

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

P-glikoprotein alap és koleszterin-függő trafficking folyamatainak vizsgálata

Gutayné Tóth Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
1.1 A multidrog rezisztencia fenotípus: a P-glikoprotein kutatás korai évei.....	7
1.2 Az ABC transzporterek	10
1.3 Az ABC transzporterek szerkezete.....	12
1.4 Az ABCB1 vagy P-glikoprotein.....	15
1.5 A Pgp trafficking folyamatai	21
1.5.1 Intracelluláris elhelyezkedés, ismert trafficking útvonalak	21
1.5.2 Stabilitás és lehetséges degradációs útvonalak	26
1.6 Membránmikrodomének	29
1.7 Pgp és membránkönyezete	33
1.8 Lipidek mint endogén szubsztátok, multidrog rezisztenciában megfigyelhető deviáns lipid összetétel	37
1.9 A sejtmembrán koleszterin tartalmának változtatása ciklodextrinekkel, a koleszterin kémiai aktivitása	44
1.10 Koleszterin kompenzációs útvonalak, a MDR sejtek esetén megfigyelhető koleszterin változások	49
1.11 Lizoszómális exocitózis és membrán repair	52
1.12 Közvetlen előzmények (a sejtfelszíni Pgp molekulák konformációs és topológiai heterogenitása).....	54
2. CÉLKITŰZÉSEK	57
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	59
3.1 Sejttenyésztés.....	59
3.2 A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása	59
3.3 Monoklonális antitestek előállítása és jelölése	59
3.4 Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése monoklonális antitesttel, az UIC2 és 15D3 monoklonális antitestek affinitásának (K_d) és maximális kötőhelyeinek (B_{max}) meghatározása	60
3.5 A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése	60

3.6 Internalizáció hőmérséklet és ATP függésének vizsgálata.....	60
3.7 Internalizálódott Pgp molekulák degradációs végpontjának mérése pHrodo festékkel jelölt Pgp-n	61
3.8 Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek	61
3.9 Exocitálódó Pgp mennyiségek meghatározása.....	61
3.10 Sejtfelszíni Pool1 mennyiségek mérése exocitózis gátló szerek mellett.....	62
3.11 Koleszterin kivonást követő sejtfelszíni LAMP1 (CD107a) és LAMP2 (CD107b) mennyiségek monitorozása.....	62
3.12 Ciklodextrin kezelések hatása a szabad koleszterin mennyiségekre és életképességekre NIH-3T3 és 3T3-MDR1 sejtek esetén.....	63
3.13 Lizoszóma mennyiségek meghatározása.....	63
3.14 A lizoszómák fotodestrukciója	64
3.15 A plazmamembrán koleszterin kivonásának hatása a lizoszómális festékek akkumulációjára.....	65
3.16 Aktin filamentum fluoreszcens jelölése	65
3.17 Detergens elúciós eljárás	66
3. 18 Statisztikai analízis	66
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	67
4.1 Méréseinkhez kapcsolódó felismerések, metodikai megfontolások.....	67
4.1.1 Az UIC2 valamint 15D3 reaktív P-glikoproteinek koleszterin-függő raft asszociációja	67
4.1.2 Különböző detergens hatása az aktin polimerizációs tulajdonságaira	68
4.1.3 A Pgp 15D3 monoklonális antitesttel detektálható koleszterin-függő konformáció változása	72
4.1.3.1 A sejtmembrán koleszterin mennyiségének változása a β -ciklodextrin származékok koleszterin szolubilizációs kapacitásának függvényében	72
4.1.3.2 A 15D3 monoklonális antitest koleszterin-függő affinitás változása	74
4.2 Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k fokozott internalizációt mutatnak	76
4.3 Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációja hőmérséklet- és ATP-függést mutat..	78
4.4 A Pool1 P-glikoprotein egyik lehetséges degradációs helye a lizoszóma.....	79
4.5 A Pool1 P-glikoprotein recirkulál a sejtfelszínre	83
4.6 A raft asszociált Pool1 Pgp-k sejtfelszíni mennyisége növekszik koleszterin kivonást követően.....	87

4.7 A koleszterin kivonás indukálta Pool1 sejt felszíni mennyiségek emelkedése nem indokolható csökkent internalizációval	90
4.8 A Pool1 Pgp-k exocitálódó mennyisége emelkedik koleszterin kivonást követően	91
4.9 Az exocitotikus folyamatok gátlása csökkenti a koleszterin kivonás indukálta emelkedett sejt felszíni Pool1 mennyiségeket	92
4.10 A lizoszómális LAMP1 és LAMP2 fehérje exocitózisa kalcium és koleszterin függő módon szintén fokozott ciklodextrin kezelést követően.....	96
4.11 A 3T3-MDR1 sejtek nagyobb mennyiségű, stabilabb lizoszómákat tartalmaznak.....	99
4.12 A 3T3-MDR1 sejtek lizoszómái koleszterin kivonást követően is stabilabbnak bizonyultak	102
4.13 A 3T3-MDR1 sejtek esetén megfigyelhető hatékonyabb membrán repair mechanizmus tükröződik a koleszterin perturbációt követő életképességekben.....	105
5. ÖSSZEFOGLALÁS	110
6. SUMMARY	111
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	112
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	136
9. TÁRGYSZAVAK.....	138
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	139
11. MELLÉKLET	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP-kötő domén (ATP Binding Cassette)
acLDL	Acetilált alacsony denzitású lipoprotein
AO	Akridin narancs
AP1	Adaptor fehérje 1
ARF1	ADP ribozilációs faktor 1 (ADP-ribosylation factor 1)
ASM	Savas szfingomielináz
A647	Alexa647, fluoreszcens festék
β CD	béta-ciklodextrin
Bmax	Maximálisan jelölhető kötőhelyek mennyisége
CERT	Ceramid transzporter
CHAPS	3-[(3-kolamidpropil)dimetilammonium]-1-propánszulfonát, tenzid
CMC	Kritikus micelláris koncentráció
COPI	Burok fehérje I (Coat protein I)
CRAC	Koleszterin-kötő domén (cholesterol recognition amino acid consensus)
CsA	Ciklosporin A
EEA1	Korai endoszóma antigén 1 (Early Endosome Antigen 1)
ER	Endoplazmatikus retikulum
FCDR	Áramlási citometriás detergens rezisztencia (Flow cytometric detergent resistance)
FRET	Förster-típusú rezonancia-energiatranszfer (Förster resonance energy transfer)
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GamIg	Kecskében termeltetett egér ellenes antitest (Goat anti mouse Immunoglobulin)
GGA	Golgi-lokalizált ARF-kötő fehérje (Golgi-localized, γ -ear homology domain, ARF-binding protein)
GluCer	Glükoceramid
glüPBS	glükózos foszfát puffer oldat

HDL ₃	Magas denzitású lipoprotein 3-as alosztálya
HMGC _o A	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reduktáz
K _d	Disszociációs állandó
LAMP1	Lizoszóma asszociált membrán fehérje 1
mAt	Monoklonális antitest
MDR	multidrog rezisztencia
NBD	Nukleotid kötő domén
NP40	Nonidet P40, tenzid
OSBP	Oxizterol kötő fehérje
PC	Foszfatidilkolin
PE	Foszfatidiletanolamin
PFA	Paraformaldehid
Pgp	P-glikoprotein
PI	Propidium jodid
PM	plazmamembrán
SM	Szfingomielin
SREBP	Koleszterin-anyagcsere szabályozásában résztvevő transzkripció faktor (Sterol regulatory element binding protein)
TGN	Transz golgi hálózat
TMD	Transzmembrán domén
TX100	Triton X-100, tenzid

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A multidrog rezisztencia fenotípus: a P-glikoprotein kutatás korai évei

A humán daganatos megbetegedések első sikeres kemoterápiás kezelése után nem sokkal jött a felismerés, hogy ezen kezelések hatékonyságának legnagyobb akadálya az adott kemoterápiás szerre mutatott kezdeti javulás után kialakuló rezisztencia. Több különböző támadásponttal rendelkező kemoterápiás szer együttes alkalmazása szintén nem vezetett sikerre, mivel a daganatos sejtek képesek voltak egyidejűleg a citosztatikumok széles spektrumával szemben is rezisztenciát, ún. multidrog rezisztenciát (MDR) kialakítani. Ezen folyamatok klinikai jelentőségét felismerve, számos kutatócsoport figyelme fordult azon farmakológiai, biokémiai és molekuláris mechanizmusok felderítésére melyek szerepet játszhatnak a jelenség kialakulásában. A kutatás mind a mai napig tart, olyan eddig már ismert és esetlegesen nem ismert mechanizmusok pontos felderítésére, melyek releváns célpontok lehetnek a daganatos sejtek kezelésében.

1970-ben Biedler és Riehm aktinomycin-D-vel szelektált kínai aranyhőrcsög sejt kultúrán kimutatta, hogy a sejt vonal egyidejűleg rezisztens más, szerkezetében és funkciójában eltérő citosztatikumra is (mitramicin, vinblasztin, vinkrisztin, puromicin, daunomicin, demekolcin, mitomicin C). A daunomicin-rezisztens sejt vonaluk szintén rezisztenciát mutatott aktinomycin-D-vel szemben is [1]. Az ezt követő években különböző kutatócsoportok még számos kereszt-rezisztenciát mutató sejt vonalat, illetve transzplantálható tumort szelektáltak különböző drogok segítségével, és bevetették a biokémia, a molekuláris biológia, a genetika és a sejtbiológia rendelkezésre álló összes eszköztárát a multidrog rezisztencia jelenség hátterének vizsgálatára. Ezen sejt vonalak némelyikét mind a mai napig használják Pgp expressziós standardként kutatócsoportok, illetve gyógyszercegek.

Dano 1973-ban daunomicin rezisztens sejtek vizsgálata során megfigyelte, hogy a daunomicin sejt magban mért koncentrációja megemelkedik különböző anyagcseregátló szerek (2-deoxiglükóz, iodoacetát), illetve vinka alkaloidok jelenlétében, melyre a sejt vonal korábbi vizsgálatok alapján kereszt-rezisztenciát mutatott [2]. Dano már ekkor felvetette annak lehetőségét, hogy a rezisztens sejtekben megfigyelhető csökkent drog akkumulációt egy energia-függő karrier-mediált pumpa mechanizmus eredményezi, amelyért a különböző drogok egymással kompetálnak. Skovsgaard daunorubicinre rezisztens, Erlich aszcitesz tumor sejtek vizsgálatakor szintén nem zárta ki egy fokozott aktív pumpa mechanizmus meglétét a rezisztens sejtekben, de emellett felvetette lehetséges magyarázatként a drogok csökkent

affinitását az intracelluláris kötőhelyekhez, valamint egy csökkent influx lehetőségét is [3]. Beck és mtsai radioaktív vinblasztinnal végzett kísérletekből arra a következtetésre jutottak, hogy a humán limfoblaszt sejtekben tapasztalt alkaloid-rezisztencia energia-függő csökkent drog kötődéssel magyarázható [4]. Ling és Thompson [5] csökkent sejtmembrán permeabilitással magyarázta az általuk vizsgált CHO sejtek kolhicin rezisztenciáját. Még ebben az évben ezen kutatócsoport is bizonyította a csökkent kolhicin akkumuláció energia-dependens voltát [6] illetve később azt, hogy a sejtek drog felvétele szoros összefüggésben van a sejtekben tapasztalt ATP szintek változásával [7]. Victor Ling saját bevallása szerint [8] eredményeik teljes egészében összeegyeztethetőek voltak Danó eredményeivel, mégis úgy gondolták akkor, hogy a MDR során kialakuló kereszt-rezisztencia - szerkezetükben adott esetben teljesen eltérő drogokra - sokkal inkább összeegyeztethető egy, a sejtmembránt érintő általános folyamattal. Ezen gondolatok, elképzelések eredményeként született meg az „aktív permeabilitási barrier modell”, mely a membrán lipid fluiditásának csökkenésével magyarázta a rezisztens sejtek drogok széles spektrumával szemben mutatott fokozott rezisztenciáját. Nehezen volt elfogadható az, hogy az MDR fenotípus önmagában magyarázható lenne egy klasszikus drog efflux mechanizmussal. Elképzelhetetlennek tűnt, hogy egyetlen transzporter hogyan képes ennyi vegyületet felismerni! A multidrog rezisztencia során a citosztatikumok széles spektrumával szemben alakul ki rezisztencia, olyan amfifil-lipofil anyagokkal szemben, melyek szerkezetükben és méretükben is jelentősen eltérőek: 200 Da-tól akár 1900 Da-ig.

1976-ban Juliano és Ling munkacsoportja az általuk szelektált kolhicin-rezisztens sejtvonalon egy glikoprotein megnövekedett expresszióját írta le [9]. Egy kb. 170 kDa (165 kDa) méretű glikoprotein csúcsot figyeltek meg a gélben a colchicin rezisztens sejtek esetében, ellentétben a vad-típusú sejtekkel. Így született a P-glikoprotein elnevezés a sejtek colchicinre mutatott csökkent permeabilitásának megfelelően. Jack Riordani és Ling 1979-ben mutáns és revertáns sejtvonalakból készített és Comassie blue-val festett plazmamembrán vezikulák vizsgálata során összefüggést tapasztalt a fehérje mennyisége és a drog rezisztencia mértéke között [10]. Kartner és mtsai poliklonális antitestek segítségével végzett Western blot kísérletekben kimutatták a 170 kDa tömegű Pgp-t, mint közös fehérjekomponenst különböző MDR sejtvonalakon [11]. Majd további monoklonális antitestek kifejlesztésével [12] korrelációt figyeltek meg a multidrog rezisztencia mértéke és a P-glikoprotein expressziós szintje között különböző emlős MDR sejtvonalakon, illetve néhány kemoterápiára rezisztens petefészek daganatban [13]. 1983-84-ben kolhicin rezisztens sejtek genom DNS-el transzfektált sejtekben Robertson és mtsai korrelációt találtak egyrészt a Pgp mennyisége, valamint az ún.

kettős-parány kromoszómák (double minute chromosomes) száma és a kolhicin rezisztencia között. Mivel ezen extrakromoszómális DNS szakaszok megjelenése bizonyos gének amplifikációjával van kapcsolatban, arra a feltételezésre jutottak, hogy a Pgp-t kódoló gén amplifikációjáról lehet szó ezen rezisztens sejtvonal és esetleg más, szelektált sejtvonalak esetében is [11, 14]. Igor Roninson CHO sejtek vizsgálata során szintén azt találta, hogy bizonyos DNS szekvenciák amplifikációja korrelál a multidrog rezisztencia mértékével [15]. 1986 május-júniusában Shen és Roninson egy 4,5 kb *mdr1* hírvivő RNS (mRNS) emelkedett szintjéről, valamint az *mdr1* DNS amplifikációjáról számolt be különböző humán sejtvonalakban [16, 17], mely szorosán korrelált a drog rezisztencia mértékével. Ueda és mtsai rövid időn belül bizonyították, hogy valójában ezen *mdr1* gén kódolja a Pgp-t [18], és az *mdr1* klón retrovirális transzfekciója multidrog rezisztens fenotípussal ruházta fel a transzfektált sejteket [19]. Gros és mtsai néhány hónappal hamarabb hasonló eredményre jutottak egér *mdr1* klón transzfektálásával [20]. 1986-ban 3 közlemény született az MDR-rel intenzíven foglalkozó neves kutatócsoportok tollából, mely az *mdr1* gén cDNS-nek szekvenálása során arra a felismerésre jutott, hogy a Pgp/*mdr1* nagyfokú szekvencia homológiát mutat már ismert bakteriális ATP-kötő transzport fehérjékkel, illetve legfőképpen azok hidrofíliájával, nukleotid kötőhelyével [21-23].

Az elsődleges szerkezet ismeretében már körvonalazódott a multidrog rezisztenciában szerepet játszó Pgp strukturális és funkcionális modellje, mely számos citosztatikum energia-dependens kipumpálásával képes ezen drogok intracelluláris koncentrációjának csökkentésére. Humán Pgp ellen kifejlesztett MRK16 egér monoklonális antitest (mAt) segítségével [24] Thibeaut és mtsai bizonyították a Pgp jelenlétét különböző normál szövetek (máj, hasnyálmirigy, vese, vastagbél, vékonybél, agy) epitél sejtjeinek apikális oldalán [25, 26]. Fojo és Goldstein ezzel párhuzamosan számos daganatos mintában is kimutatta az *mdr1* mRNS jelenlétét [27, 28]. Ezen kísérletek eredményeként fogalmazódott meg az elképzelés, mely szerint a Pgp-t a különböző toxikus xenobiotikumok elleni általános védekezési mechanizmus hívta életre, olyan szövetekben, melyek fontosak lehetnek ezen drogok abszorpciójában (bél lumen epitél sejtjei); metabolizációjában-eliminációjában (máj, vese), valamint különböző létfontosságú szervek úgymint a vér-agy gát, here, petefészek és placenta sérülékeny fiziológiás barrierjeinek megerősítésében.

1992-ben Cole és mtsai számos kemoterapeutikummal szemben rezisztenciát mutató multidrog rezisztens sejtvonalon, egy másik ATP-kötő transzporter nagyszámú kifejeződését írta le az ún. MDR-kapcsolt fehérjét, MRP1-et [29].

Majd 1998-ban Doyle és mtsai egy szintén számos citosztatikummal szemben - többek között mitoxantronnal szemben is - rezisztenciát mutató humán mellrák sejtvonalon egy harmadik fontos fehérje jelenlétéről számolt be, a BCRP-ről (Breast Cancer Resistance Protein), amely önmagában is képes volt a multidrog rezisztens fenotípus kialakítására [30].

Az emberi szervezetben mai tudásunk szerint a legfőbb MDR-ATP-kötő fehérjékhez tartozik az MDR1/Pgp/ABCB1, az MRP család számos tagja (MRP1-9) valamint a BCRP/MXR/ABCG2. Nagyszámú, főként hidrofób xenobiotikumok mellett képesek számos amfifil anion és kation természetű anyag sejtekből történő kipumpálására is, és ilyen módon, mint a szervezet ún. kemoimmunrendszerének tagjai képesek szervezetünket megvédeni a különböző toxikus metabolitoktól [31].

1.2 Az ABC transzporterek

1985-ben Higgins és mtsai három egymástól független bakteriális transzporter aminosav szekvenciájának vizsgálata során felismerték, hogy mindhárom transzporter viszonylag azonos pozícióban azonos szekvencia motívumokat tartalmaz. Ezen aminosav szekvenciák egy ún. ATP nukleotid kötő domén részét képezik. A fehérjék transzportfunkcióhoz szükséges konformációváltozását pedig az ATP kötéséből és hidrolíziséből származó energia szolgáltatja [32]. Ezen első felismerések fektették le a mára már jól ismert ABC (ATP-binding cassette transporter) transzporterek létezésének alapjait. 1986-ban Gros; Chen és Gerlach már ezen és számos egyéb bakteriális transzport fehérje aminosav szekvenciájának ismeretében sorolhatta a MDR-ban fontos szerepet játszó Pgp-t az ATP-kötőhely nagymértékű evolúciós konzerváltsága, valamint hasonló mechanizmusa alapján ezen supercsalád tagjai közé [21-23, 33].

Az ABC transzporterek képezik a legnagyobb transzmembrán fehérje családot, melynek tagjai a baktériumoktól az emberig minden élőlényben megtalálhatóak [34]. A sejtek plazmamembránjában és intracelluláris kompartmentjeinek membránjában elhelyezkedve részt vesznek számos vegyület: cukrok, aminosavak, fémionok, peptidok, fehérjék, nagyszámú hidrofób vegyület, valamint metabolitok transzportálásában. Fontos szerepet játszanak olyan sejtfunciókban, mint toxikus vegyületek kiválasztása, anyagfelvétel vagy jelátvitel [35, 36]. Az eukarióta genomban nagy számban megtalálható ABC transzporter gének nagyfokú konzerváltságot mutatnak az egyes specieszek között, mely arra enged következtetni, hogy ezen gének már az eukarióta evolúció kezdetekor is léteztek. A humán genom szekvencia analízise alapján 48 különböző ABC transzporter ismert [37], melyek 7

alcsaládra (ABCA-tól ABCG- ig) oszthatóak génstruktúrabeli hasonlóságuk (fél vagy teljes transzporterek), a domének sorrendje, valamint a nukleotid-kötő illetve a transzmembrán domének homológiájának alapján (lásd ABC transzporterek szerkezete).

Gén	Egyéb ismert elnevezés	Fenotípus, betegség	Ismert funkció
ABCA1		Tangier kór, FHLD	koleszterin és foszfolipid transzport
ABCA3		surfactant deficiencia	
ABCA4	ABCR	Stargardt kór, FFM, RP, CRD, AMD	
ABCA12		Harlequin ichtiózis	
ABCA13		skizofrénia, bipoláris depresszió, depresszió	
ABCB2	TAP1	Bechet kór	antigén peptidok transzportja az ER-be
ABCB3	TAP2	Bechet kór	antigén peptidok transzportja az ER-be
ABCB4	MDR3	3-as típusú illetve terhelességi intrahepatikus kolesztázis	foszfatidil-kolin szekréció az epébe
ABCB7		szideroblasztos anémia	FeSO ₄ komplexek transzportja a mitokondriumba
ABCB11	BSEP vagy SPGP	2-es típusú intrahepatikus kolesztázis	epesavak export
ABCC2	MRP2 vagy cMOAT	Dubin-Johnson szindróma	bilirubin export
ABCC6	MRP6	pseudoxanthoma elasticum	
ABCC7	CFTR	cisztikus fibrózis, pankreatitisz, bronchiektázia, CBAVD	Cl ⁻ csatorna
ABCC8	SUR1	gyermekkori familiáris hiperinzulinémiás hipoglikémia	ATP-szenzitív K ⁺ csatorna regulátor a pankreasz β-sejtjeiben
ABCC9		dilatatív kardiomiopátia ventrikuláris tachycardiával	
ABCC11		fokozott izzadás és fülzsír termelés	
ABCD1	ALDP	adrenoleukodisztrófia	zsírsavak (VLCFA) peroxisómális transzportja
ABCD2	ALDR	adrenoleukodisztrófia	zsírsavak (VLCFA) peroxisómális transzportja
ABCG2	BCRP	köszvény	húgysav export
ABCG5		szitoszterolémia	fitoszterolok exportja
ABCG8		szitoszterolémia	fitoszterolok exportja

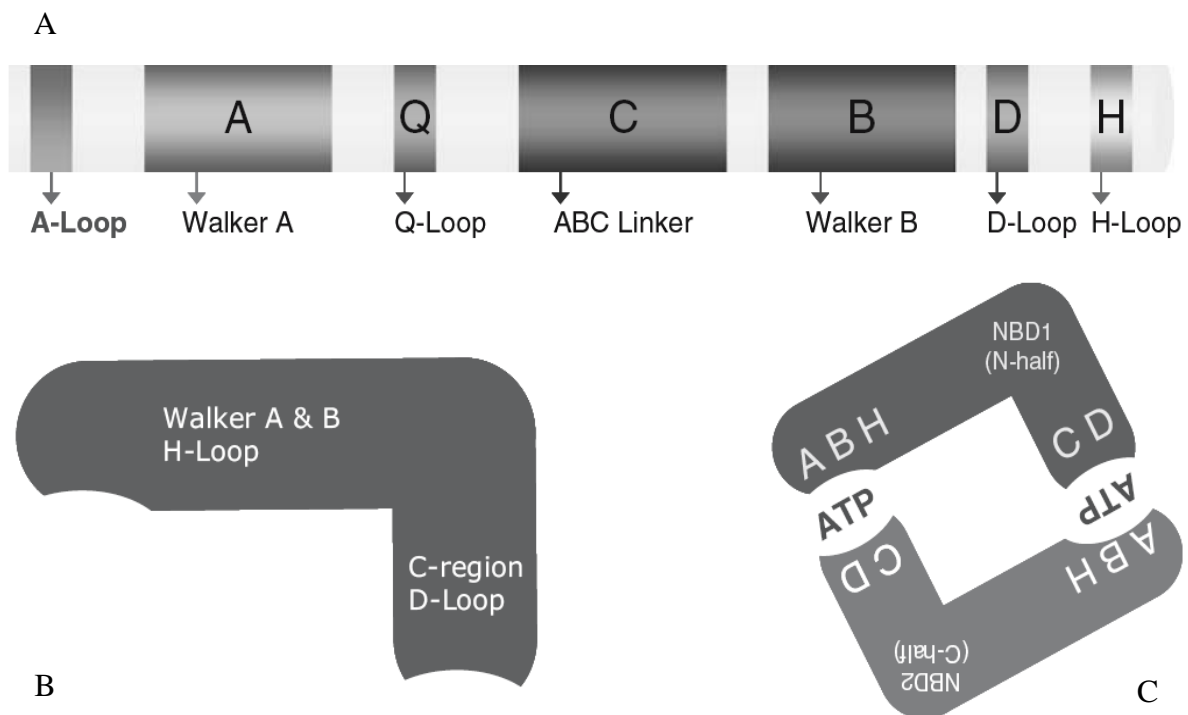
1. táblázat Humán ABC transzporterekhez köthető fenotípusok, betegségek

FHLD - familiáris hipoalfalipoproteinémia (*familial hypovalphalipoproteinemia*); *FFM* - *fundus flavimaculatus*; *RP* - *retinitis pigmentosa*; *CRD* - *csap- és pálcikasejtek disztófiája (cone rod dystrophy)*; *AMD* - *idősköri makula degeneráció (age-related macular degeneration)*; *CBAVD* - *kongenitális bilaterális vas deferens hiány (congenital bilateral absence of vas deferens)*; *VLCFA* - *hosszú szénláncú zsírsav (very long chain fatty acid)* [41-44].

Ezen ABC transzporterek egyre növekvő számban köthetőek különböző betegségek, illetve fenotípusok megjelenéséhez. Az **1. táblázat** az eddig ismert ABC transzporter mutációkhoz köthető (Mendeli rendellenességek / komplex betegségek) humán genetikai rendellenességeket foglalja össze.

Az ABC transzporterek funkciójuk alapján három csoportra oszthatóak. Pumpaműködésű transzporter fehérjékre, csatorna funkciót betöltő, valamint csatornaszabályozó fehérjékre. Míg a legtöbb ismert hatásmechanizmusú ABC-fehérje valódi transzporterként működik, addig a csatornaszabályozó, ill. csatorna működésű ABC-molekuláknak eddig csak két tagja ismert. A SUR1 (sulfonyleurea-receptor, ABCC8) valószínűleg az intracelluláris ATP, valamint ADP koncentráció függvényében szabályozza a glükóz indukálta inzulinszekréció szabályozásában fontos szerepet betöltő K^+ -csatorna működését [38]. Míg a CFTR (cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, ABCC7) egy ATP-hidrolízis és cAMP-függő foszforiláció által szabályozott Cl^- csatorna [39, 40], amely más membránfehérjék működését is szabályozza, azaz egyszerre tölt be csatorna, valamint csatornaszabályozó funkciót.

1.3 Az ABC transzporterek szerkezete



1. ábra Az ABC transzporterek nukleotid kötő doménjének konzervált motívumai (A); az L alakú NBD sémás alakja (B); valamint az N-terminális és a C-terminális két nukleotid kötő domén által kialakított funkcionális ATP kötő zsebek (C) [57].

A transzporterek prototípusa két citoplazmatikus nukleotid kötő doménből valamint a hozzájuk kapcsolódó két, a membránon többször átívelő transzmembrán doménből áll. A dimerként funkcionáló transzmembrán domének alakítják ki a szubsztrát transzlokációhoz szükséges csatornát, valamint a szubsztrát kötő zsebet, míg a két citoszolikus nukleotid kötő domén felelős az ATP kötésért, illetve hidrolízisért. Teljes transzporterek esetén ezeket a funkcionális egységeket egyetlen polipeptid lánc tartalmazza (pl. ABCB1: N-TMD-NBD-TMD-NBD-C), míg fél transzporterek esetén (pl. ABCG2: N-NBD-TMD-C) homo- vagy heterodimerek kialakulása szükséges egy működőképes transzporter létrehozásához [34, 45, 46]. Az ABC transzporterek nukleotid kötő doménje számos jellegzetes peptid motívumot tartalmaz. Az egymástól 90-120 aminosavnyi távolságra lévő Walker A és Walker B motívumot, mely minden ATP-kötő fehérje sajátja, az ABC-signature motívumot (LSGGQ szekvencia, ABC linker vagy C motívum), valamint H- D- és Q-loop-okat, mely kizárólag az ABC-transzporterekre jellemzőek.

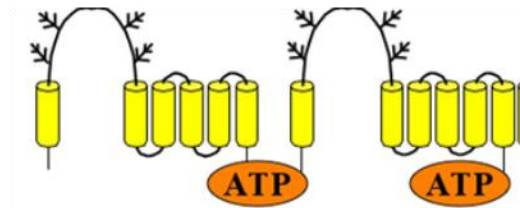
Az egyik nukleotid kötő domén Walker A, -B illetve H-loopja a másik nukleotid kötő domén D-loopjával és signature motívumával ún. „sandwich dimer”-t alkotva hozza létre a két ATP kötéséhez szükséges nukleotid kötő zsebeket (**1. ábra**).

A Walker A motívumról ismert, hogy az ATP β -foszfátját köti [47]. Az ABC-signature motívum kritikus az ATP hidrolízisében csakúgy, mint a NBD-ek és a TMD-ek közötti kommunikációban [48, 49]. A D-loop-nak valószínűleg a katalitikus kötő helyek közötti kommunikációban lehet szerepe [46]. A H-loop vagy kapcsoló régió (switch region) a szubsztrát indukálta ATP hidrolízis folyamatában résztvevő fontos peptid szekvencia lehet [50, 51]. A Q-loopról egyes szerzők feltételezték hogy a γ -foszfát hidrolízisében tölthet be szerepet [52], mások szerint ezen peptid motívum mutációja önmagában nincs hatással az ATP hidrolízisére, de valamilyen módon rontja a NBD-ek és TMD-ek közötti kommunikációt [53, 54]. A nemrégiben közölt aromás aminosavakban gazdag A-loop nagyfokú konzerváltsága révén feltehetően szintén a NBD részét képezheti, és az ATP adenin-gyűrűjével van kölcsönhatásban [55, 56].

Az ABC transzporterek osztályozását, illetve az egyes alcsaládok egy-egy jeles képviselőjét mutatja be a **2. ábra** [58]. Az ABCA illetve az ABCC család tagjai kizárólag teljes transzportereket tartalmaznak, az ABCD illetve az ABCG család féltranszporterekből áll. Az ABCG2/BCRP/MXR egy tipikus homodimerként funkcionáló ABC fehérje, ahol a két féltranszporter diszulfid hidakkal kapcsolódik egymáshoz [59] [60]. Az ABCB család az egyetlen család, mely teljes transzportereket pl. ABCB1/MDR1/Pgp valamint fél

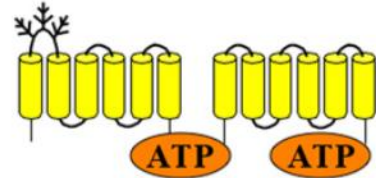
ABCA

pl. ABCA4/ABCR retinol transzporter



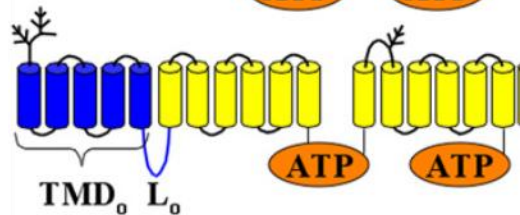
ABCB

pl. ABCB1/MDR1/Pgp drog transzporter

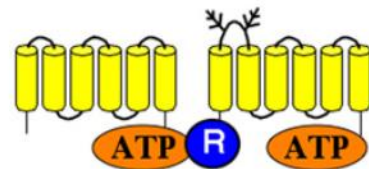


ABCC

pl. ABCC1/MRP1 drog transzporter



pl. ABCC7/CFTR Cl⁻ csatorna



ABCD

pl. ABCD3/PMP70 peroxiszómális transzporter



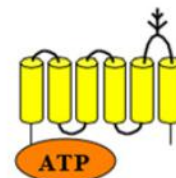
ABCE/F

pl. ABCF1 fehérje transzlációs faktor



ABCG

pl. ABCG2/BCRP drog transzporter



2. ábra Az ABC transzporterek osztályozása illetve az egyes alcsaládok egy-egy jeles képviselője

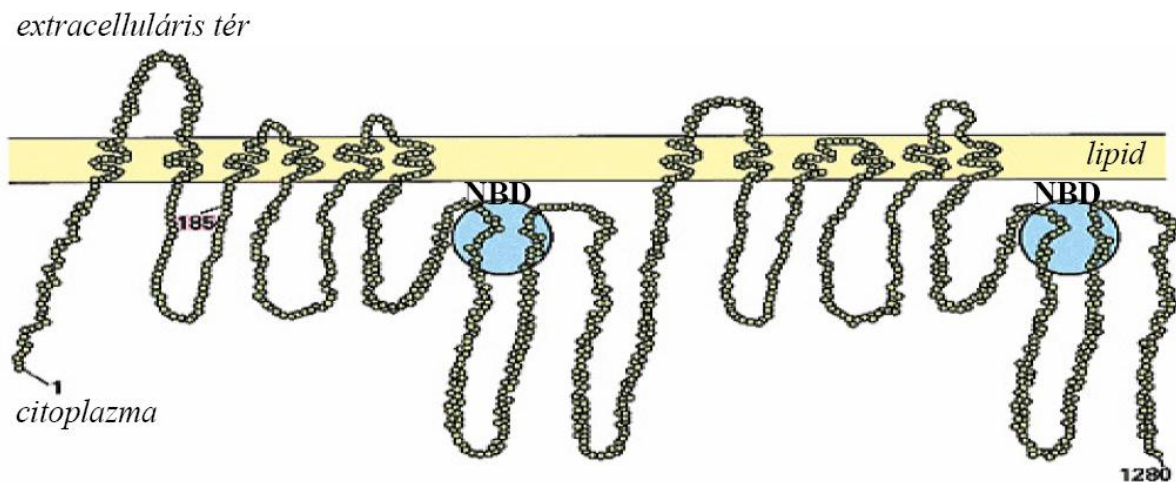
(ATP: nukleotid kötő domén; sárga oszlopok: transzmembrán domén) [58].

transzportereket is tartalmaz. Az immunsejtek antigén-prezentációjában fontos szerepet játszó ABCB2/TAP1 és ABCB3/TAP2 („transporter associated with antigen processing”) féltranszporter együttműködése a heterodimerizáció szép példája [61, 62]. Az ABCE valamint az ABCF család tagjai kizárólag nukleotid kötő doméneket tartalmaznak, de ezen nukleotid kötő doménjük alapján filogenetikailag egyértelműen az ABC transzporterek szuperfamilájába sorolandóak. A család tagjai a közös evolúciós eredet ellenére számos

bizonyos funkciókhoz kapcsolt különbséget is mutatnak. A cAMP regulált klorid-ion csatornaként működő ABCC7/CFTR például extra hosszúságú intracelluláris loopként tartalmaz még egy ún. regulátor domént is [63]. Az ABCC1/MRP az N-terminálisán egy rövidebb extra transzmembrán doménnel egészült ki. Bár úgy tűnik, ezen extra domén deléciója nem eredményez funkcióvesztést [64], nem úgy a linker rész (L₀) mely a következő transzmembrán doménhez kapcsolja [65].

1.4 Az ABCB1 vagy P-glikoprotein

Jack Riordan 1979-es drog rezisztens sejtekből készített plazmamembrán vezikulákon végzett kísérletei - mely szerint a Pgp nem volt eltávolítható ezen vezikulákból a perifériás fehérjékkel együtt, ellenben bizonyos nem-ionos detergenssekkel, több más membrán fehérjével együtt szolubilizálható volt – már előrevetítette, hogy egy integráns membránfehérjéről van szó [10]. Az 1986-ban publikált *mdr1* cDNS szekvenálási adatok alapján meghatározott elsődleges szerkezet ezt egyértelműen megerősítette [21-23] (**3. ábra**).



3. ábra A Pgp hidrofóbictási plot alapján feltételezett első szerkezete az aminosav sorrend ismeretében [23].

A 7-es kromoszómán található humán *mdr1* gén [66] egy 1280 aminosavból álló transzmembrán fehérjét kódol, mely feltehetőleg két, a plazmamembránt hatszor átvelő α -helixek által alkotott homológ transzmembrán doménből és két nukleotid kötő doménből áll. A névadó glikozilációs helyek az első nagyobb extracelluláris loop-on (hurkon) helyezkednek el. Az első adatok alapján felvázolt szekvencia homológia a két fél között (43 %-os szekvencia homológia)[22, 23], valamint bizonyos intron-párok konzerváltsága arra engedett következtetni, hogy a Pgp-t kódoló gén egy ősi, hat transzmembrán doménnel rendelkező

fehérje génjének duplikációjával jött létre, mely további mutációkon esett át az evolúció során [67]. Chen és mtsai az általuk 1990-ben meghatározott teljes exon/intron struktúra alapján, mely szerint valójában csupán két intron-pár található konzervált pozícióban (mindkettő a NBD-en belül), egy másik evolúciós utat javasoltak. Ez alapján a Pgp két hasonló, de egymástól független fehérje génjeinek fúziójaként jöhetett létre [68].

A Pgp kapcsán felmerülő egyik legérdekesebb kérdés, hogy hogyan képes egyetlen fehérje ennyi szerkezetében és méretében eltérő szubsztrát felismerésére és pumpálására? Mely kérdésre az egymással szorosan párhuzamosan futó, a Pgp valódi három dimenziós szerkezetének, komplex drog kötőhelyének, valamint pontos működési mechanizmusának megfejtésére irányuló számtalan kísérletről lassan talán választ kapunk.

A Pgp működési elvének megértésére irányuló törekvések első lépése az alapvetően fontos funkcionális egységek meghatározása volt. Korai vizsgálatok bebizonyították, hogy bármelyik molekulafél mutációja önmagában képes a Pgp működésének inaktiválására [69, 70]. Egy funkcióképes transzporter létrehozásához a molekula két felének szoros együttműködése szükséges [71], mely folyamatban a két felet összekötő 75 aminosavból álló flexibilis linker szakasznak kiemelt szerepe van [48], feltehetően a két ATP kötőhely közötti kommunikációban betöltött szerepe miatt. A transzmembrán doménekhez hasonlóan mindkét ATP-kötő hely szükséges volt a működéshez [72, 73], mely előrevetítette azt a ma már ismert tényt, hogy két nukleotid kötő domén együttesen hozza létre a két ATP kötéséhez szükséges nukleotid kötő zsebeket (lásd ABC transzporterek szerkezete).

Számos mutációs (deléciós mutánsok, cisztein mutánsok, arginin mutánsok létrehozása) valamint a fehérje tiol csoportjaival keresztkötetést létrehozó szubsztrátokkal történő vizsgálat kísérte meg a drogekötőhely vagy legalábbis azon aminosav oldalláncok azonosítását, melyek szerepet játszhatnak a fehérje-ligand kölcsönhatásban és segíthetik a drogranzsport mechanizmus pontosabb megértését. Cisztein mutáns Pgp-n végzett kísérletek megerősítették a hidrofóbicitási plot alapján 1986-ban felvázolt szerkezetet, miszerint a Pgp mindkét fele 6-6 transzmembrán szegmensből áll [74]. A korai transzport kísérletek két eltérő drog kötőhelyet azonosítottak a rhodamine (R-kötőhely) és a Hoechst 33342 festék (H-kötőhely) számára, valamint egy szabályozó funkciót betöltő harmadik kötőhelyet, ami prazosin illetve progeszteron kötésére volt képes [75, 76]. Diszulfid-hidas keresztkötetési kísérletek a 4-5-6-os valamint 10-11-12-es transzmembrán hélixek együttes közreműködését feltételezték a drog kötőhely-kötőhelyek kialakításában [77]. Egyéb tanulmányok számos további kötőhelyek meglétéről számoltak be [78, 79]. Mindezen megfigyelések alapján felvetődött annak

lehetősége, hogy ezen kötőhelyek valójában a transzmembrán domének által kialakított közös felszínen helyezkednek el [78, 80].

Számos adat utalt arra, hogy a Pgp már a plazmamembránban megköti hidrofób, valamint amfifil természetű szubsztrátjait, illetve, hogy a drog kötőhelyek valóban a TMD-ken helyezkedhetnek el. Különböző gátlószerek Pgp-re kifejtett hatása egyenes arányban volt azok PM-ban való feldúsulásukkal [81], valamint a calcein fluoreszcens festék nem fluoreszcens lipofil acetoximetil-észter származékát (calcein-AM) a Pgp még azelőtt eltávolította a sejtekből, mielőtt az fluoreszcens festékké alakulhatott volna a citoplazmatikus nem-specifikus észterázok által [82]. A drog kötőhelyek TMD-ken való elhelyezkedését tovább erősítette az a tény, hogy a NBD-eket nem tartalmazó csonkolt mutánsok megtartották szubsztrát kötő képességüket [83]. Ezek és számos egyéb példa támasztotta alá azt a korábbi elgondolást, mely szerint a Pgp nem a vizes intracelluláris térből, hanem ún. „hidrofób porszívóként” már a lipid kettősrétegből gyűjti össze a különböző drogot és ily módon már a PM-ban képes amfifil, illetve hidrofób szubsztrátjainak feltartóztatására [84-86]. Azaz a Pgp szubsztrát specificitását a drog kötőhellyel való kölcsönhatás mellett az adott vegyület lipid oldhatósága is befolyásolja.

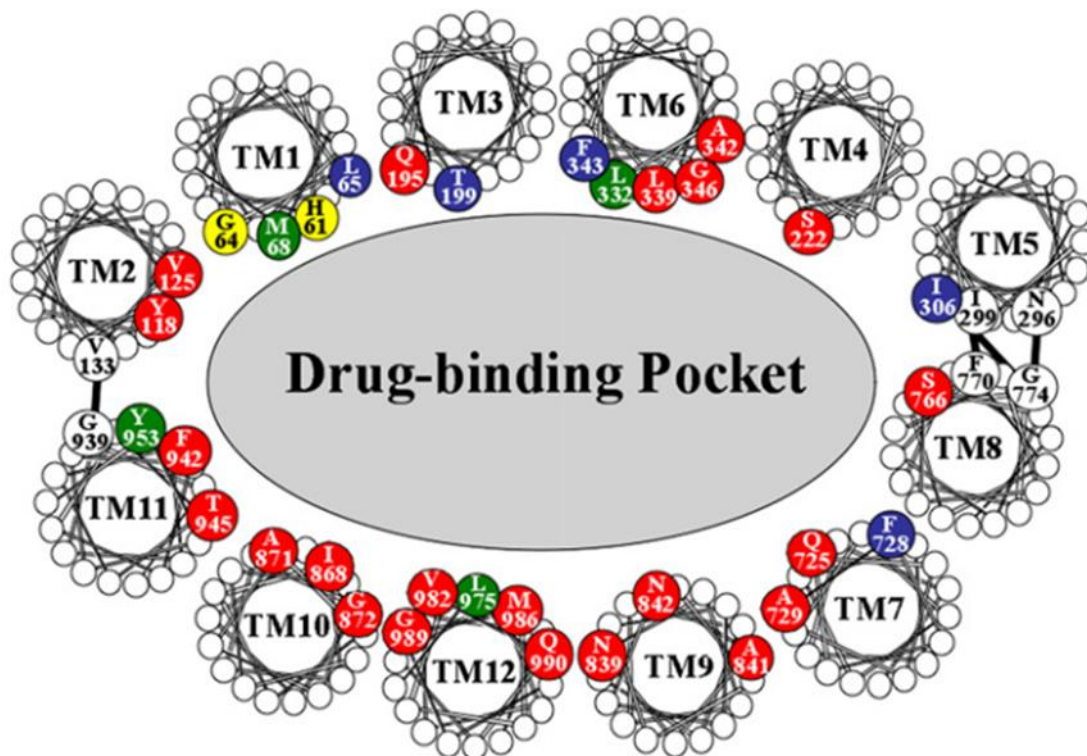
Azon megfigyelés, hogy a Pgp képes rövid szénláncú membránlipidek transzlokálására a plazmamembránon keresztül, valamint az, hogy a Hoechst 33342 Pgp szubsztrát kötőhelye a citoplazmatikus membrán lemezben lehet, egy másik elképzelt működési modell meglétét erősítette [87-89]. Eszerint a Pgp szubsztrátjait a sejtmembrán belső lemezéből a külső lemezébe átfordítva ún. flippázként egyenlőtlen eloszlást idéz elő a plazmamembránban. A Pgp működésének hatására a szubsztrátok az extracelluláris lemezben dúsulnak fel, ahonnan a molekulák az extracelluláris térbe diffundálhatnak [90, 91].

Korai, a 6-os illetve 12-es transzmembrán szegmenst érintő cisztein mutánsokon, szubsztrátok és ATP mellett végzett keresztkötési vizsgálatok bizonyították [92], hogy ezen transzmembránszegmensek keresztköthetőek drog stimulálta ATP hidrolízist követően. A transzmembrán szegmensek előzetes keresztkötése mellett viszont gátolt volt az ATP hidrolízis, mely gátlás a diszulfid hidak felbontásával megszüntethető volt. Ezek az eredmények korábbi megfigyelésekhez hasonlóan [93, 94] már feltételeztek egy konformáció változásban megnyilvánuló szoros kommunikációt a drog kötőhely valamint a nukleotid kötőhelyek között. Feltételezhető volt, hogy a Pgp szubsztrát kötő helye nagy és alacsony affinitást biztosító konformációs állapotok között alternál a NBD-ken megvalósuló ATP hidrolízis függvényében. Rádioaktív ligand kötési kísérletek azt mutatták, hogy a vinblasztin ATP távollétében mutat nagyobb affinitást a Pgp-hez, míg ATP analóg jelenlétében pedig

alacsonyabb affinitással kötődik [95]. Ezen korai sejtbioológiai és biokémiai vizsgálatok során levont következtetések még mindig rendkívül fontosak, annak ellenére, hogy azóta rendelkezésünkre áll számos elektronmikroszkópos szerkezeti eredmény [96, 97], valamint a Pgp-vel szekvencia homológiát mutató bakteriális ABC transzporterek [98-100], illetve az egér ABCB1a [101] kristályszerkezetének szerkezeti részletei. Ha figyelembe vesszük a különböző mutációs vizsgálatok, módosított drog szubsztrátok, vagy akár a kristályszerkezet meghatározás során felmerülő artefaktumok lehetőségét, valószínűtlennek tűnik, hogy bármely módszer önmagában választ adhatna a felmerülő kérdésekre.

Mai ismerteink alapján a Pgp egy komplex a transzmembrán domének által kialakított kötőhellyel, kötő zsebbel rendelkezik, amelyet a transzmembrán helixek aminosav oldalláncai bélelnek. A szubsztrátok és a Pgp aminosav oldalláncai között különböző, mindig az adott szubsztrátra jellemző hidrofób és van der Waals kölcsönhatások alakulnak ki. A „szubsztrát indukálta illeszkedés” során az egyes szubsztrátok Pgp-hez való affinitását ezen kölcsönhatások eredői határozzák meg [102]. A **4. ábrán** azon aminosav oldallánccok láthatóak, melyekről eddigi mutációs kísérletekből származó ismereteink alapján feltételezhető, hogy részt vehetnek a szubsztrát kötőzseb kialakításában.

Más elképzelés szerint azonban a valódi drogkötésben csak bizonyos transzmembrán domének vesznek részt (the domain interface model) [103]; a feltételezett transzmembrán párok az 5-ös illetve 8-as transzmembrán helix pár, valamint a 3-as és 11-es transzmembrán helix pár.



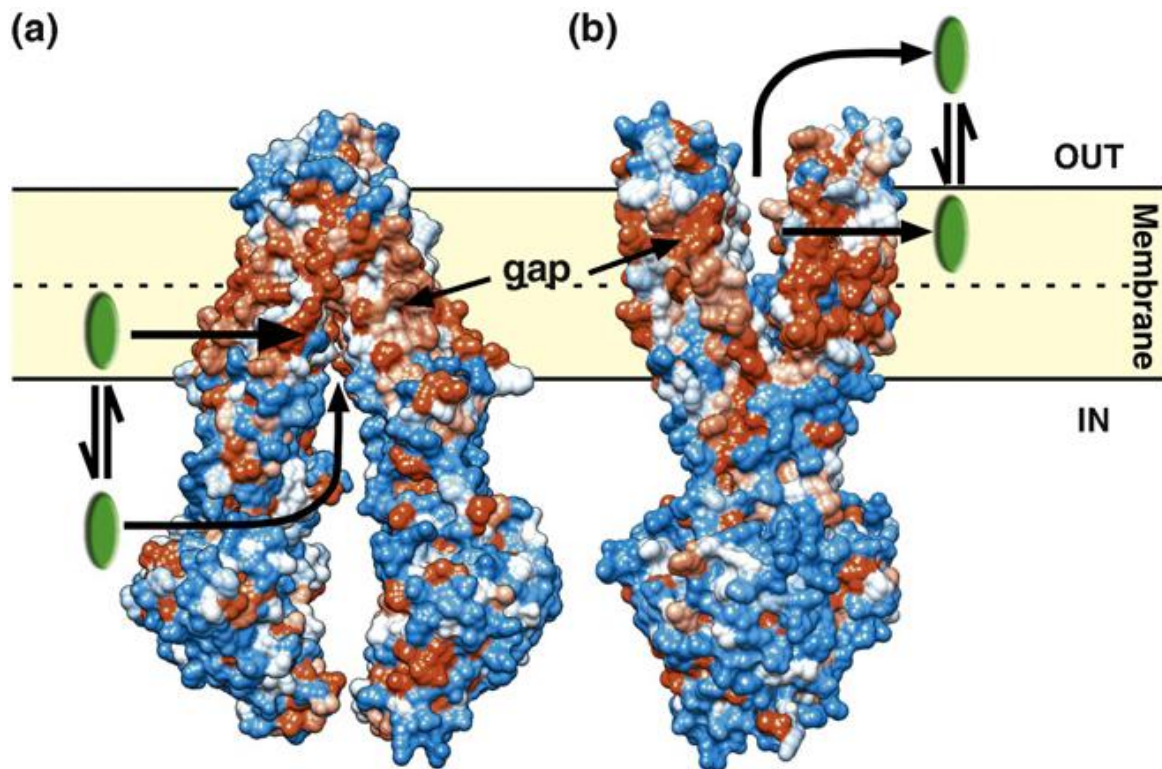
4. ábra A szubsztrát kötősebet alkotó aminosav oldalláncok felderítésére tett mutációs kísérletek eredményeinek összefoglalója [58].

A transzmembrán hélixek elrendezése még a Sav1866 bakteriális ABC transzporterének extracelluláris tér felé nyitott kristályszerkezete alapján történt. A kék aminosavak cisztein mutáns-tiol reaktív szubsztrátokkal végzett vizsgálatokban ATPáz aktivitást indukáltak. A pirossal jelölt aminosav oldalláncok hasonló kísérletben gátolták a szubsztrát indukálta ATPáz aktivitást, de a gátlás a tiol reaktív szubsztrát kezelés előtt adott szubsztráttal kivédhető volt. Az ATP hidrolízis alatt keresztköthető cisztein mutált oldalláncok zöld színnel láthatóak. A vonalak a 4 °C-on oxidálószer jelenlétében keresztköthető ciszteineket jelöli. Sárgával jelöltek azok az oldalláncok, melyek megváltoztatták a Pgp szubsztrát specificitását arginin mutációt követően.

Aller és mtsai a nemrégiben közölt 3,8 Å felbontású egér ABCB1a kristályszerkezete alapján [101] (88%-os szekvencia homológia a humán ABCB1-gyel) egy jelentős 6,000 Å³ méretű kötő üregről számolnak be, mely korábbi eredményekkel összhangban akár több drog együttes kötésére is képes [104, 105].

Korábbi, illetve a nemrégiben közölt bakteriális ABC transzporterek, illetve egér ABCB1a kristályszerkezetének ismeretében azt mondhatjuk, hogy a fehérje nukleotid távollétében egy ún. befelé (a citoplazma felé) nyitott konformációban van (5. ábra). A TMD-ek között ebben a konformációban a citoplazmatikus lemez számára hozzáférhető rés található, mely összhangban van a korábban elképzelt hidrofób porszívó vagy akár flippáz modellel is. Nukleotidok jelenlétében a fehérje kifelé (az extracelluláris tér felé) nyitott konformációba

kerül, ahol a transzmembrán domének közötti rés immár az extracelluláris lemez számára hozzáférhető.



5. ábra A szubsztrát efflux modellje

(a) Az ABCB1 befelé (az intracelluláris tér felé) nyitott konformációja egér ABCB1a kristályszerkezete alapján [101]. (b) Az ABCB1 feltételezett kifelé (az extracelluláris tér felé) nyitott konformációja az MsbA [100] valamint Sav1866 [98] bakteriális ABC transzporterek kristályszerkezete alapján. [106].

Biokémiai és a kristályszerkezeti adatok alapján a transzport mechanizmus legalább 4 lépésre osztható fel. (1) A szubsztrát a citoplazmatikus membrán lemezből vagy a citoplazmából a két transzmembrán domén közötti résen keresztül belép a szubsztrát kötő üregbe és kötődik a nagy affinitású ligand kötőhelyhez. (2) Az ATP kötése és/vagy hidrolízise alatt a transzmembrán szegmensek konformációváltozáson mennek keresztül, amely során a citoplazmatikus lemez felé eddig nyitott rész bezárul, majd az extracelluláris lemez felé kinyílik, miközben a Pgp és szubsztrátja közötti különböző intermolekuláris kapcsolatok csökkenésével romlik a szubsztrát affinitása a drog kötőhelyhez. (3) A ligand a laterális résen keresztül távozik a külső membrán lemezbe, vagy a vizes extracelluláris térbe. (4) A szubsztrát disszociációját követően a transzmembrán domének visszatérnek az intracelluláris tér felé nyitott nagy affinitású konformációs állapotba [106]. Ambudkar és mtsai egy 1999-ben javasolt modellben [107] két független drog-kötőhelyet különböztettek meg, egy nagy affinitású „ON” kötőhelyet, illetve egy alacsonyabb affinitású „OFF” kötőhelyet, mely

utóbbira a szubsztrát az extracelluláris térbe történő távozása előtt kerül át. Mai ismereteink alapján ez a modell új megvilágításba kerül. Ezen kötőhelyek akár egyazon kötőhelyet is jelenthetnek, hiszen a drog kötőzseb központi elhelyezkedése a foszfolipid kettősrétegen belül, valamint a fehérje befelé és kifelé nyitott konformációs állapot közötti alternálása következtében - mely lehetővé teszi a szubsztrát hozzáférését mindkét lemez számára - gyakorlatilag a szubsztrát elmozdulása nélkül is lehetséges. Valószínűnek tűnik korábbi biokémiai [92, 108] és mostani kristályszerkezeti adatok alapján a transzmembrán hélixek rotációja a ciklus során, mely a transzmembrán domének által rejtett pozícióba, vagy akár a lipid kettősrétegbe ágyazza a korábban a szubsztrát kötő zseb számára még hozzáférhető aminosav oldalláncokat [106]. A korábban már említett artefaktumok lehetősége miatt azonban számos kérdésre egyelőre nem adható egyértelmű válasz.

1.5 A Pgp trafficking folyamatai

1.5.1 Intracelluláris elhelyezkedés, ismert trafficking útvonalak

A Pgp ~140-150 kDa-os core-glikozilált fehérjeként szintetizálódik az ER-ban. Az eddig ismert transzkripciós faktorok között szerepel a c-Jun [109], a D vitamin receptor [110], a FOXO3a [111] és a számos más fehérje transzkripcióját is befolyásoló nukleáris faktor κ B [112]. A hősokk faktor 1 és a hősokk fehérje 27 esetén azt találták, hogy gátolta a fehérje expresszióját a fehérje transzkripcióját befolyásoló mutáns p53 illetve a már említett NF- κ B akkumulációjának gátlásával [113]. Az ER-ban a megfelelően feltekeredett (normal folding) fehérje - mely folyamat pontos szabályozásáról eddig kevés információnk van -, a Golgi-ba kerülve az első extracelluláris hurkon elhelyezkedő három N-glikozilációs helyen további glikoziláción megy keresztül és éri el végülis az emlős sejtekben jól ismert ~170 kDa-os molekula tömeget [114-117]. Feltehetően számos chaperone fehérje befolyásolja ezt a glikozilációs folyamatot, mint például a nemrégiben azonosított ER-kötött fehérje egyik új izoformája a Bap29varP, melynek úgy tűnik fontos szerepe van a Pgp sejt felszínre történő szállítási folyamataiban az N-glikoziláció végső lépéseiben játszott szerepe miatt [118].

A glikozilációs lépéseket követően a PM-ba kikerült érett Pgp a linker szakaszon még foszforilálódhat. Eddigi ismeretink alapján az azonosított kinázok között szerepel a PKC és PKA [119].

Dong Fu és mtsai által végzett Pgp-EGFP-s kísérletekben az első fluoreszcens jeleket a transzfekciót követő 8. órában tapasztalták. A 12-15. órában a fehérje intracellulárisan helyezkedett el egy ER-szerű citoszolikus kompartmentben, míg 18-20 órával a transzfekció

után a maghoz közeli Golgi apparátusban. 24 órával a transzfekciót követően pedig már erőteljes jel figyelhető meg a sejtek plazmamembránjában [120]. Korábbi eredmények is azt mutatják, hogy a megszintetizált fehérje, körülbelül 2-4-6 óra alatt érik 170 kDa-os glikoproteinné [114, 121].

A Pgp polarizált és nem-polarizált sejtek esetén is kétféle módon kerülhet az apikális membránba vagy plazma membránba. A konstitutív útvonal során a fehérjék vezikulákba csomagolva a citoskeleton mentén közvetlenül kerülnek a sejt felszínre. A másik lehetséges útvonal során a fehérjék intracelluláris poolként először különböző endoszómális kompartmentekbe kerülnek és innen gyakorlatilag közvetve szállítódnak a sejt felszínre. Polarizált WIF-B hepatocita eredetű sejtekben a Pgp a Golgi-ból közvetlenül az apikális sejt felszínre került [122], míg más tanulmányok szerint a Pgp hasonlóan más apikális fehérjékhez a Rab11a pozitív intracelluláris recirkuláló endoszómákban várakozik, és innen kerül az apikális sejt felszínre, amikor a polarizáció létre jön [123]. Nem-polarizált MCF-7 humán mellrák sejtekben az EEA1 és Rab5 pozitív korai endoszómák bizonyultak intracelluláris átmeneti poolnak a vizsgált Pgp-EGFP sejt felszínre történő kihelyezése során [124]. Kim és Sztul által közölt korai eredményekből feltételezhető, hogy a Pgp folyamatosan internalizálódik és recirkulál [125]. Eredményeik alapján a sejtekben található Pgp pool 30%-a folyamatosan intracellulárisan helyezkedik el, és valószínűleg érett fehérje. Az eddigi Pgp traffickinggel foglalkozó cikkekből amellet, hogy feltételezhető a fehérje folyamatos plazmamembrán és intracelluláris kompartmentek közötti traffickingje, még egy fontos dolog emelhető ki. Különbségek mutatkozhatnak a megfigyelt trafficking útvonalakban és az egyes interakciós partnerekben ezen folyamatok során a különböző sejt vonalak, illetve a már említett polarizáció függvényében. Kim és Sztul humán intesztinális karcinóma sejtekben végzett vizsgálatai szerint például a fehérje folyamatos klatrin és AP-2 függő endocitózison megy keresztül, mely folyamatban a Rab5 fehérje overexpressziója a PM-ban található fehérjék intracelluláris kompartmentekben való akkumulációját eredményezte. Ezen eredményekből feltételezhető a Rab5 szerepe az internalizációs folyamatokban. Fu és mtsai ugyanakkor HeLa sejtek Pgp-EGFP és domináns-negatív Rab5 egyidejű expressziója során szintén a Pgp intracelluláris kompartmentekben való felhalmozódását tapasztalta, melyből a szerzők arra következtettek, hogy a Rab5-nek a PM felé irányuló exocitotikus folyamatokban van fontos szerepe ezen sejt vonal esetén [126]. Hasonlóan drog rezisztens leukémia sejtekben a Rab4 fehérjék overexpressziója csökkentette a sejt felszíni Pgp mennyiségét, míg HeLa sejtek esetén nem eredményezett változást a fehérje intracelluláris disztribúciójában [127, 128]. Ezen sejt vonal esetén a Rab5 mellett talán még inkább a RalA bizonyult fontos

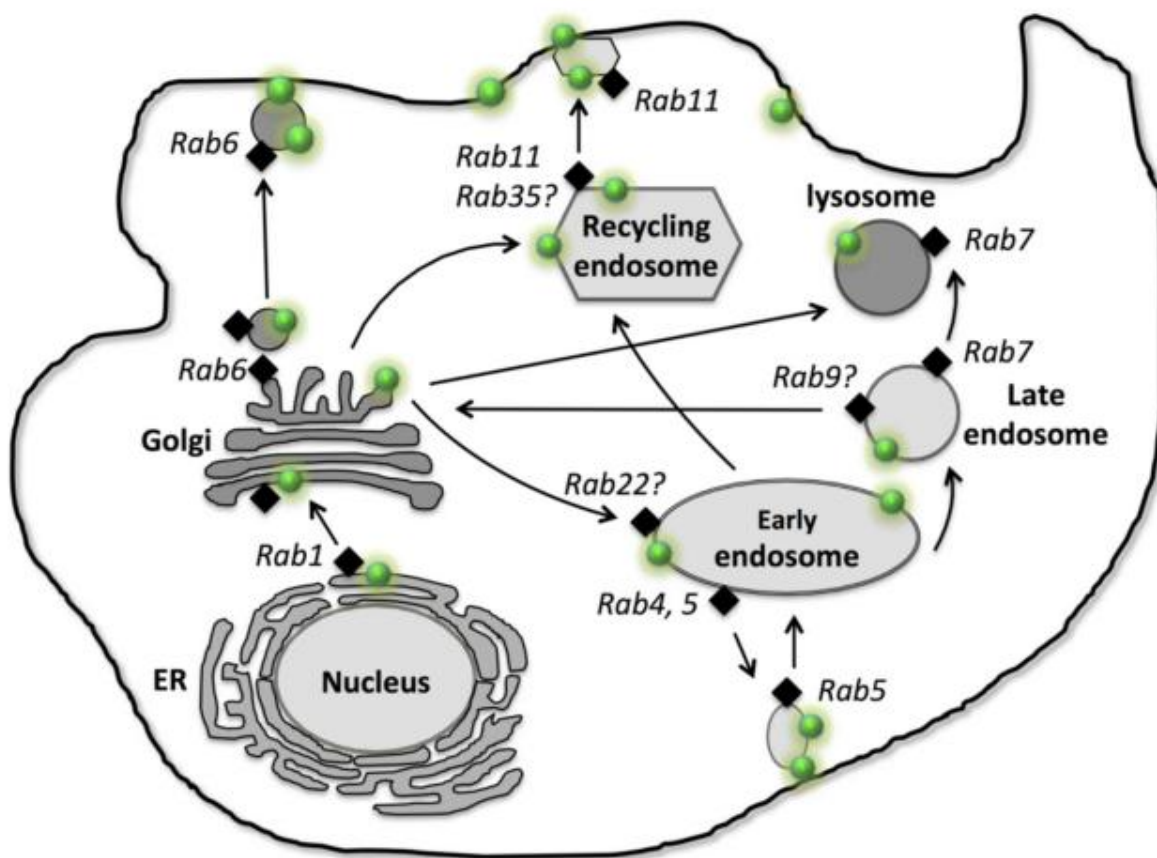
fehérjének a Pgp endocitotikus és recirkulációs folyamataiban [126]. Ezek a kísérletek felhívják a figyelmet arra, hogy a Pgp különböző sejtvonalakon vizsgált internalizációs és recirkulációs folyamatainak részletei nem feltétlenül általánosíthatóak. Ugyanakkor viszont egyértelmű, hogy ezeknek a Rab fehérjéknek fontos szerep jut a Pgp trafficking szabályozása során.

A fehérje PM-ban betöltött szerepéből, illetve a már említett plazmamembrán és az endocitotikus-recirkuláló kompartmentek között megvalósuló folyamatos traffickingjéből már feltételezhető, hogy a citoskeleton különböző elemeinek fontos szerep jut a MDR illetve a Pgp traffickingje során. Egyelőre viszonylag kevés tanulmány foglalkozik a mikrotubulusok szerepével a Pgp sejtfelszíni kifejeződésében [129, 130]. Sai munkájában polarizált WIF-B hepatocita eredetű sejtek esetén azt találta, hogy a Pgp a TGN-ből nagy részt közvetlenül, korai endoszómák vagy recirkuláló endoszómák érintése nélkül kerül ki az apikális sejtfelszínre, és ennek a TGN-PM útvonalnak a nagyobb része a mikrotubulus hálózat közreműködésével történik. Georges és mtsai eredményei szerint az α - és β -tubulinfehérjék a Pgp linker szakaszával létesítenek közvetlen kapcsolatot.

Takeshita és mtsai korai oszteosarkóma sejteken végzett vizsgálatai alapján úgy tűnik, hogy a multidrog rezisztens daganat sejtek a szenzitív tumor sejtekkel összehasonlítva fokozott mennyiségű szervezett aktin filamentum struktúrákat tartalmaznak, mely struktúrák aktin polimerizációt gátló szer melletti szétszerelődése a doxorubicin rezisztencia megszűnéséhez vezetett [131]. Tsuoro és mtsai még korábban daunomicin és vinkrisztin rezisztens sejtekben szintén azt látták, hogy az aktin filament rendszer kiemelkedőbb szerepet játszik a tumor sejtek rezisztenciájának megtartásában mint a mikrotubulus hálózat [132]. Luciani és mtsai humán limfóma sejteken azt találták, hogy a Pgp kolokalizál és immunoprecipitálható az ezrin, radixin és moesin (ERM) aktin citoskeletonhoz kapcsolódó fehérjékkel, mely fehérjék gátlása a drog rezisztencia megszűnését eredményezte a Pgp-mikrofilamentum kapcsolat gátlásával, és ez a Pgp sejten belüli véletlenszerű eloszlását eredményezte [133]. A kutatócsoport korábbi munkája során makrofág sejtek INF γ kezelésénél is azt tapasztalta, hogy az overexpresszáldott Pgp molekulák polarizált sejtfelszínre történő kihelyezése párhuzamos bizonyos aktin-kötő fehérjék redisztribúciójával. Az ezrin és Pgp kolokalizációja itt is kimutatható volt [134]. Bacsó és mtsai FRET eredményei alapján a Pgp szintén kolokalizációt mutat bizonyos raft markerekkel és molekuláris közelségben van olyan raft fehérjékkel mint a CD44 vagy CD59. Feltételezhető a CD44 szerepe a fehérje aktin kötésében az ERM fehérjéken keresztül [135]. Fu és mtsai szintén a mikrofilamentum kiemelkedő

szerepéről számolnak be humán mellrák sejtekben a Pgp-EGFP recirkulációs trafficking folyamataiban [124]. Mindezek alapján, úgy tűnik, hogy az aktin mikrofilamentum hálózatnak fontos szerepe van a Pgp trafficking folyamataiban, illetve a PM folyamatos Pgp expressziójának biztosításában, feltehetően a fehérje plazmamembrán és különböző intracelluláris kompartmentek közötti állandó internalizációs és recirkulációs folyamataiban betöltött szerepe miatt.

A sejt felszínre történő trafficking során érintett organellek mellett számos más helyen is leírták a Pgp jelenlétét. A multidrog rezisztens sejtekben megfigyelhető, a Pgp szubsztrátjaiként is számontartott drogok intracelluláris szekvesztrációja [136-138], valamint az tény, hogy a sejt felszíni Pgp molekulák gátlása nem jár a rezisztencia teljes megszűnésével, több kutatócsoportot sarkalt arra, hogy funkcionális Pgp jelenlétét feltételezze különböző intracelluláris sejtorganellek membránjában. Az adatok azonban eléggé ellentmondásosak.



6. ábra A Pgp intracelluláris lokalizációja, traffickingje és recirkulációja

A P-glikoprotein zöld pontként látható az ábrán. A fehérje trafficking és recirkulációs folyamataiban részt vevő Rab GTPázokat fekete négyzetek jelzik. A nyilak az intracelluláris organellek közötti, valamint az organellek és a plazmamembrán között megvalósuló útvonalakat demonstrálják [142].

Több szerző detektálta a Pgp jelenlétét például a sejtmag membránban [139-141] és feltételezte szerepét a sejtmag drogokkal szembeni védelmében. Szaflarski és mtsai szerint ezen lokalizációjú Pgp-k más glikozilációs mintával is rendelkeznek, mely összecsenghet azzal az elképzeléssel, hogy a glikoziláció a fehérje sejten belüli lokalizációját meghatározó trafficking folyamatok fontos szabályozója lenne [143]. Más szerzők ezzel szemben nem tapasztalták a Pgp lokalizációját ezen sejtorganellum membránjában [120, 144]. A magmembrán porozitása, mely a Pgp általi efflux ellenére megengedné a drogok passzív diffúzióját, a Pgp sejtmag membránban történő elhelyezkedése ellen szól. Bár a különböző molekulák nukleáris pórus komplexeken keresztül történő áramlása valójában úgy tűnik, hogy a sejtek által szigorúan szabályozott folyamat [145]. A Pgp mitokondriumban való elhelyezkedése kapcsán megjelent cikkek felhívják a figyelmet az egyes sejtorganellumok preparálása során felmerülő kontaminációs problémákra. Két különböző kutatócsoport által publikált eredmények szerint a mitokondriumban elhelyezkedő Pgp egyik elképzelés szerint a sejtorganellum belsejébe pumpálná a különböző drogot és ily módon védené a sejtet azok káros hatásaitól [146], míg a másik elképzelés szerint ellentétes orientációja alapján védené ezt a sejtorganellumot a drogok citoplazmába történő transzportjával [147]. Michael Gottesman laborjában végzett kísérletek - ugyan más sejt vonalakon - talán rávilágíthatnak ennek a zavarba ejtő különbségnek az okára, mely szerint az izolálás során a mitokondrium preparátumok plazmamembránnal szennyeződnek. Az ilyen kontaminált membránokon végrehajtott funkcionális esszékből pedig a vezikula keletkezése során kialakult Pgp orientációnak megfelelően különböző következtetések vonhatóak le [148]. A szerzők nem térnek ki, csak utalást tesznek a sejtmag preparálás során esetlegesen felmerülő hasonló problémákra. Más szerzők primer patkány májsejtek polarizációját befolyásoló folyamatok vizsgálata során szintén nem látták a Pgp jelenlétét a mitokondriumban [142, 149]. Ugyancsak funkcionális Pgp jelenlétét feltételezték párhuzamosan bizonyos Pgp szubsztrátok akkumulációjával, elsősorban a transz-Golgi-ban, hasonlóan a korábbi intracelluláris organellekhez [150, 151]. Mások is detektálták a Pgp jelenlétét a Golgi-ban [130, 144], de morfológiai megjelenéséből és a plazmamembránnal összehasonlítva lényegesen alacsonyabb mennyiségéből fakadóan a szerzők csak a fehérje tranziens jelenlétét feltételezték az ER-beli tartózkodásához hasonlóan. Egyéb tanulmányok, amikor is a Pgp intracelluláris lokalizációja a sejtek drogok iránti nagyfokú érzékenységgel járt [120, 152, 153] szintén arra világítanak rá, hogy a Pgp elsődleges lokalizációja a plazmamembrán, mely összhangban van a Pgp korábban említett szöveti lokalizációjával és feltételezett szerepével a szervezet védekezési mechanizmusában.

Összefoglalva tehát, bár tetszetős az elképzelés, hogy a különböző drogok, multidrog rezisztens sejtekben oly gyakran megfigyelt megváltozott intracelluláris eloszlásában a Pgp-nek ténylegesen szerepe lenne, erre nincs egyértelmű bizonyíték. A Pgp jelenléte viszont bizonyított az ER-ban, a Golgiban, korai endoszómákban, recirkuláló endoszómákban, késői endoszómákban, lizoszómákban és proteoszómákban. Gyakorlatilag azokban az intracelluláris organellumokban melyek a fehérje szintéziséhez, posztranszlációs módosításához, internalizációjához, recirkulációjához, valamint degradációjához köthetőek.

1.5.2 Stabilitás és lehetséges degradációs útvonalak

A plazmamembránban elhelyezkedő érett transzmembrán fehérjéről (170 kDa) ismert, hogy rendkívül hosszú élettartammal rendelkezik. Muller és munkatársai 14-17 órás félettartamról számolnak be, mely szérumban deprivált és magas konfluenciájú sejtek esetén más citoplazmatikus és membránfehérjékkel ellentétben még növekszik is [154]. Más szerzők akár 50 órás félettartamot is említenek [155]. HeLa sejteket Pgp-EGFP-vel transzfektálva a Pgp 3 napig detektálható a sejtekben [120]. Az éretlen core-glikozilált fehérje félettartama ettől lényegesen kevesebb, 2-3 óra [155, 156]. Ezen rosszul feltekeredett, mutáns Pgp-k az endoplazmatikus retikulumban halmozódnak fel és rövid időn belül degradálódnak.

Bár az N-glikoziláció mértéke nagyban függ a Pgp-t expresszáló sejtvonaltól, Sf9 rovar sejtekben például ~148 kDa-os Pgp fehérjék expresszálódnak a PM-ban. Érdekes megfigyelés, hogy ezek az alul glikozilált Pgp-k mégis funkcionálisan aktívnak bizonyultak [157, 158]. Korábbi eredmény, mely szerint vinblasztin rezisztens MDR sejtvonalakat tunikamicin (glikozilációt gátló) szerrel tartva, a sejtfelszíni Pgp-k glikozilációja csökkent ugyan, de ez nem járt a vinblasztin intracelluláris akkumulációjával, szintén kizárta, hogy funkcióképes Pgp-k csak megfelelően glikozilált fehérjék lehetnek [4]. Ling glikoziláció deficiens Pgp-vel végzett kísérletei során szintén erre a következtetésre jutott [159]. Valóban úgy tűnik a teljes glikoziláció nem feltétlenül szükséges a Pgp drog kötéséhez és transzport funkciójához, de az a tény, hogy az 1-es extracelluláris hurkon elhelyezkedő N-glikozilációs helyekből legalább kettő erősen konzervált szekvencia az emlős sejtek esetén, a korábbi megfigyelések ellenére arra utal, hogy kell, hogy legyen valamiféle evolúciós kényszer, ami ezeket a szekvenciákat megtartotta. Több munkacsoport arra a következtetésre jutott, hogy a megfelelő glikoziláció a fehérje funkciójának megtartásához ugyan valóban nem szükséges, de erősen befolyásolhatja annak traffickingjét és stabilitását [117, 160].

Az ismert, glikozilált fehérjék esetén releváns chaperone-ok közül [161] egy ER integráns membrán fehérjéről a calnexinről írták le, hogy mind a vad típusú mind a mutáns Pgp-vel asszociál, de csak a vad-típusú fehérjék képesek a calnexinről ledisszociálva elérni a plazma membránt [155]. A calnexinről ismert, hogy szénhidrát oldalláncot ismer fel és ahhoz kötődik [162]. Kramer és munkatársai saját és a korábbi, itt említett kísérletek megismétlésével próbálta felfedni, mi lehet a sokszor ellentmondó adatok mögött. Szükséges-e valójában a Pgp glikozilációja transzport funkciójának betöltéséhez a plazmamembránban? A sejtfelszíni Pgp mennyiségek csökkenésével párhuzamosan ugyanis, egyik sejtvonaluk esetén, fokozott doxorubicin akkumulációt figyeltek meg glikozilációt gátló tunicamycin kezelést követően. Egy másik sejtvonal esetén a 140 kDa-os alul glikozilált, de foszforilált fehérje a PM-ban helyezkedett el és a sejtvonal megtartotta az MDR fenotípust, habár korábban soha nem volt kitéve drog kezelésnek [121]. Arra a következtetésre jutottak, hogy a Pgp rendkívül hosszú féléletideje miatt a magas expressziós szintet mutató sejtvonalak esetén egy adott időablakban alkalmazott tunikamicin kezelésnek valójában nincs lényeges hatása a Pgp expressziójára. Alacsonyabb expressziós szintet mutató sejtvonalak esetén a hatás azonban már megfigyelhető. Saját, és Ling korábbi eredményeire hivatkozva ők is megjegyzik, hogy a glikoziláció nem feltétlenül szükséges a Pgp funkciójához. Adott esetben alul glikozilált Pgp-k is kikerülhetnek és még működőképeseek is lehetnek a PM-ban. Egyértelműsítik azonban azt a korábbi feltételezést, hogy a Pgp glikozilációja elengedhetetlen annak megfelelő traffickingjéhez és stabilitásához. Tehát a glikoziláció ha nem is kell a Pgp transzportfunkciójához, de hosszú távon szükséges az MDR fenotípus fenntartásához.

A glikoziláció Pgp stabilitásában betöltött szerepére utalnak Loo és Clarke valamint Zhang kísérletei. MDR sejtek tunicamycin kezelését követően - hasonlóan ezen sejtek ubiquitin transzfekciójához - a fehérje fokozott ubiquitinációja és degradációja figyelhető meg. Ez a degradáció, korábbi eredményekkel összhangban, proteaszóma gátló szer (MG-132) mellett elmarad [71, 163]. Wang és mtsai szintén hangsúlyozzák az N-glikoziláció szerepét a Pgp ubiquitináció és degradáció gátlásában [164]. Élesztő két hibrid rendszer, illetve immunoprecipitációs vizsgálatok a Pgp linker régiójának és az RNF2 (RING finger protein 2) E3 ubiquitin ligáznak az interakciójáról számolnak be. A szenzitív és rezisztens sejtek RNF2 expresszióját összehasonlítva a szerzők fontos szerepet tulajdonítanak ezen ligáz downregulációjának a Pgp emelkedett kifejeződésében [165].

Loo és Clarke, a Pgp, mint jellegzetes transzmembrán fehérje kapcsán két lehetséges degradációs útvonalról számol be. Az egyik az ER proteázok által történik, még a Pgp

szintézise alatt. A másik útvonal a poszttranszlációs modifikációt is magába foglaló teljes bioszintézist követő degradációs út. Mutációs kísérletek a Pgp egyes extracelluláris hurkát is proteolitikus degradációra érzékeny hasítási helyként azonosítják. Érdekes módon, a 113-as helyen lévő arginin cseréje, mely nem messze van a konszenzus glikozilációs helytől, megakadályozza az ER proteázok által létrehozott 130 kDa-os proteolitikus degradációs termék keletkezését [166]. A nem megfelelően glikozilált és feltekeredett éretlen Pgp-k tehát az „ER quality control” részeként vagy lebontásra kerülnek az ER proteázok által, vagy ubiquitinálódnak és a proteoszómába kerülve degradálódnak.

Érdekes módon bizonyos Pgp szubsztrátok és modulátorok jelenlétében [156], valamint a sejteket alacsony 26 fokos hőmérsékleten tartva [155], a különböző mutáns Pgp fehérjék képesek kikerülni ezt a kontrollt és érett funkcionális fehérjeként jelennek meg a sejtfelszínen. Az, hogy kapszaicin, ciklosporin, vinblasztin és verapamil ún. kémiai chaperone-ként, sejtvonaltól és mutációs helytől függetlenül, a drog kötőhelyhez kötődve képes volt elősegíteni a fehérje közel natív szerkezetének felvételét és sejtfelszíni megjelenését, egy rendkívül érdekes jelenség az MDR kapcsán.

Hasonlóan a glikozilációhoz, a foszforiláció szerepe sem egyértelmű a Pgp turnover-e során. Bár a Pgp-t foszforiláló szerin/treonin kináz Pim-1 onkogén gátlása egyértelműen csökkentette a sejtfelszíni Pgp mennyiségét [167], azonban korábbi kísérletekben a foszforilációs lépés nem bizonyult meghatározó faktornak a Pgp ubiquitinációjában, degradációjában vagy a drog transzport folyamatában [163, 168].

Míg az éretlen rosszul tekeredett Pgp-k esetén újabb tanulmányok szerint is egyértelmű a fehérje proteoszómabeli lebomlása [169-171], addig a sejtfelszíni Pgp-k esetén ezt nem mondhatjuk el. Zhang és mtsai a plazma membránban található és ubiquitinált Pgp molekulák degradációját szintén a proteoszómában feltételezték, mivel MG-132 proteoszóma gátlószer növelte mind az ubiquitinált, mind a nem ubiquitinált Pgp mennyiségét, míg klasszikus lizoszóma gátlószereknek (pl. monensin) nem volt hatása a Pgp mennyiségére [163]. Újabb tanulmányok szintén a proteoszómát nevezik meg a PM fehérje degradációs helyeként [172]. Okhawa és mtsai egy régebbi munkájában ezzel ellentétben a lactacystin proteoszóma gátlószernek nem volt hatása a fehérje citoplazmatikus és sejtfelszíni mennyiségére. A lizoszóma gátló NH_4Cl -nak viszont igen. Ezek alapján feltételezték az ubiquitinált plazma membrán Pgp-k lizoszómabeli lebomlását [173]. Kim és mtsai a keresztkött és internalizálódott sejtfelszíni Pgp molekulák végső degradációs helyének szintén a lizoszómát

nevezte meg [125]. Hasonlóan Fu és mtsai szintén azonosítottak egy kisebb intracelluláris Pgp-EGFP poolt a lizoszómában [124].

A klasszikus lizin-48 kapcsolt és a fehérje proteosómabeli lebomlást eredményező poliubiquitináció mellett ma már ismert a membrán fehérjék esetében is megfigyelhető számos monoubiquitináció és lizin-63 kapcsolt poliubiquitináció kombinációja, mely az ún. „endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)” irányítása alatt a fehérjéket az endosómákból az ún. multivezikuláris testekbe irányítják, melyek végül a lizoszómával fuzionálnak [174]. A proteosóma gátló szerek szelektivitása kétséges, mivel lizoszómális enzimek gátlására is képesek. Továbbá ezen proteosóma gátló szerek a transzmembrán fehérjék stabilitását befolyásoló intracelluláris kinázok és citoskeletális komponensek proteosómabeli degradációjával szintén befolyásolni tudják a PM fehérjék mennyiségét [175]. Mindezeket figyelembe véve valamint azt, hogy a proteosómában történő lebomlás elsődleges célpontjai valójában rövid életidejű magi, illetve citoplazmatikus fehérjék, a sejtfelszíni Pgp molekulák klasszikus lizoszómában történő lebomlása, mint egy lehetséges degradációs végpont valószínűsíthető. A két párhuzamosan futó degradációs út más membránfehérjék esetén már bizonyított [176], akár számos, eddig még nem ismert útvonal mellett.

1.6 Membránmikrodomének

1970-ben Frye és Edidin egér és humán limfocita sejtek fúzióját követően azt tapasztalta, hogy az adott sejtekre jellemző két különböző fluoreszcens festékkel jelölt fehérje antigének rövid időn belül összekeveredtek a közös sejtmembránban [177]. Ez a jelentős kísérlet lerombolta azt a korábbi elképzelést, mely szerint a lipid kettősrétegből álló membránokban merev, mozdulatlan testekként állnának a fehérjék. 1972-ben Frye és Edidin kísérletét alapul véve Singer és Nicolson megalkotta a „folyékony mozaik” membránmodell-t, mely szerint mind a lipidek, mind pedig a fehérjék szabad laterális mozgásra képesek, és ennek megfelelően egyenletesen random eloszlását mutatnak a membránokban [178]. A tinta alig száradt meg a tanulmányon, amikor már különböző kutatócsoportok eredményei álltak rendelkezésre arról, hogy a fehérjék és lipidek feltételezett véletlenszerű eloszlása a membránban valószínűleg pontatlan, hibás. Röntgen diffrakciós [179], elektronmikroszkópos [180], differenciál pásztázó kalorimetria, anizotrópia [181], spin szondával dolgozó spektroszkópiai eljárások [182], laterális diffúziós (FRAP) [183, 184] és különböző lipid próbák megoszlási kísérleteinek [184, 185] eredményei utaltak arra, hogy a fehérjék és lipidek

elrendeződésében laterális heterogenitás figyelhető meg, és hogy laterális mozgásukat valószínűleg nem kizárólag a szabad diffúzió határozza meg.

1974-ben Lee és mtsai kísérleti eredményeik tükrében „lipid klaszterek” meglétét feltételezték a membránban [186]. Wunderlich és mtsai elképzelése szerint a heterogenitás hátterében „rigid folyadék kristály klaszterek” jelenléte áll, melyeket szabadabb eloszlást mutató folyadékkristály lipid molekulák vesznek körül [187]. 1978-ra a nomenklatúra tovább finomodott, és már „rendezettebb állapotú lipid” struktúrákként („lipids in a more ordered state”) említik ezeket a klasztereket szemben a membránban általánosan megfigyelhető kevésbé rendezett, rendezetlen állapotú lipid struktúrákkal (disordered state) [179]. A „lipid domén” fogalmat először Karnovsky és mtsai említik 1982-es munkájukban. Korábbi és saját eredményeik alapján már következtetéseket vonnak le arra vonatkozóan, hogy ezen domének megzavarása a strukturális következményekkel párhuzamosan funkcionális jelentőséggel is bír [188]. Brown és munkatársai 1992-es tanulmányukban ezen jellegzetes lipid összetételű, koleszterin- és szfingolipid-gazdag mikrodomének egyik mai napig fontos tulajdonságára világítottak rá. Ezek szerint rezisztensek (oldhatatlanok) maradnak hideg 1 %-os Triton-X 100 detergens kezelés során. Ezeket 5-30 % közötti lineáris szukróz gradiensre rétegezve és centrifugálva, nagy mennyiségű, lipid összetételüknél fogva a felső alacsony denzitású frakciókból nyerhetőek vissza [189]. Magát a „raft hipotézist” Simons és Ikonen fogalmazta meg pontosan 1997-ben, mely szerint a telített zsírsavláncokat tartalmazó szfingolipidek koleszterinnel történő laterális összeszerelődése valószínűleg olyan lipid raft (lipid tutaj) struktúrákat hoz létre, ami úszik a glicerofosfolipid-gazdag környezetben és olyan sejtfunkciókban tölt be meghatározó szerepet, mint a bioszintetikus és endocitotikus trafficking folyamatok, illetve a szignál transzdukció. Az egyes fehérjék szelektíven kizáródnak vagy belekerülhetnek ezekbe a doménekbe [190]. Számos elnevezés került használatba az irodalomban ezen klaszterek detergensekkel szembeni viselkedése és jellegzetes lipid összetétele alapján (Detergent-resistant membranes (DRM); Detergent insoluble glycolipid domains (DIG); Low-density triton-insoluble fractions (LDTI) ...).

A fénymikroszkóp elméleti 200-nm-es felbontóképessége alatti méret mellett talán ez, az artefaktumok keletkezésének lehetőségét egyáltalán nem kizáró, detergens alapú azonosítási mód az, ami a leginkább megosztotta a tudományos világot a raftok létezésével kapcsolatban. Ma már olyan mikroszkópos technikák birtokában mint a SIM (Structured Illumination Microscopy; <120 nm felbontóképesség) [191], a STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy; ~80 nm felbontóképesség) [192], valamint 3D PALM/dSTORM (Photo-

activated localisation microscopy/direct Stochastic optical reconstruction microscopy; >20 nm felbontóképesség) [193, 194] - mely technika akár élő nem fixált sejtek vizsgálatára is alkalmas [195] - egyre kevesebb kétségünk lehet ezen struktúrák létezéséről [196-198].

A 2006-os Keystone szimpózium során a tudományterület érdekelt képviselői az alábbi konszenzusra jutottak a raftok, mai ismereteink alapján helytálló definícióját illetően. „A membrán raftok kicsi (10-200 nm), heterogén, rendkívül dinamikus, szterol- és szfingolipid-gazdag domének, amelyek különböző sejtfolymatok kompartmentalizációjában vesznek részt. A kisebb raftok néha fehérje-fehérje, illetve fehérje-lipid kölcsönhatásokon keresztül nagyobb platformokká összeállva stabilizálódhatnak” [199].

Annak ellenére, hogy a lipidek szerepe egyértelműen elismert a fázis szeparációban, egyre több információ áll rendelkezésre arról, hogy ezen struktúrák kialakulásában a lipidek mellett a fehérjék is fontos résztvevők. Éppen ezért megfelelőbbnek találták a résztvevők a „membrán raft” kifejezést a korábban használt „lipid raft” kifejezés helyett. Méret tekintetében a néhány nanométer nagyságú struktúrákat, az úgy nevezett nanoklasztereket a szerzők kizárták, csakúgy mint az olyan nagy komplexeket mint az immunológiai szinapszis. A 200 nm-es felső határt a kaveolák mérete adja, mely egyértelműen elfogadásra került a szerzők által, mint a membrán raft család tagja. Régóta ismert általános tulajdonsága ezen struktúráknak a jellegzetes lipid-összetétel. Detergens alapú technikával izolált raftok lipid-összetételét a teljes membránnal összevetve elmondható, hogy 3-5-ször nagyobb mennyiségű koleszterint és szfingomielint tartalmaznak. A szfingomielin a raft lipidek 10-15%-át képviseli, míg a koleszterin a lipidek akár felét is kiteheti. A glikoszfingolipidek (gangliozidok, cerebrozidok) további jellegzetes lipidkomponensei ezen struktúráknak. Glicerofosfolipidekből viszont a teljes membránnal összehasonlítva legfeljebb fele mennyiséget tartalmaznak [189, 200, 201].

A raftok jellegzetes lipid komponensei tehát a koleszterin és a két telített zsírsavláncot tartalmazó szfingolipidek. Ezen két lipidnek az interakciója az, ami erősen rendezett tulajdonságot kölcsönöz a doménnek. A tudományterület érdekelt képviselői között számos okból régóta elfogadott tény, hogy a raftok rendkívül heterogén struktúrák [200]. Annak ellenére, hogy az előbb említett összetétel általánosságban megállapítható, a raftok valójában nagy változatosságot mutatnak még lipid összetételükben is [202-204]. Egy adott lipid megjelenése a raftokban, vagy kizárása a raftokból, befolyásolja a további lipidkomponensek megjelenését, csakúgy mint a fehérjék összetételét a raftokban. Régóta ismert, hogy ezen domének koleszterin-tartalmának csökkentése befolyásolhatja egy-egy fehérje raft lokalizációját, illetve funkcióját [205-210]. Ugyanakkor egy-egy fehérje megjelenése vagy

hiánya a membrán raftokban hasonlóan befolyásolja a raftok lipid összetételét és ezen keresztül funkcióját [209, 211, 212]. A kaveolák jellegzetes fehérjéjének, a kaveolin-1-nek az expressziója olyan sejtekben melyek egyébként nem expresszálják a fehérjét, 50%-kal növelte a detergens rezisztens frakciók koleszterin tartalmát. Ily módon a raftok heterogenitása talán éppen a fehérje összetételben keresendő, általánosságban elmondható rendkívül változatos struktúrájukból kifolyólag és mivel számtalan módon képesek az egyéb raft komponensekkel interakciót kialakítani és ily módon befolyásolni, módosítani a raftok összetételét.

Az egyik legrégebben ismert szignál ami nagy valószínűséggel az adott fehérje raftokkal történő interakcióját eredményezi, az a glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) lipiddallanc jelenléte a fehérjén [189, 213-216]. Hasonlóan magának a fehérjének a zsírsavmódosítása olyan telített zsírsavakkal mint a palmitinsav, vagy a sztearinsav szintén nagy valószínűséggel eredményezi a fehérje raftokban történő megjelenését a lipid módosított fehérje és a raft lipidek között kialakult lipid-lipid kölcsönhatások következtében [217-221]. Ezek a fehérjék lehetnek szolubilis fehérjék ahol a telített zsírsavlánc interakciója egyéb raft komponensekkel a fehérje raft lokalizációját eredményezi hasonlóan a GPI-kapcsolt fehérjékhez, de régóta ismert transzmembrán fehérjék zsírsavmódosítása is [222-224]. A transzmembrán fehérjék esetén bizonyos aminosav szekvenciák melyek az extracelluláris membránlemez jellegzetes lipidjeivel lépnek kapcsolatba, szintén elősegíthetik a fehérje raft lokalizációját hasonlóan az influenza vírus hemagglutinin glikoproteinjéhez [225]. Transzmembrán fehérjék esetén ismert, hogy magának a membránt átvelő fehérje szakasznak a hossza is raft lokalizációs szignálként szolgálhat, a raft és nem-raft domének különböző membránvastagságából adódóan [226, 227]. Munro egyetlen transzmembrán domént tartalmazó fehérje esetén kimutatta, hogy amennyiben a transzmembrán domén több mint 23 aminosavat tartalmaz, a fehérje képes volt a raftokba integrálódni és elérte a sejtfelszín, de a 17 vagy kevesebb aminosavat tartalmazó fehérje már nem [228]. A fehérje-lipid kölcsönhatásokon kívül, direkt fehérje-fehérje kölcsönhatások is jelentősek lehetnek a protein raft asszociációjában olyan raft fehérjekomponensekkel például, mint a kaveolin-1, vagy a hasonló szerkezetű flotillin [229, 230]. A fehérje-lipid kölcsönhatások közül nagy érdeklődésre tart számot a fehérje-koleszterin kölcsönhatás. Egyértelműen koleszterin gazdag régióban lokalizálódó fehérjék (perifériális benzodiazepin receptor; HIV vírus gp41 fúziós fehérjéje; caveolin-1) aminosav sorrendjének vizsgálata felvetette egy ún. lehetséges CRAC motívum (c_holesterol r_ecognition a_mino acid c_onsensus) jelentőségét a fehérjék raft lokalizációjában, a fehérje megfelelő pozícióban elhelyezkedő koleszterin-kötő régiója és a koleszterin között kialakult másodlagos

kölcsönhatások eredményeként [231-233]. Természetesen egyazon fehérje egyidejűleg számtalan különböző raft lokalizációs szignállal rendelkezhet.

A fehérjék tehát, a lipidekhez hasonlóan, a különböző lipid- és fehérjekomponensekkel kialakított rendkívül változatos kölcsönhatásokon keresztül feltehetően számos módon képesek befolyásolni a raftok összetételét. A raftok rendkívül dinamikus struktúrája valószínűleg éppen ezeknek a lipid- és fehérje-komponenseknek a folyamatos, kölcsönös egymásra hatásában, és ebből kifolyólag összetételük folyamatos változásában keresendő.

A citoszkeletonnak szintén fontos szerep jut ezen metastabil struktúrák szabályozásában. Különböző citoszkeletális és adhéziós fehérjék, mint például az aktin, miozin, vinkulin, kofilin, kadherin, filamin, ezrin rutinszerűen azonosíthatóak a lipid raft preparációkban, a citoszkeleton raftokkal történő szoros kölcsönhatásából kifolyólag [234-239]. A B-sejt antigénreceptor komplex aktivációja során különböző lipid raftok koaleszcenciája figyelhető meg, mely folyamatnak előzetes feltétele a raftok citoszkeleton kapcsolódásában fontos szerepet betöltő ezrin adaptor fehérjének a disszociációja [238]. Ez a folyamat nem csupán a citoszkeleton raftok dinamikájában betöltött fontos szerepére világít rá, hanem arra is, hogy ezen időben rendkívül dinamikus változó heterogén struktúráknak a kialakulása végülis funkcionális következményekkel jár. Régóta ismert, hogy a raftok számos sejtfolyamat kompartmentalizációjában töltenek be meghatározó szerepet. Számtalan szignál transzdukciós folyamat számára biztosítanak platformot és meghatározóak olyan folyamatokban mint a koleszterin trafficking, különböző endocitotikus események, transzcitózis, receptor recirkuláció vagy akár a vírus fertőzés [240-249]. Valójában ez a tulajdonság, hogy megszámlálhatatlan sejtfolyamatban biztosítják időlegesen a szükséges fehérjék és lipidek koncentrációját, „toborzását”, dinamikus összekapcsolását az, ami a raftok jelentőségének alapjául szolgál. A raftok strukturális heterogenitása tehát valójában a funkcionális heterogenitás hátterét biztosíthatja.

1.7 Pgp és membránkörnyezete

Mai tudásunk birtokában már teljesen egyértelmű számunkra, hogy azok az ágensek, melyek befolyásolják a plazmamembrán biokémiai, illetve biofizikai tulajdonságait, szintén képesek módosítani a P-glikoprotein aktivitását. Az a tény, hogy a lipid kettősrétegben bekövetkező változások erős hatással bírnak a Pgp funkciójára, a fehérje drog-kötőhelyeinek transzmembrán doméneken való elhelyezkedése [80], illetve szubsztrátjainak

plazmamembránnal kialakított szoros kapcsolatának fényében [84-86], ma már egyáltalán nem ér minket meglepetésként.

Az 1992-1995-ben közölt fehérje extrakciós és kromatográfiás tisztítási metodika kapcsán Francis J. Sharom és Carl A. Doige munkacsoportja megállapította, hogy minden egyes Pgp 53-56 foszfolipid molekulával van kapcsolatban. Korábbi adatok és saját eredményeik birtokában felismerve azt a tényt, hogy a Pgp funkciójának megőrzésében a lipid környezet fontos szerepet tölt be, nem is tettek kísérletet a fehérje teljes lipid-mentesítésére [250-255]. A fehérje extrakciós kísérletekkel párhuzamosan számos detergensről derült ki, hogy fokozza a Pgp szubsztrátok toxicitását [256, 257], és hogy ennek megfelelően képesek kedvezően befolyásolni a multidrog rezisztencia jelenségét [256, 258-260]. Sharom munkacsoportja kimutatta, hogy alacsony koncentrációban alkalmazott TX100 és NP40 detergensok jelenlétében csökken a fotoaktív szubsztrát analóg, azidopin kötődése a Pgp-hez, mely eredmények összhangban voltak korábbi megfigyelésekkel [260]. Későbbi, kritikus micelláris koncentráció alatt alkalmazott detergensok jelenlétében végzett kísérletek szintén csökkent drog kötődésről számoltak be, párhuzamosan a Pgp csökkent drog-stimulálta ATPáz aktivitásával [261, 262]. Ezek az eredmények már bizonyították azt, hogy a detergensok intracelluláris drogakkumulációt fokozó hatása mögött nem kizárólag a membrán drogokra adott permeabilitás emelkedése húzódik meg, hanem a Pgp, mint transzmembrán fehérje közvetlen gátlása is. A drogkötődés és ATPáz aktivitás gátlása Callagan kísérleteiben lipidek hozzáadásával gátolható volt. A szerző ebben a tanulmányban felhívta a figyelmet arra, hogy a Pgp funkciójának megtartásában a fehérje-lipid határfelület megőrzésének kulcsszerepe van [262]. Regev és munkatársai adataik alapján másokhoz hasonlóan, arra a következtetésre jutottak, hogy a detergensok jelenlétében bekövetkező membrán fluiditás változása az, ami közvetlen gátló hatást gyakorol a Pgp ATPáz aktivitására [263, 264]. A Pgp-nek a membránfluiditás változására adott szokatlan szenzitivitása, ellentétben pl. az ioncsatornákkal, egyértelműen beleillett abba az elképzelésbe, miszerint a Pgp hidrofób porszívóként illetve flippázként működve rendkívül szoros kapcsolatban van a membránnal. Tehát a membrán fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltozása egyértelműen funkcionális következményekkel jár a P-glikoprotein esetén.

Számos tanulmány született ily módon a különböző membránlipidek Pgp-re gyakorolt hatásáról is, melyek akárcsak a detergensok szintén befolyással bírnak a Pgp közvetlen membránkörnyezetére. Doige és munkatársai a különböző detergensok mellett számos foszfolipidnek is vizsgálta a Pgp-re gyakorolt hatását. Telített foszfátidiletanolamin lipid

környezet képes volt aktiválni a Pgp ATPáz aktivitását és megvédeni ezt az aktivitást változó hőmérsékleti viszonyok mellett is. Ugyanakkor a lipidmentesített Pgp katalitikus aktivitásának visszaállításában a telítetlen foszfatidilkolin és foszfatidilszerin lipid környezet volt a leghatékosabb. [253]. Urbatsch és Senior hasonlóan Sharom munkacsoportjához különböző membránkörnyezetbe ültetett Pgp bazális ATPáz aktivitását vizsgálva szintén arra jutott, hogy a sejt típusától függő membránlipid összetétel rendkívül meghatározó a Pgp végleges funkcionális működése szempontjából [250].

A Pgp bazális ATPáz aktivitásának lipid függése bizonyította a lipidek közvetlen hatását a Pgp katalitikus aktivitásában, ugyanakkor egyértelművé vált, hogy a lipid környezet, összhangban a drogranzsport „hidrofób porszívó” vagy „flippáz” modelljével, hasonlóan fontos funkciót tölt be a Pgp szubsztrátok membránon belüli megoszlásában és ennek megfelelően a fehérje drog kötőhelyéhez való kötésében is [265].

Saeki és munkatársai különböző koleszterin mennyiségeket tartalmazó liposzómákba integrált Pgp-k vizsgálata során azt tapasztalta, hogy a koleszterin koncentrációjának emelkedésével kezdetben fokozódott a teszt szubsztrátként használt azidopin kötődése, majd 20 % membránkoleszterin tartalom felett csökkent [254]. Ezek a megfigyelések bizonyították azt, hogy a lipidek kvalitatív tulajdonságai mellett, a lipidarányok kényes egyensúlyának megzavarása szintén fehérje funkció változásokkal járhat együtt.

A raft hipotézis megjelenésével egyre nagyobb figyelem fordult a koleszterin, mint az egyik legfontosabb raft lipid, szerepére a Pgp funkciójának megtartásában, illetve ezzel párhuzamosan a fehérje különböző membránoménekben való elhelyezkedésének jelentősége felé. Különösen nagy érdeklődésre tartott számot a Pgp raft illetve kaveola doménekben való elhelyezkedése annak a ténynek a tükrében, hogy a P-glikoproteint overexpresszáló sejtekre gyakran jellemző a plazmamembrán összetételének megváltozása. Számos tanulmány számolt be az emelkedett Pgp szintekkel párhuzamosan emelkedett glükoceramid, koleszterin és kaveolin-1 szintekről ezekben a sejtekben (lásd 1.8-as fejezet). Lavie és munkatársai megállapították több multidrog rezisztenciát mutató sejtvonal esetén, hogy a sejtfelszíni Pgp-k egy jelentős része megtalálható ezekben a nagy koleszterin- és kaveolin-tartalmú membránrészekben [266, 267]. Demeule szintén kimutatta a Pgp jelenlétét a kaveolákban mind drog-rezisztens, mind pedig szenzitív sejtek esetén, a drog-rezisztens sejtek esetén pedig a fehérje koimmunoprecipitálható volt kaveolinnal, ami közvetlen fizikai kapcsolatot feltételezett a két fehérje között [268]. Agyi kapilláris sejtek frakcionálását követően hasonló eredményre jutottak, mely arra utalt, hogy a két fehérje in vivo körülmények között is

kolokalizál. Ugyanezen munkacsoport pár évvel később egy in vitro felállított vér-agy gát modell endotél sejtjein szintén kimutatta a Pgp jelenlétét a kaveolákban és kolokalizációját a kaveolin fehérjékkel (kaveolin-1 és kaveolin-2), valamint hogy ezek a fehérjék molekuláris komplexet alkotnak egymással. A Pgp, korábban már leírt, kaveolin kötő doménjének mutációjával pedig bizonyították, hogy a Pgp transzportfunkciója kaveolin-függő. Kaveolin távollétében a Pgp fokozott aktivitást mutatott [269]. A raft hipotézisnek és ezen megfigyeléseknek megfelelően, egy molekuláris komplex vagy membránmikrodomén szereplői különböző dinamikusan megvalósuló asszociációkon és disszociációkon keresztül tehát folyamatosan befolyásolhatják egymás funkcióit. Ronaldson és munkatársai a vér-agy gát másik fontos sejt típusán, egy primer asztrocita sejt kultúrán is bizonyította a Pgp és a kaveolin-1 fizikai kapcsolatán keresztül a két fehérje együttállásának in vivo körülmények között is megvalósuló létjogosultságát [270].

Habár a Pgp és a kaveolák között sokszor figyelhető meg kolokalizáció, már Lavie is felhívja a figyelmünket arra, hogy a raft domének, vagy detergens rezisztens membrándomének (DIG) amelyekben a Pgp egy jelentős hányada található nem feltétlenül minden esetben kaveola [266, 271]. A Pgp, ugyan nem minden esetben [272], de a legtöbb cikk tanulsága alapján egyértelműen megoszlást mutat a raft, legyen az kaveola vagy bármilyen egyéb raft domén, és a nem-raft membránstruktúrák között [135, 266, 273, 274]. Koleszterin kivonási kísérletek garmadája bizonyítja ennek a megoszlásnak a fiziológiai jelentőségét. A koleszterin szintek változásai egy sejtben, hasonlóan más lipidekhez, befolyásolják a Pgp közvetlen membránkörnyezetének lipidösszetételét és fluiditását. Ezzel párhuzamosan azonban, mint a rendezett struktúrájú membrándomének meghatározó lipid összetevője, rendkívül fontos szerepet tölt be a raft domének integritásának megőrzésében is.

Szinte az összes koleszterinnel foglalkozó tanulmányban a Pgp funkciójának gátlása figyelhető meg koleszterin kivonást követően [135, 272, 273, 275-282]. A koleszterin bevitel számos esetben szintén gátló hatást fejtett ki a Pgp-re [273, 281], bár ezzel ellentétes hatás, a drog efflux mechanizmus fokozódása is megfigyelhető volt Troost és munkatársai munkájában [277]. Saeki és munkatársainak korábban már említett munkájában a Pgp végleges drog transzport mechanizmusát befolyásoló egyik lépés, a drog kötődése a Pgp-hez, koleszterin koncentráció függést mutatott, 20% membránkoleszterin tartalomig fokozódott, majd e fölött már csökkent [254], azaz a koleszterin bevitel során tapasztalt különbségek nagy valószínűséggel hasonló koleszterin koncentráció különbségekkel magyarázhatóak. Sharom és munkatársai membránvezikulákba rekonstruált Pgp-vel végzett kísérletekben azt találta,

hogy a koleszterin más lipidekhez hasonlóan szintén befolyásolja a Pgp bazális és drog stimulálta ATPáz aktivitását, a drogok kötődését a fehérjéhez és a hidrofób drogok megoszlását a membránban [280]. Teljes sejteken methyl- β -cikodextrinokkal végzett koleszterin kivonási kísérletek ugyanakkor bizonyítják, hogy a Pgp szubsztrátok intracelluláris akkumulációjának fokozódása szorosan kapcsolható a Pgp membránlokalizációjának megváltozásához, a raft domének szétesésével párhuzamosan. Az elveszett koleszterin mennyiségek pótlásával visszaállítható a raft lokalizáció és ezzel párhuzamosan a transzport aktivitás is [273, 277]. Kamau kísérleteiben a raftok egy másik jellegzetes lipid komponensét, a szfingolipidek keletkezését PDMP-vel gátolva a Pgp lokalizációja szintén a nem-raft domének irányba tolódik el [283]. Korábbi megfigyelések alapján pedig ez a kezelés is a rodamin-123 fokozott retencióját vonja maga után [284]. Ghetie és munkatársai munkájában, a Pgp-hez fiziológias körülmények között FRET közelségben (1-10 nm) lévő CD19 fehérje és a Pgp szoros asszociációjának gátlása szintén raftokon kívülre helyezi a transzportfehérjét [274], ami korábbi megfigyelések alapján szintén csökkenti a rodamin123-as Pgp szubsztrát kipumpálását ezekből a sejtekből [285].

Bár ezek a megfigyelések első látszatra azt az elképzelést erősítették, hogy a raft doménekben elhelyezkedő Pgp az, ami funkcionális szempontból fontos lehet, nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy a sejtfelszíni Pgp-k nagyobb százalékát a szerzők ezeken a membrándoménekben kívül találták (lásd később saját adatok is). Sharom munkacsoportjának proteoliposzómákba rekonstruált Pgp-vel végzett kísérletei érdekes megfigyeléseket tartalmaznak ennek a kérdéskörnek a megfontolása szempontjából. Első munkájukban a Pgp nagyobb affinitást mutatott az ATP iránt a kevésbé rendezett fluid fázisban, ugyanakkor későbbi munkájukban azt találták, hogy a szubsztrát transzport sebessége viszont nagyobb a rigid gél fázisban (gel phase) a fluid fázissal összehasonlítva, de talán a legnagyobb a lipid kettősréteg gél-fluid átalakulási hőmérsékletén [286, 287]. A raftok rendkívül dinamikus struktúrájának tükrében tehát sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a Pgp oda-vissza jár-kei a raft és nem raft domének között és ennek a kényesen fenntartott egyensúlynak a megzavarása, párhuzamosan a közvetlen lipid környezet megváltozásával funkcionális következményekkel jár.

1.8 Lipidek mint endogén szubsztrátok, multidrog rezisztenciában megfigyelhető deviáns lipid összetétel

Régóta ismert tény, hogy a sejtmembrán két rétege nagyfokú aszimmetriát mutat mind fehérje, mind pedig lipid összetételében. A lipidek egyenlőtlen eloszlása a plazmamembrán

két rétege között, ellentétben a mesterséges membránokkal, számos sejtfolyamatban tölt be kritikus funkciót. A plazmamembrán lipid aszimmetriája meghatározó olyan folyamatokban, mint a membrán beboltosulása, vagy a szekréción vezikulák kialakulása. Ennek a fiziológiásan fennálló asszimetriának a megszűnése pedig olyan fontos biológiai következményekkel jár, mint a trombocita aggregáció vagy az apoptózis. A lipidek vertikális mozgása a hidrofób környezet miatt ugyanakkor, töltött/poláris feji csoportjaik miatt, energetikailag rendkívül kedvezőtlen. Ezek a felismerések egyértelművé tették ATP függő fehérjék közreműködését a folyamatban. Az ABC transzporterek, - a P-típusú ATPázok mellett - mint lehetséges jelöltek, szintén felmerültek.

A Pgp működési elvének megértése során szintén felmerült, a korábban már említett lehetőség, miszerint flippázként (megj.: a ma használatos pontosabb nomenklatúra szerint floppáz) működik [90]. Ez a lehetséges működési elv, illetve nagymértékű szekvencia homológiája [288] a már ismert foszfatidil-kolin (PC) transzporterrel, az MDR3-mal (ABCB4) [289, 290], felvetette annak lehetőségét, hogy esetleg a multidrog rezisztenciában szerepet játszó Pgp is képes lipidek transzlokálására a plazma membrán rétegei között.

Az első tanulmány rövid szénláncú fluoreszcens lipid analógok és radioaktív lipidek segítségével bizonyította, hogy a Pgp, a már ismert szubsztrátjai mellett képes lipidek, mint a foszfatidiletanolamin (PE), foszfatidilkolin (PC), szfingomielin (SM), illetve a glükoceramid (GluCer) transzportálására is [87]. Ugyanez a munkacsoport kis idővel később bizonyította, hogy a rövid szénláncú SM és GluCer a vezikuláris transzport gátlásakor is elérte a sejtmembránt, de megjelenése az exofaciális rétegben természetesen floppázok közreműködését igényelte. Feltételezték, hogy esetleg egy ABC transzporter vehet részt ebben a folyamatban, és mivel tipikus Pgp gátló szerek mellett a lipidek már nem jelentek meg a PM külső rétegében, a Pgp merült fel, mint lehetséges jelölt [88]. Bosch és munkatársai Pgp-t nagy mennyiségben expresszáló rovar sejtek valamint multidrog rezisztens és szenzitív sejtekből készített liposzómába injektált fluoreszcens rövid szénláncú lipid analógok (PC, PE, PS) fluoreszcens kioltási kísérleteikben azt találták, hogy a multidrog rezisztens sejtek kisebb mennyiségben akumulálták a fluoreszcens lipidek közül a PC-t valamint a PE-t, de nem láttak különbséget a PS esetén. A fluoreszcencia akkumuláció verapamil, CsA, SDZ PSC 833 valamint UIC2 jelenlétében fokozódott. A szerzők nem zárták ki azt a lehetőséget, hogy a PS különböző okok miatt esetleg nem is volt hozzáférhető a Pgp számára [291]. Romsicki és Sharom proteoliposzómákba rekonstruált Pgp, valamint ugyancsak fluoreszcens kioltási technika segítségével felhasználásával, szintén azt mutatta ki, hogy a Pgp képes PC, PE, SM,

de a korábbi munkacsoporttal ellentétben foszfatidilszerin (PS) transzportálására is [292]. A lipidek transzlokálása az ATP hidrolízis függvényében ment végbe és vanadáttal gátolható volt. Különböző Pgp szubsztrátok koncentráció függő, telíthető, és Pgp-hez való affinitásuknak megfelelő módon gátolták ezt a transzlokációt. A Pgp képes volt rövid, hosszú, telített, valamint telítetlen zsírsavláncú lipidek transzlokálására is. Ez volt az első közvetlen biokémiai bizonyíték a Pgp lipid transzlokációs képességéről és felvetette azt a lehetőséget, hogy a lipid transzlokáció és a különböző drogok extracelluláris térbe történő pumpálása, valószínűleg azonos floppáz mechanizmussal mehet végbe. Hasonló eredményeket kaptak fluoreszcensen jelölt GluCer valamint egyéb egyszerű glikolipidek esetén [293].

Természetesen ezekkel a fluoreszcens lipid analógokkal végzett kísérletekkel kapcsolatban folyamatosan felmerül a kérdés, hogy vajon milyen mértékben tükrözhetik a fiziológiás körülményeket. A trombocita aktiváló faktornak (PAF), mint egy fiziológiás körülmények között is előforduló rövid szénláncú foszfatidilkolinnak a transzlokálása a Pgp által [294, 295] arra utalt, hogy a módosított lipid analógokkal végzett kísérleteknek van fiziológiai relevanciája. Egy másik tanulmány Sharom munkacsoportjához hasonlóan arra a következtetésre jutott, hogy a Pgp képes a rövid szénláncú PS fluoreszcens analóg transzportálására is, továbbá FITC-Annexin V-tel végzett kísérleteik arra is utaltak, hogy ez akár az endogén PS-re is igaz lehet [296]. Van Meer munkacsoportja szintén kapott olyan eredményeket egér vörösvértetek vizsgálata során, hogy a Pgp esetleg részt vehet az endogén PC külső membránrétegbe helyezésében [297].

Számtalan a Pgp lipid transzlokációs képességére irányuló tanulmány tükrében, ugyanakkor továbbra is érdekes kérdés, hogy a Pgp vajon valójában képes-e hosszabb szénláncú, természetes lipidek olyan sebességű transzportálására, ami esetleg már meghatározó lehet a plazmamembrán rétegeiben PC és SM grádiens kialakulásában. Sharom munkacsoportja ugyan azt találta, hogy a Pgp képes hosszabb szénláncú lipid analógok transzportálására is, de a transzportsebesség ebben az esetben csak fele a rövid szénláncú lipidekhez képest [292]. Abulrob és munkatársai egy hosszabb szénláncú fluoreszcens foszfatidilkolin analóg transzlokációját vizsgálta a korábbiakhoz hasonló fluoreszcencia akkumulációs mérések segítségével. Pgp-t expresszáló drog rezisztens, MDR3-negatív epitél sejteket hasonlítottak össze szenzitív sejtekkel, ahol a korábbiakkal összevethető módon azt találták, hogy a szenzitív sejtek nagyobb mennyiségben akkumulálják a lipidet [298]. Ugyanakkor a transzport kinetikáját a Pgp egy jól ismert, model szubsztrátjával a Rhodamin 123-mal összevetve látható, hogy a PC esetén a transzlokáció sebessége lényegesen kisebb.

Mindezen eredményekből nem tűnik valószínűnek, az, hogy a Pgp fiziológias körülmények között egy nagy kapacitású lipid floppáz lenne. Azok az eredmények, mely szerint a Pgp nem képes a MDR3 PC transzportáló szerepét helyettesíteni, MDR3 knock out sejtek esetén, szintén ezt támasztják alá [299]. Ez az alacsony effektivitás pedig nagy valószínűséggel igaz a további más lipidek esetén is (PS, PE). Míg a trombocita aktiváló faktor esetén, mely fontos szerepet tölt be számos más folyamat mellett a tumor növekedésben vagy az angiogenezisben, esetleg érthető lehet a Pgp szerepe, addig a plazma membrán citofaciális rétegében elhelyezkedő PS vagy PE esetén a Pgp valószínűleg a fiziológias állapot fenntartása ellen dolgozna. Az, hogy ez ugyancsak nem valósul meg, szintén arra utal, hogyha a Pgp valamilyen módon, akár a drog transzport mechanizmus mellékhatásaként transzportálja is ezeket a lipidek, semmiképpen sem lehet lényeges, meghatározó tényező.

Összefoglalva tehát a Pgp képes lehet rövid szénláncú és bizonyos körülmények között hosszabb szénláncú lipidek széles spektrumának a transzportálására, de a hatékonyságát tekintve továbbra is azt mondhatjuk, hogy ez az ABC fehérje elsősorban egy multidrog transzporter. Nem elképzelhetetlen, hogy az evolúció során a fehérje egy primitív lipid transzporterből végül egy nagy hatékonyságú drog transzporterré nőtte ki magát, mely képes az amfifil szubsztrátok rendkívül széles körének transzportálására, transzlokálására.

A Pgp lehetséges szerepe a rövid szénláncú szfingolipidek transzlokálásában, illetve az a tény, hogy a GluCer, - mely számos további glikozilált szfingolipid szintézisének alapját jelenti - a Golgi citoszolikus és nem a luminális oldalán keletkezik, egy érdekes feltételezést hívott életre. Prateek Lala és munkatársai Pgp-vel transzfektált multidrog rezisztens MDCK sejtek vizsgálatakor azt találta, hogy a sejtek nagyfokú érzékenységet mutattak egy E. Coli toxin, a verocitotoxin iránt, mely drog számára egy sejtfelszíni rövid szénláncú (C16-C18) szfingolipid molekula, a globotriaosylceramid (Gal α 1-4Gal β 1-4glukozilceramid-Gb3) szolgál receptorként [300]. Pgp gátlószerek (ketokonazol, CsA) mellett a sejtek érzékenysége a verocitotoxin iránt megszűnt, a csökkent sejtfelszíni lipid szintekkel párhuzamosan. Elképzelésük szerint a Pgp a GluCer transzlokálását végezné a Golgi citoszolikus oldaláról a luminális oldalára, és ily módon elősegítené a további glikozilált szfingolipidek (LacCer: laktoceramid, Gb3) Golgi lumenben történő szintézisét. Ez a feltételezés érdekes szerepet kölcsönözne a Pgp-nek a raftok kialakításában. Ugyanakkor már a szerzők is felvetik a Pgp mellett más lehetséges faktorok meglétét, ezen drog-szelektált sejtvonal esetén. A tanulmányban használt drogoiról (ketokonazol, CsA) később valóban beigazolódott, hogy nem kizárólag a Pgp-t képesek gátolni, hanem a Golgi luminális oldalán található GluCer

szintázt is [301], mely a Pgp-hez hasonlóan gyakran magasabb mennyiségben fejeződik ki multidrog rezisztens sejtek esetén. Lala és munkatársai munkájában pedig egyértelműen nem kizárólag a sejt felszíni glikoszfinfolipidek mennyisége csökkentettketokonazol vagy CsA kezelés mellett, hanem már a kiindulási GluCer mennyisége is. Mindezek tehát kétségessé teszik azt, hogy a Pgp GluCer-ot transzlokálna a Golgi-ban.

A Pgp szerepe szintén felmerült egy másik fontos membrán, illetve raft lipid, a koleszterin transzlokálása kapcsán is. Több tanulmány bizonyította, hogy a Pgp képes számos glükokortikoid illetve endogén szteroid transzportálására, illetve, hogy bizonyos szteroidok képesek a Pgp drog transzport funkcióját antagonizálni [302-304]. Wang munkájában a koleszterinnel kapcsolatban azt találta, hogy az jelentősen gátolta a daunorubicin transzportját. Mindemellett fokozta a Pgp ATP hidrolízisét [305]. Ezen eredményekből feltételezhető volt a koleszterin direkt kölcsönhatása a drog kötőhellyel, illetve hogy a Pgp esetleg részt vesz a koleszterin transzlokálásában, transzportálásában is. Garrigues és munkatársai szintén hasonló eredményre jutottak. A Pgp ismert bazális ATPáz aktivitása, mely mindig is feltételezte valamiféle endogén szubsztát jelenlétét, erősen függ a koleszterin jelenlététől a membránban. Eredményeik azt mutatták, hogy a drog-stimulálta ATPáz aktivitás magasabb koleszterin távollétében, illetve a koleszterin-indukálta ATPáz aktivitás is magasabb szubsztátok távollétében, azaz a koleszterin és a Pgp szubsztátok valamilyen módon kompetálnak a drog kötőhelyekért [276]. Mindezek alapján feltételezték azt, hogy a Pgp aktívan részt vesz a koleszterin membránban történő transzlokálásában és esetleg hozzájárul a koleszterin-gazdag mikrodomének, raftok és kaveolák stabilizálásához. Mindezek az eredmények összhangban voltak, olyan korábbi eredményekkel, miszerint a Pgp koimmunoprecipitálható volt a kaveolák fő komponensével, a kaveolin-1-gyel [268], melynek mennyisége a kaveolák és a koleszterin mennyiségével párhuzamosan emelkedett MDR sejtek esetén [266, 306]. Gayet és munkatársai megfigyelései ugyanakkor felhívják a figyelmet arra, hogy a Pgp-nek nagy valószínűséggel nincs szerepe a MDR-es sejtek esetén gyakran tapasztalt koleszterin mennyiségi változásokban. Megfigyeléseikben a különböző rezisztenciájú humán CEM akut limfoblasztos leukémia sejteken a rezisztencia kialakulásával nő a Pgp és a koleszterin mennyisége is. De míg a rezisztencia fokával párhuzamosan az expresszált Pgp mennyisége csak egy bizonyos mértékig, addig a membrán koleszterin tartalma folyamatosan emelkedik [307]. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a Pgp-től függetlenül megvalósuló koleszterin, illetve lipid változások, szintén lényegesek lehetnek az MDR fenotípus kialakulása során.

Ueda munkacsoportja egy másik érdekes elképzeléssel állt elő a Pgp koleszterin transzlokációjával kapcsolatban [282]. Modelljük szerint a legnagyobb affinitással a 800-900 Da molekulatömegű drogok képesek kötődni a Pgp-hez és a koleszterinnek fontos szerep jut a kisebb molekulatömegű drogok transzportálása során, mivel ebben az esetben ez a lipid képes kitölteni a kisebb drog mellett a szubsztrátkötő zsebet. Elképzelésük szerint ez magyarázatot adhat arra a tényre, hogyan képes a Pgp a jelentősen eltérő méretű drogok transzportálására. Eckford és Sharom liposzómákba rekonstruált Pgp és fluoreszcens koleszterin analóg kölcsönhatásának vizsgálata során azt találta, hogy a koleszterin jelenléte a membránban valóban módosítja a Pgp mind bazális, mind drog stimulálta ATPáz aktivitását, illetve egyértelműen hatással van a drogok Pgp-hez való kötődésében és a drog transzport mechanizmusban. Ueda munkacsoportjával ellentétben azonban nem tapasztalták, hogy a koleszterin a drogok molekulatömegének függvényében befolyásolná a drog kötődés affinitását. Eredményeik továbbá azt mutatják, hogy a Pgp nem vesz részt a fluoreszcens koleszterin analóg transzlokálásában sem.

A PM citofaciális és exofaciális rétege között az egyes lipidek spontán flip-flop mozgásának sebességét a lipid struktúrája határozza meg, természetesen a membrán hőmérsékleti és fluiditási viszonyai mellett. A legtöbb membránlipid, mint a foszfolipidek vagy glikolipidek esetén ennek a spontán mozgásnak a féléletideje órákban mérhető modell membránok vagy vörösvértestek membránja esetén, mivel ezeknek a lipideknek a feji csoportjai nagy hidrofilitással rendelkeznek [308]. A koleszterin egyetlen hidrofil hidroxil csoporttal rendelkezik az A gyűrűn, és ennek megfelelően a PM két rétege közötti spontán kicserélődése rendkívül gyors, másodperces vagy az alatti skálán mozog [309, 310]. A koleszterin PM orientációjában tehát sokkal inkább meghatározó azoknak a szfingolipideknek az orientáltsága, melyeket a Pgp valószínűleg transzlokál [293], és melyekhez a koleszterin nagy affinitást mutat [311]. Eckford és Sharom következtetése szerint tehát a koleszterin nagy valószínűséggel nem a fehérjével való direkt kölcsönhatásán keresztül, hanem a közvetlen lipid környezet illetve a drogok membránon belüli megoszlásának megváltoztatásán keresztül fejti ki hatását a Pgp funkciójára (lásd 1.7-es fejezet).

Ahogy arra már utaltunk, a MDR sejtek esetén számos esetben figyelhető meg a szenzitív sejtekhez képest egy megváltozott, deviáns membrán lipidösszetétel. A P-glikoprotein multidrog rezisztenciában betöltött szerepének azonosításával egyidőben már rendelkezésre álltak olyan elektron spin rezonancia spektroszkópiái és DPH-val (1,6-difenil-1,3,5-hexatrién) mért fluoreszcencia depolarizációs adatok, melyek arról számoltak be, hogy a doxorubicin

rezisztens sejtek membránja rendezettebb, kevésbé fluid a szenzitív sejtekkel összehasonlítva [312]. Hasonló eredményeket láttak mások is adriamicin rezisztens sejtek esetén, ahol a membrán fluiditása a rezisztencia mértékének növekedésével párhuzamosan csökkent [313]. Természetesen további kutatások indultak a rezisztens sejtek plazmamembrán lipid összetételének felderítésére. Ramu további munkája során azt találta, hogy a sejtek ugyan nem mutatnak különbségeket a koleszterin mennyiségében, de emelkedett SM szintek megfigyelhetőek, párhuzamosan a csökkent PC szintekkel [314]. A korábban tapasztalt membrán fluiditás változásokat ezekkel a lipid összetétel változásokkal magyarázták. Wright vinblasztin rezisztens humán ALL T-limfocitákon szintén megerősítette a SM szintek emelkedését, párhuzamosan a csökkent PE és PS szintekkel [315]. Ugyanez a munkacsoport később a megváltozott lipidösszetétel kapcsán emelkedett koleszterin szintekről is beszámolt [316]. Escriba 1990-es munkájában szintén azt találta, hogy a drog rezisztens sejtek membránja kisebb mennyiségű PS-t és nagyobb mennyiségű koleszterint tartalmaz, továbbá céloz arra, hogy a lipid változások önmagában, a fehérje változásoktól függetlenül, hozzájárulnak az MDR fenotípus kialakulásához [317]. Pallarés-Trujillo és munkatársai az általuk vizsgált vinkrisztin rezisztens leukémia sejtvonalon a korábbiakhoz hasonlóan azt látták, hogy a koleszterin mennyiségek emelkedtek a többi lipidhez képest, és a koleszterin/foszfolipid arány növekedése párhuzamos a drog rezisztencia emelkedésével [318]. Gayet korábban már említett tanulmányában a koleszterin emelkedés mértéke szintén szoros korrelációt mutatott a drog rezisztencia fokával [307]. Ahogy arra már utaltunk a kaveolin-1 fehérjének illetve a kaveoláknak a mennyisége is gyakran fokozott a MDR sejtek esetén [266, 319-321], amelyek szintén emelkedett koleszterin mennyiségeket vonnak maguk után a kaveolák koleszterin traffickingben betöltött szerepe miatt [322-325]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a rezisztens sejtekben a különböző lipidek, valamint a koleszterin metabolizmusa módosult (lásd 1.10-es fejezet) és, hogy a MDR sejtek a szenzitív sejtekkel ellentétben sokkal inkább képesek magas koleszterin szinteket fenntartani.

Számos cikk számol be a drog rezisztens sejtek esetén egy másik raft lipid emelkedett mennyiségéről. 1996-ban Lavie és munkatársai 3 drog rezisztens sejtvonalon mutatta ki a GluCer szintek emelkedését, ami arra utalt, hogy a koleszterinhez hasonlóan a glikoszfinfolipid szintézis is módosult, fokozott ezekben a sejtekben [326]. Ugyanez a munkacsoport később klinikai minták esetén, 3 humán multidrog rezisztens sejtvonalon, 6 melanóma és egy mell-daganat mintán szintén kimutatta a GluCer emelkedett mennyiségét, és javasolták a GluCer szintek mérését, mint a MDR egyik lényeges markerét [327]. 1999-ben a munkacsoport kimutatta, hogy az emelkedett GluCer szintek mögött valószínűleg a GluCer

szintáz működése áll, mert a rezisztens sejtek hatékonyan képesek megóvni önmagukat a ceramid apoptotikus hatásaitól, annak glikozilációjával [328]. A komplexebb glikoszfingolipidek, gangliozidok esetén szintén állnak rendelkezésre korai adatok arról, hogy a rezisztens sejtek plazmamembránja ebből a lipidből is nagyobb mennyiséget tartalmaz [329]. Ugyan számos esetben megfigyelhetőek voltak ezek a lipid változások, olyan tanulmány is született, ahol a lipid változások nem voltak szembetűnőek a drog rezisztens és szenzitív sejtek esetén [330]. Érdekes módon ugyanakkor a különböző raftok megjelenésével együtt járó rendezettebb membrán struktúra, illetve fokozott membrán cirkuláció olyan esetekben is megfigyelhető volt, amikor a rezisztens illetve szenzitív sejtek közötti lipid változások megkülönböztethetetlenek voltak [331].

Mindezek a régebbi és újabb adatok [332] arra utalnak, hogy a rezisztens sejtek nagy általánosságban rendezettebb membrán struktúrákkal rendelkeznek, mely mögött valószínűleg a különböző raft domének mennyiségi emelkedése húzódik meg a különböző lipidek metabolizmusának megváltozásával párhuzamosan. Ezek a raft domének lehetnek kaveolák, de egyéb membránmikrodomének is [319], és bár ezek a változások sokszor a Pgp sejt felszíni emelkedésével párhuzamosan valósulnak meg, a Pgp nagy valószínűséggel nem vesz részt ezeknek a struktúráknak a kialakításában és kétséges a szerepe a raft domének fenntartásában, megerősítésében is. A multidrog rezisztencia során ugyanakkor az egyidejűleg megvalósuló folyamatok nagy valószínűséggel nem teljesen függetlenek egymástól.

1.9 A sejtmembrán koleszterin tartalmának változtatása ciklodextrinekkel, a koleszterin kémiai aktivitása

A ciklodextrinek (CD) ciklikus oligoszacharidok, melyek α -(1–4)-kapcsolt D-glükopiranoz egységekből épülnek fel. Ezek a különleges molekulák hosszú ideje tartanak már érdeklődésre számot, azon érdekes tulajdonságuknál fogva, hogy bár vízoldékonyak, mégis képesek különböző hidrofób drogok hordozására is. A ciklodextrinek hidrofób, henger alakú belső üregét a hidrogénatomok és glikozilkötésű oxigénatomok alakítják ki, míg a henger peremén találhatóak a glükózegységek hidroxilcsoportjai, melyek a molekula vízoldékonyágáért felelősek. Ezen előnyös tulajdonságuknál fogva számos hidrofób hatóanyag biohasznosíthatóságát képesek növelni, mindemellett nem váltanak ki immunválaszt és alacsony toxicitást mutatnak különböző állati szervezetekben és az emberben. Az α -D-glükopiranoz egységek száma alapján különböző ciklodextrin származékokat különböztethetünk meg. Az α -CD-ek hat, a β -CD-ek hét, a γ -CD-ek pedig 8 glükopiranoz

egységből állnak. A polimerizáció mértéke meghatározza a hidrofób üreg méretét és ennek megfelelően az egyes származékok affinitását a különböző vegyületek iránt [333, 334].

A β -ciklodextrinek rendelkeznek a legnagyobb affinitással a koleszterin iránt, és ezek a származékok bizonyultak a leghatékonyabbnak a különböző modell- és biológiai membránokból történő koleszterin kivonás esetén is [335-337]. A koleszterin kivonás mértéke függ az alkalmazott CD származéktól, annak koncentrációjától, az inkubáció hőmérsékletétől, idejétől, illetve az alkalmazott sejtípustól [338-340]. Az inkubációt követően a CD származékok vízdékonyságukból adódóan egy egyszerű vizes mosással eltávolíthatóak a rendszerből. A β -CD-ek koleszterin iránti nagy affinitása lehetővé teszi koleszterin inklúziós komplexek létrehozását is [341-343]. Ezen CD-koleszterin komplexek segítségével pedig képesek vagyunk növelni a sejtmembrán koleszterin mennyiségét [342, 344]. A koleszterin transzfer hatékonyságát a koleszterin kivonáshoz hasonlóan szintén több tényező határozza meg, úgymint a β -CD:koleszterin moláris aránya, a β -CD:koleszterin komplex koncentrációja, az expozíció ideje, illetve az alkalmazott sejtípus [345, 346].

Különböző modell membránokon végzett kísérletek felvetették annak lehetőségét, hogy a CD-ek nem csupán koleszterint, hanem egyéb lipideket is képesek kivonni a membránból. Giocondi és munkatársai dioleoilfoszfatidilkolin(DOPC)/szfingomielin(SM) lipidekből készített kettős lipid membrán modellen lyukak keletkezését írta le metil- β -CD-nel való inkubációt követően atomerő mikroszkóppal [347]. Más tanulmányok viszont arra a következtetésre jutottak, hogy a dipalmitoilfoszfatidilkolin (DPPC), illetve SM β -CD-nel történő szolubilizációja, messze elmarad a koleszterinétől [335, 337].

Kilsdonk és mtsai egér és humán fibroblasztok vizsgálata során azt tapasztalta, hogy a foszfolipidek mennyisége mindösszesen 2%-kal csökkent 5 órás, 5 mM-os M β CD kezelést követően [348]. Fukasawa CHO sejtek vizsgálata során szintén azt találta, hogy CD kezelést követően a [14 C]-kolin jelölt foszfolipidek mennyisége alig csökken a sejtben [349]. További makrofágokon illetve vékonybélből izolált enterocitákon végzett tanulmányok szintén azt mutatták, hogy a szfingomielin illetve foszfolipidek mennyiségének csökkenése elhanyagolható CD kezelést követően [350, 351]. Ezzel szemben agyi endotél illetve kisagyi szemcsesejteken végzett kísérletekben a CD kezelés jelentős mennyiségű szfingomielin illetve foszfatidilkolin veszteséssel is járt [352, 353].

Összeségében azonban mégis azt mondhatjuk, hogy a β -CD kezelés elsősorban a sejtek koleszterin mennyiségének csökkenésével jár. Az egyéb foszfolipidek kivonása β -CD-vel

történő inkubációt követően vagy elhanyagolható, vagy pedig érdekes módon olyan lipideket érint elsősorban, mint a PC vagy a SM, melyekről köztudott, hogy rendkívül szoros komplexet képeznek a koleszterinrel.

A CD kezelés mellett jelentkező lehetséges artefaktumok között az egyéb lipidek mellett meg kell még említenünk a fehérjék membránból történő extrakcióját is [354]. Régóta ismert a CD molekulák hidrofób aminosavakkal, illetve hidrofób fehérje doménekkal való interakciója. Számos tanulmány mutatta be a CD-ek interakcióját olyan fehérje molekulák hidrofób doménjeivel, mint a glükóamiláz1, glikoziltranszferáz vagy a maltodextrin kötő fehérje [355-357]. Aachmann és munkatársai a M β CD interakciójáról számoltak be olyan kis méretű fehérjék esetén, mint az ubiquitin vagy a kimotripszin inhibitor 2 (CI2) [358]. A CD molekulák belső üregének mérete természetesen nem teszi lehetővé, hogy akár olyan kis fehérje molekulákat is magukba zárjanak, mint az ubiquitin. Nemrégiben megjelent molekuláris dinamikai szimulációs vizsgálatok azt mutatták, hogy magának a koleszterinnek a kivonása is két CD molekulát igényel [359]. Az egyes fehérje molekulák hidrofób doménjeinek előbb említett interakciója a CD-vel ugyanakkor természetesen hozzájárulhat az adott fehérje szolubilizációjához, de a fehérjék CD kezelés mellett tapasztalt extrakciója sokkal valószínűbb, hogy ebben az esetben is a lipid környezet megzavarása miatt következik be. Irie és mtsai vörösvérsejtek különböző CD-vel végzett vizsgálatok azt tapasztalta, hogy a fehérjék membránból történő extrakciója a koleszterin kivonás mértékével mutatott szoros korrelációt és nem egyéb foszfolipidekkel [360]. A fehérjék extrakciója nagy valószínűséggel a fehérjék „shedding”-jével magyarázható, az őket körülvevő lipid régió eróziójával párhuzamosan [361]. Ennek a lipid környezetnek a rigiditásáért a lipidek közül a koleszterin tűnik a leginkább felelősnek, és ez a rigiditás lehet fontos a membrán részek sértetlenségének megőrzésében.

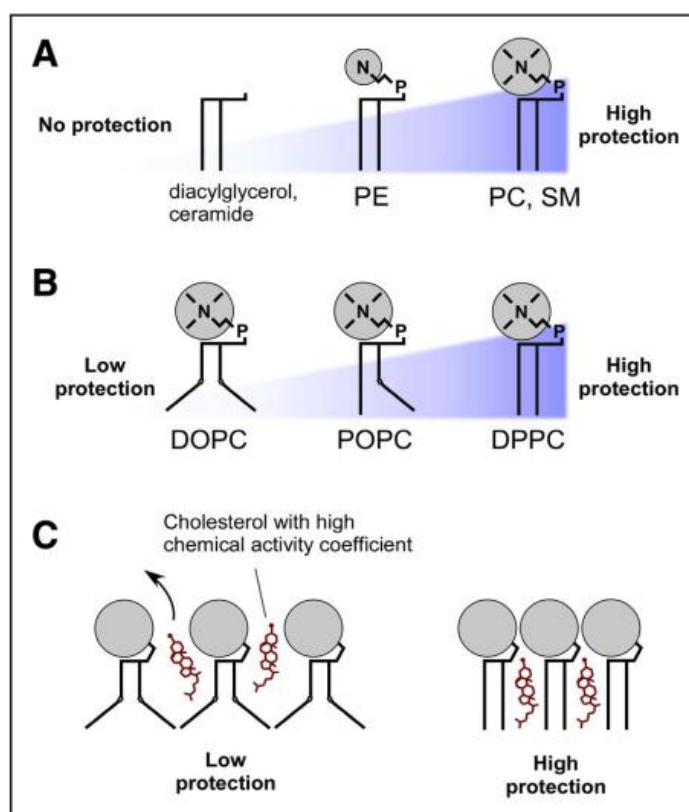
A koleszterinnek kétségkívül nagyon fontos szerep jut a plazmamembrán, illetve azon belül a raft struktúrák integritásának megőrzésében. Nem véletlen, hogy a CD-vel történő koleszterin kivonás széles körben alkalmazott a raft struktúrák megbontására, a különböző fehérjék detergens rezisztens membrán frakciókkal való asszociációjának vizsgálatára, valamint ezen fehérjék raft struktúrákkal mutatott asszociációjának-disszociációjának funkcionális következményeinek felderítésére. Sheets és mtsai kimutatták, hogy a membrán M β CD-nel történő koleszterin depléciója következtében csökken az Fc ϵ RI (Fc ϵ szipon receptor-IgE receptor) detergens rezisztens membrándoménekkal való asszociációja, mely funkcionális következményekkel jár a hízósejtek aktivációja során [361]. Kai Simons és mtsai

vizsgálataiban az influenza vírus hemagglutinin fehérje raft asszociációja gátolható M β CD-nel történő koleszterin kivonást követően, mely befolyásolja a fehérje polarizált sejtekben történő apikális szortingját [225]. Hasonló módon T-limfocitákban a membrán koleszterin depléciója a raftok dezintegrációjával számos szignalizációs útvonalat módosít [362]. A koleszterin szintén létfontosságúnak bizonyult a raft asszociált t-SNARE fehérjék (SNAP-23; syntaxin 4) klaszterizációja során [363]. Ahogy arra már utaltunk a Pgp esetén is állnak rendelkezésünkre olyan adatok, hogy a koleszterin mennyiségek pótlásával visszaállítható a raft lokalizáció és ezzel párhuzamosan a transzport aktivitás [273, 277]. A membrán koleszterin mennyiségének csökkentése fluoreszcencia anizotrópia mérések során egyértelműen csökkentette a membrán rendezettségét [364] és jelentősen fokozta a raft asszociált fehérjék diffúzióját [365].

Ugyanakkor ma már egyre nyilvánvalóbb, hogy a sejtmembrán koleszterin tartalmának CD-vel, vagy bármilyen egyéb módszerrel történő csökkentése nem csupán a raft struktúrákban található koleszterint érinti. Ismert, hogy a sejt koleszterin legnagyobb mennyiségben a PM-ban található. Nagy mennyiségű koleszterin található nem csupán a raft, de a non-raft doménekben is, ahogy azt Gaus és mtsai is kimutatták humán makrofágok raft és non-raft struktúráinak lipid összetételét vizsgálva, mind detergens, mind detergens mentes módszerekkel [366]. Rouquette-Jazdanian és mtsai T-limfociták plazmamembrán koleszterinjének M β CD-nel történő kivonása során két kinetikai poolt állapítottak meg, egy gyorsabban és egy lassabban kivonható poolt. Ők a gyorsabb poolt a raft struktúrákkal azonosították, ugyanakkor megjegyzik, hogy a gyorsan kivonható koleszterin csökkenése még nem zavarta meg a raft markerek eloszlását. További koleszterin mennyiségek kivonása szükséges - amik már a lassú poolt is érintik - a raftok struktúrájának megbontásához [367]. Hasonlóan Ottico és mtsai kisagyi szemcse sejtek vizsgálatakor azt találták, hogy 5 mM koncentrációjú M β CD mellett a detergens rezisztens membrán frakciókban található koleszterin mennyiségek csak csekély mértékben csökkennek. A magasabb denzitású frakciókban viszont ez a kis mértékű koleszterin kivonás is jelentősen csökkentette a koleszterin mennyiségeket. A 10 mM-os M β CD kezelést követően ugyanakkor a kiindulási koleszterin mennyiségek csupán 10%-a marad meg az alacsony denzitású membrán frakciókban, míg a magasabb denzitású frakciók koleszterin mennyiségei ilyen körülmények között ugyan még csökkennek, de kisebb mértékben [352]. Gaus korábbi eredményei arra utalnak, hogy a plazmamembrán koleszterin kivonása nem csupán M β CD mellett, de feltehetően fiziológiás körülmények között sem csak a raft struktúrákat érinti. Az Apo A1-re történő koleszterin efflux koleszterin töltött makrofágok esetén érinti mind a raft, mind a non-

raft struktúrákat [368]. Larbi és munkatársai eredményei szintén azt mutatják, hogy a M β CD-nel végzett koleszterin kivonás megtörténik mind a raft, mind a non-raft doménekből [369]. Érdekes módon ugyanakkor ők azt is megfigyelték, hogy az idősebb donorokból származó T-limfocitákból, melyek nagyobb mennyiségű koleszterint tartalmaznak és főképp a raft doménekben, sokkal nehezebben vonható ki a koleszterin.

Lange és Steck számos tanulmány alapján egy érdekes munkahipotézist dolgozott ki, mely magyarázatot adhat ezekre a megfigyelésekre [370]. Ismert, hogy a foszfolipidek és a koleszterin különböző arányú és affinitású komplexeket képeznek a membránban [371-373]. A koleszterin a legerősebb komplexeket a hosszú, telített zsírsavlánccal rendelkező lipidekkel alkotja, mint a szfingolipidek (glikoszfingolipidek, szfingomielin) vagy a foszfatidilkolin és a foszfatidilszerin. Kevésbé erős komplexek jönnek létre a koleszterin a foszfatidiletanolamin és egyéb rövid, telítetlen zsírsavlánccal és kisebb poláris feji csoporttal rendelkező lipidek között. A lipidek poláris feji végei képesek védeni a koleszterint a vizes fázissal szemben, az „esernyő modell”-nek megfelelően [374].



7. ábra Strukturális interakciók a koleszterin és egyéb lipidek között

A koleszterin vizes közegetől való védelmében fontos szerepet játszik a szomszédos lipidek poláris feji csoportjainak nagysága (A), illetve a zsírsavlánc telítettsége (B). A kevésbé védett koleszterin feltehetően kiáll a lipid kettősrétegből és magasabb kémiai aktivitással rendelkezik [375].

Nem meglepő módon a legerősebb komplexeket kialakító lipidek adják a rendezett membránstruktúrák, a raftok lipid összetételét [376, 377]. Az a koleszterin mennyiség, mely meghaladja a nagy affinitású lipidek komplex képző kapacitását, a membránban marad, de ún. magas kémiai aktivitást, vagy ahogyan az angol irodalom említi „escape tendency”-t mutat [375, 378]. Ezt az elméletet számos megfigyelés támasztja alá. A β -CD molekulára történő koleszterin transzfer sebessége élesen emelkedett különböző kevert foszfolipidekből álló monomolekuláris rétegekből, ahol a koleszterin mennyiség meghaladta a foszfolipidek komplex képző kapacitását [378, 379]. Vörösvérsejtek membránjában a koleszterin mennyiségek emelésével fokozódik a β -CD molekulára történő koleszterin transzfer, ugyanakkor a lizofoszfátidilkolin PM mennyiségének emelésével csökken. Hasonló tendencia figyelhető meg a koleszterin koleszterin oxidáz iránti érzékenységében [380, 381]. A szfingomielin mennyiségek szfingomielináz kezeléssel történő csökkentése szintén erősen fokozza a membránban lévő koleszterin aktivitását, a nagy affinitású komplex partner mennyiségének csökkentésével [370, 375]. Fontos megjegyeznünk, hogy a koleszterin különböző doménekből mutatott kémiai aktivitása feltehetően számos koleszterin kompenzációs mechanizmus alapját is képezi (lásd 1.10-es fejezet). Ennek megfelelően a magas kémiai aktivitással rendelkező koleszterin a raft struktúrákon kívül helyezkedik. Ez az a koleszterin ami sokkal inkább hozzáférhető mind a fizioológias (lipid transzfer fehérjék), mind a nem fizioológias (pl. ciklodextrin) akceptor molekulák számára, és melynek kivonása energetikailag is kedvezőbb. A ciklodextrinokkal történő koleszterin kivonás tehát nagyobb valószínűséggel érinti első körben a non-raft frakciókban lévő koleszterint. Sőt, vannak adatok arra vonatkozólag is, hogy a koleszterin kivonás minden esetben a non-raft régiókból történik, ahol a koleszterin a raft frakciókból pótlódik és végül ez a folyamatos redisztribúció vezet a raft domének széteséséhez [382].

1.10 Koleszterin kompenzációs útvonalak, a MDR sejtek esetén megfigyelhető koleszterin változások

Az a tény, hogy a teljes koleszterin mennyiség szigorúan kontrollált és időben alig változik a sejtekben, illetve, hogy a különböző intracelluláris organellek koleszterin szintjei szintén nagyon pontosan szabályozottak [370], megszámlálhatatlan koleszterin feedback mechanizmus létét feltételezi.

A koleszterin homeosztázis talán eddig leginkább ismert mechanizmusa, a koleszterin bioszintézis szabályozása [383]. A koleszterin bioszintézis szabályozásának központi organellema az endoplazmatikus retikulum (ER), mely számos membránkötött transzkripciós

faktort tartalmaz (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-SREBPs), melyek a koleszterin bioszintézis, továbbá a koleszterin felvételt szabályozó kulcsfontosságú gének aktivációjában vesznek részt. Az ER koleszterin szint csökkenésének eredményeként a SREBP egy eszkort fehérje segítségével (SCAP) a Golgi-ba kerül, ahol különböző hasítási lépéseken keresztül aktiválódik, majd a magba transzportálódik és szabályozza a megfelelő gének transzkripcióját. Az ER koleszterin szintjének emelkedése esetén a SREBP-SCAP komplex a SCAP fehérje szterol érzékelő doménjén (SSD) keresztül kapcsolódik egy másik fehérjéhez (Insig). A fehérje komplex ER rezidens fehérjéhez való kötése megakadályozza a Golgiba irányuló transzportot és következésképpen a koleszterin szintézis gátlását eredményezi.

A koleszterin bioszintézis sebesség meghatározó enzime a hidroxil-metil-glutaril-koenzimA reduktáz (HMGCoAR) hasonló szabályozás alatt áll. Az Insig fehérjéhez való kötődése az enzim ubiquitinációján keresztül a fehérje lebomlását eredményezi.

Az ER-ben újonnan szintetizált koleszterin egy jelentős része a Golgi-t megkerülve nem-vezikuláris transzport mechanizmussal kerül ki a plazmamembránba [384-388]. A koleszterin másik része viszont követi a bioszintetikus szekréciós útvonalat a Golgi-n keresztül, ahol részt vesz a raft domének kialakításában [389, 390], és ezeknek a dinamikus struktúráknak egy meghatározó komponenseként fontos szerepet tölt be a sejtfelszíni fehérjék szortírozásában, a különböző membrán domének közötti megoszlásában [226].

Az a tény, hogy az ER-ban működő koleszterin bioszintetikus feedback rendszer valójában az ER koleszterin szintje által szabályozott, de a teljes sejt koleszterin mennyiségének szabályozását végzi, felvetette egy plazma membránból ER felé irányuló koleszterin-szterol transzfer meglétét, hasonlóan a már ismert ER-PM útvonalhoz. Egy ilyen citoszolikus szterol hordozó fehérjék által közvetített nem-vezikuláris útvonal megléte valóban igazolódni látszik [391, 392]. A pontos, sok részletében már ismert folyamat, illetve annak mozgatórugóját jelentő elmélet már szintén leírásra került [370, 393].

Amint már azt egy korábbi fejezetben (lásd 1.9-es fejezet) említettük, a szterolok különböző sztöchiometrikus komplexeket képeznek az egyes foszfolipidekkel és ennek megfelelően különböző kémiai potenciállal rendelkeznek. Az ER-ban egyre emelkedő koncentrációban lévő újonnan szintetizálódott koleszterin a megfelelő komplex partnerek híján magas kémiai potenciállal rendelkezik, ezért viszonylag könnyen hozzáférhető a lipid transzfer fehérjék (LTPs) számára. A plazmamembrán esetén a komplex partnerek számát meghaladó

mennyiségben megemelkedett koleszterin hasonló módon szállítódik az ER-ba, és blokkolja a SREBP-SCAP által kontrollált koleszterin bioszintézist, illetve endocitotikus folyamatok révén átmenetileg intracelluláris tárhelyekben raktározódik. A plazmamembránban magas kémiai potenciállal rendelkező koleszterin kísérletesen bizonyított kivonása a membránból, olyan nem fiziológiás akceptor által, mint a ciklodextrin, ugyanezen az elevenen működik [382]. A koleszterin különböző intracelluláris kompartmentek között megvalósuló traffickingjének alapját ezek szerint az egyes organellekben nagy különbséget mutató szterol:szfingolipid arányok jelentik, ami gyakorlatilag perces időskálán megvalósuló homeosztatis koleszterin feedback mechanizmusokat jelent [370].

Nagyon korai megfigyeléseink vannak arról, hogy az egyik lipid csoport megzavarása a membránban nagyban befolyásolja a másik csoport membránban történő megoszlását [394-397]. Mindezekből arra lehet következtetni, hogy a koleszterin és szfingolipid koncentrációk koordináltan szabályozottak, ami a membránok raft mennyiségének kontrollálását is jelenti. Valóban van irodalmi adat, a két lipid csoport mennyiségének együttes szabályozására [398]. A plazmamembrán ciklodextrinnek történő koleszterin deplécióját követően egy szterol szenzor az oxiszterol kötő fehérje (OxySterol Binding Protein –OSBP) aktivációja figyelhető meg, amely szenzor funkciója mellett szterol transzporterként is működik az ER és a transz-Golgi között. Az OSBP aktivációja ugyanakkor párhuzamosan egy másik transzporter aktivációját is eredményezi. A CERT nevű transzporter a ceramidnak, a szfingomielin előalakjának a transzportját végzi a korábban említett organellek között [399]. A ciklodextrinnek végzett koleszterin kivonás tehát fokozza a raftok nukleációját.

Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az MDR sejtek hatékonyabb koleszterin kompenzációs mechanizmusokkal rendelkeznek. Korai megfigyelések bizonyítják, hogy a PM emelkedett koleszterin mennyiségei mellett, a MDR sejtek (drog szelektált sejtvonalak), fokozott koleszterin észterifikációt is mutatnak és ennek következtében fokozott mennyiségű észterifikált koleszterint állítanak elő a PM direkt vagy akár indirekt (szfingomielináz kezelés) koleszterin szaturációját követően [400, 401]. Figyelembe véve azt, hogy az acil CoA-koleszterin aciltranszferáz (ACAT) az ER-ben helyezkedik el, ez egyúttal az extra mennyiségű koleszterin fokozott felvételét is jelenti a PM-ből [402] és egy gyors koleszterin trafficking útvonalat feltételez a PM és az ER között [374]. Másrészt egy észterifikált koleszterin raktárra támaszkodva ezek a sejtek hatékonyabban képesek reagálni a PM csökkent koleszterin mennyiségeire, például koleszterin kivonást követően. Mindezek mellett a MDR sejtek fokozott sebességű koleszterin szintézist is mutatnak, a 3-hidroxi-3-

metilglutaril-CoA reduktáz (HMG CoA-reduktáz) ubiquitinációját és ezzel lebomlásának sebességét meghatározó ubiquitin E3 ligáz, a Trc8 alacsonyabb expressziója miatt [403-405]. Az ezen sejtek esetén megfigyelt nagyobb mennyiségű raft domén a PM-ban azt eredményezi, hogy a PM koleszterin nagyobb mennyiségei találhatóak alacsony kémiai potenciálú állapotban (low escape tendency) [370]. Láthattuk, hogy számos eddig ismert koleszterin kompenzációs mechanizmus a PM magas kémiai potenciálú koleszterin mennyiségeinek változásaira reagál érzékenyen. Ezen megfontolások alapján feltételezhető, hogy az MDR-es sejtek a PM már relatíve kis koleszterin változásaira is érzékenyen reagálnak.

1.11 Lizoszómális exocitózis és membrán repair

Mai tudásunk alapján már egyértelmű, hogy a különböző membrán sérülések utáni repair mechanizmus egyik létfontosságú eleme a lizoszómák exocitózisa. Számos nemrégiben megjelent tanulmány foglalkozik ezeknek az eddig talán kicsit unalmasnak és csupán szemeteszsáknak képzelt organelumoknak az újabb, érdekes szerepéről a sejt életében.

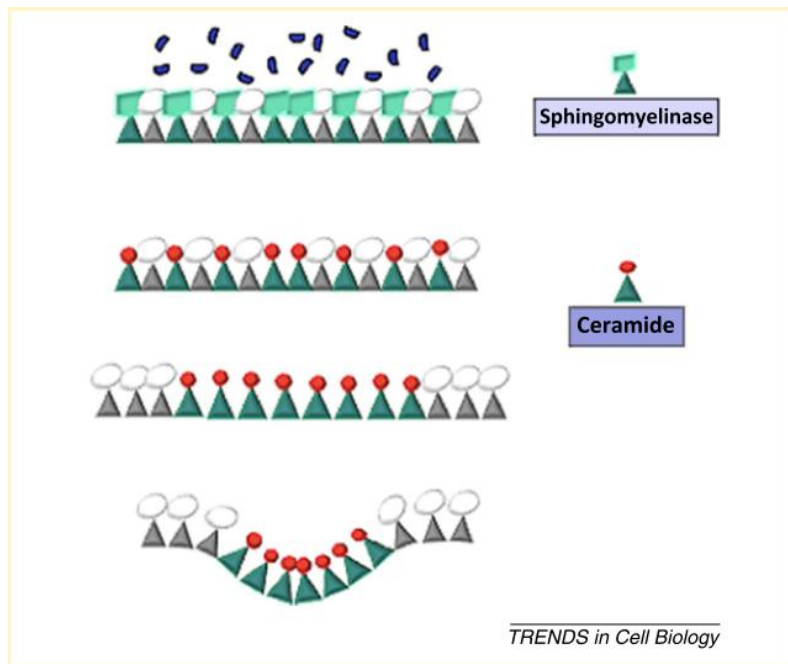
Több évtizede ismert, hogy az eukarióta sejtek másodperceken belül képesek sérült membránrészeik javítására, egy olyan mechanizmus révén amely erősen függ az extracelluláris Ca^{2+} mennyiségétől. Képzalkotó kísérletek később bizonyították, hogy a membrán léziókon keresztüli Ca^{2+} beáramlás a sérülés helyére lokalizált exocitotikus eseményekkel jár, amelyek szükségesek a membrán repair létrejöttéhez [406, 407]. Habár ezek a kísérletek még nem azonosították az exocitotikus vezikulák eredetét. Anita Reddy és mtsai bizonyították, hogy membrán sérülést követően a LAMP1 fehérje, mint lizoszómális marker jelenik meg a sejtfelszínen és a vezikula fúzió a szinaptotagmin VII SNARE fehérje közreműködésével valósul meg [408]. Bár elsőre meglepőnek tűnt a lizoszómák exocitózisa, a további eredmények számos sejtféleségben és különböző módon létrejött, pl. patogén okozta membrán permeabilizációt követően is bizonyították a jelenséget [409, 410]. A LAMP fehérjék sejtfelszíni megjelenése mellett a lizoszómális savas hidrolázok (savas szfingomielináz, hexózaminidáz) megjelenése a sejtek felülűszójában szintén bizonyítékul szolgált a lizoszómák exocitózisára [411]. A számos, különböző sejtvonal esetén tapasztalt jelenség bizonyította a folyamat általános voltát, azaz, hogy nem korlátozódik kizárólag a Ca^{2+} regulált szekréciós sejtekre [412].

Széles körben elfogadottnak tűnt az az elképzelés, hogy az exocitózis során a lizoszómák membránja, membrán darabkái azok közvetlenül a sérülés helyén pótolják a hiányzó membránrészeket [413]. Ugyanakkor mikroinjekciós túvel létrehozott lokalizált sérülést

követően érdekes módon a LAMP1 fehérje pontszerűen inkább a sérült membránrész körül helyezkedett el [408]. Streptolizin-O (SLO) bakteriális toxinnal permeabilizált sejteken egy további érdekes jelenség is megfigyelhető volt [414]. A lizoszómális exocitózis mellett ezek a sejtek masszív endocitózison is keresztül esnek. SLO permeabilizálást követő 12-20 másodpercen belül az endocitotikus vezikulák intracelluláris akkumulációja figyelhető meg, majd 4-5 perccel a sejt sérülését követően a vezikulák már nagy (300-500 nm), burok nélküli intracelluláris kompartmentként jelennek meg. Ezek az endocitotikus események tehát a sérült membrán részek eltávolításával feltehetően elősegítik a membrán repair folyamatokat. Fontos megjegyeznünk, hogy ez a gyors endocitózis vagy az irodalomban masszív endocitózisként (MEND) is nevezett folyamat úgy tűnik, hogy nem igényli sem az aktin citoskeleton sem egyéb endocitotikus regulációs fehérjék (klatrin, dinamin) közreműködését [415]. Érdekes módon az SLO kezelés során keletkező szabálytalan alakú endoszómákhoz nagyon hasonlóak jönnek létre a sejtben savas szfingomielináz (ASM-acidic shingomyelinase) kezelés mellett [416]. Ez a megfigyelés volt az első, ami rávilágított arra, hogy a Ca^{2+} kiváltotta lizoszómális exocitózis valójában a sérült membrán részek endocitózis útján történő eltávolításával segíti elő a membrán remodelling-et, a savas szfingomielinázok sejt felszínre történő szekréciójával.

A szfingomielin (SM), mint a raftok egyik lényeges komponense, nagy mennyiségben található meg a PM külső rétegében. A SM foszforilkolin feji csoportjának enzimatis hasítása pedig ceramid keletkezésével jár. Ez a lipid hasítási termék még a SM-től is szorosabb elhelyezkedést mutat, így a ceramid nagy mennyiségű keletkezése a külső membrán rétegben a PM lipidek egyenlőtlen térbeli eloszlása miatt a membrán citoplazma irányába történő boltosulását idézi elő (**8. ábra**).

A ceramid mediálta membrán invagináció egyértelműen bizonyított jelenség. Előidézhető mesterséges liposzómákban [418], valamint fiziológias körülmények között is megfigyelhető a multivezikuláris testek intraluminális vezikuláinak keletkezése során, ahol a neutrális szfingomielinázok játszanak főszerepet [419]. Számos laboratóriumból származó eredmény bizonyította a savas szfingomielinázok indukálta ceramid klaszterizációt és az endocitózis meglétét membránsérülést követően [420-422]. ASM hiányos sejtekben pedig egyértelműen bizonyítást nyert a lizoszómális enzimek jelentősége a PM integritásának helyreállításában. Érdekes módon az enzim pótlása vagy bakteriális szfingomielináz hozzáadása helyreállította a membrán repair folyamatokat a sejtekben [411].



8. ábra A ceramid-mediálta membrán invagináció feltételezett mechanizmusa [417]

Ezek a kísérletek tehát bizonyították a lizoszómák nélkülözhetetlen szerepét a membrán sérülések során a savas szfingomielinázok sejt felszínre történő szekréciójával. Ezt követő sejt felszíni lipid remodelling és végül a sérült membrán részek eltávolítása valósul meg.

1.12 Közvetlen előzmények (a sejt felszíni Pgp molekulák konformációs és topológiai heterogenitása)

Az évek során számos monoklonális antitestet fejlesztettek ki a sejt felszíni Pgp molekulák detektálására (MRK16, 4E3, MM12.10, 15D3, UIC2) [423-427], melyek a Pgp extracelluláris epitópjait ismerik fel. Ezen antitestek többsége a teljes sejt felszíni Pgp mennyiségek jelölésére alkalmasak. Az UIC2 monoklonális antitest ugyanakkor erősen konformáció érzékeny, mivel egy az 1., a 4. és a 6. extracelluláris loop-ok által képzett összetett epitópot ismer fel [428-430], mely nagy valószínűséggel a katalitikus ciklus csak egy meghatározott időablakában érhető el. Szaturációs koncentrációban alkalmazva az UIC2 antitest (vagy annak Fab fragmentuma) a sejt felszíni Pgp molekulák 10-40%-át azonosítja [430, 431]. Ugyanakkor bizonyos szubsztrátok/modulátorok (vinblasztin, ciklosporin és SDZ PSC 833, de nem verapamil) jelenlétében, valamint ATP depletált sejtekben az antitest képes az összes, akár minden sejt felszíni transzporter jelölésére is. Az irodalomban a jelenség „UIC2-shift”-ként ismert [430] és hátterében elsősorban a kötőhelyek mennyiségének emelkedése áll (1.5-10-szeres emelkedés). Az antitest affinitását jelző disszociációs állandó (K_d) csak kismértékben változik.

Az UIC2 antitest segítségével a sejtfelszíni Pgp molekulák két szubpopulációját/konformációs formáját lehet megkülönböztetni. A szaturációs koncentrációban, de modulátorok jelenléte nélkül UIC2 antitesttel jelölhető Pgp-eket (a sejtfelszíni Pgp mennyiségek 10-40%-a) Pool1 Pgp-ként, míg az UIC2 antitest számára kizárólag CsA-típusú drogok jelenlétében hozzáférhető Pgp-eket Pool2 Pgp-ként azonosítjuk. A Pool2 Pgp-k ugyanakkor CsA-típusú drogok nélkül is megjeleníthetők, az UIC2 antitest és bármely egyéb antitest (MRK16, MM12.10 vagy 15D3) szekvenciális jelölésével, mivel ezen antitestek részben átfedő epitópokat azonosítanak. Fontos megjegyeznünk, hogy a sejtfelszíni Pgp molekulák konformációs heterogenitása nagy valószínűséggel minden Pgp-t expresszáló sejtben megfigyelhető, hiszen az „UIC2-shift” jelenséget számos sejtvonalon bizonyították [430]. A két Pgp Pool folyamatosan dinamikus egyensúlyban van egymással. A sejtek egy éjszakán át történő Brefeldin-A kezelése nem befolyásolta a két különböző konformációs állapotú Pgp-k arányát. Ugyanakkor munkacsoportunk számos különbséget vélt felfedezni közöttük.

NIH 3T3-MDR1 sejtvonalon konfokális mikroszkóppal végzett kolokalizációs kísérletek azt mutatják, hogy a két Pool különböző membrán területeket foglal el. A két Pool inhomogén megoszlása a membránban különböző molekuláris partnerekre utalhat. A FITC-falloidinnal jelölt aktin mikrofilamentumok kolokalizációja inkább a Pool1 Pgp-vel figyelhető meg. A Pool1 illetve Pool2 Pgp-k raft asszociáltságának megítélésére további kísérleteket végeztünk. A két Pool biotinált antitesttel történő szelektív jelölését követően a TX-100-zal készített sejtlyázatot szukróz sűrűség-grádiensen szeparáltuk. A streptavidin konjugált mikrobead-kötött transzporter mennyiségek detektálása fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel történt. Az alacsony denzitású, raft doméneket is tartalmazó frakciók nagyobb mennyiségben tartalmazták a Pool1 Pgp-eket a Pool2 Pgp-vel összehasonlítva. Ezek alapján a különböző antitestekkel jelölt Pgp szubpopulációk más-más membrándoménekekben helyezkednek el. A két Pool citoszkeleton és raft asszociáltság-mértékének vizsgálata áramlási citometriás detergens rezisztens mérésekkel történt 3T3-MDR1 illetve KB-V1 sejtvonalon. A próba arról informál, hogy az egyes membrán fehérjék milyen mértékben/százalékban képesek ellenállni egy-egy sejtben a detergens membrán-szolubilizációs hatásának. A 0 fokon, rövid ideig és alacsony koncentrációban alkalmazott detergens kezelést követően a sejtek még alkalmasak áramlási citometriás analízisre. Az intakt citoszkeletonhoz kötött, detergens rezisztens fluoreszcensen jelölt membránfehérjék pedig azonosíthatóak [432]. A TX100 detergens alkalmas azon Pgp-k azonosítására melyek raftokon keresztül kapcsolódnak a citoszkeletonhoz, míg az NP40 detergens rezisztens transzporterek direkt citoszkeleton

asszociációt mutatnak [135]. A Pool1 Pgp-k mind raft, mind direkt citoskeleton asszociáltsága nagyobb mértékű volt a Pool2 Pgp-vel összehasonlítva.

A sejtfelszíni Pgp Pool-ok internalizációs kinetikájának vizsgálata jelöletlen elsődleges antitestes inkubációt követően fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel történt. Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k szignifikánsan nagyobb sebességgel internalizálódtak. Amikor a sejtfelszíni Pgp molekulákat (Pool1+Pool2) UIC2 távollétében 15D3 antitesttel jelöltük a Pgp-k endocitózisa időben csak sokkal később indult el. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy az endocitotikus folyamatok sokkal inkább érintik az UIC2-vel jelölt Pool1 konformációs állapotú Pgp-eket. Ugyanakkor fontos megjegyezni az UIC2 antitest szerepét ebben a trafficking folyamatban, mivel a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek UIC2-vel történő jelölését követően (CsA előinkubáció alkalmazásával) megfigyelhető változások a 15D3-mal jelölt mintákkal összehasonlítva szintén fokozott internalizációt mutattak.

A különböző antitestekkel jelölhető Pgp pool-ok konfokális mikroszkópos mérésekből feltételezhető különböző molekuláris partnereinek felderítésére immunprecipitációs kísérleteket végeztünk. A sejtfelszíni Pgp molekulák UIC2 (Pool1) illetve 15D3 (Pool1+2) antitesttel történő jelölését követően a sejteket egy meghatározott ideig 37 fokon inkubáltuk, hogy elősegítsük azok internalizációját. Ezt követően a sejteket TX100-zal lizáltuk és immunoprecipitátumokat gyűjtöttünk a koprecipitációs partnerek tömeg spektrometriás azonosításához. Számos azonosított fehérje citoskeletonális vagy citoskeleton asszociált citoplazmatikus fehérje volt. Az UIC2-vel jelölt Pgp-k mellett, olyan fehérjéket találtunk, mint a vimentin, kaptin vagy beclin-1, míg a 15D3-mal jelölt Pgp-k mellett a septin 11, annexin A2 vagy a polimeráz-delta-interakciós fehérje 2-t. Sejtfelszíni Pgp molekulák immunprecipitációja során a caveolin-1 ezekben a kísérletekben is kimutatható volt az UIC2-vel jelölt Pgp-k mellett, ellentétben a 15D3-mal jelölt Pgp-vel. Eredményeink azt mutatták, hogy a két pool részben különböző sejtfelszíni és intracelluláris fehérjékkel mutat asszociációt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

A sejtfelszíni P-glikoproteinek konformációs és topológiai heterogenitásához kapcsolódóan (lásd 1.12-es fejezet) célul tűztük ki a különböző Pool-ok trafficking folyamatainak vizsgálatát:

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

4. Mutatnak-e koleszterin-függő traffickingbeli különbségeket a Pool1 konformációs állapotú, valamint a Pool2 konformációjú P-glikoproteinek?

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

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

5. Kíváncsiak voltunk, hogy a lizoszómális exocitózis lezajlik-e a mi rendszerünkben is?
6. Célul tűztük ki továbbá a lizoszómák stabilitásának vizsgálatát NIH 3T3 és 3T3-MDR1 sejtvonalak esetén a PM koleszterin perturbációja nélkül illetve azt követően. Irodalmi adatok ugyanis arra utaltak, hogy a koleszterin moduláció jelentősen befolyásolhatja azt.
7. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a lizoszómális apparátusban tapasztalt esetleges különbségek esetén, van-e ennek hatása a két sejtvonaleletképességére?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Sejttenyésztés

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

3.2 A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

Tripszinézést követően a sejteket kétszer mostuk 8 mM glükózt tartalmazó PBS-sel (pH=7.4), majd a sejtkoncentrációt $6 \cdot 10^6$ sejt/ml-re állítottuk be. A sejtmembrán koleszterin tartalmának változtatására emelkedő koncentrációjú random-metilezett-β-ciklodextrin (RAMEB), illetve annak koleszterinnel képzett komplexét, valamint egyéb ciklodextrin származékokat használtuk. A szuszpenzióban lévő sejteket 37°C-on 20 percen keresztül inkubáltuk a különböző ciklodextrin származékokkal, mostuk majd elvégeztük a megfelelő vizsgálatokat.

3.3 Monoklonális antitestek előállítása és jelölése

Az UIC2 [IgG2a; [427]; ATCC No. HB-11027)] és a 15D3 [IgG1; [424]; (ATCC No. HB-11342)] antitesteket hibridóma sejtek felülúszójából, protein A affinitás-kromatográfia alkalmazásával magunk izoláltuk. Kísérleteinkhez az antitesteket különböző szukcinimid észter típusú módosítást tartalmazó festékekkel konjugáltuk, úgymint Alexa488, Alexa647, pHrodo (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Az antitesthez nem kötődött festék molekulákat Sephadex-G50 oszlopon gél-szűrési technikával távolítottuk el. A festék-fehérje arányt spektrofotométerben abszorbancia alapján határoztuk meg. A pHrodo konjugált antitestek fehérje/festék arányát a moláris extinkciós koefficiens hiányában festék koncentráció sor segítségével határoztuk meg.

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

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

UIC2-vel történő teljes sejtfelszíni mennyiségek jelölésekor a sejteket 10 percig 37 °C-on előinkubáltuk 10 μ M ciklosporin A-val (CsA).

3.5 A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése

Alexa647 festékkel konjugált mAb-vel jelölt NIH 3T3-MDR1 sejtekről a különböző inkubációs időket követően a sejtfelszínen maradt antitesteket savas kémhatású puffer segítségével távolítottuk el (0,5 M NaCl, 0,1 M glicin, pH=2,5 [433]). A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerben (BD FACSAarray, Budapest Flow Soft Kft.) mértük. A PI gerjesztését 542 nm-en végeztük és az FL2 (sárga) csatornában detektáltuk (585/42 nm), míg az Alexa647 festéket 635 nm-en gerjesztettük és az FL3 (vörös) csatornában detektáltuk (661/16 nm). A savas mosásra rezisztens fluoreszcencia hányadot használtuk az internalizált receptor-antitest komplexek százalékos arányának kifejezésére, mind a kezelt, mind a ciklodextrin kezelt sejtek esetén.

3.6 Internalizáció hőmérséklet és ATP függésének vizsgálata

A sejtfelszíni Pgp-k jelzetlen elsődleges mAb-el történő jelölését követően kétszer mostuk a sejteket glükóz mentes vagy glükózos PBS-sel. Majd 30 percen keresztül inkubáltuk glükóz mentes vagy glükózos PBS-ben. Az inkubációs idő alatt a sejteket 1) 0°C-on (jégen); 2) 37°C-on tartottuk illetve 3) 2 percenként mozgattuk a jég és a 37°C-os vízfürdő között. Ezt követően a mintákat mostuk 0°C-os vagy 37 °C-os pufferrel, majd 30 percen keresztül 0°C-on jelöltük GamIgA647 másodlagos jelzett antitesttel. Mosást követően a sejtfelszíni transzporter

mennyiségeket áramlási citometriásan PI jelenlétében detektáltuk. A sejtfelszíni fehérje mennyiségeket a glükóz mentes, 0°C-os minta százalékában fejeztük ki.

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

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

3.8 Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek

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

3.9 Exocitálódó Pgp mennyiségek meghatározása

A sejteket CsA kezelés nélkül vagy CsA kezelést követő jelöletlen UIC2 antitesttel jelöltük 37 °C-on 30 percen keresztül, majd hidegen mostuk. Ezt követően a sejteket a következő összetételű médiumban inkubáltuk (1% FCS-t, 2 mM L-glutamin-t, 25 µg/ml gentamicin és 5 mM HEPES-t tartalmazó DMEM; pH 7,4) különböző ideig. A megfelelő időben történt mintavétel után az újonnan kijövő sejtfelszíni Pgp mennyiségeket UIC2-A647 vagy 15D3-A647 antitesttel azonosítottuk és áramlási citometriásan detektáltuk. Minden esetben meghatároztuk a kiindulási UIC2-vel illetve 15D3-mal jelölhető Pool1 illetve Pool1+2 mennyiségeket. A fehérjeszintézis gátlása melletti sejtfelszíni Pgp mennyiségek meghatározásához a sejteket az UIC2 lefedés előtt 1 órán át 10 µg/ml koncentrációjú cikloheximiddel kezeltük. A cikloheximidet a további kezelések és inkubációk idejére minden esetben visszaadtuk.

A rövidebb idejű exocitózisra irányuló kísérletek során a sejteket először festékekkel nem konjugált Pgp ellenes jelöletlen antitestekkel fedtük le (100 µg/ml mAt; 37°C 30 perc) majd kétszer mostuk hidegen. A sejteket a továbbiakban különböző ideig (30, 25, 20, 15, 10, 5 és 2 perc) inkubáltuk DMEM tenyésztő folyadékban Alexa647 jelölt Pgp ellenes antitestek (100 µg/ml) jelenlétében az újonnan kijövő Pgp mennyiségek monitorozására. A fluoreszcenciákat két hideg PBS-sel történő mosást követően áramlási citometriásan mértük. Az exocitózisra kerülő mennyiségek számolásánál figyelembe vettük a rövid jelölési idők miatt a jelölt antitest időben történő felkötődési tulajdonságait. A koleszterin modulált minták esetén az exocitózisra került mennyiségek monitorozását megelőzte a sejtek ciklodextrin kezelése.

3.10 Sejt felszíni Pool1 mennyiségek mérése exocitózis gátló szerek mellett

A ciklodextrin kezelés utáni sejt felszíni Pgp mennyiségek mérését megismételtük különböző exocitózis gátló szerek mellett. A sejteket 2 órán keresztül előinkubáltuk glükózos PBS-ben 37°C-on Exo 1 (2-(4-Fluorobenzoilamino)-benzoesav metil észter, 400 µM) vagy Brefeldin-A (360 µM) jelenlétében, majd kezeltük őket ciklodextrinnel és ezt követően 5 perces jelöléssel monitoroztuk UIC2-Alexa647 jelenlétében a sejt felszíni mennyiségeket. A drogokat a ciklodextrin inkubáció idejére visszaadtuk.

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

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

(FacsAria). A sejtfelszíni LAMP mennyiségeket a teljes sejt mennyiségek százalékában fejeztük ki.

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

A sejteket a korábbi protokollnak megfelelően 20 percig kezeltük 37°C-on különböző koncentrációjú RAMEB-bel illetve a koleszterin töltött származékával. A sejteket vagy 5 µg/ml PI-dal jelöltük és mértük áramlási citometriásan (FacsArray) vagy 3%-os frissen készített paraformaldehiddel fixáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül további felhasználáshoz. A fixált sejteket kétszer mostuk és 1,5 mg/ml glicint tartalmazó PBS-ben quenchtük 10 percig szobahőmérsékleten. A mintákat ezután 10 % FBS-t tartalmazó 125 µg/ml koncentrációjú filipin oldattal jelöltük szobahőmérsékleten 1 órán keresztül fénytől védve, majd áramlási citometriásan mértük. A mért koleszterin mennyiségeket a két különböző sejtvonal esetén korrigáltuk a sejt volumenre. Az életképességi görbéket a mért adatokból a következő dózis-hatás görbe alapján illesztettük. $f = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{-(\log EC_{50} - X)})$.

3.13 Lizoszóma mennyiségek meghatározása

A kvantitatív képalkotó citometriás eljárás során a lizoszómákban akkumulálódó festéket a neutrálvöröst használtuk. A sejtenkénti analízishez a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel festettük, míg a lizoszómák neutrálvörössel voltak töltve. 40 µg/ml neutrálvörös jelenlétében 2 órán keresztül inkubáltuk a sejtek sejtenyésztési körülmények között [434]. A sejtek és körvonalainak azonosítása a teljes sejt jelek alapján történt. Azaz a Hoechst 33342 festék (405 nm-es UV fényvel gerjesztve és 430-470 nm-es sávszűrővel detektálva) és a neutrálvörös festék (488 nm-es kék lézer gerjesztést követően 650 nm-es felülatéresztő szűrővel detektálva) fluoreszcenciája, valamint a neutrálvörös abszorbanciája (488 nm-es gerjesztést követően) alapján. Az egyedi sejtek kiválasztása a teljes jelek területe alapján és azután a Hoechst 33342 jelekkel arányos DNS mennyiségek alapján történt. Végül a sejtek lizoszóma mennyiségeit az azonosított sejtek neutrálvörös kromatikus intenzitásából határoztuk meg. A méréseket és az analízist a képalkotó citométer (iCys, CompuCyte, Cambridge, MA) fluoro-kromatikus opcióját használva a rendszer szoftvere (iNovator Applications Development Toolkit software (Thorlabs Imaging Systems, Sterling, VA, USA, korábbi nevén CompuCyte) segítségével végeztük.

3.14 A lizozómák fotodestrukciója

A lizozómák akridin narancs (AO) szenzitizálta fény indukálta fotodestrukcióját lézerpásztázó citométerrel (iCys laser-scanning cytometer, CompuCyte, Westwood, MA) és élő sejt video-mikroszkópiával vizsgáltuk. A sejteket 8 lyukú sejttenyésztő plate-en, DMEM-ben tartottuk a konfluencia eléréséig. A sejteket 1 µg/ml koncentrációjú AO-val jelöltük 1 órán keresztül, 37 °C-on PBS-ben, majd kétszer mostuk. Az akridin narancssal töltött sejtekből a 40-es objektív (Olympus, UIS2 40x plan fluorite, NA 0,75) 2x2 látómezőnyi területét egymást követően 50 alkalommal világítottuk be a 488 nm-es kék solid-state lézerrel. A zöld (515-545, 530/30 nm) és a vörös (565-595, 580/30 nm) emissziós fluoreszcencia intenzitásokat a bevilágítási ciklusok alatt, valós időben detektáltuk. Az adatokat az iCys szoftverből a Microsoft Excel spreadsheet programba exportáltuk, ahol a kalkulációkat elvégeztük. A lizozómákban nagy koncentrációban akkumulálódó festék vörös fluoreszcenciát mutat. Az akridin narancs szenzitizált lizozómák membránja kék lézer fényvel történő megvilágítás alatt ruptúrál, a festék kikerül a nagy koncentrációt biztosító savas millióból, következésképpen a vörös fluoreszcencia intenzitás időben csökken. Az akridin narancs citoszólba történő kikerülése, illetve a sejtmag DNS-hez történő kötődése időben a zöld fluoreszcenciák emelkedésével jár. A maximális zöld fluoreszcencia intenzitás felének eléréséhez szükséges idő állandónak a meghatározását szigmoid görbék illesztésével végeztük az alábbi online görbe illesztési program segítségével (<http://zunzun.com/>). Az idő állandók átlag és szórás értékeit 10-15 sejtől kalkuláltuk.

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

Videó képsorozatok értékelése:

A szétesési eseményeket egy korábban már konfokális képsorozatok kalcium tuskéinek analizésére használt program segítségével végeztük [435]. Az exocitotikus események számát

normalizáltuk a sejtszámra, valamint mindkét sejtvonal esetén meghatároztuk az összes lizoszóma széteséséhez szükséges besugárzási időket.

3.15 A plazmamembrán koleszterin kivonásának hatása a lizoszómális festékek akkumulációjára

A festék akkumulációs kísérletekhez a sejteket 96-lyukú sejttenyésztő plate-re ($1 \cdot 10^5$ sejt/lyuk) tettük ki és 24 óráig inkubáltuk sejttenyésztési körülmények között [434]. A médium óvatos eltávolítását követően a sejtek különböző koncentrációjú CD oldatokkal és 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú neutrál vörös oldattal együtt inkubáltuk 37°C -on 1 órán keresztül sejttenyésztési körülmények között. A sejteket kétszer mostuk PBS-sel majd a sejtek lizoszómájában akkumulálódott neutrál vörös festéket feltáró oldattal vontuk ki (50 ml 96%-os alkohol; 49 ml desztillált víz és 1 ml vízmentes ecetsav). Az akridin narancs akkumulációs kísérletek során a 96-lyukú plate-en tenyésztett sejteket különböző koncentrációjú CD oldatokkal és 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú akridin narancs oldattal inkubáltuk együtt. A fluoreszcencia intenzitásokat spektrofotó-spektrofluoriméterrel mértük (Synergy HT reader; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Az emittált vörös fluoreszcencia intenzitásokat 460/40 nm-es gerjesztést követően 645/40 nm-en, míg a zöld fluoreszcenciákat 485/20 nm-es gerjesztést követően 528/20 nm-en detektáltuk. A festékek akkumulációjának változását a kezeletlen minta relatív %-ban fejeztük ki.

3.16 Aktin filamentum fluoreszcens jelölése

Az NIH 3T3-MDR1 sejtek közel konfluens egyrétegű tenyészetéből 2 perces tripszinezés (0,05 % tripszin és 0,02 % EDTA) segítségével készítettünk sejtszuspenziót, majd a sejteket kétszer mostuk Hank's pufferben. Az 1 millió/ml-es sejtszuspenziókat különböző koncentrációjú detergenssekkel [TX100 (3-0,0039 v%); Brij 98 (3-0,0039 v%); NP40 (3-0,0039 v%) és CHAPS (2-0,0039 v%)] kezeltük 30 percig jégen. A sejteket 4% -os metanol mentes formaldehiddel fixáltuk legalább 2 óráig citoszkeleton puffer oldatban (138 mM KCl; 3 mM MgCl_2 ; 2 mM EGTA; 10 mM MES pH 6,1) [436, 437], 320 mM szukrózzal kiegészítve, ami megfelelő módon őrzi meg a citoszkeletont [438]. A sejteket ezt követően mostuk Hank's pufferrel, permeabilizáltuk 0,5% TX100/Hank's oldattal majd öblítettük 0,1% TX100/Hank's oldattal. A sejteket 10 percig blokkoltuk (0,1% TX100, 2% zsírszegény tejpor Hank's pufferben), és az aktin filamentumokat 1 $\mu\text{g/ml}$ TRITC-falloidinnel jelöltük szobahőmérsékleten, 30 percig sötétben. A sejteket mostuk a blokkoló oldattal majd Hank's oldattal és a fluoreszcencia intenzitásokat áramlási citometriásan detektáltuk, illetve konfokális mikroszkópos képeket készítettünk a sejtekről.

3.17 Detergens elúciós eljárás

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

3. 18 Statisztikai analízis

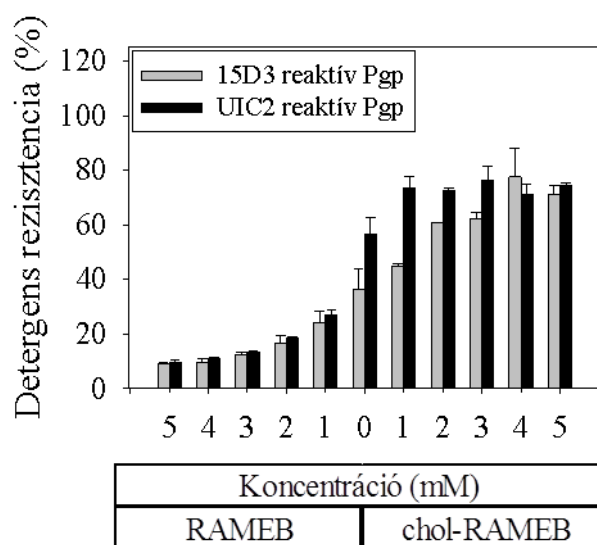
Kísérleteink során az adatokat a GrapPad Prism szoftver (6.01 verzió) segítségével értékeltük ki. Két csoport összehasonlításánál kétmintás t-próbát végeztünk. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak és minden esetben feltüntettük a p értékeket is.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1 Méréseinkhez kapcsolódó felismerések, metodikai megfontolások.

4.1.1 Az UIC2 valamint 15D3 reaktív P-glikoproteinek koleszterin-függő raft asszociációja

Munkacsoportunk azon korábbi megfigyelése, hogy az UIC2 antitesttel megkülönböztethető két pool eltérő membrán lokalizációt mutat konfokális mikroszkópos képeken, illetve nagy valószínűséggel különböző trafficking folyamatokkal jelezhető, arra utalt, hogy a két pool különböző membránkörnyezetben helyezkedik el. Munkacsoportunk több kísérletet végzett ennek a hipotézisnek a bizonyítására. Áramlási citometriás detergens rezisztens mérések segítségével én is bizonyítottam, hogy a Pool1 Pgp-k nagyobb valószínűséggel fordulnak elő TX100 rezisztens membránmikrodoménekben. Az UIC2 reaktív Pgp-k fokozott detergens rezisztenciát ($56,3 \pm 6,5\%$) mutattak a 15D3 reaktív Pgp-vel összehasonlítva ($36,5 \pm 7,3\%$) (9.ábra).



9. ábra Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k fokozott detergens rezisztenciát mutatnak

Az UIC2 reaktív Pgp-k (Pool1) fokozott detergens rezisztenciát mutatnak a 15D3 reaktív Pgp-vel (Pool1+Pool2) összehasonlítva TX100-zal végzett áramlási citometriás detergens rezisztens mérésekben. Az oszlopdiaagrammok legalább két mérés átlagát mutatják ($\pm SD$).

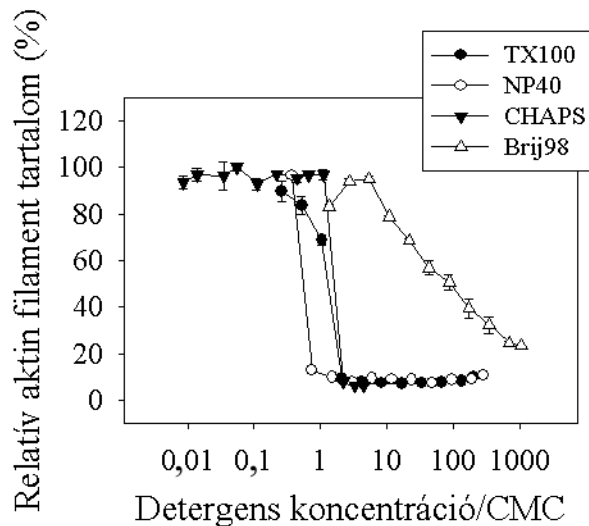
A fehérjék raft asszociációja a plazma membrán koleszterin modulálásával befolyásolható volt. Az UIC2 reaktív Pgp-k detergens rezisztenciája a koleszterin kivonás során már kis ciklodextrin koncentrációk mellett is hirtelen csökkent. Ugyanakkor a membrán koleszterin

mennyiségének emelése sokkal inkább fokozta a 15D3 reaktív Pgp-k detergens rezisztenciáját.

4.1.2 Különböző detergens hatása az aktin polimerizációs tulajdonságaira

Kollaborációs partnereink in vitro aktin polimerizációs vizsgálatai azt mutatták, hogy a raft izolálására sok esetben használt különböző detergens (TX100; NP40; CHAPS; Brij) befolyással vannak az aktin polimerizációs tulajdonságaira, mégpedig különböző módon [439]. Mivel az imént említett detergens alapú fehérje raft azonosítási módszer során azon fehérjéket vagyunk képesek mérni, melyek a polimerizált aktin citoskeletonhoz rögzülnek, ezért a detergens aktin polimerizációra gyakorolt hatásai rendkívül fontosak lehetnek.

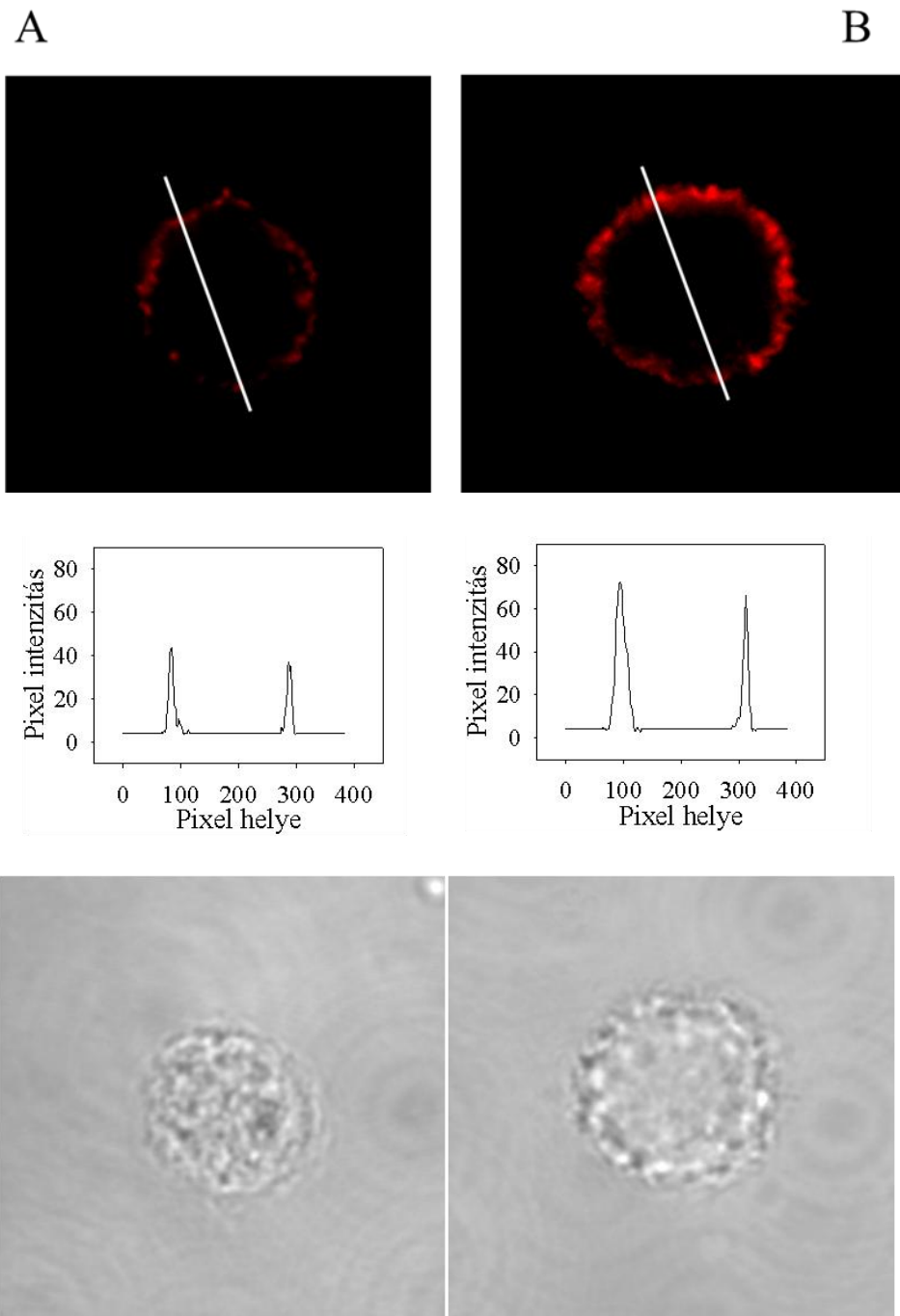
Áramlási citometriás mérésekben vizsgáltuk, hogy az in vitro körülmények között megfigyelhető polimerizációs változások, milyen módon manifesztálódnak in vivo körülmények között, NIH-3T3-MDR1 fibroblaszt sejtekben. A sejt vonal előnyösnek tűnt abból a szempontból, hogy az MDR sejtek a szenzitív sejtekkel összehasonlítva fokozott mennyiségű szervezett aktin filamentum struktúrákat tartalmaznak [131]. A sejteket tripszinezést követően különböző koncentrációjú detergenssel kezeltük 30 percig jégen, majd fixálást követően TRITC vagy FITC jelölt falloidinnel festettük. Mivel a falloidin nem kötődik az aktin monomerekhez (G-aktin), így a mért fluoreszcencia intenzitások valójában az aktin filamentumok (F-aktin) mennyiségéről adnak felvilágosítást. Az NP40, TX100 illetve CHAPS kezelések a koncentráció függvényében rendkívül hirtelen csökkentették a falloidin festést, ami az F-aktin gyors depolimerizációjára utal (**10. ábra**). Az alkalmazott koncentráció tartományban a Brij98 detergens az előző detergenshez képest csak lényegesen magasabb koncentrációban okozott aktin depolimerizációt. Általánosságban elmondható a használt detergensről, hogy a kritikus micelláris koncentrációjuk körül [NP40 (0,0105 m/V %); TX100 (0,0149 m/V %); CHAPS (0,1476-0,6150 m/V %)] okoznak rendkívül gyors aktin depolimerizációt. Ezen szabály alól tehát egyedül a Brij 98 volt kivétel, amely detergens a legalacsonyabb kritikus micelláris koncentrációval rendelkezett (0,0029 m/V %), de ettől csak lényegesen magasabb koncentrációban okozta az aktin filamentumok mennyiségének fokozatos csökkenését. Ez volt az az egyetlen detergens, amelyik a többi detergenssel összehasonlítva, in vitro körülmények között is máshogyan viselkedett. In vitro aktin polimerizációs esszében vizsgálva [439];[440] a Brij 98 a többi detergenssel ellentétben nem okozott aktin depolimerizációt, sőt enyhe aktin polimerizációt mutatott.



10. ábra A különböző detergensok hatása az NIH-3T3-MDR1 sejtek F-aktin mennyiségére.

A Brij98 detergennel ellentétben a TX100, NP40 valamint CHAPS detergensok a koncentráció függvényében rendkívül hirtelen depolimerizálták az aktin filamentumokat. A sejteket a jégen történő detergens kezelést követően fixáltuk, majd TRITC falloidinnal jelöltük és áramlási citometriásán mértük. Az ábrákon az átlagos aktin filament mennyiségeit a detergensok CMC-ben meghatározott koncentrációjának függvényében fejeztük ki.

Az áramlási citométeres mérések alapvető feltétele, hogy a sejtek még azonosíthatóak legyenek. Mivel a detergens kezelések befolyásolják a membrán integritását, a sejtek morfológiai változásait szintén monitoroztuk az áramlási citométeres vizsgálatok alatt konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (**11. ábra**). A fibroblaszt sejtekre jellemző alak, a detergens kezelést követő membrán vesztésnek köszönhetően felkerekedett. Azonban a sejtek megtartottak egy bizonyos fokú morfológiát, amely lehetővé tette az F-aktin tartalmuk mennyiségének áramlási citometriás illetve mintázatának mikroszkópos meghatározását, még a legmagasabb detergens koncentrációk mellett is. A detergens kezelt sejtek elvesztették aktin filamentumaik nagy részét, kizárólag a membrán alatti sejt cortex az, ami megmaradt. Bár a kontroll sejtekkel összehasonlítva ennek mennyisége is jelentősen csökkent.



11. ábra Detergens kezelést követő morfológiai változások

NIH-3T3MDR1 sejtek aktin filamentum mintázata. A kezeletlen sejtekkel összehasonlítva csökkent mennyiségű aktin filamentum található a sejt-kortexben 2%-os Brij98 detergens kezelést követően. Hasonló festődési mintázatot mutatnak a NP40, TX100 illetve CHAPS kezelt sejtek is. Az *NIH-3T3MDR1* sejteket különböző koncentrációjú detergenssel kezeltük, fixáltuk majd TRITC-falloidinnel jelöltük. A középső grafikonokon a felső fluoreszcens képeken feltüntetett fehér vonal mentén mért pixel intenzitásokat tüntettük fel. A kapcsolódó fázis kontraszt képek az alsó sorban találhatóak.

A vizsgált négy detergensből három esetben (TX100; NP40; CHAPS) hirtelen aktin depolimerizációt tapasztaltunk a detergensek kritikus micelláris koncentrációja körül. Ennek a megfigyelésnek egyik oka lehet az, hogy a detergensek a CMC-jüknek megfelelő koncentrációt elérve képesek a membrán permeabilizálására, illetve szolubilizálására [441]. Ez a permeabilizáció pedig olyan kis molekulák, fehérjék elvesztését, illetve mennyiségének csökkenését eredményezheti, mint az ATP vagy aktin/profilin illetve aktin/timozin komplexek, melyek elengedhetetlenek az intracelluláris aktin polimerizációjához. Így ezek elvesztése a membrán alatti sejtkortex erőteljes csökkenését eredményezik, ahogyan azt tapasztaltuk. A Brij98 detergens esetén ugyanakkor csak a CMC-től magasabb koncentrációk okoztak aktin depolimerizációt, mely felhívja a figyelmet arra, hogy a detergensek aktin polimerizációt gátló hatásának magyarázata nem feltétlenül egyszerűsíthető le, adott esetben ettől sokkal komplexebb hatásokkal kell számolni [439].

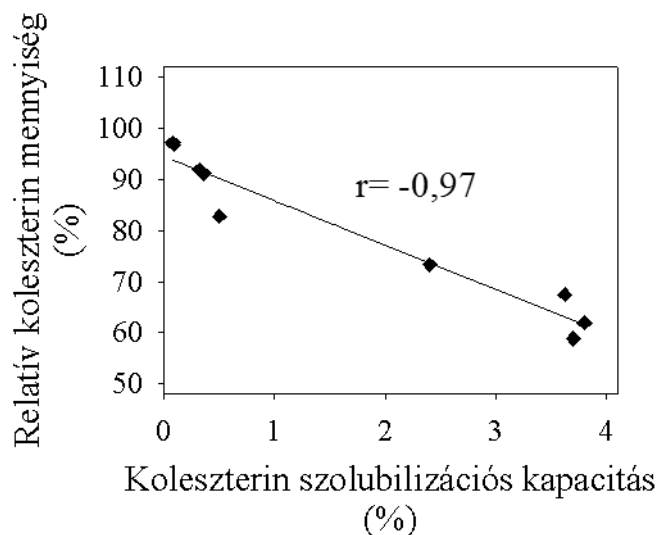
A különböző detergensek aktin polimerizációs hatása érdekes lehet olyan raft fehérje azonosítási módszerek esetén, mint az általunk is sokszor használt áramlási citométeres detergens rezisztencia meghatározás (FCDR) [135, 432, 442-445]. Feltételeztük, hogy a detergensekkel történő szolubilizáció után azok a raft fehérjék detektálhatóak a sejtfelszínen, melyek képesek közvetlenül (aktin-membrán) vagy közvetve (aktin-kötő fehérje-membrán) kapcsolatot létesíteni a membrán alatti aktin citoskeletonnal. Ebből akár arra is következtethetnénk, hogy az FCDR mérések során detektált detergens rezisztens membránrészek létrejöttében az F-aktin függő folyamatoknak van lényegesebb szerepe és nem a membránmikrodomének komponensei között megvalósuló fiziko-kémiai kölcsönhatásoknak. A különböző detergensek aktin depolimerizációt kiváltó hatása ugyanakkor cáfolja azt, hogy különböző mikrodomének detergensekben történő oldhatatlansága mögött pusztán csak a membrán alatti aktin citoskeleton venne részt. A raftok lipid-lipid, valamint lipid-fehérje kölcsönhatásai legalább ennyire fontosak a detergens rezisztens membránmikrodomének izolálásakor. Az aktin citoskeleton depolimerizációja ugyanakkor viszont bizonyítottan elősegítheti a raftok koaleszcenciáját. Ily módon a különböző detergensek aktin polimerizációra kifejtett, koncentráció-függő módon megvalósuló eltérő hatásai hozzájárulhatnak a különböző detergensek jelenlétében izolált raft domének heterogenitásához, valószínűleg sok más tényező mellett. Ezeknek a lehetséges artefaktumoknak a meglétével sajnos számolnunk kell a detergens alapú raft izolálási módszerek során. Ugyanakkor méréseink alapján javaslatot tettünk a detergens rezisztens membrándomének izolálása során optimálisan használható detergens koncentrációkra, mely koncentrációk mellett a lehető legkisebb befolyással vannak az aktin polimerizációs-

depolimerizációs folyamataira. A TX100 jelenlétében tapasztalt aktin depolimerizáció természetesen megkérdőjelezi, a fent említett FCDR technikával azonosított UIC2 valamint 15D3 reaktív Pgp-k raft asszociált abszolút mennyiségeit. Ugyanakkor nagy valószínűséggel nem befolyásolja a két különböző konformációs állapotú Pgp-k egymáshoz viszonyított relatív raft asszociáltságát.

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

4.1.3.1 A sejtmembrán koleszterin mennyiségének változása a β -ciklodextrin származékok koleszterin szolubilizációs kapacitásának függvényében

A Pgp koleszterin-függő trafficking folyamatainak vizsgálatakor érdekes megfigyelés tettünk. A 15D3 antitest affinitása nagymértékű koleszterin-függést mutatott random-metil- β -ciklodextrinnel (RAMEB) és annak koleszterinnel töltött származékával végzett PM koleszterin modulációt követően, ellentétben az UIC2 antitesttel (lásd 4.6-os fejezet). Első látásra ellentmondás mutatkozott ezen antitestek affinitásának koleszterin-függése és az általuk jelölt Pgp poolok raft asszociáltsága között. Annak ellenére, hogy az UIC2 jelölt Pgp-k rendelkeznek nagyobb mértékű raft asszociációval, mégis a 15D3 antitest affinitása mutatott jelentős koleszterin-függést. A jelenséget különböző ciklodextrin származékok segítségével végzett, különböző mértékű PM koleszterin kivonást követően vizsgáltuk tovább.



12. ábra Az egyes CD származékok koleszterin szolubilizációs kapacitása illetve a velük kezelt sejtek szabad koleszterin mennyiségei közötti korreláció

Negatív lineáris korreláció ($r=-0,97$) figyelhető meg a sejtek ciklodextrinnek történő kezelését követő szabad koleszterin mennyiségei és az egyes származékok koleszterin szolubilizációs kapacitása között. A görbe pontjai 3 mérés átlagát tartalmazzák. A pontos átlag \pm SEM értékekért lásd a 2. táblázatot.

Rövidítés	Teljes név	Koleszterin-szolubilizációs kapacitás (mg/ml) *	Relatív koleszterin mennyiség (%)
SP-DIMEB-50	Szulfopropil-heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin	0	97,1 \pm 6,05
CM-DIMEB-50	Karboximetil-heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin nátrium sója	0,2	96,8 \pm 8,83
HPBCD	2-hidroxiopropil- β -ciklodextrin	0,3	91,7 \pm 5,37
CHRYSMEB	Metilezett β -ciklodextrin	0,4	91,2 \pm 5,67
MA-RAMEB	Metilezett 6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciklodextrin	0,5	82,7 \pm 3,53
SU-RAMEB	Szukcinil random metilezett β -ciklodextrin	2,4	73,4 \pm 7,73
RAMEB	Random metilezett β -ciklodextrin	3,5	67,5 \pm 8,97
DIMEB-80	Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -ciklodextrin (80 %-os tisztaság) **	3,8	58,8 \pm 6,03
DIMEB-95	Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -ciklodextrin (95 %-os tisztaság) **	3,7	61,9 \pm 8,12

2. táblázat A vizsgált ciklodextrin származékok

A táblázatban a különböző szerkezetű β -ciklodextrin származékok oldatban mért koleszterin szolubilizációs kapacitását illetve a velük kezelt sejtek relatív koleszterin mennyiségeit tüntettük fel.

*0,04 M koncentrációjú CD oldattal mérve fölös mennyiségű koleszterin jelenlétében [446].

**Az átlagos izomer tisztaságot a heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin százalékában fejeztük ki, ahol az oldat még tartalmaz 2,6-di-O-metil, 2,3-di-O-metil és 3,6-di-O-metil- β -ciklodextrin származékokat is.

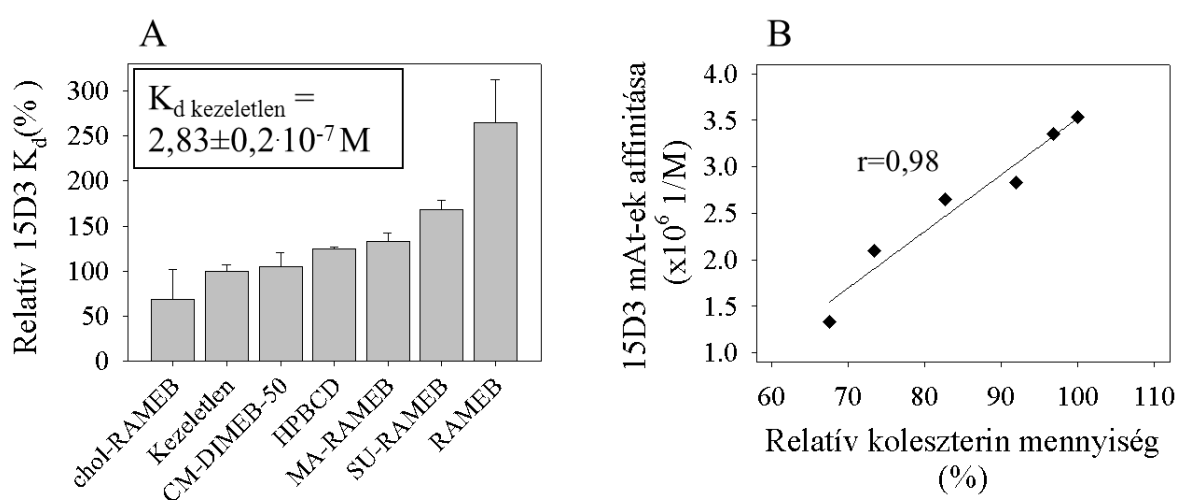
Az általunk alkalmazott különböző származékok koleszterin szolubilizációs kapacitása már ismert volt, és szoros korrelációt mutatott az egyes származékok hemolitikus aktivitásával, valamint Caco-2 sejtvonalon mért citotoxicitásukkal [446].

A szerzők az egyes CD származékok citotoxikus tulajdonságainak megítéléséhez a származékok koleszterin komplexációs tulajdonságait javasolták prediktív faktorként, habár egyetlen sejtvonalon sem történtek addig koleszterin mennyiségi mérések. Filipin festéssel végzett kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a CD származékok koleszterin szolubilizációs tulajdonságai szoros korrelációt mutatnak a származékokkal kezelt sejtek szabad koleszterin mennyiségeivel (**12. ábra**).

Az egyes CD származékok tehát valóban alkalmasak különböző koleszterin mennyiségek kivonására.

4.1.3.2 A 15D3 monoklonális antitest koleszterin-függő affinitás változása

A 15D3 antitest affinitása ezekben a kísérletekben is erős függést mutatott a különböző származékokkal végzett koleszterin kivonás mértékével (**13. A ábra**). A 15D3 monoklonális antitest affinitásának meghatározására irányuló kísérleteink során felismertük azt, hogy az antitest affinitása jelentősen változhat a különböző izolálások és jelölések során. Ezen kísérletek során használt 15D3 batch-ek átlag \pm SD értéke ($K_d = 2,33 \cdot 10^{-7} \pm 4,99 \cdot 10^{-8}$ M; n=6) volt. Ennek megfelelően a koleszterin kivonást követően detektálható disszociációs állandók értékeit minden esetben az azonos sejtmintán azonosított, kezeltlen minta disszociációs állandójának százalékában fejeztük ki.



13. ábra A 15D3 antitest affinitása fokozatosan csökken a sejt szabad koleszterin mennyiségeinek csökkenésével

A disszociációs állandó (K_d) értékeit az antitest telítési görbékből számoltuk az anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az ábrán a kezeltlen kontroll minta (K_d kezeltlen = $2,83 \times 10^{-7} \pm 2,05 \times 10^{-8}$ M egy reprezentatív 15D3 antitest disszociációs állandója \pm SD)

százalékában kifejezett relatív disszociációs állandók láthatóak. Az oszlopdiagramon az átlag \pm SD értékeket mutattuk be, $n \geq 2$.

A 15D3 mAt kötődési affinitása a Pgp-hez erős lineáris összefüggést mutatott a sejt szabad koleszterin mennyiségeivel (**13. B ábra**). Két lehetőséget vettünk számításba ennek a jelenségnek a magyarázatára. Az egyik elképzelésünk szerint, a 15D3 mAt kötődésében a Pgp koleszterin-mediálta folyamatos konformáció-változása tükröződne, míg a másik elképzelés szerint a 15D3 mAt epitópjának maszkírozása történik az egyes CD származékok Pgp-hez történő kötődése révén. Számos érvünk szól az epitóp fedés ellen.

Az egyetlen ismert irodalmi adat, mely említést tesz a β CD-ek és a Pgp direkt kapcsolatáról Sharom munkacsoportjából származik [280]. Ebben az esetben viszont a lipid vezikulákba rekonstituált transzporternek kizárólag a citoszolikus részéhez kötődhet a vízdoldékony CD molekula, ellentétben a 15D3 mAt-tel, mely extracelluláris epitópot ismer fel. Számos Caco2 sejtvonalon végzett tanulmány számol be a Pgp β CD-ek mellett tapasztalt extrakciójáról. A fehérje kivonásához minden esetben koleszterin- β CD komplexek kialakulása volt szükséges, azaz a Pgp extrakció elsődleges feltétele a PM koleszterin kivonása és ennek megfelelően a Pgp közvetlen membránkörnyezetének megbontása. Egyetlen tanulmány sem bizonyítja a β CD-ek direkt kapcsolatát a Pgp extracelluláris régiójával [278, 279, 283, 447]. Kísérleteink során továbbá minden esetben alacsony koncentrációjú, rövid inkubációs idejű CD kezeléseket alkalmaztunk, majd a sejteket alaposan mostuk. Régóta ismert hogy a CD molekulák még magas koncentrációban sem kötődnek a vörösvértestek membránjához [336]. A β CD molekulák affinitása az egyéb membrán komponensek iránt lényegesen alacsonyabb mint a koleszterin iránt [311, 335, 358, 448, 449]. Minden β CD származék esetén azonos koncentrációjú (5 mM) kezelést alkalmaztunk. A 15D3 mAt kötődési affinitása pedig az egyes CD származékok koleszterin komplexációs kapacitásával mutatott szoros lineáris korrelációt. Ezek az adatok mind arra utalnak, hogy a különböző β CD származékok kémiai variabilitása elsődlegesen a koleszterin komplexációs kapacitásokat befolyásolja, nem pedig a fehérjével való direkt kölcsönhatást. A sejtek membrán koleszterin mennyiségének RAMEB-koleszterin komplexek segítségével történő emelése (mely preparátum kb. fele mennyiségű nem-komplexált RAMEB molekulát is tartalmazott) fokozta a 15D3 affinitását (**13. A ábra**). Ebben az esetben a β CD molekulák kötődése a Pgp-hez csökkentette volna a kötődési affinitást, amennyiben a RAMEB molekulák valóban interakciót mutatnának a 15D3 mAt epitópjával.

Adataink tehát bizonyítják, hogy a membrán β CD származékokkal végzett koleszterin depléciója koleszterin-függő konformációs változásokat indukál. Valóban számos adat támasztja alá azt a tényt, hogy a membrán koleszterin mennyiségeinek változása jelentősen befolyásolja a Pgp drog transzport funkcióját [135, 281, 450] (lásd 1.7-es fejezet). A 15D3 mAt segítségével pedig ezek a koleszterin-függő konformációs változások sejtes mintákon is azonosíthatóak.

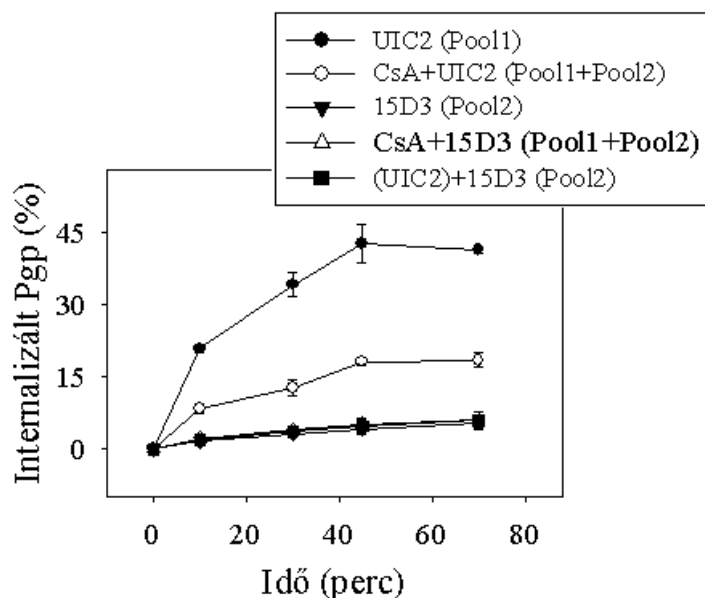
Első látásra ellentmondás látszik a 15D3 mAt UIC2 mAt-tel szembeni nagymértékű koleszterin-függő affinitása és a 15D3- valamint UIC2-reaktív Pgp-k raft asszociációja között. Ma már ismert, hogy a ciklodextrinekkal végzett koleszterin kivonás érinti mind a raft, mind a non raft doméneket. A PM koleszterin egy jelentős része nem raft doméneket helyezkedik el és magas kémiai potenciállal rendelkezik (lásd 1.9-es fejezet). Ez a magas kémiai aktivitású koleszterin pedig sokkal inkább hozzáférhető olyan extracelluláris akceptor molekulák számára, mint a ciklodextrin. Ahogyan azt már említettük, egyes szerzők szerint a koleszterin valójában minden esetben a non-raft kompartmenteken keresztül hagyja el a membránt, a kivonásra került koleszterin pedig a raft és non-raft domének közötti koleszterin redisztribúció során pótlódik és végső soron ez a redisztribúció okozza a raft domének szétesését. Ebben a kontextusban valójában nem meglepő a 15D3 antitest UIC2 antitesttel szemben mutatott erős koleszterin függése, hiszen a ciklodextrinekkal végzett koleszterin kivonás első körben valószínűleg sokkal inkább megzavarja azon Pgp-k membránkörnyezetét, melyeket nem véd a koleszterin kivonásnak sokkal ellenállóbb szfingolipid és gangliozid gazdag raft mikrokörnyezet.

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

Munkacsoportunk számos kísérletet végzett korábban az UIC2 antitesttel elkülöníthető Pgp pool-ok (Pool1 és Pool2) heterogenitásának felderítésére (lásd 1.12-es fejezet). A két különböző Pool trafficking folyamatainak vizsgálatakor, a sejtfelszíni Pgp-k másodlagos antitesttel történő visszamérésekor arra az eredményre jutottunk, hogy az UIC2-vel jelölhető Pool1 Pgp-k fokozott internalizációt mutatnak a Pool2 Pgp-vel összehasonlítva. A jelenséget megerősítő további kísérleteket végeztünk. Az elsődleges antitestes jelölést követően, a megfelelő inkubációs idő letelte után, az esetlegesen nem internalizálódott fehérjéket glicines savas mosással távolítottuk el a sejtfelszínről, az endocitálódott fluoreszcensen jelölt fehérje mennyiségeket pedig áramlási citometriásan detektáltuk. A jelölést követő 10. percben az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k $20,9 \pm 0,8\%$ -a, a CsA kezelést követően UIC2-vel jelölt Pgp-k (Pool1+Pool2) $8,5 \pm 1,0\%$ -a helyezkedett el intracellulárisan. A 15D3-mal jelölt minták esetén

ezen idő alatt lényegesen kisebb mennyiségek internalizálódtak. A 15D3 jelölt minta esetén (Pool1+Pool2) $1,8\pm 0,5\%$, a CsA kezelést követően 15D3-mal jelölt Pgp-k (Pool1+Pool2) esetén $2,2\pm 0,3\%$, míg a jelöletlen UIC2-vel előkezelt majd 15D3-mal jelölt minta esetén (Pool2) $1,9\pm 0,6\%$ volt (**14. ábra**). A 45. percre az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k már $42,6\pm 4,0\%$ -a, a CsA+UIC2-vel jelölt Pgp-k $18,2\pm 0,9\%$ -a internalizálódott, ellentétben a 15D3 antitesttel jelölt mintákkal, ahol $4,1\text{-}5,2\%$ -os mennyiségek internalizálódtak. A korábbi adatokkal összehasonlítva mennyiségileg ugyan eltérő, de tendenciájában teljesen megegyező eredményeket kaptunk.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k a Pool2 Pgp-kel összevetve fokozott endocitózis mutatnak. Ugyanakkor a CsA+15D3 illetve CsA+UIC2 mintákat összehasonlítva, egyértelműen látszik, hogy az UIC2 antitestnek rendkívül fontos szerepe van ebben az internalizációs folyamatban.

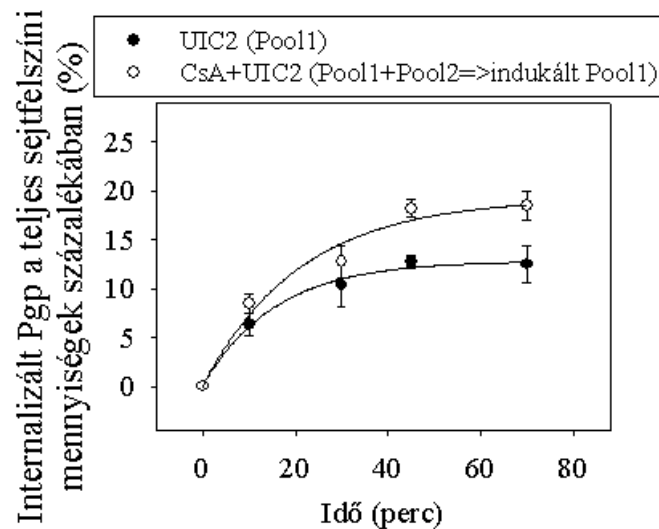


14. ábra Az UIC2-vel jelölt Pool1 P-glikoprotein fokozott endocitózist mutat

Az internalizálódott Pgp mennyiségeket minden esetben az adott antitesttel, adott körülmények között maximálisan jelölhető sejtfelszíni Pgp mennyiségek százalékában fejeztük ki. Legalább 2 kísérlet átlaga $\pm SD$.

Az UIC2 antitest szubsztrátok és modulátorok nélkül a sejtfelszíni Pgp mennyiségek csupán 10-40%-át képes detektálni (lásd 1.12-es fejezet). Minden egyes kísérletben ismert volt azonban a Pool1 Pgp-k százalékos mennyisége a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségekhez képest. Ily módon lehetőségünk volt az internalizálódott abszolút Pgp mennyiségek meghatározására (**15. ábra**).

Az UIC2-vel (Pool1) illetve CsA+UIC2-vel (Pool1+Pool2) jelölt mintákat összehasonlítva látható, hogy a kezdeti inkubációs időpontban még közel azonos, összevethető Pgp mennyiségek internalizálódtak. A sejtfelszíni Pgp mennyiségek $6,4\pm 1,1\%$ -a illetve $8,5\pm 1,0\%$ -a internalizálódott az inkubáció 10. percéig. $10,4\pm 2,2\%$ és $12,7\pm 1,6\%$ -os internalizált Pgp mennyiségeket detektáltunk az inkubáció 30. percében.



15. ábra UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k és CsA jelenlétében indukált Pool1 Pgp-k internalizálódott mennyiségei

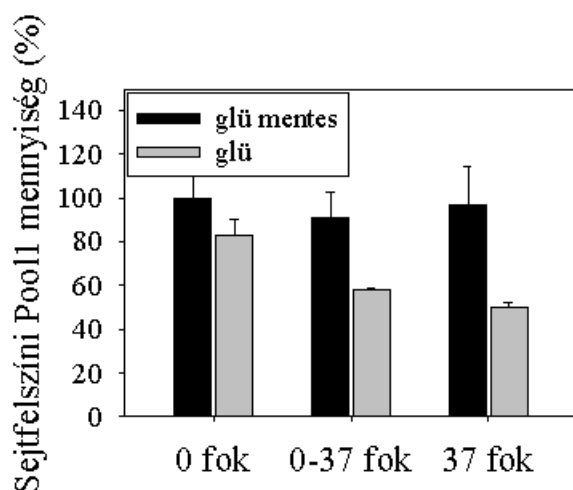
Az internalizált Pgp mennyiségeket a teljes sejtfelszíni mennyiségek százalékában fejeztük ki. Legalább 2 kísérlet átlaga \pm SD.

Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az UIC2 antitest által generált internalizációs folyamatban elsőként valószínűleg az eredetileg Pool1 konformációt mutató transzportek internalizálódnak. Ezen Pgp-k internalizációját azonban követi a többi, CsA hatására indukálódott Pool1 konformációjú Pgp-k endocitózisa.

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

Az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációjának aktív voltának megítélésére további kísérleteket végeztünk. Az egyes minták esetén különböző hőmérsékleti és ATP mennyiségeket állítottunk be (**16. ábra**).

ATP hiányában az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k internalizációja elmaradt. ATP-t tartalmazó körülmények között pedig egyértelmű hőmérsékletfüggést mutatott. A Pool1 Pgp-k korábban már bizonyított internalizációja tehát aktív folyamat révén valósul meg.



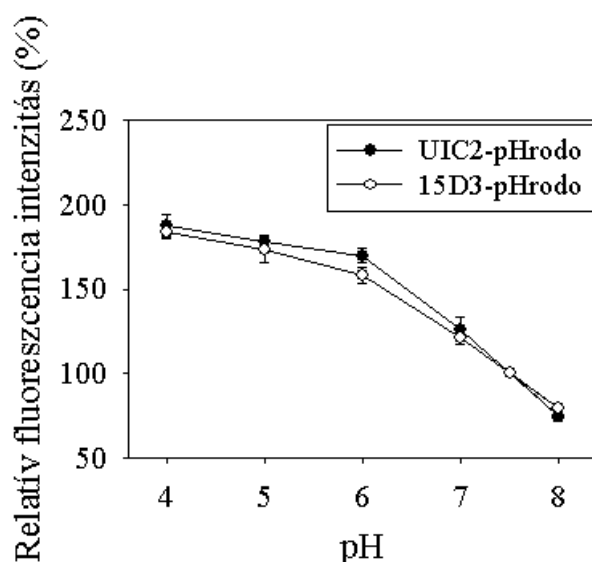
16. ábra Az UIC2-vel jelölt Pool1 P-glikoprotein endocitózisa hőmérséklet- és ATP-függő

A sejtfelszíni Pgp mennyiségek meghatározása GamIg-A647 másodlagos antitest segítségével történt. Az UIC2-vel jelölt sejteket glükóz-tartalmú (8 mM) illetve glükóz-mentes közegben inkubáltuk különböző hőmérsékleti körülmények között. A 0 fokos mintát az inkubáció ideje alatt folyamatosan jégen tartottuk, a 37°C-os mintát 37°C-on, a 0-37°C-os mintát pedig 2 perces időközönként mozgattuk a jég és a 37°C-os vízfürdő között. A sejtfelszíni Pool1 mennyiségeket a glükóz-mentes, 0°C-os minta százalékában fejeztük ki. 3 kísérlet átlaga \pm SEM.

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

A P-glikoprotein végső degradációs helyének felderítéséhez pH érzékeny festékkel (pHrodo) konjugált antitesteket használtuk. A pHrodo festék, szukcinimid észter típusú festék, melyet ennek megfelelően az Alexa festékekkel megegyező módon kötöttünk az antitestjeinkhez. A pH érzékeny festék neutrális pH-n alacsony fluoreszcenciát mutat, a fluoreszcencia azonban savas körülmények között nagymértékben emelkedik a festék fluoreszcencia kvantumhatásfok emelkedésének megfelelően. Elsőként a pHrodo festékkel konjugált UIC2 és 15D3 monoklonális antitestekkel jelölt és fixált sejteken ellenőriztük a már konjugált festékek pH érzékenységét (**17. ábra**).

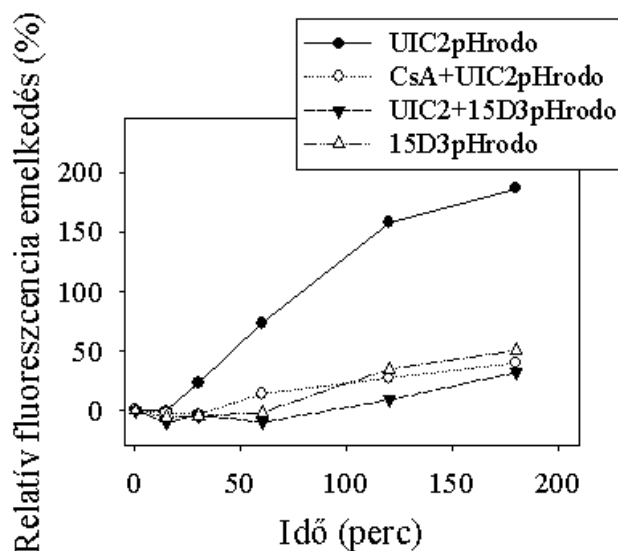
Mind az UIC2 mind a 15D3 antitesttel konjugált festék esetén közel kétszeresére (%) emelkedtek a fluoreszcenciák pH4-n. A két antitest esetén a fluoreszcencia intenzitások pH függvényében mutatott változása azonos volt. A festékkel konjugált antitestek tehát alkalmasnak bizonyultak a különböző Pgp Pool-ok savas vezikulákban történő megjelenésének vizsgálatára.



17. ábra Antitesttel konjugált pHrodo festék pH érzékenységének ellenőrzése

A különböző pH-n mutatott fluoreszcencia intenzitásokat a pH 7,5-ön mért fluoreszcencia intenzitások százalékában fejeztük ki. 2 kísérlet átlaga \pm SD.

A kinetikai mérések során 180 percen keresztül követtük nyomon a különböző Pgp Pool-ok (UIC2-pHrodo: Pool1; CsA+UIC2-pHrodo: Pool1+Pool2; UIC2+15D3-pHrodo: Pool2; 15D3-pHrodo: Pool1+Pool2) savas közegben való megjelenését. Minden esetben a kezdeti fluoreszcenciához viszonyított változásokat vizsgáltuk. A legintenzívebb fluoreszcencia emelkedést az UIC2-pHrodo (Pool1) minta esetén tapasztaltuk (**18. ábra**).

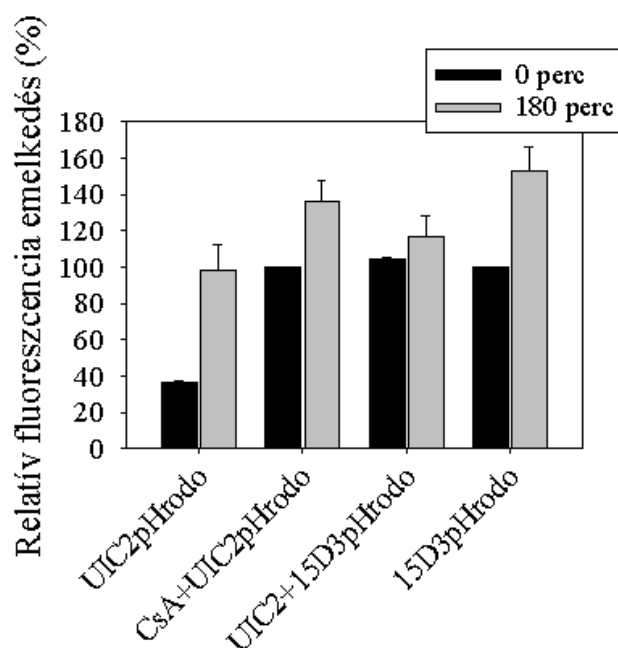


18. ábra Pool1 Pgp megjelenése a savas vezikulákban, lizozómákban

pH-rodo konjugált antitesttel jelölt P-glikoprotein pool-ok időbeli megjelenése a savas vezikulákban. A különböző inkubációs idők alatt tapasztalható fluoreszcencia intenzitásokat minden minta esetében a kezdeti fluoreszcencia százalékában fejeztük ki. Az inkubáció

kezdetekor mért fluoreszcenciákat minden minta esetében 0-nak tekintettük. Az ábrán egy reprezentatív minta eredményeit tüntettük fel.

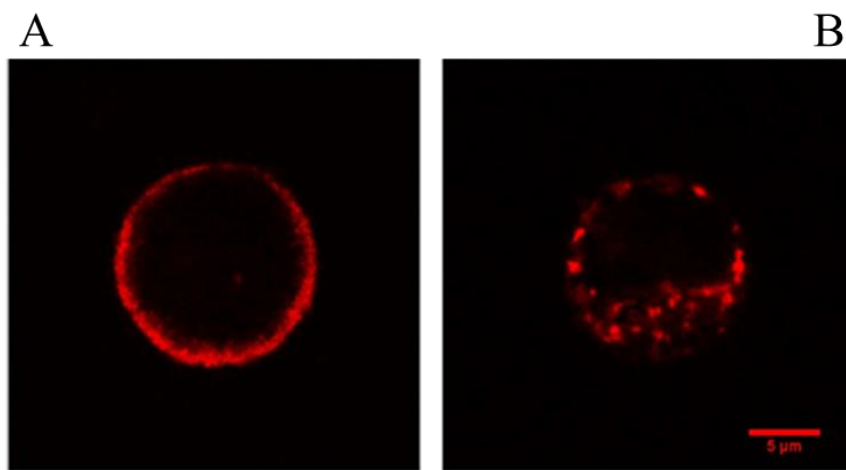
A savas vezikulákban megjelenő különböző Pgp pool-ok abszolút mennyiségeinek megítéléséhez további végpont méréseket végeztünk. Mivel a két különböző antitest (UIC2 és 15D3) F/P-vel korrigált, neutrális pH-n mért kezdeti intenzitásai nehezen voltak összehasonlíthatóak és nem minden esetben tükrözték a korábban tapasztalt Pool1-Pool1+Pool2 arányokat, ezért az UIC2-pH-rodo illetve 15D3-pH-rodo-val jelölt minták esetén tapasztalt fluoreszcencia változásokat a kezdeti teljes sejtfelszíni mennyiségek (CsA+UIC2-vel jelölt minta és a 15D3-mal jelölt minta) százalékában fejeztük ki. Ezeket a mintákat tekintettük 100%-nak. A kizárólag Pool1 Pgp-k jelölésére alkalmas UIC2-pH-rodo minta esetén a kezdeti $36,3 \pm 1,2\%$ -os relatív fluoreszcencia intenzitások a 180 perces inkubáció végére $98,2 \pm 14,1\%$ -ra emelkedtek (19. ábra).



19. ábra A Pool1 Pgp-k nagyobb valószínűséggel jelennek meg a savas vezikulákban, lizoszómákban

Az UIC2-pHrodo minta (Pool1) esetén a kezdeti $36,3 \pm 1,2\%$ -os relatív fluoreszcencia intenzitások a 180 perces inkubáció végére $98,2 \pm 14,1\%$ -ra emelkedtek. A CsA+UIC2-pHrodo (Pool1+2) valamint a 15D3-pHrodo minta (Pool1+2) esetén kisebb mértékű fluoreszcencia emelkedés tapasztalható. Az UIC2-vel előzetesen lefedett majd 15D3-pHrodo-val jelölt mintánál (Pool2) sok esetben nem történt fluoreszcencia emelkedés az inkubációs idő végéig. Az egyes mintákat a teljes sejtfelszíni mennyiségek (CsA+UIC2-vel jelölt minta és a 15D3-mal jelölt minta) százalékában fejeztük ki. 4 kísérlet átlaga \pm SEM.

A mindkét poolt jelölő CsA+UIC2-pHrodo, valamint a 15D3-pHrodo minta esetén ugyan kisebb mértékben, de szintén tapasztaltunk fluoreszcencia emelkedést. A kezdeti fluoreszcenciák $100,0 \pm 0,4\%$ -ról $136,4 \pm 11,5\%$ -ra, valamint $100,0 \pm 0,2\%$ -ról $153,1 \pm 13,2\%$ -ra emelkedtek. Ugyanakkor az UIC2-vel előzetesen lefedett majd 15D3-pHrodo-val jelölt mintánál, mely kizárólag a Pool2 Pgp-et jelöli csak kismértékű fluoreszcencia emelkedést tapasztaltunk ($104,7 \pm 0,9\%$ -ról $116,5 \pm 11,6\%$ -ra). Sok esetben egyáltalán nem is történt fluoreszcencia változás az inkubációs idő végéig.



20. ábra pH-rodo festékekkel konjugált UIC2 antitesttel jelölt Pgp megjelenése a savas vezikulákban, lizoszómákban.

A: A kezdeti 0 perces minták esetén az inkubációs oldat semleges pH-ján még csak alacsony sejtfelszíni fluoreszcenciák tapasztalhatóak. B: A 180 perces inkubáció végére a pH érzékeny festék erős fluoreszcenciát mutat a lizoszómákban a konfokális mikroszkópos képeken. A felvételek nem azonos intenzitás viszonyok mellett készültek, így az intenzitások nem összevethetőek.

Az éretlen, rosszul tekeredett Pgp-k esetén számos tanulmány tanulsága szerint egyértelmű a fehérje ER proteázok általi vagy ubiquitinációját követő, proteoszómabeli lebomlása. Az érett sejtfelszíni Pgp-k végső degradációs helyéről nincsenek ilyen egyértelmű adatok (lásd 1.5.2-es fejezet). A lizoszómabeli lebomlás mellett a sejtfelszíni transzportek ubiquitinációja ugyanis felvetette ezen fehérjék esetén is a proteoszómabeli lebomlást, ugyan a proteoszómában történő lebomlás elsődleges célpontjai valójában rövid életidejű magi illetve citoplazmatikus fehérjék. Mindent figyelembe véve a lizoszómákban történő lebomlás az érett sejtfelszíni Pgp-k esetén mégis inkább valószínűsíthető. A klasszikus lizin-48 kapcsolt és a fehérje proteoszómabeli lebomlást eredményező poliubiquitináció mellett ma már ismert a membrán fehérjék esetében is megfigyelhető számos monoubiquitináció és lizin-63 kapcsolt

poliubiquitináció kombinációja, mely az ún. „endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)” irányítása alatt a fehérjéket az endoszómákból az ún. multivezikuláris testekbe irányítják, melyek végül a lizoszómával fuzionálnak.

Mivel kísérleteink során nem volt lehetőségünk a pH-rodo fluoreszcenciákat a Pgp mennyiségeivel közvetlenül összevetni (pl. GFP konjugált Pgp segítségével), ezért a kapott eredmények interpretációja során felmerül a kérdés, hogy maga a fehérje eléri-e vajon a lizoszómákat? Ezt a kérdést sajnos nem sikerült tisztáznunk. Azt azonban az eredményeink alapján biztosan állíthatjuk, hogy a fehérje, legnagyobb valószínűséggel pedig az UIC2-vel jelölt Pool1 Pgp-k, egyértelműen rálépnek a lizoszóma felé irányuló degradációs útra az internalizációs méréseinkkel összhangban.

Eredményeink azt mutatják, hogy a Pool1 Pgp-k a Pool2 Pgp-vel összevetve szorosabb raft, illetve citoszkeleton asszociációt, valamint internalizációs hajlandóságot mutatnak és ennek megfelelően nagyobb valószínűséggel jelennek meg a savas vezikulákban. A Pgp számos koleszterin-kötő ún. CRAC motívumot tartalmaz, melyekről nem elképzelhetetlen, hogy különböző mértékben hozzáférhetőek a fehérje konformáció változásával párhuzamosan. Hasonlóan változhat a transzmembrán szegmensek hosszúsága is a fehérje kifelé- vagy befelé nyitott konformációs állapota között, mely szintén kedvezhet a Pgp egyik, vagy másik membrándoménben való feldúsulásának.

Ahogy arra már korábban is utaltunk, az UIC2 antitest szerepe azonban vitathatatlan a Pool1 Pgp-k internalizációjában.

Ugyanakkor az UIC2 valamint a CsA+UIC2 mintákat összehasonlítva megfigyelhető, hogy a kezdeti időpontokban elsőként az eredetileg UIC2-vel jelölhető Pgp-k internalizálódnak. Mindez arra utal, hogy bár az UIC2, a Pgp egy meghatározott konformációjának a rögzítésével fokozza az internalizációs folyamatokat, de ezek a Pgp-k feltehetően a membránkörnyezetüknek megfelelően eleve szorosabb asszociációt mutatnak a raft, illetve citoszkeleton struktúrákkal. Itt nem közölt UIC2-vel valamint CsA+UIC2-vel végzett detergens rezisztencia méréseink szintén erre utalnak.

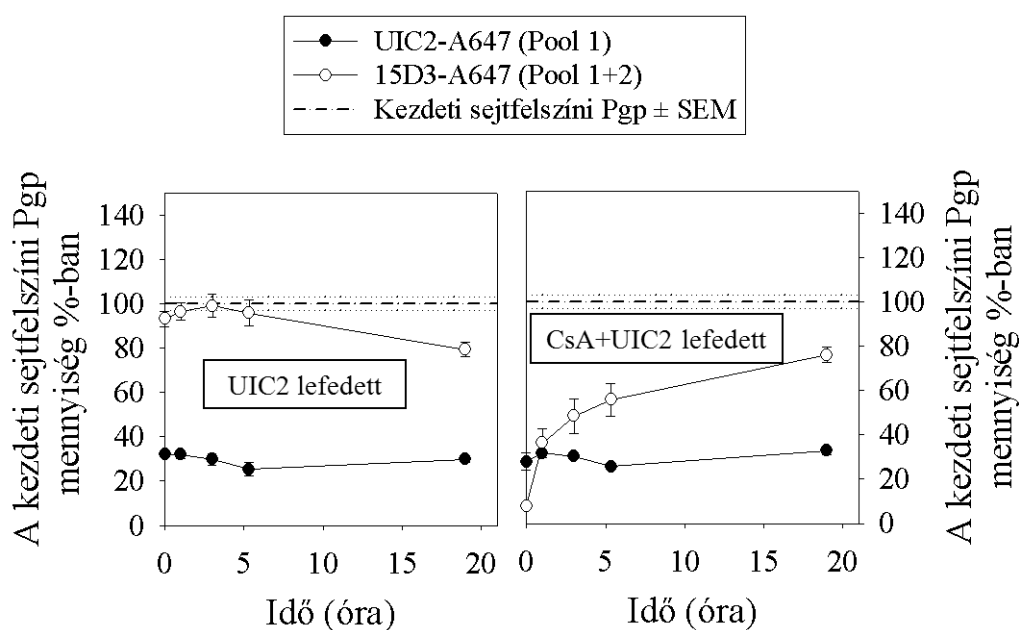
4.5 A Pool1 P-glikoprotein recirkulál a sejtfelszínre

Az UIC2 monoklonális antitest indukálta endocitózist követően szeretnénk volna megvizsgálni, hogyan alakulnak a sejtfelszíni Pgp mennyiségek. Helyreáll-e az eredeti sejtfelszíni Pgp szám

és amennyiben igen, milyen időintervallumon belül? Létezik-e egy, a korábban detektált internalizációs folyamatokkal esetleg párhuzamosan futó exocitotikus trafficking útvonal?

A sejtfelszíni Pgp mennyiségek monitorozását fluoreszcensen jelölt UIC2-Alexa647 illetve 15D3-Alexa647 antitesttel végeztük, jelöletlen UIC2 antitesttel történő előinkubálást követően. A CsA előkezelést követő UIC2 előinkubálással a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek lefedésre és a korábbi eredmények alapján- internalizációra kerülnek. Míg UIC2 előinkubációval kizárólag az eredetileg Pool1 konformációt mutató Pgp-k fedhetőek le.

Jelöletlen UIC2-vel történő lefedést követően mind UIC2-Alexa647-tel, mind 15D3-Alexa647-tel monitorozva azt látjuk, hogy a kezdeti mennyiségek már a kezdeti inkubációs időpontra visszaállnak (**21. ábra**). CsA+UIC2 lefedést követően, a kezdeti inkubációs időpontban a Pool1-nek megfelelő százalékos Pgp mennyiségek láthatóak, majd a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek elkezdnek helyreállni.



21. ábra UIC2 lefedést követően a sejtfelszíni Pool1 mennyiségek rövid időn belül visszaállnak.

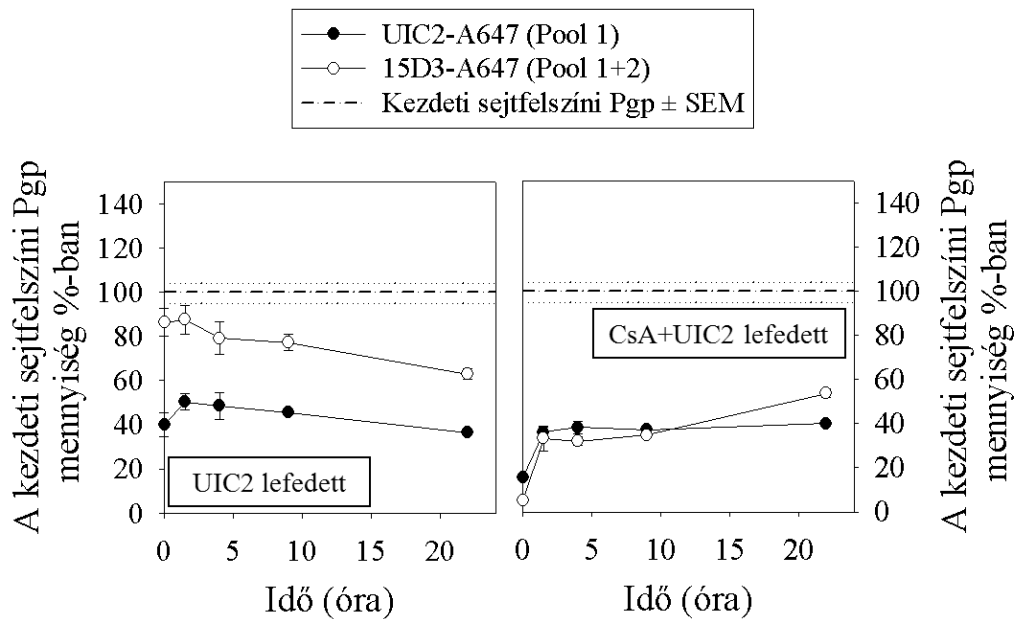
CsA előinkubáció nélkül illetve előinkubáció alkalmazásával valamint 30 perces, 37°C-on történő jelöletlen UIC2 antitesttel végzett lefedést követően kétszer mostuk a sejteket. Ezt követően további 30 percen keresztül 37°C-on jelöltük UIC2-A647 valamint 15D3-A647 antitesttel, a sejtfelszíni Pool1 illetve a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségek (Pool1+Pool2) monitorozása végett. Az eredeti Pool1 mennyiségeknek megfelelő 28,4±4,4%-nyi Pgp mennyiségek mind az UIC2 lefedett, mind a CsA+UIC2 lefedett minta esetében nagyon hamar, már az első inkubációs időpontban (0. óra) detektálhatóak, 3 kísérlet átlaga ±SEM.

A 0. órás időpontban a 15D3-mal jelölt mintához képest UIC2 antitesttel látott nagyobb mennyiségeket feltehetően a két antitest affinitás különbsége okozza (K_d UIC2= $1,55 \cdot 10^{-7} \pm 1,07 \cdot 10^{-8}$ M; 15D3 $K_d = 1,98 \cdot 10^{-7} \pm 2,04 \cdot 10^{-8}$ M). Ha a 30 perces UIC2-A647-tel illetve 15D3-A647-tel történő jelölési idő alatt még folyik az exocitózis akkor az UIC2 antitesttel nagyobb mennyiségeket tudunk detektálni, mint a 15D3 antitesttel. Korábbi méréseink azt mutatják, hogy egy 5 perces UIC2 jelölés, a 30 perces UIC2 jelöléssel összevetve a sejtfelszíni Pgp-k 90 %-át ($91,7 \pm 3,7\%$; $n=4 \pm SD$) már képes megjelölni.

A CsA előkezelt UIC2 lefedett minták esetében úgy tűnik, mintha elsőként a Pool1 Pgp-k kerülnének exocitózisra és csak ezután jelennének meg a Pool2 konformációt mutató- 15D3 antitesttel látható – transzporterek. A CsA plazmamembránból történő maradéktalan eltávolítása érdekében, intenzív BSA mosást követően is elvégeztük méréseinket és hasonló eredményt kaptuk. Ugyanakkor a CsA Pgp-re gyakorolt konformációs hatása ebben az esetben sem zárható ki teljes mértékben, hiszen a korábban internalizációra került korai, illetve recirkuláló endoszómák membránja akkumulálhatja a drogot.

Annak eldöntésére, hogy az UIC2 előinkubációkat követően sejtfelszínre került Pgp-k intracelluláris pool-okból származó Pgp-k, recirkuláló Pgp-k esetleg újonnan szintetizálódott Pgp-k, további kísérleteket végeztük. Az előbbi kísérleti protokollt cikloheximid fehérjeszintézis gátló szer mellett ismételtük meg.

Cikloheximid kezelés mellett és UIC2 lefedést követő időt a 0. órának véve, a Pool1 mennyiségek már erre az időpontra helyreállnak (**22. ábra**). Az 1. órában detektálható teljes sejtfelszíni mennyiségek sem térnek nagyon el a kezdeti Pgp mennyiségektől. Ezután viszont a 24. óráig az idő előrehaladtával ezek a mennyiségek fokozatosan csökkentek. Ennek a cikloheximid melletti sejtfelszíni Pgp mennyiség csökkenésnek a mértéke egyértelműen összeegyeztethető a Pgp irodalmi adatok alapján meghatározott 14-17 órás féléletidejével [154]. Cikloheximid kezelés melletti, CsA előinkubációt követő UIC2 lefedést követően ugyanakkor, a kezdeti sejtfelszíni Pgp mennyiségek nem állnak helyre. Ebben az esetben a CsA+UIC2 előinkubációnak köszönhetően a teljes sejtfelszíni mennyiségek lefedésre és internalizációra kerülnek. Ugyanakkor, ebben az esetben, fehérjeszintézis gátló, cikloheximid kezelés mellett a kiindulási Pgp mennyiségeknek csupán egy része, töredéke jelenik meg ismét a sejtfelszínen.



22. ábra Cikloheximid kezelés mellett csak a Pool1 Pgp-nek megfelelő sejt felszíni mennyiségek állnak helyre

UIC2 lefedést követően a sejt felszíni Pool1 mennyiségek cikloheximid mellett is helyreállnak. A teljes sejt felszíni Pgp mennyiségek (Pool1+Pool2) a 0-1.órás időpontokban még szintén megközelítik az eredeti sejt felszíni mennyiségeket, de ezután a 24 órás vizsgálati idő végére a sejt felszíni Pgp mennyiségek folyamatosan csökkennek cikloheximid jelenlétében. CsA előinkubációt és UIC2 lefedést követően azonban a teljes sejt felszíni mennyiségek már nem állnak helyre, kizárólag a Pool1 Pgp-nek megfelelő mennyiségek detektálhatóak a sejt felszínen az 1 órás inkubációs idő végére, 3 kísérlet átlaga ±SEM.

Mindez arra utal, hogy a sejt felszíni Pgp mennyiségek egy része intracelluláris pool-okban található, melynek sejt felszíni megjelenése független a fehérjeszintézistől. A CsA+UIC2 lefedést követően megfigyelhető sejt felszíni Pgp mennyiségek érdekes módon összevethetőek az eredetileg Pool1 konformációt mutató Pgp-k mennyiségével. Mindez arra enged következtetni, hogy az eredetileg Pool1 konformációt mutató Pgp-k nem csak internalizálódnak, de folyamatosan recirkulálnak is a sejt felszínre.

Eredményeink összeegyeztethetőek korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint a Pgp folyamatosan internalizálódik és recirkulál (lásd 1.5.1-es fejezet) [125]. Ezen korábbi adatok azt mutatták, hogy a sejtekben található Pgp kb. 30%-a helyezkedik el intracellulárisan. Intracelluláris átmeneti poolként pedig a EEA1 és Rab5 pozitív korai endoszómákat azonosították korábban a szerzők [124].

Munkacsoportunk korábban érdekes megfigyelést tett az UIC2 antitest különböző Pgp szubsztrátok, modulátorok jelenlétében tapasztalt hatásáról. A konformáció érzékeny UIC2

antitestről régóta állnak rendelkezésre adatok, melyek azt sugallják, hogy esetleg képes a Pgp mediálta szubsztrát transzportot gátolni [427]. A gátlás mértéke ugyanakkor csak részleges és rendkívül változó, hiszen az UIC2 antitest kötődése a sejtfelszíni Pgp-hez is nagymértékben változik (10-40%). Különböző szubsztrátok, modulátorok (vinblasztin, ciklosporin, SDZ PSC 833) jelenlétében azonban az UIC2 kötődés kiterjed a teljes sejtfelszíni mennyiségekre. Az UIC2 antitest és ezen modulátorok együttes alkalmazása pedig már közel 100%-os pumpa funkció gátlást eredményez. Sőt az adott szubsztrátból az általában alkalmazott koncentráció 1/20-a is elég a gátláshoz, ha UIC2 antitesttel együtt adják [451]. In vivo körülmények között, xenotranszplantált Pgp+ tumorokban is megfigyelhető volt a daunorubicin akkumuláció UIC2+CsA kezelés mellett, már olyan CsA koncentrációk esetén is, melyek önmagában adva még hatástalannak bizonyultak volna. Munkacsoportunk bizonyította, hogy az in vivo anti-tumor hatás a Pgp gátlás és az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) együttes eredménye [452].

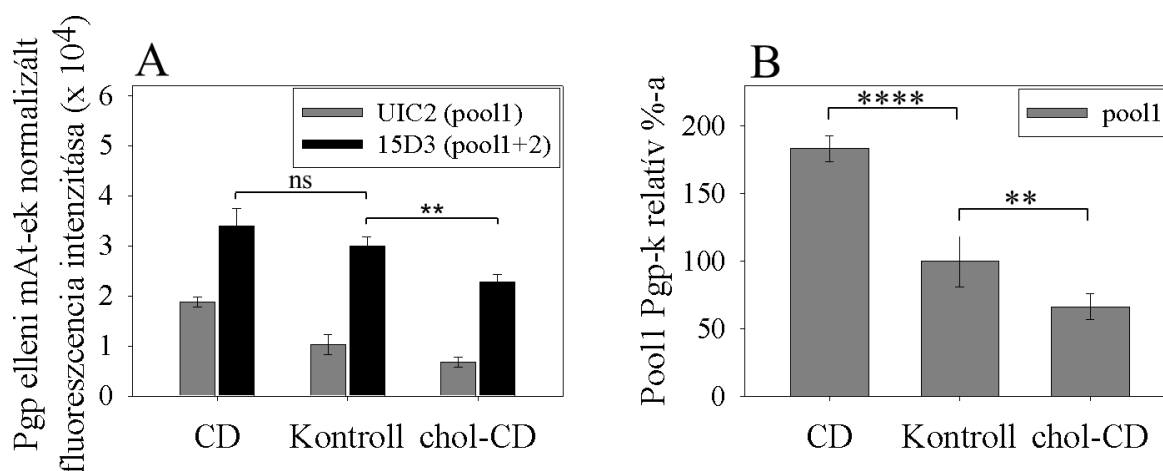
Az exocitózisra irányuló kísérleteinkből ugyanakkor látszik, hogy az UIC2 antitest ciklosporinnal történő együttadása jelentősen befolyásolja a Pgp trafficking folyamatait és az ennek következtében kialakuló/fennálló sejtfelszíni transzporter mennyiségeket is. Így ez a folyamat, az UIC2 indukálta Pgp endocitózis, ennek megfelelően szintén hozzájárulhat a doxorubicin-UIC2-CsA kezelés kiváltotta in vivo anti-tumor hatás kialakulásához.

Az UIC2-vel azonosítható Pool1 Pgp-kről ismert, hogy molekuláris közelségben vannak olyan raft markerekkel mint a CD44 vagy a CD59. Feltételezhető a CD44 szerepe a fehérje aktin kötésében az ERM fehérjéken keresztül [135]. Az ERM fehérjék gátlása pedig érdekes módon a Pgp sejten belüli véletlenszerű eloszlását eredményezi a drog rezisztencia megszűnésével párhuzamosan [133]. Ezek a kísérletek szintén arra utalnak, hogy a Pgp folyamatos sejtfelszíni expressziójának biztosításában rendkívül fontos szerepe van az internalizációs és recirkulációs folyamatoknak.

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

A különböző membrán doméneken elhelyezkedő és különböző trafficking tulajdonságokkal jellemezhető Pgp pool-ok feltételezhetően ugyancsak különböző koleszterin-függő trafficking-gel rendelkeznek. Kísérleteink első lépéseként megvizsgáltuk, hogy a PM koleszterin modulációja hatással van-e a sejtfelszíni Pgp pool-ok mennyiségére. A PM ciklodextrinek (CD és chol-CD; random-metil- β -ciklodextrin és annak koleszterinnel töltött

változata) segítségével végzett koleszterin modulációját követően emelkedő antitest koncentrációk mellett határoztuk meg az antitestek maximálisan jelölhető kötőhelyeinek mennyiségét (Bmax) a két pool esetén.

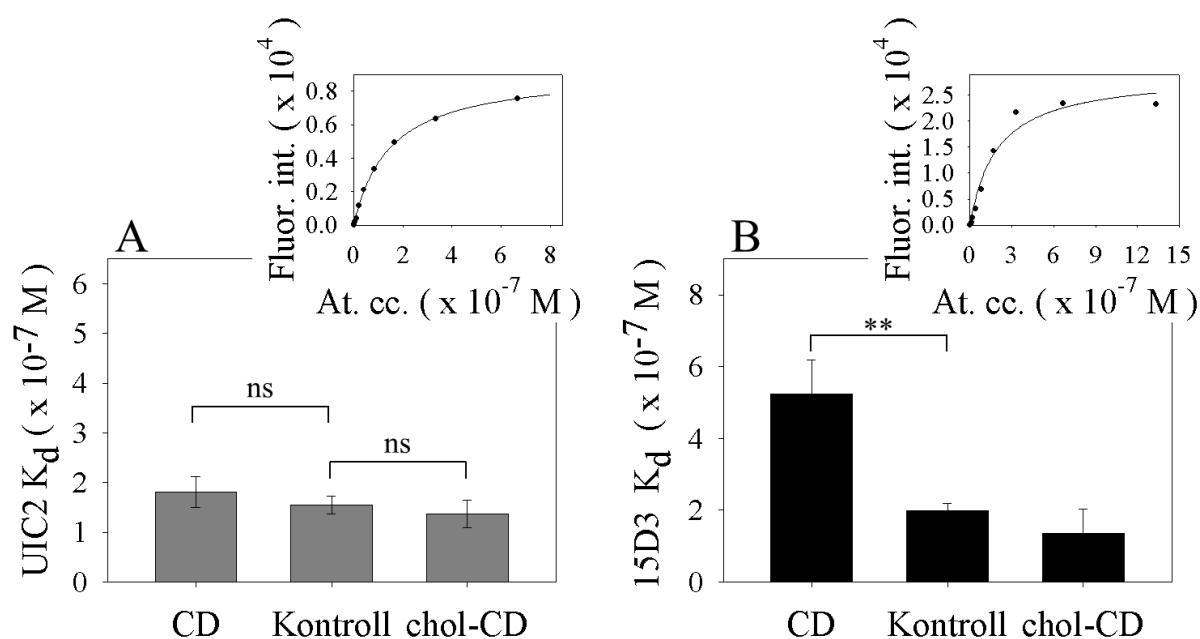


23. ábra A raft asszociált Pool1 Pgp-k sejtfelszíni mennyisége növekszik koleszterin kivonást követően

A plazmamembrán koleszterin perturbációjának hatását vizsgáltuk a Pgp különböző konformációs állapotainak detektálására alkalmas monoklonális antitestek, az UIC2 (Pool1) és a 15D3 (Pool1+2) maximálisan jelölhető kötőhelyeinek mennyiségére (Bmax). A plazmamembrán koleszterin kivonását random-metil- β -ciklodextrinnel (CD), míg a koleszterin feltöltését annak koleszterin komplexált formájával végeztük (chol-CD). A: A ciklodextrin kezelést követően a maximálisan jelölhető kötőhelyek mennyiségét (Bmax) emelkedő koncentrációjú antitest mennyiségek mellett a SigmaPlot program segítségével illesztett kötődési görbékből határoztuk meg. Az ábrák 3-5 független mérés eredményének átlagát mutatják (\pm SD). ** $p=0,0069$ párosítatlan, kétmintás t próbával. Az UIC2 reaktív Pool1 Pgp-kre vonatkozó statisztikát lásd B ábra. B: A sejtfelszíni Pool1 mennyiségi változásokat a kontroll minta százalékában fejeztük ki (183,4 %-CD; 100 %-kontroll; 66,4 %-chol-CD). Az ábrák legalább 3 független kísérlet eredményének átlagát mutatják (\pm SD). **** $p<0,0001$ és ** $p=0,0077$ párosítatlan, kétmintás t próbával.

Nem várt emelkedést tapasztaltunk a sejtfelszíni mennyiségekben koleszterin kivonását követően, akár az UIC2 (Pool1) vagy akár a 15D3 (Pool1+2) antitestet használtuk monitorozásra. Ugyanakkor a PM chol-CD-vel történő koleszterin telítését követően a sejtfelszíni Pool1 és Pool1+2 mennyiségek ellentétesen változtak, csökkentek, bizonyítva ezzel azt, hogy a jelenség koleszterin-függő (23. A-B ábra).

Az antitestek maximális kötőhelyeivel egyidejűleg meghatározott disszociációs állandóinak (K_d) változása koleszterin modulációt követően bizonyította, hogy a detektált sejtfelszíni mennyiségi változások nem magyarázhatóak az antitestek affinitás változásával.



24. ábra Az UIC2 antitest affinitása nem változik a plazmamembrán koleszterin modulációját követően

A plazmamembrán koleszterin mennyiségi változásainak hatását vizsgáltuk az Alexa647 festékkel konjugált UIC2 és 15D3 antitestek affinitására. A: Az UIC2 antitest esetén nem figyelhető meg szignifikáns változás az antitest affinitásában ($K_d_{CD} = 1,81 \cdot 10^{-7}$; $K_d_{Kontroll} = 1,55 \cdot 10^{-7}$; $K_d_{cholCD} = 1,37 \cdot 10^{-7}$). B: A 15D3 antitest esetén ezzel szemben szignifikánsan csökkent az antitest affinitása a plazmamembrán koleszterin kivonását követően. A disszociációs állandókat a SigmaPlot program segítségével illesztett aspecifikus kötődéssel korrigált kötődési görbékből, egy ligand kötőhelyet feltételezve határoztuk meg. Az ábrák legalább 3 független kísérlet eredményének átlagát mutatják ($\pm SD$). Az inzertek egy-egy reprezentatív kötődési görbét mutatnak be. ** $p=0,0021$ párosítatlan, kétmintás t próbával.

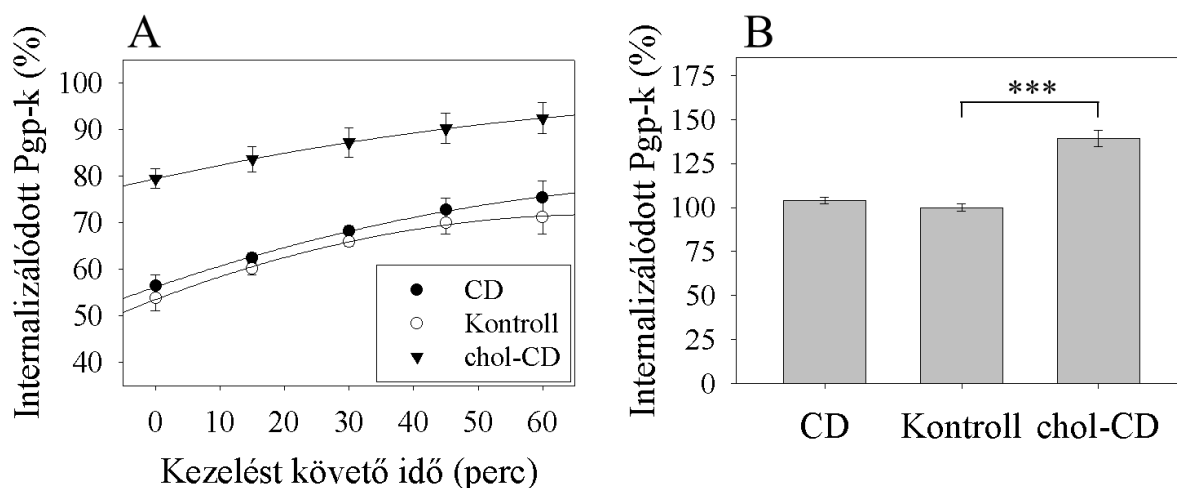
A kezeletlen minták esetén az antitestek affinitása, ami fordítottan arányos a meghatározott disszociációs állandókkal, kis mértékben különbözik a két antitest esetén (UIC2 $K_d = 1,55 \cdot 10^{-7} \pm 1,07 \cdot 10^{-8}$ M; 15D3 $K_d = 1,98 \cdot 10^{-7} \pm 2,04 \cdot 10^{-8}$ M) (24. A ábra). A PM koleszterin modulációja CD vagy chol-CD alkalmazásával, nem okozott szignifikáns változást az UIC2 antitest affinitásában ($K_d_{CD} = 1,81 \cdot 10^{-7} \pm 3,12 \cdot 10^{-8}$ M; $K_d_{cholCD} = 1,37 \cdot 10^{-7} \pm 2,84 \cdot 10^{-8}$ M). A 15D3 antitest affinitása azonban szignifikánsan csökkent koleszterin kivonást követően, az antitest disszociációs állandója 2,5-szeresére emelkedett (24. B ábra). Ellentétes, ugyan nem szignifikáns, változásokat tapasztaltunk a PM koleszterin telítését követően.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a sejtfelszíni P-glikoprotein pool-ok ellentétesen változnak a sejtmembrán koleszterin mennyiségének változásaival. Hangsúlyoznunk kell ugyanakkor, hogy ezek a változások sokkal inkább érintik a raft asszociált Pool11 frakciót (23.

B ábra), mely változások tükröződnek a teljes sejtfelszíni Pgp mennyiségekben is. Ugyanakkor az UIC2 reaktív (Pool1) Pgp-k változó mennyiségei miatt (10-40%) [451], ezek nem eredményeztek minden esetben szignifikáns változást a teljes sejtfelszíni (Pool1+2) Pgp mennyiségekben. A sejtfelszíni mennyiségi változások tehát nem csupán az UIC2-vel jelölhető Pool1 konformációjú Pgp-k esetén, hanem a 15D3-mal jelezhető teljes Pgp mennyiségek esetén is megfigyelhetők. Mindezekből arra következtettünk, hogy a koleszterin változások nem egy Pool2-Pool1 irányú konformáció változást idéztek elő, hanem trafficking változást. A koleszterin-függő trafficking változások pedig a dinamikus raft asszociált Pool1 frakciót érintik.

4.7 A koleszterin kivonás indukálta Pool1 sejtfelszíni mennyiségek emelkedése nem indokolható csökkent internalizációval

Korábbi megfigyeléseink azt mutatták, hogy a nagyobb részben raft asszociált Pool1 frakció a Pool2 frakcióval összehasonlítva sokkal intenzívebb trafficking folyamatokkal jellemezhető. Ezen megfigyelésből, valamint abból, hogy a koleszterin modulációt követő sejtfelszíni Pgp mennyiségi változásokat valójában a Pool1 sejtfelszíni mennyiségek változásai idézték elő, feltételeztük, hogy a koleszterin kivonás a Pool1 frakció trafficking folyamatainak megváltozását is előidézhetheti. A koleszterin kivonást követő szignifikáns sejtfelszíni transzporter mennyiségek emelkedése vagy csökkent internalizációra, vagy fokozott exocitózisra vezethetőek vissza. Elsőként savas mosásos kinetikai mérések segítségével vizsgáltuk a Pool1 frakció koleszterin-függő internalizációs folyamatait. A korábbi eredményekkel összhangban itt is látható volt a Pool1 frakció intenzív internalizációja a ciklodextrin nem kezelt, kontroll minta esetén. A ciklodextrin kezelés idejének megfelelő 20 perces inkubációs idő alatt a Pool1 Pgp-k 54 %-a már internalizálódott. Ez a gyors internalizáció a sejtmembrán koleszterin mennyiségének emelésével még fokozható volt (**25. A ábra**). A ciklodextrin kezelést követő 15 perces mintákat összehasonlítva az internalizálódott mennyiségek további $39,2 \pm 4,5$ %-kal emelkednek chol-CD kezelés hatására ($139,2 \pm 4,5$ %-cholCD; $100,0 \pm 2,1$ %-kontroll). Meglepő módon ugyanakkor a PM koleszterin kivonása nem befolyásolta a Pool1 frakció internalizálódott mennyiségeit ($103,8 \pm 2,0$ %-CD; $100,0 \pm 2,1$ %-kontroll) (**25. B ábra**). Hasonló eredményeket kapott korábban munkacsoportunk, amikor a koleszterin modulációt követően 15D3 antitesttel követtük nyomon az internalizációs folyamatokat [281]. Összefoglalva tehát a koleszterin kivonást követő sejtfelszíni Pool1 mennyiségek emelkedése nem indokolható csökkent internalizációval.

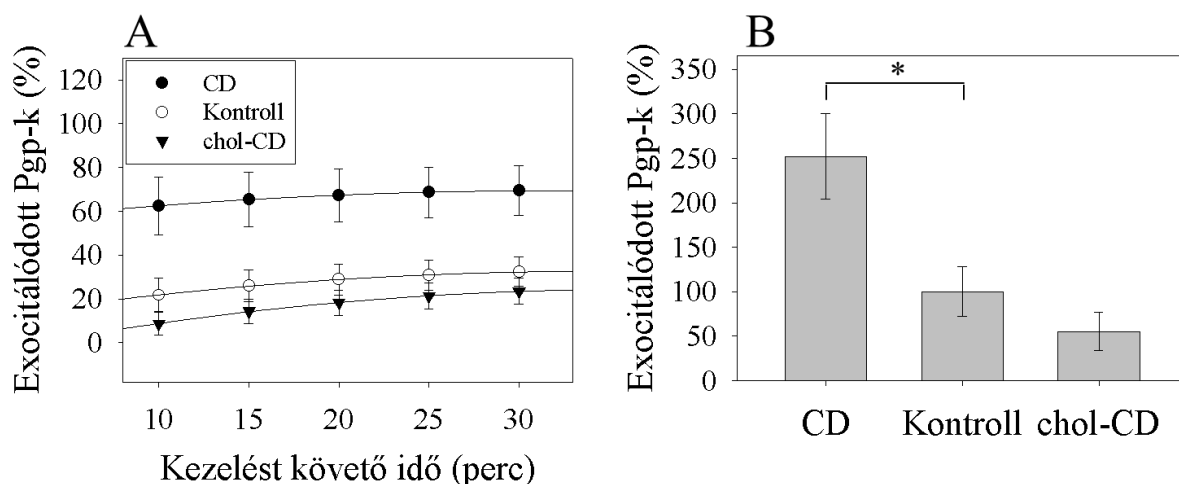


25. ábra A membrán koleszterintartalom változásának hatása a Pool1 Pgp-k internalizációjára

A: A Pool1 Pgp-k internalizációját savas mosásos kísérletekben vizsgáltuk. A grafikonok pontjai négy kísérlet átlagát mutatják (\pm SEM) Az X tengelyen a CD kezelést követő inkubációs időket tüntettük fel. B: Az ábrákon az internalizálódott Pool1 Pgp mennyiségeket tüntettük fel a ciklodextrin kezelést követő 15. percben a kezeletlen minta százalékában kifejezve. A Pool1 Pgp esetén megfigyeltő intenzív internalizáció a plazmamembrán koleszterin telítését követően még fokozható volt, de a koleszterin kivonásnak nem volt hatása a Pool1 Pgp-k endocitózisára. *** $p=0,0001$ párosítatlan, kétmintás t próbával.

4.8 A Pool1 Pgp-k exocitálódó mennyisége emelkedik koleszterin kivonást követően

A Pool1 frakció másik fontos trafficking útvonalát, az exocitózis sebességét megvizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az éppen ellentétesen változott a sejtmembrán koleszterin modulációjával. Fokozódott, amikor a sejtmembrán koleszterin szintjét redukáltuk, valamint csökkent, amikor a plazmamembránt koleszterinnel telítettük (**26. A ábra**). A ciklodextrin kezeléseket követő 15 perces exocitálódott mennyiségeket összehasonlítva ($252,0 \pm 48,0$ %-CD; $100,0 \pm 27,9$ %-kontroll; $55,2 \pm 21,4$ %-chol-CD) (**26. B ábra**), azt mondhatjuk, hogy a sejtmembrán koleszterin modulációja erőteljesen módosítja a Pgp Pool1 frakciójának exocitózisát. Továbbá a Pool1 Pgp-k kontroll mintával összehasonlított 2,5-szer nagyobb exocitálódott mennyiségei a CD kezelt minta esetén önmagában képesek magyarázni a koleszterin kivonást követően megemelkedett sejt felszíni Pgp mennyiségeket.

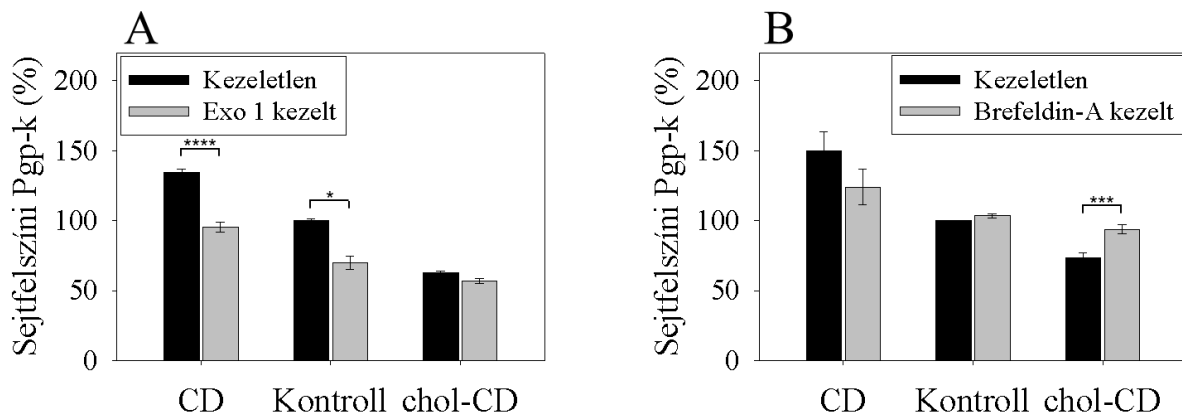


26. ábra A Pool1 Pgp-k exocitózisa fokozódik koleszterin kivonást követően

A: A plazmamembrán ciklodextrinokkal végzett koleszterin modulációját követő a Pool1 Pgp-k exocitózisának kinetikája. A grafikonok pontjai 3 kísérlet átlagát mutatják (\pm SEM). Az X tengelyen a CD kezelést követő inkubációs időket tüntettük fel. B: Az ábrán az exocitálódott Pool1 Pgp mennyiségeket tüntettük fel a cikodextrin kezelést követő 15. percben a kezeletlen minta százalékában kifejezve. Az exocitálódott Pgp-k mennyisége 2,5-szeres emelkedést mutatott CD kezelést követően ($252,0 \pm 48,0$ %) a kontroll mintával összehasonlítva ($100,0 \pm 2,9$), valamint csökkenést mutatott chol-CD kezelést követően ($5,3 \pm 21,4$ %), $*p=0,0384$ párosítatlan, kétmintás t próbával.

4.9 Az exocitotikus folyamatok gátlása csökkenti a koleszterin kivonás indukálta emelkedett sejt felszíni Pool1 mennyiségeket

Trafficking kísérleteink tehát bizonyították, hogy a chol-CD kezelést követő 34 %-kal csökkent sejt felszíni Pool1 Pgp mennyiségek fokozott internalizációs és csökkent exocitotikus folyamatok eredményeként alakulnak ki. A CD kezelést követően 83%-kal megemelkedett sejt felszíni mennyiségek kialakulása ugyanakkor magyarázható a 2,5-szer nagyobb exocitálódott Pgp mennyiségekkel önmagában. Annak bizonyításaként, hogy a koleszterin kivonás indukálta exocitotikus változás egy lényeges faktor a sejt felszíni transzporter mennyiségek kialakításában, további kísérleteket végeztünk. Ismét elvégeztük koleszterin modulációt követően a sejt felszíni mennyiségek monitorozását, olyan ismert exocitózis gátló szerek mellett, mint az Exo1 vagy a Brefeldin-A (BFA). Az Exo1 kezelés mindhárom esetben csökkentette a sejt felszíni Pool1 mennyiségeket, de különböző mértékben (**27. A ábra**). A CD kezelt minták esetén $37,9 \pm 5,9$ % -kal, a kontroll minta esetén $29,0 \pm 7,4$ %-kal míg a chol-CD minta esetén $5,5 \pm 5,4$ %-kal. A gátlás mintázata arányos volt azzal a tendenciával, ahogyan a korábbi exocitózisra irányuló kísérletek alapján, az exocitotikus események hozzájárulhattak a sejt felszíni mennyiségek alakulásához.



27. ábra Exocitózis gátló szerek mellett csökken a sejtfelszíni Pool1 Pgp-k koleszterin kivonás indukálta mennyiségi emelkedése

A plazmamembrán koleszterin perturbációjának hatása a Pool1 Pgp-k sejtfelszíni mennyiségére, különböző exocitózist gátló szerek mellett. A: Exo1 jelenlétében a sejtfelszíni Pgp mennyiségek különböző mértékben ugyan, de minden esetben csökkennek. A legnagyobb gátlás a CD minta esetén volt megfigyelhető. **** $p < 0,0001$; * $p = 0,01$ párosítatlan, kétmintás t próbával. B: BFA jelenlétében kismértékű sejtfelszíni mennyiségi csökkenés tapasztalható a CD kezelt minták esetén, melynek mértéke azonban elmarad az Exo1 esetén tapasztalttól. *** $p = 0,0008$ párosítatlan, kétmintás t próbával. Az ábrákon 3 kísérlet átlagát tüntettük fel (\pm SEM).

A kontroll minta esetén Exo1 jelenlétében kapott csökkent sejtfelszíni mennyiség megerősítette a Pool1 Pgp-k intenzív trafficking-jét, ami nemcsak az internalizációs, de az exocitotikus folyamatokra is igaz. A chol-CD minta esetén megfigyelt nagyon alacsony gátlás összhangban van azzal, hogy a koleszterin szaturáció már eleve gátolta az exocitotikus folyamatokat, mely gátlás tovább már nem volt fokozható. A legnagyobb gátlást a CD kezelt minták esetén tapasztaltuk. Kevésbé kifejezett sejtfelszíni mennyiségi csökkenést tapasztaltunk a CD kezelt minták esetén BFA mellett. chol-CD kezelés mellett a sejtfelszíni mennyiségek inkább emelkedtek, a kontroll minták esetén pedig nem tapasztaltunk változást (27. B ábra).

Az Exo1, eddigi ismereteink alapján, az ARF1 GTP hidrolízisének sebességét fokozza valamilyen ARF-GAP függő módon [453], mely folyamat főleg a Golgin belüli exocitotikus folyamatok gátlását idézi elő. A BFA viszont az ARF1-GDP/GTP kicserélő faktor nem kompetitív gátlószere, és így számos a Golgin kívüli ARF1 függő citoszolikus effektor funkció gátlását is eredményezheti [226]. Ezek olyan, eddig bizonyított burok fehérje komplexek kialakulásának gátlását jelentik [453], mint a Golgi lokalizált COPI, a TGN és endocitotikus-recirkuláló-kompartmentek vezikuláinak létrehozásában résztvevő GGA, vagy

bizonyos adaptor fehérje komplexeknek a gátlását, úgymint az AP1 vagy az AP3, melyek a fehérjék endocitózisában és lizoszómába történő szállításában vesznek részt. Ezen komplexek gátlásával a BFA nem csupán a szekréciónál átvezető útvonalon keresztül megvalósuló vezikuláris trafficking útvonalat befolyásolja, hanem az endocitotikus-recirkuláló útvonalat is.

A BFA kezelés tehát mind a bioszintetikus/szekréciónál, mind pedig az endocitotikus/recirkuláló rendszerben transzformációkat okoz, a Golgi jól ismert szétesésével párhuzamosan a vakuoláris elemek eltűnését és helyettük inkább a tubuláris elemek megjelenését eredményezi. BFA kezelést követően a bioszintetikus/szekréciónál rendszer és az endocitotikus/recirkuláló rendszer kapcsolata gyakorlatilag megszűnik [226]. A BFA-hoz hasonlóan Exo1 jelenlétében is megfigyelhető a Golgi tartalmának gyors redisztribúciója az ER-ba, de nincs hatással a TGN vagy az endocitotikus rendszer szerveződésére [453]. Ez az Exo1 mellett megvalósuló, túlnyomó részben a szekréciónál útvonalat érintő gátlás tükröződik a mi eredményeinkben is. BFA jelenlétében a Pool1 Pgp sejt felszíni mennyiségei kizárólag a CD kezelt minta esetén csökkentek, ott ahol az exocitotikus események a legintenzívebbek voltak. Mindkét trafficking rendszer gátlása változatlan sejt felszíni mennyiségeket eredményezett a BFA kezelt kontroll minta esetén. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a Pool1 Pgp-k endocitotikus és exocitotikus szigorú egyensúlyban van. A chol-CD kezelés hatására történő Pool1 sejt felszíni mennyiségi emelkedések pedig nagy valószínűséggel a BFA jelenlétében az endocitotikus folyamatok változásában is megmutatkozó események következtében alakulnak ki.

A PM koleszterin szintjének perturbációja irodalmi adatok alapján számos kompenzációs mechanizmust indít el [226, 374, 383, 399](lásd 1.10-es fejezet). A PM koleszterin szaturációja a többlet koleszterin intracelluláris pool-okba történő redisztribúcióját idézi elő, és ez a koleszterin többlet megakadályozza további koleszterin kihelyezését a plazmamembránba egészen addig, míg annak koleszterin szintje vissza nem áll a fiziológiai értékre. A plazmamembrán koleszterin depléciója ugyanakkor olyan mechanizmusokat indít el, amelyek helyreállítják a hiányzó koleszterin mennyiségeket. A kompenzációs mechanizmusok egyik lényeges eleme az OSBP-CERT fehérje pár együttműködésének köszönhetően a raft struktúrák fokozott nukleációja a Golgi-ban, majd ezen struktúrák PM felé irányuló traffickingje a szekréciónál útvonalon keresztül. Ezen kompenzációs mechanizmusok perces időskálán valósulnak meg, bár a különböző sejt vonalak között különbségek mutatkoznak a koleszterin szintézis, valamint transzportjának sebességében [389]. Az ER-ben lévő koleszterin pool 10-20 percen belül reagál a PM koleszterin szintjének

változtatására [370, 384]. Az újonnan szintetizált nem-vezikuláris útvonalat követő koleszterin, hasonló 10-30 perces időskálán belül jelenik meg a PM-ban [389]. A szekréciós útvonalat követő koleszterin nagyrészt raftokba épülve, hasonló időskálán éri el a plazmamembránt. Ezen jól dokumentált koleszterin kompenzációs mechanizmusokkal párhuzamosan, nagyon hasonló tendenciákat láttunk fehérje szinten megvalósulni, amikor is a Pgp molekulák egy része koleszterin függő trafficking-et mutatott a raft doménekkal. A Pool1 frakcióra eleve jellemző gyors internalizáció koleszterin jelenlétében még fokozható volt, valószínűleg a koleszterin intracelluláris pool-okba történő redisztribúciójával párhuzamosan. Az exocitálódó Pgp-k csökkent mennyisége koleszterin bevitelt követően, hasonlóan a gyakran marker fehérjeként használt vezikuláris stomatitis vírus G fehérjéjéhez (VSVG)[454], valószínűleg a klasszikus szekréciós útvonalon keresztül megvalósuló koleszterin export leregulálásával együtt szintén hozzájárul a csökkent sejtfelszíni Pgp mennyiségekhez. A PM koleszterin depléciója ugyanakkor szignifikánsan fokozta az UIC2 reaktív Pgp-k exocitózist, a kompenzációs koleszterin exporthoz hasonlóan.

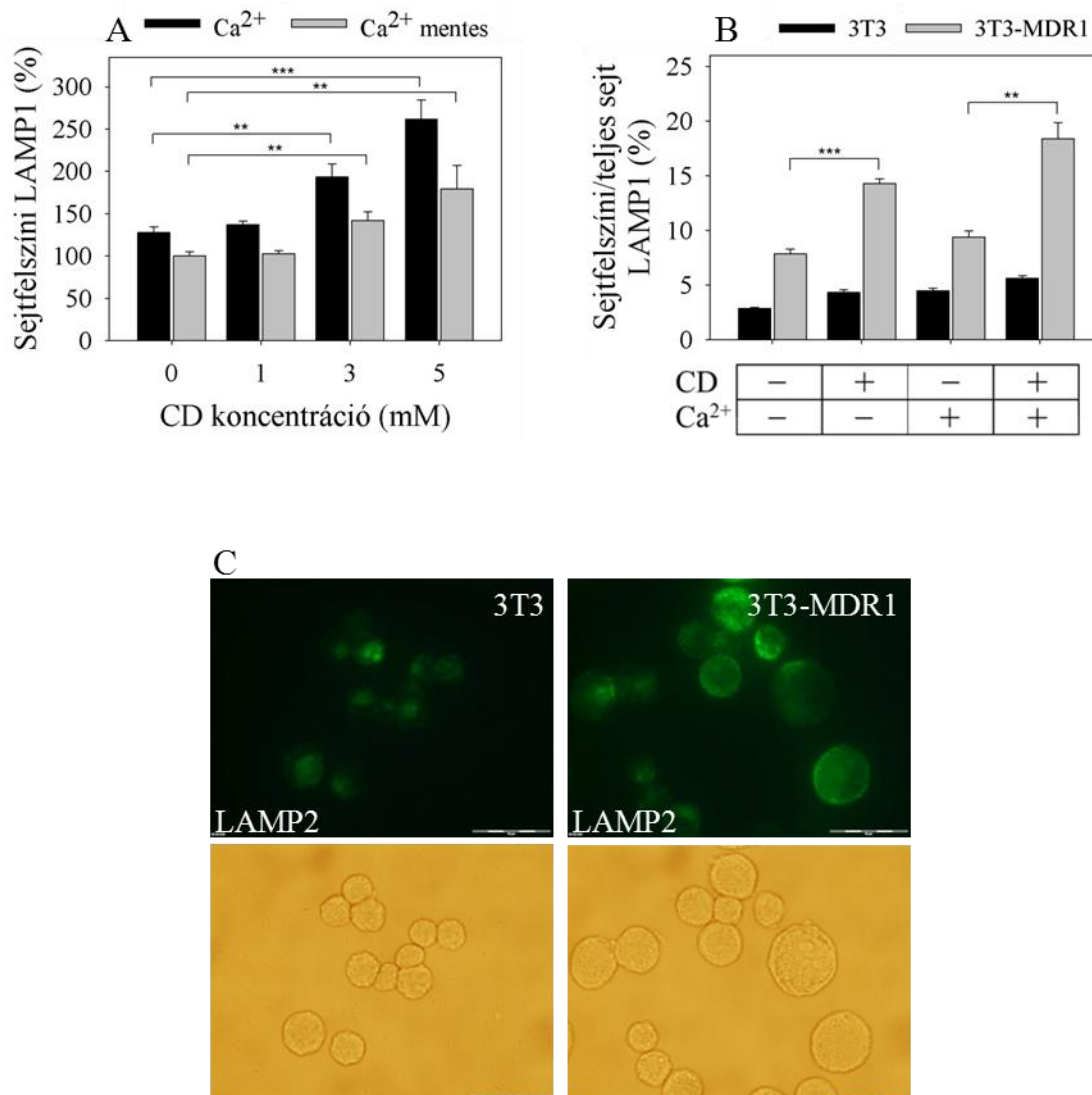
Érdekes módon a PM acLDL-lel történő koleszterin feltöltése és HDL₃ mediálta koleszterin depléciója az általunk megfigyelt tendenciákkal megegyezően befolyásolja számos más ABC transzporter fehérje kifejeződését is makrofágokban, azok gén expressziójának szabályozásán keresztül [455].

Mindezekből az eredményekből valószínűnek tűnik, hogy a korábban raft asszociált Pgp-ként azonosított Pool1 frakció, szorosan kapcsolódik a szekréciós úton keresztül CD kezelést követően megvalósuló kompenzációs szfingolipid és koleszterin exporthoz. Ezek az adatok, ugyan indirekt módon, de ismét bizonyítják azt, hogy a raft asszociált Pgp-k az UIC2 mAt-tel jelölhető Pool1 Pgp-k.

Természetesen korábbi irodalmi adatok felvetették annak lehetőségét, hogy a Pgp esetleg részt vehet a raft domének kialakításában, megerősítésében (lásd 1.8-as fejezet). A szakirodalom áttanulmányozása után ugyanakkor eddig nem találtunk meggyőző adatokat ennek a hipotézisnek a megerősítésére. Ezek alapján eddig azt tudjuk állítani, hogy a Pool1 Pgp, mint raft asszociált konformer együtt utazik a raft doménekkal, de ezen jelenség esetleges szerepét egyelőre nem ismerjük.

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

A lizoszómális exocitózis szerepe a membrán repair-ben régóta ismert (lásd 1.11-es fejezet). A lizoszómák exocitózisát követő sérült PM részek eltávolítása után a PM részek klasszikus exocitotikus útvonalakon keresztül pótlódnak [456]. Újabb tanulmányok arról számolnak be, hogy a sejtek CD kezelése kalcium függő módon szintén fokozza ezt a lizoszómális exocitózist [457, 458]. Feltételezték, hogy a CD okozta koleszterin extrakció fokozza a PM permeabilitását olyan kis molekulású anyagok iránt mint a Ca^{2+} , mely hasonlóan más membránsérüléshez lizoszómális exocitózist indukál. Az a korábbi megfigyelés, miszerint az MDR sejtek fokozott mennyiségű lizoszómális savas kompartmenttel [459, 460], és fokozott membrán turnover-rel rendelkeznek [152, 460-463], azt a feltételezést erősítette bennünk, hogy a korábban a Pool1 Pgp-k exocitózisán keresztül látott fokozott exocitotikus esemény csak egy szelete egy sokkal komplexebb eseménysornak, a lizoszómális exocitózis indukálta membrán repair folyamatnak a PM koleszterin kivonását követően. A sérült membránrészek pótlásában pedig olyan magas koleszterin tartalmú vezikulák vehetnek részt, mint a PM-ről folyamatosan lefűződő recirkuláló endoszómák vagy a Golgiból származó vezikulák. A lizoszómális exocitózis markereként, egy lizoszómális fehérje, a lizoszóma asszociált membrán fehérje 1 (LAMP1) sejt felszíni megjelenését vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy CD kezelést követően a LAMP1 fehérje sejt felszíni mennyisége valóban emelkedett koleszterin kivonást követően extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (**28. A ábra**), a korábbi membrán repair megfigyelésekhez hasonlóan ahol a folyamatot a médium β -hexóزامинидáz aktivitásán keresztül azonosították [457]. Ahogy az várható volt, a hatás kifejezettebb volt az extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében, de érdekes módon az általunk korábban alkalmazott extracelluláris Ca^{2+} -ot nem tartalmazó közegben (PBS) is megfigyelhető volt. Az 5 mM-os CD kezelés a Ca^{2+} -ot tartalmazó minták esetén kétszeresére növelte a sejt felszíni LAMP1 mennyiségét (127,7±6,7 %-ról 261,8±22,4 %-ra), míg a Ca^{2+} mentes minta esetén a lizoszómális fehérje mennyisége 80 %-kal emelkedett (100,0±5,2%-ról 179,5±27,3 %-ra). A LAMP1 fokozódó sejt felszíni megjelenése az emelkedő CD koncentrációkkal párhuzamosan egyértelműen hangsúlyozta, a folyamat koleszterin függő jellegét.



28. ábra A lizoszómális LAMP fehérjék excitóziisa kalcium és koleszterin-függő módon szintén fokozott ciklodextrin kezelést követően

*A: A lizoszómális excitóziis markereként használt lizoszóma asszociált membrán fehérje 1 (LAMP1) sejt felszíni mennyisége a sejtek egyre növekvő koncentrációjú CD kezelését követően fokozatosan nő a 3T3-MDR1 sejtek esetén, mind extracelluláris Ca²⁺-ot tartalmazó, mind nem tartalmazó közegben. A sejt felszíni LAMP1 mennyiségeket a CD nem kezelt Ca²⁺-ot nem tartalmazó minta relatív százalékában fejeztük ki. Az ábrákon három kísérlet átlagát tüntettük fel (\pm SD). A kontroll és 3 mM valamint 5 mM CD kezelt minták között statisztikai analízist végeztünk extracelluláris Ca²⁺ mellett (** $p=0,0014$, *** $p=0,0003$) és nélkül (** $p=0,0048$, ** $p=0,0083$) párosítatlan, kétmintás t próbával. B: A 3T3-MDR1 sejtek esetén a sejt teljes LAMP1 mennyiségének nagyobb hányada található a sejt felszínen, mint a 3T3 sejtek esetén, mind Ca²⁺-ot tartalmazó, mind Ca²⁺-ot nem tartalmazó közegben. A CD kezelés szignifikánsan fokozza a sejt felszíni LAMP1 mennyiségeket a 3T3-MDR1 sejtvonal esetén. Az ábrákon három kísérlet átlagát tüntettük fel (\pm SEM). *** $p=0,0003$ és ** $p=0,0022$*

párosítatlan, kétmintás t próbával. C:3T3 és 3T3-MDR1 sejtek mikroszkópos felvételei koleszterin depléciót követően. LAMP2-PE fluoreszcencia alig volt megkülönböztethető a háttér fluoreszcenciától a 3T3 sejtek esetén. A felső ábrákon az 5 mM CD kezelt 3T3 és 3T3-MDR1 sejtek fluoreszcens képeit tüntettük fel Ca^{2+} jelenlétében. Az alsó ábrákon ugyanazon sejtek transzmissziós képei szerepelnek. A felvételeken látható jelzés 50 μm -t jelöl.

A sejtben megfigyelhető különböző fúziós események létrejöttének minden esetben feltétele a Ca^{2+} jelenléte, mely általában a fúzióban résztvevő organelumok lumenjéből származik [456], de lehet extracelluláris eredetű is. Egy lizoszómális exocitotikus folyamatban a két fúzióban résztvevő “organelum” a PM és a lizoszóma. Ez azt jelenti, hogy a lizoszómák PM-nal történő fúziójához nélkülözhetetlen intracelluláris Ca^{2+} emelkedés forrása vagy az extracelluláris milliő, vagy maga a lizoszóma. A 0,4-0,6 mM-ra becsült lizoszómális Ca^{2+} koncentráció egy jelentős Ca^{2+} forrás [456]. Habár nagyon valószínű, hogy a fúziós események a Ca^{2+} felszabadulás helyétől 20-100 nm-en belül valósulnak meg, egy lizoszómális exocitotikus esemény csak mikromoláris mennyiségű Ca^{2+} -ot igényel [456, 464]. Nemrégiben egy túlnyomórészt a késői endoszómák és lizoszómák membránjában található [465, 466] befelé rektifikáló kation csatornáról, a TRPML1 receptorról (mucolipin transient receptor potential (TRP) channel 1), bizonyosodott be, hogy egy lehet azok közül a mechanizmusok közül ami a lizoszómális Ca^{2+} felszabadulást és a lizoszómális exocitózist szabályozza [467, 468]. Érdekes módon a csatorna jelentős lipid kontroll alatt áll [469].

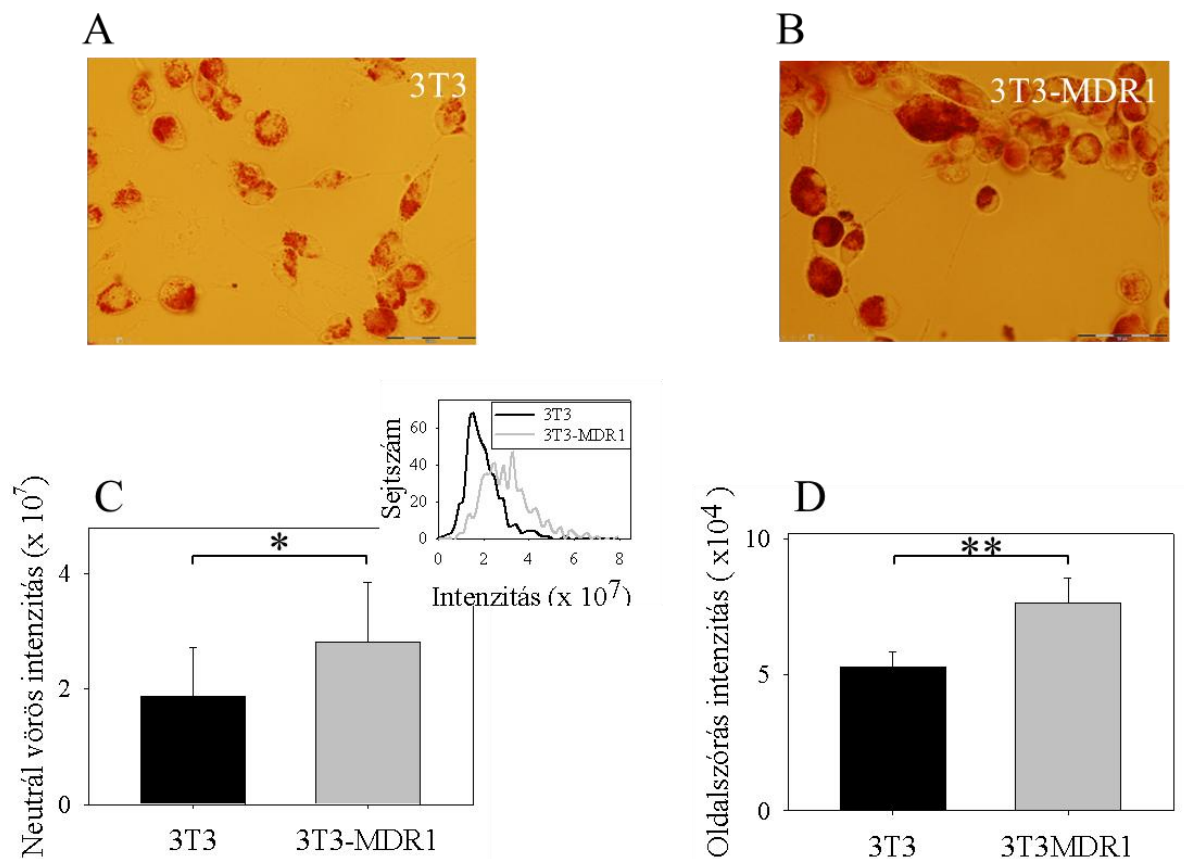
A lizoszómális enzimek fokozott szekréciója az MDR sejt vonalak esetén, arra buzdított minket, hogy tovább vizsgáljuk ennek a koleszterin kivonást követő lizoszómális exocitózis indukálta membrán repair folyamatnak a jelentőségét. Összehasonlítottuk tehát a Pgp-vel transzfektált (3T3-MDR1) sejt vonalunkat a nem transzfektált partnerével (NIH-3T3) a ciklodextrin kezelés hatására kialakult sejt felszíni LAMP1 mennyiségek tekintetében. Összehasonlítva a sejt felszíni/teljes sejt LAMP1 mennyiségeket a két sejt vonal esetén azt mondhatjuk, hogy a 3T3-MDR1 sejtekben a sejt felszíni LAMP1 százalékos mennyisége ciklodextrin kezelés nélkül is magasabb mennyiséget mutat, mint a 3T3 sejtekben, mind Ca^{2+} -ot tartalmazó (4,7 %-3T3; 9,4 % 3T3-MDR1) mind Ca^{2+} -ot nem tartalmazó minták esetén (2,8%-3T3; 7,8 %-3T3-MDR1) (**28. B ábra**). Ez összhangban van azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a drog rezisztens sejtek rendkívül gyors membrán turnovervel rendelkeznek, a savas vezikuláris kompartmentek és a PM között oda-vissza megvalósuló folyamatos trafficking folyamatok miatt [152]. Koleszterin kivonást követően a 3T3-MDR1

sejtek esetén a sejtfelszíni LAMP1 mennyiségek 7,8 %-ról 14,3%-ra változtak Ca^{2+} mentes közegben, illetve 9,4%-ról 18,4%-ra extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében. Míg a 3T3 sejtvonal esetén csak kismértékű emelkedés volt megfigyelhető. A sejtfelszíni LAMP1 százalékok 2,8%-ról 4,3%-ra emelkedtek Ca^{2+} mentes közegben, és 4,7%-ról 5,6%-ra Ca^{2+} jelenlétében. A másik lizoszómális markert, a LAMP2-t vizsgálva hasonló, ezekkel összeegyeztethető eredményt kaptunk (**28. C ábra**). A CD kezelést követően az alacsonyabb fluoreszcens jeleket mutató lizoszómális LAMP2 marker sejtfelszíni megjelenése főképp a 3T3-MDR1 sejtek esetén volt kimutatható. Ezek az eredmények tehát összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel, mely szerint Pgp-t nagy mennyiségben kifejező MDR sejtekben megfigyelhető egy fokozott trafficking a lizoszómák és a PM között. Továbbá ez a lizoszómális exocitotikus folyamat, ami számos folyamatban vehet részt többek között pl. a membrán repair folyamatokban is, jelentősen fokozható a 3T3-MDR1 sejtekben a PM koleszterin kivonását követően.

4.11 A 3T3-MDR1 sejtek nagyobb mennyiségű, stabilabb lizoszómákat tartalmaznak

Egy membrán repair folyamatban, mely folyamatban a lizoszómák plazmamembránnal történő fúziója egy meghatározó lépés, a lizoszómák száma, de talán még inkább azok stabilitása, valószínűleg egy nagyon lényeges faktor. Ezért elsőként a savas vezikulák mennyiségét hasonlítottuk össze a 3T3-MDR1 és a 3T3 sejtvonalaink esetén. A két sejtből található savas vezikulák mennyiségét a lizoszómákban akkumulálódó gyenge bázis, a neutrál vörös festék segítségével vizsgáltuk (**29. A-C ábra**). A festék savas közegben protonálódik és így csapdázódik, akkumulálódik a lizoszómákban, mely akkumulációnak a mértéke nyomon követhető az 520 nm mért abszorbancia növekedéssel. A 3T3-MDR1 sejtek 1,5-szer nagyobb mennyiségű festéket képesek akkumulálni, mint a 3T3 sejtek, mely megfigyelés a savas vezikuláris kompartment expanziójára utalhat.

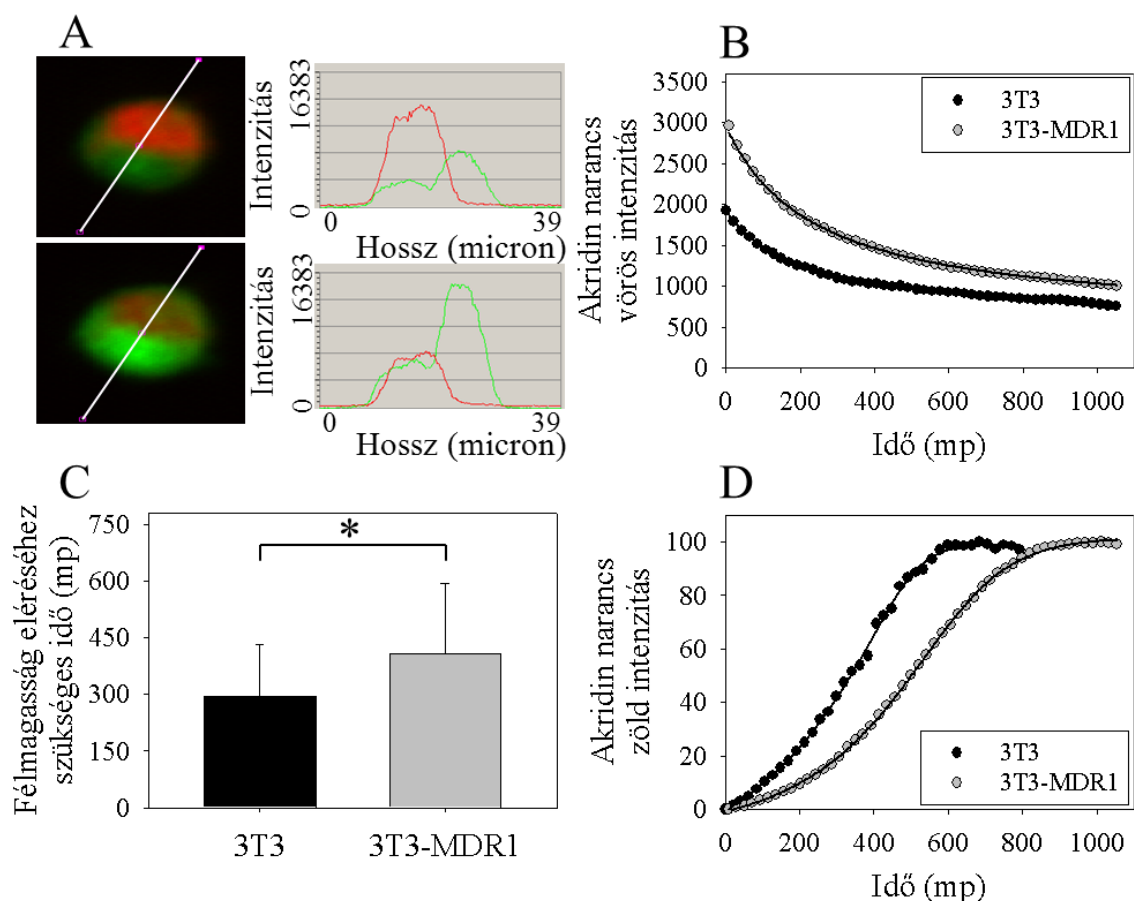
Eredményeink összhangban voltak korábbi megfigyelésekkel [460], mely szerint az MDR sejtek esetén egy számban, volumenben és membrán felszínben fokozott endoszómális vezikuláris rendszerrel kell számolni. Áramlási citométeres oldalszórásra vonatkozó megfigyeléseink, mely szerint a 3T3-MDR1 sejtek a 3T3 sejtekkel összevetve sokkal inkább granuláltak, összhangban van ezzel a korábbi megfigyeléssel (**29. D ábra**).



29. ábra A 3T3-MDR1 sejtben a savas vezikuláris kompartment expanziója figyelhető meg a 3T3 sejtekhez képest

A sejtek lizozóma mennyiségének mérése érdekében egy a savas kompartmentekben akumulálódó festéket, a neutrál vöröset használtuk. Az A és B ábrán a neutrál vörössel festett sejtek mikroszkópos felvételei láthatóak. A skála beosztása 50 micrométert jelöl. C: A sejtek lizozóma mennyiségének megítéléséhez kvantitatív képalkotó citometria segítségével határoztuk meg az abszorbanciákat. A 3T3-MDR1 sejtek 1,5-szer nagyobb mennyiségű neutrál vörös festéket képesek akumulálni, mint a 3T3 sejtek. A C ábrán 500-700 sejt neutrál vörös abszorbanciája alapján meghatározott medián értékeket tüntettük fel (\pm SD). * $p < 0,0001$ párosítatlan, kétmintás t próbával. A C ábra betét ábráján egy reprezentatív mérés eredményei szerepelnek. A D ábrán a két sejtvonal között tapasztalható oldalszórás különbségek láthatóak, áramlási citometriás mérésekből.

A lizozóma membrán stabilitásának megítéléséhez, egy másik lizozómákban akumulálódó, foto-oxidálható gyengén bázikus festéket, az akridin narancsot használtuk [470]. Az akridin narancs, mint metakromáziás festék, kék fényel történő gerjesztését követően vörös fluoreszcenciával jellemezhető, ha a festék nagy mennyiségben koncentrálnak a lizozómákban, és zöld fluoreszcenciával, amint a lizozómák ruptúráját követően alacsonyabb koncentrációra hígul a citoszolban [471], illetve, ha a DNS-hez kötődik.



30. ábra A 3T3-MDR1 sejtek stabilabb lizoszómákat tartalmaznak, mint a 3T3 sejtek

A lizoszóma membrán stabilitásának megítéléséhez, a lizoszómákban akkumulálódó, foto-oxidálható gyenge bázisú festéket, az akrinid narancsot használtuk. A lizoszómákban akkumulálódó festék kék-fénnyel történő bevilágításával a lizoszómákat fotodestrukciónak tettük ki lézer pásztázó citométerrel végzett mérésekben. Egy meghatározott látótérnyi akrinid narancssal töltött sejtet folyamatosan ismétlődő 488-nm-es lézer fényvel világítottunk be 50 cikluson keresztül és közben időben detektáltuk a vörös (565-595 nm), valamint a zöld (515-545 nm) fluoreszcencia emissziókat. A lizoszómákban nagy koncentrációban akkumulálódó metakromatikus festék vörös (az A ábra felső panelje bevilágítás előtt), míg a citoszolba került monomer formában található festék zöld fluoreszcenciát mutat (az A ábra alsó panelje bevilágítás után). A lizoszómák fotodestrukciója során a vörös fluoreszcencia időben folyamatosan csökken (B), miközben a zöld fluoreszcencia jel nő (D). A lizoszóma membrán stabilitásának jellemzésére a maximálisan elérhető zöld fluoreszcencia intenzitás felének eléréséhez szükséges bevilágítási időket hasonlítottuk össze a két sejt vonal esetén. Rövidebb bevilágítási idők detektálhatóak a 3T3 sejtek esetén (300 ± 140 mp), a 3T3-MDR1 sejtekkel összehasonlítva (410 ± 180 mp). A C ábrán 5 független mérés átlagát tüntettük fel ($\pm SD$). $*p < 0,05$ párosítatlan, kétmintás t-próbával. A B és D ábrán egy-egy reprezentatív görbe látható, mely 10-10 sejt átlagaként állt elő.

A két sejt vonal, hasonlóan a neutrál vörös festékhez, különbséget mutatott az akrinid narancs lizoszómális akkumulációjában is, mely a megvilágítás kezdetén a vörös fluoreszcencia

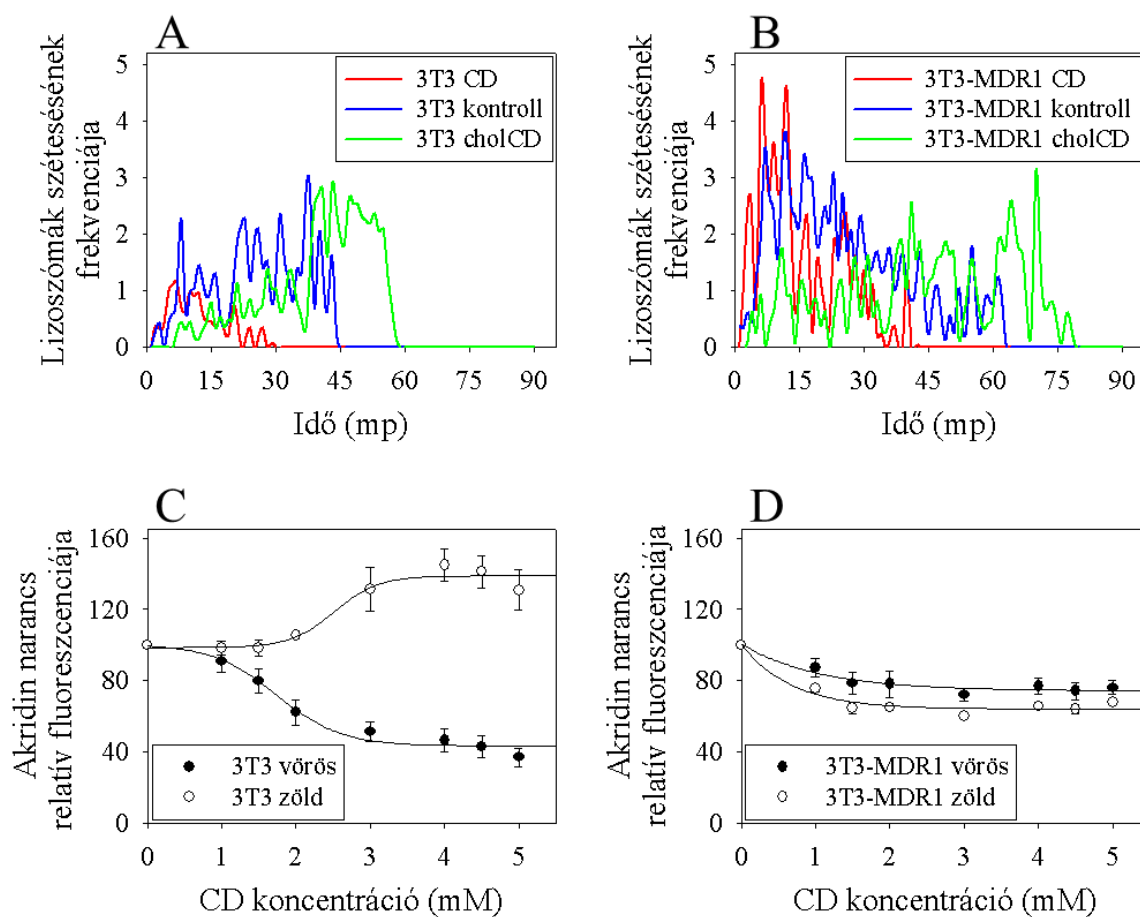
intenzitások különbségében látszott. A lizoszóma membrán csökkenő integritását a gerjesztést követően, a csökkenő vörös és fokozódó zöld fluoreszcencia intenzitások nyomon követésével detektáltuk. A sejtenkénti fluoreszcencia intenzitások alakulását 50 egymást követő 488 nm-es lézer gerjesztésű szkenningsorozat során követtük nyomon időben, a tárgylemez egy adott területén. Egy ciklus ideje hozzávetőleg 20 mp volt. A lizoszóma membrán stabilitásának jellemzésére a maximálisan elérhető zöld fluoreszcencia intenzitás felének eléréséhez szükséges bevilágítási időket hasonlítottuk össze a két sejtvonal esetén (**30. ábra**). Hosszabb bevilágítási időket detektáltunk a 3T3-MDR1 sejtek esetén (410 ± 180 mp), a 3T3 sejtekkel összehasonlítva (300 ± 140 mp), mely egy a fotodestrukciónak jobban ellenálló lizoszómális apparátusra utal a drog-rezisztens sejtvonal esetén. Eredményeink tehát egy stabilabb és mennyiségileg is fokozott endoszómális savas vezikuláris rendszerre utalnak a 3T3-MDR1 sejtek esetén.

Korábban ez a savas vezikuláris rendszer a gyengén bázikus kemoterápiás szerek nagy mennyiségeinek akkumulációja miatt tarthatott számot érdeklődésre [152]. Az exocitózis sebességének fokozódása és a korábban megfigyelt fokozott membrán turnover ezekben a sejtekben [152, 460-463], figyelembe véve azt a tényt, hogy a lizoszómák PM-nal történő fúziója egy rendkívül lényeges lépés a membrán sérüléseket követő helyreállító folyamatokban [456], más előnyökkel is felruházhatja ezeket a sejtek, nevezetesen a hatékonyabb membrán repair-rel. A lizoszómális exocitózis ezenkívül az MDR jelenség kapcsán is rendkívül fontos lehet, a savas vezikulákban nagy mennyiségben akkumulálódott drogok extracelluláris térbe történő ürítésével.

4.12 A 3T3-MDR1 sejtek lizoszómái koleszterin kivonást követően is stabilabbnak bizonyultak

A LAMP fehérjék, valamint a mi sejtvonalunk esetén is elképzelhető hősokk fehérje 70 mellett [472, 473], a lizoszómális koleszterin a lizoszómák stabilitását meghatározó egyik további lényeges tényező lehet [474]. A PM koleszterin mennyisége, ami gyakran emelkedett a MDR sejtek esetén, valószínűleg befolyásolja a lizoszómák koleszterin mennyiségeit és ily módon azok stabilitását. A 3T3-MDR1 sejtpopulációt folyamatos drog szelekció mellett tartottuk fennt, ennek megfelelően a Pgp nagy mennyiségű expressziója mellett számos más MDR tulajdonsággal is rendelkezhetnek ezek a sejtek. Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint a PM koleszterin kivonása csökkentette a lizoszóma membrán stabilitását, bár a kísérleti protokoll az akut koleszterin kivonást követően, a mi méréseinkkel ellentétben, még tartalmazott egy egész napos inkubációt [475]. Figyelembe véve azt az eshetőséget, hogy a

lizoszómák stabilitása a PM koleszterin modulációját követően a mi rendszerünkben is változhatott, a lizoszómák membrán stabilitását koleszterin perturbációt követően is összehasonlítottuk a két sejtvonal esetén. Ezt a vizsgálatot epifluoreszcens mikroszkópban, élő sejtek valós idejű videózásával végeztük. A látóterében lévő ciklodextrin kezelt sejtpopulációt folyamatos kék fény (480 ± 15 nm) expozíciónak tettük ki, közvetlenül az akridin narancs inkubációt követően, és a zöld csatornában (530 ± 15 nm) időben detektáltuk a lizoszómák szétesésének megfelelő fluoreszcencia felvillanásokat (**lásd videók**). Minden esetben az összes lizoszóma széteséséhez szükséges expozíciós időket hasonlítottuk össze, a 3T3 (CD: 29 mp; kontroll: 46 mp; cholCD: 60 mp) és a 3T3-MDR1 (CD: 40 mp; kontroll: 65 mp; cholCD: 79 mp) sejtvonal esetén (**31. A-B ábra**).



31. ábra A plazmamembrán akut koleszterin modulációi befolyásolják a lizoszómák stabilitását, a 3T3-MDR1 sejtek lizoszómái koleszterin kivonást követően is stabilabbak. A-B: A sejteket a 20 perces ciklodextrin kezelést követően akridin narancssal inkubáltuk. A sejtek látóternyi mennyiségét folyamatos kék fény besugárzásnak tettük ki, és a zöld csatornában videofilmen rögzítettük a lizoszóma szétesési eseményeknek megfelelő fluoreszcencia felvillanásokat valós időben. A plazmamembrán akut koleszterin perturbációja mindkét sejtvonal esetén hatással volt a lizoszóma stabilitására. Mindkét esetben a sejten található összes lizoszóma széteséséhez szükséges besugárzási időket hasonlítottuk össze. A

lizoszómák széteséséhez szükséges expozíciós idők a 3T3 (CD: 29 mp; kontroll: 46 mp; cholCD: 60 mp) sejtek esetén rövidebbek voltak, mint, a 3T3-MDR1 sejtek esetén (CD: 40 mp; kontroll: 65 mp; cholCD: 79 mp). A koleszterin kivonás mindkét esetben csökkentette, míg a koleszterin bevitel mindkét esetben fokozta az expozíciós időket. Ugyanakkor a lizoszóma szétesési események száma csak a 3T3 sejtek esetén csökkent. Az ábrákon a 3 mM-os ciklodextrin kezelések egy-egy reprezentatív görbájének eredményeit tüntettük fel, mert az 5 mM-os CD kezelést követően a 3T3 sejtvonal esetén már nem maradt expozíciónak kitehető lizoszóma (videók). C-D: A lizoszómák szétesése a koleszterin kivonás mértékével arányosan nő a 3T3 sejtek esetén. A plazmamembrán koleszterin kivonásának hatását vizsgáltuk az akridin narancs vörös és zöld fluoreszcencia jeleinek alakulására emelkedő koncentrációjú CD oldat és állandó koncentrációjú akridin narancs koinkubációját követően letapadt sejt kultúrában. A koinkubációt követően a steady state fluoreszcenciákat plate-reader spektrofluoriméterrel detektáltuk. A fluoreszcencia változások a lizoszómák számának jelentős csökkenését mutatják a 3T3 sejtek esetén a lizoszómák szétesésének következtében, és egy kisebb mértékű mennyiségi csökkenést a 3T3-MDR1 sejtek esetén. Az ábrán látható görbéken 4 kísérlet átlagát tüntettük fel (\pm SEM).

A PM akut ciklodextrin kezelése mindkét sejt esetében egyértelműen befolyásolta a lizoszómák stabilitását, azaz a koleszterin kivonás csökkentette az expozíciós időket, míg a PM koleszterin telítése fokozta. Bár a CD kezelés mindkét sejt esetén csökkentette a bevilágítási időket, de a lizoszóma szétesési események száma szignifikánsan csak a 3T3 sejtvonal esetén csökkent. A 31. A és B ábrán éppen ezért a 3 mM-os ciklodextrin kezelések eredményeit tüntettük fel, mert az 5 mM-os CD minták már nem voltak összehasonlíthatóak, ugyanis a 3T3 sejtvonal esetén gyakorlatilag nem maradt expozíciónak kitehető épp lizoszóma (videók). A PM koleszterin kivonás lizoszómákra gyakorolt hatásának végső kimenetelét szintén megvizsgáltuk különböző koncentrációjú CD kezelések esetén (**31. C-D ábra**). A letapadt sejteket 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk különböző mennyiségű CD-nel valamint akridin narancs festékkel sötétben, és ezt követően plate-reader spektrofluoriméterrel detektáltuk a vörös és zöld steady state fluoreszcenciákat. (Itt tehát kék fény bevilágítás csak az esetleges környezeti fényből és a jelek kiolvasásakor történő megvilágításból származott.)

A CD kezelés egyértelműen érzékenyítette a 3T3 sejteket az akridin narancs iránt, mely nyomon követhető volt a csökkenő vörös fluoreszcenciákkal párhuzamosan megfigyelhető zöld fluoreszcenciák emelkedésében a PM koleszterin kivonásának függvényében. Ezek egyértelmű jelei a vörösen festődő savas vezikulák folyamatos eltűnésének és ezzel párhuzamosan a festék zöld fluoreszcenciával jellemezhető monomer formájának megjelenésének a citoplazmában vagy a magban. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a videó eredményekkel, ahol a 3 mM-os CD kezelés már csökkentette az expozíciónak

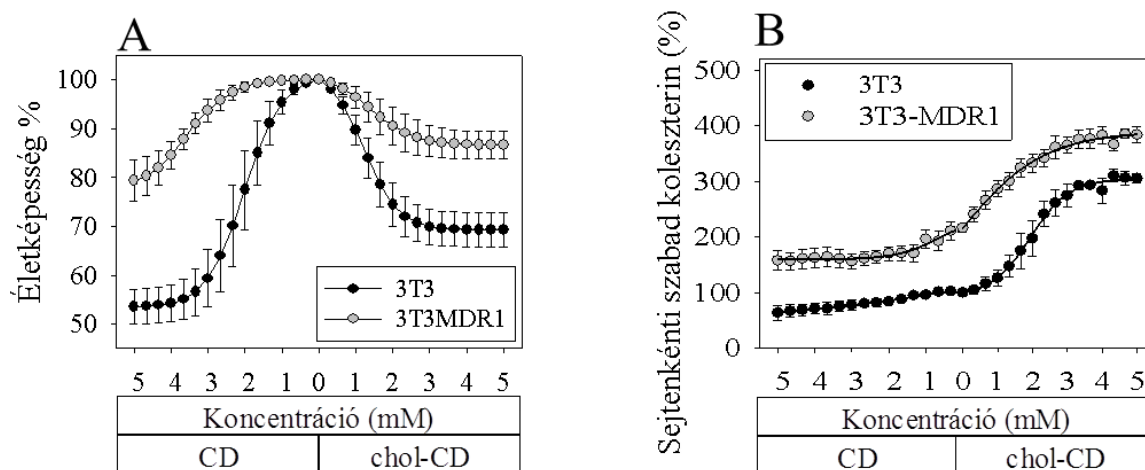
kitehető lizoszómák számát, míg az 5 mM-os kezelés után a 3T3MDR1 sejtekkel ellentétben már egyáltalán nem maradt intakt lizoszóma. A 3T3-MDR1 sejtek esetén mind a vörös mind a zöld fluoreszcenciák csökkenése figyelhető meg, mely szintén a savas vezikulák mennyiségének csökkenésére utal. De amíg a 3T3 sejt esetén a fluoreszcencia változások egyértelmű jelei a lizoszómák széteséssel járó folyamatos eltűnésének, addig a 3T3-MDR1 sejtek esetén a lizoszómák eltűnésének háttérben valamilyen más mechanizmus áll. A korábbi LAMP1-es eredmények tükrében valószínűsíthető a lizoszómák sejt felszínre történő exocitózisa, a festéknek ezzel párhuzamos sejtől való kiürülésével.

4.13 A 3T3-MDR1 sejtek esetén megfigyelhető hatékonyabb membrán repair mechanizmus tükröződik a koleszterin perturbációt követő életképességekben

A LAMP1-es és festék akkumulációs mérésekből feltételezhető hatékonyabb membrán repair a 3T3-MDR1 sejtek esetén a 3T3 sejt vonallal összehasonlítva, látható kellene hogy legyen a sejt vonalak koleszterin modulációját követő életképességekben is. Összehasonlítottuk tehát a két sejt vonal koleszterin perturbációra adott életképességét. A PM károsodását követő propidium jodid permeabilitáson alapuló életképességi tesztben a két sejt jelentős különbségeket mutatott. A PM 5 mM-os CD-nel végzett koleszterin kivonása sokkal inkább, $46,4 \pm 3,5$ %-kal csökkentette az életképességeket a 3T3 sejt vonal esetén, mint a 3T3-MDR1 sejt vonalnál, ahol az életképességbeli csökkenés $20,6 \pm 4,3$ % volt (**32. A ábra**). Érdekes módon a PM koleszterin telítése hasonló tendenciákat mutatott.

Az életképességekkel párhuzamosan meghatároztuk a sejtek szabad koleszterin mennyiségét is áramlási citometriáson detektált filipin festéssel. A 3T3-MDR1 sejt vonal esetén kétszer nagyobb mennyiségű koleszterint detektáltunk a sejtekben ($216,4 \pm 13,3$ %), mint a 3T3 sejt vonal esetén ($100,0 \pm 6,2$ %) (**32. B ábra**). Tekintve, hogy a sejtben lévő szabad koleszterin nagy része a plazmamembránban található [374], a sejtek nagy valószínűséggel szintén különbségeket mutatnak a sejtmembrán koleszterin mennyiségében, korábbi megfigyelésekhez hasonlóan [316-318]. Ezek alapján a 3T3-MDR1 sejtek esetén mért eleve nagyobb mennyiségű koleszterin akár magyarázhatja is a koleszterin kivonást követő jobb életképességeket. Ugyanakkor a 3T3-MDR1 sejtek nem kizárólag a koleszterin kivonás esetén reagálnak jobb életképességekkel, hanem az extra mennyiségben bevitt koleszterin esetén is. Mindemellett nagyon hasonló koleszterin kivonási-beviteli mintázatokat kapunk a két sejt vonal esetén, ha a koleszterin perturbációt követően a filipinnel mért sejt koleszterin mennyiségeket a sejt eredeti koleszterin szintjéhez viszonyítjuk. Ezek a csaknem párhuzamos görbék sokkal inkább utalnak a 3T3-MDR1 sejtek hatékonyabb koleszterin kompenzációs és

membrán repair folyamataira, mely folyamat részeként a PM koleszterin kivonását követően megindul a koleszterinben gazdag raft domének exocitózisa a sejt felszínre, illetve megtörténik az extra mennyiségű koleszterin redistribúciója az intracelluláris vezikuláris pool-okba.

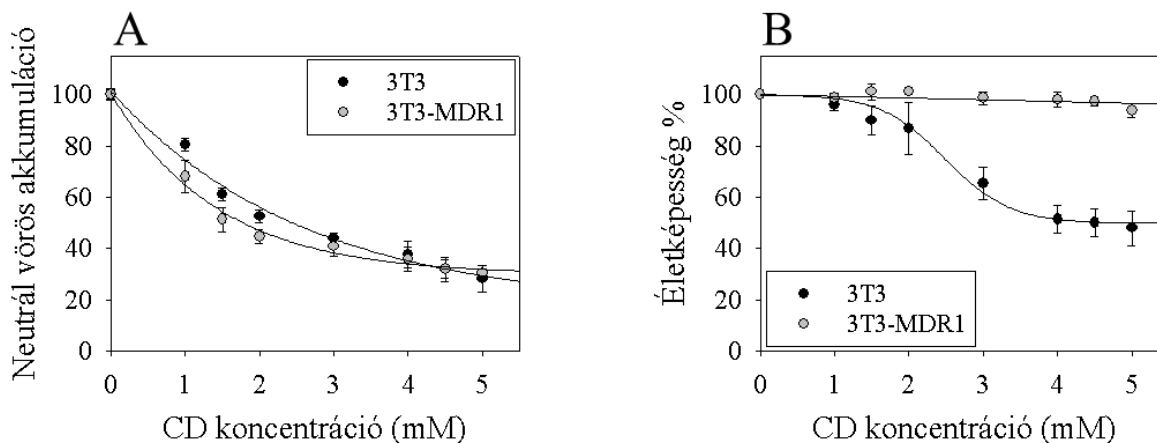


32. ábra A 3T3-MDR1 sejt vonal nagyobb mennyiségű koleszterint tartalmaz és a 3T3 sejtekkel ellentétben egyaránt kevésbé érzékeny a plazmamembrán koleszterin kivonására valamint bevitelére

A különböző koncentrációjú ciklodextrinek hatását vizsgáltuk a 3T3 és 3T3-MDR1 sejtek koleszterin mennyiségeire és életképességeire. A: A plazmamembrán koleszterin perturbációja nagyobb mértékben csökkentette a 3T3 sejtek életképességét az 5 mM CD és az 5 mM chol-CD minták esetén is (** $p=0,0086$ és ** $p=0,0020$, párosítatlan kétmintás t -próbával). Az ábrán 3 független mérés átlag eredményét 95%-os konfidencia intervallumokkal tüntettük fel. A plazmamembrán PI permeabilitásán alapuló életképességeket tripszinezett sejteken áramlási citometriásan mértük. További statisztikai analízist végeztünk az 5 mM CD, 5 mM chol-CD valamint kontroll minták primer adatai között mindkét sejt vonal esetén. $3T3_{CD} - \text{Kontroll}$ *** $p=0,0007$; $3T3_{\text{Kontroll}} - \text{chol-CD}$ ** $p=0,0020$; $3T3MDR1_{CD} - \text{Kontroll}$ * $p=0,0260$; $3T3MDR1_{\text{Kontroll}} - \text{chol-CD}$ * $p=0,0104$ párosított, kétmintás t -próbával. B: A 3T3-MDR1 sejtek nagyobb mennyiségű szabad koleszterint tartalmaznak a 3T3 sejtekkel összehasonlítva (**** $p<0,0001$ párosítatlan, kétmintás t -próbával). A szabad koleszterin mennyiségek mérése filippin segítségével, áramlási citometriával történt. Az ábrán 3 független mérés átlagát (\pm SEM) tüntettük fel. További statisztikai analízist végeztünk az 5 mM CD, 5 mM chol-CD valamint kontroll minták között mindkét sejt vonal esetén. $3T3_{CD} - \text{Kontroll}$ * $p=0,0132$; $3T3_{\text{Kontroll}} - \text{chol-CD}$ **** $p<0,0001$; $3T3MDR1_{CD} - \text{Kontroll}$ ** $p=0,0033$; $3T3MDR1_{\text{Kontroll}} - \text{chol-CD}$ **** $p<0,0001$ párosítatlan, kétmintás t -próbával.

A PI permeabilitásán alapuló életképességi teszt mellett gyakran használt másik életképességi teszt, a neutrál vörös akkumulációs esszé, melynek alapja, hogy az életképesebb sejtek nagyobb mennyiségben tudják a festéket a savas vezikuláikban akkumulálni, mert képesek a lizoszómáik pH gradiensének fenntartására [434]. A neutrál vörös akkumulációja mindkét sejt esetén nagymértékben csökkent a PM koleszterin kivonását követően. A 3T3-MDR1 sejtek

esetén egyértelmű ellentmondás van a neutrál vörös akkumuláció alapján és a hasonló körülmények között, ez esetben letapadt sejteken kivitelezett PI permeabilitáson alapuló életképességi tesztek eredménye között (**33. A-B ábra**). Bár elméletileg a PM károsodása tekinthető ebben az esetben az elsődleges támadáspontnak.



33. ábra Ellentmondás a sejtek neutrál vörös akkumulációján alapuló életképességi teszt és a plazmamembrán PI permeabilitásán alapuló életképességi teszt között a 3T3-MDR1 sejtek esetén

A 3T3 és a 3T3-MDR1 sejtek csökkenő életképességeket mutatnak az emelkedő CD koncentrációk függvényében a neutrál vörös festék akkumulációjának csökkenése alapján. Hasonló körülmények között, a plazmamembrán PI permeabilitásán alapuló életképességi tesztben kizárólag a 3T3 sejtek mutatnak csökkenő életképességeket. Az abszorbanciákat és fluoreszcencia intenzitásokat plate-reader spektrofluoriméterrel letapadt sejt kultúrákon mértük. Az ábrán látható görbéken legalább 3 kísérlet átlagát tüntettük fel (\pm SEM).

Ezek az eredmények, párhuzamosan a lizoszómális markerként használt LAMP1 sejtfelszíni megjelenésével kizárják azt az egyszerűnek tűnő magyarázatot, hogy a neutrál vörös ilyen mértékű lizoszómális akkumulációjának csökkenése az életképességek csökkenésével lenne magyarázható. A festék akkumulációjának csökkenése, párhuzamosan a sejtfelszíni LAMP1 megjelenésével koleszterin kivonást követően, lizoszómális exocitózissra utal a 3T3-MDR1 sejtvonal esetén. Ami hasonlóan a csökkent életképességű sejtekhez, csökkenti azt a lizoszómális térfogatot, amely képes lenne a festék akkumulációját a kezelt minták esetén tapasztalt szinten tartani. Az akridin narancssal végzett kísérletek szintén erre utalnak.

A lizoszómák rendkívül dinamikus struktúrák, melyek képesek fuzionálni a késői endoszómákkal, a plazmamembránnal, fagoszómákkal és autofagoszómákkal [456]. A lizoszómák traffickingjének gátlása, a mikrotubulusok vagy mikrofilamentumok megzavarásával, nagymértékben befolyásolja a lizoszómák stabilitását [476-479]. Ezekre a

kísérletes megfigyelésekre adott egyik elképzelés az, hogy a lizoszómák stabilitása jelentős mértékben támaszkodik a lizoszómák és említett egyéb organellumok, illetve a PM között folyamatosan megvalósuló fúziós eseményekre. Újabb eredmények azt bizonyítják, hogy valószínűleg a PM-ből származó koleszterin, természetesen más egyéb faktorok mellett, szintén befolyással van a lizoszómák stabilitására [475]. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a lizoszómák és a PM között megvalósuló folyamatos koleszterin forgalom eredményeként, a sejtben lévő koleszterin mennyiségek 6 %-a található a lizoszómákban normál körülmények között humán fibroblasztok esetén [480]. A mi akut koleszterin depléciós eredményeinkből kitűnik, hogy a lizoszómák stabilitása nagyon hamar reagál a PM koleszterin változásaira. Mindezekből feltételezhető, hogyha egy sejt hatékonyan képes pótolni illetve kontrollálni a PM koleszterin szintjeit, akkor ezek a stabil koleszterin szintek következtében befolyásolják a lizoszómák stabilitását illetve a lizoszóma függő folyamatokat. Eredményeink azt mutatják, hogy a lizoszómális koleszterin vesztés mértéke, életről-halálról dönthet azzal, hogy vagy korai feedback jelként szolgál egy membrán repair folyamatban vagy végzetes mértékben fokozza a lizoszóma membrán permeabilitását. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az MDR sejtek hatékonyabb koleszterin kompenzációs mechanizmusokkal rendelkeznek (lásd 1.10-es fejezet). Korai megfigyelések bizonyítják, hogy a PM emelkedett koleszterin mennyiségei mellett, az MDR sejtek (drog szelektált sejt vonalak), fokozott koleszterin észterifikációt is mutatnak és ennek következtében fokozott mennyiségű észterifikált koleszterint állítanak elő a PM direkt vagy akár indirekt (szfingomielináz kezelés) koleszterin szaturációját követően [400, 401]. Figyelembe véve azt, hogy az acil CoA-koleszterin aciltranszferáz (ACAT) az ER-ben helyezkedik el, ez egyúttal az extra mennyiségű koleszterin fokozott felvételét is jelenti a PM-ből [402] és egy gyors koleszterin trafficking útvonalat feltételez a PM és az ER között [374]. A mi életképességi adataink is azt mutatják, hogy a 3T3-MDR1 sejtek nem csak a koleszterin kivonásra reagálnak jobbnak, de hasonlóan sokkal inkább képesek megbírkózni az emelkedett koleszterin mennyiségekkel is. Másrészt egy észterifikált koleszterin pool-ra támaszkodva ezek a sejtek hatékonyabban képesek reagálni a PM csökkent koleszterin mennyiségeire, például koleszterin kivonást követően. Mindezek mellett a MDR sejtek még fokozott sebességű koleszterin szintézist is mutathatnak, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reduktáz (HMG CoA-reduktáz) ubiquitinációját és ezzel lebomlásának sebességét meghatározó ubiquitin E3 ligáz, a Trc8 alacsonyabb expressziója miatt [403-405]. Az ezen sejtek esetén valószínűsíthető nagyobb mennyiségű raft domén szintén azt eredményezheti, hogy a PM koleszterin nagyobb mennyiségei találhatóak alacsony kémiai potenciálú állapotban (low

escape tendency) [370]. Mivel számos eddig ismert koleszterin kompenzációs mechanizmus a PM magas kémiai potenciálú koleszterin mennyiségeinek változásaira reagál érzékenyen, ez a tulajdonság lehetővé teszi ezen sejtek számára, hogy a PM már relatíve kis koleszterin változásaira is reagáljanak (lásd 1.9-es fejezet). A raft domének folyamatos fokozott internalizációja mindezek mellett egy további jelentős koleszterin poolt jelent az endocitotikus-recirkuláló rendszerben. A hatékonyabb koleszterin és membrán repair folyamat, ami a 3T3-MDR1 sejtek esetén megfigyelhető magában foglalja a raft domének fokozott kihelyezését a PM-ba, mely folyamatot a raft asszociált Pool1 Pgp excitózisán keresztül tudunk nyomon követni.

Annak ellenére, hogy a Pgp overexpressziója tagadhatatlanul egy lényeges különbség a két vizsgált sejtvonal között, a Pgp hozzájárulása ehhez a folyamathoz még mindig kérdéses, csakúgy mint a raft mikrodomének stabilizálásához való hozzájárulása (lásd 1.8-as fejezet). Az egyes alternatív MDR mechanizmusok, ugyanakkor valószínűleg nem függetlenek egymástól. A hatékonyabb membrán turnover-rel rendelkező sejtek, hatékonyabb fehérje turnover-t is mutatnak. Ez a Pgp hatékonyabb kihelyezését is biztosítja a PM-ba, továbbá a Pgp lizoszómákban való nagyobb mennyiségű megjelenését szintén biztosítja. Sőt az esetlegesen beinduló membrán-repair is a hatékonyabb MDR-t szolgálja, a nagyobb mennyiségű drog export lizoszómákkal való eredményesebb eltávolításával.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az MDR sejtek hatékonyabb membrán repair-rel rendelkeznek a CD kezeléssel együtt járó PM sérülést követően, mely folyamat csatasorba állítja a koleszterin kompenzációs mechanizmusok mellett a kiterjedt endo-lizoszómális apparátusukat és magába foglalja a Pgp-t tartalmazó raft domének excitózisát a sejtfelszínre. Eredményeink az MDR sejtek alkalmazkodásának egy újabb fortélyát emelik ki.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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

6. SUMMARY

1. We have confirmed that detergents, which are the most frequently used in membrane raft studies, have an effect on the polymerization of actin *ex vivo* as well. The depolymerization effect of most detergents, applied vitally, was first observed at around their critical micellar concentrations.
2. Cholesterol modification of PM influenced the binding affinity of 15D3 mAb. 15D3 mAb binds to a conformation sensitive epitope of Pgp that was responsive to PM cholesterol levels.
3. a, We have confirmed that UIC2 labeled Pool1 Pgps show enhanced internalization compared to Pool2 Pgps.
b, We have confirmed that internalized Pool1 Pgps more likely choose the late endosomal, lysosomal degradation pathway. At the same time we have recognized that binding of the UIC2 mAb promotes internalization.
c, We have confirmed that uptake of UIC2 labeled Pgps is an energetically active process.
d, We have confirmed that Pool1 Pgps recycle to the cell surface on a time scale of 30 minutes. At the same time, recovery of Pgp expression to its original level requires intact protein synthesis and much longer time after internalization of the total amount of cell surface Pgp.
4. Alterations in cholesterol content of the PM modified the trafficking of raft-associated Pool1 Pgps. Cholesterol surplus increased the endocytosis and decreased the exocytosis of Pool1 Pgps. Cholesterol depletion induced the exocytosis of Pool1 Pgps. The timing of the process was closely linked to the timing of the compensatory cholesterol and sphingolipid export via the secretory pathway.
5. Cholesterol extraction by CD triggers lysosomal exocytosis in 3T3 and 3T3-MDR1 cells as well. Data indicate that not only extracellular calcium, as it was known earlier, but also PM cholesterol, as our new observation, has a role in this membrane repair process.
6. Pgp-overexpressing drug resistant 3T3-MDR1 cells possess more numerous and stable lysosomes compared to drug sensitive parental NIH-3T3 cells without and even after cholesterol modulations.
7. Compared to parental cells, 3T3-MDR1 cells were more resistant to cholesterol perturbations of the PM. This was reflected in significantly better viabilities.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] J.L. Biedler, H. Riehm, Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies, *Cancer research*, 30 (1970) 1174-1184.
- [2] K. Dano, Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells, *Biochimica et biophysica acta*, 323 (1973) 466-483.
- [3] T. Skovsgaard, Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells, *Cancer research*, 38 (1978) 1785-1791.
- [4] W.T. Beck, M.C. Cirtain, J.L. Lefko, Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts, *Molecular pharmacology*, 24 (1983) 485-492.
- [5] V. Ling, L.H. Thompson, Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine, *Journal of cellular physiology*, 83 (1974) 103-116.
- [6] Y.P. See, S.A. Carlsen, J.E. Till, V. Ling, Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide, *Biochimica et biophysica acta*, 373 (1974) 242-252.
- [7] S.A. Carlsen, J.E. Till, V. Ling, Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells, *Biochimica et biophysica acta*, 455 (1976) 900-912.
- [8] M.M. Gottesman, V. Ling, The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research, *FEBS letters*, 580 (2006) 998-1009.
- [9] R.L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochimica et biophysica acta*, 455 (1976) 152-162.
- [10] J.R. Riordan, V. Ling, Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability, *The Journal of biological chemistry*, 254 (1979) 12701-12705.
- [11] N. Kartner, J.R. Riordan, V. Ling, Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines, *Science*, 221 (1983) 1285-1288.
- [12] N. Kartner, D. Evernden-Porelle, G. Bradley, V. Ling, Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies, *Nature*, 316 (1985) 820-823.
- [13] D.R. Bell, J.H. Gerlach, N. Kartner, R.N. Buick, V. Ling, Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 3 (1985) 311-315.
- [14] S.M. Robertson, V. Ling, C.P. Stanners, Co-amplification of double minute chromosomes, multiple drug resistance, and cell surface P-glycoprotein in DNA-mediated transformants of mouse cells, *Molecular and cellular biology*, 4 (1984) 500-506.
- [15] I.B. Roninson, H.T. Abelson, D.E. Housman, N. Howell, A. Varshavsky, Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells, *Nature*, 309 (1984) 626-628.
- [16] D.W. Shen, A. Fojo, J.E. Chin, I.B. Roninson, N. Richert, I. Pastan, M.M. Gottesman, Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification, *Science*, 232 (1986) 643-645.
- [17] I.B. Roninson, J.E. Chin, K.G. Choi, P. Gros, D.E. Housman, A. Fojo, D.W. Shen, M.M. Gottesman, I. Pastan, Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (1986) 4538-4542.
- [18] K. Ueda, M.M. Cornwell, M.M. Gottesman, I. Pastan, I.B. Roninson, V. Ling, J.R. Riordan, The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein, *Biochemical and biophysical research communications*, 141 (1986) 956-962.
- [19] K. Ueda, C. Cardarelli, M.M. Gottesman, I. Pastan, Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1987) 3004-3008.
- [20] P. Gros, Y.B. Ben Neriah, J.M. Croop, D.E. Housman, Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance, *Nature*, 323 (1986) 728-731.

- [21] J.H. Gerlach, J.A. Endicott, P.F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K.L. Deuchars, V. Ling, Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance, *Nature*, 324 (1986) 485-489.
- [22] P. Gros, J. Croop, D. Housman, Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins, *Cell*, 47 (1986) 371-380.
- [23] C.J. Chen, J.E. Chin, K. Ueda, D.P. Clark, I. Pastan, M.M. Gottesman, I.B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell*, 47 (1986) 381-389.
- [24] H. Hamada, T. Tsuruo, Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (1986) 7785-7789.
- [25] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham, Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1987) 7735-7738.
- [26] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham, Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 37 (1989) 159-164.
- [27] A.T. Fojo, K. Ueda, D.J. Slamon, D.G. Poplack, M.M. Gottesman, I. Pastan, Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (1987) 265-269.
- [28] L.J. Goldstein, H. Galski, A. Fojo, M. Willingham, S.L. Lai, A. Gazdar, R. Pirker, A. Green, W. Crist, G.M. Brodeur, et al., Expression of a multidrug resistance gene in human cancers, *Journal of the National Cancer Institute*, 81 (1989) 116-124.
- [29] S.P. Cole, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan, R.G. Deeley, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science*, 258 (1992) 1650-1654.
- [30] L.A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, D.D. Ross, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998) 15665-15670.
- [31] B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs, A. Varadi, Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system, *Physiological reviews*, 86 (2006) 1179-1236.
- [32] C.F. Higgins, I.D. Hiles, K. Whalley, D.J. Jamieson, Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems, *The EMBO journal*, 4 (1985) 1033-1039.
- [33] C.F. Higgins, I.D. Hiles, G.P. Salmond, D.R. Gill, J.A. Downie, I.J. Evans, I.B. Holland, L. Gray, S.D. Buckel, A.W. Bell, et al., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature*, 323 (1986) 448-450.
- [34] C.F. Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man, *Annual review of cell biology*, 8 (1992) 67-113.
- [35] M. Dean, R. Allikmets, Evolution of ATP-binding cassette transporter genes, *Current opinion in genetics & development*, 5 (1995) 779-785.
- [36] S. Childs, V. Ling, The MDR superfamily of genes and its biological implications, *Important advances in oncology*, (1994) 21-36.
- [37] M. Dean, T. Annilo, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates, *Annual review of genomics and human genetics*, 6 (2005) 123-142.
- [38] K. Ueda, M. Matsuo, K. Tanabe, K. Morita, N. Kioka, T. Amachi, Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins, *Biochimica et biophysica acta*, 1461 (1999) 305-313.
- [39] M.P. Anderson, R.J. Gregory, S. Thompson, D.W. Souza, S. Paul, R.C. Mulligan, A.E. Smith, M.J. Welsh, Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity, *Science*, 253 (1991) 202-205.

- [40] M.P. Anderson, D.P. Rich, R.J. Gregory, A.E. Smith, M.J. Welsh, Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR, *Science*, 251 (1991) 679-682.
- [41] K. Moitra, M. Dean, Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease, *Biological chemistry*, 392 (2011) 29-37.
- [42] Y. Toyoda, A. Sakurai, Y. Mitani, M. Nakashima, K. Yoshiura, H. Nakagawa, Y. Sakai, I. Ota, A. Lezhava, Y. Hayashizaki, N. Niikawa, T. Ishikawa, Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type?, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23 (2009) 2001-2013.
- [43] K. Ueda, ABC proteins protect the human body and maintain optimal health, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75 (2011) 401-409.
- [44] O.M. Woodward, A. Kottgen, J. Coresh, E. Boerwinkle, W.B. Guggino, M. Kottgen, Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009) 10338-10342.
- [45] S.C. Hyde, P. Emsley, M.J. Hartshorn, M.M. Mimmack, U. Gileadi, S.R. Pearce, M.P. Gallagher, D.R. Gill, R.E. Hubbard, C.F. Higgins, Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature*, 346 (1990) 362-365.
- [46] P.M. Jones, A.M. George, The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61 (2004) 682-699.
- [47] J.E. Walker, M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay, 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, *The EMBO journal*, 1 (1982) 945-951.
- [48] C.A. Hrycyna, L.E. Airan, U.A. Germann, S.V. Ambudkar, I. Pastan, M.M. Gottesman, Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport, *Biochemistry*, 37 (1998) 13660-13673.
- [49] M.A. Bianchet, Y.H. Ko, L.M. Amzel, P.L. Pedersen, Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1-ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29 (1997) 503-524.
- [50] J. Zaitseva, S. Jenewein, T. Jumpertz, I.B. Holland, L. Schmitt, H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB, *The EMBO journal*, 24 (2005) 1901-1910.
- [51] J. Zaitseva, S. Jenewein, C. Oswald, T. Jumpertz, I.B. Holland, L. Schmitt, A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB, *Biochemical Society transactions*, 33 (2005) 990-995.
- [52] L.W. Hung, I.X. Wang, K. Nikaido, P.Q. Liu, G.F. Ames, S.H. Kim, Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter, *Nature*, 396 (1998) 703-707.
- [53] I.L. Urbatsch, M. Julien, I. Carrier, M.E. Rousseau, R. Cayrol, P. Gros, Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein, *Biochemistry*, 39 (2000) 14138-14149.
- [54] I.L. Urbatsch, K. Gimi, S. Wilke-Mounts, A.E. Senior, Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein, *Biochemistry*, 39 (2000) 11921-11927.
- [55] S.V. Ambudkar, I.W. Kim, D. Xia, Z.E. Sauna, The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding, *FEBS letters*, 580 (2006) 1049-1055.
- [56] I.W. Kim, X.H. Peng, Z.E. Sauna, P.C. FitzGerald, D. Xia, M. Muller, K. Nandigama, S.V. Ambudkar, 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 (2006) 7605-7616.
- [57] Z.E. Sauna, S.V. Ambudkar, About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work, *Molecular cancer therapeutics*, 6 (2007) 13-23.
- [58] T.W. Loo, D.M. Clarke, Mutational analysis of ABC proteins, *Archives of biochemistry and biophysics*, 476 (2008) 51-64.

- [59] C. Ozvegy, T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, B. Sarkadi, Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 285 (2001) 111-117.
- [60] K. Kage, S. Tsukahara, T. Sugiyama, S. Asada, E. Ishikawa, T. Tsuruo, Y. Sugimoto, Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 97 (2002) 626-630.
- [61] A. Kelly, S.H. Powis, L.A. Kerr, I. Mockridge, T. Elliott, J. Bastin, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, J. Trowsdale, A. Townsend, Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex, *Nature*, 355 (1992) 641-644.
- [62] T.H. Meyer, P.M. van Endert, S. Uebel, B. Ehring, R. Tampe, Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells, *FEBS letters*, 351 (1994) 443-447.
- [63] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science*, 245 (1989) 1066-1073.
- [64] E. Bakos, R. Evers, G. Szakacs, G.E. Tusnady, E. Welker, K. Szabo, M. de Haas, L. van Deemter, P. Borst, A. Varadi, B. Sarkadi, Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 32167-32175.
- [65] E. Bakos, R. Evers, G. Calenda, G.E. Tusnady, G. Szakacs, A. Varadi, B. Sarkadi, Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1), *Journal of cell science*, 113 Pt 24 (2000) 4451-4461.
- [66] A. Fojo, R. Lebo, N. Shimizu, J.E. Chin, I.B. Roninson, G.T. Merlino, M.M. Gottesman, I. Pastan, Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7, *Somatic cell and molecular genetics*, 12 (1986) 415-420.
- [67] M. Raymond, P. Gros, Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (1989) 6488-6492.
- [68] C.J. Chen, D. Clark, K. Ueda, I. Pastan, M.M. Gottesman, I.B. Roninson, Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins, *The Journal of biological chemistry*, 265 (1990) 506-514.
- [69] S.J. Currier, K. Ueda, M.C. Willingham, I. Pastan, M.M. Gottesman, Deletion and insertion mutants of the multidrug transporter, *The Journal of biological chemistry*, 264 (1989) 14376-14381.
- [70] S.J. Currier, S.E. Kane, M.C. Willingham, C.O. Cardarelli, I. Pastan, M.M. Gottesman, Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters, *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) 25153-25159.
- [71] T.W. Loo, D.M. Clarke, Superfolding of the partially unfolded core-glycosylated intermediate of human P-glycoprotein into the mature enzyme is promoted by substrate-induced transmembrane domain interactions, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 14671-14674.
- [72] A.E. Senior, D.C. Gadsby, ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR, *Seminars in cancer biology*, 8 (1997) 143-150.
- [73] I.L. Urbatsch, B. Sankaran, J. Weber, A.E. Senior, P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site, *The Journal of biological chemistry*, 270 (1995) 19383-19390.
- [74] T.W. Loo, D.M. Clarke, Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein, *The Journal of biological chemistry*, 270 (1995) 843-848.
- [75] A.B. Shapiro, V. Ling, Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein, *European journal of biochemistry / FEBS*, 250 (1997) 122-129.
- [76] A.B. Shapiro, K. Fox, P. Lam, V. Ling, Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site, *European journal of biochemistry / FEBS*, 259 (1999) 841-850.
- [77] T.W. Loo, D.M. Clarke, The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 5253-5256.

- [78] C. Martin, G. Berridge, C.F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton, R. Callaghan, Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein, *Molecular pharmacology*, 58 (2000) 624-632.
- [79] A.R. Safa, Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators, *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 4 (2004) 1-17.
- [80] T.W. Loo, D.M. Clarke, Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 14972-14979.
- [81] E. Friche, E.J. Demant, M. Sehested, N.I. Nissen, Effect of anthracycline analogs on photolabelling of p-glycoprotein by [¹²⁵I]iodomycin and [³H]azidopine: relation to lipophilicity and inhibition of daunorubicin transport in multidrug resistant cells, *British journal of cancer*, 67 (1993) 226-231.
- [82] L. Homolya, Z. Hollo, U.A. Germann, I. Pastan, M.M. Gottesman, B. Sarkadi, Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein, *The Journal of biological chemistry*, 268 (1993) 21493-21496.
- [83] T.W. Loo, D.M. Clarke, The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface, *The Journal of biological chemistry*, 274 (1999) 24759-24765.
- [84] I. Pastan, M.M. Gottesman, Multidrug resistance, *Annual review of medicine*, 42 (1991) 277-286.
- [85] M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annual review of biochemistry*, 62 (1993) 385-427.
- [86] Y. Raviv, H.B. Pollard, E.P. Bruggemann, I. Pastan, M.M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells, *The Journal of biological chemistry*, 265 (1990) 3975-3980.
- [87] A. van Helvoort, A.J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A.H. Schinkel, P. Borst, G. van Meer, MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine, *Cell*, 87 (1996) 507-517.
- [88] A. van Helvoort, M.L. Giudici, M. Thielemans, G. van Meer, 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, *Journal of cell science*, 110 (Pt 1) (1997) 75-83.
- [89] Q. Qu, F.J. Sharom, 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 (2002) 4744-4752.
- [90] C.F. Higgins, M.M. Gottesman, Is the multidrug transporter a flippase?, *Trends in biochemical sciences*, 17 (1992) 18-21.
- [91] F.J. Sharom, The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?, *The Journal of membrane biology*, 160 (1997) 161-175.
- [92] T.W. Loo, D.M. Clarke, Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12, *The Journal of biological chemistry*, 272 (1997) 20986-20989.
- [93] R. Liu, F.J. Sharom, Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains, *Biochemistry*, 35 (1996) 11865-11873.
- [94] N. Sonveaux, A.B. Shapiro, E. Goormaghtigh, V. Ling, J.M. Ruysschaert, Secondary and tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A Fourier transform attenuated total reflection infrared spectroscopy analysis, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 24617-24624.
- [95] C. Martin, C.F. Higgins, R. Callaghan, The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein, *Biochemistry*, 40 (2001) 15733-15742.
- [96] M.F. Rosenberg, R. Callaghan, S. Modok, C.F. Higgins, R.C. Ford, Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 2857-2862.
- [97] J.Y. Lee, I.L. Urbatsch, A.E. Senior, S. Wilkens, Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 5769-5779.

- [98] R.J. Dawson, K.P. Locher, Structure of a bacterial multidrug ABC transporter, *Nature*, 443 (2006) 180-185.
- [99] R.J. Dawson, K.P. Locher, Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP, *FEBS letters*, 581 (2007) 935-938.
- [100] A. Ward, C.L. Reyes, J. Yu, C.B. Roth, G. Chang, Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (2007) 19005-19010.
- [101] S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding, *Science*, 323 (2009) 1718-1722.
- [102] T.W. Loo, D.M. Clarke, Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 44332-44338.
- [103] K. Pleban, S. Kopp, E. Csaszar, M. Peer, T. Hrebicek, A. Rizzi, G.F. Ecker, P. Chiba, P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach, *Molecular pharmacology*, 67 (2005) 365-374.
- [104] S. Dey, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, S.V. Ambudkar, Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 10594-10599.
- [105] T.W. Loo, M.C. Bartlett, D.M. Clarke, Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 39706-39710.
- [106] D.A. Gutmann, A. Ward, I.L. Urbatsch, G. Chang, H.W. van Veen, Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1, *Trends in biochemical sciences*, 35 (2010) 36-42.
- [107] S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39 (1999) 361-398.
- [108] T.W. Loo, D.M. Clarke, Cross-linking of human multidrug resistance P-glycoprotein by the substrate, tris-(2-maleimidoethyl)amine, is altered by ATP hydrolysis. Evidence for rotation of a transmembrane helix, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 31800-31805.
- [109] M. Liu, R. Aneja, H. Wang, L. Sun, X. Dong, L. Huo, H. Joshi, J. Zhou, Modulation of multidrug resistance in cancer cells by the E3 ubiquitin ligase seven-in-absentia homologue 1, *The Journal of pathology*, 214 (2008) 508-514.
- [110] M. Saeki, K. Kurose, M. Tohkin, R. Hasegawa, Identification of the functional vitamin D response elements in the human MDR1 gene, *Biochemical pharmacology*, 76 (2008) 531-542.
- [111] R.C. Hui, R.E. Francis, S.K. Guest, J.R. Costa, A.R. Gomes, S.S. Myatt, J.J. Brosens, E.W. Lam, Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells, *Molecular cancer therapeutics*, 7 (2008) 670-678.
- [112] M. Bentires-Alj, V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.P. Merville, V. Bours, NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells, *Oncogene*, 22 (2003) 90-97.
- [113] R. Kanagasabai, K. Krishnamurthy, L.J. Druhan, G. Ilangovan, Forced expression of heat shock protein 27 (Hsp27) reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated drug efflux and MDR1 gene expression in Adriamycin-resistant human breast cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 286 (2011) 33289-33300.
- [114] N.D. Richert, L. Aldwin, D. Nitecki, M.M. Gottesman, I. Pastan, Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells, *Biochemistry*, 27 (1988) 7607-7613.
- [115] T.W. Loo, D.M. Clarke, Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides, *The Journal of biological chemistry*, 269 (1994) 7750-7755.
- [116] A. Molinari, M. Cianfriglia, S. Meschini, A. Calcabrini, G. Arancia, P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 59 (1994) 789-795.

- [117] J.J. Gripar, M. Ramachandra, C.A. Hrycyna, S. Dey, S.V. Ambudkar, Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system, *J Membrane Biol*, 173 (2000) 203-214.
- [118] P.S. Rao, U. Bickel, K.S. Srivenugopal, U.S. Rao, Bap29varP, a variant of Bap29, influences the cell surface expression of the human P-glycoprotein, *Int J Oncol*, 32 (2008) 135-144.
- [119] T.C. Chambers, J. Pohl, D.B. Glass, J.F. Kuo, Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein, *The Biochemical journal*, 299 (Pt 1) (1994) 309-315.
- [120] D. Fu, M. Bebawy, E.P.W. Kable, B.D. Roufogalis, Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: Implications in multidrug resistance in cancer, *International Journal of Cancer*, 109 (2004) 174-181.
- [121] R. Kramer, T.K. Weber, R. Arceci, N. Ramchurren, W.V. Kastriakis, G. Steele, I.C. Summerhayes, Inhibition of N-Linked Glycosylation of P-Glycoprotein by Tunicamycin Results in a Reduced Multidrug-Resistance Phenotype, *British journal of cancer*, 71 (1995) 670-675.
- [122] H. Kipp, I.M. Arias, Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 15917-15925.
- [123] Y. Wakabayashi, P. Dutt, J. Lippincott-Schwartz, I.M. Arias, Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 15087-15092.
- [124] D. Fu, B.D. Roufogalis, Actin disruption inhibits endosomal traffic of P-glycoprotein-EGFP and resistance to daunorubicin accumulation, *American journal of physiology. Cell physiology*, 292 (2007) C1543-1552.
- [125] H. Kim, M. Barroso, R. Samanta, L. Greenberger, E. Sztul, Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells, *The American journal of physiology*, 273 (1997) C687-702.
- [126] D. Fu, E.M. van Dam, A. Brymora, I.G. Duggin, P.J. Robinson, B.D. Roufogalis, The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein, *Biochimica et biophysica acta*, 1773 (2007) 1062-1072.
- [127] C. Ferrandiz-Huertas, A. Fernandez-Carvajal, A. Ferrer-Montiel, Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 128 (2011) 192-205.
- [128] D. Fu, I.M. Arias, Intracellular trafficking of P-glycoprotein, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44 (2012) 461-464.
- [129] E. Georges, The P-glycoprotein (ABCB1) linker domain encodes high-affinity binding sequences to alpha- and beta-tubulins, *Biochemistry*, 46 (2007) 7337-7342.
- [130] Y. Sai, A.T. Nies, I.M. Arias, Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells, *Journal of cell science*, 112 (1999) 4535-4545.
- [131] H. Takeshita, K. Kusuzaki, T. Ashihara, M.C. Gebhardt, H.J. Mankin, Y. Hirasawa, Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance, *Cancer letters*, 126 (1998) 75-81.
- [132] T. Tsuruo, H. Iida, Effects of cytochalasins and colchicine on the accumulation and retention of daunomycin and vincristine in drug resistant tumor cells, *Biochemical pharmacology*, 35 (1986) 1087-1090.
- [133] F. Luciani, A. Molinari, F. Lozupone, A. Calcabrini, L. Lugini, A. Stringaro, P. Puddu, G. Arancia, M. Cianfriglia, S. Fais, P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin, *Blood*, 99 (2002) 641-648.
- [134] P. Puddu, S. Fais, F. Luciani, G. Gherardi, M.L. Dupuis, G. Romagnoli, C. Ramoni, M. Cianfriglia, S. Gessani, Interferon-gamma up-regulates expression and activity of P-glycoprotein in human peripheral blood monocyte-derived macrophages, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79 (1999) 1299-1309.
- [135] Z. Bacso, H. Nagy, K. Goda, L. Bene, F. Fenyvesi, J. Matko, G. Szabo, Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 61 (2004) 105-116.

- [136] C. Bour-Dill, M.P. Gramain, J.L. Merlin, S. Marchal, F. Guillemin, Determination of intracellular organelles implicated in daunorubicin cytoplasmic sequestration in multidrug-resistant MCF-7 cells using fluorescence microscopy image analysis, *Cytometry*, 39 (2000) 16-25.
- [137] P. Ferrao, P. Sincock, S. Cole, L. Ashman, Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia, *Leukemia research*, 25 (2001) 395-405.
- [138] S. Meschini, A. Calcabrini, E. Monti, D. Del Bufalo, A. Stringaro, E. Dolfini, G. Arancia, Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 87 (2000) 615-628.
- [139] N. Baldini, K. Scotlandi, M. Serra, T. Shikita, N. Zini, A. Ognibene, S. Santi, R. Ferracini, N.M. Maraldi, Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution, *European journal of cell biology*, 68 (1995) 226-239.
- [140] A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, M. Cianfriglia, G. Arancia, A. Molinari, Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells, *The Histochemical journal*, 32 (2000) 599-606.
- [141] K. Babakhanian, M. Bendayan, R. Bendayan, Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 361 (2007) 301-306.
- [142] D. Fu, Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein, *Frontiers in oncology*, 3 (2013) 321.
- [143] W. Szaflarski, P. Sujka-Kordowska, R. Januchowski, K. Wojtowicz, M. Andrzejewska, M. Nowicki, M. Zabel, Nuclear localization of P-glycoprotein is responsible for protection of the nucleus from doxorubicin in the resistant LoVo cell line, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, (2013).
- [144] M.C. Willingham, N.D. Richert, M.M. Cornwell, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I.H. Pastan, Immunocytochemical Localization of P170 at the Plasma-Membrane of Multidrug-Resistant Human-Cells, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 35 (1987) 1451-1456.
- [145] A.R. Lowe, J.J. Siegel, P. Kalab, M. Siu, K. Weis, J.T. Liphardt, Selectivity mechanism of the nuclear pore complex characterized by single cargo tracking, *Nature*, 467 (2010) 600-603.
- [146] E. Munteanu, M. Verdier, F. Grandjean-Forestier, C. Stenger, C. Jayat-Vignoles, S. Huet, J. Robert, M.H. Ratinaud, Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells, *Biochemical pharmacology*, 71 (2006) 1162-1174.
- [147] M. Solazzo, O. Fantappie, N. Lasagna, C. Sassoli, D. Nosi, R. Mazzanti, P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines, *Experimental cell research*, 312 (2006) 4070-4078.
- [148] J.K. Paterson, M.M. Gottesman, P-Glycoprotein is not present in mitochondrial membranes, *Experimental cell research*, 313 (2007) 3100-3105.
- [149] D. Fu, K. Mitra, P. Sengupta, M. Jarnik, J. Lippincott-Schwartz, I.M. Arias, Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 7288-7293.
- [150] G. Arancia, A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, M. Cianfriglia, Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells, *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 106 (2001) 59-68.
- [151] A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, P. Crateri, L. Toccaceli, M. Marra, M. Colone, M. Cianfriglia, G. Arancia, Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells, *Current protein & peptide science*, 3 (2002) 653-670.
- [152] A.K. Larsen, A.E. Escargueil, A. Skladanowski, Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents, *Pharmacology & therapeutics*, 85 (2000) 217-229.
- [153] T.D. Duensing, D.L. Slate, Intracellular expression of P-glycoprotein in a human colon tumor cell line, *Anticancer research*, 14 (1994) 13-19.
- [154] C. Muller, G. Laurent, V. Ling, P-Glycoprotein Stability Is Affected by Serum Deprivation and High Cell-Density in Multidrug-Resistant Cells, *Journal of cellular physiology*, 163 (1995) 538-544.

- [155] T.W. Loo, D.M. Clarke, Prolonged Association of Temperature-Sensitive Mutants of Human P-Glycoprotein with Calnexin during Biogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994) 28683-28689.
- [156] T.W. Loo, D.M. Clarke, Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (1997) 709-712.
- [157] U.A. Germann, M.C. Willingham, I. Pastan, M.M. Gottesman, Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus, *Biochemistry*, 29 (1990) 2295-2303.
- [158] B. Sarkadi, E.M. Price, R.C. Boucher, U.A. Germann, G.A. Scarborough, Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase, *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) 4854-4858.
- [159] V. Ling, N. Kartner, T. Sudo, L. Siminovitch, J.R. Riordan, Multidrug-resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells, *Cancer treatment reports*, 67 (1983) 869-874.
- [160] A.H. Schinkel, S. Kemp, M. Dolle, G. Rudenko, E. Wagenaar, N-Glycosylation and Deletion Mutants of the Human Mdr1 P-Glycoprotein, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (1993) 7474-7481.
- [161] S. High, F.J.L. Lecomte, S.J. Russell, B.M. Abell, J.D. Oliver, Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones?, *FEBS letters*, 476 (2000) 38-41.
- [162] A. Zapun, S.M. Petrescu, P.M. Rudd, R.A. Dwek, D.Y. Thomas, J.J.M. Bergeron, Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin, *Cell*, 88 (1997) 29-38.
- [163] Z.G. Zhang, J.Y. Wu, W.N. Hait, J.M. Yang, Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination, *Molecular pharmacology*, 66 (2004) 395-403.
- [164] W.J. Wang, Q.Q. Li, J.D. Xu, X.X. Cao, H.X. Li, F. Tang, Q. Chen, J.M. Yang, Z.D. Xu, X.P. Liu, Interaction between CD147 and P-glycoprotein and their regulation by ubiquitination in breast cancer cells, *Chemotherapy*, 54 (2008) 291-301.
- [165] P.S. Rao, K.B. Mallya, K.S. Srivenugopal, K.C. Balaji, U.S. Rao, RNF2 interacts with the linker region of the human P-glycoprotein, *Int J Oncol*, 29 (2006) 1413-1419.
- [166] T.W. Loo, D.M. Clarke, Quality control by proteases in the endoplasmic reticulum - Removal of a protease-sensitive site enhances expression of human P-glycoprotein, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 32373-32376.
- [167] Y.Q. Xie, M. Burcu, D.E. Linn, Y. Qiu, M.R. Baer, Pim-1 Kinase Protects P-Glycoprotein from Degradation and Enables Its Glycosylation and Cell Surface Expression, *Molecular pharmacology*, 78 (2010) 310-318.
- [168] U.A. Germann, T.C. Chambers, S.V. Ambudkar, T. Licht, C.O. Cardarelli, I. Pastan, M.M. Gottesman, Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 1708-1716.
- [169] A. Nawa, W. Fujita-Hamabe, S. Tokuyama, Involvement of ubiquitination in the decrease of intestinal P-glycoprotein in a streptozotocin-induced diabetic mouse model, *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 27 (2012) 548-552.
- [170] Y.R. Pokharel, N.D. Kim, H.K. Han, W.K. Oh, K.W. Kang, Increased ubiquitination of multidrug resistance 1 by ginsenoside Rd, *Nutrition and cancer*, 62 (2010) 252-259.
- [171] B.K. Yoo, D. Chen, Z.Z. Su, R. Gredler, J. Yoo, K. Shah, P.B. Fisher, D. Sarkar, Molecular mechanism of chemoresistance by astrocyte elevated gene-1, *Cancer research*, 70 (2010) 3249-3258.
- [172] K. Katayama, K. Noguchi, Y. Sugimoto, FBXO15 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin--proteasome pathway in cancer cells, *Cancer science*, 104 (2013) 694-702.
- [173] K. Ohkawa, T. Asakura, K. Takada, T. Sawai, Y. Hashizume, Y. Okawa, N. Yanaihara, Calpain inhibitor causes accumulation of ubiquitinated P-glycoprotein at the cell surface: possible role of calpain in P-glycoprotein turnover, *Int J Oncol*, 15 (1999) 677-686.
- [174] C. Raiborg, H. Stenmark, The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins, *Nature*, 458 (2009) 445-452.
- [175] A. d'Azzo, A. Bongiovanni, T. Nastasi, E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation, *Traffic*, 6 (2005) 429-441.
- [176] I. Roxrud, C. Raiborg, G.D. Gilfillan, P. Stromme, H. Stenmark, Dual degradation mechanisms ensure disposal of NHE6 mutant protein associated with neurological disease, *Experimental cell research*, 315 (2009) 3014-3027.

- [177] L.D. Frye, M. Edidin, The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons, *Journal of cell science*, 7 (1970) 319-335.
- [178] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175 (1972) 720-731.
- [179] F. Wunderlich, W. Kreutz, P. Mahler, A. Ronai, G. Heppeler, Thermotropic fluid goes to ordered "discontinuous" phase separation in microsomal lipids of *Tetrahymena*. An X-ray diffraction study, *Biochemistry*, 17 (1978) 2005-2010.
- [180] S.W. Hui, D.F. Parsons, Direct observation of domains in wet lipid bilayers, *Science*, 190 (1975) 383-384.
- [181] T.A. Brasitus, A.R. Tall, D. Schachter, Thermotropic transitions in rat intestinal plasma membranes studied by differential scanning calorimetry and fluorescence polarization, *Biochemistry*, 19 (1980) 1256-1261.
- [182] A. Stier, E. Sackmann, Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes, *Biochimica et biophysica acta*, 311 (1973) 400-408.
- [183] S.W. de Laat, P.T. van der Saag, E.L. Elson, J. Schlessinger, Lateral diffusion of membrane lipids and proteins is increased specifically in neurites of differentiating neuroblastoma cells, *Biochimica et biophysica acta*, 558 (1979) 247-250.
- [184] D.E. Wolf, W. Kinsey, W. Lennarz, M. Edidin, Changes in the organization of the sea urchin egg plasma membrane upon fertilization: indications from the lateral diffusion rates of lipid-soluble fluorescent dyes, *Developmental biology*, 81 (1981) 133-138.
- [185] R.D. Klausner, D.E. Wolf, Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains, *Biochemistry*, 19 (1980) 6199-6203.
- [186] A.G. Lee, N.J. Birdsall, J.C. Metcalfe, P.A. Toon, G.B. Warren, Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes, *Biochemistry*, 13 (1974) 3699-3705.
- [187] F. Wunderlich, A. Ronai, V. Speth, J. Seelig, A. Blume, Thermotropic lipid clustering in *tetrahymena* membranes, *Biochemistry*, 14 (1975) 3730-3735.
- [188] M.J. Karnovsky, A.M. Kleinfeld, R.L. Hoover, R.D. Klausner, The concept of lipid domains in membranes, *The Journal of cell biology*, 94 (1982) 1-6.
- [189] D.A. Brown, J.K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, 68 (1992) 533-544.
- [190] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387 (1997) 569-572.
- [191] L. Shao, P. Kner, E.H. Rego, M.G. Gustafsson, Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination, *Nature methods*, 8 (2011) 1044-1046.
- [192] R. Schmidt, C.A. Wurm, S. Jakobs, J. Engelhardt, A. Egner, S.W. Hell, Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells, *Nature methods*, 5 (2008) 539-544.
- [193] B. Huang, S.A. Jones, B. Brandenburg, X. Zhuang, Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution, *Nature methods*, 5 (2008) 1047-1052.
- [194] M.F. Juette, T.J. Gould, M.D. Lessard, M.J. Mlodzianoski, B.S. Nagpure, B.T. Bennett, S.T. Hess, J. Bewersdorf, Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples, *Nature methods*, 5 (2008) 527-529.
- [195] S.T. Hess, T.J. Gould, M.V. Gudheti, S.A. Maas, K.D. Mills, J. Zimmerberg, Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (2007) 17370-17375.
- [196] B. Brugger, B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F.T. Wieland, H.G. Krausslich, The HIV lipidome: a raft with an unusual composition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 2641-2646.
- [197] D.M. Owen, A. Magenau, D. Williamson, K. Gaus, The lipid raft hypothesis revisited--new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 34 (2012) 739-747.
- [198] N. Shamitko-Klingensmith, K.M. Molchanoff, K.A. Burke, G.J. Magnone, J. Legleiter, Mapping the mechanical properties of cholesterol-containing supported lipid bilayers with nanoscale spatial resolution, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28 (2012) 13411-13422.
- [199] L.J. Pike, Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, *Journal of lipid research*, 47 (2006) 1597-1598.

- [200] L.J. Pike, Lipid rafts: heterogeneity on the high seas, *The Biochemical journal*, 378 (2004) 281-292.
- [201] A. Prinetti, V. Chigorno, G. Tettamanti, S. Sonnino, Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 11658-11665.
- [202] X. Xu, R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London, Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 33540-33546.
- [203] A.G. Ostermeyer, B.T. Beckrich, K.A. Ivarson, K.E. Grove, D.A. Brown, Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein, *The Journal of biological chemistry*, 274 (1999) 34459-34466.
- [204] J.M. Holopainen, M. Subramanian, P.K. Kinnunen, Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane, *Biochemistry*, 37 (1998) 17562-17570.
- [205] L.J. Pike, J.M. Miller, Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 22298-22304.
- [206] S. Bodin, S. Giuriato, J. Ragab, B.M. Humbel, C. Viala, C. Vieu, H. Chap, B. Payrastre, Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation, *Biochemistry*, 40 (2001) 15290-15299.
- [207] T. Furuchi, R.G. Anderson, Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK), *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 21099-21104.
- [208] S. Peiro, J.X. Comella, C. Enrich, D. Martin-Zanca, N. Rocamora, PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 37846-37852.
- [209] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J.F. Hancock, R.G. Parton, Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains, *Nature cell biology*, 1 (1999) 98-105.
- [210] H. Huo, X. Guo, S. Hong, M. Jiang, X. Liu, K. Liao, Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 11561-11569.
- [211] R.T. Watson, S. Shigematsu, S.H. Chiang, S. Mora, M. Kanzaki, I.G. Macara, A.R. Saltiel, J.E. Pessin, Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation, *The Journal of cell biology*, 154 (2001) 829-840.
- [212] L.J. Pike, X. Han, K.N. Chung, R.W. Gross, Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis, *Biochemistry*, 41 (2002) 2075-2088.
- [213] T. Cinek, V. Horejssi, The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases, *J Immunol*, 149 (1992) 2262-2270.
- [214] M. Sargiacomo, M. Sudol, Z. Tang, M.P. Lisanti, Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells, *The Journal of cell biology*, 122 (1993) 789-807.
- [215] P.E. Milhiet, M.C. Giocondi, O. Baghdadi, F. Ronzon, B. Roux, C. Le Grimellec, Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts, *EMBO reports*, 3 (2002) 485-490.
- [216] D.E. Saslowsky, J. Lawrence, X. Ren, D.A. Brown, R.M. Henderson, J.M. Edwardson, Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 26966-26970.

- [217] A.M. Shenoy-Scaria, L.K. Gauen, J. Kwong, A.S. Shaw, D.M. Lublin, Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, *Molecular and cellular biology*, 13 (1993) 6385-6392.
- [218] P.W. Shaul, E.J. Smart, L.J. Robinson, Z. German, I.S. Yuhanna, Y. Ying, R.G. Anderson, T. Michel, Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 6518-6522.
- [219] S. Moffett, D.A. Brown, M.E. Linder, Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 2191-2198.
- [220] K.A. Melkonian, A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, D.A. Brown, Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated, *The Journal of biological chemistry*, 274 (1999) 3910-3917.
- [221] D.A. Zacharias, J.D. Violin, A.C. Newton, R.Y. Tsien, Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science*, 296 (2002) 913-916.
- [222] K. Koziak, E. Kaczmarek, A. Kittel, J. Seigny, J.K. Blusztajn, J. Schulte Am Esch, 2nd, M. Imai, O. Guckelberger, C. Goepfert, I. Qawi, S.C. Robson, Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 2057-2062.
- [223] B.F. O'Dowd, M. Hnatowich, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, M. Bouvier, Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor, *The Journal of biological chemistry*, 264 (1989) 7564-7569.
- [224] G.Y. Ng, S.R. George, R.L. Zastawny, M. Caron, M. Bouvier, M. Dennis, B.F. O'Dowd, Human serotonin1B receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition, *Biochemistry*, 32 (1993) 11727-11733.
- [225] P. Scheiffele, M.G. Roth, K. Simons, Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain, *The EMBO journal*, 16 (1997) 5501-5508.
- [226] J. Lippincott-Schwartz, R.D. Phair, Lipids and cholesterol as regulators of traffic in the endomembrane system, *Annual review of biophysics*, 39 (2010) 559-578.
- [227] F.A. Nezil, M. Bloom, Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes, *Biophysical journal*, 61 (1992) 1176-1183.
- [228] S. Munro, An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention, *The EMBO journal*, 14 (1995) 4695-4704.
- [229] J. Couet, S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu, M.P. Lisanti, Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins, *The Journal of biological chemistry*, 272 (1997) 6525-6533.
- [230] A. Kimura, C.A. Baumann, S.H. Chiang, A.R. Saltiel, The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 9098-9103.
- [231] H. Li, V. Papadopoulos, Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern, *Endocrinology*, 139 (1998) 4991-4997.
- [232] N. Vincent, C. Genin, E. Malvoisin, Identification of a conserved domain of the HIV-1 transmembrane protein gp41 which interacts with cholesteryl groups, *Biochimica et biophysica acta*, 1567 (2002) 157-164.
- [233] R.M. Epanand, Proteins and cholesterol-rich domains, *Biochimica et biophysica acta*, 1778 (2008) 1576-1582.
- [234] R.R. Sprenger, D. Speijer, J.W. Back, C.G. De Koster, H. Pannekoek, A.J. Horrevoets, Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Electrophoresis*, 25 (2004) 156-172.
- [235] L. Bini, S. Pacini, S. Liberatori, S. Valensin, M. Pellegrini, R. Raggiaschi, V. Pallini, C.T. Baldari, Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering, *The Biochemical journal*, 369 (2003) 301-309.
- [236] D.L. MacLellan, H. Steen, R.M. Adam, M. Garlick, D. Zurakowski, S.P. Gygi, M.R. Freeman, K.R. Solomon, A quantitative proteomic analysis of growth factor-induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle cells, *Proteomics*, 5 (2005) 4733-4742.

- [237] L.J. Foster, C.L. De Hoog, M. Mann, Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 5813-5818.
- [238] N. Gupta, B. Wollscheid, J.D. Watts, B. Scheer, R. Aebersold, A.L. DeFranco, Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics, *Nature immunology*, 7 (2006) 625-633.
- [239] R.R. Kellner, C.J. Baier, K.I. Willig, S.W. Hell, F.J. Barrantes, Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy, *Neuroscience*, 144 (2007) 135-143.
- [240] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1 (2000) 31-39.
- [241] E.J. Smart, G.A. Graf, M.A. McNiven, W.C. Sessa, J.A. Engelman, P.E. Scherer, T. Okamoto, M.P. Lisanti, Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction, *Molecular and cellular biology*, 19 (1999) 7289-7304.
- [242] L.J. Pike, Lipid rafts: bringing order to chaos, *Journal of lipid research*, 44 (2003) 655-667.
- [243] I.R. Nabi, P.U. Le, Caveolae/raft-dependent endocytosis, *The Journal of cell biology*, 161 (2003) 673-677.
- [244] R.G. Parton, A.A. Richards, Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms, *Traffic*, 4 (2003) 724-738.
- [245] E. Ikonen, R.G. Parton, Caveolins and cellular cholesterol balance, *Traffic*, 1 (2000) 212-217.
- [246] K.S. George, S. Wu, Lipid raft: A floating island of death or survival, *Toxicology and applied pharmacology*, 259 (2012) 311-319.
- [247] V.L. Reeves, C.M. Thomas, E.J. Smart, Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins, *Advances in experimental medicine and biology*, 729 (2012) 3-13.
- [248] C. Boscher, I.R. Nabi, Caveolin-1: role in cell signaling, *Advances in experimental medicine and biology*, 729 (2012) 29-50.
- [249] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11 (2010) 688-699.
- [250] F.J. Sharom, X. Yu, J.W. Chu, C.A. Doige, Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells, *The Biochemical journal*, 308 (Pt 2) (1995) 381-390.
- [251] C.A. Doige, F.J. Sharom, Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells, *Protein expression and purification*, 2 (1991) 256-265.
- [252] C.A. Doige, X. Yu, F.J. Sharom, ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells, *Biochimica et biophysica acta*, 1109 (1992) 149-160.
- [253] C.A. Doige, X. Yu, F.J. Sharom, The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein, *Biochimica et biophysica acta*, 1146 (1993) 65-72.
- [254] T. Saeki, A.M. Shimabuku, K. Ueda, T. Komano, Specific drug binding by purified lipid-reconstituted P-glycoprotein: dependence on the lipid composition, *Biochimica et biophysica acta*, 1107 (1992) 105-110.
- [255] S.V. Ambudkar, I.H. Lelong, J. Zhang, C.O. Cardarelli, M.M. Gottesman, I. Pastan, Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992) 8472-8476.
- [256] D.M. Woodcock, M.E. Linsenmeyer, G. Chojnowski, A.B. Kriegler, V. Nink, L.K. Webster, W.H. Sawyer, Reversal of multidrug resistance by surfactants, *British journal of cancer*, 66 (1992) 62-68.
- [257] S. Drori, G.D. Eytan, Y.G. Assaraf, Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability, *European journal of biochemistry / FEBS*, 228 (1995) 1020-1029.
- [258] P.K. Dudeja, K.M. Anderson, J.S. Harris, L. Buckingham, J.S. Coon, Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity, *Archives of biochemistry and biophysics*, 319 (1995) 309-315.

- [259] J.S. Coon, W. Knudson, K. Clodfelter, B. Lu, R.S. Weinstein, Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance, *Cancer research*, 51 (1991) 897-902.
- [260] T. Zordan-Nudo, V. Ling, Z. Liu, E. Georges, Effects of nonionic detergents on P-glycoprotein drug binding and reversal of multidrug resistance, *Cancer research*, 53 (1993) 5994-6000.
- [261] S. Orłowski, M.A. Selosse, C. Boudon, C. Micoud, L.M. Mir, J. Belehradec, Jr., M. Garrigos, Effects of detergents on P-glycoprotein atpase activity: differences in perturbations of basal and verapamil-dependent activities, *Cancer biochemistry biophysics*, 16 (1998) 85-110.
- [262] R. Callaghan, G. Berridge, D.R. Ferry, C.F. Higgins, The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface, *Biochimica et biophysica acta*, 1328 (1997) 109-124.
- [263] R. Regev, Y.G. Assaraf, G.D. Eytan, Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells, *European journal of biochemistry / FEBS*, 259 (1999) 18-24.
- [264] F.A. Sinicropo, P.K. Dudeja, B.M. Bissonnette, A.R. Safa, T.A. Brasitus, Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles, *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) 24995-25002.
- [265] Y. Romsicki, F.J. Sharom, The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter, *Biochemistry*, 38 (1999) 6887-6896.
- [266] Y. Lavie, G. Fiucci, M. Liscovitch, Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 32380-32383.
- [267] Y. Lavie, G. Fiucci, M. Czarny, M. Liscovitch, Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells, *Lipids*, 34 Suppl (1999) S57-63.
- [268] M. Demeule, J. Jodoin, D. Gingras, R. Beliveau, P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries, *FEBS letters*, 466 (2000) 219-224.
- [269] J. Jodoin, M. Demeule, L. Fenart, R. Cecchelli, S. Farmer, K.J. Linton, C.F. Higgins, R. Beliveau, P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins, *Journal of neurochemistry*, 87 (2003) 1010-1023.
- [270] P.T. Ronaldson, M. Bendayan, D. Gingras, M. Piquette-Miller, R. Bendayan, Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures, *Journal of neurochemistry*, 89 (2004) 788-800.
- [271] J.W. Hinrichs, K. Klappe, I. Hummel, J.W. Kok, ATP-binding cassette transporters are enriched in non-caveolar detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains (DIGs) in human multidrug-resistant cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 5734-5738.
- [272] P. Reungpatthanaphong, C. Marbeuf-Gueye, L. Le Moyec, M. Salerno, A. Garnier-Suillerot, Decrease of P-glycoprotein activity in K562/ADR cells by MbetaCD and filipin and lack of effect induced by cholesterol oxidase indicate that this transporter is not located in rafts, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36 (2004) 533-543.
- [273] S. Meyer dos Santos, C.C. Weber, C. Franke, W.E. Muller, G.P. Eckert, Cholesterol: Coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity, *Biochemical and biophysical research communications*, 354 (2007) 216-221.
- [274] M.A. Ghetie, R. Marches, S. Kufert, E.S. Vitetta, An anti-CD19 antibody inhibits the interaction between P-glycoprotein (P-gp) and CD19, causes P-gp to translocate out of lipid rafts, and chemosensitizes a multidrug-resistant (MDR) lymphoma cell line, *Blood*, 104 (2004) 178-183.
- [275] G.D. Luker, C.M. Pica, A.S. Kumar, D.F. Covey, D. Piwnicka-Worms, Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains, *Biochemistry*, 39 (2000) 8692.
- [276] A. Garrigues, A.E. Escargueil, S. Orłowski, The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 10347-10352.
- [277] J. Troost, H. Lindenmaier, W.E. Haefeli, J. Weiss, Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells, *Molecular pharmacology*, 66 (2004) 1332-1339.
- [278] K. Yunomae, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells, *FEBS letters*, 536 (2003) 225-231.

- [279] H. Arima, K. Yunomae, T. Morikawa, F. Hirayama, K. Uekama, Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers, *Pharmaceutical research*, 21 (2004) 625-634.
- [280] P.D. Eckford, F.J. Sharom, Interaction of the P-glycoprotein multidrug efflux pump with cholesterol: effects on ATPase activity, drug binding and transport, *Biochemistry*, 47 (2008) 13686-13698.
- [281] F. Fenyvesi, E. Fenyvesi, L. Szente, K. Goda, Z. Bacso, I. Bacskay, J. Varadi, T. Kiss, E. Molnar, T. Janaky, G. Szabo, Jr., M. Vecsernyes, P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 34 (2008) 236-242.
- [282] Y. Kimura, A. Kodan, M. Matsuo, K. Ueda, Cholesterol fill-in model: mechanism for substrate recognition by ABC proteins, *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39 (2007) 447-452.
- [283] S.W. Kamau, S.D. Kramer, M. Gunthert, H. Wunderli-Allenspach, Effect of the modulation of the membrane lipid composition on the localization and function of P-glycoprotein in MDR1-MDCK cells, *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 41 (2005) 207-216.
- [284] I. Plo, G. Lehne, K.J. Beckstrom, N. Maestre, A. Bettaieb, G. Laurent, D. Lautier, Influence of ceramide metabolism on P-glycoprotein function in immature acute myeloid leukemia KG1a cells, *Molecular pharmacology*, 62 (2002) 304-312.
- [285] M.A. Ghetie, V. Ghetie, E.S. Vitetta, Anti-CD19 antibodies inhibit the function of the P-gp pump in multidrug-resistant B lymphoma cells, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5 (1999) 3920-3927.
- [286] P. Lu, R. Liu, F.J. Sharom, Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state, *European journal of biochemistry / FEBS*, 268 (2001) 1687-1697.
- [287] Y. Romsicki, F.J. Sharom, The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein--modulation by interaction with defined phospholipids, *European journal of biochemistry / FEBS*, 256 (1998) 170-178.
- [288] A.M. van der Blik, P.M. Kooiman, C. Schneider, P. Borst, Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein, *Gene*, 71 (1988) 401-411.
- [289] A.J. Smith, J.L. Timmermans-Hereijgers, B. Roelofsen, K.W. Wirtz, W.J. van Blitterswijk, J.J. Smit, A.H. Schinkel, P. Borst, The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice, *FEBS letters*, 354 (1994) 263-266.
- [290] S. Ruetz, P. Gros, Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene, *Cell*, 77 (1994) 1071-1081.
- [291] I. Bosch, K. Dunussi-Joannopoulos, R.L. Wu, S.T. Furlong, J. Croop, Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein, *Biochemistry*, 36 (1997) 5685-5694.
- [292] Y. Romsicki, F.J. Sharom, Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter, *Biochemistry*, 40 (2001) 6937-6947.
- [293] P.D. Eckford, F.J. Sharom, The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids, *The Biochemical journal*, 389 (2005) 517-526.
- [294] R.J. Raggars, I. Vogels, G. van Meer, Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor, *The Biochemical journal*, 357 (2001) 859-865.
- [295] S. Ernest, E. Bello-Reuss, Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 10 (1999) 2306-2313.
- [296] A. Pohl, H. Lage, P. Muller, T. Pomorski, A. Herrmann, Transport of phosphatidylserine via MDR1 (multidrug resistance 1)P-glycoprotein in a human gastric carcinoma cell line, *The Biochemical journal*, 365 (2002) 259-268.
- [297] N. Kalin, J. Fernandes, S. Hrafnisdottir, G. van Meer, Natural phosphatidylcholine is actively translocated across the plasma membrane to the surface of mammalian cells, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 33228-33236.

- [298] A.G. Abulrob, M. Gumbleton, Transport of phosphatidylcholine in MDR3-negative epithelial cell lines via drug-induced MDR1 P-glycoprotein, *Biochemical and biophysical research communications*, 262 (1999) 121-126.
- [299] J.J. Smit, A.H. Schinkel, R.P. Oude Elferink, A.K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, R. Ottenhoff, N.M. van der Lugt, M.A. van Roon, et al., Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease, *Cell*, 75 (1993) 451-462.
- [300] P. Lala, S. Ito, C.A. Lingwood, Retroviral transfection of Madin-Darby canine kidney cells with human MDR1 results in a major increase in globotriaosylceramide and 10(5)- to 10(6)-fold increased cell sensitivity to verocytotoxin. Role of p-glycoprotein in glycolipid synthesis, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 6246-6251.
- [301] R.J. Bleicher, M.C. Cabot, Glucosylceramide synthase and apoptosis, *Biochimica et biophysica acta*, 1585 (2002) 172-178.
- [302] D.J. Gruol, Q.D. Vo, M.C. Zee, Profound differences in the transport of steroids by two mouse P-glycoproteins, *Biochemical pharmacology*, 58 (1999) 1191-1199.
- [303] K.M. Barnes, B. Dickstein, G.B. Cutler, Jr., T. Fojo, S.E. Bates, Steroid treatment, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells, *Biochemistry*, 35 (1996) 4820-4827.
- [304] K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano, R. Hori, Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone, *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) 24248-24252.
- [305] E. Wang, C.N. Casciano, R.P. Clement, W.W. Johnson, Cholesterol interaction with the daunorubicin binding site of P-glycoprotein, *Biochemical and biophysical research communications*, 276 (2000) 909-916.
- [306] M. Liscovitch, Y. Lavie, Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways?, *Trends in biochemical sciences*, 25 (2000) 530-534.
- [307] L. Gayet, G. Dayan, S. Barakat, S. Labialle, M. Michaud, S. Cogne, A. Mazane, A.W. Coleman, D. Rigal, L.G. Baggetto, Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells, *Biochemistry*, 44 (2005) 4499-4509.
- [308] T. Pomorski, J.C. Holthuis, A. Herrmann, G. van Meer, Tracking down lipid flippases and their biological functions, *Journal of cell science*, 117 (2004) 805-813.
- [309] T.L. Steck, J. Ye, Y. Lange, Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin, *Biophysical journal*, 83 (2002) 2118-2125.
- [310] J.A. Hamilton, Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins, *Current opinion in lipidology*, 14 (2003) 263-271.
- [311] R. Leventis, J.R. Silvius, Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol, *Biophysical journal*, 81 (2001) 2257-2267.
- [312] A. Ramu, D. Glaubiger, I.T. Magrath, A. Joshi, Plasma membrane lipid structural order in doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells, *Cancer research*, 43 (1983) 5533-5537.
- [313] J.A. Siegfried, K.A. Kennedy, A.C. Sartorelli, T.R. Tritton, The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells, *The Journal of biological chemistry*, 258 (1983) 339-343.
- [314] A. Ramu, D. Glaubiger, H. Weintraub, Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells, *Cancer treatment reports*, 68 (1984) 637-641.
- [315] L.C. Wright, M. Dyne, K.T. Holmes, C.E. Mountford, Phospholipid and ether linked phospholipid content alter with cellular resistance to vinblastine, *Biochemical and biophysical research communications*, 133 (1985) 539-545.
- [316] G.L. May, L.C. Wright, M. Dyne, W.B. Mackinnon, R.M. Fox, C.E. Mountford, Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 42 (1988) 728-733.
- [317] P.V. Escriba, A.V. Ferrer-Montiel, J.A. Ferragut, J.M. Gonzalez-Ros, Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena, *Biochemistry*, 29 (1990) 7275-7282.

- [318] J. Pallares-Trujillo, C. Domenech, M.R. Grau-Oliete, M.P. Rivera-Fillat, Role of cell cholesterol in modulating vincristine uptake and resistance, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 55 (1993) 667-671.
- [319] M.M. Belanger, M. Gaudreau, E. Roussel, J. Couet, Role of caveolin-1 in etoposide resistance development in A549 lung cancer cells, *Cancer biology & therapy*, 3 (2004) 954-959.
- [320] G. Fiucci, M. Czarny, Y. Lavie, D. Zhao, B. Berse, J.K. Blusztajn, M. Liscovitch, Changes in phospholipase D isoform activity and expression in multidrug-resistant human cancer cells, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 85 (2000) 882-888.
- [321] C.P. Yang, F. Galbiati, D. Volonte, S.B. Horwitz, M.P. Lisanti, Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells, *FEBS letters*, 439 (1998) 368-372.
- [322] C.J. Fielding, A. Bist, P.E. Fielding, Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts, *Biochemistry*, 38 (1999) 2506-2513.
- [323] F. Schroeder, A.M. Gallegos, B.P. Atshaves, S.M. Storey, A.L. McIntosh, A.D. Petrescu, H. Huang, O. Starodub, H. Chao, H. Yang, A. Frolov, A.B. Kier, Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking, *Exp Biol Med (Maywood)*, 226 (2001) 873-890.
- [324] C.J. Fielding, P.E. Fielding, Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol, *Advanced drug delivery reviews*, 49 (2001) 251-264.
- [325] E.J. Smart, Y. Ying, W.C. Donzell, R.G. Anderson, A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 29427-29435.
- [326] Y. Lavie, H. Cao, S.L. Bursten, A.E. Giuliano, M.C. Cabot, Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 19530-19536.
- [327] A. Lucci, W.I. Cho, T.Y. Han, A.E. Giuliano, D.L. Morton, M.C. Cabot, Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers, *Anticancer research*, 18 (1998) 475-480.
- [328] A. Lucci, A.E. Giuliano, T.Y. Han, T. Dinur, Y.Y. Liu, A. Senchenkov, M.C. Cabot, Ceramide toxicity and metabolism differ in wild-type and multidrug-resistant cancer cells, *Int J Oncol*, 15 (1999) 535-540.
- [329] R.H. Peterson, M.B. Meyers, B.A. Spengler, J.L. Biedler, Alteration of plasma membrane glycopeptides and gangliosides of Chinese hamster cells accompanying development of resistance to daunorubicin and vincristine, *Cancer research*, 43 (1983) 222-228.
- [330] P. Vrignaud, D. Montaudon, D. Londos-Gagliardi, J. Robert, Fatty acid composition transport and metabolism in doxorubicin-sensitive and-resistant rat glioblastoma cells, *Cancer research*, 46 (1986) 3258-3261.
- [331] R. Callaghan, L.C. van Gorkom, R.M. Epand, A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi-drug resistance, *British journal of cancer*, 66 (1992) 781-786.
- [332] J.S. Yi, D.G. Mun, H. Lee, J.S. Park, J.W. Lee, J.S. Lee, S.J. Kim, B.R. Cho, S.W. Lee, Y.G. Ko, PTRF/cavin-1 is essential for multidrug resistance in cancer cells, *Journal of proteome research*, 12 (2013) 605-614.
- [333] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nature reviews. Drug discovery*, 3 (2004) 1023-1035.
- [334] K. Uekama, Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 52 (2004) 900-915.
- [335] T. Irie, K. Fukunaga, J. Pitha, Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro, *Journal of pharmaceutical sciences*, 81 (1992) 521-523.
- [336] Y. Ohtani, T. Irie, K. Uekama, K. Fukunaga, J. Pitha, Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes, *European journal of biochemistry / FEBS*, 186 (1989) 17-22.
- [337] H. Ohvo, J.P. Slotte, Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate, *Biochemistry*, 35 (1996) 8018-8024.
- [338] I. Sponne, A. Fifre, V. Koziel, T. Oster, J.L. Olivier, T. Pillot, Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18 (2004) 836-838.

- [339] S.L. Niu, D.C. Mitchell, B.J. Litman, Manipulation of cholesterol levels in rod disk membranes by methyl-beta-cyclodextrin: effects on receptor activation, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 20139-20145.
- [340] S. Grimmer, B. van Deurs, K. Sandvig, Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol, *Journal of cell science*, 115 (2002) 2953-2962.
- [341] U. Klein, G. Gimpl, F. Fahrenholz, Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor, *Biochemistry*, 34 (1995) 13784-13793.
- [342] A.E. Christian, M.P. Haynes, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content, *Journal of lipid research*, 38 (1997) 2264-2272.
- [343] I. Levitan, A.E. Christian, T.N. Tulenko, G.H. Rothblat, Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells, *The Journal of general physiology*, 115 (2000) 405-416.
- [344] V.G. Romanenko, Y. Fang, F. Byfield, A.J. Travis, C.A. Vandenberg, G.H. Rothblat, I. Levitan, Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels, *Biophysical journal*, 87 (2004) 3850-3861.
- [345] V.G. Romanenko, G.H. Rothblat, I. Levitan, Sensitivity of volume-regulated anion current to cholesterol structural analogues, *The Journal of general physiology*, 123 (2004) 77-87.
- [346] S.Y. Breusegem, N. Halaihel, M. Inoue, H. Zajicek, E. Lederer, N.P. Barry, V. Sorribas, M. Levi, Acute and chronic changes in cholesterol modulate Na-Pi cotransport activity in OK cells, *American journal of physiology. Renal physiology*, 289 (2005) F154-165.
- [347] M.C. Giocondi, P.E. Milhiet, P. Dosset, C. Le Grimellec, Use of cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation, *Biophysical journal*, 86 (2004) 861-869.
- [348] E.P. Kilsdonk, P.G. Yancey, G.W. Stoudt, F.W. Bangerter, W.J. Johnson, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins, *The Journal of biological chemistry*, 270 (1995) 17250-17256.
- [349] M. Fukasawa, M. Nishijima, H. Itabe, T. Takano, K. Hanada, Reduction of sphingomyelin level without accumulation of ceramide in Chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl-beta-cyclodextrin, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 34028-34034.
- [350] S.M. Liu, A. Cogny, M. Kockx, R.T. Dean, K. Gaus, W. Jessup, L. Kritharides, Cyclodextrins differentially mobilize free and esterified cholesterol from primary human foam cell macrophages, *Journal of lipid research*, 44 (2003) 1156-1166.
- [351] G.H. Hansen, L. Immerdal, E. Thorsen, L.L. Niels-Christiansen, B.T. Nystrom, E.J. Demant, E.M. Danielsen, Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 32338-32344.
- [352] E. Ottico, A. Prinetti, S. Prioni, C. Giannotta, L. Basso, V. Chigorno, S. Sonnino, Dynamics of membrane lipid domains in neuronal cells differentiated in culture, *Journal of lipid research*, 44 (2003) 2142-2151.
- [353] V. Monnaert, S. Tilloy, H. Bricout, L. Fenart, R. Cecchelli, E. Monflier, Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier, *J Pharmacol Exp Ther*, 310 (2004) 745-751.
- [354] S. Ilangumaran, D.C. Hoessli, Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane, *The Biochemical journal*, 335 (Pt 2) (1998) 433-440.
- [355] M.P. Williamson, M.F. Le Gal-Coeffet, K. Sorimachi, C.S. Furniss, D.B. Archer, G. Williamson, Function of conserved tryptophans in the *Aspergillus niger* glucoamylase 1 starch binding domain, *Biochemistry*, 36 (1997) 7535-7539.
- [356] A.K. Schmidt, S. Cottaz, H. Driguez, G.E. Schulz, Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product beta-cyclodextrin, *Biochemistry*, 37 (1998) 5909-5915.
- [357] J. Evenas, V. Tugarinov, N.R. Skrynnikov, N.K. Goto, R. Muhandiram, L.E. Kay, Ligand-induced structural changes to maltodextrin-binding protein as studied by solution NMR spectroscopy, *Journal of molecular biology*, 309 (2001) 961-974.

- [358] F.L. Aachmann, D.E. Otzen, K.L. Larsen, R. Wimmer, Structural background of cyclodextrin-protein interactions, *Protein engineering*, 16 (2003) 905-912.
- [359] C.A. Lopez, A.H. de Vries, S.J. Marrink, Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction, *PLoS computational biology*, 7 (2011) e1002020.
- [360] T. Irie, K. Uekama, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, *Journal of pharmaceutical sciences*, 86 (1997) 147-162.
- [361] E.D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes, *The Journal of cell biology*, 145 (1999) 877-887.
- [362] P.S. Kabouridis, J. Janzen, A.L. Magee, S.C. Ley, Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes, *European journal of immunology*, 30 (2000) 954-963.
- [363] S.A. Predescu, D.N. Predescu, K. Shimizu, I.K. Klein, A.B. Malik, Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 37130-37138.
- [364] A. Gidwani, D. Holowka, B. Baird, Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells, *Biochemistry*, 40 (2001) 12422-12429.
- [365] A. Pralle, P. Keller, E.L. Florin, K. Simons, J.K. Horber, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *The Journal of cell biology*, 148 (2000) 997-1008.
- [366] K. Gaus, M. Rodriguez, K.R. Ruberu, I. Gelissen, T.M. Sloane, L. Kritharides, W. Jessup, Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes, *Journal of lipid research*, 46 (2005) 1526-1538.
- [367] A.K. Rouquette-Jazdanian, C. Pelassy, J.P. Breittmayer, C. Aussel, Reevaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signaling, *Cellular signalling*, 18 (2006) 105-122.
- [368] K. Gaus, L. Kritharides, G. Schmitz, A. Boettcher, W. Drobnik, T. Langmann, C.M. Quinn, A. Death, R.T. Dean, W. Jessup, Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18 (2004) 574-576.
- [369] A. Larbi, N. Douziech, A. Khalil, G. Dupuis, S. Gherairi, K.P. Guerard, T. Fulop, Jr., Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging, *Experimental gerontology*, 39 (2004) 551-558.
- [370] Y. Lange, T.L. Steck, Cholesterol homeostasis and the escape tendency (activity) of plasma membrane cholesterol, *Progress in lipid research*, 47 (2008) 319-332.
- [371] P.F. Almeida, Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers, *Biochimica et biophysica acta*, 1788 (2009) 72-85.
- [372] H.M. McConnell, A. Radhakrishnan, Condensed complexes of cholesterol and phospholipids, *Biochimica et biophysica acta*, 1610 (2003) 159-173.
- [373] H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimaki, J.P. Slotte, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Progress in lipid research*, 41 (2002) 66-97.
- [374] E. Ikonen, Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 125-138.
- [375] B. Mesmin, F.R. Maxfield, Intracellular sterol dynamics, *Biochimica et biophysica acta*, 1791 (2009) 636-645.
- [376] S.L. Niu, B.J. Litman, Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition, *Biophysical journal*, 83 (2002) 3408-3415.
- [377] J.F. Hancock, Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7 (2006) 456-462.
- [378] A. Radhakrishnan, H.M. McConnell, Chemical activity of cholesterol in membranes, *Biochemistry*, 39 (2000) 8119-8124.
- [379] A. Radhakrishnan, H. McConnell, Condensed complexes in vesicles containing cholesterol and phospholipids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 12662-12666.

- [380] Y. Lange, J. Ye, T.L. Steck, How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 11664-11667.
- [381] K.W. Ahn, N.S. Sampson, Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure, *Biochemistry*, 43 (2004) 827-836.
- [382] M.P. Haynes, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, Efflux of cholesterol from different cellular pools, *Biochemistry*, 39 (2000) 4508-4517.
- [383] J.L. Goldstein, R.A. DeBose-Boyd, M.S. Brown, Protein sensors for membrane sterols, *Cell*, 124 (2006) 35-46.
- [384] N.A. Baumann, D.P. Sullivan, H. Ohvo-Rekila, C. Simonot, A. Pottekat, Z. Klaassen, C.T. Beh, A.K. Menon, Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration, *Biochemistry*, 44 (2005) 5816-5826.
- [385] L. Liscum, N.J. Munn, Intracellular cholesterol transport, *Biochimica et biophysica acta*, 1438 (1999) 19-37.
- [386] W.A. Prinz, Non-vesicular sterol transport in cells, *Progress in lipid research*, 46 (2007) 297-314.
- [387] K. Simons, E. Ikonen, How cells handle cholesterol, *Science*, 290 (2000) 1721-1726.
- [388] R.E. Soccio, J.L. Breslow, Intracellular cholesterol transport, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24 (2004) 1150-1160.
- [389] S. Heino, S. Lusa, P. Somerharju, C. Ehnholm, V.M. Olkkonen, E. Ikonen, Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 8375-8380.
- [390] P. Keller, K. Simons, Post-Golgi biosynthetic trafficking, *Journal of cell science*, 110 (Pt 24) (1997) 3001-3009.
- [391] G. D'Angelo, L.R. Rega, M.A. De Matteis, Connecting vesicular transport with lipid synthesis: FAPP2, *Biochimica et biophysica acta*, 1821 (2012) 1089-1095.
- [392] S. Raychaudhuri, Y.J. Im, J.H. Hurley, W.A. Prinz, Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides, *The Journal of cell biology*, 173 (2006) 107-119.
- [393] F.R. Maxfield, A.K. Menon, Intracellular sterol transport and distribution, *Current opinion in cell biology*, 18 (2006) 379-385.
- [394] S. Gatt, E.L. Bierman, Sphingomyelin suppresses the binding and utilization of low density lipoproteins by skin fibroblasts, *The Journal of biological chemistry*, 255 (1980) 3371-3376.
- [395] Y. Lange, T.L. Steck, Quantitation of the pool of cholesterol associated with acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human fibroblasts, *The Journal of biological chemistry*, 272 (1997) 13103-13108.
- [396] V. Puri, J.R. Jefferson, R.D. Singh, C.L. Wheatley, D.L. Marks, R.E. Pagano, Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 20961-20970.
- [397] J.P. Slotte, E.L. Bierman, Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts, *The Biochemical journal*, 250 (1988) 653-658.
- [398] N.D. Ridgway, Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin, *Biochimica et biophysica acta*, 1484 (2000) 129-141.
- [399] D.K. Breslow, J.S. Weissman, Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis, *Molecular cell*, 40 (2010) 267-279.
- [400] G.D. Luker, K.R. Nilsson, D.F. Covey, D. Piwnicka-Worms, Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol, *The Journal of biological chemistry*, 274 (1999) 6979-6991.
- [401] M. Issandou, T. Grand-Perret, Multidrug resistance P-glycoprotein is not involved in cholesterol esterification, *Biochemical and biophysical research communications*, 279 (2000) 369-377.
- [402] T.G. Tessner, W.F. Stenson, Overexpression of MDR1 in an intestinal cell line results in increased cholesterol uptake from micelles, *Biochemical and biophysical research communications*, 267 (2000) 565-571.

- [403] C. Riganti, B. Castella, J. Kopecka, I. Campia, M. Coscia, G. Pescarmona, A. Bosia, D. Ghigo, M. Massaia, Zoledronic acid restores doxorubicin chemosensitivity and immunogenic cell death in multidrug-resistant human cancer cells, *PloS one*, 8 (2013) e60975.
- [404] J. Kopecka, I. Campia, P. Olivero, G. Pescarmona, D. Ghigo, A. Bosia, C. Riganti, A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 149 (2011) 196-205.
- [405] G. Gelsomino, P.A. Corsetto, I. Campia, G. Montorfano, J. Kopecka, B. Castella, E. Gazzano, D. Ghigo, A.M. Rizzo, C. Riganti, Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition, *Molecular cancer*, 12 (2013) 137.
- [406] K. Miyake, P.L. McNeil, Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption, *The Journal of cell biology*, 131 (1995) 1737-1745.
- [407] G.Q. Bi, J.M. Alderton, R.A. Steinhardt, Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing, *The Journal of cell biology*, 131 (1995) 1747-1758.
- [408] A. Reddy, E.V. Caler, N.W. Andrews, Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes, *Cell*, 106 (2001) 157-169.
- [409] D. Roy, D.R. Liston, V.J. Idone, A. Di, D.J. Nelson, C. Pujol, J.B. Bliska, S. Chakrabarti, N.W. Andrews, A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury, *Science*, 304 (2004) 1515-1518.
- [410] C.L. Forestier, C. Machu, C. Lousert, P. Pescher, G.F. Spath, Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process, *Cell host & microbe*, 9 (2011) 319-330.
- [411] C. Tam, V. Idone, C. Devlin, M.C. Fernandes, A. Flannery, X. He, E. Schuchman, I. Tabas, N.W. Andrews, Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair, *The Journal of cell biology*, 189 (2010) 1027-1038.
- [412] N.W. Andrews, Regulated secretion of conventional lysosomes, *Trends in cell biology*, 10 (2000) 316-321.
- [413] P.L. McNeil, S.S. Vogel, K. Miyake, M. Terasaki, Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane, *Journal of cell science*, 113 (Pt 11) (2000) 1891-1902.
- [414] V. Idone, C. Tam, J.W. Goss, D. Toomre, M. Pypaert, N.W. Andrews, Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis, *The Journal of cell biology*, 180 (2008) 905-914.
- [415] V. Lariccia, M. Fine, S. Magi, M.J. Lin, A. Yaradanakul, M.C. Llaguno, D.W. Hilgemann, Massive calcium-activated endocytosis without involvement of classical endocytic proteins, *The Journal of general physiology*, 137 (2011) 111-132.
- [416] X. Zha, L.M. Pierini, P.L. Leopold, P.J. Skiba, I. Tabas, F.R. Maxfield, Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis, *The Journal of cell biology*, 140 (1998) 39-47.
- [417] N.W. Andrews, P.E. Almeida, M. Corrotte, Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair, *Trends in cell biology*, 24 (2014) 734-742.
- [418] J.M. Holopainen, M.I. Angelova, P.K. Kinnunen, Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes, *Biophysical journal*, 78 (2000) 830-838.
- [419] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, M. Simons, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science*, 319 (2008) 1244-1247.
- [420] E. Gulbins, Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide, *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 47 (2003) 393-399.
- [421] W.J. van Blitterswijk, A.H. van der Luit, R.J. Veldman, M. Verheij, J. Borst, Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics?, *The Biochemical journal*, 369 (2003) 199-211.
- [422] H. Grassme, V. Jendrossek, J. Bock, A. Riehle, E. Gulbins, Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering, *J Immunol*, 168 (2002) 298-307.
- [423] M. Cianfriglia, C. Cenciarelli, S. Barca, M. Tombesi, M. Flego, M.L. Dupuis, Monoclonal antibodies as a tool for structure-function studies of the MDR1-P-glycoprotein, *Current protein & peptide science*, 3 (2002) 513-530.
- [424] T. Shi, J. Wrin, J. Reeder, D. Liu, D.B. Ring, High-affinity monoclonal antibodies against P-glycoprotein, *Clinical immunology and immunopathology*, 76 (1995) 44-51.

- [425] R.J. Arceci, K. Stieglitz, J. Bras, A. Schinkel, F. Baas, J. Croop, Monoclonal antibody to an external epitope of the human mdrl P-glycoprotein, *Cancer research*, 53 (1993) 310-317.
- [426] E. Georges, T. Tsuruo, V. Ling, Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody, *The Journal of biological chemistry*, 268 (1993) 1792-1798.
- [427] E.B. Mechetner, I.B. Roninson, Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992) 5824-5828.
- [428] A.H. Schinkel, R.J. Arceci, J.J. Smit, E. Wagenaar, F. Baas, M. Dolle, T. Tsuruo, E.B. Mechetner, I.B. Roninson, P. Borst, Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 55 (1993) 478-484.
- [429] Y. Zhou, M.M. Gottesman, I. Pastan, The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2, *Archives of biochemistry and biophysics*, 367 (1999) 74-80.
- [430] E.B. Mechetner, B. Schott, B.S. Morse, W.D. Stein, T. Druley, K.A. Davis, T. Tsuruo, I.B. Roninson, P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 12908-12913.
- [431] H. Nagy, K. Goda, R. Arceci, M. Cianfriglia, E. Mechetner, G. Szabo, Jr., P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition, *European journal of biochemistry / FEBS*, 268 (2001) 2416-2420.
- [432] I. Gombos, Z. Bacso, C. Detre, H. Nagy, K. Goda, M. Andrasfalvy, G. Szabo, J. Matko, Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 61 (2004) 117-126.
- [433] V.B. Kandimalla, N.S. Neeta, N.G. Karanth, M.S. Thakur, K.R. Roshini, B.E. Rani, A. Pasha, Regeneration of ethyl parathion antibodies for repeated use in immunosensor: a study on dissociation of antigens from antibodies, *Biosensors & bioelectronics*, 20 (2004) 903-906.
- [434] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature protocols*, 3 (2008) 1125-1131.
- [435] E.G. Rodriguez, R. Lefebvre, D. Bodnar, C. Legrand, P. Szentesi, J. Vincze, K. Poulard, J. Bertrand-Michel, L. Csernoch, A. Buj-Bello, V. Jacquemond, Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca(2)(+) release in skeletal muscle, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 466 (2014) 973-985.
- [436] J.V. Small, Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks, *The Journal of cell biology*, 91 (1981) 695-705.
- [437] M.H. Symons, T.J. Mitchison, Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts, *The Journal of cell biology*, 114 (1991) 503-513.
- [438] L. Cramer, T.J. Mitchison, Moving and stationary actin filaments are involved in spreading of postmitotic PtK2 cells, *The Journal of cell biology*, 122 (1993) 833-843.
- [439] K. Ujfalusi-Pozsonyi, G. Hild, P. Grof, Z. Gutay-Toth, Z. Bacso, M. Nyitrai, The effects of detergents on the polymerization properties of actin, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77 (2010) 447-456.
- [440] A.H. Criddle, M.A. Geeves, T. Jeffries, The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin, *The Biochemical journal*, 232 (1985) 343-349.
- [441] H. Heerklotz, Interactions of surfactants with lipid membranes, *Quarterly reviews of biophysics*, 41 (2008) 205-264.
- [442] A.V. Filatov, I.B. Shmigol, G.V. Sharonov, A.V. Feofanov, Y. Volkov, Direct and indirect antibody-induced TX-100 resistance of cell surface antigens, *Immunology letters*, 85 (2003) 287-295.
- [443] A.V. Filatov, I.B. Shmigol, Kuzin, II, G.V. Sharonov, A.V. Feofanov, Resistance of cellular membrane antigens to solubilization with Triton X-100 as a marker of their association with lipid rafts--analysis by flow cytometry, *Journal of immunological methods*, 278 (2003) 211-219.

- [444] Z. Wolf, E. Orso, T. Werner, A. Boettcher, G. Schmitz, A flow cytometric screening test for detergent-resistant surface antigens in monocytes, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69 (2006) 192-195.
- [445] Z. Wolf, E. Orso, T. Werner, H.H. Klunemann, G. Schmitz, Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71 (2007) 486-494.
- [446] T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bacskay, J. Varadi, E. Fenyvesi, R. Ivanyi, L. Szente, A. Tosaki, M. Vecsernyes, Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40 (2010) 376-380.
- [447] H. Arima, K. Yunomae, F. Hirayama, K. Uekama, Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297 (2001) 547-555.
- [448] A. Tsamaloukas, H. Szadkowska, H. Heerklotz, Thermodynamic comparison of the interactions of cholesterol with unsaturated phospholipid and sphingomyelins, *Biophysical journal*, 90 (2006) 4479-4487.
- [449] C. Kahle, U. Holzgrabe, Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration, *Chirality*, 16 (2004) 509-515.
- [450] C. Hegedus, A. Telbisz, T. Hegedus, B. Sarkadi, C. Ozvegy-Laczka, Lipid regulation of the ABCB1 and ABCG2 multidrug transporters, *Advances in cancer research*, 125 (2015) 97-137.
- [451] K. Goda, F. Fenyvesi, Z. Bacso, H. Nagy, T. Marian, A. Megyeri, Z. Krasznai, I. Juhasz, M. Vecsernyes, G. Szabo, 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 (2007) 81-88.
- [452] G. Szaloki, Z.T. Krasznai, A. Toth, L. Vizkeleti, A.G. Szollosi, G. Trencsenyi, I. Lajtos, I. Juhasz, Z. Krasznai, T. Marian, M. Balazs, G. Szabo, K. Goda, 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 (2014) e107875.
- [453] Y. Feng, S. Yu, T.K. Lasell, A.P. Jadhav, E. Macia, P. Chardin, P. Melancon, M. Roth, T. Mitchison, T. Kirchhausen, Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 6469-6474.
- [454] M. Ying, S. Grimmer, T.G. Iversen, B. Van Deurs, K. Sandvig, Cholesterol loading induces a block in the exit of VSVG from the TGN, *Traffic*, 4 (2003) 772-784.
- [455] J. Klucken, C. Buchler, E. Orso, W.E. Kaminski, M. Porsch-Ozcurumez, G. Liebisch, M. Kapinsky, W. Diederich, W. Drobnik, M. Dean, R. Allikmets, G. Schmitz, ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 817-822.
- [456] J.P. Luzio, P.R. Pryor, N.A. Bright, Lysosomes: fusion and function, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8 (2007) 622-632.
- [457] F.W. Chen, C. Li, Y.A. Ioannou, Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis, *PloS one*, 5 (2010) e15054.
- [458] K.A. Toops, A. Lakkaraju, Let's play a game of chutes and ladders: Lysosome fusion with the epithelial plasma membrane, *Communicative & integrative biology*, 6 (2013) e24474.
- [459] N. Fehrenbacher, M. Jaattela, Lysosomes as targets for cancer therapy, *Cancer research*, 65 (2005) 2993-2995.
- [460] M. Sehested, T. Skovsgaard, B. van Deurs, H. Winther-Nielsen, Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil, *British journal of cancer*, 56 (1987) 747-751.
- [461] R. Martinez-Zaguilan, N. Raghunand, R.M. Lynch, W. Bellamy, G.M. Martinez, B. Rojas, D. Smith, W.S. Dalton, R.J. Gillies, pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines, *Biochemical pharmacology*, 57 (1999) 1037-1046.
- [462] L. Warren, J.C. Jardillier, P. Ordentlich, Secretion of lysosomal enzymes by drug-sensitive and multiple drug-resistant cells, *Cancer research*, 51 (1991) 1996-2001.

- [463] L. Warren, A. Malarska, J.C. Jardillier, The structure of P-glycoprotein and the secretion of lysosomal enzymes in multidrug-resistant cells, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 35 (1995) 267-269.
- [464] A. Rodriguez, P. Webster, J. Ortego, N.W. Andrews, Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells, *The Journal of cell biology*, 137 (1997) 93-104.
- [465] G. Bach, Mucolipin 1: endocytosis and cation channel--a review, *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 451 (2005) 313-317.
- [466] G.A. Colletti, K. Kiselyov, Trpm1, *Advances in experimental medicine and biology*, 704 (2011) 209-219.
- [467] X.P. Dong, X. Wang, D. Shen, S. Chen, M. Liu, Y. Wang, E. Mills, X. Cheng, M. Delling, H. Xu, Activating mutations of the TRPML1 channel revealed by proline-scanning mutagenesis, *The Journal of biological chemistry*, 284 (2009) 32040-32052.
- [468] M. Samie, X. Wang, X. Zhang, A. Goschka, X. Li, X. Cheng, E. Gregg, M. Azar, Y. Zhuo, A.G. Garrity, Q. Gao, S. Slangenaupt, J. Pickel, S.N. Zolov, L.S. Weisman, G.M. Lenk, S. Titus, M. Bryant-Geneviev, N. Southall, M. Juan, M. Ferrer, H. Xu, A TRP channel in the lysosome regulates large particle phagocytosis via focal exocytosis, *Developmental cell*, 26 (2013) 511-524.
- [469] D. Shen, X. Wang, X. Li, X. Zhang, Z. Yao, S. Dibble, X.P. Dong, T. Yu, A.P. Lieberman, H.D. Showalter, H. Xu, Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release, *Nature communications*, 3 (2012) 731.
- [470] J.M. Zdzolsek, G.M. Olsson, U.T. Brunk, Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange, *Photochemistry and photobiology*, 51 (1990) 67-76.
- [471] K. Kagedal, M. Zhao, I. Svensson, U.T. Brunk, Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases, *The Biochemical journal*, 359 (2001) 335-343.
- [472] Y. Xin, F. Yin, S. Qi, L. Shen, Y. Xu, L. Luo, L. Lan, Z. Yin, Parthenolide reverses doxorubicin resistance in human lung carcinoma A549 cells by attenuating NF-kappaB activation and HSP70 up-regulation, *Toxicology letters*, 221 (2013) 73-82.
- [473] T. Kirkegaard, A.G. Roth, N.H. Petersen, A.K. Mahalka, O.D. Olsen, I. Moilanen, A. Zylicz, J. Knudsen, K. Sandhoff, C. Arenz, P.K. Kinnunen, J. Nylandsted, M. Jaattela, Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology, *Nature*, 463 (2010) 549-553.
- [474] F. Fouchier, J.L. Mego, J. Dang, C. Simon, Thyroid lysosomes: the stability of the lysosomal membrane, *European journal of cell biology*, 30 (1983) 272-278.
- [475] H. Appelqvist, L. Sandin, K. Bjornstrom, P. Saftig, B. Garner, K. Ollinger, K. Kagedal, Sensitivity to lysosome-dependent cell death is directly regulated by lysosomal cholesterol content, *PloS one*, 7 (2012) e50262.
- [476] S. Aits, M. Jaattela, Lysosomal cell death at a glance, *Journal of cell science*, 126 (2013) 1905-1912.
- [477] L.E. Broker, C. Huisman, S.W. Span, J.A. Rodriguez, F.A. Kruyt, G. Giaccone, Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells, *Cancer research*, 64 (2004) 27-30.
- [478] L. Groth-Pedersen, M.S. Ostenfeld, M. Hoyer-Hansen, J. Nylandsted, M. Jaattela, Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine, *Cancer research*, 67 (2007) 2217-2225.
- [479] L. Groth-Pedersen, S. Aits, E. Corcelle-Termeau, N.H. Petersen, J. Nylandsted, M. Jaattela, Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells, *PloS one*, 7 (2012) e45381.
- [480] Y. Lange, J. Ye, T.L. Steck, Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 18915-18922.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

Jelölt: Gutay-Tóth Zsuzsanna
Neptun kód: H5EJ0Q
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gutay-Tóth, Z.**, Fenyvesi, F., Bársony, O., Szente, L., Goda, K., Szabó, G., Bacsó, Z.:
Cholesterol-dependent conformational changes of P-glycoprotein are detected by the 15D3 monoclonal antibody.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 1861 (3), 188-195, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.007>
IF: 4.779 (2015)
2. Újfalusi-Pozsonyi, K., Hild, G., Gróf, P., **Gutay-Tóth, Z.**, Bacsó, Z., Nyitrai, M.: The effects of detergents on the polymerization properties of actin.
Cytometry A. 77 (5), 447-456, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20855>
IF: 3.749





További közlemények

3. Bársony, O., Szalóki, G., Türk, D., Tarapcsák, S., **Gutay-Tóth, Z.**, Bacsó, Z., Holb, I., Székvölgyi, L., Szabó, G., Csanády, L., Szakács, G., Goda, K.: A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein.
Sci. Rep. 6 (24810), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24810>
IF: 5.228 (2015)
4. Fenyvesi, F., Réti-Nagy, K., Bacsó, Z., **Gutay-Tóth, Z.**, Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis.
PLoS One. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF: 3.234

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,99

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

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

Debrecen, 2016.08.15.



9. TÁRGYSZAVAK

Multidrog rezisztencia, P-glikoprotein, trafficking, koleszterin, ciklodextrin, lizoszómális exocitózis, membrán repair

Multidrug resistance, P-glycoprotein, trafficking, cholesterol, cyclodextrin, lysosomal exocytosis, membrane repair

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Bacsó Zsoltnak a munkám során nyújtott szakmai segítségét, türelmét és megértését.

Köszönöm Dr. Szabó Gábor professzor Úrnak, hogy a munkacsoportjához tartozhattam és dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Goda Katalinnak a gondolkodós perceket, amikből jó ötletek születtek.

Köszönöm Dr. Szöllősi János professzor Úr segítségét. Nélküle ez a dolgozat nem készült volna el.

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

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet valamennyi dolgozójának a segítségét, legyen az szakmai vagy emberi. Soha nem felejttem el, hogy amikor szükségem volt rá, valaki mindig ott volt, hogy a kezembe nyomjon akárcsak egy doboz pipettahegyet!

Köszönet az együtt töltött évekért Váradi Tímeának, Nagyné Szabó Ágnesnek, Bartók Ádámnak, Bársony Orsolyának, Szöőr Árpádnak, Dilip Shresthának.

Köszönöm Quang-Minh Doan-Xuan-nak, To-nak a Ph.D. szobánkban együtt töltött, sokszor éjszakába nyúló munkát. Nagy szükségem volt erre az ázsiai munkamorálra!

Köszönöm a Gyógyszertechnológia Intézet valamennyi dolgozójának, hogy gyógyszerészként náluk mindig magamra találtam!

Köszönöm a családom segítségét, türelmét!

Külön köszönöm húgomnak, Katinak a támogatását, aki mindig mellettem van, hogy megnyugtasson és hitet adjon!

És külön köszönöm férjemnek, Tibinek, hogy mellettem volt ezekben az években. Akkor is amikor úgy tűnt, hogy nem is igazán van felesége!