

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A P-glikoprotein transzport funkciójának gátlása konformációs állapotának és
topológiai viszonyainak modulációjával

FENYVESI FERENC



Témavezető:

Dr. Szabó Gábor

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2008

1. Bevezetés

A lipidmembránokon keresztül megvalósuló anyagtranszport alapvetően fontos az élő szervezet sejtjeinek megfelelő működéséhez. A transzportfehérjék legnagyobb családja az ABC (ATP Binding Cassette) szupercsalád, melynek számos tagja megtalálható prokariótákban és eukariótákban. Közös jellemzőjük a jellegzetes nukleotidkötő domén, melyről a család tagjait elnevezték, s amely által megkötött ATP hidrolíziséből származó energiát használják fel működésükhöz. A mai napig 48 humán ABC gént azonosítottak, melyek mutációi állnak számos genetikai rendellenesség hátterében (pl. cisztikus fibrózis: CFTR gén, intrahepatikus kolesztázis: ABCB4 gén, szitoszterolémia: ABCG5 és ABCG8 gének).

A Pgp az egyik legtöbbet tanulmányozott ABC transzporter. Transzmembrán fehérje, amely szerkezetükben és méretükben jelentősen eltérő (200 Da-tól akár 1900 Da-ig), főként hidrofób vagy amfifil karakterű molekulákat transzportál koncentrációgradienssel szemben az extracelluláris térbe. Számos szubsztrátjának szerkezetében megtalálható egy vagy több aromás gyűrű, leghatékonyabban a semleges, vagy gyengén bázikus tulajdonságú anyagokat pumpálja. A fenti kritériumoknak sok gyógyszermolekula is megfelel, köztük a daganatok kezelésére használt kemoterápiás szerek jelentős hányada. A rákos sejtekben gyakran magas szinten kifejeződő Pgp molekulák a sejten belüli hatóanyag koncentrációját olyan szintre csökkentik, ami megvédi a sejtet a citotoxikus hatástól. Ez a mechanizmus a klinikumban a terápia várt hatásának elmaradását, vagy a kezdetben hatásos kezelés eredményességének gyors csökkenését, majd hatástalanságát okozza. A daganatos betegségek kemoterápiás kezelésének egyik súlyos problémája a citosztatikumok széles spektrumával szemben fellépő rezisztencia, az ún. multidrog rezisztencia (MDR). Az MDR kialakulásában fontos szerepet játszik a P-glikoprotein (Pgp) expressziója – több más ABC transzporterrel együtt.

A mai álláspont szerint a Pgp működési módja valószínűleg nem hasonlítható a klasszikus membránpumpákéhoz, melyek az intracelluláris térből szállítják szubsztrátjukat a sejten kívülre. A Pgp a sejtmembránban feldúsult lipofil szubsztrátjait „hidrofób porszívóként” elsősorban valószínűleg a lipid kettősrétegből gyűjti össze. Egy másik elképzelés szerint a Pgp flippázként működve szubsztrátjait a sejtmembrán belső lemezéből a külső lemezébe átfordítva egyenlőtlen eloszlást idéz elő a lipid kettősrétegen belül. Innen a molekula az extracelluláris térbe diffundál.

A Pgp megtalálható az egészséges szervezetben is, de fiziológiás szerepe nem teljesen tisztázott. Endogén szubsztrátját nem ismerjük (egyes adatok szerint ilyen a koleszterin, ill. bizonyos rövid szénláncú lipidek transzportjában is részt vehet). A Pgp a szervezetben többek között az agyi kapillárisok endotél sejtjein, a bél lument bélelő epitél sejteken, valamint a májban is megtalálható. A vér-agy gát egyik fontos eleme, megakadályozza a xenobiotikumok agyba történő bejutását. A bélhámban gátolja a hatóanyagmolekulák intesztinális felszívódását, csökkentve biohasznosíthatóságukat. Az az általános benyomás, hogy a Pgp – egyéb ABC transzporterekkel együtt – a szervezet különböző fiziológiás barrierjeit erősíti azáltal, hogy aktívan részt vesz a szervek xenobiotikumokkal szembeni védelmében.

A Pgp működése során ATP-t hidrolizál. Megkülönböztethető egy szubsztrátok nélkül is mérhető bazális, valamint szubsztrát indukálta ATP-áz aktivitás. Az ATP-áz működésének vanadáttal történő gátlása a pumpát egy nagyenergiájú tranzíciós állapotában csapdázza. A Pgp egyik NBD-jének vanadát kötése elegendő a teljes ATP-áz aktivitás blokkolásához, ami arra enged következtetni, hogy a két NBD nem tud egymástól függetlenül működni.

A Pgp működésének egyik nagy kérdése, hogy az NBD-ken lejátszódó ATP hidrolízis hogyan hajtja a szubsztrát transzportot. A kérdés megválaszolására számos modell létezik. Egyetértés abban van, hogy a Pgp egy katalitikus ciklus során ATP-t használ, a katalitikus ciklus során a fehérje a szubsztráttranszporttal összefüggő konformációváltozást szenved és a membránkörnyezet befolyásolja a pumpa működését.

A Pgp katalitikus ciklusa alatt lejátszódó konformáció-változások az UIC2 mAt segítségével is detektálhatók. Az antitest kötődésének mértéke megnő a Pgp szubsztrátjainak transzportja vagy ATP-deplécio hatására („UIC2-shift” jelenség). Az antitest kötődése képes gátolni a pumpa funkcióját és növelni a Pgp szubsztrátok citotoxicitását intracelluláris akkumulációjuk növelésén keresztül, de ez a gátlás eddig részleges és variábilis volt. A UIC2 antitest további érdekes tulajdonsága, hogy a szubsztrátokkal/modulátorokkal nem kezelt sejtek sejtfelszíni Pgp molekuláinak csak egy részéhez kötődik, míg szubsztrátok, revertáló ágensek jelenlétében az antitest kötődés mértéke megnő. Ez a sejtfelszíni Pgp molekulák kétféleségére utal, mely magyarázatra szorul.

Az MDR kutatások kezdeti szakaszában megfigyelték, hogy ugyanazon sejtvonal rezisztens (Pgp^+) és szenzitív (Pgp^-) sejtjei membránjának lipidösszetétele különböző. Általában a rezisztens sejtek membránja trigliceridekben, szfingolipidekben és koleszterinben dúsabb. A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy az MDR fenotípus kialakításában a membrán lipidösszetételének megváltozása is szerepet játszhat.

A detergens-rezisztens membrán doméneiben, raftokban a sejtfelszíni Pgp molekulák 10-40%-a lokalizálódik. A rezisztens sejtek megváltozott membrán lipidösszetétele a raftok fokozott megjelenésével is magyarázható. A lipidek a pumpa működését is befolyásolják. A Pgp ATPáz aktivitását a membrán foszfolipid és koleszterintartalma is befolyásolja. Egyes elképzelések szerint a koleszterol közvetlenül befolyásolja a szubsztrátok iránti affinitást is.

Az MDR jelenség kutatásának fő gyakorlati célja a klinikumban is hatékonyan használható revertálószeres és terápiás protokollok kifejlesztése. A számos ígéretes lehetőség ellenére nem rendelkezünk a gyógyászatban hatékonyan és megbízhatóan használható gátlószerekkel. Nagy szükség van olyan módszerekre, melyekkel a hatékony és biztonságos revertáló ágensek kiszűrhetők és hatásuk *in vivo* is vizsgálható.

Munkám közvetlen előzményét az alábbi, munkacsoportunkban kifejlesztett módszerek és az általuk eredményezett megfigyelések jelentették.

Az UIC2 antitest kötődése modulátorok távollétében egy másik anti-Pgp antitest (MM12.10, MM6.15, MRK16) kötődését csak kis mértékben befolyásolja, a sejtfelszíni fehérjék átfedő epitópjaival még jelentős mennyiségű másik Pgp-specifikus antitest tud kölcsönhatást kialakítani. Modulátorok (pl. CSA) jelenlétében a másik antitest kötődése nagymértékben lecsökken, vagy teljesen elmarad. A jelenség különlegességét az adja, hogy egyes gátlószeres (pl. CSA, vinblasztin) mellett felkötődött UIC2 után minimális a másik antitest kötődése, míg más modulátorok, (pl. verapamil) nem idéznek elő jelentős hatást. Bár a jelenség az UIC2-shift következménye, mégsem jelenti csupán az UIC2 által el nem foglalt Pgp molekulák visszatitrálását egy másik antitesttel, ugyanis a módszer képes éles különbséget tenni a kétfajta („CSA-szerű” és „verapamil-szerű”) gátlószer között, míg az UIC2-shift nem. A teszt érzékeny az ATP depléció hatására kialakuló konformációváltozásra is és lehetővé teszi markáns hatású Pgp modulátor-jelölt molekulák szűrését (*antitest kompetíciós teszt, AKT*).

A sejtfelszíni Pgp molekulák raft-asszociációja detergenssek segítségével vizsgálható. A Triton X-100 (TX-100) egy gyenge, nem-ionos detergens, amely 0 °C-on a koleszterinben és szfingolipidekben gazdag detergens-rezisztens mikrodomének kivételével oldja a membránt. Ennek következtében azok a fehérjék, melyek nem raftokban helyezkednek el, és általuk vagy közvetlenül a sejtvázhoz sem horgonyzódnak, a TX-100 kezelés hatására eluálódnak a membránból, elkülönülnek a sejtmaradványoktól. A raft-asszociált fehérjék nagy része a citoszkeletonon keresztül a sejthez rögzített állapotban marad. Antitesttel jelölt membránfehérjék kioldása áramlási citometriával vizsgálható és a raft- és citoszkeleton-

asszociáció mértéke meghatározható. A raftok egyik fő komponense, a koleszterin ciklodextrinekkal való kivonása a raft-doméneket a membránban dezintegrálja, a ciklodextrin-kezelést követően a Triton-elúció nyomán csak a közvetlenül citoszkeletonhoz kötött sejtfelszíni molekulák maradnak a sejtmaradványhoz kötve.

A sejtfelszíni Pgp-k UIC2 által elérhető hányada („pool I”) és egy másik anti-Pgp antitest (pl. MRK16) által jelölhető pumpa molekulák („pool II”) nem kolokalizálódnak a konfokális mikroszkóp feloldásában: a pool I kisebb patch-ekben koncentrálódik, a pool II molekulák inkább diszpergálva találhatók a sejtfelszínen.

Nyitott kérdések

Az UIC2-shift és a sejtfelszíni Pgp molekulák topológiai heterogenitása számos kérdést vet fel. A mai napig nem teljesen tisztázott az oka annak, hogy a kezeletlen sejtek membránjában a Pgp molekuláknak csak egy része ismerhető fel az UIC2 antitest által, míg a molekulák nagyobb része csak szubsztrátok jelenlétében válik hozzáférhetővé. Ennek a kérdésnek a fontosságát és érdekességét jól demonstrálja a jelenség egyik lehetséges interpretációja: nem kizárt, hogy azon Pgp-k, amelyeket felismer az antitest, endogén szubsztrátokat transzportálhatnak. Nem teljesen érthető a katalitikus ciklusban bekövetkező konformáció változások és a topológiai heterogenitás összefüggése sem: az UIC2 kötődés nyomán az összes Pgp-nek a katalitikus tranzíciós állapotban kellene „kikötnie” – nem tapasztalnánk a telítésben is észlelhető heterogenitást. Nem ismert az sem, hogy a Pgp és membránkörnyezete milyen – kétirányú – összefüggésben, kölcsönhatásokban áll egymással. A heterogenitással kapcsolatos kérdések egy része tehát nem lezárt. Az alábbiakban azokat a kérdéseket sorolom, melyeket munkám során sikerült megválaszolni, és melyek révén a fentiekben vázolt alapvető problémák megoldásához is közelebb kerültünk.

a., A szubsztrátok kétfélesége (l. AKT-jelenség) korábban csak néhány szubsztrát/modulátor viselkedése alapján szerzett impresszió volt, szerettük volna tudni, hogy vajon a szubsztrátok, modulátorok szélesebb körében is kimutatható-e ez a dichotómia, és hogy valamilyen molekuláris sajátossággal összefügg-e? Ezen kérdések megválaszolása a pumpaműködést hatékonyan gátló modulátorok fejlesztésében nyújthat segítséget.

b., Korábban csak részleges információk voltak arról, hogy a modulátorok jelenlétében tapasztalt UIC2 kötődés-többség mennyiben a kötőhely-szám növekedésének eredménye és mennyiben a disszociációs konstans változásáé. Ez nem pusztán elméleti fontosságú kérdés,

hiszen az egyébként részleges pumpa-gátlás teljessé ill. tartóssá válhat, amennyiben az antitesttel lefedett Pgp-k aránya növelhető.

c., Az előbbiekkal összefüggésben, az UIC2-gátlás jelensége ellentmondásos volt: nem mindig és csak extrém antitest koncentrációk esetén tapasztaltak gátlást, mely részleges volt és mértéke variábilis. Az UIC2-kötődés teljessé tétele – reprodukálható módon – a gátlás terápiás felhasználásának perspektíváját vetítette előre.

d., Nem volt olyan kísérleti rendszer, melyben az UIC2-gátlás *in vivo* megfelelően tanulmányozható lett volna.

Fenti kérdések megválaszolásához az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

2. Célkitűzések

1. A szubsztrátok/modulátorok AKT-tesztben mutatott dichotóm viselkedésének tesztelése nagyobb számú ágens esetében.
2. Az UIC2 transzportfunkciót gátló hatásának vizsgálata AKT+ és AKT- szubsztrátok jelenlétében, *in vitro*.
3. Az UIC2 monoklonális antitest kötőhelyei számának és kötéseerősségének vizsgálata.
4. Az „UIC2 gátlás” tesztelése *in vivo* tumor xenograftokban.
5. A topológiai heterogenitás összefüggése a sejtmembrán lipid domén szerkezetével: ciklodextrinek hatásának vizsgálata
6. A Pgp pumpafunkció gátlása a membrán lipid domén szerkezetének modulációjával: ciklodextrinek hatásának vizsgálata

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtenyésztés

Vizsgálataink során az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak *mdr1* génnel transzfektált változatát (NIH 3T3 MDR1 G185), valamint az A2780 (Pgp⁻) és A2780^{AD} (Pgp⁺) humán ovárium karcinóma sejtvonalat használtuk. A Pgp-t kifejező sejtvonalakat 670 nM doxorubicint (NIH 3T3 MDR1) vagy 2 μ M doxorubicint (A2780^{AD}) tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn és felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő oldatba helyeztük át. Sejtvonalaink mindegyike a felülethez tapadva növekedett, így a kísérleteinkhez tripszines kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót.

3.2. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

A sejtmembrán koleszterin tartalmának csökkentése érdekében a sejtszuspenziót heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrinnel (DIMEB), vagy random-metilezett- β -ciklodextrinnel (RAMEB), a koleszterin tartalom növeléséhez koleszterinnel képzett komplexeikkel, Kol-DIMEB-bel, vagy Kol-RAMEB-bel kezeltük 37 °C-on 20 percen keresztül. A kezelést követően a sejtszuspenziót kétszer mostuk, majd elvégeztük a megfelelő vizsgálatot.

3.3. Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése monoklonális antitesttel

Az MM6.15 és MM12.10 monoklonális antitesteket M. Cianfriglia (Istituto Superiore di Sanita, Róma) bocsátotta rendelkezésünkre. Az UIC2 és a 15D3 (ATCC#: HB-11342) antitesteket hibridóma sejtek felülúszójából, protein A affinitás-kromatográfia alkalmazásával magunk izoláltuk.

Áramlási citometriás kísérleteinkhez az antitesteket különböző fluoreszkáló festékekkel konjugáltuk pl. fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) vagy Alexa 488-cal (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Az antitesthez nem kötődött festék molekulákat Sephadex-G25 oszlopon gél-szűrési technikával távolítottuk el. A festék-fehérje arányt spektrofotométerben abszorbancia alapján határoztuk meg, melynek optimális értéke körülbelül 3:1 volt.

UIC2 kötődés vizsgálatakor a sejteket 10 percig 37 °C-on előinkubáltuk 10 µM ciklosporin A-val (CSA), vagy CSA nélkül, majd további 30 percen keresztül UIC2 antitesttel (10 µg/ml). Indirekt immunfluoreszcenciás detektálás esetén a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd FITC-, vagy Alexa 647 konjugált egér ellenes nyúl IgG antitesttel (RAMIG) (100 µg/ml) jelöltük 40 percen keresztül jégen. Újabb kétszeri mosást követően a minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerben mértük. UIC2 telítési görbék felvételénél hasonlóképpen jártunk el különböző UIC2 antitest koncentrációkat alkalmazva (0 µg/ml- 75 µg/ml tartományban).

AKT teszt (Antitest Kompetíciós Teszt) esetén 1×10^6 db sejt/ml koncentrációjú sejtuszpenziót 10 percen keresztül szubsztráttal/modulátorral illetve anélkül 37 °C-on előkezeltük. A kezelések során a következő vegyületeket (Sigma) a zárójelben megadott koncentrációkban használtuk: kolhicin (100 µM), etopozid (200 µM), galangin (50 µM), hoechst 33342 (50 µM), ketokonazol (50 µM), nonidet P-40 (6×10^{-4} V/V%), oligomycin (5 µM), progeszteron (10 µM), propranolol (500 µM), quercetin (200 µM), rapamycin (20 µM), reszerpin (40 µM), tween 20 ($1,4 \times 10^{-3}$ V/V %), ciklosporin A (10 µM). Ezután a sejteket telítő koncentrációban először festékkel nem konjugált UIC2 antitesttel (10 µg/ml) inkubáltuk 30 percen keresztül, majd festékkel konjugált MM12.10, MM6.15 (8 µg/ml), vagy 15D3 (15 µg/ml), antitesttel jelöltük további 30 percig 37 °C-on. Ezt követően a sejteket kétszer megmostuk és a $488/540 \pm 10$ nm fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerben mértük. Az antitest kompetíciót (AKT) a következőképpen számoltuk: az UIC2 nélkül mért, sejtfelszíni Pgpk-hez kapcsolódó MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitás értékéből (F_1) kivontuk az UIC2 jelenlétében kötődött MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitás értékét (F_2), majd elosztottuk az UIC2 távollétében mért MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitásával (F_1). [AKT érték = $(F_1 - F_2) / F_1$].

3.4. Detergens elúciós eljárás

3×10^5 db NIH 3T3 MDR1 sejtet Alexa 488-cal konjugált 15D3 antitesttel (15 µg/ml) jelöltünk 30 percen keresztül 37 °C-on. A sejteket 8 mM-os glükózos PBS-sel 2-szer megmostuk, majd 5 mM koncentrációban DIMEB-bel és Kol-DIMEB-bel kezeltük 20 percen keresztül 37 °C-on. A mintákat 2-szer újra mostuk, majd áramlási citométerben a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitást azonnal lemértük. Mérést követően a mintákhoz TX-100 oldatot elegyítettünk 0,5 % végkoncentrációban, majd a mintákat 30 percen keresztül jégen tartottuk. Ezt követően a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitást újra megmértük és a Pgp molekulák raft-

asszociációjának mértékét százalékban fejeztük ki: a TX-100 kezelés után mért fluoreszcencia intenzitást elosztottuk a TX-100 kezelést megelőző intenzitással, majd a kapott értéket megszoroztuk 100-zal.

3.5. A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése

A488-15D3 mAt-val jelölt NIH 3T3 MDR1 sejteket 5 mM RAMEB-bel vagy Kol-RAMEB-bel 20 percen keresztül kezeltünk, majd a sejtfelszínen maradt antitesteket savas kémhatású puffer segítségével mostuk le (0,5 M NaCl, 0,1 M glicin, pH=2,5). A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerben mértük. A savas mosásra rezisztens fluoreszcencia hányadot használtuk az internalizált receptor-antitest komplexek százalékos arányának kifejezésére.

3.6. Fluoreszcens festék akkumuláció meghatározása

A 3T3 MDR1 sejteket Pgp szubsztrátokkal és modulátorokkal 10 percen keresztül 37 °C-on előkezeltük (10 µM CSA, 10 µM valinomycin, 75 µM vinblasztin, 8 µM SDZ PSC 833, 75 µM verapamil, 20 µM kinin, 125 µM nifedipin), majd UIC2 antitesttel további 30 percen keresztül inkubáltuk. A mintákat két részre osztottuk, egyik részüket 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel 1-szer, majd PBS-sel 2-szer megmostuk. A minták másik részét nem mostuk. Ezt követően a sejteket 0,25 µM calcein-AM-mel 8 mM-os glükózos PBS-ben 20 percen keresztül, 37 °C-on festettük. Az inkubálás után a sejteket kétszer mostuk glükózos PBS-sel, majd a festődés mértékét áramlási citométerben mértük. Az elpusztult sejteket 2 µg/ml propídium-jodid (PI) segítségével különítettük el.

Ciklodextrinnel történt kezelés után a sejteket szintén a fenti körülmények között festettük calcein-AM-mel.

A festék akkumuláció értékét relatív calcein akkumulációként fejeztük ki: a minták fluoreszcencia intenzitását a háttér levonása után a kezeletlen kontroll fluoreszcencia intenzitására normáltuk.

3.7. A sejtmembrán festése merocianin 540-nel

3×10^5 db ciklodextrin kezelt sejtet 100 μ l PBS-ben reszuspendáltunk. Az MC540 törzsoldatot (1 mg/ml 50 %-os etanolban oldva) a kísérletet megelőzően desztillált vízzel 0,5 mg/ml koncentrációra hígítottuk, majd 2 μ l-t a sejtsuszpenzióhoz mértünk. A sejteket 10 percig szobahőmérsékleten festettük, majd a mintákat 0,5 ml-re hígítottuk PBS-sel és áramlási citométerben a $488/540 \pm 10$ nm fluoreszcencia intenzitást PI jelenlétében azonnal mértük. Az értékeket relatív MC540 festődésként fejeztük ki: a minták fluoreszcencia intenzitását osztottuk a kezeletlen kontroll intenzitás értékével a háttér levonása után.

3.8. Áramlási citometria

Kísérleteink során a minták fluoreszcencia intenzitását Becton Dickinson FACScan vagy FACSCalibur áramlási citométerrel mértük. Kiértékeléshez BDIS CellQuest vagy WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>; Joseph Trotter) szoftvert használtunk.

3.9. Intracelluláris ATP tartalom meghatározása

A sejtmembrán koleszterin tartalmának ciklodextrinnel történő modulációját követően az egyes mintákból egyenlő mennyiségeket lefagyasztottunk és az ATP tartalom meghatározásáig folyékony nitrogénben tároltuk. A minták ATP tartalmát a Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit (Sigma) segítségével NovoStar mikroplate leolvasóban (BMG Labtech, Offenburg, Germany), lumineszcencia üzemmódban mértük meg.

Az életképes sejtek ATP tartalmának kiszámításához a minták egy másik, 100 mM EDTA-t tartalmazó lefagyasztott részletéből először meghatároztuk a teljes sejtszámot. A sejteket kiolvasztást követően 1 μ g/ml koncentrációban DAPI-val festettük 15 percen keresztül szobahőmérsékleten, majd fekete, 96 lyukú lemezen FLUOstar OPTIMA mikroplate leolvasó (BMG Labtech, Offenburg, Germany) segítségével megmértük a fluoreszcencia intenzitását. Ismert számú sejttel felvett kalibrációs görbe alapján a mintákban lévő teljes sejtszámot meghatároztuk. A teljes sejtszámot megszorozva az áramlási citometriás mérésben mért PI negatív sejtek arányával megkaptuk a mintában lévő életképes sejtek számát. A mért ATP értékeket elosztva az élő sejtek számával megkaptuk egy életképes sejt ATP tartalmát.

ATP deplécio kialakításához a sejteket 60 μ M verapamillal kezeltük glükóz mentes PBS-ben 60 percen keresztül, 37 $^{\circ}$ C-on.

3.10. Életképességi vizsgálatok

3.10.1. Életképesség vizsgálata áramlási citometriás mérések során

Az áramlási citometriás mérések megkezdése előtt a mintákat 2 µg/ml koncentrációban PI-dal festettük, ezáltal az elpusztult (PI-pozitív) sejtek a mérés során jól elkülöníthetőkké váltak. Arányukat százalékosan fejeztük ki.

3.10.2. MTT-teszt

96 lyukú tenyésztőlemezen 1×10^4 db sejtet helyeztünk el lyukanként. 24 óra múlva különböző daunorubicin koncentrációjú tenyésztőoldatot adtunk a sejtekhez. A kezelést úgy is elvégeztük, hogy daunorubicin mellett SDZ PSC 833 (Novartis, Basel, Svájc) és/vagy UIC2 antitestet is tartalmazott a tápoldat. A sejteket 72 órán keresztül 37 °C-on tenyésztettük, majd 0,5 mg/ml koncentrációjú 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) oldatra cseréltük a tápoldatot és további 4 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A keletkezett formazán kristályokat sósavas izopropanol (izopropanol:sósav = 25:1) oldattal oldottuk fel és az oldatok abszorbanciáját 570 nm-en mikroplate leolvasóval (NovoStar, BMG Labtech, Offenburg, Germany) mértük. Az eredményeket a kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a daunorubicin koncentráció függvényében ábráztuk.

3.11. Sejtek koleszterin tartalmának meghatározása

DIMEB-bel és Kol-DIMEB-bel kezelt NIH 3T3 MDR sejtek koleszterin tartalmát koleszterin-oxidáz módszerrel, HPLC méréssel határozták meg kollaborációs partnereink (Prof. Janáky Tamás, Szeged).

3.12. Tumor xenograftok transzplantációja SCID egerekbe

4×10^6 db NIH 3T3 és NIH 3T3 MDR1 sejtet 300 µl színtelen, szérummentes DMEM oldatban B-17 SCID egerek jobb illetve bal combjának bőre alá injektáltunk. Az egerekben 10-12 nap elteltével tapintható tumorok fejlődtek ki. Az állatokat ekkor i.p. 10 mg/kg ciklosporin A-val (CSA, Sandimmun, Novartis) vagy i.v. 5 mg/kg UIC2 antitesttel kezeltük.

Egyes egerek CSA és UIC2 kezelést is kaptak. 4 óra múlva i.v. 5 mg/kg daunorubicint injektáltunk az állatokba. További 4 órát követően az egereket megöltük, a tumorokat kimetszettük és azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. További felhasználásig a szövetmintákat folyékony nitrogénben tároltuk.

3.13. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek

Az állatkísérletek során gyűjtött tumormintákból fagyasztott állapotban 6 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeken a daunorubicin akkumulációt, UIC2 kötődést és a szöveti morfológiát LSM 510 (Zeiss, Jena, Germany) típusú konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A tumorok daunorubicin akkumulációjának meghatározásához a -20 °C-on tárolt metszetekről a kiolvasztást követően azonnal felvételeket készítettünk.

Az *in vivo* UIC2 kötődés vizsgálatához a metszeteket 10% kecske szérummal blokkoltuk 20 percig, majd 5 µg/ml koncentrációjú GAMIG-Alexa 488-cal jelöltük 1 órán keresztül (a jelölő puffer a GAMIG- Alexa 488 mellett 2% kecske szérumot is tartalmazott). Ezt követően kétszer 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben, majd kétszer PBS-ben mostuk a metszeteket és azonnal mikroszkópban vizsgáltuk.

Argon-ion lézer 488 nm-es hullámhosszúságú gerjesztő fényét használtuk a konfokális mikroszkópiás kísérletekben. Az Alexa 488 festék esetén 505-550 nm hullámhosszúságú sávszűrővel, daunorubicin esetén >580 nm-es „long-pass” szűrővel detektáltuk a fluoreszcenciát. A különböző metszetekről készült felvételeket az összehasonlíthatóság érdekében mindig azonos beállítási paraméterek mellett készítettük.

A szöveti morfológia megjelenítéséhez hematoxilin-eozin festést alkalmaztunk.

3.14. Képlakotó citometriás kísérletek

A mikroszkópos vizsgálatokhoz előállított metszeteket képlakotó citométerrel (iCys, CompuCyte, Cambridge, MA) megvizsgálva kvantitatív módon tudtuk kiértékelni a teljes metszet daunorubicin akkumulációját és az UIC2 kötődését. A metszetek lézer letapogatására gerjesztő fényként argon-ion lézer 488 nm hullámhosszúságú fényét használtuk és az emittált fluoreszcenciát 20X-os objektíven keresztül 530 ± 15 nm hullámhosszú sávszűrő segítségével detektáltuk. A mintákban a teljes metszet körvonalának előzetes gyors azonosítására először egy kis felbontású szövet pásztázást végeztünk el, majd a kvantitatív méréshez az azonosított szövethatárokon belül egy nagy felbontású pásztázás történt. Az így kapott képek

képpontjainak intenzitását az u.n. „phantom contouring” eljárás segítségével mértük az iCys 2.6-os szoftver segítségével. A szoftver az eljárás során a mérendő felületet véletlenszerűen, sejt méretű egymást át nem fedő körökkel („phantom contours”) fedi le, majd a körökön belül a képpontok integrált fluoreszcenciáját meghatározza.

A tumor minták daunorubicin akkumulációját összehasonlító hisztogramokon a „phantom countour” körök integrál fluoreszcencia intenzitásának eloszlását ábrázoltuk, míg a topografikus képeken a körök intenzitásának a kontúr térképét készítettük el színekódolást alkalmazva Sigma Plot 8.0 program segítségével

3.15. Statisztikai analízis

Az adatokat a SigmaStat szoftver (3.1. verzió; SPSS Inc.) segítségével értékeltük ki. Két csoport összehasonlításánál kétmintás t próbát, míg három vagy több csoport összehasonlítása esetén varianciaanalízist végeztünk. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Az UIC2 mAt kötőhelyek számát ($B_{\max}$) és a disszociációs állandókat (K_d) SigmaStat (3.1. verzió; SPSS Inc.) programmal, Scatchard-analízissel, egy ligand kötőhelyet feltételezve határoztuk meg. A különböző kezelések hatására UIC2 mAt-tel elérhető kötőhelyek mennyiségét a maximálisan telíthető mennyiséghez viszonyítva, százalékosan kifejezve adtuk meg.

4. Eredmények

4.1. A szubsztrátok/modulátorok AKT-tesztben mutatott dichotóm viselkedésének tesztelése nagyobb számú ágens esetén.

Az AKT-teszt alapján egyedülálló módon megkülönböztethető a Pgp szubsztrátok/modulátorok között egy CSA-szerű, AKT-pozitív és egy verapamil-szerű, AKT-negatív csoport. Munkánk során a korábban jellemzett kisszámú vegyületen kívül számos további ismert vagy potenciális Pgp modulátort teszteltünk, azt eldöntendő, hogy a szubsztrátok/modulátorok „kétfélesége” mennyire általános jelenség. A már azonosított CSA-szerű, AKT-pozitív gátlószerek csoportja a rapamycinnel bővült. A verapamil-szerű

gátlószerekhez újonnan sorolható a progeszteron, galangin, propranolol, kvercetin, reszerpin, Tween-20, ketokonazol és NP-40. Ugyancsak gyenge antitest kompetíciót és emellett gyenge Pgp funkciógátlást mutatott a kolhicin, ologomycin, etopozid és a Hoechst 33342 molekulák csoportja. Az AKT-hatás szempontjából a dichotómia nagyobb számú vegyületen is szembeötlő volt, a pumpagátló hatással összevetve pedig három osztályba voltak csoportosíthatók az ágensek: kis koncentrációban is erős gátló hatású szerek, csak nagyobb koncentrációban hatásos anyagok és pumpafunkciót nem befolyásoló vegyületek.

4.2. Az UIC2 transzportfunkciót gátló hatásának vizsgálata AKT+ és AKT-szubsztrátok jelenlétében, *in vitro*.

4.2.1. A pumpafunkció gátlásának meghatározása szubsztrát akkumuláció mérésével

Az UIC2 mAt kötődése képes gátolni a pumpa funkcióját és fokozza a Pgp szubsztrátok citotoxicitását intracelluláris akkumulációjuk növelésén keresztül, míg azonos kísérleti körülmények között más Pgp ellenes antitest erre nem képes. Korábban tisztázatlan okokból azonban az UIC2-gátlás mértéke variábilis és nem mindig reprodukálható volt.

Az AKT tesztben mutatott kétféle viselkedésük alapján feltételezhető volt, hogy CSA-szerű ágensek mellett az UIC2 mAt a Pgp-hez annak más konformációs állapotában kötődik,- és/vagy több sejtfelszíni pumpa molekulához - mint pl. verapamillal és az egyéb AKT⁻ vegyületekkel történő kezelés során, ezért várhatóan pl. a CSA vagy a verapamil jelenlétében felkötődött UIC2 a pumpa-gátlásban is különbözőképpen viselkedik. A hipotézis vizsgálatához a sejtfelszíni Pgp-khez AKT-pozitív és AKT-negatív szerek mellett kötöttük fel az UIC2 mAt-et, majd BSA tartalmú oldattal mosva a sejteket a modulátorokat eltávolítottuk és a pumpa működését calcein akkumulációján keresztül követtük nyomon. Az UIC2 mAt jelentősen növelte a festék akkumulációt NIH 3T3 MDR1 sejtekben CSA, vinblasztin, SDZ PSC 833, és valinomycin jelenlétében. Ez a hatás a modulátorok 1% BSA oldattal történő kimosását követően is megmaradt. Az AKT-pozitív szerek a valinomycin kivételével hatékonyan eltávolíthatóak voltak a fenti mosási eljárással. Az AKT-negatív verapamil, kinin, nifedipin nem mutattak hasonló hatást, eltávolításukat követően a calcein intracelluláris koncentrációja a kontroll szintjére esett vissza. Az AKT-negatív vegyületek nem növelték az UIC2-reaktív Pgp-k számát, míg az AKT-pozitív szerek hatására az UIC2 mAt kötődése 2-3-szorosára nőtt.

A Pgp gátlást a CSA koncentráció függvényében is vizsgáltuk. UIC2 és CSA együttes alkalmazásakor szignifikáns, több mint tízszeres intracelluláris calcein akkumulációt tapasztaltunk 0,2 μM CSA koncentráció esetén. Ugyanilyen mértékű gátlás eléréséhez mintegy hússzor nagyobb CSA koncentráció szükséges a modulátor önmagában történő alkalmazásakor. Az UIC2 gátlás tehát a CSA egy olyan alacsony koncentrációjánál létrejön, ahol a CSA önmagában, mint Pgp inhibitor hatástalan. Párhuzamos kísérleteink alapján 0,2 μM CSA koncentrációnál az UIC2 a sejtfelszíni Pgp molekulák mintegy 70%-ához kötődött.

Ugyancsak nagymértékű, mintegy huszonötszörös calcein akkumuláció növekedés volt megfigyelhető 10 nM SDZ PSC 833 és UIC2 egyidejű alkalmazásakor. Ebben a koncentrációban ez a modulátor önmagában szintén hatástalan, a kombinációs kezeléshez hasonló hatás eléréséhez tízszer magasabb SDZ PSC 833 koncentráció szükséges.

4.2.2. Életképességi vizsgálatok UIC2 antitest és modulátor együttes alkalmazásával

2780^{AD} (Pgp⁺) és 2780 (Pgp⁻) sejteket 15 nM SDZ PSC 833 modulátorral és 20 $\mu\text{g/ml}$ UIC2 mAt-tel kezeltünk különböző daunorubicin koncentrációk mellett 72 órán keresztül, majd a sejtek életképességét MTT teszt segítségével mértük. Önmagában sem a modulátor, sem az UIC2 mAt nem volt képes csökkenteni a daunorubicin IC₅₀ értékét (1 μM). Az antitest és modulátor egyidejű alkalmazásával a rezisztenciát nagymértékben gátoltuk, a fenti érték egy nagyságrenddel csökkent (100 nM).

4.3. Az UIC2 mAt kötőhelyei számának és kötéseerősségének vizsgálata

Az UIC2 mAt a kezeletlen sejtek sejtfelszíni Pgp molekuláinak csak 10-40%-ához kötődik. AKT-pozitív modulátorokkal kezelve a sejteket az antitest kötődése közel 100%-ra fokozható, míg ugyanez a hatás AKT-negatív szerekkel nem érhető el. Telítési görbék felvételével és azok Scatchard-analízisével vizsgáltuk, hogy az UIC2 kötődési többlet mennyiben a kötőhely szám növekedés és mennyiben a disszociációs konstans változásának eredménye. A kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a kezeletlen kontroll esetén az UIC2 által elért kötőhelyek mennyisége ($B_{\text{max}} = 42,69 \pm 0,788 \%$) verapamil kezelés hatására csak kismértékben nőtt ($B_{\text{max}} = 53,17 \pm 1,39 \%$), míg CSA hatására az antitest számára az összes kötőhely hozzáférhetővé vált ($B_{\text{max}} = 100,8 \pm 2,98 \%$). Az disszociációs konstans tekintetében a kezeletlen kontrollhoz ($K_d = 6,49 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$) viszonyítva mintegy kétszeres értéken belül szórnak az eredmények. A verapamil kezelés ($K_d = 2,49 \pm 0,265$

$\mu\text{g/ml}$) és a CSA kezelés ($K_d = 3,49 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$) mellett mért állandók között csak kismértékű különbség van.

4.4. Az „UIC2 gátlás” tesztelése *in vivo* tumor xenograftokban

Az antitest és modulátor együttes hatásának *in vivo* teszteléséhez SCID egerek (20 db egér, 3 független kísérletben) mindkét combja bőre alá NIH 3T3 MDR1 (Pgp^+) és NIH 3T3 (Pgp^-) sejteket injektáltunk. 10-12 nap elteltével tapintható tumorok fejlődtek ki. Az egereket ekkor UIC2-vel és/vagy CSA-val, majd 4 óra múlva DNR-rel kezeltük. Újabb 4 óra múlva a tumorokat kimetszettük, majd LN_2 -ben lefagyasztva metszeteket készítettünk. A DNR akkumulációt valamint az UIC2 kötődést konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal és pásztázó lézer citométerrel vizsgáltuk.

10 mg/kg CSA és UIC2 együttes alkalmazása a Pgp^+ tumorokban a DNR akkumulációt a Pgp^- tumorokkal azonos szintre növelte ugyanabban az állatban. CSA vagy UIC2 alkalmazása a fenti koncentrációban önmagában nem emelte a tumorsejtek DNR szintjét. A kombinációs kezeléshez hasonló DNR akkumuláció eléréséhez önmagában alkalmazva ötszörös mennyiségű CSA volt szükséges.

A kezelések hatásának kvantitatív jellemzésére pásztázó lézer citometriás méréseket végeztünk. Az átlag DNR fluoreszcencia intenzitás UIC2-vel és CSA-val kombinációban kezelt Pgp^+ tumorok esetén $3,35 \times 10^6$ ($\text{CV}=26,87\%$), ugyanabból az állatból származó Pgp^- tumorok esetén $2,98 \times 10^6$ ($\text{CV}=20,43\%$). A csak UIC2 mAt-vel kezelt állatból származó Pgp^+ tumor sejteinek átlag DNR intenzitása $1,64 \times 10^6$ ($\text{CV}=18,12\%$) volt.

A tumormetszetek hematoxin-eozin festése tipikus tumorszöveti képet mutat. Az UIC2 mAt-t i.v. alkalmazva penetrálódott a szolid tumorba és kötődött a sejtfelszíni Pgp molekulákhoz. A tumor középső részén kisebb sejtsűrűségű terület található. Ezen a részen is intakt a sejtek többsége és az erős sejtfelszíni Pgp jelölés valószínűtlenné teszi, hogy az antitest nekrotizáló területhez kötődhetett, aspecifikus módon.

Az UIC2 mAt Pgp^+ tumorokhoz specifikusan kötődött, a Pgp^- minták esetén antitest kötődést nem tapasztaltunk. Kvantitatív mérések alapján az UIC2 mAt CSA jelenlétében a teljes metszet területén kötődött a tumorsejtekhez, míg CSA nélkül a kötődés alig kimutatható. Az UIC2 kötődés lokalizációja a metszeten összhangban van a DNR akkumuláció eloszlásával.

4.5. A koleszterin Pgp pumpafunkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása

4.5.1. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

A Pgp sejtfelszíni heterogenitása – UIC2 által modulátorok távollétében is felismerhető ill. csak (AKT+) modulátorok hatására elérhető Pgp-k - konfokális mikroszkópos analízis szerint topológiailag is elkülönülő „pool-ok” létezésére utalt. Ezért megvizsgáltuk, hogy a két Pgp „pool” érzékeny-e a membrán jólismert laterális domén (raft) szerkezetének modulálására. A sejtmembrán koleszterintartalma hatásosan modulálható β -ciklodextrin származékokkal. 5 mM DIMEB-bel végzett koleszterin depléción a sejtmembrán teljes koleszterintartalmát ($16,97 \pm 0,65 \mu\text{g}$ koleszterin/ 10^6 db sejt) mintegy 50%-kal csökkentette ($8,34 \pm 2,35 \mu\text{g}$ koleszterin/ 10^6 db sejt), míg a Kol-DIMEB kezelés a membrán koleszterintartalmát 50%-kal növelte ($27,83 \pm 7,01 \mu\text{g}$ koleszterin/ 10^6 db sejt).

Mint az várható volt, a koleszterin tartalom megváltozása a sejtmembrán fizikokémiai tulajdonságaira is hatással volt. Koleszterin depléción hatására a sejtmembrán fluiditása megnőtt, valamint a lipidek közötti kapcsolat (packing density) „lazábbá” vált, amint ezt a sejtmembránhoz kötődött MC540 festék fluoreszcencia intenzitásának növekedése demonstrálta. Koleszterin bejuttatása a membránba ellentétes hatást fejtett ki. Magasabb koleszterintartalom esetén a membrán fluiditása csökkent és a membránlipidek elhelyezkedése is szorosabbá vált: ez az MC540 festék fluoreszcencia intenzitásának csökkenését eredményezte.

4.5.2. A koleszterin-modulálás hatása a Pgp raft-asszociáltságára

A sejtmembrán koleszterin depléciójának szignifikánsan csökkentette a sejt felszíni Pgp molekulák raft-asszociáltságát, míg a membrán koleszterintartalmának növelése emelte ezen membrán doménekben elhelyezkedő Pgp-k számát. Ezek az adatok felvetik azt a lehetőséget, hogy a Pgp sejt felszíni konformációs-topológiai heterogenitása kapcsolatban áll a membrán laterális domén szerkezetével, és egyben megerősítik a Pgp (részleges) raft-asszociáltságát dokumentáló irodalmi adatokat.

4.5.3. A koleszterin szerepe a pumpafunkció fenntartásában

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a membrán koleszterin tartalmának – és ezáltal a Pgp raft-asszociáltságának – a modulációja befolyással van-e a Pgp katalitikus funkciójára. A

sejtmembrán DIMEB-bel történő koleszterin depléciója növelte az intracelluláris calcein akkumulációt az életképes, Pgp⁺ sejtekben a DIMEB koncentráció függvényében. (Az adatok kiértékelése során csak a PI negatív, ép membránszerekezetű, tehát feltehetően életképes sejteket vettük figyelembe.) A koleszterin membránba történő bejuttatása szintén a calcein akkumuláció növekedését eredményezte, bár jóval kisebb mértékben. Pgp⁻ sejtekben a szubsztrát kismértékű dúsulása figyelhető meg, feltehetően a sejtmembrán perturbációja, részleges permeabilizációja következményeként.

A sejtmembrán szaturációja koleszterinnel tehát szintén pumpafunkció gátlást eredményezett. Megvizsgálva a jelenséget azt tapasztaltuk, hogy a membrán koleszterinnel történő szaturációja mintegy 2,5-szeresére növelte a Pgp internalizációjának mértékét, csökkentve a transzportban résztvevő sejtfelszíni molekulák számát. Ezzel szemben a koleszterin depléció nem okozott szignifikáns változást a fenti mechanizmusban.

4.5.4. A koleszterin-modulálás hatása az ép membránú sejtek intracelluláris ATP-szintjére

A ciklodextrin kezelés a koncentráció függvényében csökkentette a PI festés alapján életképesnek tartható sejtek arányát. A koleszterin depléció kisebb ciklodextrin koncentráció mellett okozott hasonló mértékű membránkárosodást, mint a membrán koleszterin szaturáció. A toxicitás korrelált a ciklodextrin kezelés hatására kialakult calcein akkumulációval. Annak kizárására, hogy a pumpafunkció gátlása nem a ciklodextrin toxicitással együtt járó és a szokványos, festék-kizárásos életképességi teszttel nem kimutatható membránkárosodás eredménye, meghatároztuk az életképes, PI-negatív sejtek ATP tartalmát. Sem a koleszterin depléció, sem a koleszterin szaturáció nem csökkentette szignifikánsan az életképes sejtek ATP tartalmát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Ugyanakkor glükózmentes PBS-ben, verapamillal felpörgetett Pgp aktiválás előidézte ATP-depléció hatására a sejtek ATP mennyisége jelentősen csökkent.

5. Megbeszélés

A munkacsoportunk által korábban kidolgozott AKT-esszével a Pgp hatékony modulátorai jól azonosíthatók. Kísérleteinkben számos, szerkezetében és hatásában jelentősen különböző vegyületet teszteltünk a módszer segítségével. A kapott eredmények alapján a molekulák AKT-teszt alapján két, AKT+festék-akkumuláció alapján három csoportba sorolhatók.

A magas, 0,9-1 $R_{\text{kompetíció}}$ (AKT) értékeket eredményező modulátorok (pl. CSA) a Pgp funkcióját teljes mértékben gátolni képesek. Ezen szerek mellett alkalmazva, az UIC2 antitest a pumpát a katalitikus ciklusnak abban a fázisában blokkolja, melyre jellemző konformációs állapotot az ATP-depléción is előidézi. Az „AKT-pozitív” (CSA-szerű) vegyületek önállóan alkalmazva is kiváló gátlószerei a pumpának, ami transzport esszéiben kivétel nélkül erős és alacsony koncentráció mellett érvényesülő gátlásban nyilvánul meg.

A verapamil-típusú („AKT-negatív”) vegyületek a pumpafunkció gátlásával calcein-akkumulációt okoznak, azonban hatásukra az antitestek „versengése” nem, vagy csak kevésbé modulálódik. Az $R_{\text{kompetíció}}$ értékek ennek megfelelően a 0,2-től 0,7-ig tartó intervallumba esnek. Tehát ezek az AKT-negatív vegyületek erős saját pumpafunkció gátló hatásuk ellenére sem képesek a sejtfelszíni Pgp-k többségét az UIC2 által felismerhető - majd általa ebben az állapotban befagyasztott - konformációba hozni.

A harmadik csoportba sorolhatóak azok az anyagok, melyeknek nincs számottevő hatásuk sem festék-akkumulációban, sem AKT-ban.

A vizsgált anyagok szerkezetükben jelentősen eltérőek, azonban néhány közös vonás felfedezhető bennük. Az AKT-pozitív molekulák nagy, közel 1000 Da móltömegű és hidrogén-hidak kialakítására alkalmas csoportokban gazdag vegyületek. Ez a körülmény a pumpa szubsztrátkötő helyéhez erősebb kötődést és lassabb disszociáció útján lassabb transzportot okozhat, ami az AKT-pozitív szerekre jellemző konformációs/topológiai állapot létrejöttét idézheti elő. Ez az interpretáció azonban nem magyarázná meg a kötőhelyek számának változását demonstráló ill. a topológiai heterogenitásra (részleges raft-asszociációra) utaló adatokat. Újabb adatok szerint kisebb molekulák transzportja koleszterin térkitöltő jelenlétét igényli, míg a nagyobb, 1000 Da méretű szubsztrátok maguk is transzportálódnak a Pgp által. Ez az összefüggés felveti egy olyan modell lehetőségét, melyben az UIC2 által csak a nagyméretű, AKT+ szubsztrátok jelenlétében felismert Pgp-k ezen szubsztrátok távollétében ATP-kötött „készenléti” állapotban lennének. A raft-asszociált

másik Pgp poolban bazálisan is folyhat transzport, és egyben a magas koleszterin tartalom lehetővé teszi, hogy kismolekulák is stimulálják az ATPáz működést. Mások kétféle szubsztrátfüggő ATPáz aktiválási kinetikát mutattak ki a raft-asszociált és raftokon kívüli Pgp-k esetében, és ezzel összefüggő topológiai heterogenitásra utaló adatokat is közöltek.

Az AKT-negatív molekulák általában kisebb móltömegűek. Szerkezetükben és hatásukban rendkívül különbözőek, ennek megfelelően a Pgp-vel kialakuló kölcsönhatásuk is különböző. Ezt támasztja alá az is, hogy az AKT-negatív szerek csoportján belül az AKT-értékek jóval tágabb határok között változnak, valamint az egyes szerek mért értékei közti szórás is jóval nagyobb.

A CSA-szerű vegyületek mindegyike hatékony revertálószer a Pgp-nek, és ezek a molekulák idézik elő azt a konformációs állapotot, mely az UIC2 mAt számára előnyös és amelyhez kapcsolódva az antitest egyben gátolni képes a fehérje pumpa funkcióját – tehát az antitest fokozott felkötődésének elérésére ilyen AKT+ vegyületeket érdemes alkalmazni.

Annak vizsgálatára, hogy a szubsztrátok/modulátorok által előidézett UIC2 kötődés növekedés a kötőhelyek számának növekedésével vagy a kötődési konstans változásával függ-e össze, UIC2 telítési görbéket vettünk fel, kezeletlen sejteken ill. verapamil és CSA kezelések esetén. A kötőhelyek számában a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva jelentős emelkedés figyelhető meg az AKT-pozitív CSA hatására, szemben az AKT-negatív verapamillal, amely csak kismértékű növekedést eredményezett. A kezelések következtében az UIC2 mAt affinitása kismértékben javult a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva a modulátorok AKT-típusától függetlenül. Ezek alapján feltételezhető, hogy az antitest kötődés növekedésében az AKT-pozitív szerek hatására UIC2 által felismerhetővé vagy hozzáférhetővé váló kötőhelyek számának emelkedése dominál az affinitásban bekövetkező változás fölött. Ez az interpretáció harmonizál a szubsztrátok kétféle viselkedésének fenti, a részleges raft-asszociációval is kapcsolatba hozott modelljével.

Az UIC2 mAt általi, AKT-pozitív szubsztrátok jelenlétében kialakuló – majdnem teljes - gátlás a modulátorok kimosását követően is fennmarad, vagyis ekkor a sejtfelszíni Pgp molekulák többsége UIC2-kötött, gátolt állapotban van. Szignifikáns intracelluláris szubsztrát akkumuláció fokozódás eléréséhez a sejtfelszíni Pgp molekulák legalább 70%-át blokkolni kell az UIC2 mAt-kel. AKT-negatív vegyületekkel a fenti hatás nem érhető el, az AKT-negatív szerek kimosása után gátló hatás nem marad. Az antitest által elérhető Pgp-k általában kisebbségben vannak, gátlásuk a teljes sejt festék akkumulációjában nem (vagy csak kevésbé) manifesztálódik. Mindez – a fenti modell figyelembe vételével - arra is utal, hogy az összes

sejtfelszíni Pgp potenciálisan aktív (megfelelő szubsztráttal aktiválható) állapotban van. Előbbiek a gátlás nagyfokú variabilitásának magyarázatát is adják.

A CSA és az SDZ PSC 833 vegyületek esetén megfigyeltük, hogy az UIC2 mAt festék akkumulációt gátló kötődését már jóval kisebb koncentrációban elősegítik, mint amennyi szükséges lenne önmagukban modulátorként való alkalmazáskor. Feltételezhetően ebben az alacsony koncentrációban is képesek a katalitikus ciklus beindítására a sejtfelszíni Pgp molekulák korábban UIC2-t nem kötő, tehát valószínűleg pillanatnyilag inaktív („készenlétben” lévő; l. fenn) molekulák hányadában. Ekkor ezekben is kialakul az a konformáció, amelyben az UIC2 mAt gátló hatású kötődése csapdázza a pumpát. Ezen általunk javasolt interpretáció szerint az UIC2-shift jelenség a különböző szubsztrátok által *aktiválható* sejtfelszíni molekulák kimutatását teszi lehetővé, mintsem az éppen funkcionáló Pgp molekulákat, árnyalva a korábbi elképzelést

Összhangban állnak a fentiekkel *in vitro* citotoxicitási vizsgálataink eredményei is. Az MDR sejtek életképessége alacsony modulátor koncentráció esetén csak az UIC2 mAt egyidejű alkalmazásával csökkent.

Az UIC2 és modulátor kombinációjával létrehozott MDR reverziót *in vivo* SCID egér tumor modellen is teszteltük. Az állatkísérletek során, a fagyasztott metszetek LSC analízise segítségével kimutattuk, hogy az UIC2 mAt eljut és kötődik a szolid tumorok sejtfelszíni Pgp molekuláihoz. Az AKT-pozitív CSA hatására tehát *in vivo* is megnő az UIC2 mAt által felismerhető Pgp-k száma. Az UIC2 kötődése a pumpafunkció gátlásával elősegíti a citotoxikus szubsztrát, a DNR akkumulációját a tumorsejtekben. Összefüggést figyelhettünk meg az UIC2 kötődés és a DNR akkumulációja között. Hasonlóan az *in vitro* kísérletekhez, az antitest és a CSA együttes adásakor ötször kisebb modulátor koncentráció elégséges volt a gátló hatás eléréséhez, mint a CSA-t önmagában alkalmazva. Ez az eredmény a jövőbeli terápiás lehetőségek szempontjából is fontosnak tekinthető, ugyanis kiküszöbölhetők a nagy dózisú CSA és egyéb revertálószer alkalmazásából adódó mellékhatások. Az UIC2 mAt-tel létrehozható Pgp gátlás nemcsak a daganatterápiában játszhat fontos szerepet. Számos hatóanyag (pl.: HIV proteáz inhibitorok) képtelen áthatolni a vér-agy gáton az ABC transzporterek, közöttük a Pgp működésének következtében.

A fenti állatmodell beállításának többféle gyakorlati hozadéka lehetséges. Amennyiben az UIC2 mAt és a kis dózisú modulátorok együttes alkalmazása esetén Pgp-szubsztrát drogokkal (pl. DNR) meg lehet akadályozni a transzplantált daganat kialakulását, felmerül az eljárás emberben való használati lehetősége. Ehhez természetesen elengedhetetlen

feltétel lenne az UIC2 mAt humanizált változatának előállítása. A kísérleti rendszer célzott daganatterápiás eljárások tesztelésére is előnyösen alkalmazhatónak látszik.

A Pgp transzport mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. A kristályszerkezeti vizsgálatok arra utalnak, hogy a transzmembrán alfa-hélixek a membránban egy, az extracelluláris tér felé irányuló nagy hidrofób üreget hoznak létre, mely a lipid kettősréteg felől nyitott lehet. Ezzel összhangban a Pgp valószínűleg elsősorban a membránból gyűjti be hidrofób szubsztrátjait, és juttatja a membrán extracelluláris oldalára. Amennyiben ez a mechanizmus működik, akkor a fehérjét közvetlenül övező membránrészek fontosak a szubsztrát-Pgp kapcsolat kialakulásában. Kevésbé ismert azonban a Pgp membránkörnyezetének transzportot befolyásoló szerepe. Kísérleti adataink szerint a Pgp funkció érzékeny volt a membrán koleszterin tartalmára, vagyis annak modulálása nemcsak a membrán egészére kiterjedő fizikokémiai paramétereket, hanem a Pgp szűkebb, közvetlen membránkörnyezetét is érintette.

MDR sejteket DIMEB-bel kezelve a membrán teljes koleszterintartalmát csökkentettük, valamint Kol-DIMEB-bel növeltük. Ezzel összhangban az életképes sejtek membránjának fluiditása, valamint a lipidek közötti kapcsolat is megváltozott. A koleszterin modulálása a Pgp sejtfelszíni lokalizációjára is hatással van. A Pgp TX100 detergens kioldhatósága alapján a koleszterin depléciónak csökkentette, míg a membrán koleszterin töltése növelte a citoskeleton-kötött raftokban elhelyezkedő molekulák mennyiségét. A koleszterol modulálás nemcsak a sejtmembrán globális fizikokémiai paramétereit, hanem a Pgp közvetlen membránkörnyezetét is érintette, ami a Pgp funkciójában is tükröződött. A koleszterol depléciónak koncentráció függő módon csökkentette a Pgp pumpafunkcióját. A koleszterin szaturáció okozta pumpagátlás a Pgp molekulák fokozott endocitózisára volt visszavezethető, ami a raft-asszociációval szoros összefüggésben állhat. A koleszterin szaturációval előidézett Pgp raft-asszociáció növekedés a Pgp internalizációját fokozta.

Amint várható, és a bemutatott eredmények is alátámasztják, a membránkezelés komplex hatásokat eredményez. Nem csupán a Pgp működését, hanem a sejtek számos életfolyamatát is érinti. A kezelés következményeként a sejtek életképessége a koleszterintartalom változásával párhuzamosan csökkent. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a Pgp funkció csökkenése a ciklodextrinek toxicitásának és nem a membránkörnyezet modulálásának az eredménye. A membrán permeabilizálása az ATP intracelluláris szintjének csökkenéséhez vezethet még az életképesség változásának detektálását megelőzően, ami befolyásolhatja a pumpaműködést. Ezt a lehetőséget a ciklodextrin kezeléseket követő ATP-szint méréssel egyértelműen kizártuk, az intracelluláris ATP mennyisége a kontrollhoz

viszonyítva nem csökkent. A ciklodextrinek Pgp-moduláló hatását számos közleményben leírták már előttünk, de a viabilitási markerek, a lokális és globális membránhatások korrelatív vizsgálatára ezek a vizsgálatok nem terjedtek ki.

A Pgp és membránkörnyezete között fenálló speciális kapcsolatban az egyik fontos összekötő elem tehát a koleszterin lehet. Ezen membránalkotó mennyiségének változása a membránban indirekt módon, a membránszerkezet változásán keresztül is befolyásolhatja a Pgp működését. Látható, hogy a koleszterin modulációval a raftok és a bennük helyet foglaló fehérjék szerveződése is megváltozik. Számításba véve azt a tényt, hogy az MDR sejtek membránja koleszterinben dúsabb és a raftok a szubsztrát felismerés lehetséges helyszínei lehetnek, a koleszterin modulálás hatásai további kérdéseket vetnek fel. Ismert, hogy a membrán fázisállapota hatással van a transzportra, a rigid, gél fázisban a transzport mértéke nagyobb, mint a fluid fázisban. A jelenséget a szubsztrátok különböző fázisállapotokhoz tartozó eltérő lipid megoszlásával magyarázzák. Éterrel és más anesztetikumokkal létrehozott membrán fluidizáció szintén gátolja a Pgp ATPáz aktivitását és az MDR sejtek szubsztrát effluxát is. Mindezzel analóg módon a transzportra is kiható szubsztrát megoszlási viszonyok a koleszterin depléción útján is kialakulhatnak. Ezen gondolatmenet mentén a Pgp topológiai, mikrokörnyezeti kétféleségét úgy értelmezhetjük, hogy az a széles szubsztrátspektrum feltétele lehet. Ismert, hogy a katalitikus folyamat sebességmeghatározó lépése is érzékeny a lipidkörnyezetre.

Eredményeim mindennek definitív tisztázására nem elegendők, de egy tovább vizsgálendő modell megfogalmazásához járultak hozzá, mely kapcsolatba hozza a transzporter topológiai heterogenitását a szubsztrátok konformációs hatásukban megnyilvánuló kétféleségével. Munkám hozadéka az UIC2 általi pumpagátlás körüli bizonytalanság eloszlása. Kifejlesztett protokollunk, melyben kis koncentrációban alkalmazott AKT+ ágens mellett adjuk az antitestet, megalapozza az UIC2 gátlás *in vivo* felhasználásának lehetőségét.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

1. **Fenyvesi F**, Fenyvesi É, Sente L, Goda K, Bacsó Zs, Bácskay I, Váradi J, Kiss T, Molnár É, Janáky T, Szabó G, Vecsernyés M. (2008) P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. Eur. J. Pharm. Sci. 34(4-5): 236-242. **IF: 3,127**

2. Goda K*, **Fenyvesi F***, Bacso Zs, Nagy H, Marian T, Megyeri A, Krasznai Z, Juhasz I, Vecsrnyes M, Szabo G Jr. (2007) Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. J Pharmacol Exp Ther. 320 (1): 81-88. **IF: 4,003**

***a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a közleményhez**

3. Nagy H, Goda K, **Fenyvesi F**, Bacso Zs, Szilasi M, Kappelmayer J, Lustyik G, Cianfriglia M, Szabo G Jr. (2004) Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. Biochem Biophys Res Commun. 315 (4): 942-949. **IF: 2,904**

Az értekezéshez fel nem használt közlemények

1. Szilagyi A, **Fenyvesi F**, Majercsik O, Pelyvas IF, Bacsokay I, Feher P, Varadi J, Vecsernyes M, Herczegh P. (2006) Synthesis and cytotoxicity of leinamycin antibiotic analogues. J Med Chem. 49 (18): 5626-5630. **IF: 5,115**

2. Bacso Zs, Nagy H, Goda K, Bene L, **Fenyvesi F**, Matko J, Szabo G. (2004) Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. Cytometry A. 61(2): 105-116. **IF: 1, 601**

3. Kiss T., **Fenyvesi F.**, Pasztor N., Feher P., Varadi J., Kocsan R., Sente L., Fenyvesi É., Szabo G., Vecsernyes M., Bacsokay I. (2007) Cytotoxicity of different types of methylated β -cyclodextrins and ionic derivatives, Die Pharmazie. 62(7): 557-558. **IF: 0,606**

4. Kiss T, **Fenyvesi F**, Bácskay I, Fehér P, Kocsán R, Váradi J, Sente L, Fenyvesi É, Iványi R, Vecsernyés M, (2007) Ciklodextrin-származékok citotoxicitási vizsgálata Caco-2 sejtvonalon, Acta Pharmaceutica Hungarica 77(2): 150-154.

Idézhető absztraktok

Bácskay, I., Kocsan, R., **Fenyvesi, F.**, Feher, P., Sipos, T., Varadi, J., Vecsernyes, M. (2005) Cytotoxicity of different types of surfactants on HeLa cells. Eur. J. Pharm. Sci. 25: S46-S47.

Fenyvesi, F., Goda, K., Bacso, Z., Vecsernyes, M., Juhasz, I., Marian, T., Tron, I., Krasznai, Z., Szabo, G. (2005) Conformational and topological states of P-glycoprotein, an ABC transporter involved in multidrug resistance: novel assays of transporter modulation. Eur. J. Pharm. Sci. 25: S16-S16.

Poszterek és előadások

Nagy, H., **Fenyvesi, F.**, Goda, K., Bacsó, Zs., Cianfriglia, M., Kappelmayer, J., Lustyik, Gy., Szabó, G.: Two groups of multidrug resistance modulators are sharply distinguished both by competition of UIC2 with other anti-Pgp mAbs its ability to completely inhibit pumping. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance” Gosau, Austria 2003. (*poszter*)

Bacsó, Zs., Nagy, H., **Fenyvesi, F.**, Goda, K., Bene, L., Rychly, J., Lustyik, Gy., Matkó, J., Szabó, G.: Raft- and cytoskeleton-association of the P-glycoprotein. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance” Gosau, Austria 2003. (*poszter*)

Szabó, G., Goda, K., Nagy, H., **Fenyvesi, F.**, Bacsó, Zs., Lustyik Gy.: Two groups of multidrug resistance modulators sharply distinguished based on the P-glycoprotein conformational changes they induce. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 44, 2nd ed., July 2003. Abstract Number: 3756. (*poszter*)

Fenyvesi, F., Nagy, H., Goda, K., Bacsó, Zs., Kappelmayer, J., Szabó, G., Lustyik Gy.: Antibody competition test (ACT) for detection of conformational changes of cell surface

receptors upon interactions with ligands. Cellular transport strategies for targeting of epitopes, drugs and reporter molecules, an international workshop, Budapest, 2003. (*poszter*)

Fenyvesi, F., Goda, K., Bacsó, Zs., Szabó, G.: A P-glikoprotein transzportfunkciójának antitest segítségével történő gátlása. VI. Magyar genetikai kongresszus, XIII. Sejt-és fejlődésbiológiai napok, Eger, 2005. (*poszter*)

Szilagyi, A., **Fenyvesi, F.**, Bacsokay, I., Feher, P., Vecsernyes, M., Herczegh, P.: Synthesis and cytotoxicity of leinamycin antibiotics analogs. 1st BBBB Conference on pharmaceutical sciences, Siófok, 2005. (*poszter*)

Fenyvesi, F., Kiss, T., Bácskay, I., Fodor, Z., Fehér, P., Váradi, J., Fenyvesi, É., Szenté, L., Vecsernyés, M.: A Caco-2 transzport modell és alkalmazásának lehetőségei ciklodextrinek felszívódást befolyásoló hatásának tanulmányozásában. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. Budapest, 2006. (*poszter*)

Vecsernyés, M., **Fenyvesi, F.**, Kiss, T., Váradi, J., Bácskay, I., Dévay, A., Fenyvesi, É., Szenté, L.: Evaluation of the cytotoxic properties of various cyclodextrin derivatives, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, 2008. (*poszter*)

Fenyvesi, F.: A P-glikoprotein transzportfunkciójának gátlása konformációérzékeny antitesttel. VII. Claudef Ottó emléktverseny, Visegrád, 2004. (*előadás*)

Fenyvesi, F., Fenyvesi, É., Szenté, L., Goda, K., Bacsó, Zs., Bácskay, I., Váradi, J., Kiss T., Molnár, É., Janáky, T., Szabó, G., Vecsernyés, M.: P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. Annual meeting of the Group of Carbohydrate Chemistry of the hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, 2008. (*előadás*)