

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	8
1.1. A multidrog rezisztencia és a P-glikoprotein kutatásának kezdeti évei	8
1.2. Az ABC fehérjék és az azokat meghatározó szerkezeti elemek.....	9
1.3. A humán ABC fehérjék	11
1.4. A P-glikoprotein	13
1.4.1. A P-glikoprotein szerkezete.....	14
1.4.2. A Pgp szubsztrátkötő helye.....	15
1.4.3. A Pgp nukleotidkötő helye	17
1.4.4. A P-glikoprotein általi drog transzport mechanizmusa	18
1.4.5. A Pgp katalitikus ciklusát leíró modellek	20
1.4.6. A P-glikoprotein klinikai jelentősége és gátlásának lehetőségei	23
2. Célkitűzések	25
3. Anyagok és módszerek.....	26
3.1. Etikai nyilatkozat.....	26
3.2. Reagensek.....	26
3.3. Sejtvonalak és fenntartásuk	26
3.4. A Pgp direkt immunfluoreszcens jelölése	27
3.5. Sejtfelszíni ABC transzporterek indirekt immunfluoreszcens jelölése	28
3.6. Western-blot analízis	28
3.7. Calcein és BODIPY-vinblasztin akkumulációs teszt	28
3.8. Rodamin 123 efflux esszé.....	29
3.9. Intakt sejtek jelölése VBL-BPY-vel és 15D3-A647-tel	29
3.10. Sejtek permeabilizálása <i>Staphylococcus aureus</i> α -toxinnal, illetve streptolysin-O-val	29
3.11. Permeabilizált sejtek jelölése VBL-BPY-vel és 15D3-A647-tel	30

3.12. <i>In vitro</i> citotoxicitási tesztek.....	30
3.13. <i>In vitro</i> ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) esszé	31
3.14. <i>In vitro</i> komplementfüggő citotoxicitás (CDC) esszé	31
3.15. Állatkísérletek.....	32
3.16. mRNS analízis	32
3.17. Konfokális mikroszkópia.....	33
3.18. Áramlási citometria	34
3.19. Kiértékeléshez használt programok és statisztikai analízis	34
4. Eredmények.....	36
I. A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során	36
4.1. Az MDCK sejtek a Pgp mutáns variánsait a vad típussal összemérhető szinten expresszálják.....	36
4.2. A Walker A mutáns Pgp molekulák reziduális transzportaktivitással rendelkeznek.....	36
4.3. A féloldali Walker A mutáns Pgp-k is képesek az UIC2 mAt kötődésének megváltozását okozó konformációváltozásra.....	38
4.4. A Pgp modulátorok nem változtatják meg a sejtfelszíni Pgp-k mennyiségét	39
4.5. A féloldali Walker A mutáns Pgp-k is képesek a szubsztrátaffinitás megváltozását okozó konformációváltozásra.....	40
4.6. Streptolizin-O-val permeabilizálhatók az MDCK sejtek.....	43
4.7. A Pgp nagy szubsztrátaffinitású konformációjából az alacsony szubsztrátaffinitású konformációba történő átbillenéséhez elegendő a nukleotid kötődése.....	44
4.8. A nukleotid kötése jelentősen csökkenti a Pgp UIC2 reaktivitását	46
II. Az UIC2 általi Pgp gátlás mechanizmusának és <i>in vivo</i> alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata	46
4.9. Az <i>in vivo</i> egérkísérletek során követett kísérleti stratégia	46
4.10. A KB-V1 sejtek magas szinten expresszálják a Pgp-t.....	47

4.11. A Pgp ⁺ tumor sejtek a xenotranszplantációt követően is megtartották magas expressziós szintjüket.....	48
4.12. Az UIC2 mAt és a CsA önmagában és kombinációban sem csökkenti a sejtek életképességét.....	49
4.13. A kombinált DOX-CsA-UIC2 kezelés jelentősen gátolta a Pgp ⁺ tumorok növekedését	50
4.14. Az UIC2 antitest képes ADCC-t indukálni <i>in vitro</i>	51
5. Eredmények megbeszélése.....	53
I. A P-glikoprotein szubsztrátkötő képességének vizsgálata a katalitikus ciklus során	53
II. Az UIC2 általi Pgp gátlás mechanizmusának és <i>in vivo</i> alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata	56
6. Összefoglalás.....	61
7. Summary	62
8. Kiegészítő információk	63
Felhasznált irodalom	70
Saját közlemények.....	89
Köszönetnyilvánítás	92
Függelék	93

Rövidítések jegyzéke

A647	Alexa Fluor® 647 (fluorofór)
ABC	ATP-kötő kazetta (ATP binding cassette)
ABCB1	lásd Pgp
<i>abcb1</i>	lásd Pgp
ABCB2	lásd TAP1
ABCB3	lásd TAP2
ABCC1	lásd MRP1
ABCC7	lásd CFTR
ABCC8	lásd SUR1
ABCG2	lásd BCRP
ADCC	ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AMP-PNP	adenozin-5'-(β,γ -imido)-trifoszfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BCRP	mellrák-rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein), szinonimája: ABCG2. A fehérjét kódoló gén: <i>abcg2</i>
BODIPY	boron-dipirrometén (boron-dipyrrromethene) (fluorofór)
CDC	komplementfüggő citotoxicitás (complement-dependent cytotoxicity)
CFDA-SE	5(6)-karboxifluoreszcein-diacetát-N-szukcinimidil-észter
CFL647	CruzFluor™ 647 (fluorofór)
CFTR	cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), szinonimája: ABCC7. A fehérjét kódoló gén: <i>cfr</i>
Cryo-EM	krio-elektronmikroszkópia (Cryo-electron microscopy)
CsA	ciklosporin A
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium

DOX	doxorubicin
DPSS	diórával pumpált szilárdfázisú (lézer)
DTT	DL-ditiotreitol
EC	extracelluláris
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
ESR	elektronspin rezonancia (electron spin resonance)
FCS	fötális borjúsérum (fetal calf serum)
GaMIgG	kecskében termeltetett anti-egér immunoglobulin G (goat anti-mouse IgG)
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
gl-PBS	8 mM glükózzal kiegészített PBS
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HRP	torma peroxidáz (horseradish peroxidase)
i.p.	intraperitoneális
i.v.	intravénás
IC	intracelluláris
IgG₂	G ₂ izotípusú immunoglobulin
calcein-AM	calcein-acetoxi-metilészter
mAt	monoklonális antitest; monoklonális ellenanyag
MDR	multidrog rezisztencia (multidrug resistance)
MDR1	lásd Pgp
<i>mdr1</i>	lásd Pgp
MRP1	multidrog rezisztenciához kapcsolódó fehérje 1 (multidrug resistance associated protein 1), szinonimája: ABCC1. A fehérjét kódoló gén: <i>abcc1</i>
NBD	nukleotidkötő domén (nucleotide binding domain)
NBS	nukleotidkötő hely (nucleotide binding site)

NEM	N-etilmaleimid (N-ethylmaleimide)
NK sejt	természetes ölősejt (natural killer cell)
PBMC	perifériás vérből származó mononukleáris sejt (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate buffered saline)
Pgp	P-glikoprotein (P-glycoprotein), szinonimái: ABCB1, MDR1. A fehérjét kódoló gén: <i>abcb1</i> (szinonimája: <i>mdr1</i>)
P_i	inorganikus-foszfát, ortofoszfát-ion, PO_4^{3-}
PI	propidium-jodid
R123	rodamin 123
RT-qPCR	reverz transzkripcióval valósidejű kvantitatív polimeráz láncreakció
s.c.	bőr alá (sub cutan)
SCID	súlyos kombinált immunhiány (severe combined immunodeficiency)
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát - poliakrilamid gél elektroforézis (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SPR	felszíni plazmon rezonancia (surface plasmon resonance)
SSRBC	szenzitizált juh vörösvértest (sensitized sheep red blood cells)
SUR1	szulfonilurea receptor 1 (sulfonyleurea receptor 1), szinonimája: ABCC8. A fehérjét kódoló gén: <i>abcc8</i> .
TAP1	antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 1 (transporter associated with antigen processing 1), szinonimája: ABCB2. A fehérjét kódoló gén: <i>tap1</i>
TAP2	Antigén bemutatáshoz kapcsolódó fehérje 2 (transporter associated with antigen processing 2), szinonimája: ABCB3. A fehérjét kódoló gén: <i>tap2</i>
TMD	transzmembrán domén (transmembrane domain)
VBL-BPY	BODIPY FL fluorofórral konjugált vinblasztin
V_i	ortovanadát-ion, VO_4^{3-}

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A multidrog rezisztencia és a P-glikoprotein kutatásának kezdeti évei

A daganatos megbetegedések kemoterápiás kezelése során használt citosztatikumokkal szemben fellépő rezisztencia még napjainkban is komoly problémát jelent az onkológiai gyakorlatban. Néhány tumortípus (például bizonyos emlő- és petefészek tumorok, a non-Hodgkin limfómák, a neuroblasztóma, a felnőttkori akut leukémiák egy csoportja, illetve számos gyermekkori ráktípus) kezdetben jól reagál a kemoterápiára, és csak a kezelés hatására alakul ki bennük rezisztencia, míg más daganatok (mint például a nem-kissejtes tüdőrák, a vastagbél-, gyomor-, vese- és hasnyálmirigyrákok) már a kezelés kezdetén rezisztensnek bizonyulnak [1-6]. A problémát súlyosbítja, 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 MDR vizsgálatához először olyan sejtvonalak izolálására volt szükség, melyeken *in vitro* is demonstrálható, és ezáltal vizsgálható a jelenség. Biedler és mtsai. 1970-ben olyan drogrezisztens klónokat izoláltak kínai aranyhőrcsög sejtvonalakból, melyek a szelektálásukra használt aktinomicin D mellett számos egyéb citosztatikummal szemben is keresztrezisztenciát mutattak. Emellett azt is megfigyelték, hogy a szelektált sejtvonalakban megemelkedett a kromoszóma rendellenességek száma, mely bizonyos gének amplifikációját okozhatta [7]. Danø és mtsai. az általuk izolált multidrog rezisztens sejtvonalon bizonyították, hogy a daunorubicin csökkent akkumulációja a sejtekben egy energiafüggő exportmechanizmus eredménye, mely a daunorubicin strukturális analógjaival és metabolikus gátlószerekkel is gátolható [8]. A rezisztens sejtvonalak csökkent daunorubicin felvételét több munkacsoport is a megnövekedett efflux mellett a sejten belüli drogkötődés energiafüggő csökkenésével vagy a sejtmembrán megváltozott passzív permeabilitása miatt kialakuló csökkent daunorubicin felvétellel magyarázta [9-13].

A vitás kérdés eldöntését segítette egy kb. 170 kDa tömegű fehérje azonosítása, amelyet multidrog rezisztens sejtek plazmamembránjából izoláltak, és a sejtek csökkent drogpermeabilitására utalva a P-glikoprotein (Pgp) nevet kapta [14]. Ezt követően kiderült, hogy a multidrog rezisztencia mértéke korrelál a Pgp mennyiségével [15]. Még ugyanebben az évben Beck és mtsai. humán eredetű leukémiás sejtekben is leírtak egy csökkent drogpermeabilitással összefüggésbe hozható 170 kDa tömegű glikoproteint [16]. Kartner és

mtsai. multidrog rezisztens egér és humán sejtvonalakon először poliklonális, majd monoklonális ellenanyagot használva, western-blot technikával mutatták ki a Pgp-t [17, 18], majd Bell és mtsai. klinikai mintákban is sikeresen detektálták a fehérjét [19]. Az 1980-as évek közepére egyre biztosabbá vált, hogy a daganatos sejtek megnövekedett drogrezisztenciájának hátterében a Pgp jelenléte, illetve megnövekedett expressziója áll.

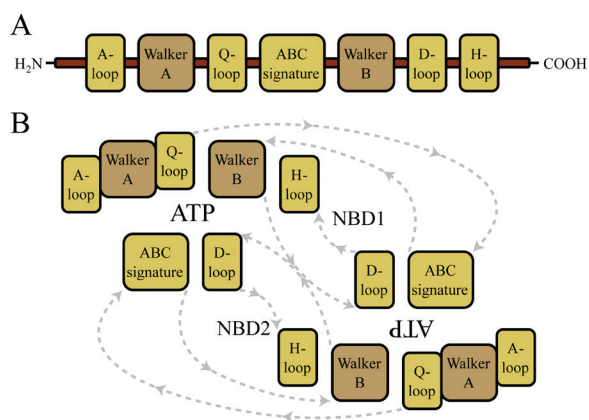
Multidrog rezisztens kínai hörcsög sejtekből izolált DNS-sel transzfektált egér sejtekben megnövekedett drogrezisztenciát és Pgp expressziót figyeltek meg, melynek mértéke korrelált a transzfektált sejtekben jelen lévő double minute kromoszómák (apró extrakromoszómális DNS fragmentek) mennyiségével [20]. Később ezt a megfigyelést felhasználva Caizzi és Bostock, majd Roninson és munkatársai is sikeresen klónozták az amplifikálódott gént [21, 22]. 1986-ban humán sejtvonalon is kimutatták a multidrog rezisztenciához köthető gén-amplifikációt, az amplifikálódott gént *mdr1*¹-nek nevezték el, és még ebben az évben izolálták [23, 24]. Ueda és mtsai. végül igazolták, hogy az *mdr1* gén kódolja a drogrezisztenciáért felelős Pgp-t [25]. Kimutatták, hogy ennek a génnek, illetve egér homológjának expressziója MDR fenotípussal ruházza fel a recipiens sejteket [26, 27]. A Pgp cDNS-ének szekvenciája alapján számos bakteriális transzporterrel találtak jelentős szekvencia homológiát, mely főleg a fehérje nukleotid-kötő régióját érintette [28-30]. Ezen szekvenciahasonlóságok alapján sorolták a Pgp-t az ABC kazettás fehérjék szupercsaládjába, melyet Higgins és mtsai. írtak le 1985-ben [31].

1.2. Az ABC fehérjék és az azokat meghatározó szerkezeti elemek

1985-ben Higgins és mtsai. bakteriális transzporterek aminosav szekvenciájának analízisével egyes fehérjék ATP-kötő doménjeiben olyan homológ szekvenciákat azonosítottak, melyek jelenléte az ATP-kötés és hasznosítás hasonló voltára utalt [31]. 1986-ban már olyan konzervált szekvenciamotívumok együtteséről számoltak be, melyek a Walker és mtsai. [32] által leírt, a nukleotidkötő fehérjékben általánosan előforduló Walker A és B szekvenciákon kívül egyéb, az evolúció során konzerválódott szegmenseket is tartalmaznak. Azokat a fehérjéket, melyek tartalmazzák ezeket az evolúciósan konzervált motívumokat az ABC (ATP binding cassette) transzporterek vagy ABC fehérjék szupercsaládjába sorolták [33, 34]. Feltételezték azt is, hogy ezekben a fehérjékben vagy fehérjekomplexekben a működőképes egység létrejöttéhez a nukleotidkötő doméneknek legalább dimerizálódniuk kell [35]. Ma már tudjuk, hogy ABC fehérjék az egyik legnagyobb fehérje szupercsaládot alkotják,

¹ A Pgp-t kódoló gén hivatalos nevének a HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) az *abcb1*-et fogadta el. Az *mdr1* név ma szinonimaként van nyilvántartva.

melynek tagjai megtalálhatók az archeákban [36], a baktériumokban [37] és az eukariótákban [38] egyaránt. Az eredeti elképzeléssel ellentétben a család tagjai nem csupán transzporterek, hanem más funkciókat is elláthatnak [39].



1. ábra Az ABC fehérjék nukleotid kötő doménjében található konzervált szekvenciák elhelyezkedése a fehérje elsődleges (A) és harmadlagos szerkezetében a „szendvics” dimer kialakulása után (B).

Az ABC fehérjék nukleotid kötéseinek másik sajátossága, hogy a két ATP kötése csak a két NBD szoros kooperációjával, úgynevezett „szendvics-dimer” létrehozásával valósulhat meg. Ez oly módon történik, hogy az egyik NBD-ben található A loop, Walker A, Q-loop, Walker B és H-loop a másik NBD ABC „signature” és D-loop szekvenciáival közösen alakítja ki az egyik nukleotidkötő helyet (NBS), míg a másik kötőhely ennek a tükörképe (**1. ábra B**). (Az ATP-kötés és hasítás részleteit később tárgyalom a Pgp példáján.)

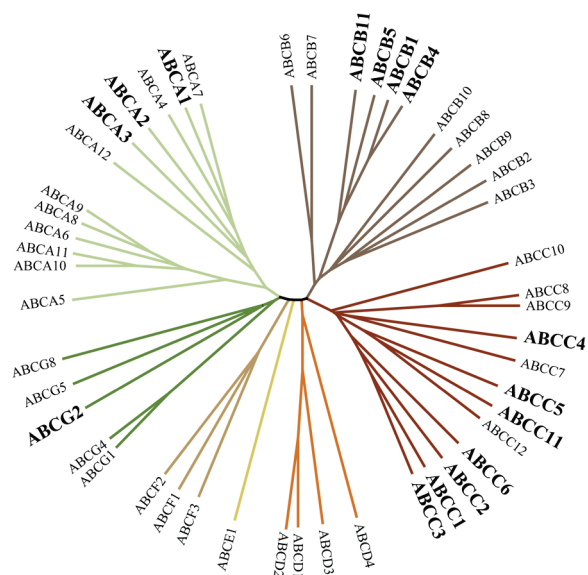
Az ABC fehérjék többségében membránba ágyazott alegységek, ún. transzmembrán domének (TMD-k) gondoskodnak arról, hogy az NBD-k segítségével az ATP kötéséből és hidrolíziséből származó energia a fehérje által ellátott feladatra fordítódjon. Szerkezetük és filogenetikai kapcsolataik alapján az ABC fehérjéket három osztályba és számos alosztályba sorolták [39]. Az első osztály (Class I systems) fehérjéi rendszerint egy polipeptid láncon hordozzák az NBD-t, valamint a membránba ágyazott TMD-t, és főként exportrendszerek tagjai. Ilyenek a bakteriális LmrA [41] vagy Sav1866 [42], illetve a humán ABCB1/Pgp/MDR1

Annak ellenére, hogy az ABC fehérjék mind funkciójukat tekintve, mind strukturálisan rendkívül sokfélék, mindegyikük tartalmaz két olyan citoplazmatikus domént, melynek feladata az ATP kötése és hasítása. Az ATP-kötő domének mind felépítésükben, mind az ATP-kötés mechanizmusát illetően speciálisak. Mindkét nukleotidkötő domén (NBD) tartalmaz egy RecA-szerű béta-redős struktúrát, mely tartalmazza a Walker A (P-

[14], ABCG2/BCRP [43], vagy ABCC1/MRP1 [44], melyek széles szubsztrátspektrummal rendelkező multidrog transzporterek. A második osztályba tartozó ABC fehérjék (Class II systems) nem tartalmazznak membránasszociált részt és többnyire nem transzportfehérjék (pl. a humán ABCE vagy ABCF alcsaládok [45]). A harmadik osztály (Class III systems) tagjai főleg prokarióta fehérjekomplexek, melyekben általában külön peptidláncon található a TMD-k és az NBD-k. Többnyire importerek, működésükhöz gyakran szükséges egy extracitoplazmatikus szubsztrátkötő fehérje (például a bakteriális BtuCD-F B₁₂ vitamin importer [46] vagy MalFGK₂-E maltóz importer [47]).

Az ABC fehérjék az ATP felhasználás rendkívül konzervált volta ellenére igen változatos feladatok ellátására képesek. Mivel túlzott működésük vagy éppen hiányuk számos betegség oka lehet, működésük jobb megértése és funkcióik felderítése a mai napig intenzíven kutatott terület. ABC fehérjék tehetők felelőssé többek között a patogén baktériumok és a malária kórokozójának gyógyszer rezisztenciájáért is [48, 49]. Az emberi ABC fehérjék rendellenes működése, vagy expressziója miatt kialakuló betegségeket az **1. kiegészítő táblázat** foglalja össze.

1.3. A humán ABC fehérjék

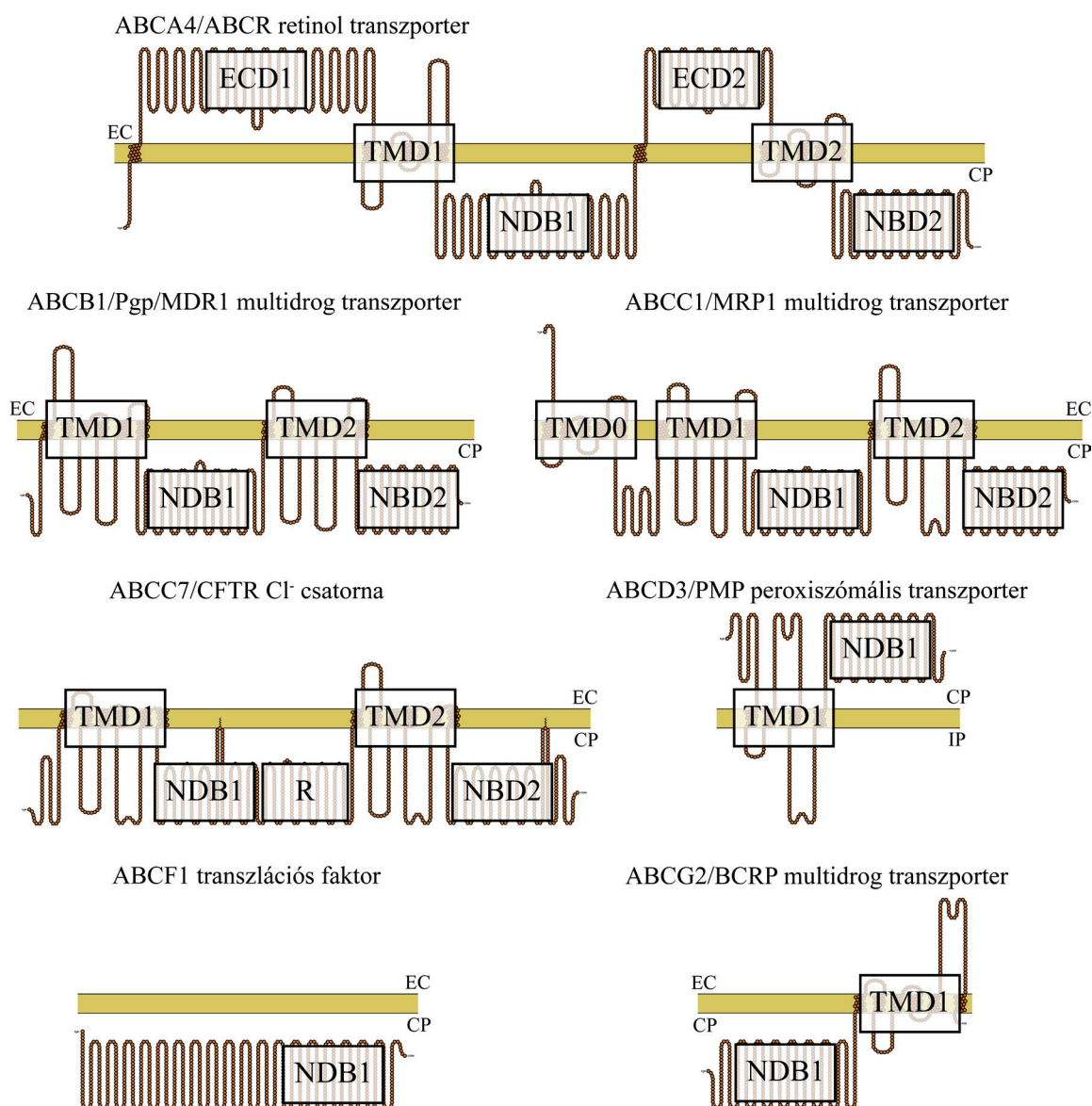


2. ábra A humán ABC fehérjék aminosav hasonlóság alapján készült filogramja. A különböző családokat eltérő színnel jelöltük. Azok az ABC fehérjék, melyek szerepet játszanak multidrog rezisztencia kialakításában, félkövér betűvel szerepelnek [50, 51]. Az ábrához használt adatok forrását lásd az „Anyagok és módszerek” fejezetben.

Az emberi genomban eddig 48 ABC fehérje génjét azonosították, melyeket hét alcsaládba soroltak (ABCA-tól ABCG-ig betűzve őket) [52-54]. Ezek között az ABCE és ABCF család képviselőit leszámítva [45] csak transzmembrán fehérjéket találunk, melyek változatos funkciókkal rendelkeznek a szervezetben. Így működhetnek ioncsatornáként (pl. ABCC7/CFTR, mely egy ATP-függő Cl⁻ csatorna [55]) vagy csatorna regulátorként (pl. ABCC8/SUR1, mely a Kir6.2 K⁺-csatornák intracelluláris ATP-koncentrációfüggő kapuzásában vesz részt a hasnyálmirigy β-sejtjeiben [56]). De legtöbbjük aktív transzporterként funkcionál,

így ezeket ABC transzportereknek is nevezik. Az ABC transzporterek igen változatos feladatokat látnak el. Részt vesznek az MHC I-függő antigén prezentációban

(ABCB2/Tap1/ABCB3/Tap2 heterodimer), a lipid anyagcserében (pl, ABCB4/foszfatidil-kolin flippáz), a húgysav szervezetből történő eliminálásában (ABCG2/BCRP), valamint számos, a májban keletkező glükuronid és glutation konjugátum epébe történő transzportjában is (ABCC1/MRP1) [57]. A Pgp leírását követően egyéb ABC fehérjéket is azonosítottak, melyek képesek voltak az MDR fenotípus kialakítására, vagyis multidrog transzporterek. 1992-ben írták le az ABCC1/MRP1-et [44], majd 1998-ban egy terápia rezisztens emlő tumor sejtvonalban az ABCG2/BCRP-t [43]. Napjainkra már számos egyéb ABC transzporterről is kiderült, hogy hozzájárulhat az MDR fenotípus kialakulásához (lásd a **2. ábra** jelölt



3. ábra A különböző humán ABC transzporter alcsaládok egy-egy képviselőjének topológiai diagramja. Az ABCE alcsalád nem szerepel az ábrán, mivel az ABCF alcsaládhoz hasonlóan nem tartalmaz membránasszociált régiót. Rövidítések: ECD: extracelluláris domén; TMD: transzmembrán domén; NBD nukleotidkötő domén; R: szabályozó domén; EC: extracelluláris oldal; CP: citoplazmatikus oldal; IP: intraperoxisómális oldal. Az ábrához használt adatok forrását lásd az anyagok és módszerek fejezetben.

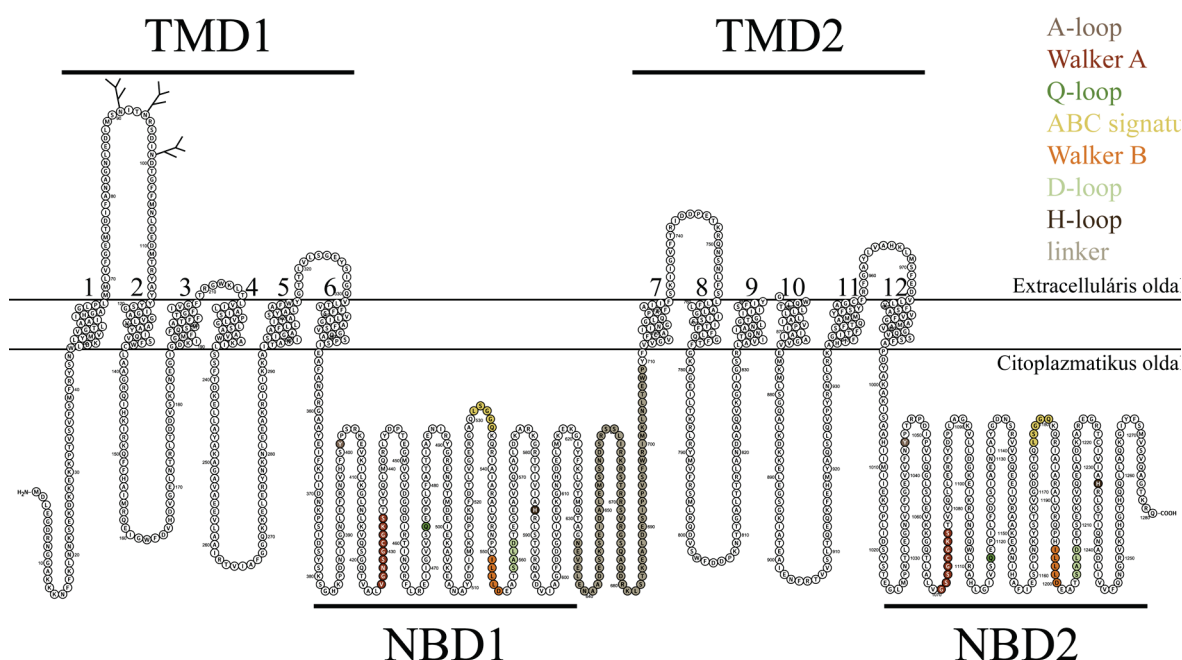
transzportereit [50, 51]), mégis az elsőként leírt Pgp-t tekintik a multidrog-transzporterek „prototípusának”.

Szerkezetüket tekintve az ABC transzporterek között találunk olyanokat, melyek egyetlen összefüggő peptidlánca tartalmaz minden olyan funkcionális egységet (tehát legalább két NDB-t és két TMD-t), mely a működő fehérje kialakításához szükséges (pl. ABCB1/Pgp), illetve tartalmazhatnak egyéb egységeket is (pl. az ABCC1/MRP1 járulékos TMD0-ja vagy az ABCC7/CFTR R doménje), melyek a transzporter szabályozásában vesznek részt [58, 59]. Ezeket az ABC fehérjéket teljes transzportereknek nevezzük. Ezzel ellentétben az ún. fél-transzporterek peptidlánca csak egy TMD-t és egy NBD-t tartalmaz, így a funkcionális fehérje kialakításához legalább homodimert (pl. ABCG2/BCRP) vagy heterodimert (pl. ABCB2-B3) kell alkotniuk [60-62]. A humán ABC fehérjék között két alcsalád, az ABCE és ABCF tagjai nem tartalmaznak membránasszociált domént, így ezek transzport funkciót nem látnak el. A humán ABC fehérje alcsaládok egy-egy reprezentatív tagjának topológiáját a **3. ábra** szemlélteti.

1.4. A P-glikoprotein

Az emberi Pgp az ABC fehérjék első osztályába tartozik, a humán ABC fehérjék B alcsaládjának első tagja, melyet a 7-es kromoszómán található *abcb1* (*mdr1*) gén kódol [63]. Ennek megfelelően a fehérjét ABCB1-nek vagy MDR1-nek is nevezik. A Pgp a szervezet barrier régióiban lévő szövetekben (pl. bélhám, máj, vesetubulusok és vér-agy gát) expresszálódik, ahol feltehetően a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védelméért felelős [64, 65]. Esetleges endogén szubsztátjairól még keveset tudunk, bár beszámoltak arról, hogy bizonyos membránlipidek, mint pl. a szfingomielin [66], a foszfatidil-kolin és foszfatidil-etanolamin [67], a glükózil-ceramid [68], illetve a trombocita aktiváló faktor [69] transzportálódnak a Pgp által. A Pgp kifejeződése jelentősen hozzájárul a tumorok multidrog rezisztenciájához. A Pgp-t expresszáló szövetekből kialakuló tumorokban gyakran a betegség progressziója során, vagy a kemoterápiás kezelés hatására fokozódik tovább a fehérje expressziója, míg a Pgp-t nem expresszáló szövetekből kialakuló tumorokban a kemoterápia indukálhatja a fehérje kifejeződését. A multidrog rezisztencia kialakulásában betöltött szerepe miatt igen nagy tudományos érdeklődés övezi a Pgp működését, és intenzíven kutatják – egyéb MDR kialakítására képes transzporterekkel együtt – gátlásának lehetőségeit is.

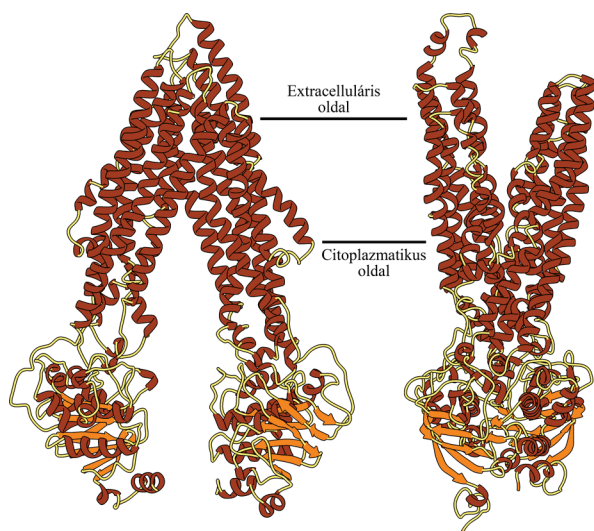
1.4.1. A P-glikoprotein szerkezete



4. ábra A Pgp topológiai diagramja a fehérje domének és a konzervált szekvenciamotívumok megjelölésével. Az ábrához használt adatok forrását lásd az anyagok és módszerek fejezetben.

A Pgp egy 170 kDa tömegű, 1280 aminosavból álló glikoprotein. Szerkezetét tekintve ún. "teljes transzporter", vagyis két, egyenként hat transzmembrán α -hélixből felépülő TMD-ből és két NBD-ből épül fel, melyek TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 elrendezésben helyezkednek el a polipeptidláncban (**4. ábra**). A molekula két fele – melyeket egy 75 aminosavból álló flexibilis linker kapcsol össze [70] – nagyfokú aminosav szekvencia homológiát mutat [29]. Ezért azt feltételezik, hogy a Pgp egy ősi "fél-transzporter"-ből génduplikációval alakult ki [30, 71], de azt sem zárják ki, hogy a teljes fehérje két "fél-transzporter" fúziójával jött létre [72].

Bár a Pgp-ről jelentős mennyiségű strukturális és funkcionális információ gyűlt össze, nem áll rendelkezésre jó felbontású röntgenkristallográfián alapuló szerkezeti modell. Ezért molekuladinamikai tanulmányokban általánosan olyan homológia modelleket alkalmaznak, melyek a bakteriális SAV1866 [73, 74] és MsbA [75] transzporterek különböző körülmények között kristályosított szerkezeteire, illetve egyéb fajokból származó Pgp homológok (például egér MDR1A [76], vagy *Caenorhabditis elegans* Pgp [77]) kristályszerkezeteire épülnek. Ezek alapján feltételezhető, hogy a Pgp-nek két, viszonylag stabil konformere van: ATP mentes körülmények között a két NBD disszociált, és a Pgp szubsztrátkötő helye hozzáférhető a membrán belső rétege és az intracelluláris tér felől is („inward facing” vagy más néven „apo” forma), míg a nukleotid kötődése után, a két NBD dimerizációjával létrejön az intracelluláris



5. ábra A Pgp intracelluláris tér felé nyitott apo konformációja (bal) és az extracelluláris oldal felé nyitott holo konformációja (jobb). A modell a másodlagos szerkezet alapján van színezve: az α -hélixek barnák, a β -redők narancssárgák, míg a hurkok okkersárgák.

tér felől zárt, de az extracelluláris tér felé nyitott konformer („outward facing” vagy „holo” forma) (5. ábra). Feltételezések szerint a Pgp a katalitikus ciklusa során ezen konformációk között fluktuál [73, 74, 78-85]. A citoplazma felől nyitott konformáció esetében megoszlanak a vélemények, hogy az NBD-k mennyire távolodnak el egymástól. Egyes álláspontok szerint az NBD-k eltávolodása egymástól szükséges a megfelelő működéshez, míg más vélemények szerint ez nem szükségszerű, és a katalitikus ciklus egymással összekapcsolt NBD-k esetén is végbemegy [75, 76, 86, 87].

1.4.2. A Pgp szubsztrátkötő helye

A transzmembrán domének által alkotott szubsztrátkötő zseb a Pgp IC oldalról nyitott konformációjában válik hozzáférhetővé a szubsztrátok számára. Mivel a Pgp számos, szerkezetileg nagyon különböző szubsztrát transzportjára képes, feltételezhető, hogy igen komplex szubsztrátkötő hellyel rendelkezik. Aller és mtsai. szerint az egér Pgp (MDR1A, *abcb1a*, melynek 87%-os a szekvencia homológiája a humán Pgp-vel) kristályszerkezete alapján a Pgp TMD-i egy kb. 6000 Å³ térfogatú szubsztrátkötő zsebet hoznak létre a membránban [76], melynek kialakításában jelentős szerepe van az 5-ös illetve a 8-as, valamint a 3-as és a 11-es transzmembrán hélix-párok kötőhelyet bélelő aminosavainak [88]. A fehérje fotoaktiválható szubsztrát analógokkal (pl. a prazosin analóg IAAP) és propafenon származékokkal történő jelölése, valamint transzport kinetikai vizsgálatok alapján két különböző szubsztrát interakciós helyet feltételeztek a TMD-k által közrezárva [88, 89], melyek akár két szubsztrát egyidejű megkötésére is képesek [90]. Shapiro és mtsai. már 1997-ben két különálló kötőhelyet írtak le [91] – egyiket a rodamin 123 számára (R-kötőhely), míg a másikat a Hoechst 33342 számára (H-kötőhely) –, mely alapján Parveen és mtsai. két különböző szubsztrát-transzlokációs útvonal meglétét feltételezték [92]. Ezt követően egy harmadik kötőhely létezését is feltételezték, mely allosztérikusán szabályozza az R- és H-kötőhelyeket (M-kötőhely) [93]. Loo és mtsai. úgy vélték, hogy a 4-6-os illetve a 9-12-es hélixek egy közös szubsztrátkötő helyet alakítanak ki, valamint feltételeztek egy másik kötőhelyet is az 1-es és 2-

es transzmembrán hélixek között [94]. Későbbi vizsgálatok tisztázták, hogy az R-kötőhely kialakításában a 6-os, a 9-es és a 12-es transzmembrán hélixek, míg a H-kötőhely kialakításában a 2-es, a 3-as, a 4-es, a 10-es és a 11-es transzmembrán hélixek vesznek részt [95-97]. Ma már kísérleti és szimulációs adatokkal támasztják alá, hogy valamely ismert Pgp szubsztrát vagy modulátor melyik kötőhelyet preferálja. Így például a rodamin 123 mellett az R-kötőhelyet preferálja a daunorubicin és a doxorubicin is, míg a Hoechst 33342-n kívül a H-kötőhelyet preferálja a kolhicin és a ciklosporin A is. Ugyanakkor bonyolítja a képet, hogy bizonyos szubsztrátok vagy modulátorok több helyre is bekötődhetnek, így például a verapamil az M- és R-kötőhelyre, míg a vinblasztin, az aktinomicin D és az etopozid az R- és H-kötőhelyekre is, ami természetesen a különböző tanulmányokban ellentmondásos képhez vezethetett [98]. Mindezek ellenére ma már számítógépes szimulációval 70% feletti valószínűséggel képesek vagyunk megjósolni, hogy egy vegyület kölcsönhat-e a Pgp-vel vagy sem [99].

A Pgp-vel kölcsönható vegyületek csoportosítása nem következetes. Legtöbbször a következő csoportokba sorolják őket: szubsztrátok, inhibitorok és modulátorok. A Pgp szubsztrátjait képes ATP-hidrolízis-függő folyamat során transzportálni. A szubsztrátok azon csoportját, melynek tagjai képesek fokozni a Pgp jól mérhető specifikus alap ATPáz aktivitását, stimulátoroknak is nevezik. Ha több olyan szubsztrát van jelen, mely ugyanazt a kötőhelyet preferálja a Pgp-n belül, kompetitív gátlás miatt legalább az egyik szubsztrát transzport sebessége akár jelentős mértékben csökkenhet (mint a későbbiekben látni fogjuk, ilyen módon lehetséges vad típusú Pgp-eket expresszáló sejteket verapamil alkalmazása mellett rodamin 123-mal feltölteni). Hasonlóan a szubsztrátok esetében fellépő kompetitív gátláshoz, léteznek olyan inhibitor vegyületek, melyek a Pgp szubsztrátkötő helyével kapcsolatba lépve gátolják más szubsztrátok transzportját, míg maguk egyáltalán nem, vagy csak csekély mértékben transzportálódnak (ilyen pl. a ciklosporin A). Allosztérikus inhibitoroknak tekintjük azokat a vegyületeket, melyek nem a szubsztrátkötő hellyel kölcsönhatva változtatják meg a Pgp transzport képességét. Sokan az allosztérikus gátlószerektől megkülönböztetik azokat a gátlószereket, melyek a Pgp ATP kötését és/vagy hasítását gátolják (pl. az ortovanadát-ion vagy a nem hidrolizálódó ATP analógok). Árnyalja a képet azonban, hogy a Pgp szubsztrátkötő helyével kölcsönható inhibitorok maguk is exportálódhatnak kis mértékben, másrészt az elég magas koncentrációban jelen lévő szubsztrátok is gátolják a Pgp-t, valamint a kötőhely közelében kötődő allosztérikusnak gondolt gátlószer esetében nehéz eldönteni, hogy a kötődés helye része-e a Pgp komplex kötőhelyének vagy sem, ezért ilyen esetekben nehéz meghúzni a fogalmi határvonalat a szubsztrátok és inhibitorok között. Emellett gyakran eltérő a nevezéktan

a Pgp működésének biokémiai, biofizikai karakterizálásáról szóló közleményekben, valamint a Pgp, mint MDR-t okozó fehérje klinikai és farmakológiai vizsgálatát leíró publikációkban. Emiatt a Pgp transzportaktivitását befolyásoló vegyületeket legtöbbször csak modulátoroknak nevezik. A Pgp-vel kölcsönható számos vegyület közül, a teljesség igénye nélkül a **2. kiegészítő táblázatban** mutatok példákat.

1.4.3. A Pgp nukleotidkötő helye

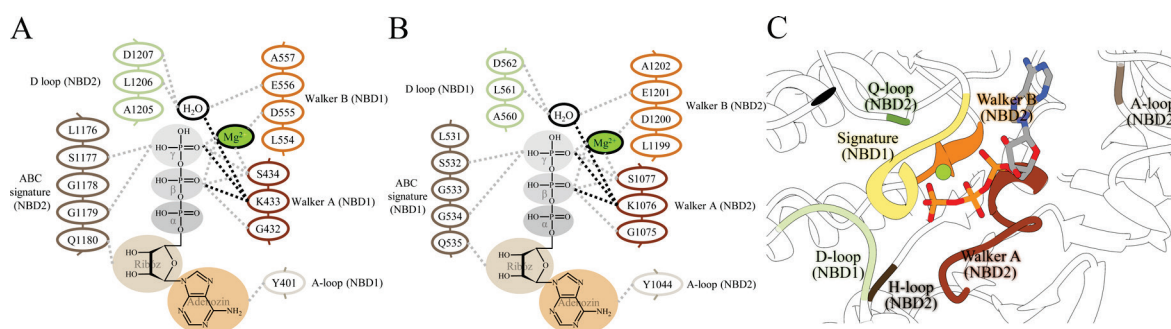
Mivel a Pgp aktív transzporter, a transzporthoz szükséges energiát az NBD-k által megkötött és elhidrolizált ATP-k biztosítják. Az ATP kötésében a már korábban említett konzervált szekvenciáknak van jelentős szerepe (ezeket a szekvenciákat részletezi a **1. táblázat**). A két molekulafélben található konzervált szekvenciamotívumok közösen alakítják

ki a két nukleotidkötő helyet (NBS), melyeknek köszönhetően ATP-kötést követően a két NBD „szendvics” dimert formál. A továbbiakban az egyszerűség kedvéért az NBD1 Walker A és B szekvenciái, A-, Q- és H-

Szekvencia	N-terminális NBD	C-terminális NBD
A-loop (Y)	401Y	1044Y
Walker A (GxxGxGKS)	427GNSGCGKS434	1070GSSGCGKS1077
Q-loop (Q)	475Q	1118Q
ABC signature (LSGGQ)	531LSGGQ535	1176LSGGQ1180
Walker B (ΦΦΦΦDE)	551ILLDE556	1196ILLDE1201
D-loop (SALD)	559SALD562	1204SALD1207
H-loop (H)	587H	1232H

1. táblázat A Pgp két nukleotidkötő doménjének konzervált aminosav szekvenciái, illetve aminosavai Seeger és mtsai. alapján [21]. A szekvenciákban az x bármilyen aminosavat, a Φ pedig hidrofób aminosavat jelöl.

hurkai illetve az NBD2 ABC „signature” szekvenciája és D-hurka által formált nukleotidkötő helyet NBS1-nek nevezzük, míg az ezzel szimmetrikusan kialakuló másik nukleotidkötő helyet pedig NBS2-nek. A nukleotidkötő helyeket alkotó konzervált szekvenciák térbeli



6. ábra A Pgp egyes (NBS 1, A) és kettes (NBS2, B) nukleotidkötő helyét kialakító konzervált motívumainak ATP-vel kapcsolatba lépő aminosavai, illetve az NBS2 konzervált motívumainak térbeli elhelyezkedése az ATP-hez viszonyítva (C).

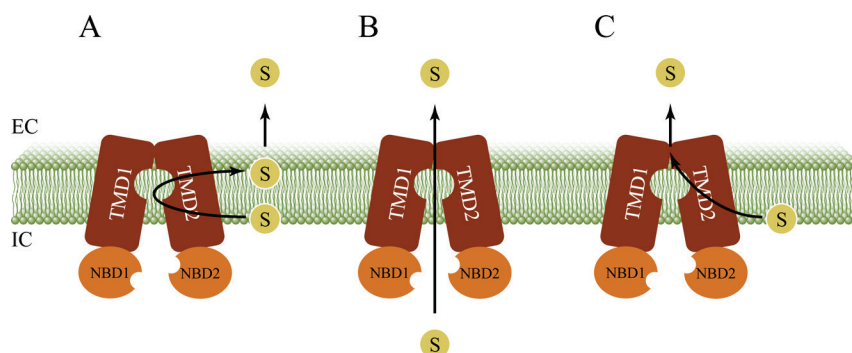
elhelyezkedését, illetve az ezeket alkotó aminosavak ATP-vel feltételezhetően kialakított kölcsönhatását a **6. ábra** szemlélteti.

Az ATPázokban általánosan megtalálható konzervált motívumok közül a Walker A szekvencia aminosavai az ATP β - és γ -foszfátjával lépnek kölcsönhatásba, míg a Walker B szekvencia csak a γ -foszfáttal [32, 100] van kapcsolatban. Itt érdemes megjegyezni, hogy a Walker A szekvencia lizinje és a Walker B szekvencia glutamátja rendkívül fontos az ATP β - és γ -foszfátjának pozícionálásában, ezáltal központi szerepük van a hidrolízisben [101, 102]. Az ABC transzporterekre jellemző konzervált szekvenciák közül az ABC „signature” szekvencia a Walker motívumokkal együttműködve koordinálja az ATP γ -foszfátját, és döntő szerepe van az NBD „szendvics” dimer kialakításában [103, 104]. Az A-loop aromás tirozin oldallánca az ATP adenin gyűrűjét pozícionálja, ezért igen jelentős szerepe van a nukleotid kötésben [40, 105]. A H-loop közvetlenül, a Q-loop pedig a vízmolekulán keresztül közvetve járul hozzá az ATP γ -foszfátjának pozícionálásához [106]. Emellett más ABC transzportereken végzett vizsgálatok alapján, a teljes transzporterek esetében a Q-loop teremt kapcsolatot a TMD-k és az ATP γ -foszfátja között, így lényeges szerepe van az ATP-vel történő kölcsönhatás következtében kialakuló konformációváltozás TMD-kre való átvitelében [100, 107-109]. A D-hurkok egymással való kölcsönhatása a két NBD közötti kommunikációt biztosítja [110].

1.4.4. A P-glikoprotein általi drog transzport mechanizmusa

Sokáig nem volt egyetértés abban, hogy a Pgp szubsztrát-transzlokációja milyen módon történik. Három fő elmélet született a szubsztrát-transzlokáció magyarázatára: a flippáz modell, a pumpa modell és a hidrofób „porszívó” modell.

- 1) A flippáz modell (**7. ábra A**) szerint a Pgp a membrán belső lemezéből a külsőbe transzlokálja a szubsztrátokat, ezáltal egyenlőtlen megoszlást hoz létre a két membránlemez között. A külső rétegben feldúsult szubsztrátok lipid-víz megoszlási hányadosaiknak megfelelően távoznak az extracelluláris térbe [111, 112].
- 2) A pumpa modell (**7. ábra B**) esetében azt feltételezték, hogy a Pgp ATP-t felhasználva, aktív pumpaként a szubsztrátjait közvetlenül a citoszolból az extracelluláris térbe pumpálja [113].
- 3) A hidrofób „porszívó” modell (**7. ábra C**) alapján pedig a Pgp nagy hatékonysággal a membránból közvetlenül az extracelluláris térbe juttatja a szubsztrátokat [114].



7. ábra A Pgp szubsztrát-transzlokációjára kidolgozott elméletek: a flippáz modell (A), a pumpa modell (B) és a hidrofób „porszívó” modell (C).

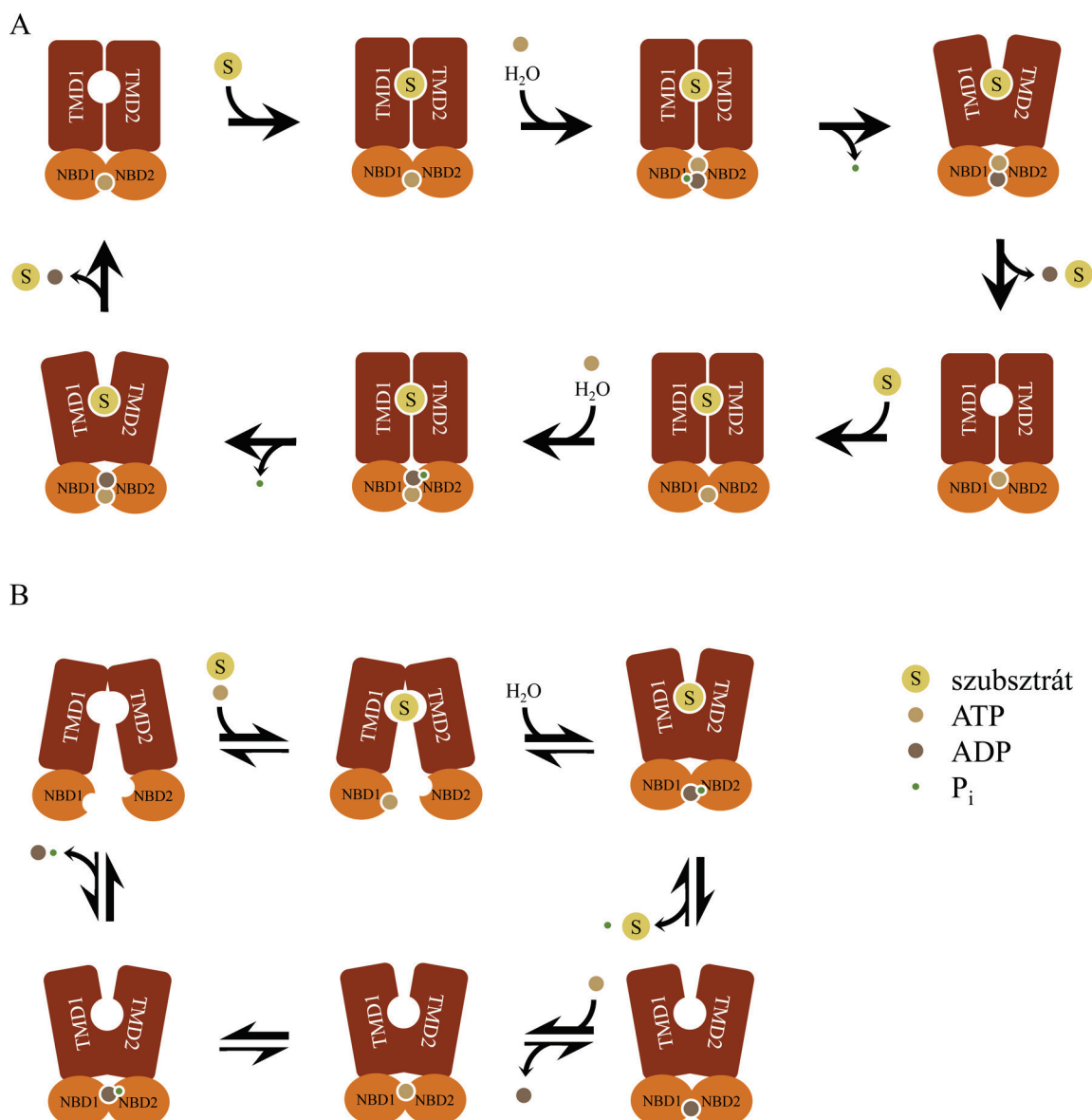
Ma már számos kísérleti bizonyíték támasztja alá, hogy a Pgp már azelőtt megkötö a szubsztrátjait, mielőtt azok a membránból a citoszólba léphetnének, ezáltal cáfolva a pumpa modellt. Például a calcein-acetoximetil-észtert (calcein-AM) – mely egy lipofil, nem fluoreszcens Pgp szubsztrát –már azelőtt eltávolítja a Pgp a sejtéből, mielőtt a molekula a membránból a citoplazmába juthatna, és ott aspecifikus észterázok az acetoximetil-észter csoportot lehasítva fluoreszcens calceinné alakítanák [115]. A flippáz és a hidrofób „porszívó” modell között azonban máig nem könnyű különbséget tenni. Transzport kísérletek és szerkezeti adatok alapján tudjuk, hogy a Pgp a befelé nyitott konformációjában meg tudja kötni a szubsztrátot a membránból [76, 77, 116-119], de nem egyértelmű, hogy a konformációváltozást követően a külső membránfélbe vagy közvetlenül a citoszólba jutnak a szubsztrátok. A Pgp működése az extracelluláris tér és a citoszól között szubsztrát koncentrációgradienst hoz létre, amely következtében a szubsztrát koncentráció-egyensúlya gyorsan beáll a membrán külső rétege és az extracelluláris tér között, így nehéz kísérletesen megállapítani, hogy pontosan hova disszociált a szubsztrát [120, 121]. Mivel a Pgp szubsztrátjai között hidrofób és amfifil vegyületek egyaránt vannak, nem zárható ki, hogy a szubsztrátkötő helyről disszociálódó szubsztrát mind az extracelluláris tér felé, mind a membrán külső lipidrétege felé távozhat, és a szubsztrát lipofil-amfifil jellege szabja meg, hogy hova történik a disszociáció [121, 122]. Számos amfifil vegyületről kimutatták, hogy azokat a Pgp a citoplazmatikus lipidrétegből az extracelluláris lipidrétegbe transzportálja, viszont ez a folyamat a vegyület amfifil jellegének csökkenésével egyre kedvezőtlenebb energetikailag [123]. Ezek alapján az adott szubsztrát transzport-mechanizmusa egy igen komplex folyamat, melyet a szubsztrát szerkezetén kívül a Pgp membránkörnyezete, ezáltal a szubsztrát és a Pgp, illetve a szubsztrát és a membrán közötti kölcsönhatások erőssége határoz meg.

1.4.5. A Pgp katalitikus ciklusát leíró modellek

A Pgp katalitikus ciklusa során két térben elkülönült folyamatot különböztethetünk meg, melyek egyrészt a szubsztrát megkötését, plazmamembránon keresztüli transzlokációját és végül disszociációját a kötőhelyről, másrészt az NBD-kben történő ATP-kötés és hidrolízis, valamint a hidrolízis-termékek disszociációjának részfolyamatait foglalják magukban. Az, hogy ezek a folyamatok a katalitikus ciklus során időben és térben hogyan kapcsolódnak egymáshoz, illetve hogy egy szubsztrát molekula transzportjához egy, vagy mindkét ATP hidrolízise szükséges-e, a mai napig vitatott kérdések. Itt a katalitikus ciklus leírására készült két legismertebb modellt szeretném bemutatni, melyek számos ponton eltérnek egymástól jelenlegi ismereteink hiányosságára és ellentmondásosságára utalva.

- 1) A Senior és mtsai. által publikált alternáló katalízis modell szerint [79] a Pgp egy teljes ciklusa során két szubsztrát molekula transzlokációja történik meg két ATP felhasználásával. A katalitikus ciklus során a két NBD mindig össze van kötve legalább egy nukleotiddal, és soha nem távolodik el egymástól. Ahogy azt a **8. ábra A** szekciója szemlélteti, a szubsztrát megkötésének pillanatában a két NBD egy ATP-vel már össze van kapcsolva, majd a már megkötött ATP hidrolízisét és egy ATP szabad NBS-re történő bekötődését követően ledisszociál a képződött inorganikus foszfát (P_i), eközben megtörténik a szubsztrát-transzlokációja, majd disszociációja az extracelluláris térbe, ezzel együtt a képződött ADP is leválik a fehérjéről. Ezt a fél ciklust követően a Pgp újra szubsztrát fogadására kész, és az előző szubsztrátkötő állapothoz képest a másik NBS-ben kötött ATP tartja együtt az NBD-ket.
- 2) A szekvenciális ATP-hidrolízis modell [124] szerint a Pgp-nek egy szubsztrát molekula transzlokációjához mindkét megkötött ATP-jét hidrolizálnia kell. A modell szerint létezik a Pgp-nek egy ATP-mentes, nagy szubsztráffinitású konformere, mely a szubsztrát megkötését követően ATP-t köt és hidrolizál az egyik NBS-en, eközben megtörténik a szubsztrát-transzlokációja és disszociációja. A két NBS disszociációja viszont nem valósulhat meg addig, míg a másik NBS-hez kötődő ATP nem hidrolizálódik és disszociál (**8. ábra B**).

Senior és mtsai. úgy vélték, hogy a Pgp NBD-i között nagyon szoros funkcionális kapcsolat van, mert amikor ortovanadát-ionnal (V_i) az egyik NBS-t blokkolták, az ATP hasítását követő fázisban a teljes katalitikus ciklus megakadt [79]. A V_i egy foszfát analóg, mely képes az ATP hidrolízise során keletkező foszfát csoport helyére nagy affinitással bekötődni, ezáltal gátolni különböző foszfatázokat és ATPázokat [125, 126]. A Pgp esetében vanadát jelenlétében nagy



8. ábra A Pgp hipotetikus katalitikus ciklusai az alternáló katalízis modell (A) és a szekvenciális ATP-hidrolízis modell (B) szerint. Mindkét grafika egy-egy teljes ciklust ábrázol.

stabilitású Pgp-ADP-V_i komplex jön létre, melyről feltételezik, hogy az ATPáz ciklus poszt-hidrolitikus átmeneti állapotát reprezentálja [127]. A reakció során csak az egyik NBS köt vanadátot, és ez elegendő az ATPáz ciklus gátlásához, melynek alapján arra következtettek, hogy az NBS-ek egymással váltakozva hidrolizálnak ATP-t [79]. A későbbi modellekben feltételezték egy olyan intermediert, melyben a Pgp mindkét NBS-e ATP-t köt, de a zárt NBD-dimer kialakulása után az egyik NBS köteleződik el az ATP hasítására, azáltal, hogy a nukleotid kötés erősebbé válik. Utóbbi állapotot „okkludált” állapotnak nevezték el [80]. Sharom és munkatársai szerint a katalitikus ciklus során „konformációs memória” gondoskodik arról, hogy mindig a soron következő NBS „okkludáljon”, majd hidrolizáljon ATP-t [128, 129]. Az

„alternáló katalízis” modell kinetikáját a rendelkezésre álló biokémiai adatok alapján később Lugo és mtsai. részletesen leírták matematikailag is [130].

Sauna és mtsai. szerint a fentiekkel ellentétben az egyik ATP hidrolízise csak arra elegendő, hogy a Pgp szubsztrátkötő helye nagy szubsztrátaffinitású konformációból alacsony affinitásúba váltson, és megtörténjen a szubsztrát molekula exportja. Ezt követően a Pgp affinitása a szubsztrátokhoz alacsony marad, és a második ATP hidrolízisével regenerálódik a kiindulási magas szubsztrátaffinitású konformáció, mely képessé teszi a fehérjét egy újabb ciklus indítására [124]. Egy későbbi összefoglalójukban Sauna és mtsai. is valószínűsítik az aszimmetrikus nukleotid kötést, vagyis az okkludált állapot meglétét, és felteszik a kérdést, hogy vajon a nukleotid kötődése, okklúziója, esetleg hidrolízise során történik-e meg a szubsztrát transzportához szükséges konformációváltozás [78].

2002-ben Smith és mtsai. egy, a Saunáékéhoz hasonló modellt mutattak be egy bakteriális (MJ0796), majd 2003-ban Janas és mtsai. egy *Saccharomyces cerevisiae* transzporter (Mdl1p) vizsgálatával, mely a humán TAP fehérjék homológja. Eredményeik szerint az NBD-k dimerizálódásához mindkét NBS-nek ATP-t kell kötnie („ATP switch”), majd a két ATP hidrolízise két külön lépésben történik, és az NBD-k csak akkor távolodnak el egymástól ismét, amikor mindkét ATP hidrolizálódott, és ledisszociáltak előbb a P_i -k, majd a két ADP is. Ezt követően indulhat újra a ciklus. Saunáék elképzeléséhez hasonlóan, ebben a modellben is szerepel a transzporter disszociált NBD-jű konformere [131, 132]. Az „ATP switch” modellt alátámasztó eredményeket Higgins és Linton foglalta össze [133].

A Pgp katalitikus ciklusának felderítése során sokszor végeztek olyan biokémiai vizsgálatokat, melyekben egyik vagy mindkét NBD konzervált szekvenciamotívumainak kulcs-aminosavait kicserélték. Mindkét oldali A-loop tirozinjának cseréje aromás csoportot nem tartalmazó aminosavra – például alaninra – gátolja a nukleotid kötést, mert ez a csoport jelentős szerepet tölt be az adenin gyűrű koordinálásában [105]; a Walker A motívum lizinjének metioninra történő cseréje gátolja az ATP hidrolízisét, de nem befolyásolja jelentősen az ATP kötődését [134, 135]; a Walker B motívum 556-os vagy 1201-es pozíciójában található glutaminsavat érintő mutáció a nukleotid okklúzióját okozta a mutáns oldalon. Hasonló hatása volt egér MDR3 esetében is a homológ glutaminsavak mutációjának [103, 136, 137]. Irodalmi adatok szerint ezek a mutánsok függetlenül attól, hogy a mutáció csak egyik vagy mindkét NBD-t érintette, nem rendelkeztek mérhető ATPáz aktivitással, ami alátámasztotta, hogy az ATP hidrolízise szigorúan felváltva történik a két ATP-kötő helyen összhangban az alternáló katalízis modellel. Ugyanakkor a szubsztrát- és ATP mentes körülmények között kristályosított

Pgp molekulák NBD-i rendszerint szeparálódva mutatkoznak a röntgenkristallográfiás szerkezeti modelleken [76, 77, 138, 139]. Emellett felszíni plazmon rezonanciás (surface plasmon resonance, SPR) [140], krio-elektronmikroszkópiás (cryo-electron microscopy, Cryo-EM) [141], ESR és molekuladinamikai adatok [142] is alátámasztják, hogy a szeparált NBD-jű IC oldalról nyitott konformáció része a katalitikus ciklusnak, összhangban a „szekvenciális ATP-hidrolízis” és az „ATP-switch” modellekkel. A fenti, egymásnak ellentmondóan interpretálható kísérleti eredmények miatt máig nincs konszenzus a Pgp katalitikus ciklusát leíró modelleket illetően.

1.4.6. A P-glikoprotein klinikai jelentősége és gátlásának lehetőségei

A Pgp szervezetünkben olyan szövetekben fejeződik ki, amelyek barrier funkciót látnak el (pl. a vér-agy gát endotél sejtjeiben, a hepatocitákban, a vese és a belek epitél sejtjeiben), így valószínűsíthető, hogy a szervezetbe került toxikus vegyületekkel szemben nyújt védelmet [143-145]. Ezáltal a Pgp a szervezetben egyéb enzimekkel és transzporterekkel együtt egy olyan rendszer része, mely alapvetően befolyásolja a szervezetbe juttatott gyógyszerek eloszlását, metabolizmusát, kiválasztását és esetleges toxicitását (ADME-Tox: *a*bsorption, *d*istribution, *m*etabolism, *e*xcretion and *t*oxicity) [146, 147]. Ugyanakkor daganatos sejteken történő gyakori kifejeződésével a Pgp (és még néhány ABC transzporter) 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 [148, 149], 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 és toxicitást más transzporterek, vagy a citokróm P450 rendszer gátlásán keresztül, mely megváltoztatta az alkalmazott citosztatikus vegyület metabolizmusát és szervezetből történő kiürülését [147, 150, 151]. A klinikai tesztek nem vezettek sikerhez még azokban az esetekben sem, amikor ún. harmadik generációs Pgp modulátorokat alkalmaztak, melyek nem rendelkeznek más biológiai aktivitással. Ezekben az esetekben klinikai vizsgálatok sikertelenségének oka a szervezetben fiziológiásan kifejeződő Pgp molekulák gátlása és ennek következtében az alkalmazott citosztatikumok megváltozott farmakokinetikája és megemelkedett toxicitása lehetett [152].

Mindezek mellett kétségek merültek fel azzal kapcsolatosan is, hogy a betegek kiválasztása megfelelő volt-e az egyes gyógyszerkipróbálások során. A gyógyszer rezisztens klinikai kép kialakulásához ugyanis akár többféle rezisztencia mechanizmus együttesen is hozzájárulhat, melyek azonosítása elengedhetetlen a megfelelő terápiás protokoll személyre szabott kiválasztása szempontjából [153]. Mindezeket egybevetve fontos a multidrog rezisztencia legyőzésére irányuló terápiás protokollok repertoárjának kiszélesítése [154, 155], és olyan modellrendszerek létrehozása, melyek alkalmasak a rezisztens tumorok *in vivo* tanulmányozására [156].

Számos olyan monoklonális antitestet hoztak létre az idők folyamán, melyek a Pgp extracelluláris részén található epitóphoz kötődnek. Ezek közül néhány (pl. az MRK16, MRK17, MC57, HYB-241 és az UIC2) komplex epitópot ismer fel konformációfüggő módon, és kötődésével részlegesen gátolja a Pgp általi drog transzportot *in vivo* és *in vitro* [157-160]. Bár ez a gátló hatás gyakran gyenge [157-162], a mértéke függhet a transzportált szubsztráttól [159, 161, 162], valamint általános tapasztalat szerint ugyanazon szubsztrát esetében is variábilis.

Az UIC2 egy IgG2a izotípusú egér monoklonális antitest, mely komplex extracelluláris epitópjának részét képezi a Pgp első [163], harmadik [164] és újabb adatok szerint negyedik extracelluláris hurka [165]. Az UIC2 önmagában alkalmazva csak a sejtfelszíni Pgp-k 10-40%-ához kötődik, míg bizonyos Pgp szubsztrátok vagy modulátorok jelenlétében (pl. CsA, SDZ PSC 833, vinblasztin, paclitaxel) minden Pgp UIC2-reaktív konformációba kerülhet [166-168]. 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 [167]. 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 multidrog rezisztens daganatos betegeknél. 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:

1. Milyen körülmények között fokozza az UIC2 mAt kombinált alkalmazása a Pgp szubsztrát citosztatikumok citotoxikus hatását *in vitro* kísérletekben?
2. *In vivo* kísérletekben az UIC2 antitest kombinált adása fokozza-e a citosztatikum terápia hatásosságát?
3. 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 Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 25364-1/2012/EKU (449/P1/12.)).)

3.2. Reagensek

A kísérletekhez és a sejtenyésztéshez használt vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A fluoreszcens Pgp szubsztrátokat, így a calcein-acetoxi-metilésztert (calcein-AM) és a BODIPY FL-el konjugált vinblasztint (VBL-BPY), valamint az antitestek fluoreszcens jelzésére használt Alexa 488 és 647 szukcinimidil-észter festékeket (A488 és A647) a Life Technologies, Inc.-től (Carlsbad, CA, USA) vásároltuk. Az UIC2, 15D3, 5D3 és QCLR-3 monoklonális antitesteket a laboratóriumunkban tenyésztett hibridóma sejtvonalak tenyésztőfolyadékából izoláltuk affinitáskromatográfiás módszerrel. A hibridóma sejtvonalakat az American Type Culture Collections-től vásároltuk (Manassas, VA, USA). Antitest-preparátumaink SDS-PAGE módszerrel történő vizsgálat során legalább 97%-os tisztaságúnak bizonyultak. Az UIC2 és 15D3 antitesteket A647 vagy A488 festékkel konjugáltuk, az antitesthez nem kötődött festéket Sephadex G-50 oszlop segítségével, géliszűrőssel távolítottuk el. Az antitest-preparátumok festék-fehérje aránya minden esetben kb. 3:1 volt.

3.3. Sejtvonalak és fenntartásuk

Az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak humán *mdr1* génnel transzfektált variánsát (NIH 3T3 MDR1 sejtvonal), valamint a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat és annak vinblasztinnal szelektált Pgp⁺ szubklónját (KB-V1 sejtvonal), Michael

Gottesman (National Institutes of Health, Bethesda, MD) laboratóriumából kaptuk. Az MDCK II (Madin-Darby canine kidney) sejtvonal és annak ABCG2-vel transzfektált változata Sarkadi Balázs (Enzimológiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, Magyarország); a GLC4 humán kissejtes tüdőrák sejtvonal, és annak MRP1-et expresszáló, doxorubicinnel szelektált szubklónja pedig Herbert M. Pinedo (Department of Medical Oncology, Academic Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam) nagyvonalú ajándéka volt. Az NIH 3T3 és az MDCK sejtvonalakat felhasználva a különböző mutáns Pgp variánsokat (K433M, K1076M és K433M/K1076M (utóbbit röviden csak MM-el jelöltük)) expresszáló transzgénikus sejtvonalakat Türk Dóra és Szakács Gergely hozták létre (Enzimológiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, Magyarország) *Sleeping Beauty (SB)* 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 10% hőinaktivált főtális marha szérumot, 2 mM L-glutamint és 0,1 mg/ml penicillin-streptomycin koktélt tartalmazott. A vad típusú humán Pgp-t kifejező sejtek esetében a magas Pgp expressziós szintet drog szelekcióval tartottuk fenn: az NIH 3T3 MDR1 sejteket 670 nM, a GLC4/ARD sejteket 600 nM doxorubicin-hidroklorid (DOX, TEVA Gyógyszergyár Zrt, Debrecen, Magyarország), a KB-V1 sejteket pedig 180 nM vinblasztin-szulfát mellett tenyésztettük. A kísérletek elvégzése előtt 2 nappal a sejteket drogmentes médiumba helyeztük át.

Az egér fibroblaszt, illetve az epidermoid karcinóma sejteket felhasználás előtt 0,05% -os tripszin-EDTA oldattal (0,5 mg/ml tripszin, 0,2 mg/ml EDTA, 2 perc, 37 °C), az MDCK sejteket pedig 0,25%-os tripszin-EDTA oldattal (2,5 mg/ml tripszin, 0,2 mg/ml EDTA, 5 perc, 37 °C) történő inkubálással választottuk el a sejtenyészítő flaska aljáról.

3.4. A Pgp direkt immunfluoreszcens jelölése

A sejtfelszíni Pgp molekulák direkt immunfluoreszcens jelöléséhez a sejszuspenziót (10⁶ sejt/ml 1% FCS tartalmú gl-PBS-ben (FCS-gl-PBS; PBS (150 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 8,6 mM NaH₂PO₄, 1,69 mM KH₂PO₄), mely 1 % FCS-t és 8 mM glükózt is tartalmaz) 30 percig 37 °C-on inkubáltuk 30 µg/ml 15D3-A647 mAb-vel vagy 10 µM ciklosporin A jelenlétében 10 µg/ml UIC2-A647 monoklonális anti-Pgp antitesttel. A jelölést követően a sejteket háromszor mostuk (300 × g, 5 perc, 4 °C) jéghideg, FCS-gl-PBS-sel. Az antitest kötődés mértékét FACS

Array vagy FACS Aria III (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

3.5. Sejtfelszíni ABC transzporterek indirekt immunfluoreszcens jelölése

A sejteket gl-PBS-ben (10^6 sejt/ml) inkubáltuk 37 °C-on 30 percig a megfelelő Pgp specifikus (15D3: 30 µg/ml) vagy ABCG2 specifikus (5D3: 10 µg/ml) elsődleges mAt-vel. A QCRL-3 anti-MRP1 mAt-vel történő jelölés előtt a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk 1% paraformaldehid és 0.1% TritonX-100 mellett PBS-ben (15 perc; 4 °C), majd 2 µg/ml QCRL-3 mAt-vel jelöltük őket 30 percig 4 °C-on. Majd háromszori jéghideg FCS-gl-PBS-sel történő mosás után újabb 30 percig inkubáltuk a mintákat jégen 1 µg/ml CFL647-tel konjugált kecske anti-egér IgG (GaMIgG-CFL647, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) jelenlétében. A sejteket újabb háromszori, FCS-gl-PBS-sel történő mosás után FACS ARIA III áramlási citométerrel analizáltuk.

3.6. Western-blot analízis

A teljes sejtlizátum fehérjéit (2,5 µg fehérje/minta) 8%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel elválasztottuk, majd 0,45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) elektroblottoltuk. A Pgp-t G1 monoklonális antitest (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) és torna-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG antitest (HRP-GaMIgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) segítségével detektáltuk. Mindkét antitestet 1:5000 hígításban alkalmaztuk. Az előhívást SuperSignal West Femto ECL reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), a kép rögzítését pedig Fluor Chem Q Alpha Innotech gél dokumentációs rendszer segítségével végeztük.

3.7. Calcein és BODIPY-vinblasztin akkumulációs teszt

A sejteket ($0,25 \cdot 10^6$ sejt/ml gl-PBS-ben) 10 percig előkezeltük ciklosporin-A-val (CsA, 10 µM) 37 °C-on, majd calcein-acetoxi-metilészter (calcein-AM, 100 nM) vagy BODIPY FL-vinblasztin (VBL-BPY, 100 nM) adását követően további 30 percig inkubáltuk 37 °C-on. Ezután a mintákat jéghideg, 1% FCS tartalmú gl-PBS-sel (FCS-gl-PBS) mostuk, és jégen tartottuk a mérésig. A mérés során az elpusztult sejteket propidium-jodiddal (PI; 5 µg/ml) 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 [169].

3.8. Rodamin 123 efflux esszé

A sejteket (10^6 sejt/ml gl-PBS-ben) 30 percen keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltunk $0,5\text{ }\mu\text{M}$ rodamin 123-mal (R123, fluoreszcens Pgp szubsztrát). A vad típusú Pgp-t expresszáló sejteket $100\text{ }\mu\text{M}$ verapamil (kompetitív Pgp inhibitor) mellett töltöttük fel R123-mal. Majd a sejtek által fel nem vett festéket eltávolítottuk, és a mintákat jégen tartottuk a mérés kezdetéig. Az efflux mérés kezdetén az R123-mal feltöltött sejteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os $0,5\%$ főtális marha szérumot (FCS) tartalmazó gl-PBS-sel 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 medián fluoreszcencia intenzitásokat (y) 10 másodpercenként átlagoltuk, és az idő (t) függvényében ábrázoltuk. A továbbiakban a sejtszuspenzióból 10, 20, 30, 60, 120 perc elteltével vettünk mintát, majd a sejtek fluoreszcencia intenzitását FACS Aria III-mal mértük. Az elsőrendű transzport sebességi állandót (k) a mérési pontok exponenciális függvénnyel történő illesztésével határoztuk meg az **1. egyenlet** alapján, ahol a a kezdeti fluoreszcencia intenzitás (a 0. percben mérhető maximális fluoreszcencia intenzitás) és a végtelenben mérhető minimális fluoreszcencia intenzitás különbsége, c pedig a sejtek háttérfluoreszcencia intenzitása:

$$y = a \cdot e^{-k \cdot t} + c \quad \text{1. egyenlet}$$

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

A sejteket nyolc-kamrás Ibidi μ -Slide-okban (Ibidi GmbH, Martinsried, Németország) növesztettük két napig, olyan kezdeti sejtszámot alkalmazva, hogy közel konfluens kultúrát alkossanak a kísérlet idejére. A sejteket háromszori 10% FCS-t tartalmazó HEPES pufferrel (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, $1,5\text{ mM}$ MgCl_2 , 1 mM CaCl_2) történő mosást követően 30 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on előkezeltük CsA-val ($10\text{ }\mu\text{M}$), NaN_3 (10 mM) és 2-deoxi-D-glükóz (8 mM) keverékével, Na_2VO_3 -tal (2 mM) vagy N-etilmaleimiddel (NEM, $50\text{ }\mu\text{M}$). Ezt követően további fél órán keresztül inkubáltuk a mintákat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 100 nM VBL-BPY és A647 fluorofórral konjugált 15D3 anti-Pgp monoklonális antitest jelenlétében ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$, 15D3-A647). Az inkubálást követően háromszor mostuk a sejteket jéghideg 10% FCS-t tartalmazó HEPES pufferrel, majd $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ PI-vel jelölve konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az elpusztult, PI-pozitív sejteket kizártuk a vizsgálatból.

3.10. Sejtek permeabilizálása *Staphylococcus aureus* α -toxinnal, illetve streptolizin-O-val

A *Staphylococcus aureus* α -toxin és a streptolizin-O (Sigma-Aldrich, Budapest) a sejtek plazmamembránjában gyűrűszerű struktúrákat hoznak létre, amelyek kisméretű vízdoldható

molekulák számára átjárhatóvá teszik a membránt [170]. A konfokális mikroszkópiához előkészített Ibidi μ -Slide IV^{0.4} tárgylemezre növesztett NIH 3T3 sejteket 50 μ g/ml α -toxin, az MDCK sejteket pedig 20 μ g/ml (kb. 1300 U/ml) streptolizin-O (SLO) kezeléssel (37 °C, 30-60 perc) permeabilizáltuk 10 mM DTT és proteáz inhibitor koktél mellett 1% FCS-t tartalmazó HEPES puffében (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). A permeabilizált sejtek arányát propidium-jodidos 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.

Áramlási citometriás méréshez az MDCK sejtuszuspenziókat (10⁶ sejt/ml) 5 μ g/ml (325 U/ml) streptolizin-O-val permeabilizáltuk 60 percig 37 °C-on, majd jéghideg 1% FCS-t tartalmazó HEPES pufferrel mostuk háromszor (a centrifugálás 4 °C-on és 500 $\times$ g-n történt 5 percig).

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

A permeabilizálást követően a sejteket háromszori 10% FCS-t tartalmazó HEPES pufferrel (20 mM HEPES, 123 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) történő mosást követően 30 percig 37 °C-on előinkubáltuk CsA-val (10 μ M) vagy ATP/MgCl₂ (5 mM) és Na₂VO₃ (2 mM) keverékével, illetve AMP-PNP/MgCl₂-dal (3 vagy 5 mM), majd ezt követően további fél órán keresztül inkubáltuk a sejteket 37 °C-on VBL-BPY(100 nM) és A647 fluorofórral konjugált 15D3 anti-Pgp mAt jelenlétében (30 μ g/ml, 15D3-A647). Az inkubálást követően háromszor mostuk a sejteket jéghideg 10% FCS-t tartalmazó HEPES pufferrel, majd 5 μ g/ml PI-vel jelölve konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A permeabilizálódott, PI-pozitív sejteket használtuk a vizsgálatához.

3.12. *In vitro* citotoxicitási tesztek

A KB-V1, illetve KB-3-1 sejteket 5 $\cdot$ 10³ sejt/lyuk koncentrációban 96 lyukú plate-ben drogmentes médiumban tenyésztettük 24 óráig, majd további 72 órán keresztül inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂) különböző koncentrációkban alkalmazott doxorubicin (DOX) és CsA (1 vagy 10 μ M) és/vagy UIC2 mAt (10 μ g/ml) jelenlétében és hiányában. Ezt követően a médiumot AlamarBlue (Serotec, Egyesült Királyság) tartalmú fenolvörös indikátor nélküli DMEM-re cseréltük és további két óra inkubálást követően a redukált AlamarBlue mennyiségét microplate olvasóval (BioTec Synergy HT, US) határoztuk meg (a minták 560/590 nm-es fluoreszcencia intenzitásának mérésével). A minták fluoreszcencia intenzitása arányos a bennük található életképes sejtek számával. Az élő sejtek arányát a DOX koncentráció függvényében ábrázoltuk,

majd a dózis-hatás görbéket a **2. egyenlet** szerint (ahol *max* és *min* a görbe maximuma és minimuma, illetve a *Hill koefficiens* a szigmoid görbe meredeksége) illesztettük, és meghatároztuk a DOX félhatásos dózisát (EC_{50}) a különböző kezelések esetében.

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}} \right)^{Hillslope}} \quad \text{2. egyenlet}$$

3.13. *In vitro* ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) esszé

A kísérleteket Barok és mtsai. [171] leírása alapján végeztük, kisebb módosításokkal. A humán perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) buffy coat-ból (a vér fehérvérsejteket és vérlemezkéket tartalmazó frakciója, melyet az Országos Vérellátó Szolgálat bocsátott rendelkezésünkre) szeparáltuk ficoll gradiens (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich) centrifugálással. A PBMC frakciót (effektor sejtek) kétszeri mosást követően 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben szuszpendáltuk fel. A KB-V1 és KB-3-1 sejteket (target sejtek) 10 μ M 5(6)-karboxifluorescein-diacetát-N-szukcinimidil észterrel (CFDA-SE) jelöltük 10 percig 37 °C-on gl-PBS-ben, majd 10% FCS-t és 1% BSA-t tartalmazó DMEM-mel mostuk háromszor, végül 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben vettük fel.

A CFDA-SE jelölt target sejteket ($1,5 \cdot 10^5$ sejt/minta) a perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekkel, mint effektor sejtekkel, különböző arányokban (1:5, 1:10, 1:50 és 1:100) kevertük össze. Ezután a mintákat DMEM médiumban 0,1 μ M CsA és/vagy 20 μ g/ml UIC2 jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk 37 °C-on CO₂-inkubátorban nyolc 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 populációk kapuzását az **1. kiegészítő ábra** szemlélteti). A CFDA-SE⁺/PI⁺ kettős pozitivitást mutató sejtek aránya az összes CFDA-SE⁺ sejtekhez (target sejtek) képest megadja az elpusztult target sejtek arányát. Negatív kontrollként effektor sejteket nem tartalmazó szuszpenziót, pozitív kontrollként pedig 4% paraformaldehiddel fixált szuszpenziót használtunk.

3.14. *In vitro* komplementfüggő citotoxicitás (CDC) esszé

A kezelt (20 mg/ml UIC2 és/vagy 0,1 μ M CsA) vagy kezeletlen KB-V1 és KB-3-1 sejteket ($2,5 \cdot 10^5$ sejt/ ml) különböző hígításokban kevertük 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 bárány vörösvértestek (SSRBC-k, Dr. Bácsi Attila ajándéka, DE Immunológia Intézet) segítségével határoztuk meg. Ennek során 50 µl 1%-os SSRBC-t különböző hígításokban kezeletlen vagy hő-inaktivált (30 perces 56 °C-on történő inkubálással inaktivált) humán szérummal inkubáltunk 30 percig 37 °C-on. Centrifugálást követően a lizált SSRBC-kból felszabadult hemoglobin mennyiségét a felülúszóból vett minták 541 nm-en mért abszorpciója alapján határoztuk meg BioTek Synergy HT plate olvasó segítségével. Az így kapott értékek alapján meghatároztuk, hogy adott szérumhígításnál az SSRBC-k hány százaléka lizálódott, így a dózis-hatás görbéből meghatározhattuk a CH₅₀ értékeket (az a szérum-hígítás, melynél a vörösvértestek 50%-a lízist szenved), melyek a normális tartományon belül voltak.

3.15. Állatkísérletek

A kísérletekhez 10-12 hetes, patogénmentes B-17 súlyos kombinált immunhiányos (severe combined immunodeficiency, SCID) egereket használtunk [172]. Az állatokat patogénmentes körülmények között 26±2 °C hőmérsékleten 50±10% páratartalom mellett tartottuk tizenkét órás cirkadián ciklust alkalmazva. Az ivóvizet és takarmányt autoklávozással sterilizáltuk, melyhez igény szerint hozzáfértek az állatok.

A SCID egerek combjába szubkután KB-3-1 (Pgp⁻; 1.5·10⁶ sejt 150 µl seteril PBS-ben a bal combba) és KB-V1 (Pgp⁺; 3·10⁶ sejt 150 µl steril PBS-ben a jobb combba) sejteket injektáltunk. Ahhoz, hogy hasonló méretű tumorokat kapjunk mindkét sejtvonal esetében, a KB-V1 sejtek mennyiségét, azok lassabb osztódási rátája miatt meg kellett dupláznunk. Azért, hogy limitáljuk a felhasznált állatok számát és maximáljuk a tumorok mennyiségét, végeztünk olyan kísérletet is, ahol az egerek vállába és combjába is injektáltunk sejteket. A tumorokat négy napig hagytuk nőni, majd az egereket doxorubicinnel (5 mg/ttkg, i.v.), vagy doxorubicin és UIC2 mAt (5 mg/ttkg, i.v.), illetve CsA (Sandimmun, Novartis, Basel, Switzerland; 10 mg/ttkg, i.p.), 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.

3.16. mRNS analízis

A fagyasztott tumorszeleteket tízszeres térfogatú, előre hűtött RNeasy-Lysis lúgos oldatban (Applied Biosystem, CA) tartottuk -20 °C-on egy éjszakán át, hogy megóvjuk az RNS-t a degradációtól, majd teljes RNS-t izoláltunk a mintából RNeasy Mini kit (Qiagen Inc., CA) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az izolátum RNS tartalmát NanoDrop ND-1000 UV-

Vis spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) segítségével határoztuk meg. Ezt követően a Pgp mRNS expresszióját a tumorokban és a xenotranszplantációhoz használt sejtekben RT-qPCR (reverz transzkripcióval való idejű kvantitatív polimeráz láncreakció) módszerrel, Taqman esszé segítségével (Applied Biosystem, CA) határoztuk meg. A Pgp mRNS expresszióját a mintákban a humán glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS mennyiségéhez viszonyítottuk.

3.17. Konfokális mikroszkópia

A mikroszkópos mintákat Olympus FluoView 1000 invertált IX-81 állvánnyal felszerelt konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A képalkotáshoz UPlanSApo 60× (NA=1,35) olajimmerziós objektívet használtunk (Hamburg, Germany). A VBL-BPY-t Ar-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, emisszióját pedig 500 nm és 530 nm között detektáltuk. A PI-t egy He-Ne lézer 561 nm-es vonalával, az A647-et pedig egy ugyanilyen lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük. A PI fluoreszcenciáját 555 nm és 655 nm között, míg az A647 fluoreszcenciáját 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 ki Shrestha és mtsai. [173] alapján. A keresztkorrelációs együttható (C) a **3. egyenlet** alapján számolható ki, melyben az $x_{i,j}$ illetve $y_{i,j}$ a kép két csatornájában lévő i és j koordinátákkal meghatározható pixel intenzitása korrigálva a kúpos zárójelben lévő háttérfluoreszcencia értékekkel. 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.

$$C = \frac{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \langle x \rangle)(y_{i,j} - \langle y \rangle)}{\sqrt{\sum_i \sum_j (x_{i,j} - \langle x \rangle)^2 \sum_i \sum_j (y_{i,j} - \langle y \rangle)^2}} \quad \text{3. egyenlet}$$

A permeabilizált sejtek membránstruktúrájában történt változások miatt nem tudtunk 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 pixeleken (a számolás folyamatábráját a **2. kiegészítő ábra** mutatja).

3.18. Áramlási citometria

Vizsgálataink során Becton Dickinson FACScan, FACS Array vagy FACS Aria III típusú áramlási citométereket használtunk (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Az ADCC és a CDC esszék eredményének kiértékelése során a FACScan 488 nm-es Ar-ion 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.

FACS Array mérések során a PI-t 532 nm-es, az A647-et pedig 633 nm-es dióda lézerrel gerjesztettük. A PI-t 585/42 nm-es („Yellow csatorna”) az A647-et pedig 661/16 nm-es („Red csatorna”) 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 DPSS lézerrel gerjesztettük, és 585/42 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. A magas Pgp expressziójú sejtpopulációkat direkt immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás sejtszeparálással válogattuk ki FACS Aria III készülék segítségével. Ezekben a kísérletekben az A647-et 633 nm-es He-Ne lézerrel gerjesztettük, és az emittált jelet 660/20 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk.

3.19. Kiértékeléshez használt programok és statisztikai analízis

A mikroszkópos képek szerkesztéséhez és a grafikai utómunkához ImageJ-t [174], Adobe Photoshop-ot és Adobe Illustratort (Adobe Systems Inc.), az adatok statisztikai analízisére Sigma Stat (Systat Software Inc.) vagy SPSS (IBM Inc.) 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.

A bevezetésben látható filogram elkészítéséhez a CLUSTALX [175] és Archaeopteryx [176] programokat használtuk. A topológiai diagramok a PROTTER [177] online topológiai szoftverrel készültek a szemléltetett fehérjék UniProt adatbázis bejegyzése alapján.

A fehérjék UniProt azonosítói a következők: ABCA1: O95477; ABCA2: Q9BZC7; ABCA3: Q99758; ABCA4: P78363; ABCA5: Q8WWZ7; ABCA6: Q8N139; ABCA7:

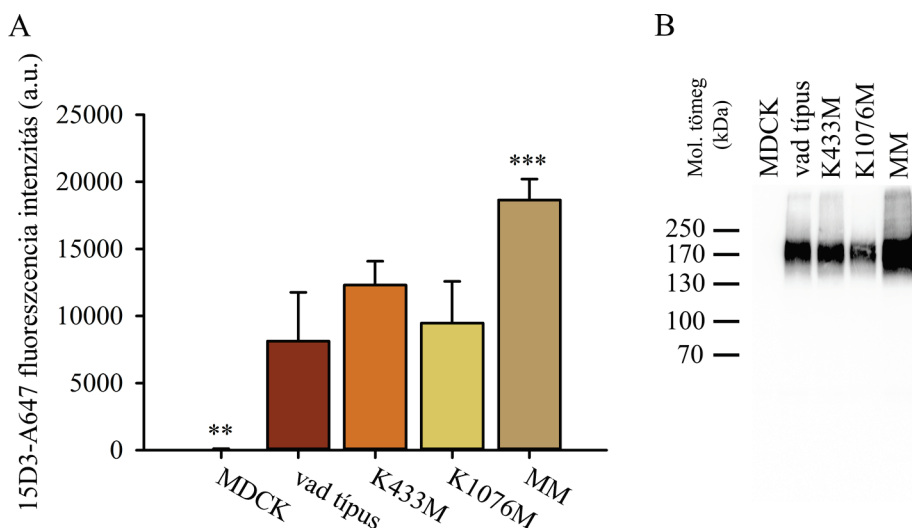
Q91V24; ABCA8: O94911; ABCA9: Q8IUA7; ABCA10: Q8WWZ4; ABCA11: Q4W5N1; ABCA12: Q86UK0; ABCB1: P08183; ABCB2: Q03518; ABCB3: Q03519; ABCB4: P21439; ABCB5: Q2M3G0; ABCB6: Q9NP58; ABCB7: O75027; ABCB8: Q9NUT2; ABCB9: Q9NP78; ABCB10: Q9NRK6; ABCB11: O95342; ABCC1: P33527; ABCC2: Q92887; ABCC3: O15438; ABCC4: O15439; ABCC5: O15440, ABCC6: O95255; ABCC7: P13569; ABCC8: Q09428; ABCC9: O60706; ABCC10: Q5T3U5; ABCC11: Q96J66; ABCC12: Q96J65; ABCD1: P33897; ABCD2: Q9UBJ2; ABCD3: P28288; ABCD4: O14678; ABCE1: P61221; ABCF1: Q8NE71; ABCF2: Q9UG63; ABCF3: Q9NUQ8; ABCG1: P45844; ABCG2: Q9UNQ0; ABCG4: Q9H172; ABCG5: Q9H222; ABCG8: Q9H221.

A molekulaszervezetek ábráihoz az UCSF Chimera programcsomagot használtuk (Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311)) [178], melyhez a Pgp humán homológia modelljeit Hegedűs Tamás (Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre.

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



9. ábra A különböző MDCK sejtvonalak Pgp expressziójának ellenőrzése direkt immunfluoreszcenciával (A) és Western blottal (B). A sejteket 30 percig inkubáltuk 15D3-A647 anti-Pgp antitesttel, majd a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük, és a kapott fluoreszcenciaeloszlási hisztogramok mediánjainak átlagait ábráztuk. Az ábrán három független mérésből származó mediánok átlagai ($\pm$ SD) (A) láthatók. **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ A Western blot analízis során a sejtek fehérjetartalmát SDS-PAGE-gel választottuk el, majd a blottolás után a Pgp-t G1 anti-Pgp antitesttel detektáltuk. Az ábrán egy reprezentatív Western blot (B) látható.

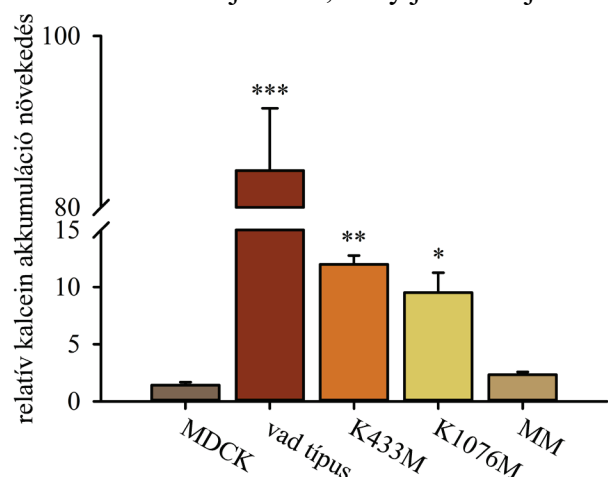
Ahhoz, hogy a vad típusú és Walker A mutáns Pgp variánsok transzportaktivitását össze lehessen hasonlítani, olyan sejtvonalakra volt szükségünk, melyek hasonló mértékben fejezik ki a különböző variánsokat. Ezért a kollaborációs partnereink által előállított transzgénikus sejtvonalakból a Pgp-t homogén módon expresszáló sejtpopulációkat direkt immunfluoreszcens jelölést követően áramlási citometriás sejtszeparálással válogattuk ki (FACS Aria III High Speed Cell Sorter, Becton Dickinson). A sejtklónok Pgp expresszióját immunfluoreszcens jelöléssel és áramlási citometriával, illetve Western-blottal rendszeresen ellenőriztük (9. ábra). 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 szubsztráttakkumulációs-tesztel mértük, melyben calcein-AM-et használtunk Pgp szubsztrátként. Ahogy az a bevezetőben már

említésre került, a calcein-AM csak akkor válik fluoreszcenssé, s ezáltal detektálhatóvá, ha azt a Pgp nem képes a membránból eltávolítani, így a citoplazmába jut, és ott aspecifikus észterázok fluoreszcens calceinné alakítják. A Pgp variánsok transzportaktivitását a sejtek CsA (ciklosporin A, kompetitív Pgp gátlószer) érzékeny calcein felvételével jellemeztük.

Kísérleteink során MDCK sejteket és azok mutáns Pgp variánsokat expresszáló változatait használtunk a calcein akkumulációs mérésekhez. 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



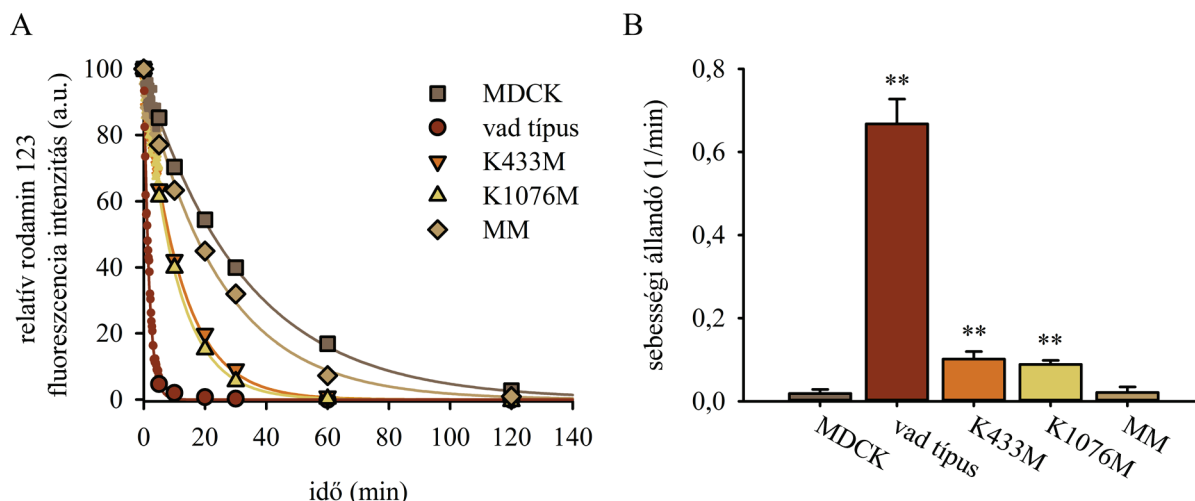
10. ábra A vad típusú és mutáns Pgp molekulák transzport funkciójának vizsgálata calcein-akkumulációs méréssel. Az ábrán a CsA kezelés hatására bekövetkező calcein akkumuláció növekedés átlagai ($\pm$ SD) láthatók három független mérés adataiból számolva. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$

értékek a féloldali mutáns Pgp-ket 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-ket expresszáló sejtekéhez ($2,3 \pm 0,2$ -szeres), illetve a Pgp-t nem expresszáló sejtekéhez ($1,4 \pm 0,3$ -szeres) képest (**10. ábra**). 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 efflux kinetikáját, és meghatároztuk a rodamin 123 transzport sebességi állandóját. Ehhez a sejteket feltöltöttük rodamin 123 festékkel, majd nagy térfogatú rodamin 123 mentes pufferbe helyezve mértük, hogy milyen gyorsan távozik a sejtekből a festék.

A sejtek festékkel történő feltöltése során arra törekedtünk, hogy a sejtek hasonló mennyiségű rodamin 123-at vegyenek fel. Ehhez a vad típusú Pgp-t expresszáló sejteket verapamil (Pgp gátlószer) jelenlétében töltöttük fel, mert a hatékony aktív transzport miatt a rodamin 123 önmagában alkalmazva szinte egyáltalán nem jutott be a sejtekbe. A többi Pgp variáns esetében a csökkent vagy hiányzó transzportaktivitás miatt nem kellett Pgp gátlószert alkalmaznunk.



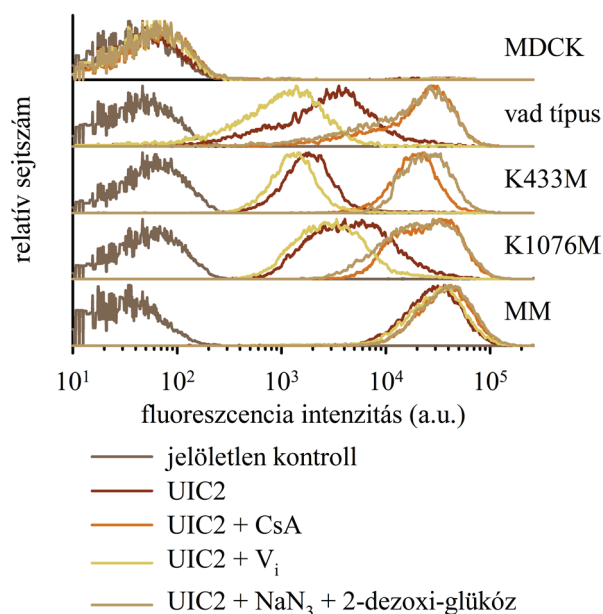
11. ábra A különböző Pgp variánsok transzport funkciójának vizsgálata rodamin 123 efflux mérésével. Áramlási citometria segítségével követtük az előzetesen rodamin 123-mal feltöltött, majd nagy térfogatú rodamin 123 mentes pufferbe kihígított sejtek fluoreszcencia intenzitását. A minták medián fluoreszcencia intenzitását az idő függvényében ábrázolva (A) meghatároztuk a különböző Pgp variánsokat expresszáló sejtvonalak rodamin 123 exportjának sebességi állandóját (B). A sebességi állandók három független mérés átlagai $\pm$ SD. **: $P < 0,01$

A festékekkel feltöltött sejteket ezt követően nagy térfogatú, előmelegített pufferbe téve mértük a bennük maradt R123 fluoreszcenciáját. A mérés első öt percében folyamatosan követtük az exportot, majd ezt követően különböző időpillanatokban vett minták fluoreszcenciáját mértük. Az így kapott R123 fluoreszcencia intenzitásokat az idő függvényében ábrázoltuk, és ebből határoztuk meg a különböző sejtvonalak transzport sebességi állandóit (**11. ábra A**).

Ezekből 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-ket 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-ket 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 (**11. ábra B**). 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

Goda és mtsai [169] leírták, hogy önmagában alkalmazva az UIC2 antitest csak a sejtfelszíni Pgp-k 20-40%-ához kötődik, de CsA jelenlétében vagy ATP depléción hatására a



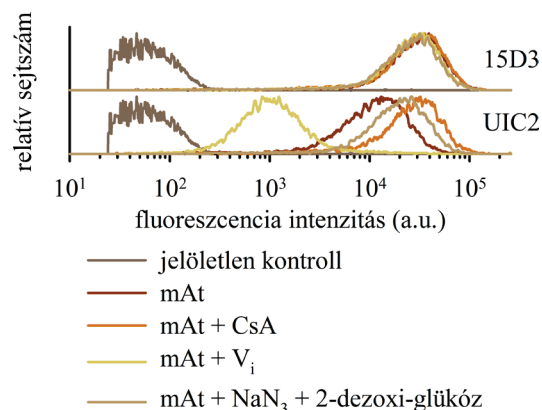
12. ábra A különböző Pgp variánsokat expresszáló MDCK sejtek jelölése UIC2-A647 antitesttel. Jelölés előtt 30 percig előkezeltük a sejteket $10 \mu\text{M}$ CsA-val, 2 mM V_i -vel vagy 10 mM NaN_3 és 8 mM 2-dezoxi-glükóz keverékével, majd tovább inkubáltuk UIC2-A647-tel 30 percig 37°C -on.

átmeneti állapotot [124] – UIC2 reaktivitás csökkenést tapasztaltunk. Ugyanakkor a mindkét oldali Walker A szekvenciában mutációt hordozó Pgp-ket expresszáló sejtek kezeléstől függetlenül magas UIC2 reaktivitást mutattak. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a féloldali mutáns Pgp-k képesek az UIC2-reaktív és UIC2-t nem kötő konformációk közötti váltásra, míg a dupla-mutáns Pgp-k az UIC2-reaktív konformációban rekedtek, melyből az általunk alkalmazott kezelésekkel 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 sejteket jelöltünk a modulátorokkal történő előkezelés után 15D3-A647 illetve UIC-A647 antitestekkel. Mivel a 15D3 mAt nem konformációérzékeny kötődésű, minden sejtfelszíni Pgp-t megjelöl. Ezekben a kísérletekben nem tapasztaltunk különbséget a

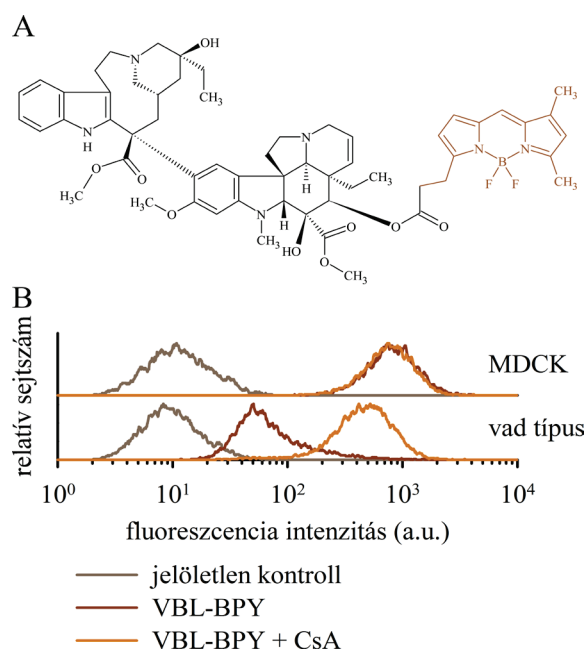
sejtfelszíni Pgp-k mindegyike az antitest számára felismerhető konformációba kerül. Emellett azt is kimutatták, hogy V_i hatására az UIC2-vel jelölhető Pgp-k aránya csökken. Ezért további kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a Walker A mutációt hordozó Pgp molekulák képesek-e az UIC2 antitesttel detektálható konformációváltozásokra. Ahogy azt a **12. ábra** mutatja, a féloldali mutációt hordozó Pgp-ket expresszáló sejtek a vad típusú Pgp-t kifejező sejtekhez hasonlóan CsA kezelés és ATP deplécio hatására jelentős UIC2 reaktivitás növekedést mutattak, míg V_i hatására – mely a P_i helyére bekötődve stabilizálja a hidrolízist követő



13. ábra Vad típusú Pgp-t expresszáló NIH 3T3 MDRI sejtek jelölése 15D3-A647 és UIC2-A647 monoklonális antitesttel, miután az ábrán jelölt modulátorokkal ($10 \mu\text{M}$ CsA, 2 mM V_i , 10 mM NaN_3 és 8 mM 2-dezoxi-glükóz) 30 percig 37°C -on előkezeltük a sejteket.

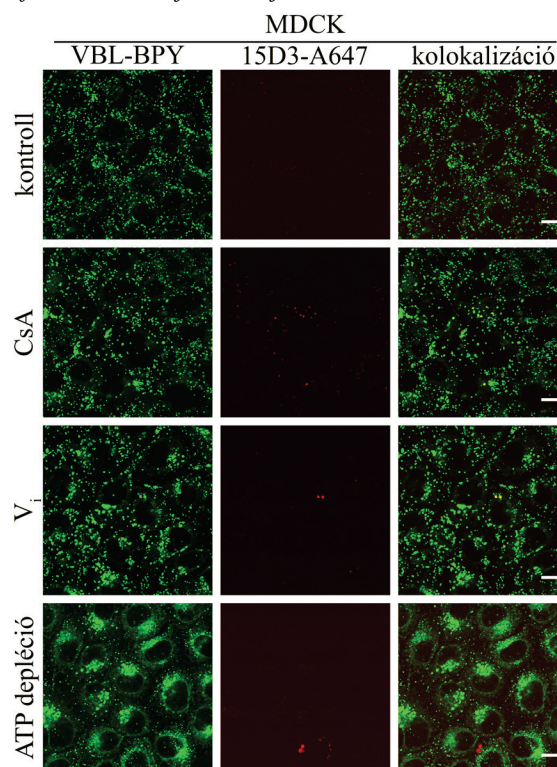
kezeletlen és a modulátorral előkezelt sejtek jelölődése között, míg a konformációérzékeny kötődésű UIC2 antitest esetében az MDCK MDR1 sejtek esetében már bemutatott konformációváltozásokat detektáltuk (vö. **12. ábra** és **13. ábra**). Ezek a megfigyelések azt bizonyították, hogy a használt modulátorok az előkezelés és a jelölés során nem befolyásolják jelentősen a sejtfelszíni Pgp-k számát, így az UIC2 kötődése a konformáció tényleges megváltozását jelenti.

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



14. ábra A BODIPY FL fluorofórral konjugált vinblasztin molekula szerkezete (A). A vinblasztin eredeti váza feketével, a hozzá kapcsolt boron-dipirrometén (BODIPY) váz pedig barnával van jelölve. VBL-BPY akkumuláció mérése (B) vad típusú Pgp-t expresszáló (alsó hisztogram), illetve nem transzfektált sejteken (felső hisztogram). A kísérletek során a sejteket a 0,1 μ M VBL-BPY-vel inkubáltuk 10 μ M CsA jelenlétében (narancs vonal) vagy hiányában (barna vonal). A szürke hisztogram a jelöletlen sejtek háttérfluoreszcenciáját mutatja.

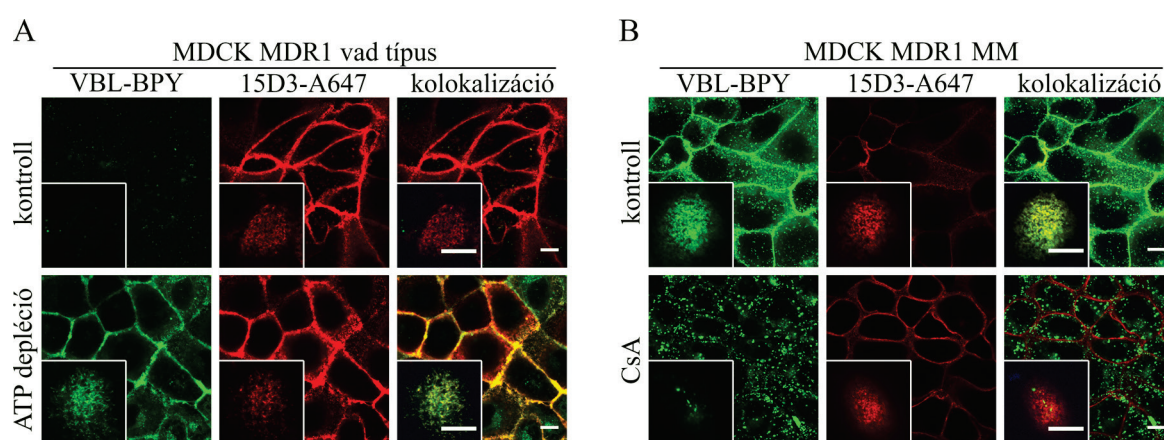
A Pgp molekulák szubsztrátaffinitását BODIPY-FL fluorofórral konjugált vinblasztin (BODIPY-FL-vinblasztin; VBL-BPY, szerkezetét a **14. ábra A** része szemlélteti) molekulákkal teszteltük. Elsőként megvizsgáltuk, hogy a VBL-BPY a vinblasztinhoz hasonlóan szubsztrátja-e a Pgp-nek. Kimutattuk, hogy az MDCK sejtek jól festődnek VBL-BPY-vel, míg a vad típusú Pgp-t expresszáló sejtekben hasonló körülmények között jelentősen kisebb jelölődést figyeltünk meg. A Pgp⁺ sejtek VBL-BPY akkumulációját a CsA kezelés a Pgp⁻ MDCK sejtekkel hasonló



15. ábra MDCK sejtek jelölése VBL-BPY-vel és 15D3-A647 antitesttel. A sejteket a festést megelőzően 30 percig 37 °C-on kezeltük elő Ciklosporin A-val (CsA), nátrium-ortovanadáttal (Vi) illetve nátrium-azid és 2-deoxi-glükóz keverékével (ATP deplécio), majd 30 perc 37 °C-on történő jelölést követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Skála: 10 μ m.

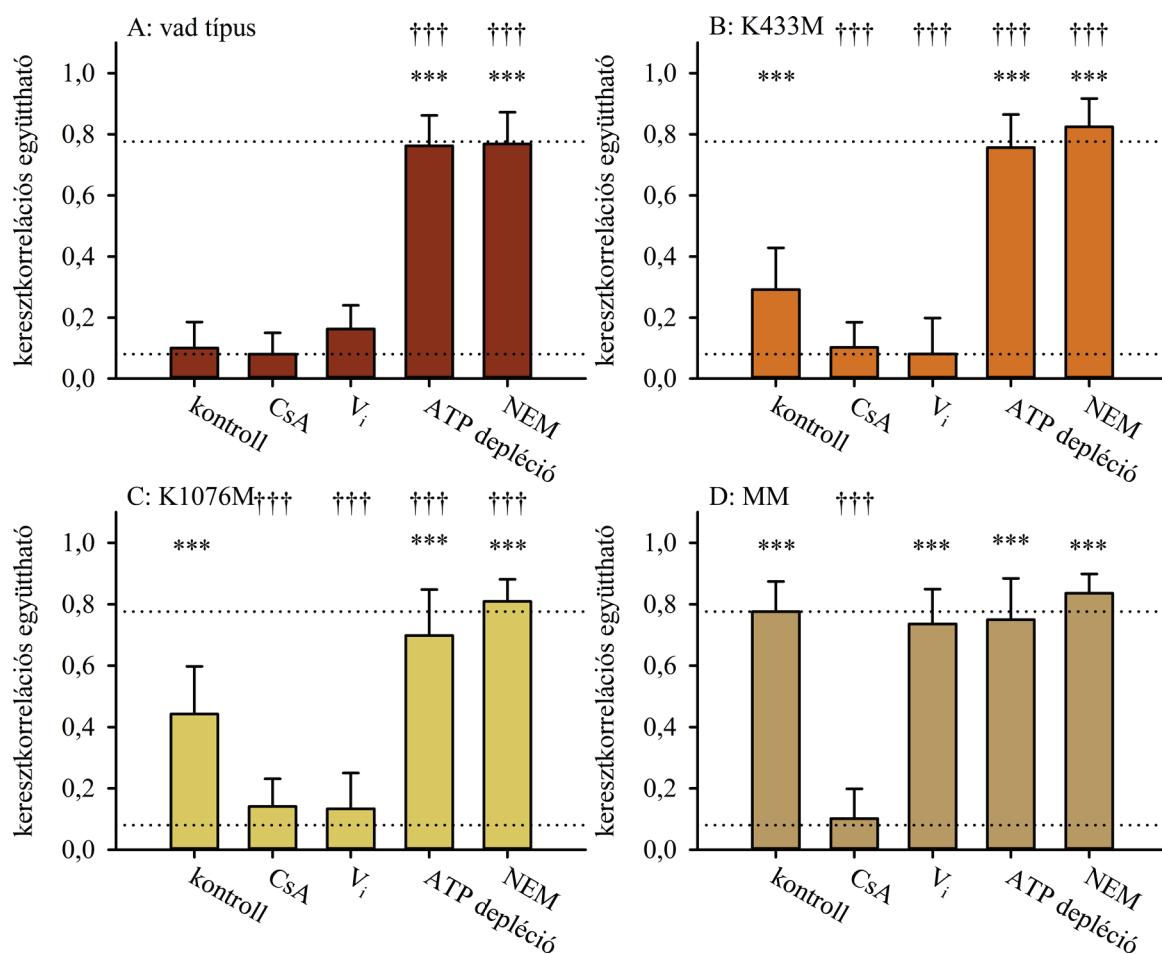
szintre fokozta (**14. ábra B.**). Ezek az adatok alátámasztják, hogy hasonlóan a vinblasztinhoz, a VBL-BPY megőrizte Pgp szubsztrát karakterét.

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. Érdekes módon ATP depléción hatására némiképp megváltozott a VBL-BPY festődést mutató vezikulák intracelluláris eloszlása, mely abban nyilvánult meg, hogy ezek a sejtmaghoz közel, vagy a mag körül koncentráálódtak. A Pgp⁻ MDCK sejtek esetében nem tapasztaltunk festődést a 15D3-A647 anti-Pgp mAt-vel (**15. ábra**).



16. ábra Vad típusú (A) és dupla mutáns (B) Pgp-et expresszáló MDCK sejtek jelölése VBL-BPY-vel (zöld) és 15D3-Alexa647 mAt-vel (piros) előkezelés nélkül (A és B, felső sor), ATP depléciót követően, melyet 30 perces előkezeléssel értünk el 10 mM Na-aziddal és 8 mM 2-dezoxi-glükózzal (A, alsó sor), illetve 30 perces előkezelés után 10 µM CsA-val (B, alsó sor). Az inzertek apikális membrán felületről készült felvételek. Skála: 10 µm.

A vad típusú Pgp molekulákat expresszáló sejtek esetében azonos műszer beállítás mellett nem tapasztaltunk intracelluláris VBL-BPY felhalmozódást a hatékony transzport következményeképpen (**16. ábra A, felső sor**), ezzel szemben, amikor a sejteket ATP depléciót követően festettük VBL-BPY-vel, intenzív plazmamembrán festődést tapasztaltunk (**16. ábra A, alsó sor**). Abban az esetben, ha Walker A mutáns Pgp-t expresszáló sejteket festettük előkezelés nélkül, a féloldali mutánsokat expresszáló sejtek esetében gyenge, míg a kétoldali mutánst expresszáló sejtek esetében igen erős membrán festődést detektáltunk (**16. ábra B, felső sor**). Ez a membrán jelölődés minden esetben kivédhető volt CsA előkezeléssel (**16. ábra B, alsó sor**). Mivel a membránban detektálható VBL-BPY jel csak a Pgp-t expresszáló 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.



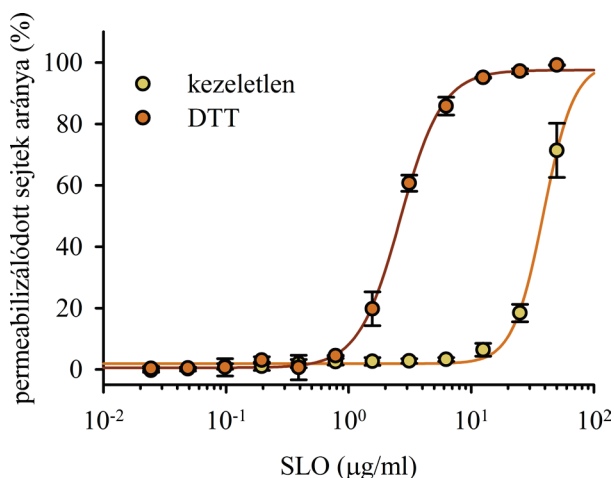
17. ábra A különböző Pgp variánsokat expresszáló MDCK sejtek (A: vad típus; B: K433M; C: K1076M; D: MM) esetében számolt Pearson-féle keresztkorrelációs koefficiensek, melyeket a VBL-BPY és 15D3-A647 csatornák közötti intenzitás-eloszlásokból határoztunk meg. A sejteket 30 percig előkezeltük 10 μ M CsA-val, 2 mM nátrium-ortovanáttal (V_i), 10 mM nátrium-azid és 8 mM 2-deoxi-glükóz keverékével (ATP deplécio), illetve 50 μ M NEM-mel, majd további 30 percig festettük 100 nM VBL-BPY-vel és 30 μ g/ml 15D3-A647 anti-Pgp antitesttel 37 °C-on. A keresztkorrelációs koefficienseket membránszínéről készült képekből határoztuk meg. A vad típusú Pgp-et expresszáló sejtek kezeletlen kontrolljától szignifikánsan különböző mintákat (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$), illetve az adott sejtvonal saját kezeletlen kontrolljától szignifikánsan különböző mintákat (†: $P < 0,05$; ††: $P < 0,01$; †††: $P < 0,001$) jelöltük.

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-et expresszáló sejtek esetében a keresztkorrelációs együttható magas volt (0,8 körüli), mely alapján arra következtethetünk, hogy a Pgp-k túlnyomó többsége magas szubsztrátaffinitású konformációban volt (**17. ábra D panel**). A féloldali mutánsokat expresszáló sejtek esetében valamivel magasabb volt a VBL-BPY kötés és ezzel együtt a keresztkorrelációs együttható is, mint a vad típusú Pgp-t expresszáló sejt esetében. A kompetitív inhibitorral (CsA) történő előkezelés mindegyik mutáns

esetében, míg a poszt-hidrolitikus állapotot rögzítő foszfát analóg (V_i) a féloldali mutánsok esetében csökkentette a keresztkorrelációs együttható értékét nullához közelítő értékre (**17. ábra B-D panelek**). 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 koefficiens magas, 0,8 körüli értéke (**17. ábra A, B és C panelek**). 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 (**17. ábra D panel**). A keresztkorrelációs együtthatók kiszámításához használt konfokális mikroszkópos képekből a **3. és 4. kiegészítő ábra** mutat mintánként egy-egy reprezentatív példát.

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 konformációváltozásra, míg a dupla mutáns erre képtelen.

4.6. Streptolizin-O-val permeabilizálhatók az MDCK sejtek



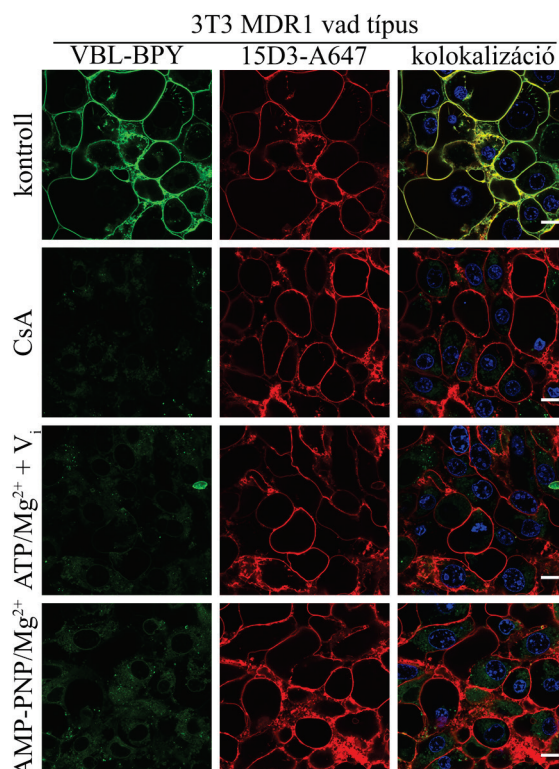
18. ábra MDCK sejtek permeabilizálása SLO-val. A sejteket két órán keresztül kezeltük 37 °C-on különböző koncentrációjú SLO-val, 10 mM DTT jelenlétében vagy hiányában, majd a permeabilizálódott sejteket propidium-jodiddal tettük láthatóvá.

Az MDCK sejtek, illetve ezek valamilyen ABC transzporterrel transzfektált változata jól permeabilizálható streptolizin-O-val (SLO), mely egy, a *Streptococcus* baktériumok által termelt hemolitikus endotoxin. Mivel az SLO oxigén labilis, a permeabilizálás határfoka jelentősen növelhető redukáló ágens, például DTT hozzáadásával. Redukáló körülmények között a toxin már 5 µg/ml koncentrációban hatékonyan permeabilizálta a szuszpenziós sejtek többségét (**18. ábra**), viszont a letapadt

sejtek esetében magasabb, 20 µg/ml koncentrációjú toxinra volt szükség, így ezt a koncentrációt alkalmaztuk további kísérleteinkben. A sejtek permeabilizálása után a membránban kialakuló pórusok átmérője elég nagy ahhoz, hogy rajtuk keresztül kimoshassuk belőlük a nukleotidokat, és feltölthessük a sejteket a kívánt típusú és koncentrációjú nukleotidokkal, vagy nukleotid-analógokkal.

4.7. A Pgp nagy szubsztrátaffinitású konformációjából az alacsony szubsztrátaffinitású 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 mAb-vel. Ezt követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben, illetve a **2. kiegészítő ábrán** említett módon számítottuk ki 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 konfokális mikroszkópos képekből egy-egy reprezentatív példa látható a **19. ábra és az 5. kiegészítő ábrán**).

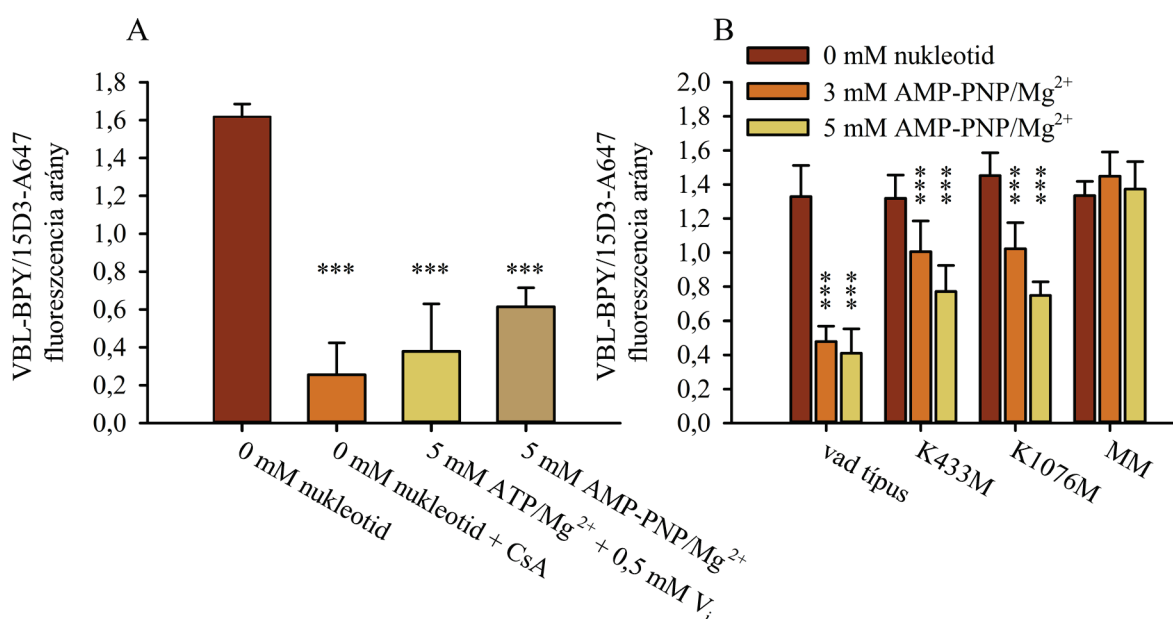


19. ábra A CsA, $ATP/Mg^{2+} + V_i$, vagy $AMP-PNP/Mg^{2+}$ kezelés hatása a *Staphylococcus aureus* α -toxinnal permeabilizált NIH 3T3 MDR1 sejtek VBL-BPY-vel történő jelölődésére. A sejteket $37^\circ C$ -on 30 percig előkezeltük a fent említett anyagokkal ($10 \mu M$ CsA, $5 mM$ $ATP/Mg^{2+} + 2 mM$ V_i , illetve $5 mM$ $AMP-PNP/Mg^{2+}$), majd $100 nM$ VBL-BPY-vel (zöld) és $30 \mu g/ml$ 15D3-A648-tel (piros) festettük. Kiértékelés során a permeabilizálódott sejteket használtuk, melyek magja jól jelölődött PI-vel (kék). Skála: $10 \mu m$.

A nukleotidok kimosását követően a vad típusú Pgp molekulák az élő sejtek ATP depléciója során is tapasztalható nagy szubsztrátaffinitású konformációt vették fel (**20. ábra A, barna oszlop**). Mivel a membrán VBL-BPY-vel történő jelölődése CsA alkalmazásával kivédhető volt (**20. ábra A, narancs oszlop**), itt is elmondhatjuk, hogy a membrán jelölődése a VBL-BPY szubsztrátkötő helyre történő nagy affinitású bekötődésének az eredménye. A VBL-BPY kötődés megszüntethető volt a permeabilizált sejtek ATP/Mg^{2+} -vel és V_i -vel történő előkezelésével, mely a Pgp molekulákat az ATP hidrolízist követő állapotban csapdázza [124] (**20. ábra A, okkersárga oszlop**). Érdekes módon, ha a permeabilizált sejteket $5 mM$ $AMP-PNP/Mg^{2+}$ -vel inkubáltuk elő, akkor is jelentősen csökkent a VBL-BPY/15D3-A648 arány, ami

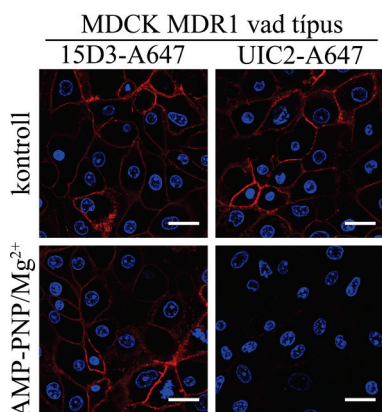
arra utal, hogy a Pgp-k többsége alacsony szubsztrátaffinitású konformációba került. Mivel az AMP-PNP nem hidrolizálódó ATP analóg, így arra következtethetünk, hogy a Pgp molekulák alacsony szubsztrátaffinitású konformációba történő átbillenéséhez nem szükséges a nukleotid hidrolízise (**20. ábra A**, világosbarna oszlop).

Hasonló eredményeket kaptunk, ha vad típusú humán Pgp-t expresszáló MDCK MDR1 sejteket használtunk. Ebben az esetben már 3 mM AMP-PNP is elegendő volt, hogy a Pgp molekulák jelentős részét alacsony szubsztrátaffinitású konformációba billentse át (**20. ábra B**, első oszlopcsoport). 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 (**20. ábra B**, második és harmadik oszlopcsoport). 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 szubsztrátaffinitású konformációban maradtak (**20. ábra B**, negyedik oszlopcsoport).



20. ábra A VBL-BPY kötődése az NIH 3T3 MDR1 sejtek által expresszált vad típusú Pgp (A), illetve az MDCK sejtek által expresszált mutáns Pgp variánsokhoz (B). Az NIH 3T3 MDR1 sejteket *Staphylococcus* α -toxinnal (A), az MDCK sejteket pedig Streptolizin-O-val permeabilizáltuk (B), majd a kezeléseket (10 μ M CsA, 5 mM ATP/Mg²⁺ + 0,5 mM V_i illetve AMP-PNP/Mg²⁺ 3 vagy 5 mM koncentrációban alkalmazva) követően festettük VBL-BPY-vel és 15D3-A647-tel. Ezután meghatároztuk a VBL-BPY és a 15D3-A647 fluoreszcencia intenzitásainak arányát a 15D3-A647 pozitivitás alapján kiválasztott, a plazmamembránt reprezentáló pixelekből. Az ábrázolt értékek három független mérésből származó átlagok $\pm$ SD. Minden mintát a vad típusú Pgp-eket expresszáló sejtek nukleotid depletált (0 mM nukleotid) mintájához hasonlítottunk (***: $P < 0,001$).

4.8. A nukleotid kötése jelentősen csökkenti a Pgp UIC2 reaktivitását



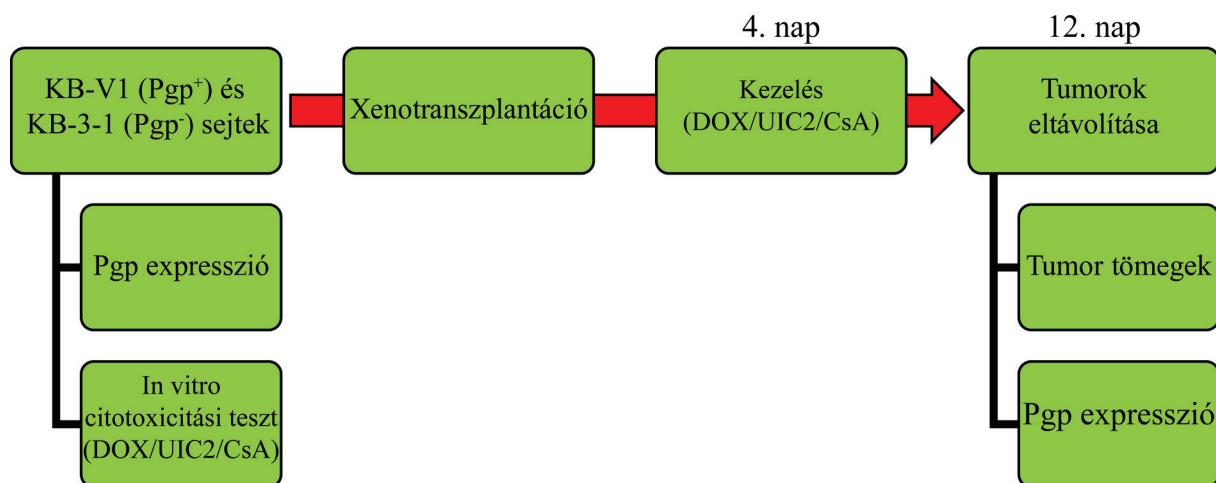
21. ábra SLO-va permeabilizált, vad típusú Pgp-t expresszáló MDCK MDR1 sejtek jelölése 15D3-A647 és UIC2-A647 mAb-ekkel nukleotid-mentes körülmények között (kontroll) és 5 mM AMP-PNP/Mg²⁺ jelenlétében. Az antitestekkel történő festődést piros, a permeabilizálódott sejtek magjaihoz kötődött propidium jodidot pedig kék szín jelzi. Skála: 20 µm.

Az előzőekben láthattuk, hogy a nem-hidrolizálódó nukleotid analóg, az AMP-PNP kötődése a Pgp-t alacsony szubsztrátaffinitású konformációban stabilizálja. Ezután arra is kíváncsiak voltunk, hogy ez a konformációváltozás detektálható-e az UIC2 mAb-tel. A kísérletek során az MDCK MDR1 vad típusú Pgp-t expresszáló sejteket permeabilizáltunk SLO-val, majd kimostuk belőlük a nukleotidokat. Nukleotidok hiányában intenzív UIC2 jelölődést tapasztaltunk a plazmamembránban, ugyanakkor AMP-PNP jelenlétében a 15D3-A647 mAb-tel ellentétben az UIC2-A647 nem jelölte a Pgp-eket, jelezve, hogy olyan konformációváltozás következett be, mely során megszűnt az UIC2 komplex epitópja (**21. ábra**).

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

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

4.9. Az *in vivo* egérkísérletek során követett kísérleti stratégia

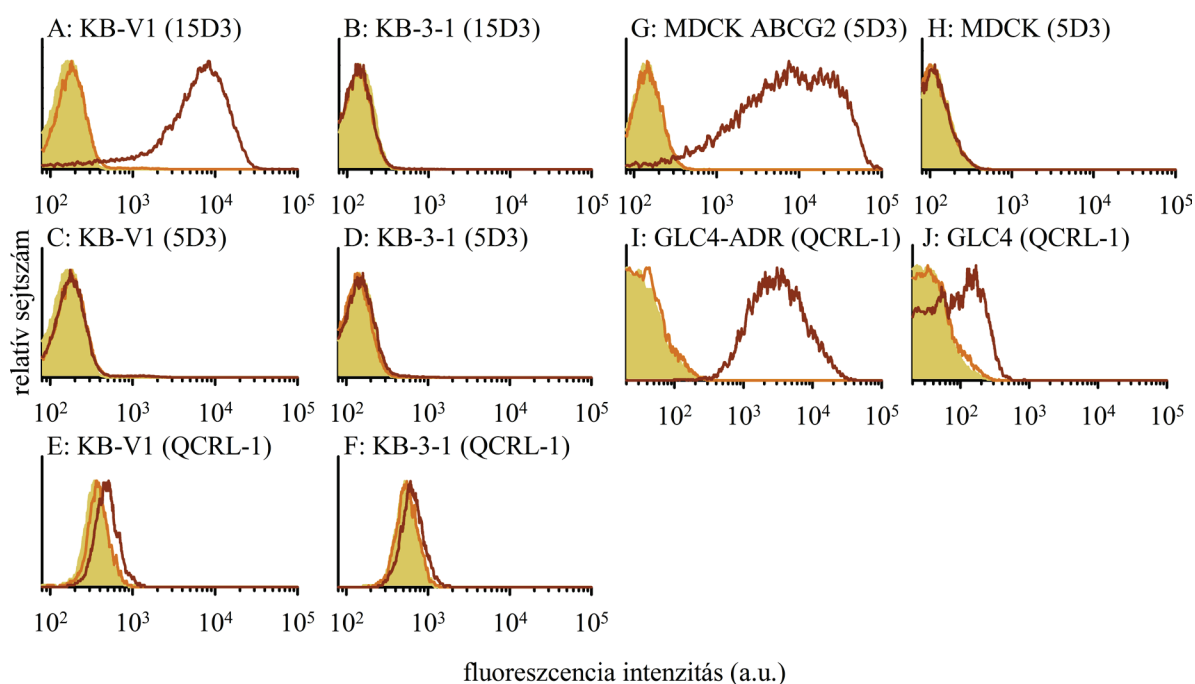


22. ábra A kísérletek során követett stratégia folyamatábrája.

A kombinált UIC2-CsA-DOX kezelés hatásainak *in vitro* és *in vivo* vizsgálatára a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat és annak vinblasztinnal szelektált szubklónját, a KB-V1 sejtvonalat használtuk. A kísérletek során elsőként megvizsgáltuk, hogy a kiválasztott sejtvonal 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 s.c. injektáltuk, majd négy nap elteltével az állatokat DOX-szal, UIC2-vel, CsA-val, illetve ezek kombinációival kezeltük. Mivel a tizenkettedik napra már tapintható tumorok fejlődtek a kezeltlen egerekben, a kísérletet ezen a napon termináltuk. Megmértük az egerekből eltávolított tumorok tömegét, és összevetettük a tumorok mRNS szintű Pgp expresszióját a kiindulási sejtekéivel. A kísérletek során követett stratégiát a **22. ábra** szemlélteti.

4.10. A KB-V1 sejtek magas szinten expresszálják a Pgp-t

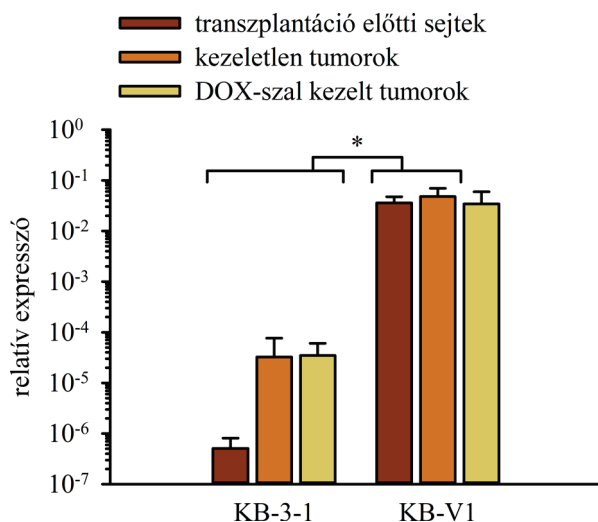
Az *in vivo* kísérletek megkezdése előtt, indirekt immunfluoreszcenciás jelölést követően áramlási citometriás módszerrel meghatároztuk mindkét alkalmazott sejtvonal esetében a leggyakrabban multidrog rezisztenciát okozó ABC transzporterek (Pgp, ABCG2 és MRP1)



23. ábra A KB-V1 (A, C, E) és KB-3-1 (B, D, F) sejtvonalak Pgp, ABCG2 és MRP1 expressziójának áramlási citometriás vizsgálata. A kísérletek során indirekt immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk CFL647 fluorofórral konjugált GaMigG felhasználásával. A Pgp-t 15D3 mAt-vel, az ABCG2-t 5D3 mAt-vel, az MRP1-et pedig QCRL-3 mAt-vel jelöltük. Az okkersárga kitöltött histogramok a sejtek autofluoreszcenciáját, a narancs histogrammok a csak másodlagos antitesttel kezelt mintákat, míg a barna histogrammok az elsődleges és másodlagos antitesttel kezelt mintákat jelölik. Az ABCG2-t expresszáló MDCK ABCG2 (G) és az MRP1-et expresszáló GLC4-ADR (I) sejtvonalakat, illetve ezek nem expresszáló párjait (H és J) kontrollként használtuk.

expressziós szintjét. A KB-3-1 sejtekben nem volt kimutatható a Pgp, míg a KB-V1 sejtekben magas Pgp expressziót mértünk (23. *ábra A és B*). Ugyanakkor a részben átfedő szubsztrátspektrumú multidrog transzporterek, az ABCG2 és az MRP1 jelenléte nem volt kimutatható sem a KB-3-1, sem a KB-V1 sejtekben (23. *ábra C-F*). Ezek alapján a KB-3-1 és KB-V1 sejtvonalak ideálisnak mutatkoztak a további kísérletekhez.

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

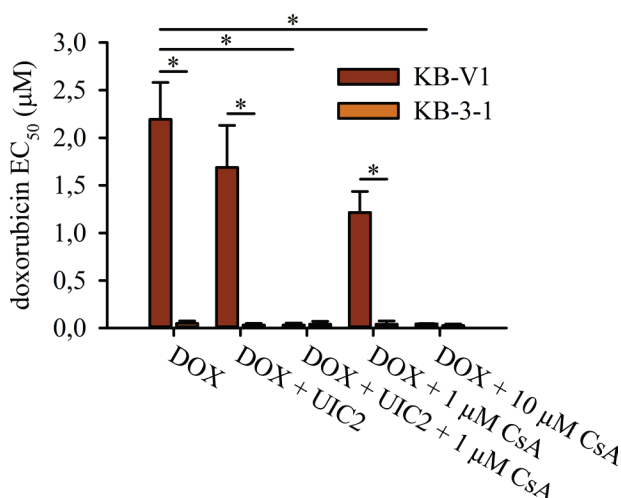


24. *ábra* A Pgp mRNA szintű expressziója a KB-V1 és KB-3-1 eredetű tumorokban és a xenotranszplantációhoz használt sejtekben. A Pgp expressziós szintjét a GAPDH szintjéhez viszonyítottuk (átlagok $\pm$ SD, n=5).

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 mRNA expresszióját RT-qPCR technikával határoztuk meg. A KB-V1 sejtekben és a belőlük kifejlődött tumorokban hasonló mértékű Pgp mRNA expressziót detektáltunk, mely legalább három nagyságrenddel magasabb a KB-3-1 tumorokhoz képest. Érdekes módon a KB-3-1 tumorokban a Pgp mRNA 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 (24. *ábra*).

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 dózisú CsA-val kombinációban használni visszaállítani a Pgp⁺ sejtek doxorubicin érzékenységét a Pgp⁻ sejtek szintjére

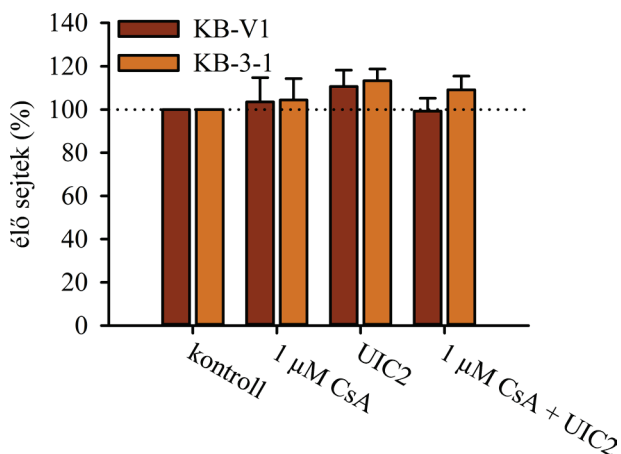


25. ábra A doxorubicin citotoxikus hatásának változása UIC2 antitest, CsA, illetve ezek együttes alkalmazásakor KB-V1 (Pgp⁺, barna színű oszlopok) és KB-3-1 (Pgp⁻, narancsszínű oszlopok) sejtek esetében. Az EC₅₀ értékeket a megfelelő dózis-hatás görbék alapján határoztuk meg. Az ábrázolt értékek három független mérésből származó átlagok (± SD). *: P<0,05

Gátlási stratégiánk és a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpár tesztelésére először *in vitro* citotoxicitási tesztek végeztünk. Összhangban magas Pgp expressziós szintjünkkel a KB-V1 sejtek rezisztensek a Pgp szubsztrát doxorubicinre (DOX). A DOX félhatásos dózisa a KB-V1 sejtek esetében 2,19±0,39 μM, míg a Pgp⁻ KB-3-1 sejtek esetében mindössze 44±3 nM. A KB-V1 sejtekben a CsA kezelés koncentrációfüggő 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 μM

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±19,7 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 (25. ábra).

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



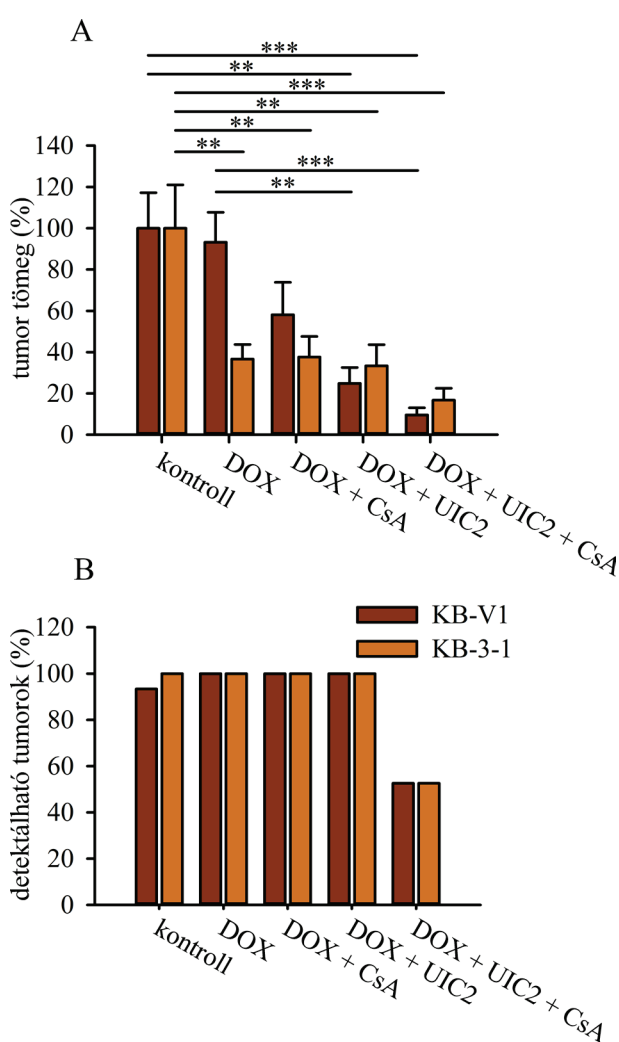
26. ábra Az UIC2 mAb és CsA kezelés hatása a KB-V1 (barna oszlopok) és a KB-3-1 (narancs oszlopok) sejtek *in vitro* életképességére. Az élő sejtek százalékos arányát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrázolt értékek három független mérésből származó átlagok (± SD).

Megvizsgáltuk, hogy az UIC2 vagy a CsA, illetve ezek kombinációja DOX nélkül alkalmazva befolyásolja-e a sejtek életképességét *in vitro* kísérletekben. Ahogy az a 26. ábrán látható, 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 fejt ki hatását [167].

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 dózisú CsA és UIC2 mAt kezeléssel kombinálva képes-e gátolni a DOX a SCID egerekbe xenotranszplantált Pgp⁺ KB-V1 sejtekből kialakuló tumorok növekedését.



27. ábra A DOX kezelés hatása UIC2 mAt-tel és/vagy kis dózisú CsA-val kombinációban a tumorok tömegére (A), és a detektálható tumorok aránya a különböző csoportokban (B). A tumorok tömegét a kezeletlen állatokból eltávolított tumorok átlagos tömegének százalékában fejeztük ki (átlagok $\pm$ SEM, $n=8$). A statisztikailag szignifikáns különbségeket a kezeletlen kontrollokhoz, illetve a csak DOX-szal kezelt csoporthoz viszonyítva a következőképpen jelöltük: *: $P<0,05$; **: $P<0,01$; ***: $P<0,001$. Barna oszlopok: KB-V1; narancs oszlopok: KB-3-1.

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. Ahogy az a **27. ábra A** részén is látható, 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 kisebb

volt, 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 tumorokhoz képest, 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 (**27. ábra B**), 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 (**25. ábra**) az *in vivo* kísérletekben a DOX-UIC2 kombinált kezelés is csökkentette a KB-V1 tumorok növekedését (**27. ábra A**) 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.

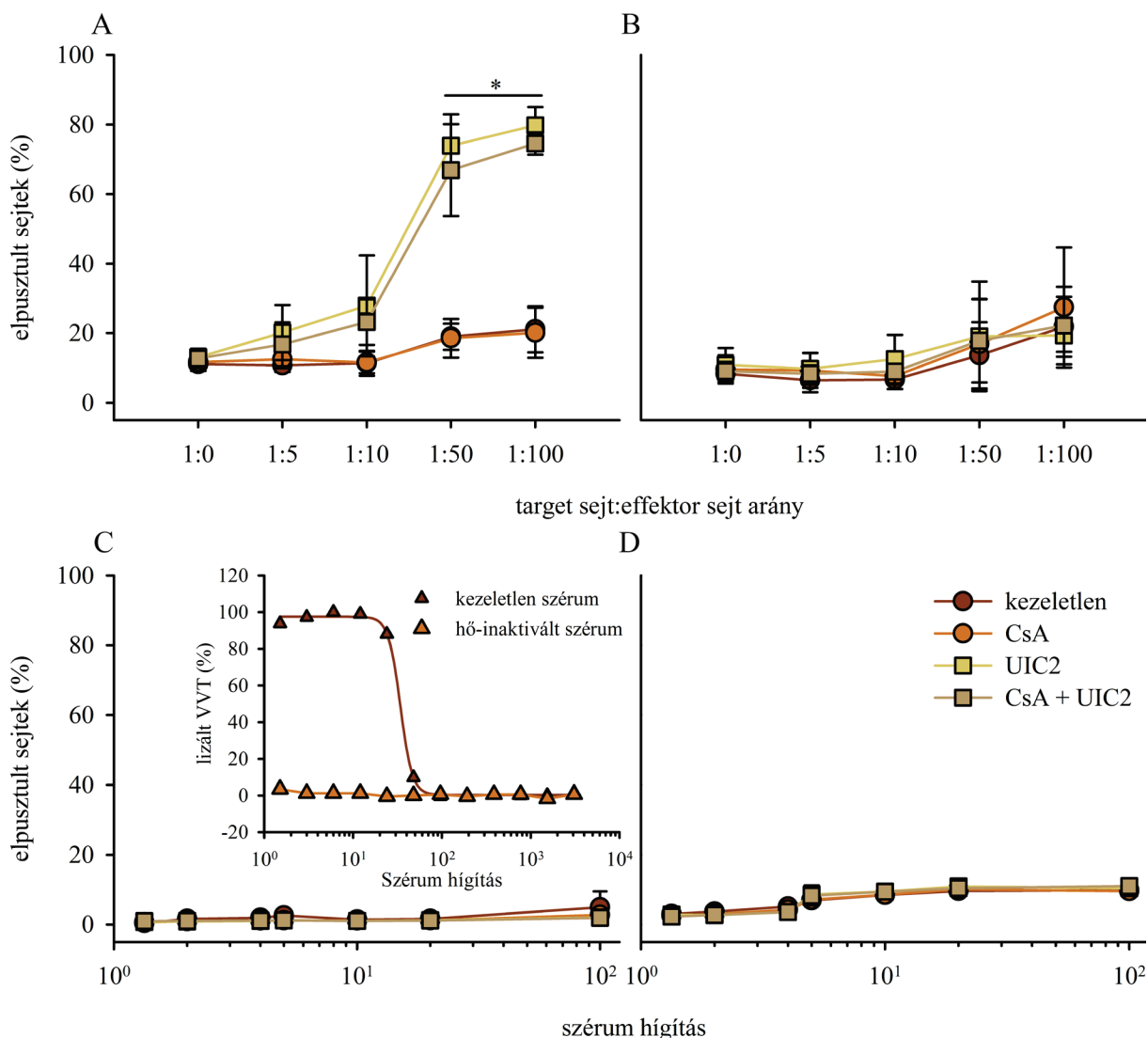
4.14. Az UIC2 antitest képes ADCC-t indukálni *in vitro*

Mivel felmerült, hogy az UIC2-vel kezelt tumorok növekedésének gátlásában a Pgp gátlása mellett immunológiai folyamatok is szerepet játszhattak, megvizsgáltuk, hogy az UIC2 mAt képes-e ellenanyagfüggő 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 tesztjeink 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 (**27. ábra A és B**).

Ugyanakkor *in vitro* CDC kísérleteinkben nem tapasztaltunk kimutatható komplement általi sejtлизist sem a KB-V1, sem a KB-3-1 sejtek esetében (**28. ábra C és D**), annak ellenére, hogy a használt szérumok a kontroll kísérletben az elvárásoknak megfelelő hemolitikus aktivitással rendelkeztek (**28. ábra C inzert**).

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



28. ábra Az UIC2 mAb által okozott in vitro ellenanyagfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC, A és B panelek), illetve komplement közvetített lízis (CDC, C és D panelek). Az ADCC mérések során a CFDA-SE-vel jelölt KB-V1 (A) és KB-3-1 (B) sejteket (target sejtek) kevertünk össze perifériás vérből frissen izolált PBMC-vel (effektor sejtek) különböző arányban. A szuszpenziók tartalmaztak még 10 μ M CsA-t (narancs kör), 20 μ g/ml UIC2-t (okker négyzet), illetve ezek keverékét (szürke négyzet). Nyolc óra 37 °C-os inkubálást követően a sejteket propidium-jodiddal festettük, majd áramlási citométerrel meghatároztuk az elpusztult target sejtek arányát. A CDC mérés során a target sejteket (C: KB-V1 sejtek, D: KB-3-1 sejtek) humán vészérum különböző hígításaival inkubáltuk együtt 37 °C-on négy órán keresztül, majd propidium-jodidos festéssel határoztuk meg az elpusztult sejtek arányát. A szérum aktivitását hemolitikus hatásának mérésével határoztuk meg (C panel inzertje). Szenzitivizált birka vörösvértesteket inkubáltunk együtt kezeletlen (barna háromszög), illetve hő-inaktivált (narancs háromszög) szérummal, majd a permeabilizált vörösvértestekből felszabaduló hemoglobint kvantitáltuk. Az ábrázolt értékek négy független mérésből származó átlagok $\pm$ SD. ***: $P < 0,001$

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 tisztázottak.

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 a 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 [179]. 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, 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 IC oldalról nyitott konformációjából az EC oldalról nyitott konformációba (**21. ábra**), melyet a Pgp szubsztrátaffinitásának csökkenése is kísér (**19. ábra** illetve **20. ábra** és **5. kiegészítő ábra**). Tehát a Pgp szubsztrátaffinitásának csökkenése mindenképpen megelőzi az ATP hidrolízisét.

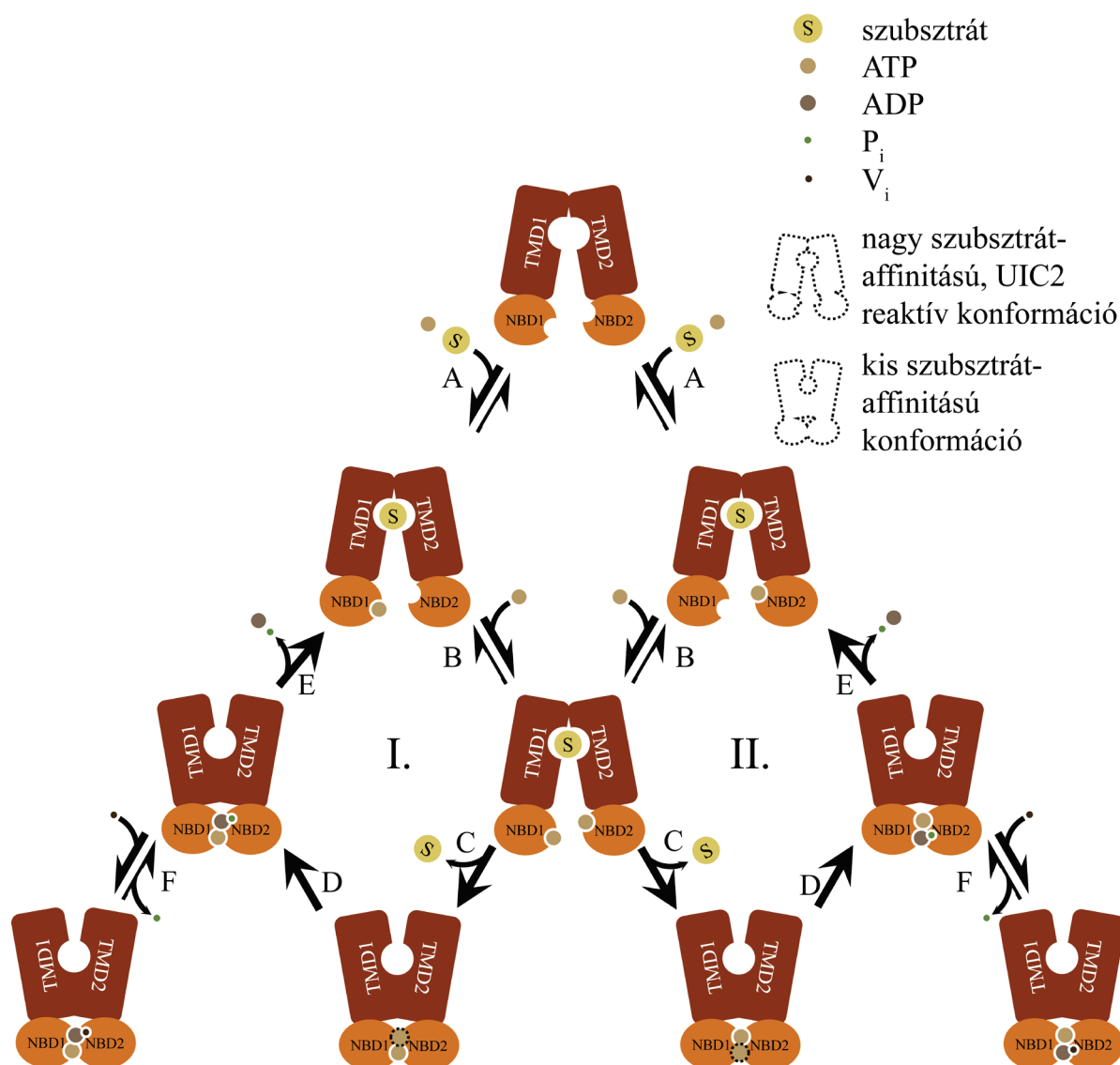
Eredményeinket alátámasztják munkánk megjelenést követően egy másik munkacsoport által publikált Cryo-EM technikával végzett szerkezetvizsgálaton és molekula modellezésen alapuló adatok is [180].

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. Számos ABC transzporterben a konzervált Walker A szekvenciák egyik vagy mindkét ATP-kötő helyben előidézett mutációja az ATPáz aktivitás megszűnését, vagy drasztikus csökkenését okozta [135, 181-185]. 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 [127, 186, 187].

Kísérleteink megerősítették, hogy a Pgp mindkét oldali Walker A lizinjének egyidejű mutációja teljesen inaktíválja a fehérjét (**10. ábra** és **11. ábra**), az UIC2 reaktív IC oldalról nyitott konformációban csapdázva (**12. ábra**), melynek nagy a szubsztrátaffinitása (**17. ábra**). Érdekes módon azonban, ha csak az egyik NBD lizinjét 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 (**12. ábra**), melynek során a fehérjék szubsztrátaffinitása is lecsökken (**17. ábra**). 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 azok a megfigyeléseink is, hogy az egyoldali mutáns Pgp-knek alacsony, de mérhető szubsztráttal stimulálható ATPáz aktivitása van ([188] S2 kiegészítő ábrája), és enyhe drogrezisztenciát is kölcsönöznek az őket kifejező sejteknek ([188] S4 kiegészítő ábrája). Drog transzport kísérleteink alapján ezek a féloldali Walker A mutánsok a vad típusú fehérjéhez képest kb. 10-15 %-os „maradék” transzportaktivitással rendelkeznek (**10. ábra** és **11. ábra**), 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 (pl. az UIC2 csak indirekt módon detektálja az NDB-k dimerizációját), meg kell jegyeznünk, hogy azoknak a kísérleteknek a többségében, melyek során a féloldali mutánsokat működésképtelennek

találtak, heterológ expressziós rendszereket (pl. Sf9 sejteket [135, 189], vagy *Saccharomyces cerevisiae*-t [190]), vagy tisztított és rekonstituált fehérjét használtak [183, 190, 191]. Ismert, hogy a plazmamembrán összetétele befolyásolja az ABC fehérjék aktivitását [192], illetve, hogy a membrán koleszterintartalma befolyásolja a Pgp működését [193]. Mivel a membrán koleszterintartalma jelentősen kisebb az alacsonyabb rendű eukariótákban [192, 194], így feltételezhetően ez lehetett az oka, hogy a heterológ expressziós rendszerekben nem tudták



29. ábra A Pgp munkacsoportunk által feltételezett katalitikus ciklusa: az intracelluláris tér felé nyitott ATP-mentes, vagy csak egy ATP-t kötött Pgp nagy affinitással képes megkötni a szubsztrátjait. Ha a Pgp mindkét NBD-je ATP-t köt (B), az NBD-k szendvics dimert formálnak, mely kiváltja a TMD-k átrendeződését az extracelluláris tér felé nyitott konformációba, és a drog kötőhely szubsztrát affinitásának lecsökkenését, mely lehetővé teszi a szubsztrát disszociációját. Ezt követően valamelyik ATP elköteleződik a hidrolízisre (C). Attól függően, hogy a hidrolizálódó ATP (pontozott vonallal jelölve) az NBS1-hez vagy NBS2-höz kötődik, különíthetjük el az I. és II. ciklust. Az, hogy melyik ciklus játszódik le, véletlenszerűen dől el, és az I. és II. ciklus nem szigorúan váltakozva követi egymást. Az ATP hidrolízisét (D) követően V_i jelenlétében kialakulhat a Pgp-ADP- V_i komplex (F), illetve a hidrolízis során keletkező P_i és ADP disszociációját követően (E) regenerálódik a kiindulási állapot, és a fehérje újra kész a szubsztrát megkötésére, majd transzportjára.

detektálni az egyoldali Walker A mutánsok igen alacsony ATPáz aktivitását. Más esetekben a fehérje szolubilizálása és rekonstitúciója is okozhatott aktivitásvesztést [109].

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 [79, 129]. 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 (**29. ábra**).

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 [167, 168]. 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 [166]. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy *in vivo* körülmények között az UIC2 antitest kombinált adása fokozza-e a citosztatikum terápia hatásosságát.

SCID egerekbe xenotranszplantált multidrog rezisztens tumorokon vizsgáltuk, hogy az UIC2 mAt és a kis dózisu CsA kombinációja *in vivo* fokozza-e a DOX tumorellenes hatását. A kísérleteinkben az egerekbe xenotranszplantált KB-V1 sejtek magas szinten expresszálták a Pgp-t, ugyanakkor nem fejezték ki detektálható szinten sem az MRP1-et, sem az ABCG2-t (**23. ábra**), míg a kontrollként alkalmazott KB-3-1 sejtek rendkívül alacsony Pgp expressziót mutattak, mely a kísérletek végére sem növekedett jelentősen (**23. ábra** és **24. ábra**). A xenotranszplantált egerekben a KB sejtek gyors növekedési rátájának köszönhetően 10-12 nap elteltével jól tapintható, körülbelül 1 cm átmérőjű tumorok fejlődtek, melyek Pgp szubsztrátok

hiányában is megtartották magas Pgp expressziós szintjüket a kísérletek időtartama alatt (**24. ábra**).

A fenti *in vivo* modellrendszerben az UIC2 mAt és kis dózisú CsA kombinációja jól láthatóan fokozta a DOX tumor növekedést gátló hatását a KB-V1 tumorok esetében (**27. ábra A**). Ha az állatokat csak DOX-szal kezeltük, a KB-V1 tumorok mérete nem csökkent a kezeletlen kontroll állatokéhoz képest. Ezek az adatok összhangban vannak a munkacsoportunk által korábban publikált *in vitro* és *in vivo* drog akkumulációs adatokkal [167], és *in vitro* citotoxicitási kísérleteink eredményeivel (**25. ábra**). Azonban *in vivo* kísérleteinkben az UIC2 kezelés önmagában is fokozta a DOX tumor növekedést gátló hatását: az UIC2+DOX kombinációjával kezelt egerekben a tumorok átlagos tömege mindössze negyede volt a csak DOX-szal kezelt egerekből származó tumoroknak (**27. ábra A**). Ezzel szemben, az *in vitro* citotoxicitási kísérleteinkben az UIC2 mAt önmagában csak enyhén növelte a DOX citotoxikus hatását (**25. ábra**), mely azzal magyarázható, hogy CsA hiányában a sejtfelszíni Pgp-k csak kis hányada felismerhető az UIC2 számára, így a Pgp-k többsége funkcionális marad [167].

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 (vesd össze **25. ábra** és **27. ábra A**).

A SCID egerek, attól függetlenül, hogy adaptív immunrendszerük nem működik, rendelkeznek működő komplementrendszerrel, természetes ölősejtekkel és polimorfonukleáris sejtekkel [195]. 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 (**28. ábra**).

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, és éppen olyan esetekben alkalmazzák őket, amikor az effektor funkciók aktiválása felesleges vagy nemkívánatos [196].

Természetesen a szakirodalomban találunk arra példát, hogy IgG₂ izotípusú anti-Pgp antitestek, pl. az egérben termeltetett MRK16, és ennek egy egér-humán kiméra módosítása (MH162) daganatellenes és anti-metasztatikus hatását ADCC kiváltásával magyarázzák [197]. Emellett más célpont, így az epidermális növekedési faktor elleni IgG₂ antitest is képes volt monocitákon és neutrofil granulocitákon keresztül ADCC-t kiváltani [198], azok FcγRIIIa receptorán keresztül kötődve az antitesthez [199, 200]. Mivel az IgG₂ izotípusú antitestek NK sejteken keresztül nem indukálnak ADCC-t [198], így a mi kísérleteinkben, melyhez PBMC-eket használtunk, a sejtelhalásért a monociták voltak felelősek. Mivel a SCID egerek szintén rendelkeznek funkcionális monocitákkal [195], az általuk közvetített ADCC megmagyarázhatja *in vivo* eredményeinket.

Felmerül a kérdés, hogy a kombinált kezelések erős tumorellenes 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 a sejtfelszíni Pgp molekulák 20-40%-ának jelölődése elegendő a maximális ADCC hatás kiváltásához (**28. ábra**). 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 (**27. ábra A**), 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 daunorubicin (mely szintén Pgp szubsztrát) akkumuláció növekedést mértek a Pgp⁺ xenotranszplantált tumorokban [167]. Tehát *in vitro* és *in vivo* adataink alapján valószínűsíthető, hogy az UIC2+CsA+DOX-szal végzett kombinált kezelés jelentős tumorellenes hatása a Pgp gátlás és ADCC együttes eredménye.

Az ADCC már viszonylag kis receptorszám, és alacsony mértékű antitestkötődés mellett is kiváltható [198, 201]. Így a KB-3-1 tumorok esetében a kiindulási sejtekhez képest mért 60-szoros Pgp expresszió növekedés (lásd **24. ábra**) 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 (**27. ábra B**).

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 [167] és a Pgp⁺ A2780 petefészekrák [168] 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 gátolhatóságában is. Másrészt 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 expresszáldó Pgp molekulákat is gátolhatja, vagy akár ADCC révén kiválthatja a barrier régiókban a Pgp⁺ sejtek pusztulását. Például a vér-agy gátban expresszáldó 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 [148]). Ennek ellenére klinikai gyógyszereszek során az alkalmazott Pgp modulátorok nem okoztak központi idegrendszeri károsodást [202], 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 aktiválásért 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 [196].

Az UIC2 mAt nem kötődik az egér Pgp-hez [158], így a SCID egerekben nem tesztelhető, hogy a fiziológiásan expresszáldó 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 rezisztenciamechanizmussal vagy ezen mechanizmusok kombinációjával rendelkezik, ezért elengedhetetlen a daganatterápia személyre szabása, nemcsak a malignus transzformáció típusát és a tumor szöveti eredetét, hanem a kialakuló rezisztencia mechanizmusát is figyelembe véve [154]. Az általunk kidolgozott Pgp gátlási módszer a humanizált UIC2 antitest kifejlesztését követően gazdagíthatja a multidrog rezisztens tumorok kezelési stratégiáinak repertoárját.

6. 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 vizsgálataink 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.

7. Summary

- ❖ We have developed a fluorescence co-localization measurement based assay to detect the changes of the substrate affinity of Pgp upon distinct phases of its catalytic cycle. In addition, we adopted numerous fluorescence based techniques to measure the transport activity and conformation changes of Pgp. Using the mentioned assays we made the following statements regarding the catalytic mechanism of Pgp:
 - ❖ The conformation change of P-glycoprotein from the inward open, high substrate affinity state to the outward open, low substrate affinity conformation precedes the ATP hydrolysis.
 - ❖ The double Walker A mutant Pgp variant is catalytically inactive and trapped in the inward open, high substrate affinity conformation.
 - ❖ Single Walker A mutants have significant residual transport activity and thus they are capable of passing full transport cycles albeit with reduced efficiency.
- ❖ We designed an *in vivo* model system based on the xenotransplantation of Pgp-positive and Pgp-negative human tumors into SCID mice to test whether the combined treatment with low dose of CsA and UIC2 mAb can potentiate the anti-tumor effect of doxorubicin.
 - ❖ Our results demonstrated that the combined treatment significantly increased the sensitivity of the Pgp expressing tumors to doxorubicin and decreased the growth rate of the tumors at a clinically relevant extent.
 - ❖ We also concluded that antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) contributes to the anti-tumor effect of the combined treatment *in vivo*, besides Pgp inhibition.

8. Kiegészítő információk

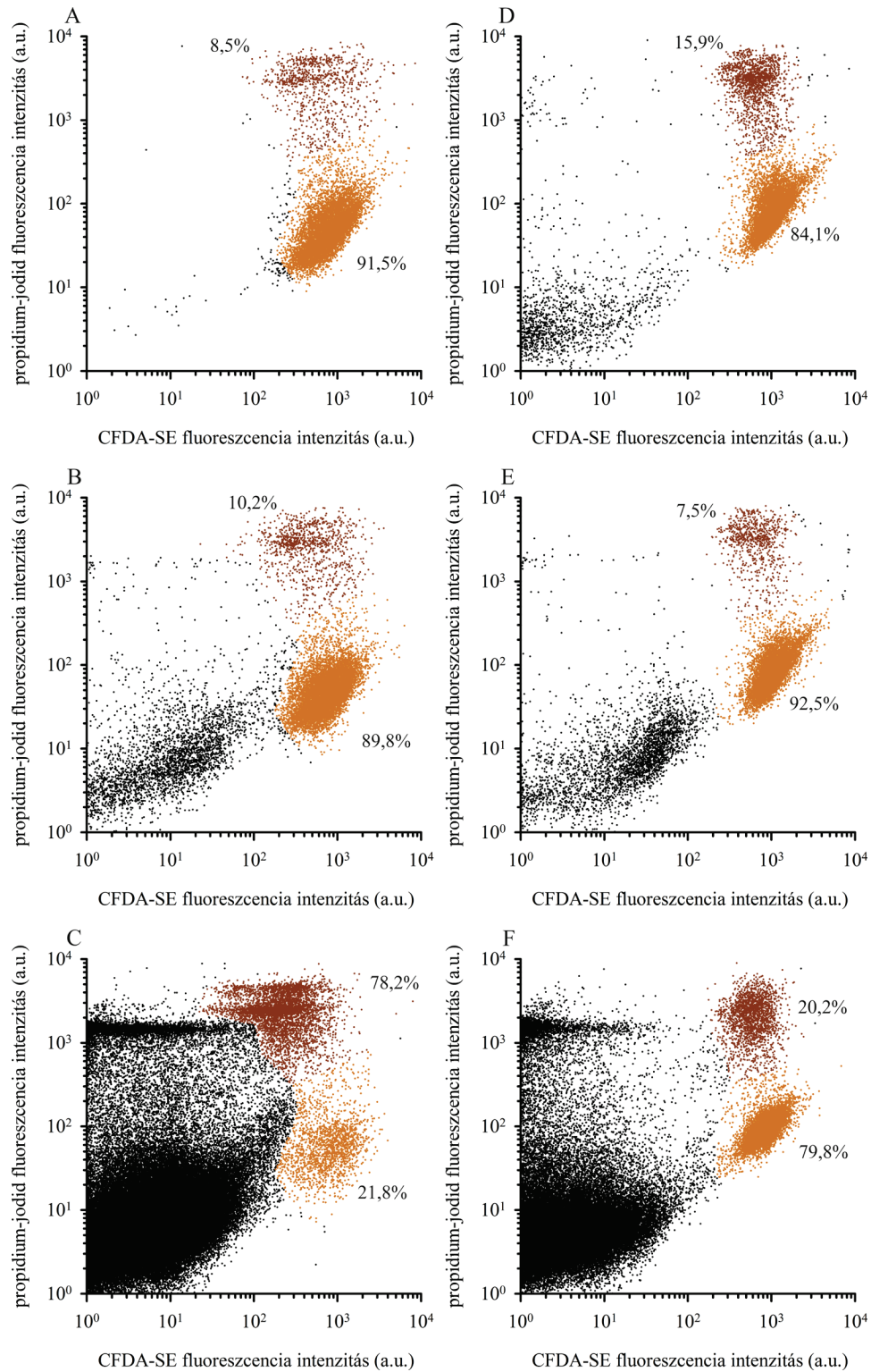
Gén	Egyéb ismert elnevezés	Fenotípus, betegség	Ismert funkció
ABCA1	CERP	Tangier-kór, Familiáris HDL deficiencia	koleszterin és foszfolipid transzport
ABCA3	ABC3, ABCC	surfactant deficiencia, tüdőfibrózis, veleszületett szürkehályog	foszfolipid transzport
ABCA4	ABCR	Stargardt-kór, retnitis pigmentosa, csap- és pálcikasejtek disztrófiája (CRD), időskori makula degeneráció (AMD)	
ABCA12		Harlequin és lamellás ichtiózis	
ABCA13		skizofrénia, bipoláris depresszió, depresszió	
ABCB1	Pgp, MDR1	multidrog rezisztencia (MDR)	xenobiotikum export
ABCB2	TAP1	Bechet-kór	antigén peptidek transzportja az ER-be
ABCB3	TAP2	Bechet-kór	antigén peptidek transzportja az ER-be
ABCB4	MDR3, PGY3	3-as típusú illetve terhességi intrahepatikus kolesztázis	foszfatidil-kolin szekréció az epébe
ABCB7	ABC7	szideroblasztos anémia és ataxia	FeSO ₄ komplexek transzportja a mitokondriumba
ABCB11	BSEP, SPGP	2-es típusú intrahepatikus kolesztázis, újszülöttkori distressz szindróma (IRDS, Infant Respiratory Distress Syndrome)	epesav export
ABCC11	MRP1	multidrog rezisztencia (MDR)	szerves anionok, glükuronidok és szulfátok exportja
ABCC2	MRP2, cMOAT	Dubin-Johnson szindróma	bilirubin export
ABCC5	MRP5	örökletes hypertrichosis	
ABCC6	MRP6	pseudoxanthoma elasticum	
ABCC7	CFTR	cisztikus fibrózis, pankreatitisz, bronchiectázia, kongenitális bilaterális vas deferens hiány	Cl ⁻ csatorna
ABCC8	SUR1	familiáris hiperinzulinémiás hipoglikémia	ATP-szenzitív K ⁺ -csatorna regulátor a pankreász β-sejtjeiben
ABCC9	SUR2	dilatatív kardiomiopátia ventrikuláris tachycardiával	
ABCC11		fokozott izzadás és fülzsír termelés	

ABCD1	ALDP	adrenoleukodisztrófia	zsírsavak peroxisómális transzportja
ABCD2	ALDR	adrenoleukodisztrófia	zsírsavak peroxisómális transzportja
ABCD3	PMP70	hepatosplenomegália; májbetegség	zsír- és epesavak peroxisómális transzportja
ABCD4	PMP69	veleszületett hiba a B12 vitamin metabolizmusban	
ABCG2	BCRP	MDR, köszvény	húgysav export
ABCG5		szitoszterolémia, koronária betegség, epekö	fitoszterolok exportja
ABCG8		szitoszterolémia, koronária betegség, epekö	fitoszterolok exportja

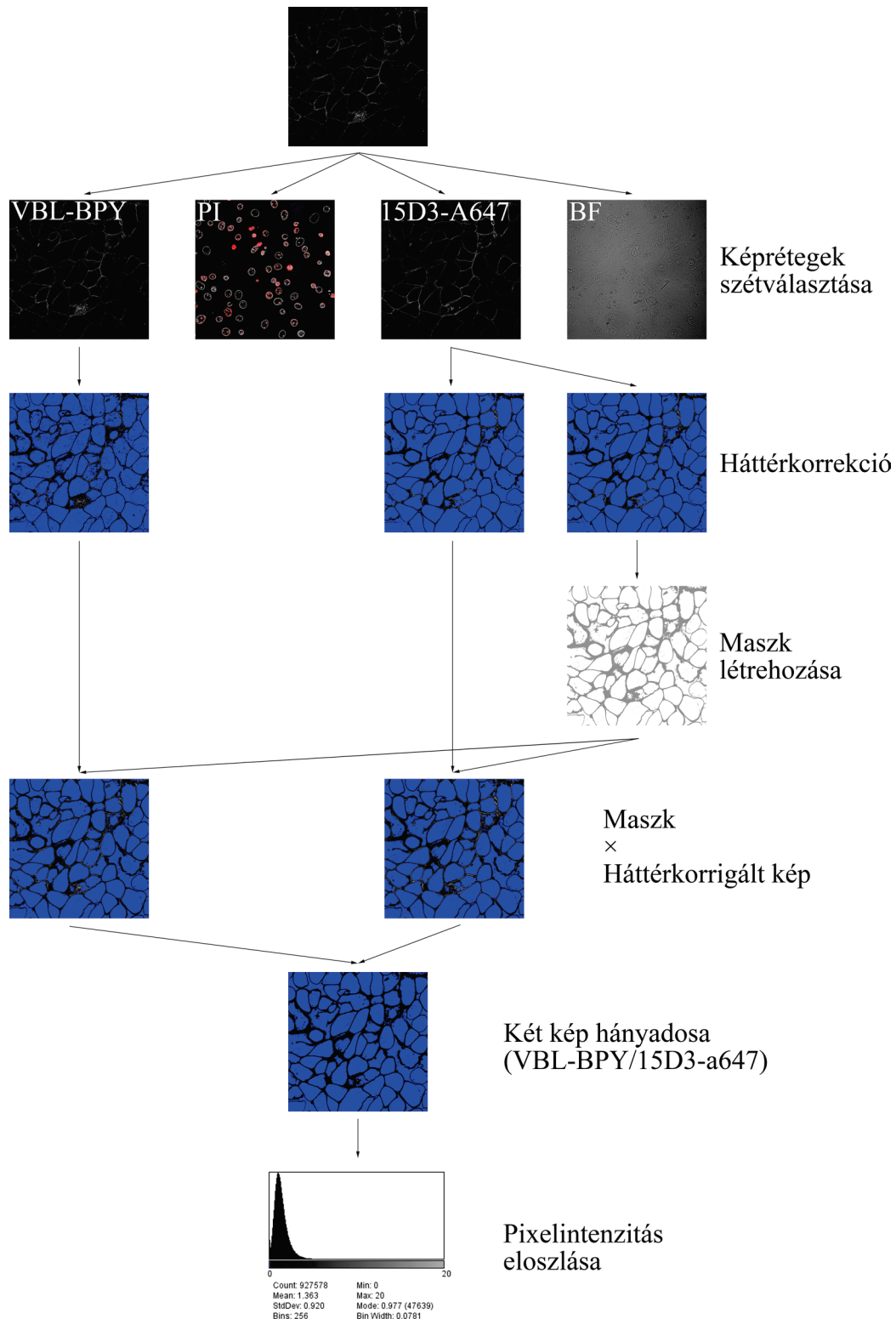
1. kiegészítő táblázat A humán ABC transzporterek rendellenes működéséhez vagy expressziójához kapcsolódó betegségek, tünetegyüttesek [57, 203-208].

Szubsztrátok	Inhibitorok	Stimulátorok
Aktinomicin D, Aldoszteron, ALLM peptid, ALLN peptid, Amitriptilin, Amprenavir, Atorvasztatin, β -amiloid, Bromperidol, Calcein-AM, Carbamazepin, Celiprolol, Kloropromazin, Clopidogrel, Cimetidin, Citalopram, Kolhicin, Kortikoszteron, Kortizol, Ciklosporin A, Daunorubicin, Dexametazon, Digoxin, Diltiazem, Docetaxel, Domperidon, Doxyciclin, Doxorubicin, Erytromicin, Etopozid, Fexofenadin, Grapefruit lé, Gramacidin D, Gramacidin S, Imatinib, Indinavir, Irinotecan, Itrakonazol, Ivermectin, Ketokonazol, Lamotrigin, Lanzoprazol, Levotiracetam, Levofloxacin, Loperamid, Lozartán, Lovasztatin, Melfalán, Metilprednizolon, Mevinolin, Mitomicin C, Mitoxantron, Morfin, Nelfinavir, Omeprazol, Ondansetron, Paklitaxel, Pantoprazol, Pentazocin, Fenobarbital, Fenothiazin, Fenitoin, Propanolol, Kinidin, Ranitidin, Rifampicin, Ritonavir, Szakvinavir, rövid szénláncú lipidek, Simvasztatin, Szirolimus, Sparfloxacin, Takrolimus, Talinolol, ^{99m} Tc-MIBI, Tenipozid, Terfenadin, Tetraciklin, Topotekán, Valspodar, Vekuronium, Verapamil, Vinblasztin, Vinkrisztin	Amiodaron, Amitriptilin, Aszemizol, Atorvasztatin, Bepridil, Birikodar, Bromokriptin, Karotinoidok, Karvedilol, Klórpromazin, Klaritromicin, Kobalamin, Kortizol, Cremophor EL, Kurkumin, Ciklosporin A, Dezipramin, Étrendkiegészítő antioxidánsok, Diltiazem, Dipyridamole, Diszulfirám, Elacridar, Erlotinib, Eritromicin, Felodipin, Fluoxetin, Flupentixol, Flufenazin, Gefitinib, Haloperidol, Indinavir, Itrakonazol, Ketokonazol, Laniquidar, Lanzoprazol, Leupeptin, Lonafernib, Maprotilin, Meflokin, Midazolam, Mifepriszton, Terészetes diterpének, Természetes tripterpének, Nelfinavir, Nikardipin, Nitrendipin, ONT-093, Omeprazol, Pantoprazol, Paroxetin, Pentazocin, Progeszteron, Propafenon, Kinidin, Kinin, Rezerpin, Ritonavir, Szakvinavir, Szertralin, Szimvasztatin, Szirolimus, Spironolakton, Takrolimus, Tamoxifen, Tarikvidar, Terfenadin, Tetrabenzine, Tokoferol, Valinomicin, Valspodar, Ortovanadát, Verapamil, Vinblasztin, XR9051, Zosuquidar	Amiodaron, Amprenavir, Bromokriptin, Klórambucil, Ciszplatin, Klotrimazol, Kolhicin, Ciklosporin A, Daunorubicin, Dexametazon, Diltiazem, Doxorubicin, Efavirenz, Erythromycin, Etoposide, FCME peptid, Fluorouracil, GGCM peptid, Hidroxiurea, Insulin, Indinavir, Metotrexát, Midazolam, Mitoxantron, Morfin, Nelfinavir, Nikardipin, Nifedipin, Fenitoin, Fenotiazin, Prenilciszteinek, Probenecid, Rezerpin, Retinsav, Rifampicin, Ritonavir, Szakvinavir, Orbáncfű, Takrolimus, Tamoxifen, Verapamil, Vinblasztin, Vinkrisztin, Johimbín

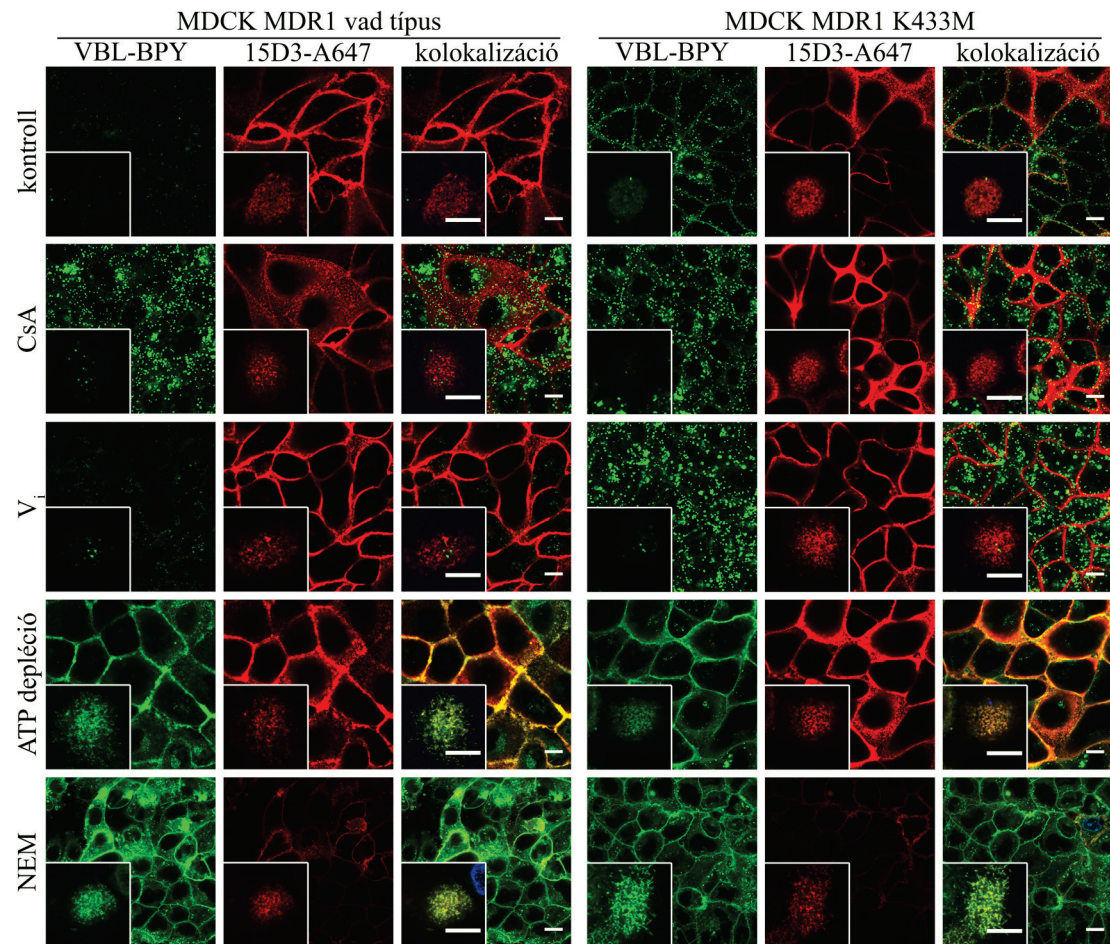
2. kiegészítő táblázat A Pgp szubsztrátjai, inhibitorai és stimulátorai Hodges és mtsai. alapján [209].



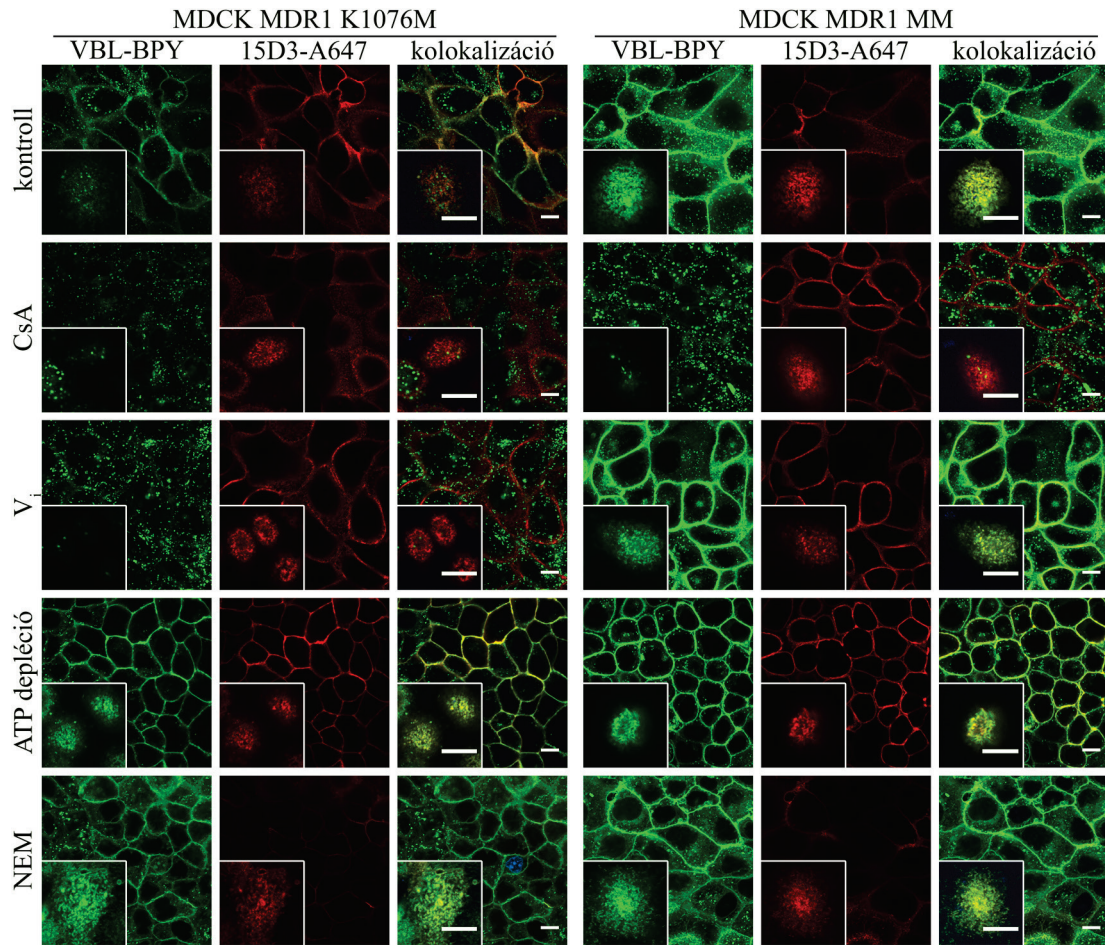
1. kiegészítő ábra: Az *in vitro* ADCC vizsgálatok menete és kiértékelése. A vizsgálatok során a KB-V1 (A, B, C) és KB-3-1 target sejteket (D, E, F) CFDA-SE festékkel jelöltük, majd frissen izolált PBMC-vel kevertük össze 1:5 (B, E) vagy 1:100 (C, F) arányban. A mintákat 8 órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd PI festést követően áramlási citométerrel mértük. A dot plotokon a PI és a CFDA-SE fluoreszcencia intenzitása látható. A barnával jelölt magas CFDA-SE és PI fluoreszcenciát mutató sejtek az elpusztult target sejtek, a narancsszínnel jelölt alpopuláció az élő target sejteket jelöli, míg az alacsony CFDA-SE fluoreszcenciát mutató sejtek (fekete alpopuláció) pedig az effektor sejtek.



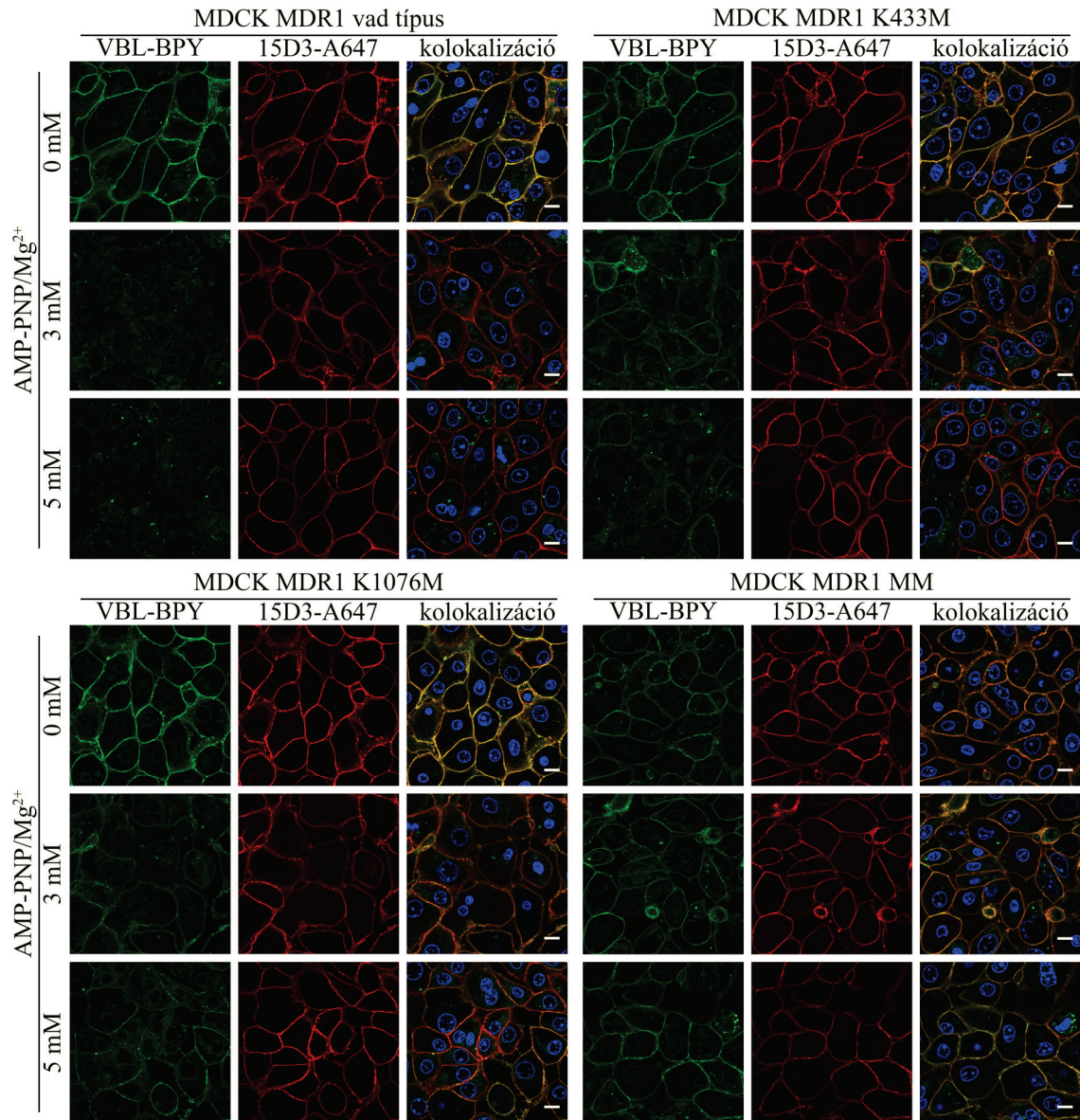
2. kiegészítő ábra A permeabilizált sejtekről készült konfokális mikroszkópos felvételek kiértékelésének sémája. A stack felvételben lévő képrétegek elválasztását (jobb felső sarkokban jelöltük, mely fluorofór csatornájáról van szó) követően kivontuk a háttérrel, majd a 15D3-A647 csatorna egy képének az egyik másolatáról olyan maszkot hoztunk létre, melyben a membránt reprezentáló pixelek intenzitása egy, a többi nulla. Ennek a maszknak és egy VBL-BPY illetve a 15D3-A647 csatorna képének a szorzatában csak olyan pixelek tartalmaztak nullától különböző intenzitást, melyek a membránt reprezentálják. Ezt követően a két csatorna képének a hányadosát képeztük, melyben a pixelek intenzitása 0 és kb. 20 (max) között változott, majd a pixelek [0, max] intervallumon értelmezett eloszlásának középértékét használtuk a további számításokhoz.



3. kiegészítő ábra: Vad típusú és K433M mutáns Pgp-eket expresszáló MDCK sejtek jelölése 100 nM VBL-BPY-vel (zöld) és 30 µg/ml 15D3-A647 antitesttel (piros), modulátor nélküli médiummal (kontroll), illetve 10 µM CsA-val, 2 mM nátrium-ortovanadáttal (V_i), 50 µM NEM-mel történő előkezelést, vagy a sejtek ATP deplécióját (8 mM 2-dezoxi-glükóz és 10 mM NaN_3 keverékével) követően. Az előkezelés és a jelölés is 30 percig tartott 37 °C-on. Az elpusztult sejteket PI-s jelölés alapján különböztettük meg (kék sejtmagok) és kizártuk az analízisből. Skála: 10 µm.



4. kiegészítő ábra: K1076M és dupla-mutáns Pgp-eket expresszáló MDCK sejtek jelölése 100 nM VBL-BPY-vel (zöld) és 30 µg/ml 15D3-A647 antitesttel (piros), modulátor nélküli médiummal (kontroll), illetve 10 µM CsA-val, 2 mM nátrium-ortovanadáttal (V_i), 50 µM NEM-mel történő előkezelést vagy a sejtek ATP deplécióját (8 mM 2-dezoxi-glükóz és 10 mM NaN₃ keverékével) követően. Az előkezelés és a jelölés is 30 percig tartott 37 °C-on. Az elpusztult sejteket PI-s jelölés alapján különböztettük meg (kék sejtmagok) és kizártuk az analízisből. Skála: 10 µm.



5. kiegészítő ábra: Különböző koncentrációjú AMP-PNP kezelés hatása az SLO-val permeabilizált, különböző Pgp variánsokat expresszáló MDCK sejtek VBL-BPY jelölődésére. A sejteket 30 percig kezeltük az ábrán jelölt koncentrációban alkalmazott AMP-PNP/Mg²⁺-mal, majd 100 nM VBL-BPY-vel (zöld) és 30 µg/ml 15D3-A647-tel (piros) festettük. Kiértékelés során a permeabilizálódott sejteket használtuk, melyek magja jól jelölődött PI-vel (kék). Skála: 10 µm.

Felhasznált irodalom

1. Nooter, K., Stoter, G.: Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathol Res Pract*, 192 (7), 768-80. 1996.
2. Leith, C. P., Kopecky, K. J., Chen, I. M., Eijdem, L., Slovak, M. L., McConnell, T. S., Head, D. R., Weick, J., Grever, M. R., Appelbaum, F. R., Willman, C. L.: Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, 94 (3), 1086-99. 1999.
3. Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J. Y., Chaoui, D., Marie, J. P., Legrand, O.: Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res*, 10 (23), 7896-902. 2004.
4. Bernaudin, J. F., Fajac, A., Fleury-Feith, J., Kerrou, K., Lacave, R., *ABC Proteins and Oncology: Expression, Detection, and Implication of ABC Proteins in Solid Tumors*, in *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 143-176.
5. Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S. L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G. M., et al.: Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 81 (2), 116-24. 1989.
6. Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., Pastan, I.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (1), 265-9. 1987.
7. Biedler, J. L., Riehm, H.: Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*, 30 (4), 1174-84. 1970.
8. Dano, K.: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 323 (3), 466-83. 1973.
9. Beck, W. T., Cirtain, M. C., Lefko, J. L.: Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Mol Pharmacol*, 24 (3), 485-92. 1983.
10. Skovsgaard, T.: Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res*, 38 (6), 1785-91. 1978.
11. Ling, V., Thompson, L. H.: Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol*, 83 (1), 103-16. 1974.

12. See, Y. P., Carlsen, S. A., Till, J. E., Ling, V.: Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide. *Biochim Biophys Acta*, 373 (2), 242-52. 1974.
13. Carlsen, S. A., Till, J. E., Ling, V.: Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 455 (3), 900-12. 1976.
14. Juliano, R. L., Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455 (1), 152-62. 1976.
15. Riordan, J. R., Ling, V.: Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem*, 254 (24), 12701-5. 1979.
16. Beck, W. T., Mueller, T. J., Tanzer, L. R.: Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res*, 39 (6 Pt 1), 2070-6. 1979.
17. Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., Ling, V.: Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316 (6031), 820-3. 1985.
18. Kartner, N., Riordan, J. R., Ling, V.: Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221 (4617), 1285-8. 1983.
19. Bell, D. R., Gerlach, J. H., Kartner, N., Buick, R. N., Ling, V.: Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol*, 3 (3), 311-5. 1985.
20. Robertson, S. M., Ling, V., Stanners, C. P.: Co-amplification of double minute chromosomes, multiple drug resistance, and cell surface P-glycoprotein in DNA-mediated transformants of mouse cells. *Mol Cell Biol*, 4 (3), 500-6. 1984.
21. Roninson, I. B., Abelson, H. T., Housman, D. E., Howell, N., Varshavsky, A.: Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. *Nature*, 309 (5969), 626-8. 1984.
22. Caizzi, R., Bostock, C. J.: Gene amplification in methotrexate-resistant mouse cells. IV. Different DNA sequences are amplified in different resistant lines. *Nucleic Acids Res*, 10 (21), 6597-618. 1982.
23. Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., Pastan, I.: Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (12), 4538-42. 1986.

24. Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I., Gottesman, M. M.: Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science*, 232 (4750), 643-5. 1986.
25. Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., Riordan, J. R.: The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 141 (3), 956-62. 1986.
26. Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., Pastan, I.: Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (9), 3004-8. 1987.
27. Gros, P., Ben Neriah, Y. B., Croop, J. M., Housman, D. E.: Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 323 (6090), 728-31. 1986.
28. Gerlach, J. H., Endicott, J. A., Juranka, P. F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. L., Ling, V.: Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, 324 (6096), 485-9. 1986.
29. Gros, P., Croop, J., Housman, D.: Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47 (3), 371-80. 1986.
30. Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., Roninson, I. B.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47 (3), 381-9. 1986.
31. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Whalley, K., Jamieson, D. J.: Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *EMBO J*, 4 (4), 1033-9. 1985.
32. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J.: Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1 (8), 945-51. 1982.
33. Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F.: Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346 (6282), 362-5. 1990.
34. Higgins, C. F., Hyde, S. C., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Gill, D. R., Gallagher, M. P.: Binding protein-dependent transport systems. *J Bioenerg Biomembr*, 22 (4), 571-92. 1990.

35. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., et al.: A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323 (6087), 448-50. 1986.
36. Albers, S. V., Koning, S. M., Konings, W. N., Driessen, A. J.: Insights into ABC transport in archaea. *J Bioenerg Biomembr*, 36 (1), 5-15. 2004.
37. Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J.: Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (2), 317-64. 2008.
38. Dassa, E., *Chapter 1 - Phylogenetic and functional classification of abc (atp-binding cassette) systems**, in *ABC Proteins*. 2003, Academic Press: London. p. 3-35.
39. Dassa, E.: Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem*, 50 (1), 19-42. 2011.
40. Ambudkar, S. V., Kim, I. W., Xia, D., Sauna, Z. E.: The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett*, 580 (4), 1049-55. 2006.
41. Bolhuis, H., van Veen, H. W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A. J., Konings, W. N.: Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J*, 15 (16), 4239-45. 1996.
42. Velamakanni, S., Yao, Y., Gutmann, D. A., van Veen, H. W.: Multidrug transport by the ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 47 (35), 9300-8. 2008.
43. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, D. D.: A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (26), 15665-70. 1998.
44. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R. G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258 (5088), 1650-4. 1992.
45. Kerr, I. D.: Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 315 (1), 166-73. 2004.

46. Borths, E. L., Poolman, B., Hvarup, R. N., Locher, K. P., Rees, D. C.: In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake. *Biochemistry*, 44 (49), 16301-9. 2005.
47. Mourez, M., Jehanno, M., Schneider, E., Dassa, E.: In vitro interaction between components of the inner membrane complex of the maltose ABC transporter of *Escherichia coli*: modulation by ATP. *Mol Microbiol*, 30 (2), 353-63. 1998.
48. Michalet, S., Dijoux-Franca, M.-G., *ABC Transporters and Resistance to Antibiotics*, in *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 177-193.
49. Farooq, U., Mahajan, R. C.: Drug resistance in malaria. *J Vector Borne Dis*, 41 (3-4), 45-53. 2004.
50. Bates, S. E., *Chapter 18 - Solving the Problem of Multidrug Resistance: ABC Transporters in Clinical Oncology*, in *ABC Proteins*. 2003, Academic Press: London. p. 359-391.
51. Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., Norris, M. D.: ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*, 10 (2), 147-56. 2010.
52. Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G.: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 42 (7), 1007-17. 2001.
53. Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R.: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11 (7), 1156-66. 2001.
54. Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D. W.: Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3 (3), 281-90. 2009.
55. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245 (4922), 1066-73. 1989.
56. Gribble, F. M., Tucker, S. J., Ashcroft, F. M.: The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J*, 16 (6), 1145-52. 1997.
57. Alexander, S. P., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J. A., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., Collaborators, C.: The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Transporters. *Br J Pharmacol*, 172 (24), 6110-202. 2015.

58. Sheppard, D. N., Welsh, M. J.: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, 79 (1 Suppl), S23-45. 1999.
59. He, S. M., Li, R., Kanwar, J. R., Zhou, S. F.: Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem*, 18 (3), 439-81. 2011.
60. Kelly, A., Powis, S. H., Kerr, L. A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J., Townsend, A.: Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*, 355 (6361), 641-4. 1992.
61. Morita, M., Imanaka, T.: Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822 (9), 1387-96. 2012.
62. Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., Sarkadi, B.: Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285 (1), 111-7. 2001.
63. Fojo, A., Lebo, R., Shimizu, N., Chin, J. E., Roninson, I. B., Merlino, G. T., Gottesman, M. M., Pastan, I.: Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet*, 12 (4), 415-20. 1986.
64. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., Willingham, M. C.: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (21), 7735-8. 1987.
65. Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Girolamo, F., Maiorano, E., Roncali, L., Bertossi, M.: Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J Histochem Cytochem*, 50 (12), 1671-6. 2002.
66. van Helvoort, A., Giudici, M. L., Thielemans, M., van Meer, G.: Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci*, 110 (Pt 1), 75-83. 1997.
67. Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R. L., Furlong, S. T., Croop, J.: Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry*, 36 (19), 5685-94. 1997.
68. Eckford, P. D., Sharom, F. J.: The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J*, 389 (Pt 2), 517-26. 2005.

69. Raggars, R. J., Vogels, I., van Meer, G.: Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J*, 357 (Pt 3), 859-65. 2001.
70. Hrycyna, C. A., Airan, L. E., Germann, U. A., Ambudkar, S. V., Pastan, I., Gottesman, M. M.: Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport. *Biochemistry*, 37 (39), 13660-73. 1998.
71. Raymond, M., Gros, P.: Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (17), 6488-92. 1989.
72. Chen, C. J., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., Roninson, I. B.: Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem*, 265 (1), 506-14. 1990.
73. Dawson, R. J., Locher, K. P.: Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443 (7108), 180-5. 2006.
74. Dawson, R. J., Locher, K. P.: Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett*, 581 (5), 935-8. 2007.
75. Ward, A., Reyes, C. L., Yu, J., Roth, C. B., Chang, G.: Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (48), 19005-10. 2007.
76. Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., Chang, G.: Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323 (5922), 1718-22. 2009.
77. Jin, M. S., Oldham, M. L., Zhang, Q., Chen, J.: Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 490 (7421), 566-9. 2012.
78. Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V.: About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther*, 6 (1), 13-23. 2007.
79. Senior, A. E., al-Shawi, M. K., Urbatsch, I. L.: The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*, 377 (3), 285-9. 1995.
80. Tomblin, G., Senior, A. E.: The occluded nucleotide conformation of p-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr*, 37 (6), 497-500. 2005.
81. Dawson, R. J., Hollenstein, K., Locher, K. P.: Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol*, 65 (2), 250-7. 2007.

82. Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M.: The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry*, 43 (38), 12081-9. 2004.
83. Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O.: ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (3), 218-27. 2009.
84. Lee, J. Y., Urbatsch, I. L., Senior, A. E., Wilkens, S.: Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem*, 277 (42), 40125-31. 2002.
85. Lee, J. Y., Urbatsch, I. L., Senior, A. E., Wilkens, S.: Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy. *J Biol Chem*, 283 (9), 5769-79. 2008.
86. Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M.: Human P-glycoprotein is active when the two halves are clamped together in the closed conformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 395 (3), 436-40. 2010.
87. Verhalen, B., Wilkens, S.: P-glycoprotein retains drug-stimulated ATPase activity upon covalent linkage of the two nucleotide binding domains at their C-terminal ends. *J Biol Chem*, 286 (12), 10476-82. 2011.
88. Pleban, K., Kopp, S., Csaszar, E., Peer, M., Hrebicek, T., Rizzi, A., Ecker, G. F., Chiba, P.: P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol Pharmacol*, 67 (2), 365-74. 2005.
89. Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V.: Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (20), 10594-9. 1997.
90. Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M.: Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem*, 278 (41), 39706-10. 2003.
91. Shapiro, A. B., Ling, V.: Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem*, 250 (1), 130-7. 1997.
92. Parveen, Z., Stockner, T., Bentele, C., Pferschy, S., Kraupp, M., Freissmuth, M., Ecker, G. F., Chiba, P.: Molecular dissection of dual pseudosymmetric solute translocation pathways in human P-glycoprotein. *Mol Pharmacol*, 79 (3), 443-52. 2011.

93. Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P., Ling, V.: Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem*, 259 (3), 841-50. 1999.
94. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol*, 206 (3), 173-85. 2005.
95. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane. *J Biol Chem*, 274 (50), 35388-92. 1999.
96. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem*, 276 (18), 14972-9. 2001.
97. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Location of the rodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem*, 277 (46), 44332-8. 2002.
98. Ferreira, R. J., Ferreira, M. J., dos Santos, D. J.: Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein. *J Chem Inf Model*, 53 (7), 1747-60. 2013.
99. Chen, L., Li, Y., Yu, H., Zhang, L., Hou, T.: Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discov Today*, 17 (7-8), 343-51. 2012.
100. Seeger, M. A., van Veen, H. W.: Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1794 (5), 725-37. 2009.
101. Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A., Jault, J. M.: The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J Biol Chem*, 278 (47), 47002-8. 2003.
102. Ambudkar, S. V., Kim, I. W., Sauna, Z. E.: The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci*, 27 (5), 392-400. 2006.
103. Tomblin, G., Bartholomew, L. A., Urbatsch, I. L., Senior, A. E.: Combined mutation of catalytic glutamate residues in the two nucleotide binding domains of P-glycoprotein generates a conformation that binds ATP and ADP tightly. *J Biol Chem*, 279 (30), 31212-20. 2004.
104. Tomblin, G., Bartholomew, L., Gimi, K., Tyndall, G. A., Senior, A. E.: Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis. *J Biol Chem*, 279 (7), 5363-73. 2004.
105. Kim, I. W., Peng, X. H., Sauna, Z. E., FitzGerald, P. C., Xia, D., Muller, M., Nandigama, K., Ambudkar, S. V.: The conserved tyrosine residues 401 and 1044 in

- ATP sites of human P-glycoprotein are critical for ATP binding and hydrolysis: evidence for a conserved subdomain, the A-loop in the ATP-binding cassette. *Biochemistry*, 45 (24), 7605-16. 2006.
106. Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B., Schmitt, L.: H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J*, 24 (11), 1901-10. 2005.
 107. Wilkens, S.: Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14. 2015.
 108. Urbatsch, I. L., Gimi, K., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E.: Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 39 (39), 11921-7. 2000.
 109. Zolnerciks, J. K., Akkaya, B. G., Snippe, M., Chiba, P., Seelig, A., Linton, K. J.: The Q loops of the human multidrug resistance transporter ABCB1 are necessary to couple drug binding to the ATP catalytic cycle. *FASEB J*, 28 (10), 4335-46. 2014.
 110. Zaitseva, J., Jenewein, S., Oswald, C., Jumpertz, T., Holland, I. B., Schmitt, L.: A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans*, 33 (Pt 5), 990-5. 2005.
 111. Higgins, C. F., Gottesman, M. M.: Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci*, 17 (1), 18-21. 1992.
 112. Romsicki, Y., Sharom, F. J.: Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry*, 40 (23), 6937-47. 2001.
 113. Altenberg, G. A., Vanoye, C. G., Horton, J. K., Reuss, L.: Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11), 4654-7. 1994.
 114. Raviv, Y., Pollard, H. B., Bruggemann, E. P., Pastan, I., Gottesman, M. M.: Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem*, 265 (7), 3975-80. 1990.
 115. Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U. A., Pastan, I., Gottesman, M. M., Sarkadi, B.: Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem*, 268 (29), 21493-6. 1993.
 116. Shapiro, A. B., Ling, V.: Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, 250 (1), 122-9. 1997.

117. Shapiro, A. B., Ling, V.: Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, 254 (1), 181-8. 1998.
118. Katzir, H., Yeheskely-Hayon, D., Regev, R., Eytan, G. D.: Role of the plasma membrane leaflets in drug uptake and multidrug resistance. *FEBS J*, 277 (5), 1234-44. 2010.
119. Qu, Q., Sharom, F. J.: Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry*, 41 (14), 4744-52. 2002.
120. Sharom, F. J.: The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem*, 50 (1), 161-78. 2011.
121. Sharom, F. J.: Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Front Oncol*, 4, 41. 2014.
122. Borst, P., Van Meer, G., Oude Elferink, R., *Chapter 22 - Lipid Transport by ABC Transporters*, in *ABC Proteins*. 2003, Academic Press: London. p. 461-478.
123. Li-Blatter, X., Beck, A., Seelig, A.: P-glycoprotein-ATPase modulation: the molecular mechanisms. *Biophys J*, 102 (6), 1383-93. 2012.
124. Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V.: Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (6), 2515-20. 2000.
125. Cyboron, G. W., Vejins, M. S., Wuthier, R. E.: Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effects of its inhibitors at physiological pH. *J Biol Chem*, 257 (8), 4141-6. 1982.
126. Cremo, C. R., Grammer, J. C., Yount, R. G.: Direct chemical evidence that serine 180 in the glycine-rich loop of myosin binds to ATP. *J Biol Chem*, 264 (12), 6608-11. 1989.
127. Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Weber, J., Senior, A. E.: P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem*, 270 (33), 19383-90. 1995.
128. Urbatsch, I. L., Tyndall, G. A., Tomblin, G., Senior, A. E.: P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J Biol Chem*, 278 (25), 23171-9. 2003.
129. Siarheyeva, A., Liu, R., Sharom, F. J.: Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis. *J Biol Chem*, 285 (10), 7575-86. 2010.

130. Lugo, M. R., Sharom, F. J.: Kinetic validation of the models for P-glycoprotein ATP hydrolysis and vanadate-induced trapping. Proposal for additional steps. *PLoS One*, 9 (6), e98804. 2014.
131. Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C., Tampe, R.: The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem*, 278 (29), 26862-9. 2003.
132. Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J., Hunt, J. F.: ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, 10 (1), 139-49. 2002.
133. Higgins, C. F., Linton, K. J.: The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 11 (10), 918-26. 2004.
134. Szakacs, G., Ozvegy, C., Bakos, E., Sarkadi, B., Varadi, A.: Transition-state formation in ATPase-negative mutants of human MDR1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 276 (3), 1314-9. 2000.
135. Muller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germann, U. A., Gottesman, M. M., Morse, B. S., Roninson, I. B., Sarkadi, B.: Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *J Biol Chem*, 271 (4), 1877-83. 1996.
136. Sauna, Z. E., Muller, M., Peng, X. H., Ambudkar, S. V.: Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1). *Biochemistry*, 41 (47), 13989-4000. 2002.
137. Tomblin, G., Muharemagic, A., White, L. B., Senior, A. E.: Involvement of the "occluded nucleotide conformation" of P-glycoprotein in the catalytic pathway. *Biochemistry*, 44 (38), 12879-86. 2005.
138. Li, J., Jaimes, K. F., Aller, S. G.: Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci*, 23 (1), 34-46. 2014.
139. Szewczyk, P., Tao, H., McGrath, A. P., Villaluz, M., Rees, S. D., Lee, S. C., Doshi, R., Urbatsch, I. L., Zhang, Q., Chang, G.: Snapshots of ligand entry, malleable binding and induced helical movement in P-glycoprotein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 71 (Pt 3), 732-41. 2015.
140. Ritchie, T. K., Kwon, H., Atkins, W. M.: Conformational analysis of human ATP-binding cassette transporter ABCB1 in lipid nanodiscs and inhibition by the antibodies MRK16 and UIC2. *J Biol Chem*, 286 (45), 39489-96. 2011.

141. Frank, G. A., Shukla, S., Rao, P., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Merk, A., Mobin, A., Esser, L., Earl, L. A., Gottesman, M. M., Xia, D., Ambudkar, S. V., Subramaniam, S.: Cryo-EM Analysis of the Conformational Landscape of Human P-glycoprotein (ABCB1) During its Catalytic Cycle. *Mol Pharmacol*, 90 (1), 35-41. 2016.
142. van Wonderen, J. H., McMahon, R. M., O'Mara, M. L., McDevitt, C. A., Thomson, A. J., Kerr, I. D., MacMillan, F., Callaghan, R.: The central cavity of ABCB1 undergoes alternating access during ATP hydrolysis. *FEBS J*, 281 (9), 2190-201. 2014.
143. Borst, P., Elferink, R. O.: Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 71 (1), 537-92. 2002.
144. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., Sarkadi, B.: The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*, 1 (1), 27-42. 2004.
145. Leonard, G. D., Fojo, T., Bates, S. E.: The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 8 (5), 411-24. 2003.
146. Joshi, A. A., Vaidya, S. S., St-Pierre, M. V., Mikheev, A. M., Desino, K. E., Nyandege, A. N., Audus, K. L., Unadkat, J. D., Gerk, P. M.: Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. *Pharm Res*, 33 (12), 2847-2878. 2016.
147. Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B.: The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today*, 13 (9-10), 379-93. 2008.
148. Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P., et al.: Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77 (4), 491-502. 1994.
149. Schinkel, A. H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L., Smit, J. J., van der Valk, M. A., Voordouw, A. C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J. M., Fibbe, W. E., Borst, P.: Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8), 4028-33. 1997.
150. Friedenberg, W. R., Rue, M., Blood, E. A., Dalton, W. S., Shustik, C., Larson, R. A., Sonneveld, P., Greipp, P. R.: Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer*, 106 (4), 830-8. 2006.

151. Chico, I., Kang, M. H., Bergan, R., Abraham, J., Bakke, S., Meadows, B., Rutt, A., Robey, R., Choyke, P., Merino, M., Goldspiel, B., Smith, T., Steinberg, S., Figg, W. D., Fojo, T., Bates, S.: Phase I study of infusional paclitaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833. *J Clin Oncol*, 19 (3), 832-42. 2001.
152. Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H., Pinto, M. M.: Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem*, 19 (13), 1946-2025. 2012.
153. Volm, M., Efferth, T.: Prediction of Cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. *Front Oncol*, 5, 282. 2015.
154. Gottesman, M. M., Ludwig, J., Xia, D., Szakacs, G.: Defeating drug resistance in cancer. *Discov Med*, 6 (31), 18-23. 2006.
155. Sarkadi, B., Szakacs, G.: Understanding transport through pharmacological barriers--are we there yet? *Nat Rev Drug Discov*, 9 (11), 897-8. 2010.
156. Rottenberg, S., Borst, P.: Drug resistance in the mouse cancer clinic. *Drug Resist Updat*, 15 (1-2), 81-9. 2012.
157. Chaudhary, P. M., Mechetner, E. B., Roninson, I. B.: Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood*, 80 (11), 2735-9. 1992.
158. Mechetner, E. B., Roninson, I. B.: Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (13), 5824-8. 1992.
159. Rittmann-Grauer, L. S., Yong, M. A., Sanders, V., Mackensen, D. G.: Reversal of Vinca alkaloid resistance by anti-P-glycoprotein monoclonal antibody HYB-241 in a human tumor xenograft. *Cancer Res*, 52 (7), 1810-6. 1992.
160. Jachez, B., Cianfriglia, M., Loor, F.: Modulation of human P-glycoprotein epitope expression by temperature and/or resistance-modulating agents. *Anticancer Drugs*, 5 (6), 655-65. 1994.
161. Watanabe, T., Naito, M., Kokubu, N., Tsuruo, T.: Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin, cyclosporin derivatives, and MRK-16 antibodies. *J Natl Cancer Inst*, 89 (7), 512-8. 1997.
162. Naito, M., Watanabe, T., Tsuge, H., Koyama, T., Oh-hara, T., Tsuruo, T.: Potentiation of the reversal activity of SDZ PSC833 on multi-drug resistance by an anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK-16. *Int J Cancer*, 67 (3), 435-40. 1996.

163. Schinkel, A. H., Arceci, R. J., Smit, J. J., Wagenaar, E., Baas, F., Dolle, M., Tsuruo, T., Mechetner, E. B., Roninson, I. B., Borst, P.: Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. *Int J Cancer*, 55 (3), 478-84. 1993.
164. Zhou, Y., Gottesman, M. M., Pastan, I.: The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2. *Arch Biochem Biophys*, 367 (1), 74-80. 1999.
165. Alam, A., Kung, R., Kowal, J., McLeod, R. A., Tremp, N., Broude, E. V., Roninson, I. B., Stahlberg, H., Locher, K. P.: Structure of a zosuquidar and UIC2-bound human-mouse chimeric ABCB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (9), E1973-E1982. 2018.
166. Nagy, H., Goda, K., Fenyvesi, F., Bacso, Z., Szilasi, M., Kappelmayer, J., Lustyik, G., Cianfriglia, M., Szabo, G., Jr.: Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 315 (4), 942-9. 2004.
167. Goda, K., Fenyvesi, F., Bacso, Z., Nagy, H., Marian, T., Megyeri, A., Krasznai, Z., Juhasz, I., Vecsernyes, M., Szabo, G., Jr.: Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. *J Pharmacol Exp Ther*, 320 (1), 81-8. 2007.
168. Krasznai, Z. T., Toth, A., Mikecz, P., Fodor, Z., Szabo, G., Galuska, L., Hernadi, Z., Goda, K.: Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, ^{99m}Tc-MIBI and ¹⁸F-FDG. *Eur J Pharm Sci*, 41 (5), 665-9. 2010.
169. Goda, K., Nagy, H., Mechetner, E., Cianfriglia, M., Szabo, G., Jr.: Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells. *Eur J Biochem*, 269 (11), 2672-7. 2002.
170. Berube, B. J., Bubeck Wardenburg, J.: Staphylococcus aureus alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)*, 5 (6), 1140-66. 2013.
171. Barok, M., Isola, J., Palyi-Krek, Z., Nagy, P., Juhasz, I., Vereb, G., Kauraniemi, P., Kapanen, A., Tanner, M., Vereb, G., Szollosi, J.: Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 6 (7), 2065-72. 2007.
172. Marian, T., Szabo, G., Goda, K., Nagy, H., Szincsa, N., Juhasz, I., Galuska, L., Balkay, L., Mikecz, P., Tron, L., Krasznai, Z.: In vivo and in vitro multitracer analyses of P-

- glycoprotein expression-related multidrug resistance. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30 (8), 1147-54. 2003.
173. Shrestha, D., Exley, M. A., Vereb, G., Szollosi, J., Jenei, A.: CD1d favors MHC neighborhood, GM ganglioside proximity and low detergent sensitive membrane regions on the surface of B lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2013.
 174. Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9 (7), 671-5. 2012.
 175. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21), 2947-8. 2007.
 176. Han, M. V., Zmasek, C. M.: phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics*, 10, 356. 2009.
 177. Omasits, U., Ahrens, C. H., Muller, S., Wollscheid, B.: Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30 (6), 884-6. 2014.
 178. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25 (13), 1605-12. 2004.
 179. Mechetner, E. B., Schott, B., Morse, B. S., Stein, W. D., Druley, T., Davis, K. A., Tsuruo, T., Roninson, I. B.: P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (24), 12908-13. 1997.
 180. Kim, Y., Chen, J.: Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science*, 359 (6378), 915-919. 2018.
 181. Frelet, A., Klein, M.: Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett*, 580 (4), 1064-84. 2006.
 182. Gyimesi, G., Borsodi, D., Saranko, H., Tordai, H., Sarkadi, B., Hegedus, T.: ABCMdb: a database for the comparative analysis of protein mutations in ABC transporters, and a potential framework for a general application. *Hum Mutat*, 33 (11), 1547-56. 2012.
 183. Lerner-Marmarosh, N., Gimi, K., Urbatsch, I. L., Gros, P., Senior, A. E.: Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from *Pichia pastoris* cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins. *J Biol Chem*, 274 (49), 34711-8. 1999.

184. Ozvegy, C., Varadi, A., Sarkadi, B.: Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem*, 277 (50), 47980-90. 2002.
185. Davidson, A. L., Sharma, S.: Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 179 (17), 5458-64. 1997.
186. al-Shawi, M. K., Urbatsch, I. L., Senior, A. E.: Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity. *J Biol Chem*, 269 (12), 8986-92. 1994.
187. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem*, 270 (39), 22957-61. 1995.
188. Barsony, O., Szaloki, G., Turk, D., Tarapcsak, S., Gutay-Toth, Z., Bacso, Z., Holb, I. J., Szekvolgyi, L., Szabo, G., Csanady, L., Szakacs, G., Goda, K.: A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein. *Sci Rep*, 6, 24810. 2016.
189. Szabo, K., Welker, E., Bakos, Muller, M., Roninson, I., Varadi, A., Sarkadi, B.: Drug-stimulated nucleotide trapping in the human multidrug transporter MDR1. Cooperation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem*, 273 (17), 10132-8. 1998.
190. Urbatsch, I. L., Beaudet, L., Carrier, I., Gros, P.: Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry*, 37 (13), 4592-602. 1998.
191. Loo, T. W., Clarke, D. M.: Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J Biol Chem*, 270 (37), 21449-52. 1995.
192. Pal, A., Mehn, D., Molnar, E., Gedey, S., Meszaros, P., Nagy, T., Glavinas, H., Janaky, T., von Richter, O., Bathori, G., Szente, L., Krajcsi, P.: Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther*, 321 (3), 1085-94. 2007.
193. Gayet, L., Dayan, G., Barakat, S., Labialle, S., Michaud, M., Cogne, S., Mazane, A., Coleman, A. W., Rigal, D., Baggetto, L. G.: Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry*, 44 (11), 4499-509. 2005.
194. Grillitsch, K., Tarazona, P., Klug, L., Wriessnegger, T., Zellnig, G., Leitner, E., Feussner, I., Daum, G.: Isolation and characterization of the plasma membrane from the yeast *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta*, 1838 (7), 1889-97. 2014.

195. Bosma, M. J., Carroll, A. M.: The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, 9, 323-50. 1991.
196. Carter, P. J.: Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, 6 (5), 343-57. 2006.
197. Yano, S., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., Nokihara, H., Nishimura, N., Tsuruo, T., Sone, S.: Combined therapy with anti-P-glycoprotein antibody and macrophage colony-stimulating factor gene transduction for multiorgan metastases of multidrug-resistant human small cell lung cancer in NK cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer*, 82 (1), 105-11. 1999.
198. Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Berger, S., Rossen, K., van Berkel, P. H., Derer, S., Beyer, T., Lohse, S., Bleeker, W. K., Peipp, M., Parren, P. W., van de Winkel, J. G., Valerius, T., Dechant, M.: Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*, 184 (1), 512-20. 2010.
199. van de Winkel, J. G., Anderson, C. L.: Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol*, 49 (5), 511-24. 1991.
200. Ravetch, J. V., Bolland, S.: IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 19, 275-90. 2001.
201. Bleeker, W. K., Lammerts van Bueren, J. J., van Ojik, H. H., Gerritsen, A. F., Pluyter, M., Houtkamp, M., Halk, E., Goldstein, J., Schuurman, J., van Dijk, M. A., van de Winkel, J. G., Parren, P. W.: Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol*, 173 (7), 4699-707. 2004.
202. Sikic, B. I., Fisher, G. A., Lum, B. L., Halsey, J., Beketic-Oreskovic, L., Chen, G.: Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40 Suppl, S13-9. 1997.
203. Ferdinandusse, S., Jimenez-Sanchez, G., Koster, J., Denis, S., Van Roermund, C. W., Silva-Zolezzi, I., Moser, A. B., Visser, W. F., Gulluoglu, M., Durmaz, O., Demirkol, M., Waterham, H. R., Gokcay, G., Wanders, R. J., Valle, D.: A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet*, 24 (2), 361-70. 2015.
204. Theodoulou, F. L., Kerr, I. D.: ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans*, 43 (5), 1033-40. 2015.
205. Moitra, K., Dean, M.: Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biol Chem*, 392 (1-2), 29-37. 2011.

206. Toyoda, Y., Sakurai, A., Mitani, Y., Nakashima, M., Yoshiura, K., Nakagawa, H., Sakai, Y., Ota, I., Lezhava, A., Hayashizaki, Y., Niikawa, N., Ishikawa, T.: Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? *FASEB J*, 23 (6), 2001-13. 2009.
207. Ueda, K.: ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (3), 401-9. 2011.
208. Woodward, O. M., Kottgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B., Kottgen, M.: Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (25), 10338-42. 2009.
209. Hodges, L. M., Markova, S. M., Chinn, L. W., Gow, J. M., Kroetz, D. L., Klein, T. E., Altman, R. B.: Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*, 21 (3), 152-61. 2011.



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

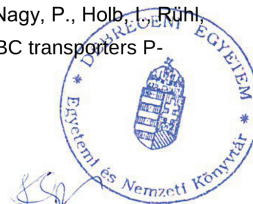
Jelölt: Szalóki Gábor
Neptun kód: EPEUDY
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10040820

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., Nizsalóczki, 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 értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,493

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

Debrecen, 2018.03.22.



Tárgyszavak

Pgp, multidrog rezisztencia, ABC transzporter, katalitikus ciklus, szubsztrátaffinitás, UIC2 antitest, transzport gátlás, tumor növekedés gátlás, ADCC

Keywords: Pgp, multidrug resistance, ABC transporter, cathalytic cycle, substrate-affinity, UIC2 antibody, transport inhibition, tumor growth inhibition, ADCC

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Goda Katalinnak, aki középiskolás éveim második felétől kitartóan egyengette utamat, időt és energiát nem sajnálva segített és támogatott abban, hogy kísérleteim valóban tudományos igényű munkákká álljanak össze. Köszönöm neki a rengeteg segítséget, mely nélkül azokat a sikereket, melyeket szakdolgozóként, majd PhD hallgatóként elértem, minden bizonnyal nem értem volna el.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szabó Gábornak, hogy a munkacsoportja tagjaként kutathattam és dolgozhattam.

Külön köszönöm a technikai segítséget Szabó Anikónak, Szabóné Jeney Anitának, Dajka Gyöngyinek, Téglási Annamáriának és Vezendiné Nagy Adélnak, akikkel az évek alatt együtt dolgozhattam.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet valamennyi dolgozójának, hogy egy ilyen jó csapat tagja lehettem, és hogy kérdéseimmel, kéréseimmel bátran fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm szerzőtársaimnak, kollaborációs partereimnek a kísérletekben nyújtott segítséget és a kemény közös munkát, mely során a disszertációm alapjául szolgáló közlemények megszülethettek.

Köszönöm családomnak, különösen feleségemnek, Krisztinek és kisfiamnak, Gabikának a türelmet és a támogatást.

Függelék