

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során, és gátlása UIC2 monoklonális antitest segítségével

Szalóki Gábor

Témavezető: Dr. Goda Katalin



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során, és gátlása UIC2 monoklonális antitest segítségével

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

Írta: Szalóki Gábor, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében.

Témavezető: Dr. Goda Katalin, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Diskussziós szoba, 2015. október 6. 13 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sarkadi Balázs, az MTA rendes tagja
Dr. Krizbai István, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja
tagok: Prof. Dr. Sarkadi Balázs, az MTA rendes tagja
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Krizbai István, az MTA doktora

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika tantereme, 2018. október 8., 11 óra

1 Bevezetés

A daganatos megbetegedések kemoterápiás kezelése során használt citosztatikumokkal szemben fellépő rezisztencia még napjainkban is komoly problémát jelent az onkológiai gyakorlatban. Néhány tumortípus kezdetben jól reagál a kemoterápiára és csak a kezelés hatására alakul ki bennük rezisztencia, míg más daganatok már a kezelés kezdetén rezisztensnek bizonyulnak. A problémát súlyosítja, hogy a tumor nem csupán a kezelésre használt hatóanyagra válik rezisztenssé, hanem számos, szerkezetében és hatásmechanizmusában is különböző citosztatikumra is. A jelenséget multidrog rezisztenciának (MDR) nevezték el, és az 1970-es évektől intenzíven kutatják az okait és megelőzésének lehetőségeit.

Az 1980-as évek második felére kiderült, hogy a daganatos sejtek MDR fenotípusának kialakításáért gyakran a P-glikoprotein (Pgp), egy, a sejtek plazmamembránjában kifejeződő aktív transzporter jelenléte, illetve megemelkedett expressziója felelős. A Pgp cDNS-ének szekvenciája alapján számos bakteriális transzporterrel találtak jelentős szekvencia homológiát, mely főleg a fehérje nukleotidkötő régióját érinti. Ezen szekvenciahasonlóságok alapján sorolták a Pgp-t az ABC kazettás fehérjék szupercsaládjába, mely az élővilág egyik legnagyobb fehérje szupercsaládjá.

Az emberi genomban eddig 48 ABC fehérje génjét azonosították, melyeket hét alcsaládba soroltak (ABCA-tól ABCG-ig betűzve őket). Ezek között az ABCE és ABCF család képviselőit leszámítva csak transzmembrán fehérjéket találunk, melyek változatos funkciókkal rendelkeznek a szervezetben, így működhetnek ioncsatornaként, csatorna regulátorként, de legtöbbjük aktív transzporterként funkcionál, így ezeket ABC transzportereknek is nevezik. A Pgp leírását követően egyéb ABC fehérjéket is azonosítottak, melyek képesek voltak az MDR fenotípus kialakítására, vagyis multidrog transzporterek. Napjainkra már számos egyéb ABC transzporterről is kiderült, hogy hozzájárulhat az MDR fenotípus kialakulásához mégis az elsőként leírt Pgp-t tekintik a multidrog-transzporterek „prototípusának”. Ezért a Pgp-t egyéb MDR kialakítására képes transzporterekkel együtt nagy tudományos érdeklődés övezi, intenzíven kutatják működését és gátlásának lehetőségeit is.

1.1 A Pgp szerkezete és katalitikus ciklusa

A Pgp a humán ABC fehérjék B alcsaládjának első tagja, melyet a 7-es kromozómán található *abcb1* (*mdr1*) gén kódol. A szervezet barrier régióiban lévő szövetekben (pl. bélhám, máj, vesetubulusok és vér-agy gát) expresszálódik, ahol feltehetően a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védelméért felelős. A Pgp egy 170 kDa tömegű, 1280 aminosavból álló glikoprotein. Szerkezetét tekintve ún. „teljes transzporter”, vagyis a két, egyenként hat transzmembrán α -hélixből felépülő transzmembrán domén (TMD) és a két nukleotidkötő-domén (NBD) egy fehérje láncon helyezkedik el. A TMD-k alkotják a Pgp komplex szubsztrátkötő helyét, mellyel az NBD-k által megkötött és elhidrolizált ATP-ből származó energiát felhasználva képes a sejtből vegyületek százait eltávolítani. Az NBD-k mind felépítésükben, mind az ATP-

kötés mechanizmusát illetően speciálisak. Mindkét nukleotidkötő-domén tartalmaz egy RecA-szerű béta-redős struktúrát, mely tartalmazza az ATPázokra általánosan jellemző Walker A és Walker B szekvencia motívumokat, valamint egy főleg α -hélixből álló szubdomént, melyben az ABC fehérjékre jellemző ABC „signature” motívum található. Az ABC fehérjék nukleotid kötésének másik sajátossága, hogy a két ATP megkötése a két NBD szoros kooperációjával, ún. „szendvics-dimer” létrehozásával valósul meg.

Bár a Pgp-ről jelentős mennyiségű strukturális és funkcionális információ gyűlt össze, nem áll rendelkezésre jó felbontású röntgen-krisztallográfián alapuló szerkezeti modell, ezért a molekuladinamikai tanulmányokban rendszerint bakteriális ABC transzportereken, vagy egér, illetve *C. elegans* Pgp-n alapuló homológia modelleket alkalmaznak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a Pgp-nek két, viszonylag stabil konformere van. Az ATP-mentes körülmények között megfigyelt konformerben a két NBD disszociált, és a Pgp szubsztrátkötő helye hozzáférhető a membrán belső rétege és az intracelluláris tér felől is („inward facing” forma), míg az ATP molekulák kötődése után a két NBD dimerizációjával létrejön az intracelluláris tér felől zárt, de az extracelluláris tér felé nyitott konformer („outward facing” forma). Feltételezések szerint a Pgp a katalitikus ciklusa során ezen konformációk között fluktuál.

A katalitikus ciklus során két, térben elkülönült folyamatot különböztethetünk meg, melyek egyrészt a szubsztrát megkötését, plazmamembránon keresztüli transzlokációját, és végül a kötőhelyről történő disszociációját foglalják magukban, másrészt az NBD-kben történő ATP-kötés és hidrolízis, valamint a hidrolízis termékek disszociációjának részfolyamatait. Az azonban, hogy ezek a folyamatok a katalitikus ciklus során időben és térben hogyan kapcsolódnak egymáshoz, illetve hogy egy szubsztrát molekula transzportjához az egyik, vagy mindkét ATP hidrolízise szükséges-e, a mai napig vitatott kérdések. A koncentrációgradiens ellenében történő transzport feltétele, hogy a szubsztrát megkötését követően az extracelluláris tér felé nyitottá váló szubsztrátkötő hely szubsztrátkötő affinitása lecsökkenjen, lehetővé téve a szubsztrát távozását. Azonban az sem ismert, hogy ehhez az affinitás változáshoz az ATP kötődése elegendő, vagy a hidrolízisnek is be kell következnie.

A Pgp katalitikus ciklusának felderítése során sokszor végeztek olyan biokémia vizsgálatokat, melyekben egyik vagy mindkét NBD konzervált szekvenciamotívumainak kulcs-aminosavait kicserélték. Ezek a mutációk attól függően, hogy mely konzervált szekvenciát érintik, a katalitikus ciklust más-más ponton állítják meg. Irodalmi adatok szerint függetlenül attól, hogy a mutáció csak egyik, vagy mindkét NBD-t érintette, a mutánsok rendszerint nem rendelkeztek mérhető ATPáz aktivitással. Ezek az eredmények alátámasztották azt az elképzelést, hogy az ATP hidrolízise szigorúan felváltva történik a két ATP-kötő helyen (NBS), ciklusonként egy ATP-t felhasználva, míg ezalatt a másik, hidrolizálatlan ATP együtt tarthatja a „szendvics dimert”. Ugyanakkor a szubsztrát- és ATP-mentes körülmények között kristályosított Pgp molekulák NBD-i rendszerint szeparálódva mutatkoznak a röntgen-krisztallográfiás szerkezeti modelleken. Amennyiben a szeparált NBD-jű intracelluláris oldalról nyitott konformáció valóban része a katalitikus ciklusnak, valószínűsíthető,

hogy a ciklus során mindkét ATP elhidrolizál, vagy az első hidrolízisét követően a második ATP már nem képes összetartani a dimert. A fenti, egymásnak ellentmondóan interpretálható kísérleti eredmények miatt máig sincs konszenzus a Pgp katalitikus ciklusát leíró modelleket illetően.

1.2 A Pgp klinikai jelentősége

A Pgp szervezetünkben olyan szövetekben fejeződik ki, amelyek barrier funkciót látnak el, így valószínűsíthető, hogy a szervezetbe került toxikus vegyületekkel szemben nyújt védelmet. Ugyanakkor daganatos sejteken történő gyakori kifejeződésével a Pgp multidrog rezisztenciát okoz, ezáltal jelentősen rontja számos daganatos betegség prognózisát, csökkenti a betegek túlélését.

Már a korai vizsgálatok kimutatták, hogy egerekben a humán Pgp-t kódoló *abcb1* génnel homológ *abcb1a/b* gének deléciója nem jár jelentős fiziológiai következményekkel, így a Pgp gátlása megfontolandó stratégia lehet a multidrog rezisztencia legyőzésére. A klasszikus farmakológiai megközelítés szerint az inhibitorokat a Pgp szubsztrát citosztatikumokkal együtt alkalmazva fokozható a citosztatikumok akkumulációja a tumor sejtekben. Sajnos a klinikai vizsgálatok során a Pgp gátlószerek gyakran okoztak megjósolhatatlan és nem tolerálható farmakokinetikai interakciókat, melynek oka a szervezetben fiziológiásan kifejeződő Pgp molekulák gátlása, és ennek következtében az alkalmazott citosztatikumok megváltozott farmakokinetikája és megemelkedett toxicitása lehetett.

A gyógyszer rezisztens klinikai kép kialakulásához akár többféle rezisztencia mechanizmus együttesen is hozzájárulhat, melyek azonosítása elengedhetetlen a megfelelő terápiás protokoll személyre szabott kiválasztása szempontjából. Mindezeket egybevetve fontos a multidrog rezisztencia legyőzésére irányuló terápiás protokollok repertoárjának kiszélesítése, és olyan modellrendszerek létrehozása, melyek alkalmasak a rezisztens tumorok *in vivo* tanulmányozására.

Számos olyan monoklonális antitestet (mAt) hoztak létre az idők folyamán, melyek a Pgp extracelluláris részén található epitóphoz kötődnek. Közülük néhány (pl. a MRK16, MRK17, MC57, HYB-241 és az UIC2) olyan komplex epitóphoz kapcsolódik, melynek a megjelenése konformációfüggő. Ezek az antitestek kötődésükkel képesek részlegesen gátolni a Pgp általi drog transzportot *in vivo* és *in vitro*. Bár ez a gátló hatás gyakran gyenge, mértéke függhet a transzportált szubsztráttól is, valamint általános tapasztalat szerint ugyanazon szubsztrát esetében is variábilis.

Az UIC2 egy monoklonális antitest, mely önmagában alkalmazva csak a sejtfelszíni Pgp-k 10-40%-ához kötődik, míg bizonyos Pgp szubsztrátok, vagy modulátorok jelenlétében (pl. Ciklosporin A (CsA), SDZ PSC 833, vinblasztin, paclitaxel) minden Pgp UIC2-reaktív konformációba kerülhet. Munkacsoportunk már korábban kimutatta, hogy az UIC2 képes teljesen meggátolni a Pgp transzport funkcióját, ha az előzőleg említett Pgp modulátorok valamelyikével együtt alkalmazva kötődését teljessé tesszük. Ehhez elegendő a modulátorokat a Pgp gátló koncentrációjuknál 10-20-szor kisebb koncentrációban alkalmazni. SCID egerekbe xenotranszplantált Pgp⁺ tumorok

vizsgálata során munkacsoportunk azt is kimutatta, hogy az UIC2 képes volt a szolid tumorokba penetrálni, a sejtfelszíni Pgp molekulákhoz kapcsolódni, és a Pgp⁻ sejtekhez hasonló szintre növelni ezen sejtek daunorubicin akkumulációját. Ezek alapján felvetődik kérdés, hogy a CsA-val és UIC2 mAt-vel végzett kombinált kezelés fokozza-e a citosztatikumok (pl. doxorubicin, daunorubicin) tumorelles hatását, és alkalmazásával elérhető-e klinikailag releváns tumorméret-csökkenés.

2 Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a Pgp katalitikus ciklusát régóta igen intenzíven tanulmányozzák, még mindig nem tisztázott, hogy az ATP-kötés és hasítás részfolyamatai hogyan kapcsolódnak a TMD konformációváltozásokhoz, és hogyan teszik lehetővé végső soron a szubsztrátok koncentrációgradiens ellenében történő transzportját. Figyelembe véve az ABC transzporterek érzékenységét membránkörnyezetük összetételére, célul tűztük ki olyan kísérleti rendszerek kidolgozását, melyek lehetővé teszik a Pgp katalitikus ciklusának tanulmányozását normál membránkörnyezetében, emlős sejtek membránjában kifejezve. Vizsgálataink során az alábbi konkrét kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan változik a Pgp szubsztrátjaihoz való affinitása a katalitikus ciklus során?
2. Milyen hatással van a fehérje transzportaktivitására a Walker A szekvencia konzervált lizin aminosavának metioninra történő cseréje egyik vagy mindkét oldali NBD-ben (K433M és/vagy K1076M)?
3. A fenti Walker A mutációk befolyásolják-e az UIC2-reaktív és az UIC2-vel nem jelölhető Pgp konformációk közötti átmenet bekövetkezését, valamint a fehérje szubsztrátkötő-affinitásának változását?

Irodalmi adatok és munkacsoportunk korábbi tapasztalatai alapján az UIC2 mAt kötődése gátolja a Pgp transzportaktivitását, így humanizálást követően alkalmas lehet a Pgp szubsztrát citosztatikumok általi kezelés hatékonyságának fokozására multidrogo rezisztens daganatos betegekben. Ezért célul tűztük ki az UIC2 általi Pgp gátlás mechanizmusának és *in vivo* alkalmazási lehetőségeinek részletes vizsgálatát. Ennek során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

4. Milyen körülmények között fokozza az UIC2 mAt kombinált alkalmazása a Pgp szubsztrát citosztatikumok citotoxikus hatását *in vitro* kísérletekben?
5. *In vivo* kísérletekben az UIC2 antitest kombinált adása fokozza-e a citosztatikum terápia hatásosságát?
6. A Pgp gátláson kívül más tényezők hozzájárulnak-e a kombinált kezelés *in vivo* megfigyelt hatásaihoz?

3 Anyagok és módszerek

3.1 Etikai nyilatkozat

Az állatkísérletek kivitelezése során a National Institute of Health laboratóriumi állatgondozási irányelveit tekintettük irányadónak, és az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével végeztük (engedélyszámok: 26/2006/DE-MAB és 122/2009/DEMAB).

A humán vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) Debreceni Regionális Vérellátó Központjából kaptuk, illetve a vérplazma preparáláshoz a vért egészséges önkéntesek adták. Az önkéntesek a vérvétel előtt, a vérük kísérleti felhasználását írásban engedélyezték, a vérmintákat az Orvos Világszervezet Helsinki Nyilatkozatában foglaltak szerint kezeltünk. A kísérletek elvégzését a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális Tudományos- és Kutatás-etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 25364-1/2012/EKU (449/P1/12.)).

3.2 Alkalmazott sejtvonalak

A kísérletekhez NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak humán *mdr1* génnel transzfektált variánsát (NIH 3T3 MDR1 sejtvonala); valamint a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonala és annak vinblasztinnal szelektált Pgp⁺ szubklónját (KB-V1 sejtvonala); az MDCK II (Madin-Darby canine kidney) sejtvonala és annak ABCG2-vel transzfektált változatát; a GLC4 humán kissejtes tüdőrák sejtvonala és annak MRP1-et expresszáló, doxorubicinnel szelektált szubklónját használtuk. Az NIH 3T3 és az MDCK sejtvonalaikat felhasználva a különböző mutáns Pgp variánsokat (K433M, K1076M és K433M/K1076M (utóbbit röviden csak MM-el jelöltük)) expresszáló transzgénikus sejtvonalaikat kollaborációs partnereink hozták létre Sleeping Beauty transzpozon alapú génexpressziós rendszer segítségével.

A sejteket letapadó kultúrákban tartottuk fenn 37 °C-os inkubátorokban, 5%-os CO₂ atmoszférában. A sejtek tenyésztőközege Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) volt, mely hőinaktivált főtális marha szérumot, L-glutamint és penicillin-streptomycin kóktélt tartalmazott. A vad típusú humán Pgp-t kifejező sejtek esetében a magas Pgp expressziós szintet drog szelekcióval tartottuk fenn. A kísérletek elvégzése előtt 2 nappal a sejteket drogmentes médiumba helyeztük át. Az sejteket felhasználás előtt tripszin-EDTA oldattal történő inkubálással választottuk el a sejttenyésztő flaska aljáról.

3.3 A Pgp direkt immunfluoreszcens jelölése

A sejt felszíni Pgp molekulák direkt immunfluoreszcens jelöléséhez a sejtszuspenziót 30 percig 37 °C-on inkubáltuk 15D3-A647 antitesttel vagy CsA jelenlétében UIC2-A647 monoklonális anti-Pgp antitesttel. A jelölést követően a sejteket háromszor mostuk jéghideg, FCS-t és glükózt tartalmazó PBS-sel. Az antitest kötődés mértékét FACS Array vagy FACS Aria III áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

3.4 Sejtfelszíni ABC transzporterek indirekt immunfluoreszcens jelölése

A sejteket 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a megfelelő elsődleges monoklonális antitesttel (mAt). A QCRL-3 anti-MRP1 mAt-vel történő jelölés előtt a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk, majd 30 percig jelöltük őket 4 °C-on. Ezt követően háromszori mosás után újabb 30 percig inkubáltuk a mintákat jégen CFL647-tel konjugált kecske anti-egér IgG jelenlétében. A sejteket újabb háromszori mosás után FACS ARIA III áramlási citométerrel analizáltuk.

3.5 Western blot analízis

A teljes sejtlizátum fehérjét (2,5 µg fehérje/minta) 8%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra elektroblottoltuk. A Pgp-t G1 monoklonális antitest és torma-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG antitest segítségével detektáltuk. Az előhívást SuperSignal West Femto ECL reagenssel, a kép rögzítését pedig Fluor Chem Q Alpha Innotech géldokumentációs rendszer segítségével végeztük.

3.6 Calcein és BODIPY-vinblasztin akkumulációs teszt

A sejteket 10 percig előkezeltük CsA-val, majd calcein-acetoxi-metilészter vagy BODIPY FL-vinblasztin (VBL-BPY) adását követően további 30 percig inkubáltuk. Mosást követően a sejteket jégen tartottuk a mérésig. A mérés során az elpusztult sejteket propídiium-jodiddal (PI) történő festéssel zártuk ki az analízisből. A Pgp transzportaktivitását a relatív calcein vagy VBL-BPY akkumuláció-növekedéssel jellemeztük, melyet a CsA-val kezelt és nem kezelt minták háttér fluoreszcenciával korrigált fluoreszcencia intenzitásának hányadosaként számoltunk ki.

3.7 Rodamin 123 efflux esszé

A sejteket 30 percen keresztül inkubáltunk rodamin 123-mal (R123, fluoreszcens Pgp szubsztrát). A vad típusú Pgp-t expresszáló sejteket verapamil (kompetitív Pgp inhibitor) mellett töltöttük fel, majd a sejtek által fel nem vett R123-at mosással eltávolítottuk, és a mintákat jégen tartottuk a mérés kezdetéig. Az efflux mérés kezdetén az R123-mal feltöltött sejteket 37 °C-os festék-mentes pufferrel hígítottuk ki, és a sejtek R123 fluoreszcencia intenzitását Becton Dickinson FACS Aria III áramlási citométerrel temperált mintavételi egységet használva folyamatosan mértük 5 percen keresztül. A továbbiakban a sejtuszpenzióból 10, 20, 30, 60, 120 perc elteltével mintákat vettünk, majd megmértük a sejtek fluoreszcencia intenzitását. Az elsődrendű transzport sebességi állandót a mérési pontok exponenciális függvénnyel történő illesztésével határoztuk meg.

3.8 Intakt sejtek jelölése VBL-BPY-vel és 15D3-A647-tel

A sejteket nyolc-kamrás Ibidi µ-Slide-okban növesztettük két napig, olyan kezdeti sejtsszámot alkalmazva, hogy közel konfluens kultúrát alkossanak a kísérlet idejére. A sejteket háromszori mosást követően 30 percig 37 °C-on előkezeltük CsA-val, Na₂N₃ és 2-deoxi-D-glükóz keverékével, Na₂VO₃-tal vagy N-etilmaleimiddel (NEM). Ezt követően további fél órán keresztül inkubáltuk a mintákat VBL-BPY és A647 fluorofórral konjugált 15D3 anti-Pgp monoklonális antitest jelenlétében. Az inkubálás

követően háromszor mostuk a sejteket, majd PI-vel jelölve konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A PI-pozitív, elpusztult sejteket kizártuk a vizsgálatból.

3.9 Sejtek permeabilizálása *Staphylococcus aureus* α -toxinnal illetve streptolysin-O-val

A konfokális mikroszkópiához előkészített Ibidi μ -Slide IV^{0.4} tárgylemezre növesztett NIH 3T3 sejteket α -toxin az MDCK sejteket pedig streptolizin-O (SLO) kezeléssel, 30-60 percig permeabilizáltuk DTT és proteáz inhibitor koktél mellett FCS-t tartalmazó HEPES puffében. A permeabilizált sejtek arányát PI-os festéssel határoztuk meg, a permeabilizálást akkor fejeztük be, amikor a sejtek körülbelül 80%-a PI-pozitívvá vált. A permeabilizálást követően a szabad toxint mosással távolítottuk el.

3.10 Permeabilizált sejtek jelölése VBL-BPY-vel és 15D3-A647-tel

A permeabilizálást követően a sejteket háromszori mosást követően 30 percig előinkubáltuk CsA-val vagy ATP/MgCl₂ és Na₂VO₃ keverékével, illetve AMP-PNP/MgCl₂-dal majd ezt követően további fél órán keresztül inkubáltuk a sejteket VBL-BPY és A647 fluorofórral konjugált 15D3 anti-Pgp mAt jelenlétében. Az inkubálást követően háromszor mostuk a sejteket, majd PI-vel jelölve konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk azokat. A permeabilizálódott, PI-pozitív sejteket használtuk a vizsgálathoz.

3.11 *In vitro* citotoxicitási tesztek

A KB-V1, illetve KB-3-1 sejteket 96 lyukú plate-ben drogmentes médiumban tenyésztettük 24 órán keresztül, majd további 72 órán keresztül inkubáltuk különböző koncentrációkban alkalmazott doxorubicin (DOX) és CsA és/vagy UIC2 mAt jelenlétében és hiányában. Ezt követően a médiumot AlamarBlue tartalmú médiumra cseréltük, és további két óra inkubálást követően a redukált AlamarBlue mennyiségét microplate olvasóval határoztuk meg. A minták fluoreszcencia intenzitása arányos volt a bennük található életképes sejtek számával. Az élő sejtek arányát a DOX koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd a dózis-hatás görbék illesztésével meghatároztuk a DOX félhatásos dózist (EC₅₀) a különböző kezelések esetében.

3.12 *In vitro* ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) esszé

Az emberi perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) buffy coat-ból szeparáltuk ficoll gradiens centrifugálással. A PBMC frakciót (effektor sejtek) kétszeri mosást követően DMEM-ben szuszpendáltuk fel. A KB-V1 és KB-3-1 sejteket (target sejtek) 5(6)-karboxifluoreszcein-diacetát-N-szukcinimidil észterrel (CFDA-SE) jelöltük 10 percig, majd DMEM-mel mostuk háromszor, végül DMEM-ben vettük fel.

A CFDA-SE jelölt target sejteket a perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekkel, mint effektor sejtekkel, különböző arányokban (1:5, 1:10, 1:50 és 1:100) összekevertük. Ezután a mintákat DMEM médiumban CsA és/vagy UIC2 jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk 37 °C-on CO₂-inkubátorban 8 órán keresztül. PI festést követően a mintákat áramlási citométerrel mértük. Elpusztult target sejteknek a CFDA-SE⁺/PI⁺ populációt, élő target sejteknek a CFDA-SE⁺/PI⁻ populációt tekintettük. A CFDA-SE⁺/PI⁺ kettős

pozitivitást mutató sejtek aránya az összes CFDA-SE⁺ sejtekhez (target sejtek) képest megadja az elpusztult target sejtek arányát.

3.13 *In vitro* komplementfüggő citotoxicitás (CDC) esszé

Az UIC2-vel és/vagy CsA-val kezelt vagy kezeletlen KB-V1 és KB-3-1 sejteket különböző hígításokban kevertük össze frissen preparált humán szérummal. 4 óra inkubálás után (37 °C, CO₂-inkubátor) áramlási citométerben meghatároztuk a PI-pozitív halott sejtek arányát. A használt humán szérumok hemolitikus aktivitását nyúl sztróma antitestekkel szenzitizált bányai vörösvértestek segítségével határoztuk meg.

3.14 Állatkísérletek

A kísérletekhez 10-12 hetes, patogénmentes B-17 súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egereket használtunk. Az állatokat patogénmentes körülmények között tartottuk, az ivóvizet és takarmányt autoklávozással sterilizáltuk, melyhez igény szerint hozzáfértek az állatok.

A SCID egerek combjába szubkután KB-3-1 és KB-V1 sejteket injektáltunk. Ahhoz, hogy hasonló méretű tumorokat kapjunk mindkét sejtvonala esetében, a KB-V1 sejtek mennyiségét, azok lassabb osztódási rátája miatt meg kellett duplázunk. A tumorokat négy napig hagytuk nőni, majd az egereket doxorubicinnel, doxorubicin és UIC2 mAt vagy CsA keverékével, vagy mindhárom kombinációjával kezeltük. A kísérletet a kemoterápiát követő nyolcadik napon termináltuk, az állatokat nyaki diszlokációval öltük le, az eltávolított tumorokat a tömegük meghatározását követően az mRNS analízisig folyékony nitrogénben tároltuk.

3.15 mRNS analízis

A fagyasztott tumorszeleteket tízszeres térfogatú, előre hűtött RNAlater-ICE oldatban tartottuk -20 °C-on egy éjszakán át, hogy megóvjuk az RNS-t a degradációtól, majd teljes RNS-t izoláltunk a mintából. Ezt követően a Pgp mRNS expresszióját a tumorokban és a xenotranszplantációhoz használt sejtekben RT-qPCR módszerrel, Taqman esszé segítségével határoztuk meg. A Pgp mRNS expresszióját a mintákban a humán glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS mennyiségéhez viszonyítottuk.

3.16 Konfokális mikroszkópia

A mikroszkópos mintákat Olympus FluoView 1000 invertált IX-81 állvánnyal és UPlanSApo 60× (NA=1,35) olajimmerziós objektívvel felszerelt konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A VBL-BPY emisszióját 488 nm-es gerjesztés mellett, 500 nm és 530 nm között detektáltuk. A PI-t 561 nm-es gerjesztés, az A647-et pedig 633 nm-es gerjesztés mellett 555 nm és 655 nm között, illetve 655 nm és 755 nm között detektáltuk.

Az intakt sejtek jelölését követően a Pearson-féle keresztkorrelációs együtthatók meghatározásához a sejtek membránfelszínéről készítettünk felvételeket, majd a VBL-BPY (zöld) és 15D3-A647 (piros) csatornái közötti keresztkorrelációt számoltuk. A keresztkorrelációs koefficiens elméleti maximuma 1, ebben az esetben a két csatornában mérhető jelek 100%-ban kolokalizálnak, míg 0 érték esetén az eloszlások

egymáshoz képet véletlenszerű, -1 esetén pedig az adott pixelben az egyik csatornában mérhető jel kizárja a másik csatorna jelének jelenlétét.

A permeabilizált sejtek membránstruktúrájában történt változások miatt nem tudunk jó minőségű felvételeket készíteni a membránfelszínekről, így ott Pearson-féle keresztkorrelációs együttható számítására nem volt lehetőség. Ezeket a képeket úgy kvantifikáltuk, hogy meghatároztuk a VBL-BPY és a 15D3-A647 anti-Pgp antitest fluoreszcenciájának hányadosát a membránt reprezentáló pixelekből.

3.17 Áramlási citometria

Vizsgálataink során Becton Dickinson FACScan, FACS Array vagy FACS Aria III típusú áramlási citométereket használtunk.

Az ADCC és a CDC esszék eredményének kiértékelése során a FACScan 488 nm-es lézert használtuk gerjesztésre, és a CFDA-SE jelét az 530/30 nm-es sávszűrővel ellátott csatornában, míg PI-t az 585/42 nm-es sávszűrővel ellátott csatornában detektáltuk.

A FACS Array mérések során a PI-t 532 nm-es, az A647-et pedig 633 nm-es dióda lézerral gerjesztettük. A PI-t 585/42 nm-es, az A647-et pedig 661/16 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk.

A calcein és VBL-BPY akkumulációs teszt során, és az R123 efflux FACS Aria III-mal történő mérésekor a fluorofórokat az Ar-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, és az emittált fényt 530/30 nm sávszűrőn keresztül detektáltuk. A PI-t 532 nm-es lézerral gerjesztettük, és 585/42 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. A magas Pgp expressziójú sejtpopulációkat direkt immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás sejtseparálással válogattuk ki FACS Aria III készülék segítségével. Ezekben a kísérletekben az A647-et 633 nm-es lézerral gerjesztettük és az emittált jelet 660/20 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk.

3.18 Kiértékeléshez használt programok és statisztikai analízis

A mikroszkópos képek szerkesztéséhez és a grafikai utómunkához ImageJ-t, Adobe Photoshop-ot és Adobe Illustrator-t, az adatok statisztikai analizésére Sigma Stat vagy SPSS programokat használtunk. Két független csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát, három, vagy több csoport összehasonlítására varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. A minták páronkénti összehasonlításához egyenlő varianciák esetén Holm-Sidak, különböző varianciák esetén pedig Dunnett T3 post hoc tesztet alkalmaztunk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $P < 0,05$ volt.

4 Eredmények

I. A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során

4.1 Az MDCK sejtek a Pgp mutáns variánsait a vad típussal összemérhető szinten expresszálják

Ahhoz, hogy a vad típusú és Walker A mutáns Pgp variánsok transzportaktivitását össze lehessen hasonlítani, olyan sejtvonalakra volt szükségünk, melyek hasonló mértékben fejezik ki a különböző variánsokat. Ezért a kollaborációs partnereink által előállított transzgenikus sejtvonalakból a Pgp-t homogén módon expresszáló sejtpopulációkat direkt immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás sejtszeparálással válogattuk ki. A sejtklonok Pgp expresszióját immunfluoreszcens jelöléssel és áramlási citometriával, illetve Western-blottal rendszeresen ellenőriztük. A vad és féloldali mutáns Pgp-t kifejező sejtvonalak expressziós szintje nem különbözött egymástól szignifikánsan, míg a dupla mutáns Pgp expressziója magasabb volt.

4.2 A Walker A mutáns Pgp molekulák reziduális transzportaktivitással rendelkeznek

A különböző Pgp variánsok transzportaktivitását szubsztrátkumulációs-teszttel mértük, melyben calcein-AM-et használtunk Pgp szubsztrátként. A Pgp variánsok transzportaktivitását a sejtek CsA (ciklosporin A, kompetitív Pgp gátlószer) érzékeny calcein felvételével jellemeztük.

A vad típusú Pgp-t expresszáló sejtek esetében a CsA kezelés hatására jelentősen, $84,3\pm 7,3$ -szorosára nőtt a calcein akkumuláció a sejtekben, mely jól mutatja a vad típusú Pgp-k általi hatékony exportot. Ezek az értékek a féloldali mutáns Pgp-eket expresszáló sejtek esetében kisebbek (a K433M mutáns esetében $12\pm 0,8$ -szoros, míg a K1076M mutáns esetében $9,5\pm 1,7$ -szeres növekedés), de még mindig szignifikánsan magasabbak a mindkét Walker A szekvenciájában mutáns Pgp-eket expresszáló sejtekéhez ($2,3\pm 0,2$ -szeres), illetve a Pgp-t nem expresszáló sejtekéhez ($1,4\pm 0,3$ -szeres) képest. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a féloldali mutációt hordozó Pgp molekulák rendelkeznek reziduális transzportaktivitással, míg mindkét NBD mutációja esetén a molekula nem transzportál.

A Walker A mutáns Pgp variánsok transzportaktivitásának kvantitatív jellemzésére vizsgáltuk a rodamin 123 (R123) efflux kinetikáját, és meghatároztuk az R123 transzport sebességi állandóját. Ehhez a sejteket feltöltöttük R123 festékkel, majd nagy térfogatú R123-mentes pufferbe helyezve mértük, hogy milyen gyorsan távozik a sejtekből a festék. A sejtek által megtartott fluoreszcencia intenzitást az idő függvényében ábrázolva meghatároztuk az R123 transzport sebességi állandóját.

Eredményeink alapján jól látható, hogy a sebességi állandó a Pgp-t nem expresszáló sejtek esetében ($0,02\pm 0,01 \text{ min}^{-1}$) és a dupla mutáns Pgp-eket expresszáló sejtek esetében ($0,02\pm 0,01 \text{ min}^{-1}$) megegyezik és igen alacsony. A féloldali mutációt hordozó Pgp-t expresszáló sejtek esetében a sebességi állandó legalább négyszerese ($0,1\pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ a

K433M sejtek esetében és $0,09 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ a K1076M sejtek esetében), míg a vad típusú Pgp-eket expresszáló sejtek esetében a sebességi állandó több, mint harmincszorosa ($0,7 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$) a Pgp-t nem expresszáló sejtek sebességi állandójának. Eredményeink alátámasztják, hogy az egyik NBD mutációja összeegyeztethető a transzporttal, bár jelentősen csökkenti annak hatékonyságát, míg mindkét Walker A szekvencia mutációja transzport szempontjából inaktív fehérjét eredményez.

4.3 A féloldali Walker A mutáns Pgp-k is képesek az UIC2 mAt kötődésének megváltozását okozó konformációváltozásra

Önmagában alkalmazva az UIC2 antitest csak a sejtfelszíni Pgp-k 20-40%-ához kötődik, de CsA jelenlétében vagy ATP depláció hatására a sejtfelszíni Pgp-k mindegyike az antitest számára felismerhető konformációba kerül. Emellett azt is kimutatták, hogy az ortovanadát-ion (V_i) hatására az UIC2-vel jelölhető Pgp-k aránya csökken. További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a Walker A mutációt hordozó Pgp molekulák képesek-e az UIC2 antissztel detektálható konformációváltozásokra. A féloldali mutációt hordozó Pgp-eket expresszáló sejtek a vad típusú Pgp-t kifejező sejtekhez hasonlóan CsA kezelés és ATP depláció hatására jelentős UIC2 reaktivitás növekedést mutattak, míg V_i hatására, mely a P_i helyére bekötődve stabilizálja a hidrolízist követő átmeneti állapotot, pedig UIC2 reaktivitás csökkenést tapasztaltunk. Ezzel szemben a mindkét oldali Walker A szekvenciában mutációt hordozó Pgp-eket expresszáló sejtek kezeléstől függetlenül magas UIC2 reaktivitást mutattak. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a féloldali mutáns Pgp-k képesek az UIC2-reaktív és az UIC2-t nemkötő konformációk közötti váltásra, míg a dupla-mutáns Pgp-k az UIC2-reaktív konformációban rekedtek, melyből az általunk alkalmazott kezelésekkal nem lehet őket kimozdítani.

4.4 A Pgp modulátorok nem változtatják meg a sejtfelszíni Pgp-k mennyiségét

Felmerült a kérdés, hogy mivel a kísérletek során alkalmazott modulátorok többsége jelentős hatással van a sejtek metabolizmusára, nem változik-e a sejtfelszíni Pgp-k száma az előkezelés és a jelölés során. Ennek vizsgálatára vad típusú Pgp-t expresszáló NIH 3T3 és MDCK sejteket jelöltünk a modulátorokkal történő előkezelés után 15D3-A647 mAT-vel. Mivel a 15D3 mAt nem konformációérzékeny kötődésű, minden sejtfelszíni Pgp-t megjelöl. Ezekben a kísérletekben nem tapasztaltunk különbséget a kezeletlen és a modulátorral előkezelt sejtek jelölődése között. Ezek alapján belátható, hogy a használt modulátorok az előkezelés és a jelölés során nem befolyásolják jelentősen a sejtfelszíni Pgp-k számát.

4.5 A féloldali Walker A mutáns Pgp-k is képesek a szubsztráffinitás megváltozását okozó konformációváltozásra

A Pgp molekulák szubsztráffinitását BODIPY-FL fluorofórral konjugált vinblasztin molekulákkal teszteltük. Akumulációs teszttel kimutattuk, hogy hasonlóan a vinblasztinhoz, a VBL-BPY megőrizte Pgp szubsztrát karakterét. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a sejten belül hogyan oszlanak el a VBL-BPY molekulák, illetve, hogy megváltozik-e az eloszlásuk különböző Pgp modulátorok hatására. A Pgp⁺ MDCK

sejtekben a VBL-BPY intracelluláris vezikulákban halmozódott fel, ugyanakkor plazmamembrán festődést nem tapasztaltunk.

A vad típusú Pgp molekulákat expresszálo sejtek esetében nem tapasztaltunk intracelluláris VBL-BPY felhalmozódást a hatékony transzport következményeképpen, ezzel szemben, amikor a sejteket ATP depléciót követően festettük VBL-PBY-vel, intenzív plazmamembrán festődést tapasztaltunk. Abban az esetben, ha Walker A mutáns Pgp-t expresszálo sejteket festettük előkezelés nélkül, a féloldali mutánsokat expresszálo sejtek esetében gyenge, míg a kétoldali mutáns expresszálo sejtek esetében igen erős membrán festődést detektáltunk. Ez a membrán jelölődés minden esetben kivédhető volt CsA előkezeléssel. Mivel a membránban detektálható VBL-BPY jel csak a Pgp-t expresszálo sejteken volt megfigyelhető, ráadásul kompetitív Pgp inhibitorral kivédhető volt, arra következtettünk, hogy ebben az esetben a VBL-BPY a nagy szubsztrátaffinitású konformációban lévő Pgp-k szubsztrátkötő helyére kötődik be és ott csapdázódik.

Mivel a VBL-BPY és a Pgp vizualizálására használt 15D3-A647 anti-Pgp antitest jele jól korrelált, a szubsztrátkötő konformációban lévő Pgp-k aránya meghatározható volt a két jel Pearson-féle keresztkorrelációs együtthatójának meghatározásával. Mivel az antitest kötődése konstans volt a kísérletek során, így a keresztkorrelációs együttható értéke csak a VBL-BPY kötődésének mértékétől függött. A kétoldali mutáns Pgp-eket expresszálo sejtek esetében a keresztkorrelációs együttható magas volt (0,8 körüli), mely alapján arra következtethettünk, hogy a Pgp-k túlnyomó többsége magas szubsztrátaffinitású konformációban volt. A kompetitív inhibitorral (CsA) történő előkezelés mindegyik mutáns esetében, míg a poszt-hidrolitikus állapotot rögzítő foszfát analóg (V_i) a féloldali mutánsok esetében a keresztkorrelációs együttható értékét nullához közelítő értékre csökkentette. Ha a sejteket ATP depletáltuk, vagy meggátoltuk a Pgp-k ATP-kötését N-etilmaleimid (NEM) alkalmazásával, mind a vad típusú, mind a féloldali mutáns Pgp-k nagy szubsztrátaffinitású konformációba kerültek, melyet jól tükrözött a keresztkorrelációs koeficiens magas, 0,8 körüli értéke. Itt érdemes megjegyezni, hogy a dupla mutáns Pgp-eket a magas szubsztrátaffinitású állapotból nem lehetett kimozdítani, a fluoreszcens szubsztrát kötődését csak a kompetitív inhibitor alkalmazása gátolta meg.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a féloldali nukleotidkötő hely mutációt hordozó Pgp variánsok a szubsztrát transzport vizsgálatok eredményeivel összhangban képesek a magas és alacsony szubsztrátaffinitású állapotok közötti konformációváltásra, míg a dupla mutáns erre képtelen.

4.6 A Pgp nagy szubsztrát-affinitású konformációjából az alacsony szubsztrát-affinitású konformációba történő átbillenéséhez elegendő a nukleotid kötődése

Mivel a különböző nukleotidok nem membránpermeábilisak, így intakt sejteken nem vizsgálható, hogy milyen hatással vannak a Pgp molekulák konformációjára és szubsztrátaffinitására. Az NIH 3T3 MDR1 sejteket Staphylococcus α -toxinnal, míg az

MDCK sejteket Streptolizin-O-val permeabilizáltuk, majd különböző nukleotidokkal és Pgp modulátorokkal történő előkezeléseket követően festettük őket VBL-BPY-vel és 15D3-A648 anti-Pgp mAt-vel. Ezt követően kiszámítottuk a VBL-BPY és a 15D3-A648 antitest fluoreszcens jelének arányát a membránban. Mivel a permeabilizálatlan sejtekhez hasonlóan a 15D3-A648 antitest kötődésének mértéke itt is konstans volt, a fluoreszcens jelek aránya csak a VBL-BPY kötődés mértékétől függött.

A nukleotidok kimosását követően a vad típusú Pgp molekulák az élő sejtek ATP depléciója során is tapasztalható nagy szubsztráffinitású konformációt vették fel. A VBL-BPY kötődés megszüntethető volt a permeabilizált sejtek ATP/Mg²⁺-vel és V_i-vel történő előkezelésével, mely a Pgp molekulákat az ATP hidrolízist követő állapotban csapdázza. Érdekes módon, ha a permeabilizált sejteket 5 mM AMP-PNP/Mg²⁺-vel inkubáltuk elő, akkor is jelentősen csökkent a VBL-BPY/15D3-A648 arány, ami arra utal, hogy a Pgp-k többsége alacsony szubsztráffinitású konformációba került. Mivel az AMP-PNP nem hidrolizálódó ATP analóg, így arra következtethetünk, hogy a Pgp molekulák alacsony szubsztráffinitású konformációba történő átbillenéséhez nem szükséges a nukleotid hidrolízise.

A féloldali Walker A mutánsokat expresszáló sejtek esetében a vad típusú Pgp-khez képest AMP-PNP hatására kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk a VBL-BPY kötődésben. Ezzel szemben a mindkét Walker A szekvencia lizinjében mutációt hordozó Pgp-eket expresszáló sejtek VBL-BPY kötődésére semmilyen hatással nem volt az AMP-PNP-vel történő előkezelés, a Pgp molekulák magas szubsztrát-affinitású konformációban maradtak.

4.7 A nukleotid kötése jelentősen csökkenti a Pgp UIC2 reaktivitását

Az előzőekben láthattuk, hogy a nem-hidrolizálódó nukleotid analóg, az AMP-PNP kötődése a Pgp-t alacsony szubsztráffinitású konformációban stabilizálja. Ezután arra is kíváncsiak voltunk, hogy ez konformációváltozás detektálható-e az UIC2 mAt-vel. A nukleotidokat kimosva a permeabilizált sejtekből intenzív UIC2 jelölődést tapasztaltunk a plazmamembránban, ugyanakkor AMP-PNP jelenlétében az UIC2-A647 nem jelölte a Pgp-eket.

Ez alapján elmondható, hogy az AMP-PNP által kiváltott konformációváltozás nemcsak a szubsztráffinitás-változásban, hanem a Pgp molekulák UIC2 reaktivitásának csökkenésében is tetten érhető.

II. Az UIC2 általi Pgp gátlás mechanizmusának és *in vivo* alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata

4.8 Az *in vivo* egérkísérletek során követett kísérleti stratégia

A kombinált UIC2-CsA-DOX kezelés hatásainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálatára a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejt vonalat és annak vinblasztinnal szelektált szubklónját, a KB-V1 sejt vonalat használtuk. A kísérletek során elsőként megvizsgáltuk, hogy a kiválasztott sejt vonal alkalmas lehet-e Pgp gátlási stratégiánk *in vivo* tesztelésére. Ezért meghatároztuk a sejtek Pgp expresszióját, illetve kizártuk egyéb

ABC transzporterek jelenlétét, majd *in vitro* citotoxicitási teszttel vizsgáltuk az UIC2 mAt és CsA kombinált alkalmazása során kialakuló DOX érzékenységváltozást. Ezt követően a sejteket SCID egerekbe szubkután injektáltuk, majd négy nap elteltével az állatokat DOX-al, UIC2-vel, CsA-val, illetve ezek kombinációival kezeltük. Mivel a tizenkettedik napon már tapintható tumorok fejlődtek a kezeletlen egerekben, a kísérletet ezen a napon termináltuk, az egerekből eltávolítottuk a tumorokat, és megmértük azok tömegét, illetve összevetettük a tumorok mRNS szintű Pgp expresszióját a kiindulási sejtekével.

4.9 A KB-V1 sejtek magas szinten expresszálják a Pgp-t

Az *in vivo* kísérletek megkezdése előtt indirekt immunfluoreszcenciás jelölést követően áramlási citometriás módszerrel meghatároztuk mindkét alkalmazott sejtvonal esetében a leggyakrabban multidrog rezisztenciát okozó ABC transzporterek (Pgp, ABCG2 és MRP1) expressziós szintjét. A KB-3-1 sejtekben nem volt kimutatható a Pgp, míg a KB-V1 sejtekben magas Pgp expressziót mértünk. Ugyanakkor a részben átfedő szubsztrát spektrumú multidrog transzporterek, az ABCG2 és az MRP1 jelenléte nem volt kimutatható sem a KB-3-1, sem a KB-V1 sejtekben.

4.10 A Pgp⁺ tumor sejtek a xenotranszplantációt követően is megtartották magas expressziós szintjüket

Ahhoz, hogy megfelelő kísérleti rendszert hozzunk létre Pgp gátlási stratégiánk *in vivo* tesztelésére, ellenőriznünk kellett, hogy a xenotranszplantációra használt sejtek megőrzik-e magas Pgp expressziójukat a kísérlet időtartama alatt. A KB sejtek gyors növekedési rátájának köszönhetően a xenotranszplantációt követően 10-12 nappal már tapintható tumorok alakultak ki a citosztatikummal nem kezelt állatokban. A xenotranszplantáció után 12 nappal eltávolított tumorok és a kiindulási sejtek Pgp mRNS expresszióját RT-qPCR technikával határoztuk meg. A KB-V1 sejtekben és a belőlük kifejlődött tumorokban hasonló mértékű Pgp mRNS expressziót detektáltunk, mely legalább három nagyságrenddel magasabb a KB-3-1 tumorokhoz képest. Érdekes módon a KB-3-1 tumorokban a Pgp mRNS szintje körülbelül 60-szorosára nőtt az állatokba injektált kiindulási sejtekhez képest, de még így is igen alacsony szinten maradt. Ez alapján elmondható, hogy a KB-V1 sejtek a tumorokban megtartották multidrog rezisztens fenotípusukat, míg a KB-3-1 tumorok csak igen csekély mennyiségben expresszálták a Pgp-t.

Tehát a KB-3-1/KB-V1 Pgp⁻/Pgp⁺ humán epidermoid karcinóma sejtvonalpár SCID egerekbe történő xenotranszplantációján alapuló kísérleti rendszer alkalmas lehet Pgp gátlási stratégiánk *in vivo* tesztelésére.

4.11 Az UIC2 antitest képes kis dózisu CsA-val kombinációban használni visszaállítani a Pgp⁺ sejtek doxorubicin érzékenységét a Pgp⁻ sejtek szintjére

Gátlási stratégiánk és a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpár tesztelésére először *in vitro* citotoxicitási tesztek végeztünk. Összhangban a magas Pgp expressziós szintjükkel, a KB-V1 sejtek rezisztensek a Pgp szubsztrát doxorubicinre (DOX). A DOX félhatásos

dózisa a KB-V1 sejtek esetében $2,19 \pm 0,39 \mu\text{M}$, míg a Pgp⁻ KB-3-1 sejtek esetében mindössze $44 \pm 3 \text{ nM}$. A KB-V1 sejtekben a CsA kezelés koncentráció-függő módon gátolta a Pgp-t és csökkentette a DOX EC₅₀ értékét, míg az UIC2 antitest önmagában nem csökkentette szignifikánsan a sejtek DOX rezisztenciáját. Azonban $1 \mu\text{M}$ CsA és telítő koncentrációban alkalmazott UIC2 mAt kombinációjával a KB-3-1 sejtekéhez hasonló szintre fokozta a KB-V1 sejtek DOX érzékenységét, amit a DOX EC₅₀ értékének $33 \pm 19,7 \text{ nM}$ -ra való csökkenése jelzett. Ilyen mértékű drog-érzékenység növekedést KB-V1 sejteknél csak tízszeres mennyiségű CsA alkalmazásával tudtunk elérni UIC2 antitest nélkül. A KB-3-1 sejtek esetében a fent említett kezelések egyike sem változtatta meg szignifikánsan a sejtek DOX érzékenységét.

4.12 Az UIC2 mAb és a CsA önmagában és kombinációban sem csökkenti a sejtek életképességét

Megvizsgáltuk, hogy az UIC2 vagy a CsA, illetve ezek kombinációja DOX nélkül alkalmazva befolyásolja-e a sejtek életképességét *in vitro* kísérletekben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy egyik kezelés sem csökkentette a sejtek viabilitását. Tehát a kombinált CsA+UIC2 kezelés *in vitro* kísérleteinkben munkacsoportunk korábbi adataival összhangban a KB-V1 sejtek DOX érzékenységét fokozva fejti ki hatását.

4.13 A kombinált DOX-CsA-UIC2 kezelés jelentősen gátolta a Pgp⁺ tumorok növekedését

A fenti *in vitro* eredmények alapján olyan *in vivo* kísérletsorozatot terveztünk, melynek során megvizsgáltuk, hogy alacsony dózisu CsA és UIC2 mAt kezeléssel kombinálva képes-e gátolni a DOX a SCID egerekbe xenotranszplantált Pgp⁺ KB-V1 sejtekből kialakuló tumorok növekedését.

A kísérleti állatokat a xenotranszplantációt követő 4. napon kemoterápiás kezelésnek vetettük alá, majd az ezt követő nyolcadik napon termináltuk a kísérletet, eltávolítottuk a tumorokat, majd megmértük azok tömegét. A DOX kezelés önmagában csaknem hatástalan volt a KB-V1 tumorok esetében, míg a KB-3-1 tumorok növekedését jelentősen csökkentette. Ha a DOX mellett 10 mg/ttkg CsA-t is adtunk az állatoknak, a KB-V1 tumorok tömege csökkent, míg a KB-3-1 tumorok tömege nem változott a csak DOX kezelést kapott tumorokhoz viszonyítva. A DOX-CsA-UIC2 kombinált kezelést kapott állatok esetében azonban a KB-V1 tumorok átlagos tömege mindössze kb. tizede volt a DOX-szal kezelt állatokból izolált tumorokénak, míg a KB-3-1 tumorok esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Fontos megjegyezni, hogy a DOX-CsA-UIC2 kezelésben részesült állatokban a xenotranszplantált tumorok csupán 52%-a fejlődött detektálható méretűvé, és az állatok 20%-a teljesen tumormentes maradt. Ezzel szemben az összes többi kísérleti csoportban minden esetben találtunk detektálható tumort. Érdekes módon az *in vitro* citotoxicitási tesztek eredményével ellentétben az *in vivo* kísérletekben a DOX-UIC2 kombinált kezelés is csökkentette a KB-V1 tumorok növekedését a csak DOX-szal kezelt állatokhoz képest. Ez arra engedett következtetni, hogy a tumor növekedésének gátlása nem csupán a Pgp gátlása miatt történt, hanem egyéb folyamatok is közrejátszhattak, ezért megvizsgáltuk,

hogy vajon a SCID egerek részlegesen működőképes immunrendszere hozzájárulhatott-e a tumorok növekedésének gátlásához.

4.14 Az UIC2 antitest képes ADCC-t indukálni *in vitro*

Megvizsgáltuk, hogy az UIC2 mAt képes-e ellenanyag-függő sejtközvetített citotoxicitást (ADCC), vagy komplement közvetített lízist (CDC) indukálni. Mivel a tesztekhez jelentős mennyiségű élő immunsejtre, illetve szérumra volt szükség, melyet csak nagyszámú egér feláldozásával lehetett volna kinyerni, így a tesztekhez humán sejteket, illetve szérumot használtunk.

ADCC tesztejünk során a KB-V1 target sejtek több mint 80%-a elpusztult, amikor UIC2 antitesttel és humán eredetű perifériás vérből származó mononukleáris sejtekkel (PBMC), mint effektor sejtekkel, 1:50 illetve 1:100 target-effektor sejt arányt alkalmazva inkubáltunk együtt. A CsA kezelés nem befolyásolta az UIC2 által mediált ADCC mértékét. Kontroll kísérleteinkben KB-3-1 sejtek esetében akkor sem tapasztaltunk jelentős target sejt pusztulást, ha a minta nagy mennyiségű effektor sejtet tartalmazott a target sejtekhez képest.

Ugyanakkor *in vitro* CDC kísérleteinkben nem tapasztaltunk kimutatható komplement általi sejtlyízist sem a KB-V1, sem a KB-3-1 sejtek esetében, annak ellenére, hogy a használt szérumok a kontroll kísérletben az elvárásoknak megfelelő hemolitikus aktivitással rendelkeztek.

Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az UIC2 kötődése a Pgp⁺ sejtekhez képes ADCC-t indukálni, CDC-t viszont nem.

5 Eredmények megbeszélése

I. A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során

Kristályszerkezetek, biokémiai és biofizikai adatok alapján széleskörűen elfogadott, hogy az ABC transzportereknek legalább két különböző, energetikailag stabil konformere van: a disszociált NBD-jű, citoplazmatikus oldal felől nyitott konformáció és az asszociált NBD-ekkel jellemezhető, az extracelluláris tér felé nyitott konformáció. A két konformációs állapot közötti átmenet valószínűleg számos lépésből áll, melynek során végül a pumpa szubsztrátaffinitása lecsökken, ezáltal elősegítve a megkötött szubsztrát disszociációját és transzportját a koncentrációgradienssel szemben. Azon molekuláris történések részletei azonban, melyek a nukleotidok kötődését, az NBD-k asszociációját és disszociációját, illetve a TMD-k szubsztrátaffinitást befolyásoló konformációváltozását összekapcsolják, a mai napig nem tisztáztak.

Kísérleteink során azt tűztük ki célul, hogy fluoreszcens Pgp szubsztrátok segítségével feltérképezzük, hogy a katalitikus ciklus mely pontján történik meg a TMD-kben az a konformációváltozás, melynek során a fehérje szubsztrátaffinitása lecsökken. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a fenti konformációváltozás milyen kapcsolatban van a Pgp extracelluláris hurkainak azon átrendeződésével, melynek hatására a fehérje felismerhetetlenné válik a konformációérzékeny UIC2 mAt számára. Kísérleteink során a Pgp konformációját és szubsztrátaffinitását vizsgáltuk oly módon, hogy a Pgp-t katalitikus ciklusának különböző pontjain megrekesztettük nukleotid analógok, különböző inhibitorok alkalmazásával, vagy mutációk indukálásával a fehérje ATP-kötő helyében. Az UIC2 konformációérzékeny mAt segítségével detektáltuk a Pgp TMD-iben végbemenő konformációváltozásokat. A VBL-BPY és 15D3-A647 anti-Pgp antitest fluoreszcencia kolokalizációjának mérésén alapuló módszerünk segítségével pedig a Pgp szubsztrátaffinitásáról kaptunk információt a katalitikus ciklus különböző szakaszaiban. Mivel a Pgp szoros kapcsolatban van a lipid kettősréteggel, melybe beágyazódik, és amelyből megköti a szubsztrátjait, így kísérleti rendszereink erőssége, hogy természetes emlős membránkörnyezetében teszi lehetővé a Pgp vizsgálatát.

Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a nem hidrolizálódó ATP analóg AMP-PNP kötődése kiváltja az UIC2-vel detektálható konformációváltozást a Pgp az IC oldalról nyitott konformációjából az EC oldalról nyitott konformációba, melyet a Pgp szubsztrátaffinitásának csökkenése is kísér. Tehát a Pgp konformációváltozása az IC oldalról nyitott konformációból az EC oldalról nyitott konformációba és a szubsztrátaffinitás csökkenése mindenképpen megelőzi az ATP hidrolízisét.

A Walker A motívumok mindkét NBD-ben, az ellenoldali NBD „signature” motívumával együttműködve, közvetlenül részt vesznek az NBD-k ATP-függő dimerizációjában és az ATP hidrolízisében. De az, hogy az ATP-kötés és hidrolízis folyamata hogyan koordinálódik a két NBD között, illetve, hogy transzportált szubsztrátonként egy vagy kettő (vagy akár több) ATP molekula használódik-e fel, még

nem ismert. Irodalmi adatok szerint számos ABC transzporterben a konzervált Walker A szekvenciák egyik vagy mindkét ATP-kötő helyben előidézett mutációja az ATPáz aktivitás megszűnését vagy drasztikus csökkenését okozta. Mivel a Pgp mindkét ATP-kötő helye képes ATP hidrolízisére és már az egyik NBD mutációja is gátolta az ATPáz és transzportaktivitást, úgy vélték, hogy a Pgp két NBD-je funkcionálisan egyenértékű, és mindkettő épsége szükséges a fehérje katalitikus aktivitásához.

Kísérleteink megerősítették, hogy a Pgp mindkét oldali Walker A lizinének egyidejű mutációja teljesen inaktíválja a fehérjét, az UIC2 reaktív IC oldalról nyitott konformációban csapdázva, melynek nagy a szubsztrátaffinitása. Érdekes módon azonban, ha csak az egyik NBD lizinét érinti a mutáció, akkor a mutáns fehérjék esetében a vad típushoz hasonlóan kiváltható az IC oldalról nyitott konformációból az EC oldalról nyitott konformációba történő átmenet, melynek során a fehérjék szubsztrátaffinitása is lecsökken. V_i kezelés hatására a vad típusú Pgp-hez hasonlóan a féloldali mutánsokban is kialakul a stabil Pgp-ADP- V_i komplex, melyet UIC2-vel nem jelölhető konformáció és csökkent szubsztrátaffinitás jellemez. A féloldali Walker A mutánsok katalitikus aktivitását támasztják alá munkacsoportunk azon egyéb megfigyelései is, melyek szerint az egyoldali mutáns Pgp-knek alacsony, de mérhető szubsztráttal stimulálható ATPáz aktivitása van és enyhe drogrezisztenciát is kölcsönöznek az őket kifejező sejteknek. Drog transzport kísérleteink alapján ezek a féloldali Walker A mutánsok a vad típusú fehérjéhez képest kb. 10-15 %-os „maradék” transzportaktivitással rendelkeznek, mely nem magyarázható másképp, csak úgy, hogy képesek újra és újra áthaladni a katalitikus cikluson.

Bár az általunk használt kísérleti rendszereknek is számos korlátja van, meg kell jegyeznünk, hogy azoknak a kísérleteknek a többsége, melyek során a féloldali mutánsokat működésképtelennek találták, heterológ expressziós rendszereket vagy tisztított és rekonstituált fehérjét használtak. Ismert, hogy a plazmamembrán összetétele befolyásolja az ABC fehérjék aktivitását, illetve, hogy a membrán koleszterin-tartalma befolyásolja a Pgp működését. Mivel a membrán koleszterin-tartalma jelentősen kisebb az alacsonyabb rendű eukariótákban, így feltételezhetően ez lehetett az oka, hogy a heterológ expressziós rendszerekben nem tudták detektálni az egyoldali Walker A mutánsok igen alacsony ATPáz aktivitását. Más esetekben a fehérje szolubilizálása és rekonstitúciója is okozhatott aktivitásvesztést.

Mivel kísérleteink során úgy találtuk, hogy a féloldali Walker A mutáns Pgp-k katalitikusan aktívak, az a katalitikus ciklus modell, mely szerint szigorúan két ATP hidrolízise szükséges egy ciklus során, nem egyeztethető össze eredményeinkkel. Hasonlóan nehezen illeszkednek az eredményeink egy olyan modellbe is, melyben szigorúan felváltva működik a két nukleotidkötő hely. Ha a nukleotidkötő helyek szigorúan alternálva működnének, minden második ciklus során a működésképtelen NBS kerülne sorra, mely megrekesztené a ciklust. Ezzel szemben az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a működőképes NBS ciklusosan köti és hidrolizálja az ATP-t, anélkül, hogy a mutáns NBS-ben hidrolízis menne végbe. Ezt a legegyszerűbben úgy magyarázhatjuk, hogy a vad típusú Pgp két funkcionálisan egyenértékű NBS-e

közül az egyik véletlenszerűen köteleződik el a hidrolízisre minden ciklus során, míg az egyoldali mutáns esetében ez csak a működő NBS-ben történhet meg, mely jelentősen csökkenti a transzport sebességét.

II. Az UIC2 általi Pgp gátlás mechanizmusának és *in vivo* alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata

Korábbi vizsgálatok alapján az UIC2 mAt alkalmas a fehérje *in vitro* és *in vivo* gátlására is. Hasonlóan más konformációérzékeny kötődésű antitesthez, az élő sejtek plazmamembránjában kifejeződő Pgp-knek csak kis hányadához kötődik. Bizonyos modulátorok (pl. CsA) jelenlétében azonban minden Pgp molekula jelölhetővé és ezáltal gátolhatóvá válik az UIC2 antitesttel. Ehhez elegendő a modulátor olyan kis koncentrációja is, mely önmagában alkalmazva nem gátolja számottevően a Pgp általi szubsztrát transzportot. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy *in vivo* körülmények között az UIC2 antitest kombinált adása fokozza-e a citosztatikum terápia hatását.

A kezelés hatásainak *in vivo* vizsgálatára kifejlesztettünk egy a KB-3-1/KB-V1 Pgp⁻/Pgp⁺ humán epidermoid karcinóma sejtvonalpár SCID egerekbe történő xenotranszplantációján alapuló modell rendszert. Kísérleteinkben az UIC2 mAt és kis dóziszú CsA kombinációja jól láthatóan fokozta a DOX tumor növekedést gátló hatását a KB-V1 tumorok esetében. Ha az állatokat csak DOX-szal kezeltük, a KB-V1 tumorok mérete nem csökkent a kezeletlen kontroll állatokhoz képest. Ezek az adatok összhangban vannak a munkacsoportunk által korábban publikált *in vitro* és *in vivo* drog akkumulációs adatokkal, és *in vitro* citotoxicitási kísérleteink eredményeivel. Azonban *in vivo* kísérleteinkben az UIC2 kezelés önmagában is fokozta a DOX tumor növekedést gátló hatását. Ezzel szemben az *in vitro* citotoxicitási kísérleteinkben az UIC2 mAt önmagában csak enyhén növelte a DOX citotoxikus hatását, mely azzal magyarázható, hogy CsA hiányában a sejtfelszíni Pgp-k csak kis hányada felismerhető az UIC2 számára, így a Pgp-k többsége funkcionális marad. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a kombinált kezelés eredményeképpen tapasztalható tumor növekedés gátlás nemcsak a megemelkedett UIC2 mAt kötődés és az emiatt kialakuló Pgp gátlás és DOX akkumuláció növekedés következménye, hanem egy jóval összetettebb mechanizmus eredménye. Így az *in vitro* és a SCID egereken végzett *in vivo* kísérletek eredményeiben mutatkozó különbségek miatt felvetődött annak a lehetősége, hogy az általunk használt kezelési protokoll citotoxikus hatásához immunológiai tényezők is hozzájárultak.

A SCID egerek, attól függetlenül, hogy az adaptív immunrendszerük nem működik, rendelkeznek működő komplement rendszerrel, természetes ölüsejtekkel és polimorfonukleáris sejtekkel. Így a terápia során a szervezetbe juttatott antitestek kötődése a tumor sejtekhez citotoxikus hatást válthat ki közvetlenül, komplement kötésén keresztül (CDC) vagy közvetve, az antitesttel borított tumor sejtekhez effektor sejteket kötve (ADCC). *In vitro* ADCC kísérleteink alátámasztották azt a

feltételezésünket, hogy az UIC2 mAt képes *in vivo* ADCC-t indukálni a SCID egerekben.

Az, hogy az UIC2-vel történő kezelés *in vivo* daganatellenes hatásához az ADCC is hozzájárul, kísérleteink váratlan eredménye volt. Az IgG₂ izotípusú antitestek, melyek közé az UIC2 is tartozik, többnyire rosszul aktiválnak effektor funkciókat. Ezért éppen olyan esetekben alkalmazzák őket, amikor az effektor funkciók aktiválása felesleges vagy nemkívánatos. Mivel az IgG₂ izotípusú antitestek NK sejteken keresztül nem indukálnak ADCC-t, így a mi kísérleteinkben, melyhez PBMC-eket használtunk, a sejtelhalásért a monociták voltak a felelősek. Mivel a SCID egerek szintén rendelkeznek funkcionális monocitákkal, az általuk közvetített ADCC megmagyarázhatja *in vivo* eredményeinket.

Felmerül a kérdés, hogy a kombinált kezelések erős tumorelles hatása nem tulajdonítható-e teljes egészében az UIC2 antitest által kiváltott ADCC-nek. Abból a megfigyelésből, hogy az *in vitro* ADCC kísérletben a csak UIC2-vel kezelt, és az UIC2+CsA-val kezelt minták között nincs számottevő különbség, arra következtethetünk, hogy sejtfelszíni Pgp molekulák 20-40%-ának jelölődése elegendő a maximális ADCC hatás kiváltásához. Azonban az *in vivo* kísérletekben tapasztalt különbség az UIC2-vel és az UIC2+CsA-val kezelt állatokból eltávolított tumorok tömegében, valamint az, hogy az UIC2+CsA-val kezelt egereknek 52%-ban nem fejlődtek ki a KB-V1 tumorok, arra enged következtetni, hogy a daganatellenes hatásért az ADCC mellett legalább részben a kombinált kezelés miatt kialakuló megnövekedett DOX érzékenység is felelős. Ezt a feltételezésünket alátámasztják munkacsoportunk korábbi kísérletei is, amelyben hasonló módon alkalmazva az UIC2 és CsA kombinációját kétszeres daunubicin (szintén Pgp szubsztrát citosztatikum) akkumuláció növekedést mértek a Pgp⁺ xenotranszplantált tumorokban. Tehát *in vitro* és *in vivo* adataink alapján valószínűsíthető, hogy az UIC2+CsA+DOX-szal végzett kombinált kezelés jelentős tumorelles hatása a Pgp gátlás és ADCC együttes eredménye.

Az ADCC már viszonylag kis receptorszám, és alacsony mértékű antitest kötődés mellett is kiváltható. Így a KB-3-1 tumorok esetében a kiindulási sejtekhez képest mért 60-szoros Pgp expresszió növekedés feltehetően elegendő az ADCC kiváltásához, ha CsA jelenlétében az összes sejtfelszíni Pgp-hez UIC2 mAt kötődik. Ennek az eredménye lehet, hogy a DOX+UIC2+CsA-val kezelt egerek 52%-ban nem fejlődött ki KB-3-1 tumor, míg a többi csoportban minden állatban megjelentek a tumorok.

A megfigyelt hatások Pgp függését bizonyítja, hogy a tumorok mérete csak azokban az állatokban volt kisebb, melyeket az UIC2 Pgp specifikus mAt-vel is kezeltünk. Korábbi vizsgálataink során összehasonlítottuk a KB-V1 sejtvonalat az *abcb1* génnel transzfektált NIH 3T3 egér fibroblaszt és a Pgp⁺ A2780 petefészekrák sejtvonalakkal, és úgy találtuk, hogy ezek a sejtvonalak teljesen megegyeznek a multidrog rezisztens fenotípus minden aspektusában, így a Pgp általi drog-transzport UIC2-vel történő gátlhatóságában is. Másrészről az ADCC hatás független a target sejtek szöveti

típusától, legfőképp a kiváltó antitest Fc régiója és az effektor sejtek Fc receptorai közötti kölcsönhatástól függ.

Természetesen egy anti-Pgp antitesten alapuló daganatterápia klinikai alkalmazhatóságával kapcsolatban kétségek is merülhetnek fel. A terápia akár súlyos mellékhatásokat is kiválthat, mert az UIC2 antitest kötődése a szervezet barrier régióiban fiziológiásan expresszálandó Pgp molekulákat is gátolhatja, vagy akár ADCC révén kiválthatja a barrier régiókban a Pgp⁺ sejtek pusztulását, melynek következtében sérül a barrier integritása. Például a vér-agy gátban expresszálandó Pgp molekulák gátlásával megnő a Pgp szubsztrát citosztatikumok akkumulációja az agyban, és akár neurotoxikus koncentrációt is elérhetnek (ilyen jelenséget *abcb1a/b* knockout egereken végzett kísérletek során figyeltek meg). Ennek ellenére klinikai gyógyszertesztet során az alkalmazott Pgp modulátorok nem okoztak központi idegrendszeri károsodást, feltehetően azért, mert egyéb ABC transzporterek (pl. MRP1 vagy ABCG2) képesek voltak a Pgp szerepét pótolni. Ezzel szemben az ADCC hatás sokkal komolyabb veszélyekkel járhat, mert ebben az esetben a Pgp-t kifejező szövetek súlyosan károsodhatnak. Mivel az ADCC aktiválásáért az antitest Fc régiója felelős, így ez a mellékhatás elkerülhető, ha a klinikai alkalmazás során az antitest Fab fragmentumát használjuk. Az antitest humanizálása során az Fc régió manipulálásával az antitest effektor hatásai szintén kivédhetőek.

Az UIC2 mAt nem kötődik az egér Pgp-hez, így a SCID egerekben nem tesztelhető, hogy a fiziológiásan expresszálandó Pgp-k jelölődése UIC2-vel milyen mellékhatásokat okozhat. Mivel az UIC2 antitest a humán Pgp-n kívül egyéb főemlős és a birka Pgp-t is felismeri, ezek az állatmodellek lennének használhatók a fent leírt hatások, illetve azok kivédésének tesztelésére. Az antitest célzott alkalmazása, például közvetlenül a tumorba történő injektálása is csökkenthetné a szisztémás hatásokat, így ennek a lehetőségnek a tesztelése is megfontolandó.

Az általunk használt modell-rendszerben a kezeléseket viszonylag korán, a sejtek injektálását követő negyedik napon kezdtük meg. Ekkor a tumorok még viszonylag kicsik, mely azt a klinikai helyzetet szimulálja a legjobban, amikor a szisztémás kezelést azért alkalmazzák, hogy megakadályozzák vagy lelassítsák a multidrog rezisztens tumor-metasztázisok kifejlődését.

Minden multidrog rezisztens tumor egyéni rezisztencia-mechanizmussal, vagy ezen mechanizmusok kombinációjával rendelkezik, ezért elengedhetetlen a daganat-terápia személyre szabása nemcsak a malignus transzformáció típusát és a tumor szöveti eredetét, hanem a kialakuló rezisztencia mechanizmusát is figyelembe véve. Az általunk kidolgozott Pgp gátlási stratégia a humanizált UIC2 antitest kifejlesztését követően gazdagíthatja a multidrog rezisztens tumorok kezelési stratégiának repertoárját.

5.1 Összefoglalás

Kifejlesztettünk egy konfokális mikroszkópos fluoreszcencia kolokalizáció mérésen alapuló esszét, mely alkalmas fluoreszkáló Pgp szubsztrátok kötődési affinitás változásainak detektálására a Pgp katalitikus ciklusának különböző fázisaiban. Adaptáltunk számos fluoreszcencia alapú kísérleti technikát, melyek alkalmasak a Pgp transzportaktivitásának és konformációváltozásainak mérésére. A fenti esszék alkalmazásával a Pgp működési mechanizmusára vonatkozóan az alábbi megállapításokat tettük:

- ❖ A P-glikoprotein konformációváltozása, melynek során átbillen az intracelluláris tér felé nyitott magas szubsztrátaffinitású állapotából az extracelluláris tér felé nyitott alacsony szubsztrátaffinitású konformációba, az ATP hidrolízisét megelőzően megtörténik.
- ❖ A mindkét oldali NBD Walker A szekvenciájában mutációt hordozó Pgp variáns katalitikusan inaktív és az intracelluláris tér felé nyitott, nagy szubsztrátaffinitású konformációban rekedt.
- ❖ Az egyoldali Walker A mutánsok képesek a teljes katalitikus cikluson végigmenni, és jól mérhető reziduális transzportaktivitással rendelkeznek.

A Pgp *in vivo* gátlására irányuló kísérleteink során beállítottunk egy olyan kísérleti rendszert, melyben a SCID egerekbe transzplantált humán tumorsejtek megtartják drogrezisztens vagy szenzitív fenotípusukat a vizsgálat ideje alatt. Kísérleteink alapján az alábbi következtetésekre jutottunk:

- ❖ Az UIC2 monoklonális antitest és kis dózisu ciklosporin A kombinált alkalmazása jelentősen fokozza a Pgp-t expresszáló tumorok doxorubicin érzékenységét, és a tumorok növekedésének klinikailag is releváns mértékű csökkenéséhez vezet.
- ❖ A kombinált kezelés *in vivo* tapasztalt tumorelles hatásához a Pgp gátlásán kívül az antitest-függő citotoxikus hatás (ADCC) is hozzájárul.



Nyilvántartási szám: DEENK/76/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szalóki Gábor

Neptun kód: EPEUDY

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

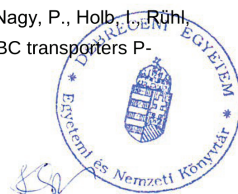
MTMT azonosító: 10040820

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>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 4.259
2. **Szalóki, G.**, Krasznai, Z. T., Tóth, Á., Vízkeleti, L., Szöllősi, A. G., Trencsényi, G., Lajtos, I., Juhász, I., Krasznai, Z., Márián, T., Balázs, M., Szabó, G., Goda, K.: 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. 9 (9), 1-9, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107875>
IF: 3.234

További közlemények

3. Tarapcsák, S., **Szalóki, G.**, Telbisz, Á., Gyöngy, Z., Matúz, K., Csősz, É., Nagy, P., Holb, I., Rühl, R., Nagy, L., Szabó, G., Goda, K.: Interactions of retinoids with the ABC transporters P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein.
Sci Rep. 7 (41376), 1-31, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41376>
IF: 4.259 (2016)





4. Hoffmann, O. I., Kerekes, A., Lipták, N., Hiripi, L., Bodó, S., **Szalóki, G.**, Klein, S., Ivics, Z., Kues, W. A., Bösze, Z.: Transposon-Based Reporter Marking Provides Functional Evidence for Intercellular Bridges in the Male Germline of Rabbits. PLoS One. 11 (5), 1-15, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154489>
IF: 2.806
5. Trencsényi, G., Kertész, I., Krasznai, Z. T., Máté, G., **Szalóki, G.**, Péli-Szabó, J., Kárpáti, L., Krasznai, Z., Márián, T., Goda, K.: 2' [18F]-fluoroethylrhodamine B is a promising radiotracer to measure P-glycoprotein function. Eur. J. Pharm. Sci. 74, 27-35, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.026>
IF: 3.773
6. Krasznai, Z. T., Trencsényi, G., Krasznai, Z., Mikecz, P., Nizsalóczi, E., **Szalóki, G.**, Péli-Szabó, J., Balkay, L., Márián, T., Goda, K.: 18FDG a PET tumor diagnostic tracer is not a substrate of the ABC transporter P-glycoprotein. Eur. J. Pharm. Sci. 64C, 1-8, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.002>
IF: 3.35
7. Trencsényi, G., Márián, T., Lajtos, I., Krasznai, Z., Balkay, L., Emri, M., Mikecz, P., Goda, K., **Szalóki, G.**, Juhász, I., Németh, E., Miklovicz, T., Szabó, G., Krasznai, Z. T.: 18FDG, [18F]FLT, [18F]FAZA and 11C-methionine are suitable tracers for the diagnosis and in vivo follow up the efficacy of chemotherapy by miniPET both in multidrug resistant and sensitive human gynecologic tumor xenografts. Biomed Res. Int. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/787365>
IF: 1.579
8. **Szalóki, G.**, Czégény, I., Szemán-Nagy, G., Bánfalvi, G.: Removal of Heavy Metal Sulfides and Toxic Contaminants from Water. In: Cellular effects of heavy metals. Ed.: Gáspár Bánfalvi, Springer, Milton Keynes, 333-346, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,26

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapján szolgáló közlemények):

7,493

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, 2018.03.22.

