]; [119] biokémiai adatok sora is alátámasztja, azonban részleteiben máig nem tisztázott, hogy a nukleotid kötés és hidrolízis folyamatai pontosan hogyan kapcsolódnak a TMD-ekben végbemenő konformáció változásokhoz. Nem teljesen bizonyos, hogy mely katalitikus lépés, az ATP kötődése vagy hidrolízise, váltja ki a fehérje azon konformáció változását, melynek eredményeképpen feltehetőleg az extracelluláris tér felé nyitott orientációba került transzmembrán domének által formált szubsztrát kötőhely(ek)ről ledisszociálnak a szubsztrátok.

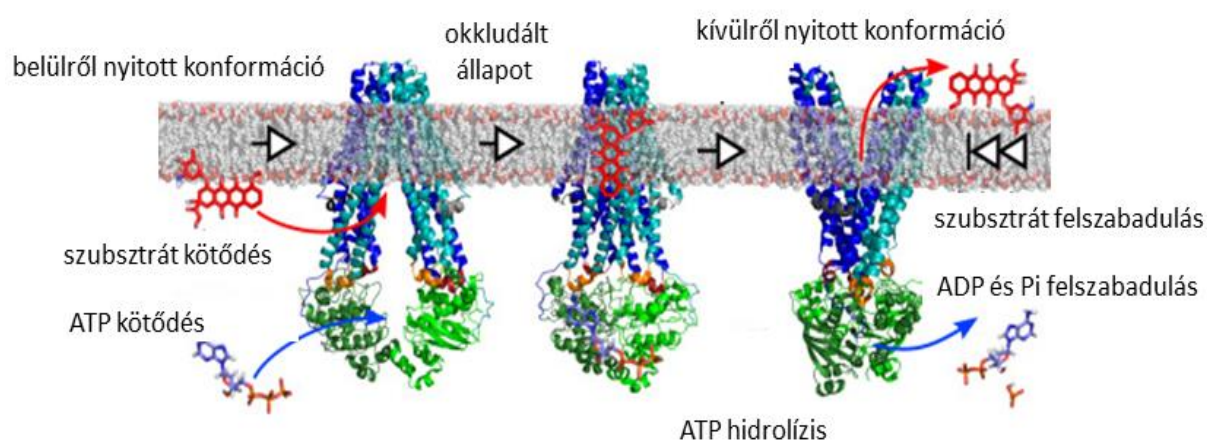
A katalitikus ciklus hajtóereje az ATP hidrolízis, mely Pgp esetében végbemehet mindkét funkcionálisan szimmetrikus kompozit ATP-kötőhelyen. Azonban a mai napig nem ismert, hogy egy szubsztrát molekula transzportjához egy, kettő esetleg több ATP molekula hidrolízise szükséges.

1.6.2. Katalitikus ciklus modellek

Az ABC fehérjék katalitikus ciklusát és konformáció változásait különböző biokémiai és biofizikai módszerekkel, valamint molekuláris dinamikai szimulációk segítségével széles körben vizsgálják, azonban a hosszú idő alatt felhalmozott, gyakran ellentmondásos kísérleti eredmények alapján az előző fejezetben megfogalmazott kérdésekre válaszolva változatos katalitikus ciklus modellek születtek.

Egy izgalmas és könnyebben érthető megközelítése lehet a katalitikus ciklus modellek az alapján történő csoportosítása, hogy a nukleotid-kötő domének milyen kapcsolatban állnak egymással a ciklus folyamán. A modellek egyik csoportja a nukleotid-kötő domének szétválását, míg a modellek másik csoportja a nukleotid-kötő domének folyamatos kapcsolatát feltételezi a transzport ciklus egésze során [122].

Ez utóbbira példa az „**alternáló katalízis**” (alternating sites) [164], a „**folyamatos kapcsolat**” (constant contact) [165] és a „**nukleotid okklúzió**” (nucleotide occlusion) [133]; [166] modell, míg a legismertebb nukleotid-kötő domén szeparációs modellek a „**csipesz-szerű**” (tweezers-like) [167], az „**ATP kapcsoló**” (ATP switch) [168] és a „**processive-clamp**” modellek [169]; [170]; [171]. A különbözőségek ellenére valamennyi modell egyetért abban, hogy a nukleotid-kötő domének és a transzmembrán domének szoros kapcsolatban vannak egymással, azaz a zárt nukleotid-kötőhely dimer megfelel a kívülről nyitott transzmembrán domén konformációnak (**6. ábra**), míg a belülről nyitott transzmembrán domén konformáció lazább nukleotid-kötő domén asszociációt eredményez (**6. ábra**).

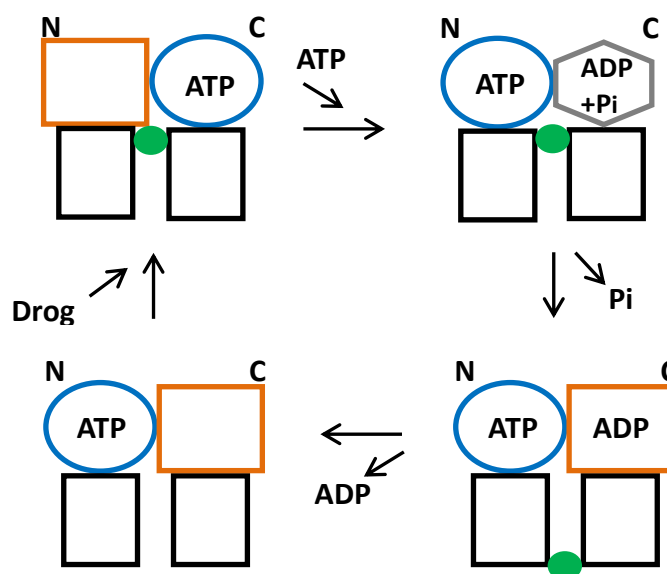


6. ábra. Az MsbA bakteriális transzporter három különböző konformációs állapota, mely számos ABC transzporter katalitikus ciklusában megfigyelhető állapotot reprezentál [122].

Ezenkívül az ABCB alcsaládban is megfigyelhető „okkludált” állapot egy olyan átmeneti konformációt képvisel a transzport ciklusban, mely az extracelluláris és intracelluláris oldalon egyaránt zárt, jellemző rá a nukleotid-kötő domének szoros kapcsolata és a szubsztrát kötőhely zártsága az extracelluláris és az intracelluláris oldalról egyaránt [122]; [172]. Lényeges megjegyezni, hogy az itt leírt „okkludált” állapot nem azonos a dolgozatom későbbi részében említett nukleotid okklúzióval. Míg itt az okkludált állapot egy domének közötti szoros kapcsolatot jelent, addig a dolgozat további részében a hidrolízis irányába elköteleződő ATP molekula nukleotid kötőhelyre történő szoros behúzóódását jelenti („nukleotid okklúzió”).

Az „**alternáló katalízis**” modell szerint - melyet 1995-ben *Senior* és munkatársai dolgoztak ki - a fehérje konformáció változásai, valamint a szubsztrát transzport a két nukleotid kötőhely szigorúan felváltva történő működésén alapul, egyidejűleg mindig csak az

egyik kötőhelyen végbemenő ATP hidrolízissel. A hidrolízis bekövetkeztével a fehérje és a nukleotid közötti kötések meggyengülnek, lehetővé téve az ADP disszociációját és később egy újabb ATP molekula bekötődését. Ezt követően kerülhet sor a szemközti ATP-kötőhelyen lezajló ATP hidrolízisre, mely egy újabb szubsztrát transzportját katalizálhatja [164]. Feltételezték, hogy a szubsztrát transzportja az ATP hidrolízisét követően létrejövő nagy energiájú konformációs állapot relaxációja következtében valósul meg, melyet a foszfát felszabadulása idéz elő (7. ábra) [164].



7. ábra: A Senior-féle katalitikus ciklus modell [164]. A fekete négyzetek a Pgp két transzmembrán doménjét képviselik, míg a többi alakzat (kék, narancssárga, szürke) a fehérje N- és C-terminálisán lévő katalitikus helyeinek (nukleotid-kötő domén 1: NBD1; nukleotid-kötő domén 2: NBD2) különböző konformációit reprezentálja. Az N-terminális katalitikus hely üres, a C-terminális katalitikus hely ATP-t köt, míg a szubsztrát (zöld ellipszis) a szubsztrát kötőhely belső részéhez kötődik (*balra fent*). Az ATP kötődése az N-terminális katalitikus helyéhez lehetővé teszi a C-terminális katalitikus helyén lévő ATP hidrolízisét, olyan konformáció változást indukálva az utóbbi helyen, mely gátolja az ATP hidrolízist az N-terminálison (*jobbra fent*). A C-terminális katalitikus helyen a hidrolízist követően egy nagyenergiájú állapot jön létre ADP és inorganikus foszfát jelenlétében (*jobbra fent*), melynek relaxációja során az inorganikus foszfát felszabadul, a szubsztrát pedig a pumpa magas affinitású belső kötőhelyéről átkerül az alacsony affinitású külső kötőhelyre (*jobbra lent*). A szubsztrát és az ADP disszociációját követően (*balra lent*) az N- és C-terminális katalitikus helyek kapcsolata megváltozik, így a következő ciklusban az N-terminális katalitikus helyen megy végbe az ATP hidrolízis.

Egy ciklus során két drog molekula transzportját feltételezték két ATP molekula felhasználásával. A nukleotid-kötő domének közötti szoros együttműködést és az alternáló katalízis modellt azzal bizonyították, hogy az általuk végzett kísérletekben az egyik nukleotid-kötő domén N-etilmaleimiddel történő kovalens jelölése teljes mértékben gátolta a fehérje

ATPáz aktivitását [173]. A modell további bizonyítékának tekinthető, hogy a féloldali ATP kötőhelyek konzervált szekvenciáiban előidézett mutációk is teljesen meggátolták a fehérje transzport és ATPáz aktivitását [174]; [114]; [159]; [175]; [176]; [158]; [153]; [137].

Egyes elképzelések szerint az „alternáló katalízis” modellben minden intermedier aszimmetrikus, ami egyfajta „konformációs memóriát” biztosít a katalitikus ciklus során arra vonatkozólag, hogy melyik nukleotid-kötő helyen játszódtott le az ATP hidrolízise az előző lépésben [177].

Az előbbi modellel összhangban van a „**nukleotid okklúziós**” modell, mely szerint a katalitikus ciklus elején a félig-nyitott állapotban lévő nukleotid-kötő dimerek egy „okkludált” (szorosan kötött) és egy lazán kötött ATP-t tartalmaznak, a transzmembrán domének pedig belülről nyitott állapotban vannak [122]. A szubsztrát kötődést követően az „okkludált” nukleotid elhidrolizál, miközben a lazán kötött ATP elköteleződik a hidrolízis irányába szorosan behúzódva a kötőzsebbe. Az első ATP hidrolízisét követően a transzmembrán domének kívülről nyitott állapotba kerülnek, melynek következtében a szubsztrát felszabadul. Az első ATP hidrolíziséből keletkező ADP és inorganikus foszfát disszociációja a transzmembrán doméneket a kezdeti belülről nyitott konformációs állapotba billenti vissza [133]; [166]; [177].

Míg az előbb bemutatott modellekben a szubsztrátoknak a pumpa kötőhelyéről történő disszociációját az ATP hidrolízise váltja ki, az ún. „**ATP-switch**” modellben a szubsztrát kötődést követő ATP kötődés hozza létre azt a konformáció változást, melynek hatására a pumpa szubsztrátok iránti affinitása lecsökken, lehetővé téve a szubsztrát távozását az extracelluláris térbe vagy a membrán külső lemezébe [178]; [179]; [168]. Ebben a modellben feltételezik, hogy a ciklus kezdeti állapotában a nukleotid-kötő dimerek üresek, egymástól szeparáltan helyezkednek el, a transzmembrán domének pedig az intracelluláris tér felé nyitott állapotban vannak. A nukleotid-kötő domének szeparációja és a transzmembrán domének belülről nyitott konformációs állapotának újbóli kialakulása a hidrolízis, majd az azt követő ADP és P_i felszabadulás után következik be [122].

Janas és munkatársai a *Saccharomyces cerevisiae* Mdl1p nevű ABC transzporterével végzett kísérletei szerint a katalitikus ciklus kezdetén 2 ATP molekula kötődik, melynek következtében a korábban egymástól külön vált nukleotid-kötő domének dimert formálnak. Minden általuk izolált NBD dimerben 2 nukleotid volt megfigyelhető (ATP-ATP; ATP-ADP; ADP-ADP). Eredményeik alapján feltételezték, hogy a transzporter katalitikus ciklusa során szekvenciális módon mindkét ATP elhidrolizál, melyet az inorganikus foszfát és az ADP

molekulák disszociációja után a nukleotid-kötő domének egymástól történő elválása követ. Az általuk javasolt „**processive-clamp**” modellben a nukleotid-kötő domének asszociációja és disszociációja a kötött nukleotidok típusától függ [169].

Egyes tanulmányok szerint a két nukleotid-kötő domén a katalitikus ciklus során folyamatos kapcsolatban van egymással és sohasem figyelhető meg teljes disszociációjuk. Szerintük mindez annak köszönhető, hogy a nukleotid-kötő domének által kialakított dimerben az egyik oldalon megkötött ATP hidrolízisét követően a helikális és katalitikus aldomének relatív rotációja az ADP-kötött katalitikus hely nyitását eredményezi, mely valószínűleg elégséges ahhoz, hogy lehetővé tegye a nukleotid cserét [165].

1.6.3. A katalitikus ciklus során bekövetkező konformáció változások detektálása: UIC2-kötődés

Az UIC2 egy konformáció érzékeny kötődésű monoklonális antitest, mely kezeletlen ép sejteken a sejtfelszíni Pgp molekulák 10-40 %-át ismeri fel. Az antitest összetett, konformáció érzékeny epitópját valószínűleg az 1., 3. és 4. extracelluláris hurkokon elhelyezkedő peptid szekvenciák alkotják [180]; [181]. Az UIC2 antitest Pgp-hez történő kötődésének mértéke ATP depléciónak hatására, valamint bizonyos szubsztrátok, modulátorok (pl. vinblasztin, CsA) jelenlétében megnő [182]. Ugyanakkor bakteriális toxinokkal permeabilizált Pgp⁺ sejtekkel végzett kísérletekben ADP, ATP vagy nem hidrolizáló ATP analógok (pl. AMP-PMP) jelenlétében nukleotid koncentráció-függő módon csökken a sejtek UIC2-reaktivitása [183]. A foszfát analógok (pl. vanadát, berillium-fluorid) az ATP hidrolízisét követő katalitikus átmeneti állapotban csapdázzák a Pgp molekulákat, mely konformert szintén nem ismeri fel az UIC2 antitest [183]; [184]. Ezek a megfigyelések a Pgp katalitikus ciklusa során lejátszódó konformáció változásokra és a különböző konformációs állapotok eltérő UIC2 affinitására utalnak.

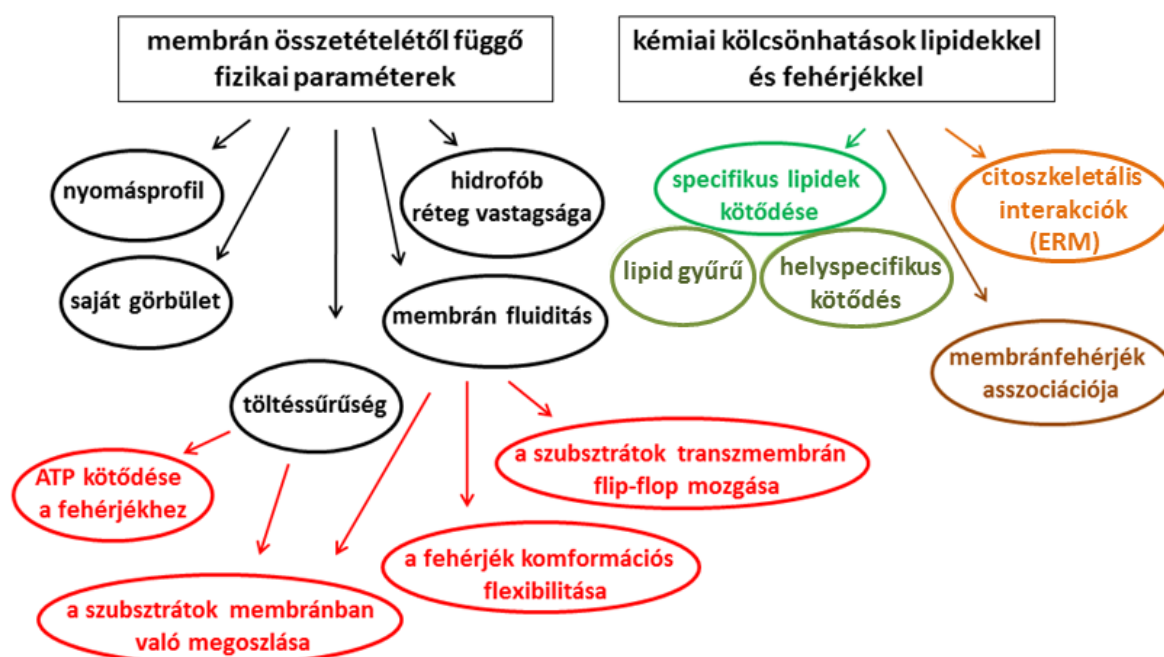
1.7. A Pgp mint transzmembrán fehérje

1.7.1. A Pgp membrán mikrokörnyezete

Általánosságban elmondható, hogy a membrán fizikai és kémiai paraméterei befolyásolják a bennük elhelyezkedő fehérjék és transzporterek működését [185]. A Pgp, mint transzmembrán fehérje funkciója is szorosan kapcsolódik az öt beágyazó lipid kettősréteghez, ahonnan szubsztrátjait is összegyűjti. A membrán mikrokörnyezet fizikai és kémiai tulajdonságai befolyásolják a fehérje konformáció változásait, transzport aktivitását,

szubsztrátjainak megoszlását a lipid kettősrétegben, valamint kölcsönhatásukat a transzporter szubsztrát kötőhelyével (**8. ábra**).

Ezen kívül a membrán a transzporter ATP kötését és hidrolízisét is befolyásolhatja, közvetlenül a nukleotid-kötő doménekkel (NBD-k) történő interakció révén vagy közvetetten a transzporter transzmembrán régióinak stabilizálásával [108]. Érdekes megfigyelés ezzel kapcsolatban, hogy a Pgp ATPáz aktivitásának különböző drogok általi stimulációját vagy gátlását a fehérje lipid környezete is befolyásolja [187].



8. ábra: A biológiai membránok legfontosabb jellemzői, melyek hatással lehetnek az általuk beágyazott fehérjék működésére [186]; [108]. Piros körök szimbolizálják azokat a membrán összetételétől függő fizikai paraméterek által meghatározott/befolyásolt folyamatokat, melyek elsősorban a membrán transzporterek (és ABC transzporterek) működésére vannak hatással.

A Pgp tisztítása során a vele szoros kölcsönhatásban lévő membrán lipidek („annular lipids” = „lipid belt” = „lipid gyűrű”) eltávolítása inaktíválja a fehérjét [188]; [189]; [190]. Például 10 mM CHAPS detergenssel történő tisztítása során a Pgp megtart kb. 53-56 szorosan kötött lipid molekulát, mely elegendő a fehérje aktivitásának megőrzéséhez [150]. Azonban más detergenssek (pl. TX-100, digitonin, SDS) már jóval alacsonyabb koncentrációban inaktíválják a Pgp-t és egyéb membrán fehérjéket is. Ebből arra következtettek, hogy a membránon átívelő transzmembrán hélixek lipidek általi stabilizálása esszenciális a nukleotid-kötő domének katalitikus aktivitásához vagy az utóbb említett domének funkcionális és struktúrális integritása függhet a foszfolipidek jelenlététől.

A Pgp-nek mint transzmembrán fehérjének, valamint szubsztrátjainak membránnal való szoros kapcsolata feltételezi, hogy a pumpafunkciót a membrán biofizikai tulajdonságai is erőteljesen befolyásolják. A sejtmembrán fázisátalakulási hőmérséklet (T_m) feletti folyadékkristályos, és a fázisátalakulási hőmérséklet alatti gél fázisának strukturális rendezettsége, fluiditása és a sejtmembránt felépítő lipidek diffúzió sebessége eltérő [191]. Annak érdekében, hogy a membrán ezen tulajdonságainak a Pgp általi transzport folyamatokra gyakorolt hatását megvizsgálják, *Clay* és *Sharom* három, szerkezetében teljesen eltérő Pgp szubsztrátot (LDS-751, H33342, MK-571) vizsgált. Eredményeikből kiderült, hogy mindhárom molekula membránban való megoszlásának a folyadékkristályos fázis kedvezett, ugyanakkor gél fázisban nagyobb affinitással kötődtek a Pgp-hez [191]. Hasonlóképpen, más Pgp szubsztrátok pl. a vinblasztin, verapamil és daunorubicin Pgp-hez való affinitása is nagyobb volt a gél fázisban annak ellenére, hogy a drogok membránban történő feldúsulása gél fázisban lényegesen alacsonyabb mértékű volt [106]. A fenti megfigyelések logikus magyarázata az lehet, hogy a szubsztrátok a Pgp-hez való kötődéskor elhagyják a lipid kettősréteget, ezért egy kevésbé kedvező szubsztrát-lipid kölcsönhatás elősegítheti a transzporterhez történő kötődésüket [108].

A Pgp általi ATP kötést és hidrolízist egyaránt befolyásolja a transzportert beágyazó membrán fázisátalakulása. A Pgp általi ATP hidrolízis aktivációs energiája, valamint az ATP kötődésre jellemző K_d érték szignifikánsan különbözik a fázisátalakulási hőmérséklet alatt és fölött. A pumpa általi ATP kötés affinitása magasabb a folyadékkristályos fázisban, míg az ATP hidrolízisre mért K_M érték a rigid gél fázisban alacsonyabb [108]; [192]. Valószínűleg ez annak köszönhető, hogy a nukleotid-kötő domének konformációját és konformáció változásait, így a nukleotidok kötődését és hidrolízisét is befolyásolja a membrán fluiditása és rendezettsége [108].

Az állati sejtek plazmamembránjának egyik fő lipid komponense a koleszterin, mely kitölti a foszfolipidek közötti hézagokat [193]; [194], így csökkenti a membrán permeabilitását különösen a magasabb molekulásúlyú molekulákra nézve. Ezzel összhangban, modell membránokban a koleszterin jelenléte csökkentette bizonyos a Pgp-vel kölcsönható vegyületek pl. a ciklosporin A (CsA) behatolását a lipid kettősrétegbe, míg annak kivonása metil- β -ciklodextrinnel növelte a vinkrisztin felvételét mind a Pgp-t expresszáló, mind pedig a kontroll sejtekbe [195].

A Pgp működéséhez a koleszterin jelenléte a membránban nem esszenciális, melyet alátámasztanak azok a megfigyelések, melyek szerint a koleszterin szegény Sf9 (*Spodoptera*

frugiperda, rovarsejt) membránokba és különböző szintetikus foszfolipidekből felépülő, de koleszterint nem tartalmazó lipid vezikulákba ágyazott tisztított fehérjék szintén aktívak [196]; [147]. Azonban vannak arra vonatkozó megfigyelések, hogy a koleszterin modulálja a Pgp alap és szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitását is. Például Ueda K. munkacsoportja megfigyelte, hogy a koleszterin jelenléte a membránban növeli a kis molekulású drogok Pgp-hez való affinitását (<500 Da), nincs hatással a 800-900 Da-os drogok kötődésére és gátolja a nagy molekulású (>1000 Da) szubsztrátok kötődését. A szerzők egy olyan modellt javasolnak, melyben a koleszterin vagy a kisméretű szubsztráttal együtt bekötődve kitölti a drogkötő helyet, vagy allosztérikusan beszűkíti azt, elősegítve ezáltal a kis molekulású szubsztrátok transzportját [196]. Ezzel ellentétben, vannak olyan adatok is melyek szerint a koleszterin nem változtatja meg szignifikánsan sem a nicardipin (480 Da), sem az XR9576 (647 Da) kötődési affinitását a Pgp-hez [197].

Összességében elmondható, hogy a membrán fizikai és kémiai tulajdonságai sokrétűen befolyásolják a Pgp ATP kötését és hidrolízisét, valamint a szubsztrát drogok felhalmozódását a membránban, bejutását a Pgp drogkötő helyére és végül transzportját a sejtekből [198]. Így a sejtmembrán tulajdonságainak változtatása ígéretes megközelítés lehet a multidrog rezisztencia mérsékelésére vagy legyőzésére a klinikai gyakorlatban [108].

1.7.2. A Pgp megjelenése a „raft” és „nem-raft” membrán mikrodoménekben

A sejtmembrán egy magasan szervezett dinamikus struktúra, melyet a két membrán lemez eltérő lipid összetétele mellett a membrán síkjában is jelentős oldalirányú heterogenitás jellemez [199]; [200]; [201]. Bizonyos laterális membrán mikrodomének (pl. klatrin burkos vezikulák, kaveolák) jellegzetes elektronmikroszkópos struktúrájuk és speciális fehérje alkotóelemeik révén jól elkülöníthetőek, míg más mikrodomének, mint például az ún. „lipid raftok” = lipid tutajok [199]; [201] általában nem felismerhetőek elektronmikroszkópos felvételeken, azonban magas GPI (glikozil-foszfatidil-inozitol)-kihorgonyozott fehérje, koleszterin és glikoszfingolipid tartalmuk miatt különböznek a membrán egyéb régióitól [200]; [201]; [202]; [203]; [204]. Funkciójukat tekintve a „lipid raftok” és a kaveolák részt vesznek a jelátvitelben, a transzportban és a „membrán trafficking” folyamatokban egyaránt [205].

A „lipid raftok” vizsgálata dinamikus struktúrájának köszönhetően rendkívül nehéz feladat. Elektron paramágneses rezonancia (EPR) vizsgálatok segítségével meghatározható a raftokban lévő lipidek féléletideje, míg egyedi molekulák pályáját nyomon követve („single

particle tracking”) tanulmányozható a „raft” domének fehérjékkel történő kölcsönhatása [206]; [207]; [208]. Mindkét mérési technika segítségével kb. 100 ns-nak becsülik a „lipid raftok” féléletidejét. A „lipid raftok” nagyon rövid féléletideje többféleképpen magyarázható. Egyrészt a koleszterin, szfingomielin és a telítetlen foszfolipidek asszociátumai fiziológias hőmérsékleten hajlamosak a feloszlásra, majd az újra egyesülésre [209], másrészt a „raftok” egymással történő nagymértékű asszociációját bizonyos biológiai folyamatok, mint az endocitózis és a vezikuláris transzport is gátolják [210].

A „lipid raftok” 5-20 nm átmérőjűek, méretüket és dinamikájukat azonban a velük kölcsönhatásban lévő fehérjék is befolyásolják. A nagyobb „raft” struktúrákra hosszabb féléletidő jellemző [210]. Szerkezetük nem homogén, egy struktúrált, TX-100 (nem-ionos detergens) rezisztens központi, valamint egy kevésbé struktúrált TX-100 által oldható, de enyhébb detergensekben pl. Brij 98-ban nem oldható külső régióból állnak, mely fokozatosan a rendezetlen folyadékkristályos membrán fázisba megy át [200]; [211].

Lavie és munkatársai [212] bizonyították elsőként a Pgp TX-100 detergens rezisztens mikrodoménekkel való asszociációját 1998-ban. Orlowski és munkatársa [213] tovább vizsgálták a Pgp és a lipid raftok közötti asszociációt, és azt találták, hogy függ a sejttípustól és a raftok izolálására alkalmazott detergens típusától is. Az általános nézet szerint a Pgp nem, vagy kevésbé jelentős mértékben asszociálódik a TX-100 rezisztens mikrodoménekkel, inkább a Brij96 vagy Lubrol rezisztens mikrodoménekben található meg.

Detergens-mentes „lipid raft” izolálás során, mely a sejtek karbonát pufferben történő szonikálásán alapul, a Pgp részleges vagy erős asszociációját tapasztalták a „lipid raftokkal” [214]. A Pgp hiánya a klasszikus TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekben összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a transzporter sok sejttípusban a nem-kaveoláris „lipid raftokban” van jelen [215] és közvetlenül nem hat kölcsön a kaveolinnal, mely a raftok speciális alcsoportjának, a TX-100 detergennel izolálható kaveoláknak a fő komponense [216]. Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy a Pgp és a kaveolin fizikailag kölcsönhat egymással azokban a sejttípusokban, ahol a Pgp részlegesen a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekben lokalizálódik [217]; [218]; [212]. Munkacsoportunk korábban kidolgozott egy egyszerű áramlási citometriás detergens rezisztencia tesztet (FCDR) [219], mely alkalmas a membránfehérjék detergens rezisztens membrán mikrodoménekkel és a citoszkeletonnal való asszociációjának vizsgálatára [220]; [221] és megállapította, hogy számos sejtvonal esetében a sejtfelszíni Pgp molekulák 10-50 %-a TX-100 rezisztens

„raftokban” és/vagy kaveolákban található [222]; [223], míg a fennmaradó hányaduk a TX-100 oldható membrán régiókban helyezkedik el.

A Pgp-k heterogén elhelyezkedését figyelembe véve fontos kérdés, hogy membrán mikrodomén lokalizációjuk és működésük között van-e kapcsolat. A különböző membrán mikrodoménekben elhelyezkedő Pgp-k eltérő működésére utal az a megfigyelés, hogy a verapamil (454 Da) a koleszterinben gazdag detergens-rezisztens membrán régiókban elhelyezkedő Pgp-k ATPáz aktivitását stimulálja, míg a detergens oldható membrán régiókban találhatókét gátolja [213]. Vannak olyan elképzelések is, melyek szerint kizárólag a raft asszociált Pgp molekulák aktívak, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a pumpa „raft” és „nem-raft” környezetben való megoszlásának befolyásolásán keresztül módosítható a fehérje működése [224].

A raftok stabilizálásában szerepe lehet bizonyos „raft” asszociált fehérjék citoszkeletonnal való kapcsolatának, mely kapcsoló fehérjék közreműködésével jön létre. Kimutatták, hogy a Pgp aktinnal való kapcsolata meghatározó szereppel bír a humán oszteoszarkóma sejtek multidrog rezisztenciájának kialakításában [225]. Ezen kölcsönhatás létrejöttéhez elengedhetetlen fontosságú a citoszkeleton kapcsoló molekulájának az ezrinnek a jelenléte, mely kialakítja a Pgp-ezrin-aktin komplexet és lehetővé teszi a Pgp stabil lokalizációját a membrán „lipid raftjaiban” [225].

Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy különböző szöveti eredetű sejtek membránjában az UIC2 konformáció érzékeny antitest kötődése által megkülönböztethető Pgp populációk eltérő mértékű asszociációt mutatnak a TX-100 rezisztens „raftokhoz” és a citoszkeletonhoz [223]. A Pgp molekulák és a „raftok” közötti strukturális és funkcionális kapcsolatra vonatkozóan újabb ismeretekkel szolgálhat a két Pgp populáció arányát befolyásoló tényezők tanulmányozása, valamint annak a felderítése, hogy katalitikusan aktívak-e és eltérő membrán mikrodomén lokalizációjuk befolyásolja-e további sorsukat a „trafficking” folyamatok során.

2. Célkitűzések

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

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

Munkánk második szakaszában az élő sejteken detektálható különböző raft és citoszkeleton asszociáltságot mutató UIC2-reaktív és UIC2-t nemkötő Pgp populációk tulajdonságait vizsgáltuk.

5. Mivel permeabilizált sejteken szoros korreláció van az ATP koncentráció és az UIC2-reaktív és az UIC2 antitestet nemkötő konformációk aránya között, ezért intakt sejteken is vizsgálni kívántuk az intracelluláris ATP koncentráció és az UIC2 antitest kötődése közötti kapcsolatot az ATP szint modulálása során.
6. Tanulmányozni kívántuk az intracelluláris ATP koncentráció változások hatását a Pgp molekulák detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára.
7. Vizsgálni kívántuk azt is, hogy a Pgp mindkét oldali ATP-kötőhelyének Walker A szekvenciájában előidézett mutáció, mely a transzporter UIC2-reaktív konformációban történő megrekedését és katalitikus aktivitásának megszűnését eredményezi befolyásolja-e a fehérje membrán mikrodoménekhez való asszociációját.

- 8.** Követni kívántuk az UIC2 konformáció szenzitív kötődésű antitest kötődése alapján megkülönböztetett két Pgp populáció internalizációját és ennek függését a membrán koleszterin tartalmától.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

A sejt kultúra tenyésztőfolyadék, annak kiegészítői és a kísérletekben alkalmazott vegyszerek a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország), míg az Alexa 488 és 647 szukcinimidil-észter fluoreszcens festékek a Life Technologies-től (Carlsbad, CA, USA) származtak. Az UIC2, 15D3 és 4E3 Pgp-ellenes monoklonális antitesteket hibridóma felülúszóból preparáltuk affinitás kromatográfiát alkalmazva. A hibridóma sejtvonalakat az American Type Culture Collections-től vásároltuk (Manassas, VA, USA). Az antitestek tisztaságát SDS/PAGE-vel ellenőriztük. Az UIC2, 15D3 és 4E3 antitesteket Alexa 647 szukcinimidil-észterrel (A647) jelöltük és a nem kötődött festéket Sephadex G-50 oszlopon gélfiltrációval távolítottuk el. A festék-fehérje arány 3 körüli érték volt minden antitest preparátum esetében. A RAMEB (random metilezett β -ciklodextrin) és koleszterinnel töltött származéka (Kol-RAMEB) a Cyclolab Cyclodextrin R&D Laboratórium Kft. ajándéka volt.

3.2. Módszerek

3.2.1. Sejttenyésztés

Vizsgálataink során az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat, valamint a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat és annak vinblasztinnal történő szelekcióval előállított Pgp⁺ változatát (KB-V1) [226]; [227] használtuk. A sejtvonalakat Michael Gottesman (NIH, Bethesda, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A sejteket 10% hővel-inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS, Gibco, Budapest), 2 mM L-glutamint és 0,1 mg/ml penicillin-streptomycin koktélt tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékban növesztettük 37 °C-on, 5 %-os CO₂ atmoszférában, 95 %-os páratartalom mellett. Azokhoz a kísérletekhez, amelyekhez rendkívül magas expressziós szintű (kb. 1×10^6 Pgp/ sejt) sejtekre volt szükség a vad típusú Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejtvonalat a magas expressziós szint fenntartására 670 nM doxorubicint tartalmazó tápoldatban növesztettük, míg a KB-V1 sejteket 180 nM vinblasztin mellett tenyésztettük. A sejteket felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő folyadékba helyeztük át. Sejtvonalaink mindegyike a felülethez tapadva növekedett, melyekből tripszines (0,5 mg/ml tripszin, 0,2 mg/ml EDTA PBS-ben, 2 perc, 37 °C) kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót felhasználásuk előtt. A sejtek mycoplasma mentességét rendszeresen ellenőriztük MycoAlert teszt (Lonza, Budapest, Magyarország) segítségével.

3.2.2. Transzgénikus sejtvonalak létrehozása

A vad típusú, K433M, K1076M és K433M/K1076M dupla mutáns MDR1/P-glikoproteint stabilan expresszáló sejtvonalakokat a *Sleeping Beauty* (SB) transzpozon-alapú génbeviteli rendszer segítségével hozták létre kollaborációs partnereink Dr. Türk Dóra és Dr. Szakács Gergely [228]; [229]. A különálló transzkripció kazettákban lévő, CAG promóter által hajtott EGFP cDNS-t és puromycin rezisztencia gént (PURO) tartalmazó *Sleeping Beauty* (SB) transzpozon vektort Dr. Orbán Tamás bocsátotta rendelkezésünkre (Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont, Budapest) [230].

Az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejteket a gyári leírásnak megfelelően ko-transzfectálták a SB transzpozáz és SB transzpozon vektor konstrukciókkal Lipofectamin2000 reagens segítségével (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A fehérje expressziót a humán MDR1/Pgp-re specifikus MRK16 (Abnova GmbH, Heidelberg, Germany), vagy 15D3 monoklonális antitestekkel történő jelölés alapján mérték.

A fehérjét homogén módon expresszáló sejtpopulációk létrehozására a szortolást a transzfectió után két héttel ismét elvégeztük, vagy alacsony expresszió esetén többször is megismételtük. A vad típusú Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejteket, ha bizonyos kísérletekben az expressziós szint további növelésére volt szükség doxorubicin mellett tartottuk fenn.

A FRET-alapú ATP szenzort tartalmazó plazmidot [231], mely Hiromi Imamura ajándéka (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japán) Dr. Szilágyi Orsolya és Dr. Imre László lentivírus vektor segítségével fejezték ki a KB-V1 sejteken.

3.2.3. Sejtek permeabilizálása *Staphylococcus aureus* α -toxinnal

A *Staphylococcus aureus* α -toxin a sejtek plazmamembránjában gyűrűs szerkezetű hexamereket hoz létre, amelyek kisméretű vízoldható molekulák számára – beleértve a nukleotidokat is – átjárhatóak [232]. A sejteket (1×10^7 sejt/ml) 4 μ g/ml α -toxinnal glükózmentes foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) 1% marha szérumból (BSA) jelenlétében 37 °C-on 30 percig kezeltük [183]. Ilyen körülmények között a kezelés végére a sejtek kb. 50 %-a permeabilizálódott, mutatott propidium-jodid (PI) pozitivitást. A reakciót 40 ml 37 °C-os PBS-sel állítottuk le, majd szobahőmérsékleten centrifugáltuk ($2250 \times g$; 7 perc). A nem-kötődött toxin eltávolítására a sejteket háromszor mostuk, majd a sejt pelletet PBS-ben vettük fel a további kezelésekhez.

3.2.4. Nukleotid és antitest kötődés affinitásának meghatározása

Az antitest kötődési görbék felvételéhez a *Staphylococcus aureus* α -toxinnal permeabilizált sejteket (1×10^6 sejt/ml) ATP/Mg²⁺ különböző koncentrációival előkezeltük 20 percig, ezt követően különböző koncentrációkban alkalmazott UIC2-A647 antitesttel jelöltük 30 percig a nukleotidok eltávolítása nélkül. A permeabilizált sejtek fluoreszcencia intenzitását az antitest koncentráció függvényében ábrázoltuk és három független mérés görbéinek illesztésével meghatároztuk a látszólagos UIC2 kötődési affinitás értékeket (K_U). A 0 mM ATP jelenlétében kapott látszólagos UIC2 kötődési affinitást tekintettük az antitest kötődés K_d értékének.

A permeabilizált sejteket (1×10^6 sejt/ml) nukleotidok széles koncentráció tartományban történő alkalmazásával 20 percig előinkubáltuk, majd mosás nélkül tovább inkubáltuk 10 μ g/ml A647-konjugált UIC2 monoklonális antitesttel (UIC2-A647) 37 °C-on 30 percig. Az UIC2 antitest kötődése ATP/Mg²⁺ jelenlétében reverzibilis folyamat, így az antitestet kvázi telítő koncentrációban alkalmaztuk ($5K_{d, UIC2}$). Ilyen körülmények között az inkubálás időtartama elegendő volt az egyensúlyi UIC2 kötődés eléréséhez. Az ATP hidrolízisét lehetővé tevő körülmények esetén kisebb sejt koncentrációt ($1,5 \times 10^4$ sejt/ml) alkalmaztunk az ATP fogyasztás csökkentése érdekében. Ilyen feltételek mellett a permeabilizált sejtekben a Pgp ATPáz aktivitása és az endogén ATPázok jelenléte nem csökkentette szignifikánsan a mintában lévő ATP koncentrációt (az ATP kevesebb mint 3%-a alakult ADP-vé).

Az ATP hidrolízis gátlása érdekében a permeabilizált sejtekhez az ATP-t 5 mM EDTA jelenlétében és Mg²⁺ hiányában adtuk. Hasonlóképpen tudtuk gátolni a hidrolízist, ha az ATP helyett nem-hidrolizáló ATP analóg AMP-PNP/Mg²⁺-ot alkalmaztunk vagy a kísérletet ATP/Mg²⁺ jelenlétében, de 4 °C-on végeztük. Az utóbbi esetben az A647-konjugált UIC2 monoklonális antitesttel történő 45 perces jelölést is 4 °C-on hajtottuk végre. Az antitesttel történő jelölést követően a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel (2250 $\times$ g; 4 °C; 7 perc). A permeabilizált PI-pozitív sejtek áramlási citométerrel mért UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását a nukleotid koncentráció függvényében ábrázoltuk. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a Pgp nukleotidokhoz való látszólagos affinitását (K_A), az ábrázolt mérési pontokat négy-paraméteres Hill-függvény segítségével illesztettük, ahol az F_{min} és F_{max} értékek a minimum és maximális fluoreszcencia intenzitást jelentik, n pedig a Hill-koefficiens:

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

3.2.5. Nukleotid csapdázás („trappelés”)

A Pgp hidrolízist követő katalitikus átmeneti állapotát ATP/Mg²⁺ és vanadát (V_i) vagy ATP/Mg²⁺ és berillium-fluorid (BeF_x) együttes alkalmazásával 37 °C-on stabilizáltuk. A permeabilizált sejteket 100 μM (vad-típus) vagy 500 μM (K433M és K1076M) ATP/Mg²⁺-ot és 0,5 mM vanadátot (13,5 mM-os desztillált vízben oldott áttetsző Na-ortovanadát törzsoldatból) [233] vagy BeF_x-ot (200 μM BeSO₄ és 1 mM NaF) tartalmazó PBS-ben szubsztrátok jelenlétében vagy azok hiányában inkubáltuk 37 °C-on. A kezelés során meghatározott időközönként 500 μl mintát vettünk, melyeket kétszer mostunk 5 ml jéghideg PBS-sel, mely vanadátot vagy berillium-fluoridot tartalmazott a korábban alkalmazott koncentrációban, majd 10 μg/ml UIC2-A647 monoklonális antitesttel 4 °C-on 45 percig jelöltük. A minták UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitását (F) az idő (t) függvényében ábrázoltuk. Az UIC2-reaktív Pgp konformáció fél-életidejét reprezentáló $t_{1/2}$ értékeket a mérési pontokra illesztett exponenciális függvény alapján számítottuk ki:

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

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

3.2.6. A vanadát által csapdázott poszt-hidrolízis állapotból való visszatérés

Az ATP/Mg²⁺ (100 μM a vad-típus és 500 μM a féloldali Walker A mutánsok esetében) és 0,5 mM V_i kezeléssel az ATP hidrolízisét követő állapotban csapdázott Pgp molekulákat tartalmazó permeabilizált sejteket 3-szor mostuk jéghideg PBS-sel, majd ATP és szubsztrátok (verapamil, vinblasztin) jelenlétében és hiányában 37 °C-on inkubáltuk 200 μM N-etilmaleimidet (NEM) tartalmazó PBS-ben (NEM-PBS). Utóbbira azért volt szükség, hogy elkerüljük a diszulfid-hidak kialakulását a Walker A ciszteinek között [234]. Meghatározott időközönként 2×10⁵ sejtet tartalmazó 500 μl-es mintákat vettünk, melyeket 5 ml NEM-PBS-sel kétszer mostunk és 37 °C-on 15 percig vagy 4 °C-on 45 percig jelöltünk 10 μg/ml UIC2-A647 antitesttel. Az inkubálás végén a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel, majd jégen tartottuk az áramlási citometriás mérés kezdetéig.

3.2.7. Detergens elúciós eljárás (FCDR, áramlási citometriás detergens-rezisztencia teszt)

A mintákat különböző antitestekkel (pl. UIC2-A647, 4E3-A647 vagy 15D3-A647 Pgp elleni antitestek) történő jelölést követően két részre osztottuk. A minták feléhez 0,5% végkoncentrációban jéghideg TX-100 oldatot (TX-100-PBS) adtunk, majd 20 percen keresztül jégen tartottuk, végül 4% paraformaldehid oldattal (PFA) fixáltuk 4°C-on. A sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük. A Pgp molekulák TX-100 rezisztens raftokhoz való asszociációjának jellemzésére a TX-100-zal kezelt minták fluoreszcencia intenzitását a TX-100-zal nem kezelt minták fluoreszcencia intenzitásának százalékos arányában fejeztük ki [222].

3.2.8. A sejtek koleszterin tartalmának módosítása

A sejteket 1×10^6 sejt/ml koncentrációban vettük fel 8 mM glükózt tartalmazó PBS-ben (gl-PBS). A különböző antitestekkel (UIC2-A647, 15D3-A647) történő jelölést követően a sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálásához a sejteket 5 mM random metilezett- β -ciklodextrinnel (RAMEB, koleszterin kivonás) vagy ennek koleszterinnel képzett komplexével (Kol-RAMEB, koleszterin feltöltés) kezeltük 37 °C-on 20 percig, majd kétszer mostuk PBS-sel.

3.2.9. Az intracelluláris ATP koncentráció változás hatásának vizsgálata a Pgp molekulák plazmamembrán expressziójára

A sejteket (2×10^5 sejt/300 μ l) különböző ideig (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 perc) éhezettük 10 mM 2-deoxi-D-glükóz-t tartalmazó PBS-ben, majd kétszer mostuk PBS-sel. A mosást követően 60 μ g/ml 4E3-A647 anti-Pgp antitesttel jelöltük a sejteket 37 °C-on 30 percig, majd az éhezés időtartamának függvényében ábrázoltuk az áramlási citometriás mérésekkel kapott 4E3-A647 fluoreszcencia intenzitásokat.

3.2.10. A Pgp UIC2-reaktivitása és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata

Az intakt sejtek intracelluláris ATP koncentráció változásainak követésére FRET-alapú ATP szenzort kifejező KB-V1 sejteket használtunk. A sejteket meghatározott időtartamig (0, 5 és 10 perc) kezeltük 10 mM 2-deoxi-D-glükózzal (2DG) PBS-ben az intracelluláris ATP szint csökkentésére. 5 perc elteltével a minták egy részéhez 20 mM glükózt adtunk és tovább inkubáltuk a sejteket 0 és 5 perces időtartamokig. Az i.c. ATP szint

teljes kimerítéséhez 30 mM 2DG-zal és 10 mM kálium-cianiddal kezeltük a sejteket. Kontroll mintákat is készítettünk, melyeket 0 mM illetve 8 mM glükózt tartalmazó PBS-ben inkubáltunk, de nem kezeltünk 2-deoxi-D-glükózzal, míg másokat permeabilizáltunk és vizsgáltuk az UIC2-A647 antitest kötődését.

Az UIC2 fluoreszcencia intenzitás meghatározásához a kezelések végén a sejteket 100 µg/ml UIC2-A647 antitesttel jelöltük 37 °C-on 3 percig, majd a mintákat alaposan mostuk és az antitest kötődését, valamint az ATP szenzor fluoreszcens jelét áramlási citométerben mértük.

3.2.11. A Pgp molekulák internalizációjának vizsgálata

A Pgp specifikus antitesttel (UIC2-A647, 15D3-A647 és 4E3-A647) megjelölt mintákat kettéosztva a minta párok egyikét gl-PBS-sel, a másikat alacsony pH-jú oldattal (0.5 M NaCl, 0.1 M glicin, pH=2.5 [235]) mostuk szobahőmérsékleten, majd ismét gl-PBS-ben vettük fel. Az alacsony pH-jú oldat eltávolítja a sejtfelszíni Pgp-khez kötődött antitestet, így az alacsony pH-jú oldattal illetve PBS-sel mosott minták fluoreszcencia intenzitásainak hányadosa megadja az internalizálódott Pgp hányadot.

3.2.12. Áramlási citometriás mérés

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

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

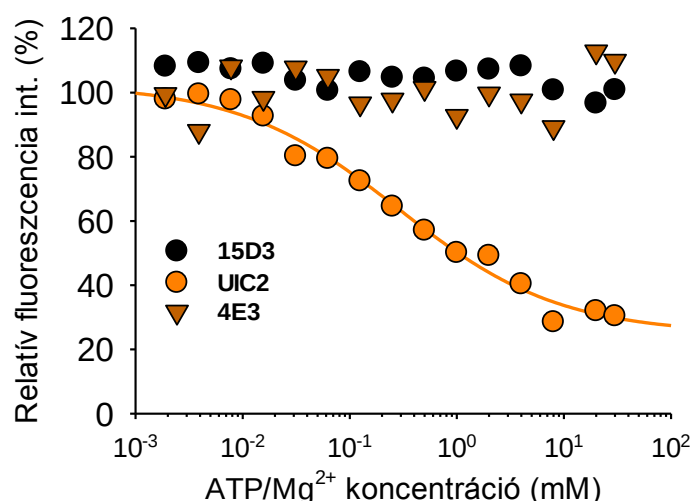
3.2.13. Statisztikai analízis

Adatainkat a SigmaStat (3.1 verzió, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program segítségével analizáltuk, az ábrákon az átlag $\pm$ SD értékeket mutatjuk. Két csoport összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük, a statisztikai szignifikanciát 3 vagy több csoport esetében variancia-analízissel (ANOVA) állapítottuk meg Holm-Sidak *post-hoc* teszt alkalmazásával. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $P < 0,05$ volt.

4. Eredmények I.: A Pgp konformáció változásainak vizsgálata

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

A sejtmembrán mérsékelt permeabilizálása *Staphylococcus aureus* alfa-toxin vagy streptolizin segítségével lehetővé teszi a sejt intracelluláris környezetének módosítását anélkül, hogy megzavarná a membrán szerkezetét, valamint a membránban elhelyezkedő transzporterek működését. Ennek a módszernek köszönhetően lehetőségünk nyílt a nukleotidok kimosására a sejtekből és a Pgp molekulák ATP-mentes, magas UIC2-affinitású konformációban való szinkronizálására [183]. Ugyanakkor a permeabilizált sejtek ATP/Mg²⁺-mal történő feltöltése Druley és munkatársai eredményeihez hasonlóan [183] koncentrációfüggő módon indukálta a Pgp molekulák alacsony UIC2-affinitású konformációs állapotba történő átfordulását (9. ábra és 13. ábra A).

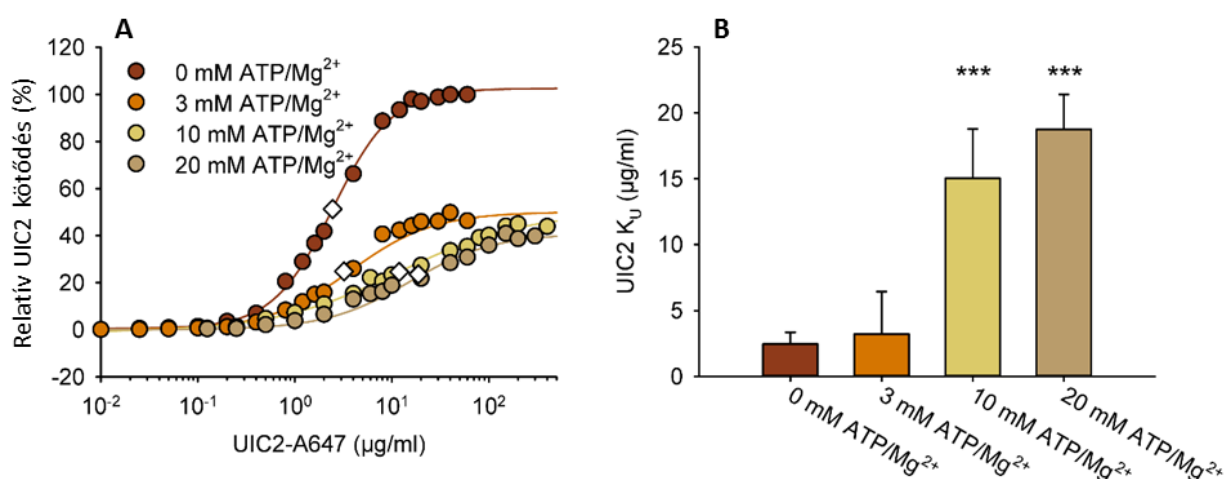


9. ábra: Az UIC2, 15D3 és 4E3 antitestek kötődése a vad típusú Pgp-hez *Staphylococcus aureus* α -toxinnal permeabilizált NIH 3T3 MDR1 sejteken ATP/Mg²⁺ jelenlétében. A permeabilizált sejteket ATP/Mg²⁺ különböző koncentrációival előkezeltük 20 percig, ezt követően 10 μ g/ml UIC2, 15 μ g/ml 15D3-A647 vagy 60 μ g/ml 4E3-A647 antitesttel jelöltük 30 percig a nukleotidok eltávolítása nélkül. Az antitestek fluoreszcencia intenzitását a nukleotid koncentráció függvényében ábráztuk, a nukleotid kötődés látszólagos affinitása (K_A) és a Hill-koefficiens meghatározásához a mérési pontokra négy-paraméteres Hill-függvényt illesztettünk (lásd Anyagok és Módszerek).

Az UIC2 kötődési görbék illesztése során az ATP kötődés látszólagos affinitására kapott érték ($K_A=0,25 \pm 0,16$ mM) megegyezett a transzporter ATP affinitására vonatkozó korábbi irodalmi adatokkal [236]; [147] és hasonló volt az ATP hidrolízis K_M értékéhez, melyet munkacsoportunk Pgp⁺ NIH 3T3 sejtekből preparált membrán mintákon mért ([237]-es közlemény; kiegészítő információk 1. ábra).

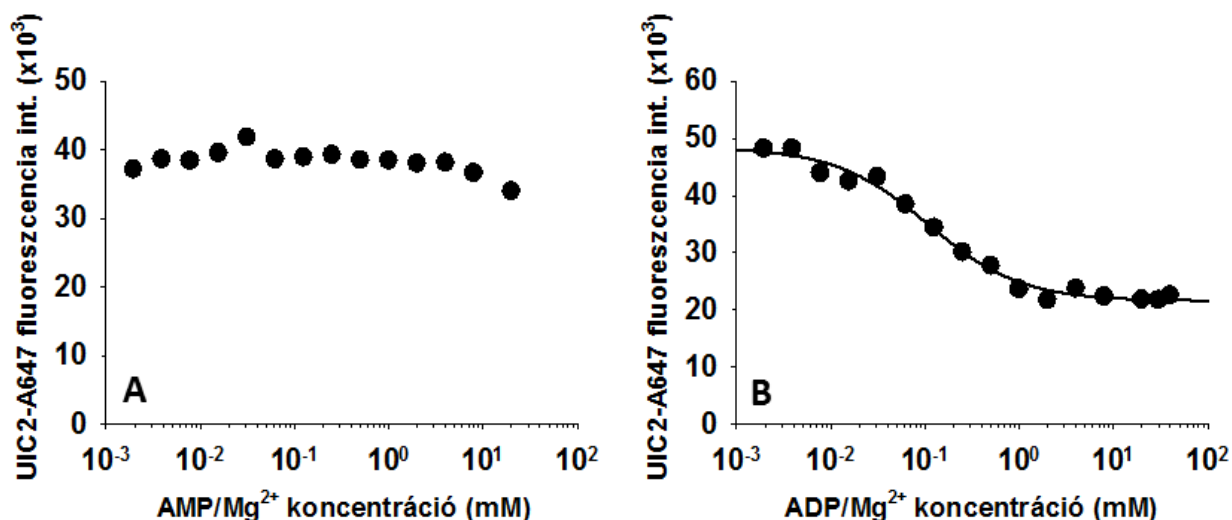
Az UIC2 antitesttel ellentétben a 15D3 és 4E3 monoklonális antitestek kötődése nem változott meg magas ATP/Mg²⁺ koncentrációk mellett sem (9. ábra), bár ezek az antitestek az UIC2-vel kompetálnak és részlegesen átfedő extracelluláris epitópokat ismernek föl a Pgp molekulán [180]; [238]. Ezen tulajdonságukat kihasználva kísérleteinkben kontroll antitestként használtuk őket az UIC2 antitest által detektált konformáció változások tényleges bekövetkezésének bizonyítására.

A 9. ábrán bemutatott kísérletben, mindhárom antitestet kvázi telítő koncentrációban alkalmaztuk, melyet korábban intakt sejteken végzett antitest kötődési méréseink alapján határoztunk meg. További kísérleteink során permeabilizált sejteken különböző ATP koncentrációk alkalmazása mellett vettünk fel antitest kötődési görbéket (10. ábra A). Az antitest kötődési görbék illesztése során meghatároztuk az UIC2 antitest látszólagos kötődési affinitását (K_U; 10. ábra B). Eredményeink azt mutatták, hogy magas ATP koncentrációk mellett 5-9-szeresére nőtt a K_U érték az ATP/Mg²⁺ távollétében mért kb. 2 µg/ml értékhez képest.



10. ábra: Reprezentatív UIC2 antitest kötődési görbék (A) és az UIC2 antitest látszólagos kötődési affinitása (K_U) (B) különböző ATP/Mg²⁺ koncentrációk mellett vad típusú Pgp-t kifejező permeabilizált NIH 3T3 MDR1 sejteken. A *Staphylococcus aureus* α-toxinnal permeabilizált sejteket ATP/Mg²⁺ különböző koncentrációival előkezeltük 20 percig, ezt követően különböző koncentrációkban alkalmazva UIC2-A647 antitesttel jelöltük 30 percig a nukleotidok eltávolítása nélkül. A sejtek fluoreszcencia intenzitását az antitest koncentráció függvényében ábrázoltuk és három független mérés görbéinek illesztésével meghatároztuk a látszólagos UIC2 kötődési affinitás értékeket (K_U; átlag ± SD); (0 mM ATP/Mg²⁺-kezeléshez képest tapasztalt szignifikáns K_U változás: ***, (P<0.001)).

Kontroll kísérleteinkben megvizsgáltuk az UIC2 antitest által detektált konformáció változások nukleotid specificitását is. Az adenosin-monofoszfát (AMP/Mg²⁺) alkalmazása nem idézett elő UIC2 antitesttel detektálható konformáció változást a Pgp molekulákban (**11. ábra A**). Feltételezhető, hogy az egyetlen foszfát csoporttal rendelkező adenosin-monofoszfát szerkezetéből adódóan képtelen a nukleotid-kötő domének dimerizációjának kiváltására, és így a TMD-kben végbemenő UIC2 antitest által detektálható konformáció változás előidézésére is [239].

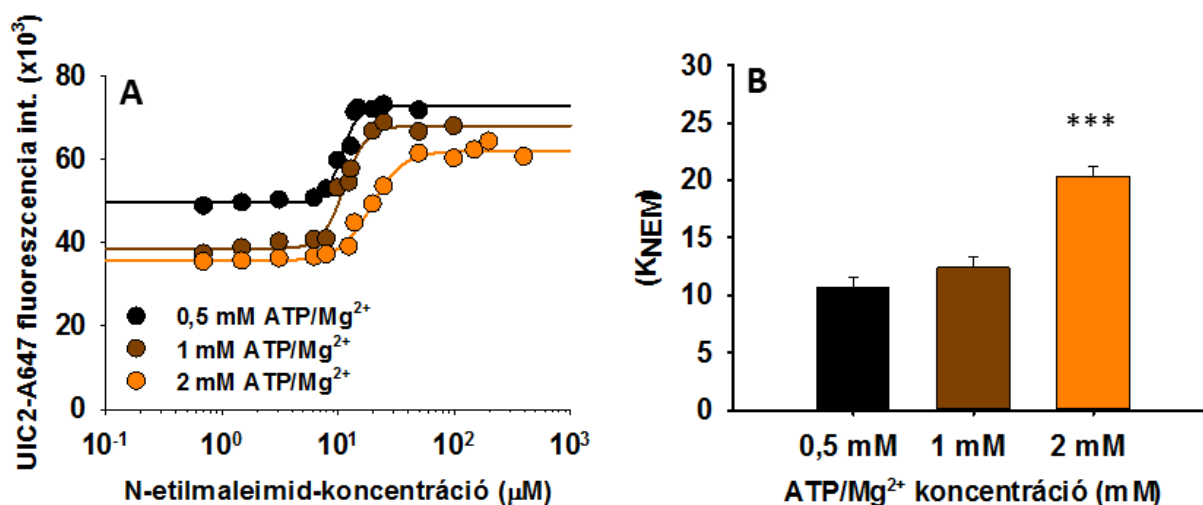


11. ábra: Az AMP/Mg²⁺ (A) és az ADP/Mg²⁺ (B) UIC2 kötődésre gyakorolt hatása. A permeabilizált sejteket 37°C-on 20 percig előkezeltük különböző koncentrációkban alkalmazott AMP/Mg²⁺ vagy ADP/Mg²⁺-mal, majd UIC2-A647 antitesttel tovább jelöltük 30 percig a nukleotidok eltávolítása nélkül. Az ábrán reprezentatív görbéket mutatunk be 3 független kísérletből.

Ellenben az adenosin-difoszfáttal (ADP/Mg²⁺) végzett kísérleteink azt bizonyítják, hogy a nukleotidok ezen típusa az ATP-hez hasonló módon konformáció változást idéz elő (**11. ábra B**).

Az N-etilmaleimid (NEM) egy szulfhidril reagens, mely kovalensen kötődik a Pgp Walker A motívumában található Cys aminosavhoz, amennyiben a nukleotid kötőhely üres vagy ADP-t tartalmaz [173], így a Pgp molekulákat ATP-t nemkötő UIC2 reaktív állapotban csapdázza. Mivel az ATP β és γ -foszfátja a Walker A motívummal lép kölcsönhatásba, a nukleotid kötőhely ATP-vel történő telítése koncentráció-függő módon gátolja az NEM kötődését, amit az UIC2 kötődési görbék jobbra tolódása (**12. ábra A**), valamint a NEM kötődés látszólagos affinitásának csökkenése, azaz a K_{NEM} érték növekedése jelez (**12. ábra B**). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a nukleotid kötőhelyben bekövetkező változások

TMD konformáció változásokat hoznak létre, melyet az általunk használt UIC2 kötődésen alapuló kísérleti rendszer segítségével képesek vagyunk detektálni.

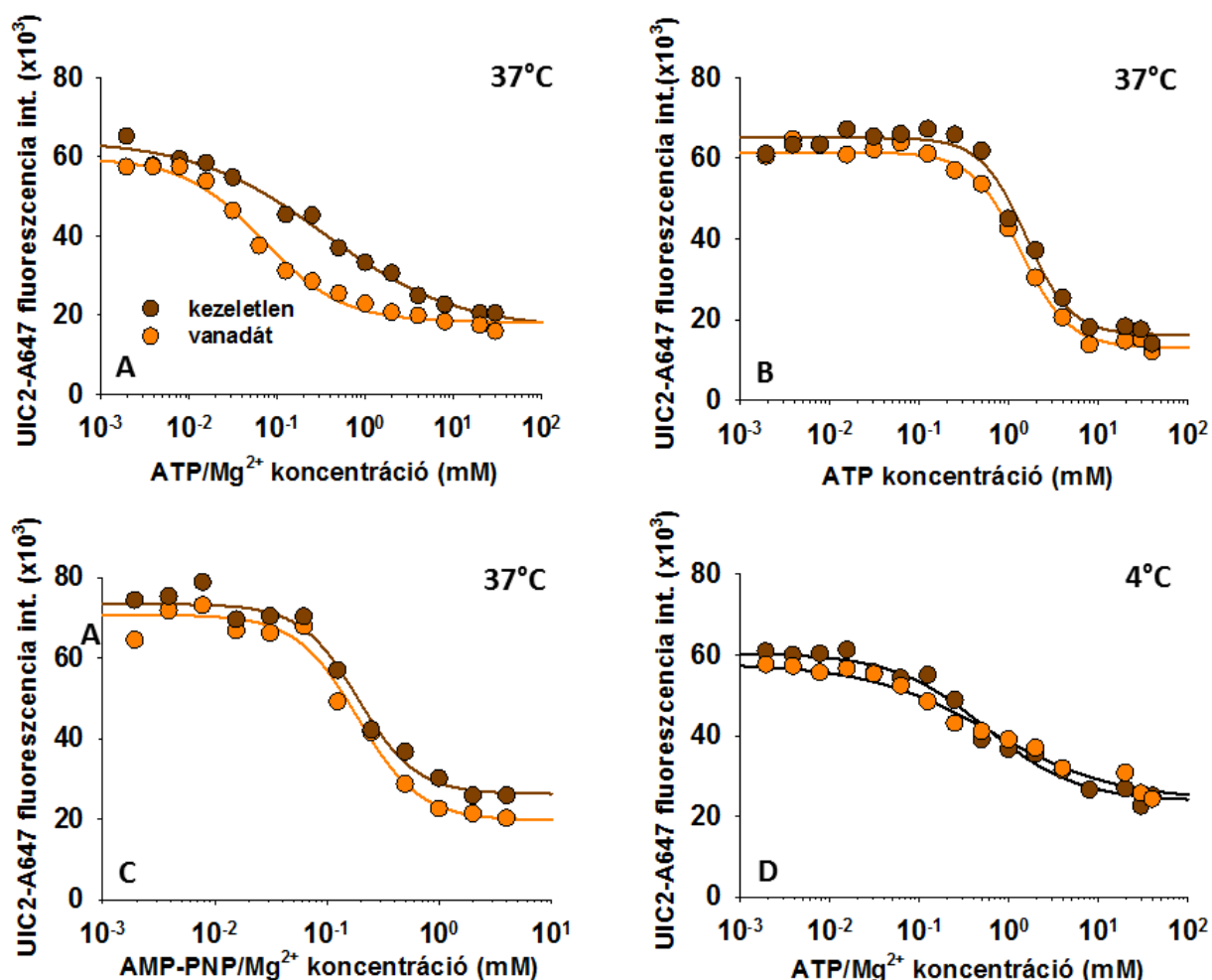


12. ábra: Az ATP/Mg²⁺ koncentráció-függő módon csökkenti az N-etilmaleimid (NEM) Pgp-hez való kötődésének látszólagos affinitását. A *Staphylococcus aureus* alfa-toxinnal permeabilizált NIH 3T3 MDR1 sejteket ATP-vel inkubáltuk (0,5; 1; 2 mM) 20 percig, 37°C-on, majd az egyes mintákat N-etilmaleimid (NEM) különböző koncentrációival kezeltük 20 percig, 37°C-on. Az UIC2-A647 antitesttel történő jelölést (30 perc, 37°C) követően a fluoreszcencia intenzitást az NEM koncentráció függvényében ábrázoltuk, és az NEM kötődés látszólagos affinitásának (K_{NEM}) meghatározásához a mérési pontokat négy-paraméteres Hill-egyenlet segítségével illesztettük. A **B** ábra 3 független mérés átlagát $\pm$ SD mutatja. *** $P < 0,001$.

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

Az ATP hidrolízisét akadályozó kísérleti körülmények között: az ATP-t Mg²⁺ hiányában alkalmazva (ATP + EDTA; **13. ábra B**) vagy a kísérletet jégen végrehajtva (**13. ábra D**) szintén végbement a Pgp-ek az extracelluláris tér felé nyitott (UIC2-mentes) állapotba átvivő konformáció változás (**3. táblázat**), de ez magasabb ATP koncentrációk mellett következett be, mint a hidrolízist megengedő körülmények között. A foszfát analóg anionok - ortovanadát (V_i) vagy BeF_x - képesek a Pgp transzport funkciójának és ATPáz ciklusának gátlására azáltal, hogy stabilan bekötődnek a hidrolízis során felszabaduló γ -foszfát helyére. Az így kialakuló stabil Pgp-ADP-vanadát komplex (Pgp-ADP- V_i) kizárólag olyan feltételek mellett jöhet létre, amely megengedi legalább egy ATP molekula hidrolízisét [164]; [176].

A nem-hidrolizáló ATP analóg AMP-PNP szintén konformáció változást indukált a TMD-kben, melyet az UIC2 kötődés nukleotid koncentráció-függő csökkenése jelzett (13. ábra C).



13. ábra. Az UIC2 monoklonális antitest kötődése a vad típusú Pgp-hez ATP/Mg²⁺ jelenlétében (A), ATP jelenlétében Mg²⁺-mentes közegben (B), AMP-PNP/Mg²⁺ jelenlétében 37 °C-on (C) vagy ATP/Mg²⁺ jelenlétében 4 °C-on (D). A *Staphylococcus aureus* alfa-toxinnal permeabilizált vad típusú Pgp-t kifejező NIH 3T3 sejteket nukleotidok különböző koncentrációival kezeltük 20 percig, ezt követően UIC2-A647 antitesttel jelöltük 30 (A–C) vagy 45 percig (D) a nukleotidok eltávolítása nélkül. Vanadáttal (V_i) történő kezelés esetében a nem-csapdázódott nukleotidokat az antitest adása előtt kimostuk és az antitesttel történő jelölést 0,5 mM V_i jelenlétében jégén végeztük. Az UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitást a nukleotid koncentráció függvényében ábrázoltuk, a nukleotid kötődés látszólagos affinitásának (K_A) és a Hill-koefficiens értékek meghatározásához a mérési pontokat négy-paraméteres Hill-egyenlet segítségével illesztettük (lásd Anyagok és Módszerek).

Nukleotid	Kezelés (ábra)	K_A (mM $\pm$ SD)	Hill-koeff. ($\pm$ SD)	Feltételezett katalitikus lépés(ek) a hidrolitikus ciklus során
ATP (n=59)	37 °C, Mg ²⁺ (13. ábra A)	0,25 $\pm$ 0,16	0,77 $\pm$ 0,20	hidrolízis
ATP (n=3)	37 °C, <i>nincs</i> Mg ²⁺ (13. ábra B)	1,92 $\pm$ 0,33	1,60 $\pm$ 0,22	nukleotid kötődés és NBD dimerizáció
ATP (n=7)	4 °C, Mg ²⁺ (13. ábra D)	2,70 $\pm$ 1,83	0,66 $\pm$ 0,17	nukleotid kötődés és NBD dimerizáció
AMP-PNP (n=17)	37 °C, Mg ²⁺ (13. ábra C)	0,27 $\pm$ 0,14	1,75 $\pm$ 0,34	nukleotid kötődés és NBD dimerizáció
ATP +Vi (n=11)	37 °C, Mg ²⁺ (13. ábra A)	0,07 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,15	poszt-hidrolízis állapot

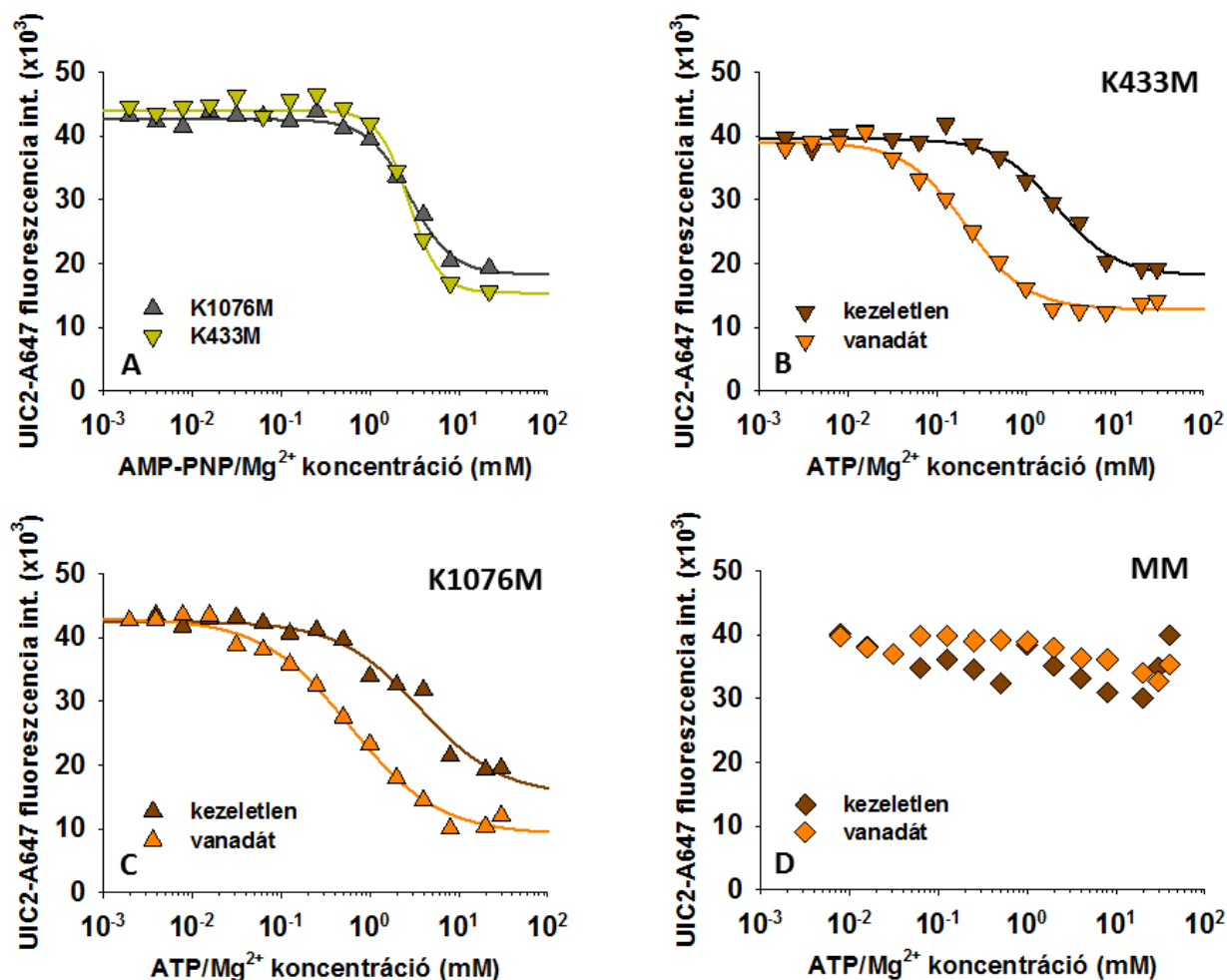
3. táblázat. A vad típusú Pgp nukleotid kötésének látszólagos affinitás (K_A) és Hill-koefficiens értékei. (NBD: nukleotid-kötő domén)

A Pgp-ADP-V_i stabil komplex létrejöttének megfelelően, az ATP hidrolízisét lehetővé tevő körülmények között kísérleteinkben a vanadát növelte a nukleotid kötődés látszólagos affinitását (37°C, ATP/Mg²⁺ jelenléte; **13. ábra A** és **3. táblázat**), míg ugyanez nem volt megfigyelhető az ATP hidrolízisét kizáró kísérleti körülmények között (**13. ábrák B–D**).

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

A Walker A szekvencia (GXXGXGKS/T), más néven P-loop (foszfát-kötő hurok) kiterjedt kötéseket alakít ki az ATP terminális foszfátjával (ld. Irodalmi áttekintés **4. ábra**) [134]. Irodalmi adatok szerint a Walker A szekvenciában található konzervált lizin aminosav metioninra történő cseréje az ATPáz aktivitás gátlását okozza [240]; [241]; [114]. Ahhoz, hogy tanulmányozhassuk a Pgp N- és C-terminális nukleotid-kötő doménjeinek Walker A szekvenciáiban található lizin aminosavak cseréjének hatását a fehérje transzmembrán doménjeinek konformáció változásaira, a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli rendszer segítségével olyan emlős sejt vonalakat hoztunk létre (NIH 3T3 és MDCK), melyek stabilan expresszálják a vad, az egyik Walker A szekvenciában mutáns (K433M vagy K1076M) vagy mindkét oldali Walker A szekvenciában mutációt hordozó Pgp molekulákat (K433M/K1076M). Korábbi tanulmányokkal egyezően eredményeink azt mutatták, hogy

kizárólag az egyik nukleotid-kötő domént érintő mutációk nem akadályozták a nukleotidok kötődését [114], melyet a K433M és K1076M Pgp variánsok UIC2-reaktivitásának csökkenése jelzett AMP-PNP (14. ábra A) és ATP jelenlétében (14. ábra B és C).



14. ábra. Az UIC2 monoklonális antitest kötődése egyik (K433M, K1076M) vagy mindkét Walker A szekvenciában mutációt hordozó (MM) Pgp molekulákhoz AMP-PNP/Mg²⁺ (A) vagy ATP/Mg²⁺ (B–D) és vanadát hiányában vagy jelenlétében. A permeabilizált sejteket nukleotidok különböző koncentrációival kezeltük 37 °C-on 20 percig és ezt követően 30 percig jelöltük UIC2-A647 antitesttel a nukleotidok eltávolítása nélkül. Vanadáttal (V_i) történő kezelés esetében a nem-csapdázódott nukleotidokat az antitest adása előtt kimostuk és az antitesttel történő jelölést is V_i jelenlétében jégen végeztük. Az UIC2-A647 fluoreszcencia intenzitást a nukleotid koncentráció függvényében ábrázoltuk, a nukleotid kötődés látszólagos affinitása (K_A) és a Hill-koefficiens meghatározásához a mérési pontokat négy-paraméteres Hill-egyenlet segítségével illesztettük (lásd Anyagok és Módszerek).

Kollaborációs partnereink korábban kimutatták, hogy az egyik Walker A szekvencia lizin aminosavát érintő mutáció ellenére (K433M vagy K1076M) a Pgp-k a foszfát analóg alumínium-fluorid jelenlétében jelölődtek [α - ^{32}P]-8-azido-ATP-vel [242], ami ezen mutánsok részleges katalitikus aktivitását jelezheti. Jelen munkánk során azt tapasztaltuk, hogy vanadát jelenlétében az egyetlen lizin mutációt hordozó fehérjék ATP-hez való látszólagos affinitása 5-10-szeresére nőtt a csak ATP-vel kezelt mintákhoz képest (**14. ábra B és C, 4. táblázat**). Mivel a vanadáttal vagy BeF_x -dal történő komplex-képződés előfeltétele az ATP hidrolízis bekövetkezése, eredményeinkből arra következtetünk, hogy az egyik molekula-felet érintő lizin mutáció ellenére is bekövetkezik az ATP hidrolízise. Ezzel ellentétben, mindkét molekula-fél Walker A lizinjét érintő szimultán mutáció stabil UIC2-kötő konformációt eredményez, mely nukleotidok jelenlétében is megmarad (**14. ábra D**).

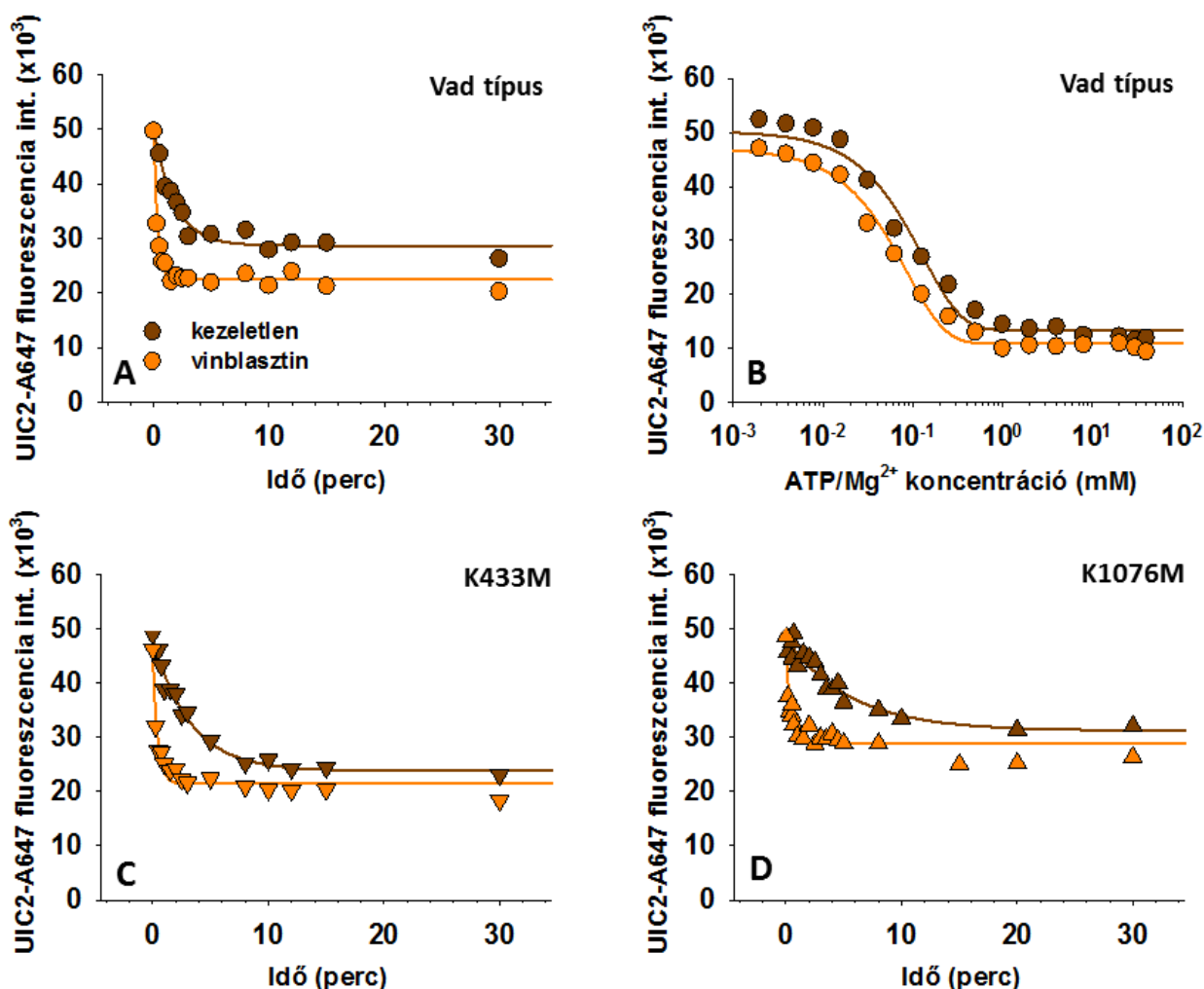
Nukleotid	K_A (mM)			Hill-koefficiens		
	Vad típus	K433M	K1076M	Vad típus	K433M	K1076M
ATP	$0,25 \pm 0,16$	$2,08 \pm 1,04$ $P < 0,001$	$2,03 \pm 0,91$ $P < 0,001$	$0,77 \pm 0,20$	$0,90 \pm 0,32$ $P = 0,158$	$0,89 \pm 0,33$ $P = 0,452$
AMP-PNP	$0,27 \pm 0,14$	$3,40 \pm 1,42$ $P < 0,001$	$3,01 \pm 0,92$ $P < 0,001$	$1,75 \pm 0,34$	$2,06 \pm 0,29$ $P = 0,261$	$1,68 \pm 0,23$ $P = 0,698$
ATP + V_i	$0,07 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,28$ $P = 0,002$	$0,80 \pm 0,33$ $P < 0,001$	$0,92 \pm 0,15$	$1,08 \pm 0,24$ $P = 0,257$	$1,03 \pm 0,28$ $P = 0,582$

4. táblázat. A vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k (K433M és K1076M) nukleotid kötésének látszólagos affinitás (K_A) és Hill-koefficiens értékei. A féloldali mutánsok esetében kapott átlag értékeket a vad típusú Pgp-nél megfigyelt értékekhez hasonlítottuk. A P értékeket egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) és az azt követő Holm-Sidak *post-hoc* teszt segítségével határoztuk meg. A táblázatban az átlag $\pm$ SD értékeket tüntettük fel ($n \geq 4$).

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

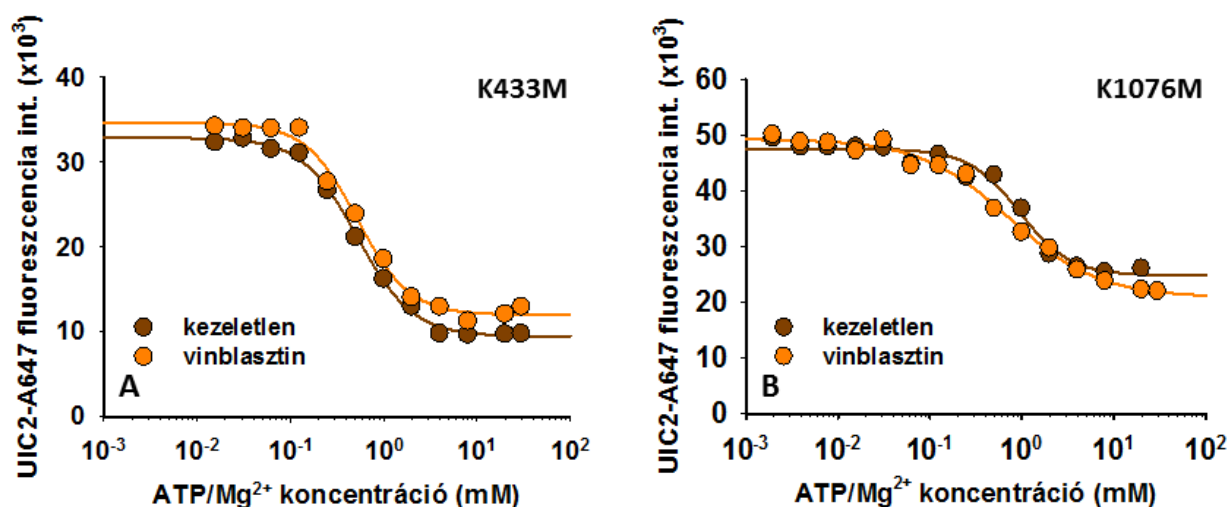
A Pgp katalitikus ciklusának sebessége („turnover rate”) transzportált szubsztrátok pl. verapamil, vinblasztin jelenlétében jelentősen felgyorsul, amit a fehérje ATPáz aktivitásának szubsztrátok jelenlétében mért fokozódása jelez (szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitás) [147]. A BeF_x vagy V_i által csapdázott poszt-hidrolitikus komplexek keletkezésének kinetikai analízise során azt tapasztaltuk, hogy az alacsony UIC2-affinitású poszt-hidrolitikus állapotban való progresszív felhalmozódás hasonló kinetikával következik be a vad típusú és

az egyik molekula-félben mutációt hordozó Pgp-k esetében. Eredményeink azt is bizonyítják, hogy Pgp szubsztrátok (verapamil, vinblasztin, rodamin 123) jelenlétében szignifikánsan felgyorsul a foszfát analógok által stabilizált átmeneti komplex képződése mind a vad típusú, mind a féloldali mutációt hordozó Pgp molekulák esetében (vinblasztinnal kapott eredményeinket a **15. A, C és D ábrák** mutatják).



15. ábra. A Pgp-ADP-BeF_x komplex kialakulásának időfüggése vad-típusú (A) és az egyik nukleotid-kötő doménben mutációt hordozó Pgp-t (K433M, K1076M) kifejező sejtekben (C,D). A permeabilizált sejteket 100 μ M (vad típus esetében) vagy 500 μ M (K433M és K1076M mutánsok esetében) ATP/Mg²⁺-mal és berillium-fluoriddal (BeF_x; 200 μ M BeSO₄ és 1 mM NaF) 37 °C-on inkubáltuk 50 μ M vinblasztin jelenlétében és hiányában, majd különböző időpontokban mintát vettünk. 200 μ M vinblasztin hatását a vad-típusú Pgp látszólagos nukleotid affinitására a **B** ábra mutatja. A permeabilizált sejteket BeF_x-dal és különböző ATP/Mg²⁺ koncentrációval kezeltük 200 μ M vinblasztin jelenlétében 20 percig 37 °C-on. Azért, hogy a formálódott Pgp-ADP-BeF_x komplexek szétesését meggátoljuk az UIC2 antitesttel való jelölést BeF_x jelenlétében, jégben végeztük az ATP/Mg²⁺ eltávolítását követően.

A szubsztrátok ATP hidrolízist fokozó hatása nem az ATP kötődés affinitásának növekedésével függ össze, mivel az ATP kötődés látszólagos affinitása a Pgp-hez még magas (200 μM -os) szubsztrát koncentrációnál sem változott meg, sem a vad típusú fehérjében (**15. ábra B**), sem pedig a féloldali Walker A mutáns transzporterekben (**16. ábra A, B**). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a Walker A szekvenciában található konzervált lizin aminosav mutációja ellenére a katalitikus ciklus képes eljutni a foszfát analógok által stabilizált lépésig, amennyiben a mutáció a fehérje két nukleotid-kötő doménjének csak az egyikét érinti.



16. ábra. 200 μM vinblasztin hatása a féloldali Walker A mutáns Pgp-k (K433M, K1076M) látszólagos nukleotid affinitására. A permeabilizált sejteket 500 μM ATP/Mg²⁺-mal és berillium-fluoriddal (BeF_x; 200 μM BeSO₄ és 1 mM NaF) inkubáltuk 37 °C-on 200 μM vinblasztin jelenlétében vagy hiányában 20 percig. Azért, hogy a formálódott Pgp-ADP-BeF_x komplexek szétesését meggátoljuk az UIC2 antitesttel való jelölést BeF_x jelenlétében, jégen végeztük az ATP/Mg²⁺ eltávolítását követően.

Az a tény, hogy viszonylag hosszú idő szükséges a BeF_x ($t_{1/2} \sim 120$ s; lásd **15. ábra** és **5. táblázat**) és V_i által stabilizált poszt-hidrolitikus komplexek képződéséhez ($t_{1/2} = 235,2 \pm 52,2$ s; $n = 6$) a ciklus teljes időtartamához viszonyítva, amely - nagyságrendileg kb. 100 ms – arra enged következtetni, hogy az anionok által stabilizált komplex rendkívül kis valószínűséggel jön létre. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy a foszfát lehasadása és a nukleotid disszociációja közötti BeF_x- vagy vanadát-“szenzitív” állapot nagyon rövid élettartamú a ciklus során.

Kezelés	BeF _x csapdázási reakció t _{1/2} értékei (perc)		
	Vad típusú Pgp	K433M	K1076M
Kontroll	2,31 ± 0,69 (n=10)	1,92 ± 0,85 (n=8)	3,36 ± 2,83 (n=7)
+ verapamil (50 µM)	0,38 ± 0,26 (n=5) <i>P</i> < 0,001	0,34 ± 0,11 (n=5) <i>P</i> < 0,001	0,29 ± 0,08 (n=6) <i>P</i> < 0,012

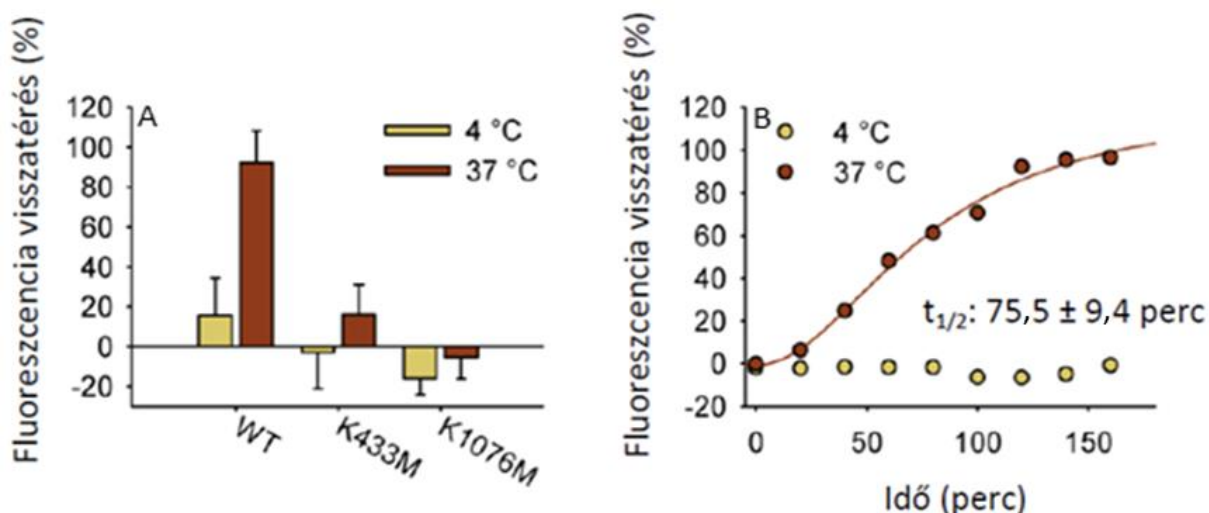
5. táblázat. Verapamil hatása a berillium-fluorid (BeF_x) által csapdázott poszt-hidrolitikus komplexek keletkezésére. A t_{1/2} értékek reprezentálják az UIC2 antitestet magas affinitással kötő Pgp konformer felezési idejét (lásd Anyagok és Módszerek). A *P* értékeket Student-féle t-próba segítségével határoztuk meg a verapamillal-kezelt és kezeletlen kontroll minták statisztikai összehasonlításával (egyoldali próba). A féloldali mutánsok t_{1/2} értékei nem különböztek szignifikánsan a vad típus esetében kapott értékektől sem a kontroll (*P*=0.229), sem a verapamillal kezelt minták esetében (*P*=0.669; ANOVA, Holm-Sidak *post-hoc* teszt).

Összességében megállapítható, hogy a féloldali Walker A mutáns fehérjék a vad-típusú Pgp-hez hasonlóan nemcsak az ATP hidrolízisére képesek, hanem átlagosan ~1200–2500 cikluson is képesek keresztül menni, mielőtt BeF_x vagy vanadát által csapdázódnak. Ebből következően, a féloldali Walker A mutánsok is rendelkeznek gyenge, de szignifikáns szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitással, melyet a mutáns transzportereket magas szinten expresszáló NIH 3T3 sejtekből preparált membrán mintákban munkacsoportunk később képes volt detektálni is ([237]-es közlemény, kiegészítő információk, 2. ábra).

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

A vanadát (vagy BeF_x) által csapdázott állapot kialakulásának időkinetikája hasonló volt a vad típusú és a féloldali mutáns Pgp-k esetében (5. táblázat), ami feltételezi, hogy az az időtartam, melyet a működő transzporter a hidrolízist követő (poszt-hidrolitikus) vanadát-szenzitív állapotban tölt hasonló a vad és féloldali Walker A mutánsoknál. Érdekes megfigyelés azonban, hogy a vanadát-csapdázott komplex szétesése gyakorlatilag nem következett be a féloldali mutánsoknál, amit az UIC2-reaktív állapotba történő visszatérés elmaradása jelzett (17. ábra A).

Bár a vanadáttal csapdázott poszt-hidrolitikus komplex rendkívül stabil, ha a vanadátot eltávolítjuk a médiumból irodalmi adatokkal összhangban megfigyelhető a komplex szétesése és a vad típusú Pgp-k rendkívül lassú ($t_{1/2}=75,5$ perc) visszatérése az UIC2-reaktív intracelluláris tér felé nyitott konformációba (17. ábra A és B).

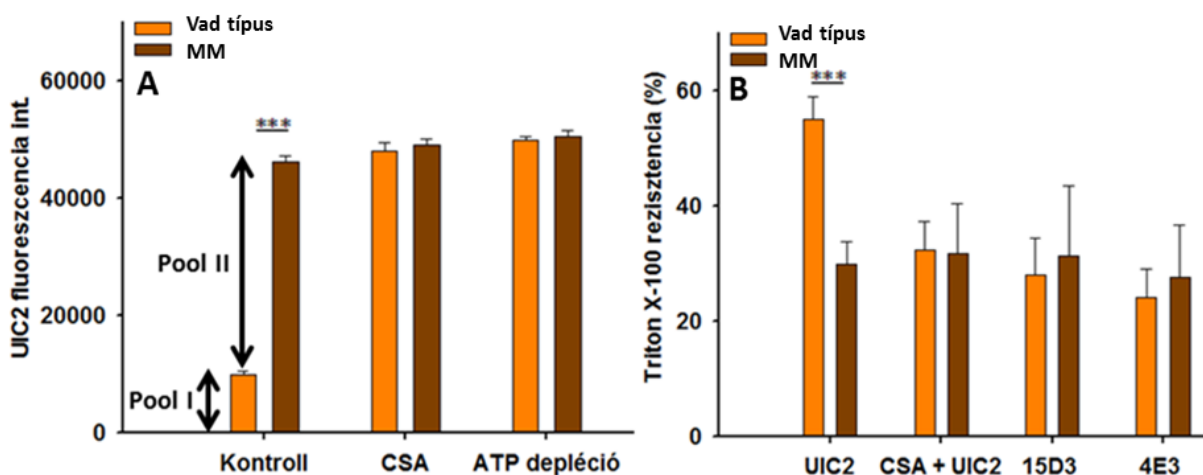


17. ábra. A vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k visszatérése a vanadáttal csapdázott poszt-hidrolitikus állapotból az UIC2 reaktív konformációba 4 °C-on és 37 °C-on. (A) A vad típusú és az egyik molekulafélben mutációt hordozó Pgp-ket kifejező *Staphylococcus aureus* alfa-toxinnal permeabilizált NIH 3T3 sejteket ATP és 500 μ M vanadát (V_i) jelenlétében inkubáltuk, hogy csapdássuk a Pgp molekulákat az ATP hidrolízist követő állapotban. Ezután a mintákat 120 percig inkubáltuk az ábrán jelzett hőmérsékleteken (4 és 37 °C) vanadát- és ATP-mentes körülmények között 50 μ M N-etilmaleimid (NEM) jelenlétében, majd UIC2 antitesttel jelöltük. Az ábra 3 független mérés átlagát $\pm$ SD mutatja. **(B)** Az ATP és vanadát kezelést követően meghatározott időpontokban mintákat vettünk, melyeket 200 μ M NEM-et tartalmazó vanadát- és ATP-mentes PBS-sel mostunk, majd UIC2 antitesttel jelöltünk (lásd Anyagok és Módszerek).

4. Eredmények II.

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

Különböző szöveti eredetű, intakt sejtek plazmamembránjában a Pgp molekulák 10-40 %-a található UIC2-reaktív konformációban, míg a többi Pgp molekula csak bizonyos szubsztrátok, modulátorok pl. ciklosporin A (CsA) jelenlétében vagy a sejtek ATP depléciója hatására képes megkötni az antitestet (**18. ábra A**, narancssárga oszlopok) [182]; [184].



18. ábra. (A) Vad típusú és mindkét ATP kötőhely Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp molekulák (MM) spontán, valamint ciklosporin A (CsA) jelenlétében és ATP depléció hatására mért UIC2 kötése. A CsA-val történő kezelést (37 °C, 10 perc) illetve az ATP kimerítést (5 mM 2-deoxi-D-glükóz és 5 mM nátrium-azid együttes alkalmazása) követően a sejteket 10 µg/ml UIC2-A647 antitesttel jelöltük 37 °C-on 30 percig. A jelölést követően a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS-sel, majd áramlási citométerben mértük. A spontán UIC2 jelölést követően mért fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan különbözik a vad típusú és a mindkét ATP-kötőhely Walker A szekvenciájában (K433M/K1076M) mutációt hordozó sejtfelszíni Pgp-k esetében ($P < 0,001$). **(B) Vad típusú és mindkét ATP-kötőhely Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp molekulák raft asszociációjának mértéke TX-100 detergens elúciót követően.** A sejteket különböző Pgp elleni antitestekkel (pl. UIC2-A647, 4E3-A647, 15D3-A647) történő jelölést követően két részre osztottuk. A minta párok egyikét jéghideg 0,5%-os TX-100 oldattal, míg a másikat PBS-sel kezeltük 20 percig, végül 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk a mintákat 4°C-on. A Pgp molekulák TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjának jellemzésére a TX-100-zal kezelt minták fluoreszcencia intenzitását a TX-100 kezelést nem kapott minták fluoreszcencia intenzitásának százalékos arányában fejeztük ki. Három független mérés átlagai $\pm$ SD. ***: $P < 0,001$.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a katalitikusan inaktív, mindkét ATP-kötőhely Walker A szekvenciájában (K433M/K1076M) mutációt hordozó sejtfelszíni Pgp-k a fenti kezelésektől

függetlenül az UIC2 antitest által felismerhető, valószínűleg ATP-mentes konformációs állapotot preferálják az élő sejtek plazmamembránjában (**18. ábra A**, barna oszlopok).

Korábbi tanulmányok és munkacsoportunk eredményei is alátámasztják, hogy különböző szöveti eredetű sejtvonalakon a sejtfelszíni Pgp molekulák 20-50 %-a rezisztens a TX-100 detergenssel történő kezelésre, így valószínűsíthető, hogy a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekben található [222]; [213]; [223].

Munkánk során először arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az UIC2-vel spontán megjelölhető („pool-I”) és az UIC2-vel csak bizonyos szubsztrátok adása mellett megjelölhető Pgp populáció („pool-II”) és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez asszociált Pgp-k között milyen kapcsolat van. Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy az UIC2-reaktív „pool-I” Pgp molekulák 50-60%-a ellenáll a TX-100 kezelésnek az áramlási citometriás detergens-rezisztencia tesztben (FCDR). Amikor az összes sejtfelszíni Pgp molekulát láthatóvá tettük 4E3 vagy 15D3 antitesttel, vagy UIC2 antitesttel CsA kezelés mellett, csak a Pgp molekulák 25-30%-a mutatott rezisztenciát a TX-100 kezeléssel szemben (**18. ábra B**, narancssárga oszlopok), és a detergens rezisztens Pgp hányad nem függött az alkalmazott antitesttől. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a vad típusú Pgp-k spontán UIC2 reaktív populációja („pool-I”) fokozott raft és citoszkeleton asszociáltságot mutat, míg a „pool-II” Pgp-k, inkább a membrán TX-100-zal oldható nem raft régiókban helyezkednek el.

Érdekes módon a mindkét ATP kötőhely Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp-k a vad típusú fehérjékhez hasonló mértékű (kb. 25-30%) detergens rezisztenciát mutattak (**18. ábra B**, barna oszlopok). Ha a kétoldali Walker A mutánsokra jellemző UIC2-reaktív, valószínűleg ATP-mentes konformáció kedvezne a fehérje raft-beli megjelenésének a kétoldali Walker A mutáns Pgp-ket expresszáló sejtek esetében a vad típusúhoz képest nagyobb mértékű detergens rezisztenciát várnánk.

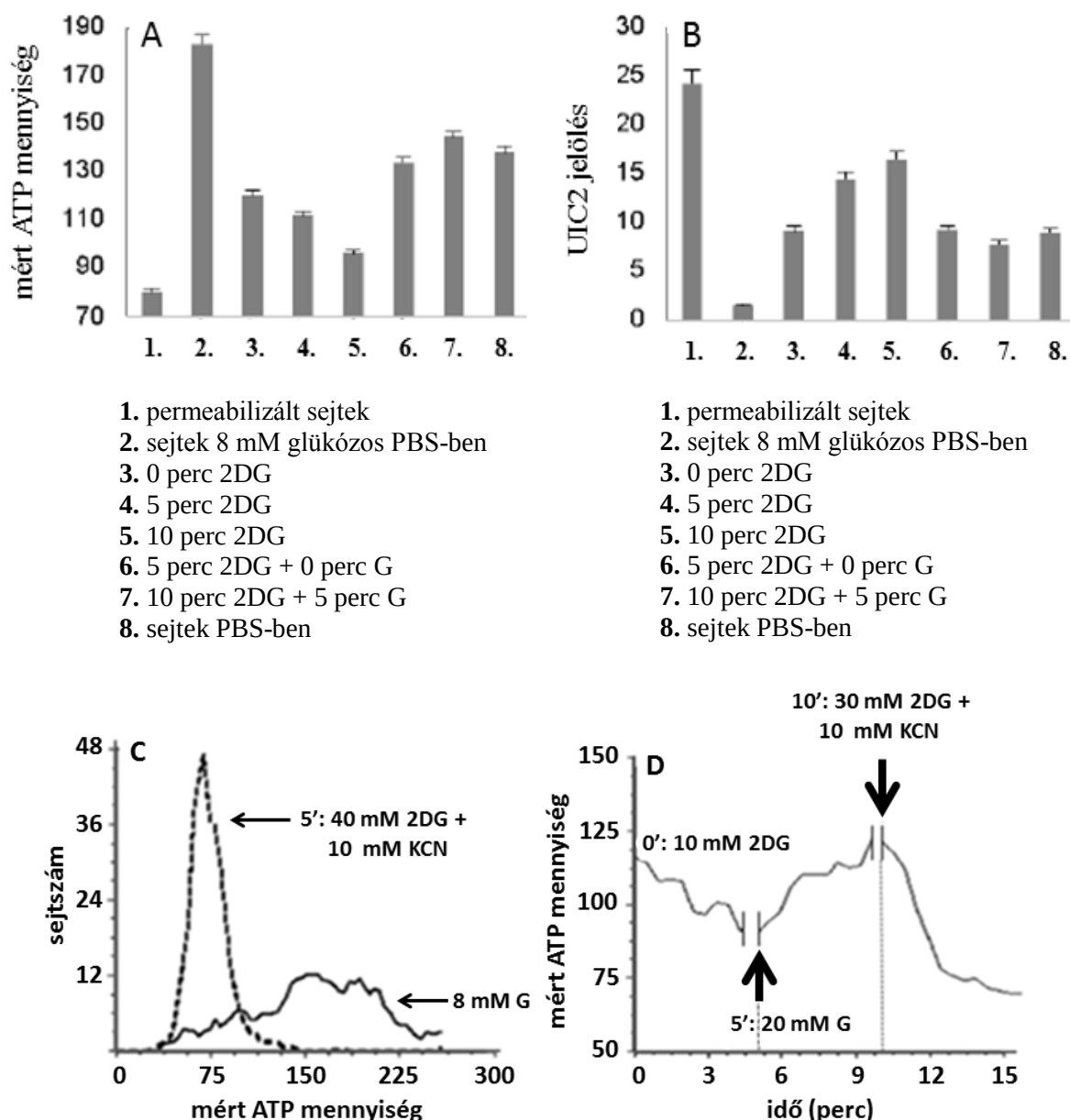
4.7. Az UIC2 antitest Pgp-hez való kötődése és az i.c. ATP szint közötti összefüggés vizsgálata élő sejtekben

További kísérleteinkben vad típusú Pgp-t kifejező ép sejteken is megvizsgáltuk, hogy az intracelluláris ATP koncentráció és így a Pgp molekulák ATP telítettsége befolyásolja-e a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjukat.

Kísérleteinkben a nem metabolizálható 2-deoxi-D-glükóz és glükóz alkalmazásával moduláltuk az intracelluláris ATP szintet, melynek változásait egy YFP (sárga-fluoreszcens fehérje) alapú intracelluláris ATP szenzor segítségével detektáltuk, valamint mértük a

sejtfelszíni Pgp molekulák ATP-mentes UIC2-reaktív és nukleotid-kötött UIC2-t nem-kötő konformációi közötti megoszlását is.

Kísérleteink bizonyították, hogy a 2-deoxi-D-glükóz a kezelés időtartamának növelésével párhuzamosan csökkenti az intracelluláris ATP szintet, ezáltal növeli az UIC2-reaktív Pgp-k arányát. Tehát a permeabilizált sejtekhez hasonlóan (**13. ábra A**) az intakt sejteken is szoros korreláció van a sejtek ATP szintje és a sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2 reaktivitása között (**19. ábra A és B**).

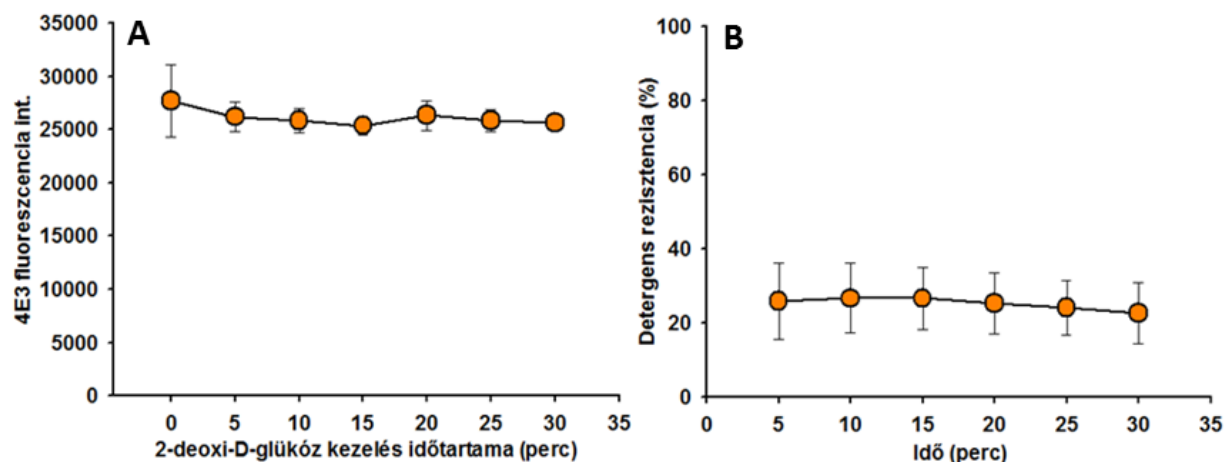


19. ábra. Intakt KB-V1 sejtek intracelluláris ATP koncentráció változásainak követése FRET-alapú ATP szenzor segítségével (A, C, D) és a sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2 reaktivitásának paralel vizsgálata (B). Az ATP szenzort kifejező sejteket meghatározott időtartamig (0, 5 és 10 perc)

kezeltük 10 mM 2-deoxi-D-glükózzal (2DG) az intracelluláris ATP szint csökkentésére. 5 perc elteltével a minták egy részéhez 20 mM glükózt (G) adtunk és tovább inkubáltuk a sejteket. A kezeléseket követően a sejteket 37 °C-on 3 percig jelöltük UIC2-A647 (100 µg/ml) antitesttel, majd jéghideg PBS-sel mostuk. **C:** A *pontozott vonal* a KB-V1 sejtek ATP koncentráció eloszlását reprezentálja 5 perc kezelést követően 40 mM 2DG-zal és 10 mM kálium-cianiddal (KCN), a *folytonos vonal* pedig egy olyan sejtpopuláció ATP koncentráció eloszlását reprezentálja, melyet 8 mM glükózt tartalmazó PBS-ben tartottunk. **D:** Az intracelluláris ATP koncentráció folyamatos nyomonkövetése áramlási citométerben. 0 időpontban 10 mM 2DG-t adtunk a sejtekhez, majd 5 perc elteltével 20 mM glükózt, újabb 5 perc múlva pedig 30 mM 2DG-t és 10 mM KCN-ot adtunk a mintákhoz az i.c. ATP szint teljes kimerítéséhez. Az oszlopok 3 párhuzamos minta átlag $\pm$ SD értékeit ábrázolják.

4.8. Az intracelluláris ATP koncentráció változások hatása a Pgp molekulák detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára

Párhuzamos kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az intracelluláris ATP koncentráció rövid idejű csökkentése (maximum 30 perc) befolyásolja-e a plazmamembránban expresszált Pgp molekulák mennyiségét, valamint van-e hatása a Pgp molekulák detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára. Ezekhez a kísérleteinkhez a 4E3 nem konformáció érzékeny anti-Pgp antitestet használtuk, mely telítő koncentrációban alkalmazva valamennyi sejtfelszíni Pgp molekulát képes megjelölni.



20. ábra. Az ATP deplécio időtartamának hatása a Pgp molekulák plazmamembrán expressziójára (A) és detergens rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjára KB-V1 sejtekben (B). A sejteket különböző ideig éhezettük 10 mM 2-deoxi-D-glükóz kezeléssel, majd kétszer mostuk PBS-ben. A mosást követően 60 µg/ml 4E3-A647 anti-Pgp antitesttel jelöltünk 37 °C-on 30 percig, majd az éhezés időtartamának függvényében ábrázoltuk az áramlási citometriás mérésekkel kapott fluoreszcencia intenzitásokat (A). A detergens kioldási kísérletekben a 4E3-A647 antitesttel megjelölt mintákat kettéosztottuk, majd a minták felét 0,5% TX-100 detergenssel kezeltük 4°C-on 20 percig, ezt követően a mintapárokat 4% PFA-val fixáltuk. A sejtek 4E3-A647

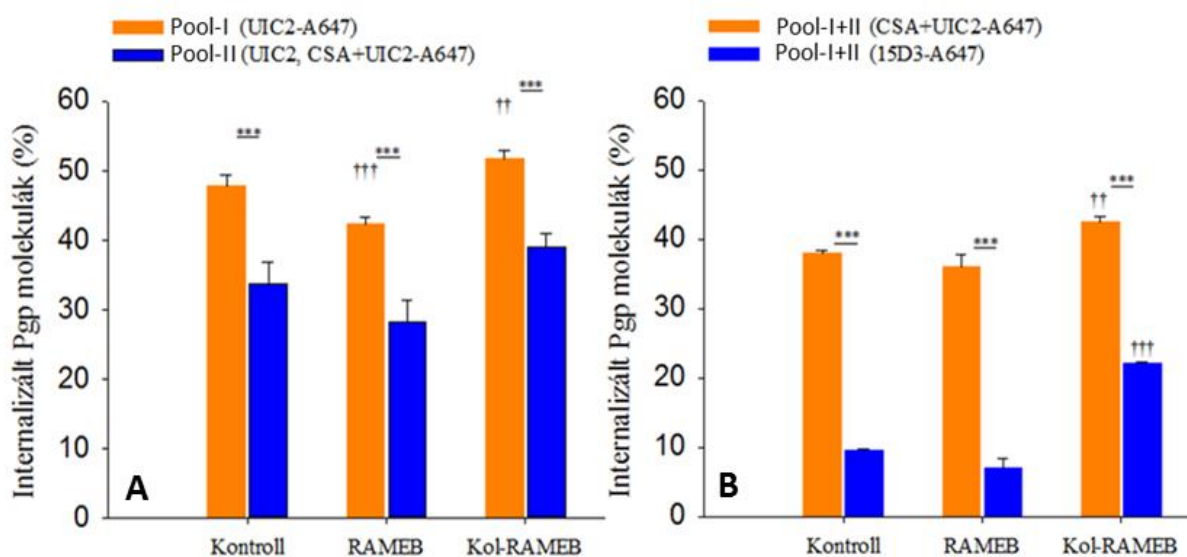
fluoreszcencia intenzitásának áramlási citometriás mérésével meghatároztuk a detergens kezelésnek ellenálló Pgp-k százalékos arányát (**B**). Három független mérés átlagát ábrázoltuk ($\pm$ SD).

Eredményeink azt mutatják, hogy a sejtek rövid távú ATP depléciója nem befolyásolta a Pgp molekulák sejtfelszíni expresszióját (**20. ábra A**) és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjukat sem (**20. ábra B**). Így ezek a kísérleteink valószínűsítik, hogy nem az UIC2-reaktív konformációs állapot felvétele irányítja a pool-I Pgp-eket a raftokba, hanem inkább a raft környezet kedvez a Pgp molekulák ATP-mentes UIC2 reaktív konformációban történő stabilizálódásának.

4.9. A membrán két Pgp populációjának internalizációja és ennek függése a membrán koleszterin tartalmától

A két Pgp populáció („pool-I” és „pool-II”) különböző membrán mikrodomén lokalizációjának további bizonyítéka lehet trafficking folyamataik különbözősége is. Ezért kísérleteinkben megvizsgáltuk, az UIC2 antitest kötődése alapján megkülönböztetett fokozott detergens rezisztenciát mutató „pool-I” és a kevésbé detergens rezisztens „pool-II” Pgp populációk endocitózisát. Fluoreszcens festékkel konjugált UIC2 (UIC2-A647) antitesttel megjelöltük a „pool-I” Pgp molekulákat, valamint festékkel nem konjugált UIC2 antitesttel történő „lefedést” követően CsA és UIC2-A647 antitest együttes alkalmazásával láthatóvá tettük a Pgp-k „pool-II” populációját. Az összes sejtfelszínen kifejeződő Pgp molekulát CsA jelenlétében UIC2-A647-tel jelöltük, vagy 15D3-A647 antitesttel tettük láthatóvá. A jelölést követően a mintákat kettéosztottuk és a mintapárok egyikében savas mosással [235] távolítottuk el a sejtfelszíni Pgp-khez kötődött antitesteket, majd áramlási citometriás mérés segítségével meghatároztuk az internalizálódott, így a savas kezelés számára nem hozzáférhető Pgp hányadot. Eredményeinkből kiderült, hogy a „pool-I” Pgp-knek szignifikánsan nagyobb hányada internalizálódott, mint az ugyanazon antitesttel jelölt „pool-II” Pgp populációnak (**21. ábra A**). Mivel a két Pgp populáció jelölését azonos ideig végeztük, és az antitest kezelés ugyanabban a konformációban csapdázza őket valószínűsíthető, hogy eltérő mértékű internalizációjukért különböző molekuláris környezetük/lokalizációjuk tehető felelőssé. Azt is megállapítottuk, hogy a membrán koleszterin tartalmának növelése koleszterinnel töltött random metilezett- β -ciklodextrinnel (Kol-RAMEB) fokozta a Pgp molekulák internalizációját, míg koleszterin tartalmának

random metilezett- β -ciklodextrinnel (RAMEB) történő kivonása csökkentette a „pool-I” Pgp-k endocitózisának mértékét.



21. ábra. A „pool-I” és „pool-II” Pgp molekulák internalizációjának meghatározása fluoreszcensen jelölt antitestekkel valamint RAMEB és Kol-RAMEB kezelést követően. A „pool-I” Pgp-ket UIC2-Alexa647-el jelöltük, míg a teljes sejtfelszíni Pgp pool-t 15D3-Alexa647 antitesttel vagy 10 μ M ciklosporin A (CsA) jelenlétében végzett UIC2-Alexa647 jelöléssel tettük láthatóvá. A „pool-II” Pgp-ket a „pool-I” Pgp-k fluoreszcens festékekkel nem konjugált UIC2 antitesttel történő lefedését követően 15D3-Alexa647 antitest segítségével jelöltük. Az antitest jelölést követően a membrán koleszterin tartalmát 20 perces ciklodextrin (RAMEB és koleszterinnel töltött RAMEB) kezeléssel moduláltuk (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). Az internalizált Pgp hányad meghatározásához a mintákat kettéosztottuk, a minta párok egyikét gl-PBS-sel, a másikat alacsony pH-jú oldattal (0,5 M NaCl, 0,1 M glicin, pH=2,5 [235]) mostuk szobahőmérsékleten 5 percre, majd jéghideg gl-PBS-ben vettük fel. Az alacsony pH-jú oldat eltávolítja a sejtfelszíni Pgp-khez kötődött antitestet, így az alacsony pH-jú oldattal illetve PBS-sel mosott minták fluoreszcencia intenzitásának hányadosa arányos az internalizálódott Pgp mennyiséggel. Az oszlopok 3-5 független mérés átlagát mutatják $\pm$ SD. *** $P < 0,001$; †††: $P < 0,001$, ††: $P < 0,01$.

A teljes sejtfelszíni Pgp populációt 15D3-A647 jelöléssel és CsA kezelés mellett történő UIC2-A647 jelöléssel is láthatóvá tettük (**21. ábra B**). Az UIC2-vel jelölt Pgp-k minden esetben fokozott internalizációt mutattak a 15D3-mal jelölt Pgp-khez képest, ami arra utal, hogy az UIC2 antitest kötődése stimulálja a Pgp-k endocitózisát. Érdekes módon a membrán koleszterin koncentrációjának növelése több mint duplájára fokozta a 15D3-kötött Pgp-k internalizációjának mértékét (**21. ábra B**).

Összegzésként elmondható, hogy a „pool-I” Pgp-k „pool-II” Pgp-khez képest nagyobb mértékű internalizációja szintén a két Pgp populáció eltérő membrán mikrokörnyezetére

utalhat, és az is valószínűsíthető, hogy a Pgp molekulák internalizációja a koleszterin gazdag raftoktól és/vagy kaveoláktól függő folyamat.

5. Diszkusszió

5.1. Diszkusszió I.

Számos biofizikai, biokémiai illetve kristályszerkezeti adat alapján napjainkra már általánosan elfogadott, hogy az ABC transzporterek transzport ciklusuk során legalább két egymástól különböző konformációt vesznek föl. A citoplazma felé nyitott konformációs állapot és az összekapcsolódott NBD-kkel és az extracelluláris tér felé nyitott TMD-kkel jellemezhető állapotok közötti átmenet feltehetőleg konformáció változások sorozatát foglalja magában, mely végül a szubsztrát-kötő affinitás csökkenését eredményezi és lehetővé teszi a koncentráció grádiens ellenében történő szubsztrát transzportot. Azonban nem teljesen tisztázott, hogy a nukleotidok kötődése, a NBD-k dimerizációja, majd az ATP(k) hidrolízise hogyan kapcsolódik a TMD-k konformáció változásaihoz.

Kísérletes munkánk során az volt a célunk, hogy a Pgp egy összetett extracelluláris epitópját felismerni képes UIC2 konformáció érzékeny monoklonális antitest egyedülálló tulajdonságait hasznosítva nyomon kövessük a Pgp transzmembrán doménjeiben bekövetkező konformáció változásokat. Az UIC2 antitest a pumpa két eltérő konformációját különbözteti meg, melyek közötti ATP-függő átmenet a *Staphylococcus aureus* alfa-toxinnal-permeabilizált sejtekben az intracelluláris ATP szint módosítása során tanulmányozható [183]. Korábbi irodalmi adatokkal összhangban [184]; [183] kísérleti eredményeink megerősítették, hogy az UIC2-nemkötő konformáció a Pgp molekula extracelluláris tér felé nyitott nukleotid-kötött, míg az UIC2-reaktív konformáció a fehérje citoplazma felé nyitott ATP-mentes kristály szerkezetekben megfigyelt állapotának felel meg [120]; [162]. A Pgp konformáció változásainak vizsgálatával párhuzamosan munkacsoportunk más tagjai fluoreszcens Pgp szubsztrát analógok felhasználásával tanulmányozták a nukleotid-függő konformáció változások hatását a pumpa szubsztrát-kötő affinitására.

Az aktív transzporterek katalitikus ciklusának tanulmányozása során az egyik legfontosabb kérdés a szubsztrát-kötő affinitás csökkenését eredményező konformáció változás pontos időzítése a ciklus során. Az „ATP switch modell” szerint az ATP kötődése indukálja a nukleotid-kötő domének dimerizációját, melynek hatására a TMD-kben bekövetkező konformáció változás a szubsztrát-kötés affinitásának csökkenését eredményezi, majd az ATP hidrolízisét követően a nukleotidok disszociációja visszaállítja a transzportert a következő ciklus kezdésére alkalmas magas szubsztrát affinitású konformációba [171]; [169]; [167]; [179]; [243]. A modell egyik bizonyítéka, hogy a nem hidrolizáló ATP analóg AMP-PNP hatására a Pgp csökkent vinblasztin kötődést mutatott [115]; [178]. Más vizsgálatok szerint azonban a magas szubsztrát affinitású állapotból az alacsonyba történő átmenetet a

már kialakult NBD dimerben létrejövő nukleotid okklúzió, azaz a nukleotid szoros kötődése eredményezi [243]; [166]; [133]. Ezzel ellentétben vannak olyan elképzelések is melyek szerint a drog-kötő affinitás csökkenését kiváltó konformáció változást vagy az ATP hidrolízise [177]; [152]; [244] vagy a hidrolízis során kialakult magas-energiájú katalitikus állapot relaxációja hozza létre [164]. Az egymásnak ellentmondó feltételezések alapjául szolgáló eltérő kísérleti eredmények bizonyára részben abból adódhatnak, hogy rendkívül nehéz feladat az erősen lipofil vegyületek, mint a Pgp szubsztrátok transzmembrán transzporterekhez való kötődési affinitásának meghatározása [245]; [246].

Tekintettel arra, hogy a Pgp nagyon szoros kapcsolatban van az őt beágyazó lipid kettősréteggel és szubsztrátjait is innen veszi fel, érdemes megjegyezni, hogy a munkám során alkalmazott UIC2-kötődési esszé a transzportert saját természetes plazmamembrán környezetében vizsgálja. Annak ellenére, hogy az UIC2 esszé indirekt módszer a nukleotidok Pgp-hez történő látszólagos affinitásának mérésére, kísérleti rendszerünk egyértelműen képes az ATPáz ciklus különböző lépéseit (pl. a nukleotid kötődése vagy az ATP hidrolízise) kísérő konformáció változások megkülönböztetésére. Kísérleteink bizonyítják, hogy a nem hidrolizálódó ATP analóg AMP-PNP kötődése kiváltja a transzporter citoplazma felé nyitott állapotból az extracelluláris tér felé nyitott állapotba történő átfordulását (**13. ábra C**). Hasonló eredményeket kaptunk akkor is, ha az ATP hidrolízisét a sejtek lehűtésével vagy Mg^{2+} -mentes körülmények biztosításával akadályoztuk meg. Munkacsoportunk más tagjai ugyanezen kísérleti beállítást alkalmazva megfigyelték, hogy az AMP-PNP kötődése által kiváltott konformáció változás során a Pgp molekulák alacsony szubsztrát affinitású állapotba kerülnek ([237]-es közlemény 8. ábra a). Tehát eredményeink alátámasztják, hogy a transzporter szubsztrátok iránti affinitásának csökkenése már az ATP hidrolízisét megelőzően bekövetkezik.

Mindkét nukleotid-kötő domén Walker A motívuma az ellenoldali nukleotid-kötő domén „signature” szekvenciájával együtt közvetlenül részt vesz a két nukleotid-kötő domén nukleotid-függő dimerizációjában és az ATP hidrolízisben. A két ATP-kötőhely együttműködésének részletei azonban még ismeretlenek, az sem tisztázott, hogy a Pgp egy vagy két (esetleg több) ATP molekulát hidrolizál transzport ciklusonként. Több kutatócsoport is megfigyelte, hogy a Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának mutációja egyik vagy mindkét oldali ATP-kötőhelyben rendkívül alacsony szintre csökkenti a különböző ABC transzporterek ATPáz aktivitását [240]; [241]; [114]; [151]; [247]; [248]. Általánosan elfogadott, hogy a Pgp két nukleotid kötőhelye funkcionálisan egyenértékű. Mivel irodalmi

adatok szerint a Pgp egyik nukleotid kötőhelyének inaktivációja az ATPáz aktivitás és a transzport aktivitás gátlását eredményezte [176]; [160]; [158], mindkét katalitikus centrum épségét szükségesnek tartják a transzport folyamatokhoz.

Kísérleteink megerősítették, hogy mindkét oldali Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának metioninra történő szimultán cseréje inaktíválja a Pgp-t ([237]-es közlemény 5. ábra és kiegészítő információk 3. ábra). Mivel a dupla mutáns transzporter nem mutat ATP-függő konformáció változásokat feltételezhető, hogy lényegében stabilizálódik az UIC2-reaktív, a citoplazma felé nyitott konformációs állapotban (**14. ábra D**), melyet ugyanakkor magas szubsztrát-kötő affinitás is jellemez ([237]-es közlemény 6-8. ábra).

Meglepő azonban, hogy a nukleotid kötődés a féloldali Walker A mutánsokban is kiváltotta az extracelluláris tér felé nyitott állapotba történő átfordulást (**14. ábra A**), melyet a szubsztrát kötés affinitásának csökkenése is kísért hasonlóan a vad típusú Pgp-hez ([237]-es közlemény 7. és 8. ábra). Kísérleteinkben a vanadát a vad típusú Pgp-hez hasonlóan a féloldali Walker A mutánsokban is megnövelte az ATP kötődés látszólagos affinitását (**14. ábra B és C és 4. táblázat**). Mivel a vanadát-függő csapdázódás egy meglehetősen kis valószínűséggel bekövetkező esemény, a vanadát által csapdázott stabil komplex kialakulása (**15. ábra**), valamint az UIC2 kötődési görbék szignifikáns mértékű balra tolódása vanadát jelenlétében (**14. ábra B és C**) úgy magyarázható, hogy a féloldali Walker A mutánsok katalitikusan aktívak. Ezen eredményeink ellentétben állnak azokkal az elképzelésekkel, melyek szerint mindkét nukleotid-kötő domén épsége szükséges a fehérje katalitikus aktivitásához [164]. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a féloldali Walker A mutációk inaktíváló hatását leíró tanulmányok többsége heterológ expressziós rendszerben pl. Sf9 sejteken kifejezett Pgp-t [114]; [249], vagy *Saccharomyces cerevisiae* sejteken kifejezett Pgp-t vizsgált [157], vagy tisztított és rekonstituált fehérjét használt [151]; [157]; [175]. Fontos tény azonban, hogy a plazmamembrán összetétele, így például a membrán koleszterin tartalma befolyásolja a Pgp aktivitását [250]; [251]. Mivel a membrán koleszterin tartalma szignifikánsan kisebb az alacsonyabb rendű eukariótákban [251]; [252], a féloldali Walker A mutánsok alacsony ATPáz aktivitásának hiánya a heterológ expressziós rendszerekben összefügghet a plazmamembrán különböző összetételével, vagy a fehérjék feloldása, tisztítása, rekonstitúciója során keletkező műterméknek tekinthető [146].

Kísérleteinkben a féloldali Walker A mutánsok drog-stimulált nukleotid hidrolízis aktivitást mutattak (**15. ábra** és [237]-es közlemény, kiegészítő információk 2. ábra), valamint munkacsoportunk más tagjainak adatai alapján bizonyított, hogy csökkentették a

sejtek intracelluláris calcein akkumulációját ([237]-es közlemény 5. ábra a), elősegítették az R123 eltávolítását a sejtekből ([237]-es közlemény 5. ábra d és e) és mérsékelt védelmet nyújtottak a Pgp szubsztrátok citotoxikus hatásával szemben ([237]-es közlemény, kiegészítő információk 4. ábra).

A vanadát által csapdázott poszt-hidrolitikus konformer keletkezése a vad típusú és féloldali mutáns Pgp-kben hasonló sebességgel történik (**15. ábra**), melyből arra következtettünk, hogy az az időtartam, melyet a működő transzporter a vanadát-érzékeny hidrolízist követő állapotban tölt, közel hasonló a vad típusú és féloldali Walker A mutáns Pgp-k esetén. Érdekes módon azonban a vanadát-csapdázott komplex szétesése gyakorlatilag nem következik be a féloldali mutánsokban (**17. ábra**). Ez a megfigyelésünk könnyen megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy a vanadáttal csapdázott fehérje köt egy ATP molekulát a másik oldali ATP-kötőhelyen is, és az UIC2-t nemkötő vanadáttal csapdázott komplex szétesése csak a másik ATP hidrolízisét követően jöhet létre. A féloldali Walker A mutáns transzporterek működőképességét alátámasztó transzport és ATPáz aktivitás mérési eredményeink ([237]-es közlemény 5. és 7. ábrák) összességében arra utalnak, hogy míg vanadát hiányában egyetlen hidrolitikus esemény elegendő a Pgp magas szubsztrát-affinitású belülről nyitott konformációs állapotának helyreállításához, addig a vanadát-csapdázott komplex szétesése igényli a szemközti ATP-kötőhely hidrolitikus aktivitását is. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a vanadát által stabilizált állapot nem reprezentál egy valódi, a ciklus során ténylegesen előforduló katalitikus intermediert, bár a katalitikus ciklus ezen részleteinek teljes megértése még további kutatómunkát igényel.

A féloldali Walker A mutációk ellenére megmaradó transzport aktivitás ténye összeegyeztethetetlen azon katalitikus ciklus modellekkel, melyek mindkét megkötött ATP molekula hidrolízisét feltételezik minden ciklusban. Eredményeinket egyaránt nehéz összeegyeztetni azzal az elképzeléssel is, mely szerint a pumpa két nukleotid-kötő doménje szigorúan váltakozó módon hidrolizálja az ATP-t [164]; [177]. Ha a nukleotid kötőhelyek valóban váltakozva működnének, úgy minden második ATP molekula hidrolízise a mutációt szenvedett katalitikus centrum működésére lenne bízva, ami a ciklus megakadását idézné elő. Ehelyett eredményeink azt támasztják alá, hogy a vad típusú, teljesen ép katalitikus hely ismételt ciklusokban képes az ATP hidrolízisére anélkül, hogy a másik nukleotid-kötő doménben hidrolízis következne be. Ennek legegyszerűbb magyarázata pedig az, hogy a vad típusú Pgp-ben a két funkcionálisan egyenértékű hely egyike mindig véletlenszerűen

köteleződik el a hidrolízis irányába, míg a féloldali mutánsokban az egyedüli funkcionálisan aktív kötőhely kezdeményez minden ciklust.

Összefoglalásként elmondható, hogy a Pgp átfordulása az extracelluláris tér felé nyitott konformációba megelőzi az ATP hidrolízisét és együtt jár a szubsztrát kötés affinitásának csökkenésével. A mindkét oldali Walker A mutációt hordozó Pgp-k a magas szubsztrát affinitású belülről nyitott konformációban stabilizálódnak, míg a féloldali mutánsok képesek a teljes transzport cikluson végigmenni, habár csökkent hatékonysággal. Ezek az eredményeink alátámasztják a Pgp két katalitikus centrumának véletlenszerű elköteleződését az ATP hidrolízisre. Vizsgálataink azt is bizonyítják, hogy a vanadát által csapdázott alacsony szubsztrát affinitású, az extracelluláris tér felé nyitott konformációs állapotból való kiszabadulás két funkcionálisan aktív ATP-kötőhelyet igényel, így nem modellezi minden tekintetben a fehérje poszt-hidrolitikus állapotát.

5.2. Diskusszió II.

A Pgp molekulák a különböző szöveti eredetű emlős sejtek membránjában “kozmozopolita módon” megtalálhatók a TX-100 rezisztens, feltehetőleg raft és citoszkeleton asszociált membrán mikrodoménekben, valamint a TX-100 oldható membrán mikrodoménekben egyaránt [223]. Munkacsoportunk korábbi adatai alapján az UIC2-reaktív „pool-I” Pgp-k fokozott raft-asszociáltságot mutatnak, míg az antitesttel csak ATP depléción vagy bizonyos gátlószerek, pl. CsA hatására jelölhető „pool-II” Pgp-k legnagyobb hányada (kb. 70%-a) a rafton kívüli membránkörnyezetben lokalizálódik. Munkánk második szakaszában a Pgp molekulák konformációja, membrán mikrodomén lokalizációja és endocitózisa közötti kapcsolatot vizsgáltuk.

Áramlási citometriás detergens kioldási kísérleteinkben igazoltuk, hogy a katalitikusan inaktív, fiziológiás ATP koncentrációk mellett ATP kötésre képtelen mindkét oldali NBD Walker A szekvenciájában mutációt hordozó (K433M/K1076M) Pgp-k a vad-típusú transzporterekhez hasonló mértékű TX-100 rezisztenciát mutatnak, mely a vad típusú Pgp-khez hasonló mértékű raft és citoszkeleton asszociáltságukra utal (**18. ábra B**).

Vizsgálataink azt is bizonyították, hogy a 2-deoxi-D-glükóz az éheztetés időtartamától függő módon csökkentette az intracelluláris ATP koncentrációt (**19. ábra A**), valamint növelte az UIC2-reaktív Pgp molekulák arányát (**19. ábra B**), azonban még fél óra elteltével sem változtatta meg a membránban kifejeződő Pgp molekulák mennyiségét (**20. ábra A**) és a TX-100 rezisztens raftokkal asszociált Pgp-k arányát (**20. ábra B**). Tehát kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy a Pgp molekulák ATP kötése és konformációja nem befolyásolja membrán mikrodomén lokalizációjukat. Mivel az UIC2-reaktív „pool-I” Pgp-k fokozott raft asszociációt mutatnak valószínűsíthető, hogy a raft milliő kedvez az UIC2-reaktív ATP-mentes Pgp konformáció kialakulásának. Tehát eredményeink arra utalnak, hogy nem az UIC2-reaktív Pgp konformerek vándorolnak a raftokba, hanem a raftokban található Pgp-k stabilizálódnak az UIC2-reaktív konformációban.

A későbbiekben munkacsoportunk tagjai konfokális mikroszkópos fluoreszcencia lokalizációs kísérletekben kimutatták, hogy a “pool-I” Pgp-k fokozott asszociációt mutatnak a kortikális aktin citoszkeletonnal, melynek mértéke jelentősen csökken latrunkulin kezelés hatására. A “pool-I” Pgp-k kihorgonyozottságukkal összhangban nem mutatnak szubsztrát függő konformáció változásokat, míg a kortikális aktin citoszkeleton latrunkulin kezeléssel történő dezintegrálása ismét aktiválja őket.

További kísérleteinkben azt is kimutattuk, hogy az UIC2 jelöléssel láthatóvá tett sejtfelszíni Pgp populációk 4-6-szor gyorsabb endocitózist mutatnak a 15D3-mal jelölt Pgp-khez képest (**21. ábra**), ami valószínűsíti, hogy az UIC2 antitest által stabilizált feltehetőleg ATP-mentes konformáció kedvez az internalizációnak. Legjelentősebb mértékű internalizációt a raft asszociált “pool-I” Pgp-k esetében tapasztaltunk. Így arra következtetünk, hogy a Pgp endocitózist elősegíti a raft miliő is. Utóbbi feltételezésünkkel összhangban van az a tapasztalatunk is, hogy a membrán koleszterin tartalmának növelése fokozta a Pgp-k internalizációjának mértékét. Ez a hatás a teljes sejtfelszíni Pgp populáció 15D3-mal történő jelölése esetén volt a legkifejezettebb. Ezt a megfigyelésünket megmagyarázhatja az a korábbi irodalmi adat, hogy a magasabb koleszterin tartalmú raftokban a Pgp kisebb affinitással köti az ATP-t, így a membrán koleszterinnel való telítése megnövelheti az ATP-t nemkötő, a citoplazma felé nyitott Pgp konformerek arányát a plazma membránban [192]. A membrán koleszterin tartalmának kivonása csökkentette az internalizáció mértékét, és ez a hatás a raft-asszociált “pool-I” Pgp esetében volt a legkifejezettebb. Tehát a Pgp molekulák internalizációja feltehetőleg a membrán koleszterin gazdag raft és caveola régióinak közreműködésével történik.

Az ABCG2 multidrog transzportert felismerő 5D3 konformáció érzékeny kötődésű antitest, az UIC2-höz hasonlóan a fehérje citoplazma felé nyitott ATP-mentes konformerét ismeri fel [253], [254]. Érdekes módon az 5D3 antitest kötődése az ABCG2 fehérjéhez szintén gyors endocitózist indukál, mely irodalmi adatok szerint részben klatrin-függő, részben koleszterin függő módon megy végbe [255]. Mivel mindkét antitest a transzporterek ugyanazon konformációját ismeri fel és stabilizálja, így elképzelhető, hogy valamely intracellulárisan elhelyezkedő, pl. az ABC fehérjék konzervált NBD-iben található motívum képezheti az endocitózis szignált.

Az UIC2 antitestet *in vitro* [256]; [257]; [258] és *in vivo* [259] kísérleti rendszerekben is alkalmazzák a Pgp által közvetített multidrog rezisztencia kivédésére, azonban a pontos hatásmechanizmus még ismeretlen. Kísérleti eredményeink valószínűsítik, hogy az UIC2 kötődést követően tapasztalt csökkentet drog effluxhoz a transzportot lehetővé tevő konformáció változások gátlásán kívül a Pgp molekulák UIC2 antitest kötődés által kiváltott fokozott internalizációja is hozzájárul. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét is, hogy a Pgp molekulák endocitózisának fokozása új stratégia lehet a multidrog rezisztencia legyőzésére.

6. Összefoglalás

6.1. Összefoglalás

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

- 1) A transzporter UIC2-reaktív, intracelluláris tér felé nyitott konformációjából az extracelluláris tér felé nyitott konformációba történő átbillenése és szubsztrátok iránti affinitásának csökkenése már az ATP hidrolízisét megelőzően bekövetkezik a katalitikus ciklus során.
- 2) Megállapítottuk, hogy az UIC2 antitesttel részben átfedő extracelluláris epitópokat felismerő monoklonális antitestek (4E3, 15D3) kötődése nem érzékeny a transzporter ATP-függő konformáció változásaira.
- 3) Tanulmányoztuk, hogy hogyan befolyásolják az UIC2-reaktív és az UIC2-vel nem jelölhető Pgp konformációk közötti átmenet bekövetkezését az egyik (K433M vagy K1076M) vagy mindkét oldali Walker A szekvenciában (K433M/K1076M) előidézett mutációk. Megállapítottuk, hogy a nukleotid kötődés a féloldali Walker A mutánsokban is kiváltotta az extracelluláris tér felé nyitott állapotba történő átfordulást, melyet a szubsztrát-kötés affinitásának csökkenése is kísért hasonlóan a vad típusú Pgp-hez. Azonban mindkét oldali Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának szimultán cseréje metioninra inaktiválta a Pgp-t.
- 4) A foszfát analógok a vad típusú Pgp-hez hasonlóan a féloldali Walker A mutánsokat is csapdázták a poszt-hidrolitikus állapotban, melyet a nukleotid kötődés látszólagos affinitásának jelentős növekedése jelzett.
- 5) Irodalmi adatokkal összhangban vad típusú Pgp esetében a vanadát-csapdázott komplex lassú szétesését figyeltük meg. A féloldali mutánsokban a komplex szétesése gyakorlatilag nem következett be, ami arra utal, hogy ehhez a folyamathoz mindkét ATP-kötőhely épsége szükséges.

Munkánk második szakaszában az élő sejteken detektálható különböző raft és citoszkeleton asszociáltságot mutató UIC2-reaktív és UIC2-t nemkötő Pgp populációk tulajdonságait vizsgáltuk.

- 6) Mivel permeabilizált sejteken szoros korreláció van az ATP koncentráció és az UIC2-reaktív és UIC2 nemkötő Pgp konformációk aránya között, ezért intakt sejteken is vizsgáltuk a sejtfelszíni Pgp-k UIC2-reaktivitását az intracelluláris ATP szint

modulálása során. Eredményeink alapján elmondható, hogy a permeabilizált sejtekhez hasonlóan az intakt sejteken is szoros korreláció van a sejtek ATP szintje és a sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2-reaktivitása között.

- 7) A sejtek rövid távú ATP depléciója, mely a Pgp molekulákat UIC2-reaktív konformációban stabilizálja, nem befolyásolja a Pgp molekulák sejtfelszíni expresszióját és a TX-100 rezisztens membrán mikrodoménekhez való asszociációjukat sem.
- 8) Vizsgáltuk azt is, hogy a Pgp mindkét oldali ATP-kötőhelyének Walker A szekvenciájában előidézett mutáció, mely a transzporter UIC2-reaktív konformációban történő megrekedését és katalitikus aktivitásának megszűnését eredményezi, befolyásolja-e a fehérje membrán mikrodoménekhez való asszociációját. Eredményeink alapján elmondható, hogy a mindkét Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp-k a vad típusú fehérjékhez hasonló mértékű (kb. 25-30%) TX-100 rezisztenciát mutatnak. Így valószínűsíthető, hogy a Pgp-k konformációja nem befolyásolja raft és citoszkeleton asszociáltságukat.
- 9) Tanulmányoztuk az UIC2 antitest kötődése alapján megkülönböztetett két Pgp populáció internalizációját. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a “pool-I” Pgp-k “pool-II” Pgp-khez képest nagyobb mértékű endocitózist figyeltük meg, mely a két Pgp populáció eltérő membrán mikrokörnyezetére utalhat.

6.2. Summary

We have applied the UIC2 conformation selective monoclonal antibody to elucidate the conformational changes of Pgp at different steps of its catalytic cycle using permeabilized cells. We have made the following statements regarding the catalytic mechanism of Pgp:

- 1) The conformational rearrangements of Pgp responsible for switching between inward facing, high substrate affinity state and the outward facing low substrate affinity conformation occur prior to the ATP hydrolysis event.
- 2) The binding of the 4E3 and 15D3 monoclonal antibodies recognizing extracellular epitopes partially overlapping with the epitope of UIC2 is not sensitive to the ATP-dependent conformation changes of Pgp.
- 3) Similarly to wild-type Pgp, nucleotide binding drives the single Walker A mutant Pgp variants from the inward to outward-facing conformation. In contrast, simultaneous mutation of both lysine residues stabilizes the transporter in a high substrate affinity inward-open conformation.
- 4) Addition of phosphate mimicking anions such as V_i or BeF_x results in a 5–10-fold increase in the apparent nucleotide affinity indicating the formation of a stable posthydrolytic complex either in wild-type or the the single Walker A mutant Pgp variants.
- 5) The rate of disassembly of the V_i -trapped complex is greatly reduced in the single mutants compared to the wild-type Pgp supporting the possibility that resetting the inward facing conformation requires two intact catalytic sites.

In the second part of our work, we have investigated the relationship between the conformation, the membrane microdomain localization and the endocytosis of Pgp.

- 6) In intact cells similarly to permeabilized cells, there is a close correlation between the intracellular ATP concentration and the UIC2 reactivity of Pgp molecules.
- 7) Short-term ATP depletion of cells that switches Pggs into a UIC2-reactive conformation does not affect the cell surface expression of Pgp molecules and their association to the TX-100 resistant membrane microdomains.
- 8) Double Walker A mutant and wild type Pggs show similar detergent resistance (approx. 25-30%) supporting their similar membrane microdomain localization.
- 9) "Pool-I" Pgp molecules exhibit faster endocytosis compared to „pool-II" Pggs probably indicating their distinct membrane microenvironment.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Fojo, A.T., et al., *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(1): p. 265-9.
2. Lowe, S.W., et al., *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell, 1993. **74**(6): p. 957-67.
3. Synold, T.W., I. Dussault, and B.M. Forman, *The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 584-90.
4. Kelland, L.R., *New platinum antitumor complexes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1993. **15**(3): p. 191-219.
5. Li, L.H., et al., *The upregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in liver is involved in acquired resistance to 5-fluorouracil*. Eur J Cancer, 2013. **49**(7): p. 1752-60.
6. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 615-27.
7. El-Awady, R., et al., *The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 535.
8. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
9. Cole, S.P., *The 1991 Merck Frosst Award. Multidrug resistance in small cell lung cancer*. Can J Physiol Pharmacol, 1992. **70**(3): p. 313-29.
10. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
11. Maliepaard, M., et al., *Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3458-64.
12. Scheffer, G.L., et al., *Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines*. Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2589-93.
13. Suzuki, M., et al., *ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22644-9.
14. del Moral, R.G., et al., *P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity*. Exp Nephrol, 1998. **6**(2): p. 89-97.
15. Greiner, B., et al., *The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin*. J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 147-53.
16. Sedlakova, I., et al., *Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2015. **25**(2): p. 236-43.
17. Bagnoli, M., et al., *Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 143202.
18. Haber, M., et al., *Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(10): p. 1546-53.
19. Pirker, R., et al., *MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia*. Blood, 1992. **80**(2): p. 557-9.
20. Sicchieri, R.D., et al., *ABCG2 is a potential marker of tumor-initiating cells in breast cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(12): p. 9233-43.

21. Doxani, C., M. Voulgarelis, and E. Zintzaras, *MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis*. Biomarkers, 2013. **18**(5): p. 425-35.
22. Campos, L., et al., *Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis*. Blood, 1992. **79**(2): p. 473-6.
23. Karaszi, E., et al., *Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **112**(2): p. 308-14.
24. Dean, M. and T. Annilo, *Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2005. **6**: p. 123-42.
25. Holland, I.B. and M.A. Blight, *ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 381-99.
26. Bouige, P., et al., *Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(5): p. 541-59.
27. Dawson, R.J. and K.P. Locher, *Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP*. FEBS Lett, 2007. **581**(5): p. 935-8.
28. Hofnung, M., D. Hatfield, and M. Schwartz, *malB region in Escherichia coli K-12: characterization of new mutations*. J Bacteriol, 1974. **117**(1): p. 40-7.
29. Kellermann, O. and S. Szmelcman, *Active transport of maltose in Escherichia coli K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein*. Eur J Biochem, 1974. **47**(1): p. 139-49.
30. Silhavy, T.J., et al., *Structure of the malB region in Escherichia coli K12. II. Genetic map of the malE,F,G operon*. Mol Gen Genet, 1979. **174**(3): p. 249-59.
31. Rice, A.J., A. Park, and H.W. Pinkett, *Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(5): p. 426-37.
32. Locher, K.P., *Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1514): p. 239-45.
33. Bell, A.W., et al., *The nucleotide sequences of the rbsD, rbsA, and rbsC genes of Escherichia coli K12*. J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7652-8.
34. Groarke, J.M., et al., *The amino acid sequence of D-ribose-binding protein from Escherichia coli K12*. J Biol Chem, 1983. **258**(21): p. 12952-6.
35. Joseph, B., et al., *Transmembrane gate movements in the type II ATP-binding cassette (ABC) importer BtuCD-F during nucleotide cycle*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 41008-17.
36. Orelle, C., K. Mathieu, and J.M. Jault, *Multidrug ABC transporters in bacteria*. Res Microbiol, 2019.
37. Havarstein, L.S., D.B. Diep, and I.F. Nes, *A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export*. Mol Microbiol, 1995. **16**(2): p. 229-40.
38. Koronakis, V. and C. Hughes, *Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin*. Semin Cell Biol, 1993. **4**(1): p. 7-15.
39. Omori, K. and A. Idei, *Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins*. J Biosci Bioeng, 2003. **95**(1): p. 1-12.
40. Delepelaire, P. and C. Wandersman, *Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium Erwinia chrysanthemi*. Mol Microbiol, 1991. **5**(10): p. 2427-34.

41. Mackman, N., et al., *Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from E. coli*. Mol Gen Genet, 1985. **201**(3): p. 529-36.
42. Blight, M.A. and I.B. Holland, *Heterologous protein secretion and the versatile Escherichia coli haemolysin translocator*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(11): p. 450-5.
43. Pimenta, A.L., et al., *Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the E. coli haemolysin translocator*. Mol Gen Genet, 1999. **261**(1): p. 122-32.
44. ter Beek, J., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Structural diversity of ABC transporters*. J Gen Physiol, 2014. **143**(4): p. 419-35.
45. Chen, C.J., et al., *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 381-9.
46. Dassa, E. and P. Bouige, *The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 211-29.
47. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 336-45.
48. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 347-51.
49. Rust, S., et al., *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 352-5.
50. Wada, M., et al., *Mutations in the canilicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 203-7.
51. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
52. Klein, I., B. Sarkadi, and A. Varadi, *An inventory of the human ABC proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 237-62.
53. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
54. Aleksandrov, A.A., L.A. Aleksandrov, and J.R. Riordan, *CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 693-702.
55. Bryan, J., et al., *ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 703-18.
56. Theodoulou, F.L. and I.D. Kerr, *ABC transporter research: going strong 40 years on*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(5): p. 1033-40.
57. Glavinas, H., et al., *The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity*. Curr Drug Deliv, 2004. **1**(1): p. 27-42.
58. Suh, W.K., et al., *Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing*. Science, 1994. **264**(5163): p. 1322-6.
59. Allikmets, R., et al., *Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 743-9.
60. Ichikawa, Y., et al., *Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4152-7.
61. Shirihi, O.S., et al., *ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2492-502.
62. Mosser, J., et al., *Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters*. Nature, 1993. **361**(6414): p. 726-30.

63. van Geel, B.M., et al., *Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in The Netherlands: a survey of 30 kindreds*. Neurology, 1994. **44**(12): p. 2343-6.
64. Moser, H.W., *Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy*. Brain, 1997. **120 (Pt 8)**: p. 1485-508.
65. Gartner, J., et al., *Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy*. Neuropediatrics, 1998. **29**(1): p. 3-13.
66. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 216-37.
67. Sarkadi, B., M. Muller, and Z. Hollo, *The multidrug transporters--proteins of an ancient immune system*. Immunol Lett, 1996. **54**(2-3): p. 215-9.
68. Sarkadi, B., et al., *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1179-236.
69. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 653-65.
70. Koepsell, H. and H. Endou, *The SLC22 drug transporter family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 666-76.
71. Szakacs, G., et al., *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discov Today, 2008. **13**(9-10): p. 379-93.
72. Varma, M.V., O.P. Perumal, and R. Panchagnula, *Functional role of P-glycoprotein in limiting peroral drug absorption: optimizing drug delivery*. Curr Opin Chem Biol, 2006. **10**(4): p. 367-73.
73. Perloff, M.D., et al., *Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(8): p. 1601-8.
74. Nagashige, M., et al., *Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast*. Placenta, 2003. **24**(10): p. 951-8.
75. Harris, M.J., et al., *Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT)*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 20876-81.
76. Schinkel, A.H., et al., *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4028-33.
77. Wijnholds, J., et al., *Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1275-9.
78. Jonker, J.W. and A.H. Schinkel, *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(1): p. 2-9.
79. Semsei, A.F., et al., *ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Cell Biol Int, 2012. **36**(1): p. 79-86.
80. Visscher, H., et al., *Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children*. J Clin Oncol, 2012. **30**(13): p. 1422-8.
81. Kus, T., et al., *Polymorphism of CYP3A4 and ABCB1 genes increase the risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel and docetaxel*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 5073-80.

82. Cisternino, S., et al., *Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3296-301.
83. Nakayama, A., et al., *ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2011. **30**(12): p. 1091-7.
84. Bhatnagar, V., et al., *Analysis of ABCG2 and other urate transporters in uric acid homeostasis in chronic kidney disease: potential role of remote sensing and signaling*. *Clin Kidney J*, 2016. **9**(3): p. 444-53.
85. Kottgen, A., et al., *Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations*. *Nat Genet*, 2013. **45**(2): p. 145-54.
86. Matsuo, H., et al., *Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population*. *Sci Transl Med*, 2009. **1**(5): p. 5ra11.
87. Leier, I., et al., *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(45): p. 27807-10.
88. Bartosz, G., et al., *Human mast cells secreting leukotriene C4 express the MRP1 gene-encoded conjugate export pump*. *Biol Chem*, 1998. **379**(8-9): p. 1121-6.
89. Leier, I., et al., *Identification of the biosynthetic leukotriene C4 export pump in murine mastocytoma cells as a homolog of the multidrug-resistance protein*. *Eur J Biochem*, 1996. **242**(2): p. 201-5.
90. Zamora, J.M., H.L. Pearce, and W.T. Beck, *Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells*. *Mol Pharmacol*, 1988. **33**(4): p. 454-62.
91. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. *Essays Biochem*, 2011. **50**(1): p. 161-78.
92. Saeki, T., et al., *Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(9): p. 6077-80.
93. Seelig, A., *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein*. *Eur J Biochem*, 1998. **251**(1-2): p. 252-61.
94. Sharom, F.J., *ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance*. *Pharmacogenomics*, 2008. **9**(1): p. 105-27.
95. Chen, Z., et al., *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade*. *Cancer Lett*, 2016. **370**(1): p. 153-64.
96. Eytan, G.D., et al., *The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(22): p. 12897-902.
97. Maki, N., P. Hafkemeyer, and S. Dey, *Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18132-9.
98. Thomas, H. and H.M. Coley, *Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein*. *Cancer Control*, 2003. **10**(2): p. 159-65.
99. Newman, M.J., et al., *Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. *Cancer Res*, 2000. **60**(11): p. 2964-72.
100. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **11**(4): p. 265-83.

101. Lomovskaya, O. and K.A. Bostian, *Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(7): p. 910-8.
102. Lomovskaya, O., et al., *Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(1): p. 56-65.
103. Amin, M.L., *P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery*. Drug Target Insights, 2013. **7**: p. 27-34.
104. Yu, J., et al., *Advances in plant-based inhibitors of P-glycoprotein*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016. **31**(6): p. 867-81.
105. Pusztai, L., et al., *Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(4): p. 682-91.
106. Romsicki, Y. and F.J. Sharom, *The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter*. Biochemistry, 1999. **38**(21): p. 6887-96.
107. Regev, R., et al., *Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(1): p. 161-9.
108. Sharom, F.J., *Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 41.
109. Siarheyeva, A., J.J. Lopez, and C. Glaubitz, *Localization of multidrug transporter substrates within model membranes*. Biochemistry, 2006. **45**(19): p. 6203-11.
110. Homolya, L., et al., *Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21493-6.
111. Hollo, Z., et al., *Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1191**(2): p. 384-8.
112. Higgins, C.F. and M.M. Gottesman, *Is the multidrug transporter a flippase?* Trends Biochem Sci, 1992. **17**(1): p. 18-21.
113. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?* J Membr Biol, 1997. **160**(3): p. 161-75.
114. Muller, M., et al., *Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 1877-83.
115. Rosenberg, M.F., et al., *Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5615-25.
116. Rosenberg, M.F., et al., *Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8294-9.
117. Lee, J.Y., et al., *Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5769-79.
118. Dawson, R.J. and K.P. Locher, *Structure of a bacterial multidrug ABC transporter*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 180-5.
119. Ward, A., et al., *Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19005-10.
120. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1718-22.
121. Li, J., K.F. Jaimes, and S.G. Aller, *Refined structures of mouse P-glycoprotein*. Protein Sci, 2014. **23**(1): p. 34-46.
122. Szollosi, D., et al., *Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2018. **1860**(4): p. 818-832.

123. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44332-8.
124. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 36877-80.
125. Ramachandra, M., et al., *Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state*. Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 5010-9.
126. Lam, F.C., et al., *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein*. J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 1121-8.
127. Pleban, K., et al., *P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 365-74.
128. Martin, C., et al., *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(3): p. 624-32.
129. Lugo, M.R. and F.J. Sharom, *Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 14020-9.
130. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities*. Eur J Biochem, 1997. **250**(1): p. 130-7.
131. Shapiro, A.B., et al., *Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site*. Eur J Biochem, 1999. **259**(3): p. 841-50.
132. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13603-6.
133. Sauna, Z.E. and S.V. Ambudkar, *About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(1): p. 13-23.
134. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
135. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer*. Q Rev Biophys, 1999. **32**(1): p. 1-56.
136. Hung, L.W., et al., *Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 703-7.
137. Hrycyna, C.A., et al., *Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 13887-99.
138. Sauna, Z.E., et al., *Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1)*. Biochemistry, 2002. **41**(47): p. 13989-4000.
139. Tomblin, G., et al., *Properties of P-glycoprotein with mutations in the "catalytic carboxylate" glutamate residues*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46518-26.
140. Tomblin, G., et al., *Combined mutation of catalytic glutamate residues in the two nucleotide binding domains of P-glycoprotein generates a conformation that binds ATP and ADP tightly*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31212-20.
141. Ambudkar, S.V., et al., *The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1049-55.

142. Lawson, J., M.L. O'Mara, and I.D. Kerr, *Structure-based interpretation of the mutagenesis database for the nucleotide binding domains of P-glycoprotein*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(2): p. 376-91.
143. Hoof, T., et al., *Cystic fibrosis-type mutational analysis in the ATP-binding cassette transporter signature of human P-glycoprotein MDR1*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20575-83.
144. Bakos, E., et al., *Characterization of the human multidrug resistance protein containing mutations in the ATP-binding cassette signature region*. Biochem J, 1997. **323 (Pt 3)**: p. 777-83.
145. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41303-6.
146. Zolnercik, J.K., et al., *The Q loops of the human multidrug resistance transporter ABCB1 are necessary to couple drug binding to the ATP catalytic cycle*. FASEB J, 2014. **28**(10): p. 4335-46.
147. Sarkadi, B., et al., *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4854-8.
148. Garrigues, A., A.E. Escargueil, and S. Orlowski, *The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10347-52.
149. van Helvoort, A., et al., *MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine*. Cell, 1996. **87**(3): p. 507-17.
150. Sharom, F.J., et al., *Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells*. Biochem J, 1995. **308 (Pt 2)**: p. 381-90.
151. Lerner-Marmarosh, N., et al., *Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from Pichia pastoris cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34711-8.
152. Al-Shawi, M.K., et al., *Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52629-40.
153. Liu, R. and F.J. Sharom, *Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains*. Biochemistry, 1996. **35**(36): p. 11865-73.
154. Qu, Q., P.L. Russell, and F.J. Sharom, *Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle*. Biochemistry, 2003. **42**(4): p. 1170-7.
155. Delannoy, S., et al., *Nucleotide binding to the multidrug resistance P-glycoprotein as studied by ESR spectroscopy*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 14010-9.
156. Liu, R., A. Siemiarczuk, and F.J. Sharom, *Intrinsic fluorescence of the P-glycoprotein multidrug transporter: sensitivity of tryptophan residues to binding of drugs and nucleotides*. Biochemistry, 2000. **39**(48): p. 14927-38.
157. Urbatsch, I.L., et al., *Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26956-61.
158. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 22957-61.

159. Azzaria, M., E. Schurr, and P. Gros, *Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(12): p. 5289-97.
160. Urbatsch, I.L., et al., *P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(33): p. 19383-90.
161. Becker, J.P., et al., *Molecular models of human P-glycoprotein in two different catalytic states*. *BMC Struct Biol*, 2009. **9**: p. 3.
162. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 2012. **490**(7421): p. 566-9.
163. Gutmann, D.A., et al., *Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(1): p. 36-42.
164. Senior, A.E., M.K. al-Shawi, and I.L. Urbatsch, *The catalytic cycle of P-glycoprotein*. *FEBS Lett*, 1995. **377**(3): p. 285-9.
165. Jones, P.M. and A.M. George, *Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle*. *Proteins*, 2009. **75**(2): p. 387-96.
166. Sauna, Z.E., et al., *Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the *E_S* reaction intermediate with ATP- γ -S, a nonhydrolyzable analogue of ATP*. *Biochemistry*, 2007. **46**(48): p. 13787-99.
167. Chen, J., et al., *A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle*. *Mol Cell*, 2003. **12**(3): p. 651-61.
168. Higgins, C.F. and K.J. Linton, *The ATP switch model for ABC transporters*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(10): p. 918-26.
169. Janas, E., et al., *The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(29): p. 26862-9.
170. Smith, P.C., et al., *ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer*. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 139-49.
171. van der Does, C. and R. Tampe, *How do ABC transporters drive transport?* *Biol Chem*, 2004. **385**(10): p. 927-33.
172. Mi, W., et al., *Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport*. *Nature*, 2017. **549**(7671): p. 233-237.
173. Berridge, G., et al., *The nucleotide-binding domains of P-glycoprotein. Functional symmetry in the isolated domain demonstrated by N-ethylmaleimide labelling*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(7): p. 1483-92.
174. Schneider, E. and S. Hunke, *ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains*. *FEMS Microbiol Rev*, 1998. **22**(1): p. 1-20.
175. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(37): p. 21449-52.
176. al-Shawi, M.K., I.L. Urbatsch, and A.E. Senior, *Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(12): p. 8986-92.
177. Siarheyeva, A., R. Liu, and F.J. Sharom, *Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(10): p. 7575-86.
178. Martin, C., C.F. Higgins, and R. Callaghan, *The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein*. *Biochemistry*, 2001. **40**(51): p. 15733-42.

179. Linton, K.J. and C.F. Higgins, *Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 555-67.
180. Schinkel, A.H., et al., *Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 478-84.
181. Alam, A., et al., *Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(9): p. E1973-E1982.
182. Mechetner, E.B., et al., *P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 12908-13.
183. Druley, T.E., W.D. Stein, and I.B. Roninson, *Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity*. Biochemistry, 2001. **40**(14): p. 4312-22.
184. Goda, K., et al., *Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells*. Eur J Biochem, 2002. **269**(11): p. 2672-7.
185. Coskun, U. and K. Simons, *Cell membranes: the lipid perspective*. Structure, 2011. **19**(11): p. 1543-8.
186. Hegedus, C., et al., *Lipid regulation of the ABCB1 and ABCG2 multidrug transporters*. Adv Cancer Res, 2015. **125**: p. 97-137.
187. Urbatsch, I.L. and A.E. Senior, *Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 135-40.
188. Callaghan, R., et al., *The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1328**(2): p. 109-24.
189. Doige, C.A., X. Yu, and F.J. Sharom, *The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1146**(1): p. 65-72.
190. Urbatsch, I.L., M.K. al-Shawi, and A.E. Senior, *Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein*. Biochemistry, 1994. **33**(23): p. 7069-76.
191. Clay, A.T. and F.J. Sharom, *Lipid bilayer properties control membrane partitioning, binding, and transport of p-glycoprotein substrates*. Biochemistry, 2013. **52**(2): p. 343-54.
192. Romsicki, Y. and F.J. Sharom, *The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein--modulation by interaction with defined phospholipids*. Eur J Biochem, 1998. **256**(1): p. 170-8.
193. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
194. Ratajczak, M.K., et al., *Cholesterol displacement from membrane phospholipids by hexadecanol*. Biophys J, 2007. **93**(6): p. 2038-47.
195. Pallares-Trujillo, J., et al., *Role of cell cholesterol in modulating vincristine uptake and resistance*. Int J Cancer, 1993. **55**(4): p. 667-71.
196. Kimura, Y., et al., *Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol*. Biochem J, 2007. **401**(2): p. 597-605.
197. Modok, S., C. Heyward, and R. Callaghan, *P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment*. J Lipid Res, 2004. **45**(10): p. 1910-8.
198. Denning, E.J. and O. Beckstein, *Influence of lipids on protein-mediated transmembrane transport*. Chem Phys Lipids, 2013. **169**: p. 57-71.
199. Horejsi, V., *Lipid rafts and their roles in T-cell activation*. Microbes Infect, 2005. **7**(2): p. 310-6.

200. Pike, L.J., *Lipid rafts: heterogeneity on the high seas*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 281-92.
201. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
202. Edidin, M., *Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 414-8.
203. Jacobson, K., O.G. Mouritsen, and R.G. Anderson, *Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(1): p. 7-14.
204. Soderlund, T., J.Y. Lehtonen, and P.K. Kinnunen, *Interactions of cyclosporin A with phospholipid membranes: effect of cholesterol*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(1): p. 32-8.
205. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
206. Kawasaki, K., et al., *Pulse EPR detection of lipid exchange between protein-rich raft and bulk domains in the membrane: methodology development and its application to studies of influenza viral membrane*. Biophys J, 2001. **80**(2): p. 738-48.
207. Kusumi, A., I. Koyama-Honda, and K. Suzuki, *Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 213-30.
208. Kenworthy, A.K., N. Petranova, and M. Edidin, *High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1645-55.
209. Almeida, P.F., A. Pokorny, and A. Hinderliter, *Thermodynamics of membrane domains*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1720**(1-2): p. 1-13.
210. Shaw, A.S., *Lipid rafts: now you see them, now you don't*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1139-42.
211. Anderson, R.G. and K. Jacobson, *A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1821-5.
212. Lavie, Y., G. Fiucci, and M. Liscovitch, *Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32380-3.
213. Orłowski, S., S. Martin, and A. Escargueil, *P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?)*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(9): p. 1038-59.
214. Song, K.S., et al., *Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9690-7.
215. Hinrichs, J.W., et al., *ATP-binding cassette transporters are enriched in non-caveolar detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains (DIGs) in human multidrug-resistant cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5734-8.
216. Radeva, G., J. Perabo, and F.J. Sharom, *P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains*. FEBS J, 2005. **272**(19): p. 4924-37.
217. Demeule, M., et al., *P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries*. FEBS Lett, 2000. **466**(2-3): p. 219-24.
218. Barakat, S., et al., *Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation*. J Neurochem, 2007. **101**(1): p. 1-8.
219. Gombos, I., et al., *Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins*. Cytometry A, 2004. **61**(2): p. 117-26.

220. Wolf, Z., et al., *A flow cytometric screening test for detergent-resistant surface antigens in monocytes*. Cytometry A, 2006. **69**(3): p. 192-5.
221. Wolf, Z., et al., *Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains*. Cytometry A, 2007. **71**(7): p. 486-94.
222. Bacso, Z., et al., *Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein*. Cytometry A, 2004. **61**(2): p. 105-16.
223. Goda, K., Z. Bacso, and G. Szabo, *Multidrug resistance through the spectacle of P-glycoprotein*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(3): p. 281-97.
224. Ghetie, M.A., et al., *An anti-CD19 antibody inhibits the interaction between P-glycoprotein (P-gp) and CD19, causes P-gp to translocate out of lipid rafts, and chemosensitizes a multidrug-resistant (MDR) lymphoma cell line*. Blood, 2004. **104**(1): p. 178-83.
225. Brambilla, D., et al., *P-glycoprotein binds to ezrin at amino acid residues 149-242 in the FERM domain and plays a key role in the multidrug resistance of human osteosarcoma*. Int J Cancer, 2012. **130**(12): p. 2824-34.
226. Shen, D.W., et al., *Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins*. J Biol Chem, 1986. **261**(17): p. 7762-70.
227. Akiyama, S., et al., *Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs*. Somat Cell Mol Genet, 1985. **11**(2): p. 117-26.
228. Izsvak, Z., Z. Ivics, and R.H. Plasterk, *Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates*. J Mol Biol, 2000. **302**(1): p. 93-102.
229. Mates, L., et al., *Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates*. Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 753-61.
230. Kolacsek, O., et al., *Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers*. Mob DNA, 2011. **2**(1): p. 5.
231. Imamura, H., et al., *Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15651-6.
232. Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen, *Alpha-toxin of Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev, 1991. **55**(4): p. 733-51.
233. Gordon, J.A., *Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor*. Methods Enzymol, 1991. **201**: p. 477-82.
234. Urbatsch, I.L., et al., *Cysteines 431 and 1074 are responsible for inhibitory disulfide cross-linking between the two nucleotide-binding sites in human P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 26980-7.
235. Palyi-Krek, Z., et al., *EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44*. Cancer Lett, 2008. **263**(2): p. 231-42.
236. Al-Shawi, M.K. and H. Omote, *The remarkable transport mechanism of P-glycoprotein: a multidrug transporter*. J Bioenerg Biomembr, 2005. **37**(6): p. 489-96.
237. Barsony, O., et al., *A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24810.
238. Gutay-Toth, Z., et al., *Cholesterol-dependent conformational changes of P-glycoprotein are detected by the 15D3 monoclonal antibody*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1861**(3): p. 188-95.
239. Chang, X.B., Y.X. Hou, and J.R. Riordan, *Stimulation of ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein by nucleoside diphosphates*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23844-8.

240. Frelet, A. and M. Klein, *Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1064-84.
241. Gyimesi, G., et al., *ABCMdb: a database for the comparative analysis of protein mutations in ABC transporters, and a potential framework for a general application*. Hum Mutat, 2012. **33**(11): p. 1547-56.
242. Szakacs, G., et al., *Transition-state formation in ATPase-negative mutants of human MDR1 protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 1314-9.
243. Martin, C., et al., *Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis*. Biochemistry, 2000. **39**(39): p. 11901-6.
244. Verhalen, B., et al., *Dynamic ligand-induced conformational rearrangements in P-glycoprotein as probed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1112-27.
245. Sharom, F.J., *Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1)*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(6): p. 979-92.
246. Sharom, F.J., R. Liu, and B. Vinepal, *Fluorescence studies of drug binding and translocation by membrane transporters*. Methods Mol Biol, 2010. **637**: p. 133-48.
247. Ozvegy, C., A. Varadi, and B. Sarkadi, *Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 47980-90.
248. Davidson, A.L. and S. Sharma, *Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(17): p. 5458-64.
249. Szabo, K., et al., *Drug-stimulated nucleotide trapping in the human multidrug transporter MDR1. Cooperation of the nucleotide binding domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10132-8.
250. Gayet, L., et al., *Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells*. Biochemistry, 2005. **44**(11): p. 4499-509.
251. Pal, A., et al., *Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(3): p. 1085-94.
252. Grillitsch, K., et al., *Isolation and characterization of the plasma membrane from the yeast Pichia pastoris*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(7): p. 1889-97.
253. Taylor, N.M.I., et al., *Structure of the human multidrug transporter ABCG2*. Nature, 2017. **546**(7659): p. 504-509.
254. Manolaridis, I., et al., *Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states*. Nature, 2018. **563**(7731): p. 426-430.
255. Studzian, M., G. Bartosz, and L. Pulaski, *Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: trafficking mechanisms and intracellular fate*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(8): p. 1759-71.
256. Mechetner, E.B. and I.B. Roninson, *Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5824-8.
257. Goda, K., et al., *Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 81-8.
258. Krasznai, Z.T., et al., *Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, 99mTc-MIBI and 18FDG*. Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(5): p. 665-9.

259. Szaloki, G., et al., *The strong in vivo anti-tumor effect of the UIC2 monoclonal antibody is the combined result of Pgp inhibition and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107875.

7.2. Saját közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Bársony Orsolya

Neptun kód: B9RM8L

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bársony, O.**, Szalóki, G., Türk, D., Tarapcsák, S., Gutay-Tóth, Z., Bacsó, Z., Holb, I., Székvölgyi, L., Szabó, G., Csanády, L., Szakács, G., Goda, K.: A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein.
Sci. Rep. 6 (24810), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24810>
IF: 4.259
2. Gutay-Tóth, Z., Fenyvesi, F., **Bársony, O.**, Sente, L., Goda, K., Szabó, G., Bacsó, Z.:
Cholesterol-dependent conformational changes of P-glycoprotein are detected by the 15D3 monoclonal antibody.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1861 (3), 188-195, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.007>
IF: 5.547

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,806

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

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

Debrecen, 2019.09.09.



8. Tárgyszavak

multidrog rezisztencia, ABC transzporter, P-glikoprotein, katalitikus ciklus, konformáció változás, UIC2 antitest, ATP, szubsztrát, sejtmembrán, internalizáció

multidrug resistance, ABC transporter, P-glycoprotein, catalytic cycle, conformational change, UIC2 antibody, ATP, substrate, cell membrane, internalization

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek **Dr. Goda Katalinnak** a munkám során nyújtott kiváló szakmai segítségét, türelmét és megértését valamint, hogy időbeli ráfordítást nem sajnálva segítette munkám előrehaladását.

Hálával tartozom **Dr. Szabó Gábor** professzor Úrnak, hogy a munkacsoportjához tartozhattam valamint, hogy felkeltette érdeklődésemet a téma iránt. Külön köszönöm neki a kiváló ötleteket, az együttgondolkodást.

Köszönöm **Dr. Bacsó Zsoltnak** a közös kísérletek megvalósítása során nyújtott szakmai segítségét, odafigyelését.

Köszönöm **Dr. Szöllősi János** professzor Úrnak és **Dr. Panyi György** professzor úrnak, hogy intézetvezetőként szakmai javaslataikkal segítették munkámat.

Köszönöm az összes asszisztensnek, akikkel együtt dolgoztam, **Vezendiné Nagy Adélnak**, **Szabóné Jeney Anitának** és **Téglási Annamáriának** a segítségét.

A nevek felsorolása nélkül köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, kollégáimnak a szakmai és emberi segítségét.

Köszönöm a **Szüleimnek**, hogy kiegyensúlyozott háttérrel biztosítottak számomra, köszönöm a **Férjem** maximális támogatását és a **Kisfiam** türelmét, Mindannyiuk odaadó szeretetét.

10. Függelék