

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**P-glikoprotein alap és koleszterin-függő trafficking folyamatainak
vizsgálata**

GUTAYNÉ TÓTH ZSUZSANNA

Témavezető:
Dr. Bacsó Zsolt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2016

P-glikoprotein alap és koleszterin-függő trafficking folyamatainak vizsgálata

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

Írta: Gutayné Tóth Zsuzsanna
okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris sejt- és immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora
Dr. Homolya László, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ,
Orvosi Vegytani Intézet
2014. augusztus 27. , 10.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Jóna István, az MTA doktora
Dr. Homolya László, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Jóna István, az MTA doktora
Dr. Homolya László, az MTA doktora
Dr. Pomozi Viola, PhD
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2017. január 17., 13.00 óra

1. Bevezetés

A humán daganatos megbetegedések első sikeres kemoterápiás kezelése után nem sokkal jött a felismerés, hogy ezen kezelések hatékonyságának legnagyobb akadálya az adott kemoterápiás szerre mutatott kezdeti javulás után kialakuló rezisztencia. Érdekes módon a daganatos sejtek képesek voltak egyidejűleg a citosztatikumok széles spektrumával szemben rezisztenciát-ún. multidrog rezisztenciát (MDR)-kialakítani. Az emberi szervezetben mai tudásunk szerint a legfőbb MDR-ATP-kötő fehérjékhez tartozik az MDR1/Pgp/ABCB1, az MRP család számos tagja (MRP1-9), valamint a BCRP/MXR/ABCG2. Mindegyik fehérje a legnagyobb transzmembrán fehérje család, az ABC transzporterek családjának tagja, melynek képviselői a baktériumoktól az emberig minden élőlényben megtalálhatóak. Közös tulajdonságuk a jellegzetes nukleotidkötő domén (NBD), melyről a család a nevét kapta (ABC: ATP-binding cassette), s amely által megkötött ATP hidrolíziséből származó energiát használják fel működésükhöz.

Az általunk vizsgált MDR fehérje, a P-glikoprotein(Pgp) szubsztrátjai kémiai szerkezetüket és méretüket (200 Da-tól akár 1900 Da-ig) tekintve nagyon eltérő, elsősorban hidrofób és amfifil sajátságú anyagok, melyek aromás gyűrű(ke)t és bázikus nitrogént tartalmaznak, töltetlenek, vagy gyengén pozitívan töltöttek. Ezen kritériumokat sok gyógyszermolekula, többek között a daganatos terápia során használt számos citosztatikum is teljesíti. A rákos sejtek membránjában nagy mennyiségben kifejeződő Pgp molekulák ily módon képesek a sejten belüli drog koncentrációt jelentős mértékben csökkenteni. Bár ma már ismert, hogy az MDR fenotípus számos egyéb sejtfolyamat eredőjeként valósul meg, a Pgp-t mind a mai napig meghatározó faktorként tartják számon a multidrog rezisztenciát mutató klinikai esetek többségében. Mindemellett a Pgp fiziológiásan is előfordul olyan szövetekben, melyek fontosak lehetnek a különböző drogok abszorpciójában (bél lumen epitél sejtjei); metabolizációjában-eliminációjában (máj, vese), valamint részt vesz létfontosságú szervek úgymint a vér-agy gát, here, petefészek és placenta sérülékeny barrierjeinek megerősítésében.

Működési elvét tekintve a Pgp nem a vizes intracelluláris térből, hanem ún. „hidrofób porszívóként” már a lipid kettősrétegből gyűjti össze a különböző drogot és ily módon már a plazmamembránban (PM-ban) képes amfifil illetve hidrofób szubsztrátjainak feltartóztatására. Egy másik elképzelés szerint a Pgp szubsztrátjait a sejtmembrán belső lemezéből a külső lemezébe átfordítva ún. flippázként (a mai pontos nomenklatúra szerint floppáz) működve idézi elő a drogok egyenlőtlen eloszlását a PM-ban. A Pgp működésének hatására a szubsztrátok az extracelluláris lemezben dúsulnak fel, ahonnan a molekulák az extracelluláris térbe diffundálhatnak. Mai ismereteink alapján a Pgp egy komplex, a transzmembrán domének által kialakított kötőhellyel, kötőzsebbel rendelkezik, amelyet a transzmembrán helixek aminosav oldalláncai bélelnek. A szubsztrátok és a Pgp aminosav oldalláncai között különböző, mindig az adott szubsztrátra jellemző hidrofób és van der Waals kölcsönhatások alakulnak ki. A „szubsztrát indukálta illeszkedés” során az egyes szubsztrátok Pgp-hez való affinitását ezen kölcsönhatások eredői határozzák meg. A Pgp szubsztrát kötőhelye, a NBD-eken megvalósuló ATP hidrolízis függvényében, a szubsztrátokra nézve egy nagy, és egy alacsony affinitást biztosító konformációs állapot között alternál. Korábbi, illetve a nem régiben közölt bakteriális ABC transzporterek illetve egér ABCB1a kristályszerkezetének ismeretében azt mondhatjuk, hogy a fehérje nukleotid távollétében egy ún. befelé (a citoplazma felé) nyitott konformációban van. A transzmembrán domének (TM) között ebben a konformációban a citoplazmatikus lemez számára hozzáférhető rés található, mely a drogok kötésének kedvez. Nukleotidok jelenlétében a fehérje kifelé (az extracelluláris

tér felé) nyitott konformációba kerül, ahol a transzmembrán domének közötti rés immár az extracelluláris lemez számára hozzáférhető.

A drog transzport „hidrofób porszívó” vagy „flippáz” modelljével összhangban a lipid környezet egyértelműen fontos funkciót tölt be a Pgp szubsztrátok membránon belüli megoszlásában, és ennek megfelelően a fehérje drog kötőhelyéhez való kötésében. Ugyanakkor a Pgp bazális ATPáz aktivitásának (szubsztrátok nélkül tapasztalt ATPáz aktivitás) lipid függése bizonyítja a lipidek közvetlen hatását is a Pgp katalitikus aktivitásában. A Pgp a legtöbb irodalmi adat tanulsága alapján egyértelműen megoszlást mutat a nem-raft membránstruktúrák és a raft, azaz koleszterin- és szfingolipid-gazdag, detergens-rezisztens membrándomének között. Ezek a membrándomének lehetnek kaveolák, vagy bármilyen egyéb raft domének. A koleszterin ily módon, más lipidekkel szemben, nem csupán a Pgp bazális és drog stimulálta ATPáz aktivitására vagy drog kötésére van hatással, hanem mint a rendezett struktúrájú membrándomének meghatározó lipid összetevője, rendkívül fontos szerepet tölt be a raft domének integritásának megőrzésében is. Teljes sejteken metil- α -cikodextrinekkal végzett koleszterin kivonási kísérletek bizonyítják, hogy a Pgp szubsztrátok intracelluláris akkumulációjának fokozódása szorosan kapcsolható a Pgp membránlokalizációjának megváltozásához, a raft domének szétesésével párhuzamosan. Az elvesztett koleszterin mennyiségek pótlásával visszaállítható a raft lokalizáció és ezzel párhuzamosan a transzport aktivitás is. A raftok egyik másik jellegzetes lipid komponensét, a szfingolipidek keletkezését gátolva a Pgp lokalizációja szintén a nem-raft domének irányba tolódik el, mely a rodamin-123 Pgp szubsztrát fokozott retencióját vonta maga után. A Pgp szoros asszociációjának gátlása a CD19 fehérjével szintén raftokon kívül helyezte a transzportfehérjét, mely hasonló funkcionális következményekkel járt.

Bár ezek a megfigyelések első látszatra azt az elképzelést erősítették, hogy a raft doménekben elhelyezkedő Pgp az, ami funkcionális szempontból fontos lehet. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy a sejtfelszíni Pgp-k nagyobb százalékát a szerzők ezeken a membrándoméneken kívül találták (lásd később saját adatok is). A raftok rendkívül dinamikus struktúrájának tükrében sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a Pgp oda-vissza jár-kel a raft és nem-raft domének között, és ennek a kényesen fenntartott egyensúlynak a megzavarása, párhuzamosan a közvetlen lipid környezet megváltozásával, funkcionális következményekkel jár.

A Pgp flippáz működési elve, valamint a Pgp ismert bazális ATPáz aktivitása, mely mindig is feltételezte valamiféle endogén szubsztrát jelenlétét, felvetette annak lehetőséget, hogy a Pgp képes lehet lipidek transzlokálására is a PM rétegei között. Számos tanulmány született, mely a foszfatidiletanolamin (PE), foszfatidilkolin (PC), szfingomielin (SM), glükoceramid (GlüCer) valamint koleszterin Pgp általi transzportálására irányult. Mindezek alapján azonban azt mondhatjuk, hogy a Pgp nagy valószínűséggel nem képes hosszabb szénláncú, természetes lipidek olyan sebességű transzportálására, ami esetleg már meghatározó lehet a PM rétegeiben. A MDR sejtek esetében sokszor tapasztalt raft domének, illetve kaveolák mennyiségi emelkedése különösen érdekessé tette a koleszterin, valamint a GlüCer transzlokálását, mely számos további glikozilált szfingolipid szintézisének alapját jelenti. Prateek Lala és munkatársai Pgp-vel transzfektált multidrog rezisztens MDCK sejtek vizsgálatakor azt találta, hogy a sejtek nagyfokú érzékenységet mutattak egy E. Coli toxin, a verotoxin iránt, mely drog számára egy sejtfelszíni rövid szénláncú szfingolipid molekula, a globotriaoszilceramid szolgál receptorként. Pgp gátlószerek (ketokonazol, ciklosporin) mellett a sejtek érzékenysége a verotoxin iránt megszűnt, a csökkent sejtfelszíni lipid szintekkel párhuzamosan. A glikoszfingolipidek szintézise során a glikozilációs lépések többsége a Golgi lumenében történik. Az egyetlen köztitermék a GlüCer, amely a Golgi citoszolikus

oldalán keletkezik. Ez a tény mindig is feltételezte valamilyen transzlokációs mechanizmus meglétét, amely a GluCer-ot a Golgi citoszolikus oldaláról a lumenális oldalára transzportálja. Az eredmények alapján a szerzők feltételezték a Pgp szerepét ebben a transzlokációs folyamatban. A tanulmányban használt drogokról azonban beigazolódott, hogy nem kizárólag a Pgp-t képesek gátolni, hanem a Golgi citoszolikus oldalán található GluCer szintázt is. Mindezek tehát kétségessé teszik azt, hogy a Pgp GluCer-ot transzlokálna a Golgi-ban. Liposzómákba rekonstruált Pgp és fluoreszcens koleszterin analóg kölcsönhatásának vizsgálata során a koleszterin jelenléte a membránban módosítja a Pgp bazális, valamint drog stimulálta ATPáz aktivitását, valamint a drogok Pgp-hez való kötődését, de a Pgp nem vesz részt a fluoreszcens koleszterin analóg transzlokálásában. A koleszterin szerkezetéből adódó, rendkívül gyors, másodperces vagy az alatti skálán mozgó spontán kicserélődése a PM két rétege között, szintén kétségessé teszi a koleszterin transzlokációját. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a Pgp elsősorban egy multidrog transzporter. Nem elképzelhetetlen, hogy az evolúció során a fehérje egy primitív lipid transzporterből végül egy nagy hatékonyságú drog transzporterré nőtte ki magát, mely képes az amfifil szubsztrátok rendkívül széles körének transzportálására, transzlokálására.

Ahogy arra már utaltunk, a MDR sejtek esetén számos esetben figyelhető meg a szenzitív sejtekhez képest egy megváltozott, deviáns membrán lipidösszetétel. A drog rezisztens sejtek membránja számos esetben nagyobb mennyiségű koleszterint, komplex glikoszíngolipideket, gangliozidokat tartalmaz. Az egyik cikk tanulsága szerint a drog rezisztencia fokával magának a koleszterin szinteknek az emelkedése mutatott szoros korrelációt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a rezisztens sejtekben a különböző lipidek, valamint a koleszterin metabolizmusa módosult. Valóban van arra adat, hogy az MDR sejtek (drog szelektált sejt vonalak), fokozott koleszterin észterifikációt mutatnak és ennek következtében fokozott mennyiségű észterifikált koleszterint állítanak elő a PM direkt, vagy akár indirekt (színgomielináz kezelés) koleszterin szaturációját követően. Erre az észterifikált koleszterin raktárra támaszkodva ezek a sejtek hatékonyabban képesek reagálni a PM csökkent koleszterin mennyiségeire, például koleszterin kivonást követően. Mindezek mellett az MDR sejtek fokozott sebességű koleszterin szintézist is mutatnak. Az MDR sejtek a szenzitív sejtekkel ellentétben tehát sokkal inkább képesek magas PM koleszterin szinteket fenntartani. A rezisztens sejtek nagy általánosságban valóban rendezettebb membrán struktúrákkal rendelkeznek, mely mögött valószínűleg a különböző raft domének mennyiségi emelkedése húzódik meg a különböző lipidek metabolizmusának megváltozásával párhuzamosan. Nagy valószínűséggel ezek a lipid változások önmagában, a fehérje változásoktól függetlenül, hozzájárulnak az MDR fenotípus kialakulásához.

A Pgp polarizált és nem-polarizált sejtek esetén is kétféle módon kerülhet az apikális membránba vagy PM-ba. A konstitutív útvonal során vezikulákba csomagolva a citoskeleton mentén közvetlenül kerül a sejt felszínre. A másik lehetséges útvonal során a fehérjék először különböző endoszómális kompartmentekbe kerülnek és innen közvetve szállítódnak a sejt felszínre. Irodalmi adatok alapján a korai endoszómák bizonyultak az egyik ilyen intracelluláris átmeneti raktárnak. A Pgp nagy valószínűséggel az aktin mikrofilamentum hálózat mentén folyamatosan internalizálódik és recirkulál. Irodalmi adatok alapján ennek megfelelően a sejtekben található érett Pgp molekulák 30%-a folyamatosan intracellulárisan helyezkedik el.

A Pgp szubsztrátjaiként számontartott drogok intracelluláris szekvesztrációja több kutatócsoportot sarkalt arra, hogy funkcionális Pgp jelenlétét feltételezze különböző intracelluláris sejtorganellek membránjában. Az adatok azonban eléggé ellentmondásosak és így nincs egyértelmű bizonyíték arra, hogy a különböző drogok, MDR sejtekben oly

gyakran megfigyelt, megváltozott intracelluláris eloszlásában a Pgp-nek ténylegesen szerepe lenne. A Pgp jelenléte azonban bizonyított az endoplazmatikus retikulumban (ER), a Golgiban, korai endoszómákban, recirkuláló endoszómákban, késői endoszómákban, lizoszómákban és proteoszómákban. Gyakorlatilag azokban az intracelluláris organellekben melyek a fehérje szintéziséhez, posztranszlációs módosításához, internalizációjához, recirkulációjához, valamint degradációjához köthetők.

A PM-ban elhelyezkedő érett transzmembrán fehérjéről (170 kDa) ismert, hogy rendkívül hosszú, 14-17 órás féléletidővel rendelkezik. Az éretlen, rosszul tekeredett Pgp-k esetén számos tanulmány tanúsága szerint egyértelmű a fehérje ER proteázok általi, vagy ubiquitinációját követő, proteoszómabeli lebomlása. Az érett sejtfelszíni Pgp-k végső degradációs helyéről nincsenek ilyen egyértelmű adatok. A lizoszómabeli lebomlás mellett a sejtfelszíni transzportek ubiquitinációja ugyanis felvetette ezen fehérjék esetén is, a proteoszómabeli lebomlást. Ugyan a proteoszómában történő lebomlás elsődleges célpontjai valójában rövid életű magi, illetve citoplazmatikus fehérjék. Mindent figyelembe véve a lizoszómákban történő lebomlás, az érett sejtfelszíni Pgp-k esetén mégis inkább valószínűsíthető. A klasszikus lizin-48 kapcsolt és a fehérje proteoszómabeli lebomlást eredményező poliubiquitináció mellett ma már ismert, a membrán fehérjék esetében is megfigyelhető, számos monoubiquitináció és lizin-63 kapcsolt poliubiquitináció kombinációja, mely az ún. „endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)” irányítása alatt a fehérjéket az endoszómákból az ún. multivezikuláris testekbe irányítják, melyek végül a lizoszómával fuzionálnak.

Közvetlen előzmények:

Az évek során számos monoklonális antitestet fejlesztettek ki a sejtfelszíni Pgp molekulák detektálására (MRK16, 4E3, MM12.10, 15D3, UIC2), melyek a Pgp extracelluláris epitópjait ismerik fel. Ezen antitestek többsége a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek jelölésére alkalmasak. Az UIC2 monoklonális antitest ugyanakkor erősen konformáció érzékeny, mivel egy, az 1., a 4., és a 6. extracelluláris loop-ok által képzett összetett epitópot ismer fel, mely nagy valószínűséggel a katalitikus ciklus csak egy meghatározott időablakában érhető el. Szaturációs koncentrációban alkalmazva az UIC2 antitest (vagy annak Fab fragmentuma) a sejtfelszíni Pgp molekulák 10-40%-át azonosítja. Ugyanakkor bizonyos szubsztrátok/modulátorok (vinblasztin, ciklosporin (CsA) és SDZ PSC 833, de nem verapamil) jelenlétében, valamint ATP depletált sejtekben az antitest képes az összes, akár minden sejtfelszíni transzporter jelölésére is. Az irodalomban a jelenség „UIC2-shift”-ként ismert, és hátterében elsősorban a kötőhelyek mennyiségének emelkedése áll.

Az UIC2 antitest segítségével a sejtfelszíni Pgp molekulák két szubpopulációját/konformációs formáját lehet megkülönböztetni. A szaturációs koncentrációban, de modulátorok jelenléte nélkül UIC2 antissal jelölhető Pgp-eket (a sejtfelszíni Pgp mennyiségek 10-40%-a) Pool1 Pgp-ként, míg az UIC2 antitest számára kizárólag CsA-típusú drogok jelenlétében hozzáférhető Pgp-eket Pool2 Pgp-ként azonosítjuk. A Pool2 Pgp-k ugyanakkor CsA-típusú drogok nélkül is megjeleníthetők, az UIC2 antitest és bármely egyéb antitest (MRK16, MM12.10 vagy 15D3) szekvenciális jelölésével, mivel ezen antitestek részben átfedő epitópokat azonosítanak. A sejtfelszíni Pgp molekulák konformációs heterogenitása nagy valószínűséggel minden Pgp-t expresszáló sejtben megfigyelhető, hiszen az „UIC2-shift” jelenséget számos sejtvonal esetén bizonyították.

NIH 3T3-MDR1 sejtvonalon konfokális mikroszkóppal végzett kolokalizációs kísérletek azt mutatják, hogy a két Pool különböző membrán területeket foglal el és valószínűleg különböző molekuláris partnerekkel van kapcsolatban. A FITC-falloidinrel jelölt aktin

mikrofilamentumok kolokalizációja inkább a Pool1 Pgp-kel figyelhető meg. TritonX-100-zal (TX100) készített sejtlyázátumot szukróz sűrűség-grádiensen szeparálva, az alacsony denzitású, raft doméneket is tartalmazó frakciók nagyobb mennyiségben tartalmazzák a Pool1 Pgp-ket a Pool2 Pgp-kel összehasonlítva.

NP40 és TX100 detergenssek segítségével végzett áramlási citometriás detergens rezisztencia (FCDR) esszében a Pool1 Pgp-k mind raft, mind direkt citoszkeleton asszociáltsága nagyobb mértékű volt a Pool2 Pgp-kel összehasonlítva.

A sejtfelszíni Pgp Pool-ok internalizációs kinetikájának vizsgálata jelöletlen elsődleges antitestek inkubációt követően, fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel történt. Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k szignifikánsan nagyobb sebességgel internalizálódtak. Amikor a sejtfelszíni Pgp molekulákat (Pool1+Pool2) UIC2 távollétében 15D3 antitesttel jelöltük a Pgp-k endocitózisa időben csak sokkal később indult el. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy az endocitotikus folyamatok sokkal inkább érintik az UIC2-vel jelölt Pool1 konformációs állapotú Pgp-ket.

A különböző antitestekkel jelölhető Pgp Pool-ok molekuláris partnereinek felderítésére immunprecipitációs és tömeg spektrometriás kísérleteket végeztünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a két Pool részben különböző sejtfelszíni és intracelluláris fehérjékkel mutat asszociációt.

2. Célkitűzések

A Pgp alap és koleszterin-függő trafficking folyamatainak felderítésére alkalmazott kísérletek tervezése és kivitelezése során, felmerült néhány metodikai probléma, melyek megoldásra vártak:

1. Kollaborációs partnereink *in vitro* aktin polimerizációs kísérletekben azt találták, hogy a raft izolálásra, valamint fehérjék raft asszociációjának vizsgálatára használt különböző detergenssek befolyásolják az aktin polimerizációt. Mivel a munkacsoportunk által kidolgozott raft fehérje azonosítási módszer, az áramlási citometriás detergens rezisztencia esszé (FCDR), olyan fehérjéket mér, melyek a polimerizált aktin citoszkeletonhoz rögzülnek, ezért a detergenssek aktin polimerizációra gyakorolt hatásai rendkívül fontosak lehetnek. Ezért kíváncsiak voltunk a különböző detergenssek (TX100; NP40; CHAPS; Brij) *ex vivo* aktin polimerizációra kifejtett hatásaira, melyet NIH 3T3-MDR1 sejtekben áramlási citometriás, valamint mikroszkópos technikával vizsgáltunk.
2. Random-metil- α -ciklodextrinnel végzett koleszterin kivonási kísérletekben a teljes sejtfelszíni P-glikoprotein mennyiségek azonosítására használt 15D3 monoklonális antitest kötődési affinitása változott. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy különböző koleszterin szolubilizációs kapacitással rendelkező más α -ciklodextrin származékok befolyásolják-e a 15D3 mAt affinitás változását.

A sejtfelszíni P-glikoproteinek konformációs és topológiai heterogenitásához kapcsolódóan célul tűztük ki a különböző Pool-ok trafficking folyamatainak vizsgálatát:

3. Mutat-e traffickingbeli különbségeket a Pool1 konformációs állapotú (főként raft asszociált) valamint a Pool2 konformációjú (kisebb mértékben raft asszociált) P-glikoprotein?
 - a, Valóban gyorsabb-e a raft asszociált Pgp-k endocitózisa?
 - b, Vannak-e lizoszómális iránybeli különbségek a Poolok között?
 - c, Mutatnak-e az internalizációs folyamatok hőmérséklet és ATP függést?
 - d, Hogyan változnak az exocitotikus folyamatok fehérjeszintézist gátló kezelés mellett?
4. Mutatnak-e koleszterin-függő traffickingbeli különbségeket a Pool1 konformációs állapotú, valamint a Pool2 konformációjú P-glikoproteinek?

A ciklodextrinek segítségével végzett koleszterin extrakciós kísérleteinkben, számunkra is meglepő módon felismertük azt, hogy bizonyos exocitotikus események fokozódnak. Nemrégiben megjelent tanulmányok a lizoszómák exocitózisáról számoltak be ciklodextrin kezelést követően. A lizoszómális exocitotikus folyamatok, párhuzamosan egyéb exocitotikus eseményekkel, feltehetően egy komplex membrán repair folyamat részeként valósulhatnak meg.

Ennek megfelelően további célkitűzéseket fogalmaztunk meg, melyek túlmutattak a P-glikoprotein trafficking folyamatainak vizsgálatán:

5. Kíváncsiak voltunk, hogy a lizoszómális exocitózis lezajlik-e a mi rendszerünkben is?
6. Célul tűztük ki továbbá a lizoszómák stabilitásának vizsgálatát NIH 3T3 és NIH 3T3-MDR1 sejtvonalak esetén a PM koleszterin perturbációja nélkül illetve azt követően. Irodalmi adatok ugyanis arra utaltak, hogy a koleszterin moduláció jelentősen befolyásolhatja azt.

7. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a lizoszómális apparátusban tapasztalt esetleges különbségeknek, van-e ennek hatása a két sejtvonal életképességére?

3. Anyagok és módszerek

3.1 Sejttenyésztés

Vizsgálataink tárgyát az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonal és annak *mdr1* génnel transzfektált változata (NIH 3T3-MDR1 G185) képezte. A sejteket 10% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FCS, Gibco), 5 mM glutaminsavat és 25 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékban növesztettük állandó körülmények mellett (37fok, 5 %-os CO₂ atmoszféra, 95 %-os páratartalom). A Pgp-t kifejező sejtvonalakat 670 nM doxorubicint tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn és felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő oldatban tartottuk tovább. Kísérleteink zömében a letapadva növő sejtekből tripszin/EDTA kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót.

3.2 A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

A sejtek tripszinezését és mosását követően beállítottuk a sejtkoncentrációt ($6 \cdot 10^6$ sejt/ml). A sejtmembrán koleszterin tartalmának változtatására emelkedő koncentrációjú random-metilzett- α -ciklodextrint (CD), illetve annak koleszterinnel képzett komplexét (chol-CD), valamint egyéb ciklodextrin származékokat használtuk. A szuszpenzióban lévő sejteket 37fokon 20 percen keresztül inkubáltuk a különböző ciklodextrin származékokkal, mostuk, majd elvégeztük a megfelelő vizsgálatokat.

3.3 Monoklonális antitestek előállítása és jelölése

Az UIC2 (IgG2a) és a 15D3 (IgG1) antitesteket hibridóma sejtek felülúszójából, proteinA affinitás-kromatográfia alkalmazásával izoláltuk. Kísérleteinkhez az antitesteket különböző festékekkel konjugáltuk (Alexa488, Alexa647, pHrodo). Az antitesthez nem kötődött festék molekulákat Sephadex-G50 oszlopon gél-szűrési technikával távolítottuk el. A festék-fehérje arányt spektrofotométerben abszorbancia alapján határoztuk meg. A pHrodo konjugált antitestek fehérje/festék arányát a moláris extinkciós koefficiens hiányában, festék koncentráció sor segítségével határoztuk meg.

3.4 Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése monoklonális antitesttel, az UIC2 és 15D3 monoklonális antitestek affinitásának (K_d) és maximális kötőhelyeinek (B_{max}) meghatározása

Az előzőekben leírt ciklodextrin kezelt sejteket emelkedő koncentrációjú antitest mennyiségekkel inkubáltuk 37 fokon 30 percen keresztül, majd kétszer mostuk hideg 8 mM glükózzal kiegészített PBS-sel (glüPBS). A fluoreszcencia értékeket áramlási citometriásan (BD FACSArray, Budapest Flow Soft Kft.) mértük a PI negatív populáció esetén. A kötődési görbéket a SigmaPlot program (Systat Software, Inc. San Jose, CA) segítségével illesztettük. Az adatokat a GraphPad Prism szoftver (6.01 verzió) segítségével értékeltük ki. Az UIC2 és a 15D3 mAt-ek maximális kötőhelyeinek a számát (B_{max}) illetve az antitestek affinitását jellemző disszociációs állandókat (K_d) a SigmaPlot programmal (8-as verzió) egy ligand kötőhelyet és aspecifikus kötődést feltételező szaturációs ligand kötődési model segítségével határoztuk meg az alábbi egyenlet alapján $f = B_{max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x)) + Ns \cdot x$.

UIC2-vel történő teljes sejtfelszíni mennyiségek jelölésekor a sejteket 10 percig 37fokon előinkubáltuk 10 μ M ciklosporin A-val.

3.5 A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése

Alexa647 festékkel konjugált mAt-vel jelölt NIH 3T3-MDR1 sejtekről a különböző inkubációs időket követően a sejtfelszínen maradt antitesteket savas kémhatású puffer segítségével távolítottuk el (0,5 M NaCl, 0,1 M glicin, pH=2,5). A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerben (BD FACSAArray, Budapest Flow Soft Kft.) mértük. A PI gerjesztését 542 nm-en végeztük és az FL2 (sárga) csatornában detektáltuk (585/42 nm), míg az Alexa647 festéket 635 nm-en gerjesztettük és az FL3(vörös) csatornában detektáltuk (661/16 nm). A savas mosásra rezisztens fluoreszcencia hányadot használtuk az internalizált receptor-antitest komplexek százalékos arányának kifejezésére, mind a kezelt, mind a ciklodextrin kezelt sejtek esetén.

3.6 Internalizáció hőmérséklet és ATP függésének vizsgálata

A sejtfelszíni Pgp-k jelzetlen elsődleges mAt-el történő jelölését követően kétszer mostuk a sejteket glükóz mentes vagy glüPBS-sel. Majd 30 percen keresztül inkubáltuk glükóz mentes vagy glüPBS-ben. Az inkubációs idő alatt a sejteket 1) 0fokon (jégen); 2) 37fokon tartottuk illetve 3) 2 percenként mozgattuk a jég és a 37fokos vízfürdő között. Ezt követően a mintákat mostuk 0fokos vagy 37 fokos pufferrel, majd 30 percen keresztül 0fokon jelöltük GamIgA647 másodlagos jelzett antitesttel. Mosást követően a sejtfelszíni transzporter mennyiségeket áramlási citometriásan PI jelenlétében detektáltuk. A sejtfelszíni fehérje mennyiségeket a glükóz mentes, 0fokos minta százalékában fejeztük ki.

3.7 Internalizálódott Pgp molekulák degradációs végpontjának mérése pHrodo festékkel jelölt Pgp-n

A pHrodo konjugált Pgp antitestek pH érzékenységeinek vizsgálatához a sejteket a szokásos módon jelöltük, mostuk majd fixáltuk 2 %-os PFA-val és változtattuk a puffer pH-ját. A kinetikai mérésekhez különböző mintákat készítettünk. A sejteket CsA inkubációt követően vagy anélkül jelöltük UI2-pHrodo-val (100 μ g/ml; 37 fok; 30 perc) illetve jelöletlen UIC2-vel való előinkubációt követően vagy anélkül jelöltük 15D3-pHrodo-val (100 μ g/ml; 37 fok; 30 perc), majd kétszer mostuk glüPBS-sel. A sejtek további inkubációjához a korábban leírt DMEM oldatot használtuk 10 mM HEPES-sel kiegészítve. A megfelelő inkubációs időpontokban vett minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával értékeltük (FACSAArray). A mintákat 532 nm-en gerjesztettük és az 585/42 sávszűrő segítségével detektáltuk. Minden mintát korrigáltunk a háttér intenzitással, amit jelöletlen antitest előinkubációt követően UIC2-pHrodo illetve 15D3-pHrodo jelölt mintákon határoztunk meg.

3.8 Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek

A pH érzékeny festékkel konjugált antitesttel jelölt sejtekről különböző inkubációs idők után (0 perc, 3 óra) LSM 510 (Zeiss, Jena, Germany) típusú konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket.

3.9 Exocitálódó Pgp mennyiségek meghatározása

A sejteket CsA kezelés nélkül vagy CsA kezelést követő jelöletlen UIC2 antitesttel jelöltük 37 fokon 30 percen keresztül, majd hidegen mostuk. Ezt követően a sejteket 1% FCS-t, 2 mM L-glutamin-t, 25 μ g/ml gentamicin és 5 mM Hepes-t tartalmazó DMEM-ben(pH7,4) inkubáltuk különböző ideig. A megfelelő időben történt mintavétel után az újonnan kijövő sejtfelszíni Pgp mennyiségeket UIC2-A647 vagy 15D3-A647 antitesttel azonosítottuk és áramlási citometriásan detektáltuk. Minden esetben meghatároztuk a kiindulási UIC2-vel illetve 15D3-mal jelölhető Pool1 illetve Pool1+2 mennyiségeket. A fehérjeszintézisgátlása melletti sejtfelszíni Pgp mennyiségek meghatározásához a sejteket az UIC2 lefedés előtt

1 órán át 10 µg/ml koncentrációjú cikloheximiddel kezeltek. A cikloheximidet a további kezelések és inkubációk idejére minden esetben visszaadtuk.

A rövidebb idejű exocitózisra irányuló kísérletek során a sejteket először festékekkel nem konjugált Pgp ellenes jelöletlen antitestekkel fedtük le (100 µg/ml mAt, 37 fok, 30 perc) majd kétszer mostuk hidegen. A sejteket a továbbiakban különböző ideig (30, 25, 20, 15, 10, 5 és 2 perc) inkubáltuk. Alexa647 jelölt Pgp ellenes antitestek (100 µg/ml) jelenlétében monitoroztuk az újonnan kijövő Pgp mennyiségeket. A fluoreszcenciákat két hideg glüPBS-sel történő mosást követően áramlási citometriásan mértük. Az exocitózisra kerülő mennyiségek számolásánál a rövid jelölési idők miatt figyelembe vettük a jelölt antitest időbeli felkötődési tulajdonságait.

3.10 Sejt felszíni Pool1 mennyiségek mérése exocitózis gátló szerek mellett

A ciklodextrin kezelés utáni sejt felszíni Pgp mennyiségek mérését megismételtük különböző exocitózis gátló szerek mellett. A sejteket 2 órán keresztül előinkubáltuk glüPBS-ben 37 fokon Exo 1 (2-(4-Fluorobenzoilamino)-benzoesav metil észter, 400 µM) vagy Brefeldin-A (360 µM) jelenlétében, majd kezeltük őket ciklodextrinnel és ezt követően UIC2-Alexa647 jelenlétében monitoroztuk a sejt felszíni mennyiségeket. A drogokat a ciklodextrin inkubáció idejére visszaadtuk.

3.11 Koleszterin kivonást követő sejt felszíni LAMP1(CD107a) és LAMP2(CD107b) mennyiségek monitorozása

Tripszinézést követően a sejteket PBS-sel vagy Hank's pufferrel (1 mM CaCl₂) mostuk. Mindkét puffert 8 mM glükózzal egészítettük ki. A LAMP2 minták esetén a glüPBS-t még 1 mM EDTA-val is kiegészítettük. A különböző pufferben lévő sejteket CD nélkül és CD jelenlétében inkubáltuk 37 fokon 20 percig, majd ezt követően jelöltük 2,5 µg/ml egér ellenes fikoeritrin konjugált LAMP1 antitesttel (CD107a-PE) vagy 10 µg/ml LAMP2 antitesttel (CD107b-Alexa488) 37 fokon 30 percig. Ezt követően mostuk a sejteket, majd azonnal fixáltuk frissen készített 2%-os PFA-ban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A teljes sejt LAMP mennyiségek meghatározásához a sejteket először 20 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, mostuk és 1,5 mg/ml-es glicin oldattal quencheltük 10 percig, majd azonos mennyiségű CD107a-PE (2,5 µg/ml) illetve CD107b-Alexa488 (10 µg/ml) antitesttel jelöltük 1 órán keresztül 0,5% szaponint és 1% BSA-t tartalmazó pufferben szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket 0,5% szaponint és 1% BSA-t tartalmazó pufferrel majd csak 1% BSA-t tartalmazó pufferrel mostuk és áramlási citometriásan mértük (FacsArria). A sejt felszíni LAMP mennyiségeket a teljes sejt mennyiségek százalékában fejeztük ki.

3.12 Ciklodextrin kezelések hatása a szabad koleszterin mennyiségekre és életképességekre NIH 3T3 és NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén

A sejteket a korábbi protokollnak megfelelően kezeltük különböző koncentrációjú CD-nel illetve annak koleszterin töltött származékával (chol-CD). A sejteket vagy 5 µg/ml PI-dal jelöltük és mértük áramlási citometriásan (FacsArray) vagy 3%-os frissen készített PFA-val fixáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül további felhasználáshoz. A fixált sejteket kétszer mostuk és 1,5 mg/ml glicint tartalmazó glüPBS-ben quencheltük 10 percig szobahőmérsékleten. A mintákat ezután 10 % FBS-t tartalmazó 125 µg/ml koncentrációjú filipin oldattal jelöltük szobahőmérsékleten 1 órán keresztül fénytől védve, majd áramlási citometriásan mértük. A mért koleszterin mennyiségeket a két különböző sejt vonal esetén korrigáltuk a sejt volumenre. Az életképességi görbéket a mért adatokból a következő dózis-hatás görbe alapján illesztettük. $f = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - X)})$.

3.13 Lizoszóma mennyiségek meghatározása

A kvantitatív képalkotó citometriás eljárás során a lizoszómákban akkumulálódó festéket a neutrálvöröst használtuk. A sejtenkénti analízishez a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel festettük, míg a lizoszómák neutrálvörössel voltak töltve. 40 µg/ml neutrálvörös jelenlétében 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket sejtenyészési körülmények között. A sejtek és körvonalaiknak azonosítása a teljes sejt jelek alapján történt. Azaz a Hoechst 33342 festék (405 nm-es UV fényel gerjesztve és 430-470 nm-es sávszűrővel detektálva) és a neutrálvörös festék (488 nm-es kék lézer gerjesztést követően 650 nm-es felüáteresztő szűrővel detektálva) fluoreszcenciája, valamint a neutrálvörös abszorbanciája (488 nm-es gerjesztést követően) alapján. Az egyedi sejtek kiválasztása a teljes jelek területe alapján és azután a Hoechst 33342 jelekkel arányos DNS mennyiségek alapján történt. Végül a sejtek lizoszóma mennyiségeit az azonosított sejtek neutrálvörös kromatikus intenzitásából határoztuk meg. A méréseket és az analízist a képalkotó citométer (iCys, CompuCyte, Cambridge, MA) fluoro-kromatikus opcióját használva a rendszer szoftvere (iNovator Applications Development Toolkit software (Thorlabs Imaging Systems, Sterling, VA, USA, korábbi nevén CompuCyte) segítségével végeztük.

3.14 A lizoszómák fotodestrukciója

A lizoszómák akridin narancs (AO) szenzitizálta fény indukálta fotodestrukcióját lézerpásztázó citométerrel (iCys laser-scanning cytometer, CompuCyte, Westwood, MA) és élő sejt video-mikroszkópiával vizsgáltuk. A sejteket 8 lyukú sejtenyésző plate-en, DMEM-ben tartottuk a konfluencia eléréséig. A sejteket 1 µg/ml koncentrációjú AO-val jelöltük 1 órán keresztül, 37 fokon glüPBS-ben, majd kétszer mostuk. Az akridin narancssal töltött sejtekből a 40-es objektív (Olympus, UIS2 40x plan fluorite, NA 0.75) 2x2 látómezőnyi területét egymást követően 50 alkalommal világítottuk be a 488 nm-es kék solid-state lézerrel. A zöld (515-545, 530/30 nm) és a vörös (565-595, 580/30 nm) emissziós fluoreszcencia intenzitásokat a bevilágítási ciklusok alatt, valós időben detektáltuk. Az adatokat az iCys szoftverből a Microsoft Excel spreadsheet programba exportáltuk, ahol a kalkulációkat elvégeztük. A lizoszómákban nagy koncentrációban akkumulálódó festék vörös fluoreszcenciát mutat. Az akridin narancs szenzitizált lizoszómák membránja kék lézer fényel történő megvilágítás alatt ruptúrál, a festék kikerül a nagy koncentrációt biztosító savas milliöböl, következésképpen a vörös fluoreszcencia intenzitás időben csökken. Az akridin narancs citoszólba történő kikerülése, illetve a sejtmag DNS-hez történő kötődése időben a zöld fluoreszcenciák emelkedésével jár. A maximális zöld fluoreszcencia intenzitás felének eléréséhez szükséges idő állandónak a meghatározását szigmoid görbék illesztésével végeztük az alábbi online görbe illesztési program segítségével (<http://zunzun.com/>). Az idő állandók átlag és szórás értékeit 10-15 sejtből kalkuláltuk.

A lizoszómák élő sejteken végrehajtott koleszterin függő fotodestrukcióját az alábbiak szerint végeztük. A letapadva növvő sejteket a 20 perces ciklodextrin kezelését követően 30 percig inkubáltuk 1 µg/ml koncentrációjú AO-val, majd a sejteket ezt követően folyamatos kék megvilágításnak (FITC filter beállítás) tettük ki az Olympus IX-71 fluoreszcens mikroszkóp iCys rendszerének epifluoreszcens Hg-gőz lámpa gerjesztésének felhasználásával. A mikroszkópos videókat az Olympus DP71 (Olympus, Budapest) nagy felbontású színes digitális kamerájával rögzítettük a bevilágítás kezdetétől. A lizoszóma szétesési eseményeknek megfelelő zöld felvillánosokat időben rögzítettük.

Videó képsorozatok értékelése:

A szétesési eseményeket egy korábban már konfokális képsorozatok kalcium tűskéinek analizálására használt automata program segítségével végeztük (Rodriguez, Lefebvre et al. 2014). Az exocitotikus események számát normalizáltuk a sejtszámra, valamint mindkét sejtvonal esetén meghatároztuk az összes lizoszóma széteséséhez szükséges besugárzási időket.

3.15 A PM koleszterin kivonásának hatása a lizoszómális festékek akkumulációjára

A festék akkumulációs kísérletekhez a sejteket 96-lyukú sejtenyészítő plate-re (1×10^5 sejt/lyuk) tettük ki és 24 óráig inkubáltuk sejtenyészítési körülmények között. A médium óvatos eltávolítását követően a sejtek különböző koncentrációjú CD oldatokkal és 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú neutrálvörös oldattal inkubáltuk együtt 37 fokon 1 órán keresztül sejtenyészítési körülmények között. A sejteket kétszer mostuk glüPBS-sel majd a sejtek lizoszómájában akkumulálódott neutrálvörös festéket feltárási oldattal vontuk ki (50 ml 96%-os alkohol; 49 ml desztillált víz és 1 ml vízmentes ecetsav keveréke). Az akridin narancs akkumulációs kísérletek során a 96-lyukú plate-en tenyésztett sejteket különböző koncentrációjú CD oldatokkal és 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú akridin narancs oldattal inkubáltuk együtt. A fluoreszcencia intenzitásokat spektrofotó-spektrofluoriméterrel mértük (Synergy HT reader; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Az emittált vörös fluoreszcencia intenzitásokat 460/40 nm-es gerjesztést követően 645/40 nm-en, míg a zöld fluoreszcenciákat 485/20 nm-es gerjesztést követően 528/20 nm-en detektáltuk. A festékek akkumulációjának változását a kezeletlen minta relatív %-ban fejeztük ki.

3.16 Aktin filamentum fluoreszcens jelölése

Az NIH 3T3-MDR1 sejtek közel konfluens egyrétegű tenyészetéből 2 perces tripszinezés (0,05% tripszin és 0,02% EDTA) segítségével készítettünk sejtszuspenziót, majd a sejteket kétszer mostuk Hanks pufferben. Az $1 \times 10^6/\text{ml}$ -es sejtszuspenziókat különböző koncentrációjú detergensekkel [TX100 (3-0,0039 v%); Brij 98 (3-0,0039 v%); NP40 (3-0,0039 v%) és CHAPS (2-0,0039 v%)] kezeltük 30 percig jégen. A sejteket 4% -os metanol mentes formaldehiddel fixáltuk legalább 2 óráig citoszkeleton puffer oldatban (138 mM KCl; 3 mM MgCl_2 ; 2 mM EGTA; 10 mM MES pH 6,1), 320 mM szukrózzal kiegészítve, ami megfelelő módon őrzi meg a citoszkeletonot. A sejteket ezt követően mostuk Hanks pufferrel, permeabilizáltuk 0,5% TX100/Hanks oldattal majd öblítettük 0,1% TX100/Hanks oldattal. A sejteket 10 percig blokkoltuk (0,1% TX100, 2% zsírszegény tejpor Hanks pufferben), és az aktin filamentumokat 1 $\mu\text{g/ml}$ TRITC-falloiddinnel jelöltük szobahőmérsékleten, 30 percig sötétben. A sejteket mostuk a blokkoló oldattal majd Hanks oldattal és a fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citometriásan detektáltuk, illetve konfokális mikroszkópos képeket készítettünk a sejtekről.

3.17 Detergens elúciós eljárás

A sejtfelszíni Pgp mennyiségek jelölését [15D3 mAb (15 $\mu\text{g/ml}$); UIC2 (10 $\mu\text{g/ml}$); 37 fok; 30 perc] és a ciklodextrin kezelést követően azonnal mértük a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citométerrel (BD FACSArray). Mérést követően a mintákhoz TX-100 oldatot adtunk 0,5%-os koncentrációban. A mintákat 15 percen keresztül jégen tartottuk majd frissen készített 2%-os PFA-val fixáltuk és a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitásokat újból megmértük. A Pgp molekulák raft asszociációjának mértékét százalékban fejeztük ki: a megfelelő háttérrel levonását követően a TX-100 kezelés után mért fluoreszcencia intenzitást elosztottuk a TX-100 kezelést megelőző intenzitással, majd a kapott értékeket szoroztuk 100-zal.

3.18 Statisztikai analízis

Az adatokat a GraphPad Prism szoftver (6.01 verzió) segítségével értékeltük ki. Két csoport összehasonlításánál kétmintás t-próbát végeztünk. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak és minden esetben feltüntettük a p értékét.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 Méréseinkhez kapcsolódó felismerések, metodikai megfontolások.

4.1.1 Különböző detergens hatása az aktin polimerizációs tulajdonságaira

In vitro aktin polimerizációs esszében a raft asszociált fehérjék vizsgálatára gyakran használt detergens befolyással voltak az aktin polimerizációs tulajdonságaira. A különböző detergens aktin polimerizációs hatása érdekes lehet olyan raft fehérje azonosítási módszerek esetén, mint az általunk is sokszor használt áramlási citometriás detergens rezisztencia meghatározás (FCDR). A detergens aktin polimerizációra kifejtett hatását sejtes mintákon vizsgáltuk tovább. Általánosságban elmondható a használt detergensről, hogy a kritikus micelláris koncentrációjuk körül [NP40 (0,0105 m/V %); TX100 (0,0149 m/V %); CHAPS (0,1476-0,6150 m/V %)] okoztak rendkívül gyors aktin depolimerizációt. Ezen szabály alól a Brij 98 volt egyedül kivétel, mely a kritikus micelláris koncentrációjától (0,0029 m/V %) csak lényegesen magasabb koncentrációban okozta az F-aktin filamentumok mennyiségének csökkenését. A detergens in vitro körülmények között sem okozott aktin depolimerizációt, sőt enyhe aktin polimerizációt mutatott. A sejtek a csökkent, de megmaradt membrán alatti sejtkortexnek köszönhetően a legmagasabb detergens koncentrációk mellett is megtartottak egy bizonyos fokú morfológiát, amely lehetővé tette az F-aktin tartalmuk mennyiségének áramlási citometriás illetve mintázatának mikroszkópos mérését. A TX100 jelenlétében tapasztalt aktin depolimerizáció megkérdőjelezhetia FCDR technikával azonosított UIC2 valamint 15D3 reaktív Pgp-k raft asszociált abszolút mennyiségeit, de nem befolyásolja azok egymáshoz viszonyított relatív raft asszociáltságát

4.1.2 A Pgp 15D3 monoklonális antitesttel detektálható koleszterin-függő konformáció változása

A Pgp koleszterin-függő trafficking folyamatainak vizsgálatok a 15D3 antitest kötődési affinitása nagymértékű koleszterin-függést mutatott. A jelenséget különböző koleszterin szolubilizációs kapacitású ciklodextrin származékok segítségével vizsgáltuk tovább. Filipin festéssel végzett kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a CD származékok koleszterin szolubilizációs tulajdonsága szoros korrelációt mutat a származékokkal kezelt sejtek szabad koleszterin mennyiségeivel. Az egyes CD származékok tehát valóban alkalmasak különböző koleszterin mennyiségek kivonására. A 15D3 mAt kötődési affinitása a Pgp-hez erős lineáris összefüggést ($r=0,98$) mutatott a sejt szabad koleszterin mennyiségeivel. Méréseink és irodalmi adatok bizonyítják, hogy a membrán CD származékokkal végzett koleszterin depléciója koleszterin-függő konformációs változásokat indukál, mely a 15D3 mAt segítségével sejtes mintákon azonosítható.

4.2 Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k fokozott internalizációt mutatnak

A két különböző Pool trafficking folyamatainak vizsgálatok, a sejtfelszíni Pgp-k másodlagos antitesttel történő visszamérésekor azt tapasztaltuk, hogy az UIC2-vel jelölhető Pool1 Pgp-k fokozott internalizációt mutatnak a Pool2 Pgp-vel összehasonlítva. A jelenséget

direkt jelölést követően, savas mosásos kísérletekben az intracelluláris Pgp mennyiségek direkt monitorozásával bizonyítottuk.

A jelölést követő 10. percben az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k $20,9 \pm 0,83\%$ -a, a CsA kezelést követően UIC2-vel jelölt Pgp-k (Pool1+Pool2) $8,5 \pm 1,02\%$ -a helyezkedett el intracellulárisan. A 15D3-mal illetve CsA kezelést követően 15D3-mal jelölt minták esetén ezen idő alatt lényegesen kisebb mennyiségek internalizálódtak ($1,8 \pm 0,52\%$ és $2,2 \pm 0,31\%$). A 45. percre az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k már $42,6 \pm 4,00\%$ -a, a CsA+UIC2-vel jelölt Pgp-k $18,2 \pm 0,93\%$ -a internalizálódott ellentétben a 15D3 antitesttel jelölt mintákkal ($4,1-5,2\%$). A korábbi adatokkal összehasonlítva mennyiségileg ugyan eltérő, de tendenciájában teljesen megegyező eredményeket kaptunk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k a Pool2 Pgp-kel összevetve fokozott endocitózis mutatnak. Ugyanakkor a CsA+15D3 illetve CsA+UIC2 mintákat összehasonlítva, egyértelműen látszik, hogy az UIC2 antitestnek rendkívül fontos szerepe van ebben az internalizációs folyamatban.

Az UIC2 antitest szubsztrátok és modulátorok nélkül a sejtfelszíni Pgp mennyiségek csupán 10-40%-át képesek detektálni, azonban minden egyes kísérletben ismert volt a Pool1 Pgp-k százalékos mennyisége a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségekhez képest. Ily módon lehetőségünk volt az UIC2-vel (Pool1) illetve CsA+UIC2-vel (Pool1+Pool2) jelölt minták esetén az internalizálódott abszolút Pgp mennyiségek összehasonlítására. A sejtfelszíni Pgp mennyiségek $6,4 \pm 1,12\%$ -a illetve $8,5 \pm 1,02\%$ -a internalizálódott az inkubáció 10. percéig. $10,4 \pm 2,2\%$ és $12,7 \pm 1,59\%$ -os internalizált Pgp mennyiségeket detektáltunk az inkubáció 30. percében. Ezek az összevethető mennyiségek arra engednek következtetni, hogy az UIC2 antitest által generált internalizációs folyamatban elsőként valószínűleg az eredetileg Pool1 konformációt mutató transzportek internalizálódnak. Ezen Pgp-k internalizációját azonban követi a többi, CsA hatására indukálódott Pool1 konformációjú Pgp-k endocitózisa.

4.3 Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációja hőmérséklet- és ATP-függést mutat

Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációjának aktív voltának megítélésére különböző hőmérsékleti és ATP mennyiségeket állítottunk be. ATP hiányában az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációja elmaradt. ATP-t tartalmazó körülmények között pedig egyértelmű hőmérsékletfüggést mutatott. A Pool1 Pgp-k internalizációja tehát aktív folyamat révén valósul meg.

4.4 A Pool1 P-glikoprotein egyik lehetséges degradációs helye a lizoszóma

A P-glikoprotein végső degradációs helyének felderítéséhez pH érzékeny festékkel (pHrodo) konjugált antitesteket használtuk. pHrodo festékkel konjugált UIC2 és 15D3 monoklonális antitestekkel jelölt és fixált sejteken ellenőriztük a konjugált festékek pH érzékenységét. A kinetikai mérések során 180 percen keresztül követtük nyomon a különböző Pgp Pool-ok savas közegben való megjelenését. A kezdeti fluoreszcenciához viszonyított legintenzívebb fluoreszcencia emelkedést az UIC2-pHrodo (Pool1) minta esetén tapasztaltuk. A savas vezikulákban megjelenő abszolút mennyiségek megítéléséhez végpont méréseket végeztünk. A kizárólag Pool1 Pgp-k jelölésére alkalmas UIC2-pHrodo minta esetén a kezdeti $36,3 \pm 1,2\%$ -os relatív fluoreszcencia intenzitások a 180 perces inkubáció végére $98,2 \pm 14,1\%$ -ra emelkedtek. A mindkét Poolt jelölő CsA+UIC2-pHrodo, valamint a 15D3-pHrodo minta esetén ugyan kisebb mértékben, de szintén tapasztaltunk fluoreszcencia emelkedést ($100 \pm 0,4\%$ -ról $136,4 \pm 11,5\%$ -ra, valamint $100 \pm 0,2\%$ -ról $153,1 \pm 13,2\%$ -ra). Ugyanakkor kizárólag a Pool2 Pgp-et jelölő (UIC2-vel lefedett majd 15D3-pHrodo-val jelölt) mintánál, csak kismértékű fluoreszcencia emelkedést tapasztaltunk ($104,7 \pm 0,9\%$ -ról $116,5 \pm 11,6\%$ -ra). Sok esetben egyáltalán nem is történt fluoreszcencia változás az inkubációs idő végéig. Az eredményeink alapján biztosan állíthatjuk, hogy a fehérje, legnagyobb valószínűséggel pedig az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k, egyértelműen rálépnek a lizoszóma felé irányuló degradációs útra az internalizációs méréseinkkel összhangban.

4.5 A Pool1 P-glikoprotein recirkulál a sejtfelszínre

Az UIC2 monoklonális antitest indukálta endocitózist követően szeretnénk volna megvizsgálni, hogyan alakulnak a sejtfelszíni Pgp mennyiségek. Helyreáll-e az eredeti sejtfelszíni Pgp szám és amennyiben igen, milyen időintervallumon belül? A sejtfelszíni Pgp mennyiségek monitorozását fluoreszcensen jelölt UIC2-Alexa647 illetve 15D3-Alexa647 antitesttel végeztük, jelöletlen UIC2, illetve CsA+UIC2 antitesttel történő előinkubálást követően. A CsA előkezelést követő UIC2 előinkubálással a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek lefedésre és a korábbi eredmények alapján internalizációra kerülnek. Míg UIC2 előinkubációval kizárólag az eredetileg Pool1 konformációt mutató Pgp-k fedhetők le. Jelöletlen UIC2-vel történő lefedést követően mind UIC2-Alexa647-tel, mind 15D3-Alexa647-tel monitorozva azt látjuk, hogy a kezdeti Pool1 mennyiségek már az első inkubációs időpontra visszaállnak (30 perc alatt). CsA+UIC2 lefedést követően, az első inkubációs időpontban csak a Pool1-nek megfelelő százalékos Pgp mennyiségek láthatóak. A teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek csak hosszabb idő alatt (kb. 24 óra) állnak helyre.

Cikloheximid (fehérjeszintézisgátló) kezelés mellett, UIC2 lefedést követően a Pool1 mennyiségek a korábbiakhoz hasonlóan helyreállnak. Az 1. órában detektálható teljes sejtfelszíni mennyiségek sem térnek nagyon el a kezdeti Pgp mennyiségektől. Ezután viszont a 24. óráig az idő előrehaladtával ezek a mennyiségek fokozatosan csökkennek. Ez egyértelműen összeegyeztethető a Pgp irodalmi adatok alapján meghatározott 14-17 órás félféltidejével. Cikloheximid kezelés mellett, CsA előinkubációt követő UIC2 lefedést követően ugyanakkor, a kezdeti sejtfelszíni Pgp mennyiségek nem állnak helyre. A teljes sejtfelszíni mennyiségek internalizációját követően (CsA+UIC2-vel jelölt minta) a kiindulási Pgp mennyiségeknek csak egy része, töredéke jelenik meg ismét a sejtfelszínen, mely összeegyeztethető a kezdeti Pool1 mennyiségekkel. Mindez arra utal, hogy a sejtfelszíni Pgp mennyiségek egy része intracelluláris pool-okban található, melynek sejtfelszíni megjelenése független a fehérjeszintézistől. Az eredetileg Pool1 konformációt mutató Pgp-k nem csak internalizálódnak, de folyamatosan recirkulálnak is a sejtfelszínre.

4.6 A raft asszociált Pool1 Pgp-k sejtfelszíni mennyisége növekszik koleszterin kivonást követően

A különböző membrán doménekben elhelyezkedő Pgp Pool-ok feltételezhetően különböző koleszterin-függő trafficking-gel rendelkeznek. A PM ciklodextrinek (CD és chol-CD; random-metil- β -ciklodextrin és annak koleszterinnel töltött változata) segítségével végzett koleszterin modulációját követően emelkedő antitest koncentrációk mellett határoztuk meg az antitestek maximálisan jelölhető kötőhelyeinek mennyiségét (B_{max}) a két Pool esetén. Nem várt emelkedést tapasztaltunk a sejtfelszíni mennyiségekben koleszterin kivonását követően, akár UIC2 (Pool1), akár 15D3 (Pool1+2) antitestet használtuk monitorozásra. A PM koleszterin telítését követően a sejtfelszíni Pool1 és Pool1+2 mennyiségek ellentétesen változtak, csökkentek, bizonyítva ezzel, hogy a jelenség koleszterin-függő. Az egyidejűleg meghatározott disszociációs állandók (K_d) koleszterin modulációt követő változása (nem változott vagy emelkedett) -mely fordítottan arányos az affinitással- bizonyította, hogy a detektált sejtfelszíni mennyiségi változások nem magyarázhatóak az antitestek affinitás változásával. Hangsúlyoznunk kell, hogy ezek a változások a raft asszociált pool1 frakciót érintik, mely változások tükröződnek a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségekben is. Mindezekből arra következtettünk, hogy a koleszterin változások nem egy Pool2-Pool1 irányú konformáció változást idéztek elő, hanem trafficking változást. A koleszterin-függő trafficking változások pedig a dinamikus raft asszociált Pool1 frakciót érintik.

4.7 A Pool1 sejtfelszíni mennyiségek emelkedése nem indokolható csökkent internalizációval koleszterin kivonást követően, a Pool1 Pgp-k exocitálódó mennyisége emelkedik

A nagyobb részben raft asszociált Pool1 frakció Pool2 frakcióval összehasonlított intenzívebb trafficking folyamatai, valamint, hogy a PM koleszterin modulációja a Pool1 sejtfelszíni mennyiségek változásait idézték elő, feltételeztük, hogy a koleszterin kivonás a Pool1 frakció trafficking folyamatait módosította. Elsőként savas mosásos kinetikai mérések segítségével vizsgáltuk a Pool1 frakció koleszterin-függő internalizációs folyamatait.

A ciklodextrin kezelést követő 15 perces mintákat összehasonlítva az internalizálódott mennyiségek további $39,2 \pm 4,5\%$ -kal emelkednek chol-CD kezelés hatására ($139,2 \pm 4,5\%$ -cholCD; $100,0 \pm 2,1\%$ -kontroll). A PM koleszterin kivonása ugyanakkor nem befolyásolta a Pool1 frakció internalizálódott mennyiségeit ($103,8 \pm 1,96\%$ -CD; $100,0 \pm 2,1\%$ -kontroll). Tehát a koleszterin kivonást követő sejtfelszíni Pool1 mennyiségek emelkedése nem indokolható csökkent internalizációval. A Pool1 frakció másik fontos trafficking útvonalát, az exocitózis sebességét megvizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az éppen ellentétesen változott a sejtmembrán koleszterin modulációjával. Fokozódott, amikor a sejtmembrán koleszterin szintjét redukáltuk, valamint csökkent, amikor a PM-t koleszterinnel telítettük. A ciklodextrin kezeléseket követő 15 perces exocitálódott mennyiségek alapján ($252,0 \pm 48,0\%$ -CD; $100,0 \pm 27,9\%$ -kontroll; $55,2 \pm 21,4\%$ -chol-CD) a sejtmembrán koleszterin modulációja erőteljesen módosítja a Pgp Pool1 frakciójának exocitózist. A CD kezelt minta esetén tapasztalt exocitálódott mennyiségek önmagában képesek magyarázni a koleszterin kivonást követően megemelkedett sejtfelszíni Pgp mennyiségeket.

4.8 Az exocitotikus folyamatok gátlása csökkenti a koleszterin kivonás indukálta emelkedett sejtfelszíni Pool1 mennyiségeket

Az exocitotikus változások bizonyításaként exocitózis gátló szerek mellett (Exo1; BFA) ismét elvégeztük koleszterin modulációt követően a sejtfelszíni mennyiségek monitorozását. Az Exo1 kezelés mindhárom esetben csökkentette a sejtfelszíni Pool1 mennyiségeket, különböző mértékben (CD- $37,9 \pm 5,9\%$ -kal, kontroll $29,0 \pm 7,4\%$ -kal, chol-CD $5,5 \pm 5,4\%$ -kal). A gátlás mintázata arányos volt azzal a tendenciával, ahogyan az exocitotikus események hozzájárulhattak a sejtfelszíni mennyiségek alakulásához. Kevésbé kifejezett csökkenést tapasztaltunk a CD kezelt minták esetén BFA mellett. chol-CD kezelés mellett a sejtfelszíni mennyiségek inkább emelkedtek, a kontroll minták esetén pedig nem tapasztaltunk változást. Az Exo1, az ARF1 GTP hidrolízisének sebességét fokozza, mely folyamat főleg a Golgi-n belüli exocitotikus folyamatok gátlását idézi elő. A BFA, mint az ARF1-GDP/GTP kicserélő faktor nem kompetitív gátlószere, számos Golgi-n kívüli ARF1 függő citoszolikus effektor funkció gátlását is eredményezi. Így nem csupán a szekréciós útvonalon keresztül megvalósuló vezikuláris trafficking útvonalat befolyásolja, hanem az endocitotikus-recirkuláló útvonalat is gátolhatja. Eredményeink tükrözték a két drog támaszpontja között tapasztalt különbséget. Az irodalomban jól dokumentált koleszterin kompenzációs mechanizmusok, melyek kinetikailag is összeegyeztethetőek voltak méréseinkkel, arra utaltak, hogy a korábban raft asszociált Pgp-ként azonosított Pool1 frakció, szorosan kapcsolódik a szekréciós úton keresztül CD kezelést követően megvalósuló kompenzációs szfingolipid és koleszterin exporthoz.

4.9 A lizoszómális LAMP1 és LAMP2 fehérje exocitózisa kalcium- és koleszterin-függő módon szintén fokozott ciklodextrin kezelést követően

A lizoszómális exocitózis szerepe a membrán repair-ben, mely során a sérült PM részek eltávolítása után a PM részek klasszikus exocitotikus útvonalakon keresztül pótlódnak, régóta ismert. Újabb tanulmányok szerint a sejtek CD kezelése, kalcium függő módon szintén fokozza a lizoszómák exocitózist. Feltételezték, hogy a koleszterin extrakció fokozza a PM

permeabilitását olyan kis molekulású anyagok iránt mint a Ca^{2+} , mely lizoszómális exocitózist indukál. Mindez azt a feltételezést erősítette bennünk, hogy a Pool1 Pgp-k exocitózisán keresztül látott fokozott exocitotikus esemény csak egy szelete egy sokkal komplexebb eseménysornak, a lizoszómális exocitózis indukálta membrán repair folyamatnak.

Az 5 mM-os CD kezelés a Ca^{2+} -ot tartalmazó minták esetén kétszeresére növelte a sejtfelszíni lizoszómális fehérje, a LAMP1 mennyiségét ($127,7 \pm 6,7\%$ -ról $261,8 \pm 22,4\%$ -ra) 3T3-MDR1 sejtekben. Ugyanakkor a fehérje mennyisége Ca^{2+} mentes minta esetén is 80 %-kal emelkedett ($100,0 \pm 5,2\%$ -ról $179,5 \pm 27,3\%$ -ra). A LAMP1 fokozódó sejtfelszíni megjelenése az emelkedő CD koncentrációkkal párhuzamosan a folyamat koleszterin függő jellegére utalt. A sejtben megfigyelhető különböző fúziós események létrejöttének feltétele a Ca^{2+} jelenléte, mely általában a fúzióban résztvevő organellumok lumenjéből származik vagy extracelluláris eredetű. Egy lizoszómális exocitotikus folyamatban a két fúzióban résztvevő "organellum" a PM és a lizoszóma. Ez azt jelenti, hogy a lizoszómák PM-nal történő fúziójához nélkülözhetetlen intracelluláris Ca^{2+} emelkedés forrása vagy az extracelluláris milliő, vagy maga a lizoszóma. A 0,4-0,6 mM-ra becsült lizoszómális Ca^{2+} koncentráció egy jelentős Ca^{2+} forrás. Nemrégiben a lizoszómák membránjában található befelé rektifikáló kation csatornáról írták le, hogy egy lehet azok közül a mechanizmusok közül, ami a lizoszómális Ca^{2+} felszabadulást és a lizoszómális exocitózist szabályozza. A csatorna jelentős lipid kontroll alatt áll. A lizoszómális enzimek fokozott szekréciója az MDR sejtvonalak esetén, arra buzdított minket, hogy tovább vizsgáljuk a folyamatot. Összehasonlítottuk tehát a Pgp-vel transzfektált (NIH 3T3-MDR1) sejtvonalunkat a nem transzfektált partnerével (NIH 3T3) a CD kezelés hatására kialakult sejtfelszíni LAMP1 mennyiségek tekintetében. A sejtfelszíni LAMP1 százalékos mennyisége a NIH 3T3-MDR1 sejtekben a ciklodextrin kezelés nélkül is magasabb mennyiséget mutat. Ezek a mennyiségek koleszterin kivonást követően mind Ca^{2+} mentes közegben, mind extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében jelentősebb emelkedést mutattak mint az NIH 3T3 sejtek esetén. LAMP2 markerrel végzett méréseink szintén összeegyeztethetőek voltak ezen mérésekkel. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel, mely szerint Pgp-t nagy mennyiségben kifejező MDR sejtekben megfigyelhető egy fokozott trafficking a lizoszómák és a PM között. Továbbá ez a lizoszómális exocitotikus folyamat, ami számos folyamatban vehet részt többek között pl. a membrán repair folyamatokban is, jelentősen fokozható az NIH 3T3-MDR1 sejtekben a PM koleszterin kivonását követően.

4.10 Az NIH 3T3-MDR1 sejtek nagyobb mennyiségű, stabilabb lizoszómákat tartalmaznak

Egy lizoszómális exocitózis irányította membrán repair folyamatban a lizoszómák száma és stabilitása valószínűleg nagyon fontos tényező. Az NIH 3T3-MDR1 és az NIH 3T3 sejtekben található savas vezikulák mennyiségét a lizoszómákban akkumulálódó gyenge bázis, a neutrálvörös festék segítségével vizsgáltuk. Az NIH 3T3-MDR1 sejtek 1,5-szer nagyobb mennyiségű festéket képesek akkumulálni, mint az NIH 3T3 sejtek, mely megfigyelés a savas vezikuláris kompartment expanziójára utal. Áramlási citométeres oldalszórásra vonatkozó megfigyeléseink, valamint irodalmi adatok összhangban vannak ezzel a megfigyeléssel. A lizoszóma membrán stabilitásának megítéléséhez egy másik lizoszómákban akkumulálódó, foto-oxidálható festéket, az akridin narancsot használtuk. Az akridin narancs, mint metakromáziás festék, kék fénnel történő gerjesztést követően vörös fluoreszcenciával jellemezhető, ha a festék nagy mennyiségben koncentrálódik a lizoszómákban, és zöld fluoreszcenciával, amint a lizoszómák ruptúráját követően alacsonyabb koncentrációra hígul a citoszolban. A sejtenkénti fluoreszcencia intenzitások alakulását 50 egymást követő 488 nm-es lézer gerjesztésű szkenningszkennelés során követtük nyomon időben. A lizoszóma membrán stabilitásának jellemzésére a maximálisan elérhető zöld fluoreszcencia intenzitás

felének eléréséhez szükséges bevilágítási időket hasonlítottuk össze. Hosszabb bevilágítási időket detektáltunk az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén (410 ± 180 mp), az NIH 3T3 sejtekkel összehasonlítva (300 ± 140 mp), mely egy a fotodestrukciónak jobban ellenálló lizoszómális apparátusra utal a drog-rezisztens sejtvonal esetén. Eredményeink tehát egy stabilabb és mennyiségileg is fokozott endoszómális savas vezikuláris rendszerre utalnak az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén.

4.11 Az NIH 3T3-MDR1 sejtek lizoszómái koleszterin kivonást követően is stabilabbnak bizonyultak

Irodalmi adatok alapján a lizoszómális koleszterin, a lizoszómák stabilitását meghatározó lényeges tényező. A PM koleszterin mennyisége, ami gyakran emelkedett a MDR sejtek esetén, valószínűleg befolyásolja a lizoszómák koleszterin mennyiségeit, és ily módon azok stabilitását. Figyelembe véve azt az eshetőséget, hogy a PM koleszterin modulációját követően a lizoszómák stabilitása a mi rendszerünkben is változhatott, koleszterin perturbációt követően ezt is összehasonlítottuk a két sejtvonal esetén. A vizsgálatot epifluoreszcens mikroszkópban, élő sejtek valós idejű videózásával végeztük. A látótérben lévő ciklodextrin kezelt sejtpopulációt folyamatos kék fény (480 ± 15 nm) expozíciónak tettük ki, közvetlenül az akridin narancs inkubációt követően, és a zöld csatornában (530 ± 15 nm) időben detektáltuk a lizoszómák szétesésének megfelelő fluoreszcencia felvillanásokat. Majd összehasonlítottuk az összes lizoszóma széteséséhez szükséges expozíciós időket az NIH 3T3 (CD: 29 mp; kontroll: 46 mp; cholCD: 60 mp) és az NIH 3T3-MDR1 (CD: 40 mp; kontroll: 65 mp; cholCD: 79 mp) sejtvonal esetén. A PM akut ciklodextrin kezelése mindkét sejt esetében befolyásolta a lizoszómák stabilitását. A koleszterin kivonás csökkentette az expozíciós időket, míg a PM koleszterin telítése fokozta. De a lizoszóma szétesési események száma koleszterin kivonást követően, szignifikánsan csak az NIH 3T3 sejtvonal esetén csökkent. A PM koleszterin kivonás-lizoszómákra gyakorolt hatásának végső kimenetelét szintén megvizsgáltuk emelkedő mértékű koleszterin kivonás esetén. A letapadt sejteket 1 órán keresztül 37 fokon inkubáltuk emelkedő mennyiségű CD-nel valamint akridin narancs festékkel sötétben, és ezt követően plate-reader spektrofluoriméterrel detektáltuk a vörös és zöld steady state fluoreszcenciákat. Az NIH 3T3 sejtek esetén a csökkenő vörös fluoreszcenciákkal párhuzamosan zöld fluoreszcencia emelkedést tapasztaltunk. Az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén mind a vörös, mind a zöld fluoreszcenciák csökkentek, mely szintén a savas vezikulák mennyiségének csökkenésére utal. De amíg az NIH 3T3 sejt esetén a fluoreszcencia változások egyértelmű jelei a lizoszómák széteséssel járó folyamatos eltűnésének, addig az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén a lizoszómák eltűnésének hátterében valamilyen más mechanizmus áll. A LAMP1-es eredmények tükrében valószínűsíthető a lizoszómák sejt felszínre történő exocitózisa.

4.12 Az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén megfigyelhető hatékonyabb membrán repair mechanizmus tükröződik a koleszterin perturbációt követő életképességekben

Az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén feltételezhető hatékonyabb membrán repair bizonyítására összehasonlítottuk a sejtvonalak koleszterin modulációját követő életképességeket. A PM károsodását követő propidium jodid permeabilitáson alapuló életképességi tesztben az 5 mM-os CD-nel végzett koleszterin kivonás $46,4 \pm 3,5\%$ -kal csökkentette az életképességeket az NIH 3T3 illetve $20,6 \pm 4,3\%$ -kal az NIH 3T3-MDR1 sejtvonal esetén. A PM koleszterin telítése hasonló tendenciákat mutatott. Az életképességekkel párhuzamosan meghatároztuk a sejtek szabad koleszterin mennyiségét is áramlási citometriásan detektált filipin festéssel. Az NIH 3T3-MDR1 sejtvonal esetén kétszer nagyobb mennyiségű koleszterint detektáltunk a sejtekben ($216,4 \pm 13,3\%$), mint az NIH 3T3 sejtvonal esetén ($100,0 \pm 6,2\%$). Az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén mért eleve nagyobb mennyiségű koleszterin akár magyarázhatja is a koleszterin kivonást követő jobb életképességeket. Ugyanakkor az NIH 3T3-MDR1 sejtek nem kizárólag a koleszterin kivonás esetén reagálnak jobb

életképességekkel, hanem az extra mennyiségben bevitt koleszterin esetén is. Mindemellett nagyon hasonló koleszterin kivonási-beviteli mintázatokat kapunk a két sejtvonal esetén, ha a koleszterin perturbációt követően a filipinnel mért koleszterin mennyiségeket a sejt eredeti koleszterin szintjéhez viszonyítjuk. Ezek a csaknem párhuzamos görbék sokkal inkább utalnak az NIH 3T3-MDR1 sejtek hatékonyabb koleszterin kompenzációs és membrán repair folyamataira, mely folyamat részeként a PM koleszterin kivonását követően megindul a koleszterinben gazdag raft domének exocitózisa a sejtfelszínre, illetve megtörténik az extra mennyiségű koleszterin redisztribúciója az intracelluláris vezikuláris Pool-okba.

Akut koleszterin depléciós eredményeinkből kitűnik, hogy a lizoszómák stabilitása nagyon hamar reagál a PM koleszterin változásaira. Mindezekből feltételezhető, hogyha egy sejt hatékonyan képes pótolni, illetve kontrollálni a PM koleszterin szintjeit, akkor ezek a stabil koleszterin szintek következőképpen befolyásolják a lizoszómák stabilitását, illetve a lizoszóma függő folyamatokat. Méréseink szerint a lizoszómális koleszterin vesztes mértéke, életről-halálról dönthet, azzal, hogy vagy korai feedback jelként szolgál egy membrán repair folyamatban (NIH 3T3-MDR1 sejtek) vagy végzetes mértékben fokozza a lizoszóma membrán permeabilitását (NIH 3T3 sejtek). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az MDR sejtek hatékonyabb membrán repair-rel rendelkeznek a CD kezeléssel együtt járó PM sérülést követően, mely folyamat csatasorba állítja a koleszterin kompenzációs mechanizmusok mellett a kiterjedt endo-lizoszómális apparátusukat és magába foglalja a Pgp-t tartalmazó raft domének exocitózist a sejtfelszínre. Eredményeink az MDR sejtek alkalmazkodásának egy újabb fortélyát emelik ki.

5. Összefoglalás

1. Bizonyítottuk, hogy a fehérjék raft asszociációjának vizsgálatára használt különböző detergensek hatással vannak az aktin polimerizációs tulajdonságaira *ex vivo* körülmények között is. Szubvitálisan alkalmazott detergensek esetében a kritikus micelláris koncentrációjuk elérésétől kezdve az aktin depolimerizációja figyelhető meg intracellulárisan.
2. A 15D3 monoklonális antitest kötődési affinitása jelentős koleszterin-függést mutatott. Az antitest segítségével a fehérje koleszterin mediált konformáció változása nagy érzékenységgel nyomon követhető volt.
3. a, Bizonyítottuk az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k fokozott endocitózist a Pool2-höz képest.
b, Bizonyítottuk, hogy az internalizálódott Pool1 Pgp-k nagyobb mértékben lépnek rá a késői endoszómák, lizoszómák felé irányuló degradációs útra. Ugyanakkor felismertük, hogy az UIC2 antitest kötődése elősegíti a Pool1 Pgp-k internalizációját.
c, Bizonyítottuk, hogy az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációja energetikailag aktív folyamat révén valósul meg.
d, Bizonyítottuk, hogy a Pool1 Pgp-k 30 perces időintervallumon belül recirkulálnak a sejtfelületre. A teljes sejtfelületi Pgp mennyiségek internalizációját követően az expressziós szintek csak hosszabb idő alatt, sértetlen fehérjeszintézis mellett állnak helyre.
4. A PM koleszterin modulációja elsősorban a Pool1 Pgp-k trafficking folyamatait módosítja. Többet koleszterin mellett fokozódik a sejtfelületi fehérjék internalizációja és csökken a sejtfelületre történő kihelyeződésük. Koleszterin kivonást követően a Pool1 Pgp-k exocitózisa erősödik a kompenzatórikus koleszterin és szfingolipid exporttal párhuzamosan.
5. Bizonyítottuk, hogy a CD kezelés az NIH 3T3-MDR1 sejtek esetén is lizoszómális exocitózist indukál a membrán repair folyamat részeként. Újdonságként kimutattuk, hogy a folyamat az extracelluláris kalciumtól való függés mellett koleszterin-függést is mutat.
6. Bizonyítottuk, hogy a Pgp-t expresszáló multidrog rezisztens NIH 3T3-MDR1 sejtvonal a drog rezisztens NIH 3T3 sejtekkel ellentétben nagyobb mennyiségű és stabilabb lizoszómákkal rendelkezik koleszterin moduláció nélkül, és koleszterin modulációt követően is.
7. A plazmamembrán koleszterin perturbációjához a multidrog rezisztens sejtvonal jobban alkalmazkodik és jobb életképességekkel rendelkezik.

6. Tudományos munkák jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/211/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gutay-Tóth Zsuzsanna

Neptun kód: H5EJ0Q

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gutay-Tóth, Z.**, Fenyvesi, F., Bársony, O., Szenté, 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: 4.779 (2015)
2. Újfalusi-Pozsonyi, K., Hild, G., Gróf, P., **Gutay-Tóth, Z.**, Bacsó, Z., Nyitrai, M.: The effects of detergents on the polymerization properties of actin.
Cytometry A. 77 (5), 447-456, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20855>
IF: 3.749





További közlemények

3. Bárony, 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: 5.228 (2015)
4. Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Bacsó, Z., **Gutay-Tóth, Z.**, Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis.
PLoS One. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF: 3.234

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,99

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 8,528

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

Debrecen, 2016.08.15.

