

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTÉKEZÉS

**A P-glikoprotein konformáció-változásai
antitestek kompetíciójának tükrében**

NAGY HENRIETTA



Témavezető:

Dr. Szabó Gábor

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

DEBRECEN, 2003

BEVEZETÉS

Rosszindulatú daganatos megbetegedések kezelésére a sugárterápiás és sebészeti megoldások mellett a kemoterápiát alkalmazzák. Sajnos a daganatos sejtpopuláción belüli klonális evolúciós folyamatok eredményeként a különböző kemoterápiás szerekkel szemben rezisztencia alakulhat ki, ami csökkenti a gyógyulás, illetve a túlélés esélyét. Ennek egyik legjelentősebb formája a *multidrog rezisztencia* (MDR), melynek kialakulásában, egyéb mechanizmusok mellett, eddig három humán transzporter fehérje szerepét bizonyították. Ezek a P-glikoprotein (ABCB1/Pgp), a multidrog rezisztencia fehérje 1 (ABCC1/MRP1) és a mellrák rezisztencia fehérje (ABCG2/BCRP). Mindhárom fehérje az ABC transzporterek hatalmas családjába tartozik, melyek közös jellemzője a konzervatív felépítésű ATP-kötőhely (ABC: „ATP-binding cassette”) jelenléte. A Pgp, az ABCC1 és az ABCG2 MDR fehérjék egyik lényeges fiziológiás funkciója a külvilágból a szervezetbe kerülő toxikus xenobiotikumok eltávolítása a sejtekből.

Az általunk vizsgált MDR fehérje, a Pgp szubsztrátjai kémiai szerkezetüket, méretüket és sejtbeli célpontjukat tekintve nagyon eltérő, elsősorban hidrofób és amfifil sajátságú anyagok, melyek aromás gyűrűt (gyűrűket) és bázikus nitrogént tartalmaznak, töltetlenek, vagy gyengén pozitívan töltöttek. A Pgp szubsztrátjai között a daganatellenes szerek mellett számos egyéb, gyógyászatban használt vegyület is megtalálható (pl. maláriaellenes szerek, narkotikumok, antidepresszánsok). Mivel a citosztatikumok nagy része a Pgp szubsztrátja, a fehérje működését gátolni képes szerek (ún. revertálószer) keresése és fejlesztése intenzíven kutatott terület.

A P-glikoprotein az emberi daganatos betegségek majd felében olyan szinten fejeződik ki, hogy önmagában klinikailag releváns gyógyszer-rezisztenciát okozhat. Az expresszió fokozódás hátterében az állhat, hogy a Pgp jelenléte a daganatsejtekben szelekciós előnyt biztosít a tumor progressziója során. A Pgp kifejeződés mértékének diagnosztizált változása orientálja a kemoterápiás protokoll megválasztását, ill. a fehérje sejtfelszínen való kifejeződésének kvantitatív jellemzése prognosztikai jelentőséggel is bír számos daganat klinikumában. A különböző laboratóriumok által kidolgozott, Pgp-t kimutató tesztek érzékenysége más és más, ill. az adatok és a betegség klinikai lefolyása közötti összefüggések általános és egységes interpretációja is rendkívül nehéz.

Felvetődik a kérdés, hogyan képes a Pgp kémiai szerkezetüket, méretüket tekintve nagyon eltérő, főként hidrofób sajátosságú vegyületek felismerésére és szállítására? A jelenleg rendelkezésre álló szerkezeti modellek egyelőre nem teszik lehetővé, hogy a szubsztrátok megkötésének és sejtből történő eltávolításának egyes lépéseit a molekuláris kölcsönhatások szintjén ellentmondásmentesen tudjuk jellemezni. Nem eléggé ismertek pl. annak a molekuláris felismerési folyamatnak a részletei, mely a nagy számú, eltérő sajátosságokkal rendelkező hidrofób vegyületek felismerését és szállítását megvalósítja, nem ismertek a fehérje alak- (konformáció-) változásai, melyek a szubsztrát transzlokációt előidézik, sem a fehérje membrán-környezetéhez való viszonya, annak esetleges megváltozása a transzport során. A Pgp működési mechanizmusának mélyebb megértéséhez a fehérje konformációs és topológiai viszonyainak tanulmányozása, ezek változásai és a katalitikus ciklus közötti kapcsolat részleteinek feltárása vezethet.

A katalitikus ciklus egyes lépéseit követő konformációs történések nyomonkövetésére ad lehetőséget olyan, a Pgp ellen termeltetett antitestek alkalmazása, melyek kötődési sajátosságait a pumpa szubsztrát-telítettsége befolyásolja. A Pgp katalitikus ciklusa során végbemenő komplex konformáció-változások átrendeizhetik a molekula extracelluláris hurkainak helyzetét, így befolyásolva antitesttel való jelölhetőségét. Ezen konformáció-érzékeny antitestek közül a legjobban jellemzett az UIC2 monoklonális antitest (mAt), melynek kötődése igen jelentős konformáció-függést mutat és gátolva a Pgp transzport aktivitását, növelni képes számos drog akkumulációját is. Az UIC2 antitest epitópját az 1., a 4. és a 6. extracelluláris hurkokon elhelyezkedő peptid szekvenciák, valamint a 11. transzmembrán hélix egy része alkotja.

Az UIC2 antitest a sejtfelszíni Pgp molekuláknak csak egy részéhez kötődik, míg szubsztrátok, revertáló ágensek jelenlétében a kötődés mértéke 2-5-szörösére növekszik, mely részben a kötőhelyek számának, részben a mAt Pgp-hez való kötődés erősségének növekedésével magyarázható. Ez a jelenség az ún. *UIC2-shift*, melyet felfedezői a sejtfelszíni, „fukcionális Pgp” molekulák kimutatására, ill. a kis mennyiségben jelenlevő Pgp kimutathatóságának növelésére javasoltak. Az UIC2-shift-en alapuló klinikai MDR vizsgálatokra is bevezetett teszt alkalmazhatóságát azonban jelentősen korlátozza a „shift” mértékének nagymértékű variabilitása, melyre egyelőre nincs elfogadott magyarázat. Más antitestek kötődése nem, vagy csak alig

változik modulátorok, szubsztrátok jelenlétében (pl. MM12.10, MM6.15, MRK16, 4E3).

Bár a Pgp által közvetített transzport-folyamatról egyre több információval rendelkezünk, működésének részletes mechanizmusa még nem ismert. A fehérje működésének még feltáratlan mozzanatai megoldást nyújthatnak a gyógyszer rezisztencia kivédésére a klinikai gyakorlatban, pl. újabb, hatékonyabb és szelektívebb revertáló szerek kifejlesztésével.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk érdeklődése a fenti problémakörre összpontosul. A Pgp pumpa-fehérje reverzió (moduláció) során bekövetkező konformációs-topológiai változásait az intézetünkben beállított, fluoreszcencián alapuló metodikák és egy nemzetközi együttműködés keretén belül rendelkezésünkre álló monoklonális antitest panel segítségével vizsgáltuk. Célkítűzéseink egy metodikai elgondolás megvalósítása nyomán formálódtak: felvetődött, hogy a Pgp átfedő epitópjait felismerő monoklonális antitestek versengése érzékeny lehet a receptor aktuális konformációjára. Ezt az elképzelést teszteltük a Pgp-modulátor kölcsönhatás összefüggésében.

Célkítűzéseink a következőek voltak:

1. Érzékeny, antitest-kötődésen alapuló fluoreszcenciás módszer kidolgozása a Pgp modulációja során bekövetkező konformáció-változások detektálására.
2. A konformáció-változások és a katalitikus ciklus fázisai közötti összefüggések tanulmányozása.
3. A Pgp topológiai viszonyainak vizsgálata a plazmamembrán felszínén.

4. A fenti, konformáció-változások detektálásán alapuló módszer lehetséges gyakorlati alkalmazásainak feltárása:

4.1. klinikai, elsősorban hemoproliferatív kórképekben a Pgp kifejeződés vizsgálatára alkalmas eljárásként.

4.2. vegyület-panelek szűrésére, új, hatékony revertáló szerek kifejlesztése céljából.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Vizsgálataink során a KB-3-1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat valamint annak vinblasztinnal (KB-V1) és kolhicinnel (KB-8-5) szelektált Pgp-t kifejező változatait, továbbá az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak *mdr1* génnel transzfektált változatát (NIH 3T3 MDR1 G185) alkalmaztuk.

Pgp ellenes monoklonális antitestek

Vizsgálataink során a következő Pgp ellen termeltetett antitesteket használtunk: MRK16, 4E3, MM12.10, MM6.15, MM4.17 és UIC2. Az UIC2 antitestek egy részét tisztított formában kaptuk ill. hibridóma sejtek felülúszójából, protein A affinitás-kromatográfia alkalmazásával magunk izoláltuk.

Áramlási citometriás és konfokális pásztázó lézer mikroszkópiás kísérleteinkhez az antitesteket ill. az UIC2 Fab fragmentumait 6-(fluoreszcein-5-karboxiamido)-hexanoilsav szukcinimidil észterrel (sFx), vagy fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) ill. szulfoindocianin-szukcinimidil észterrel (Cy3 és Cy5) és biotinamido-kaprónsav-N-szukcinimidil észterrel (biotin) konjugáltuk.

Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése áramlási citometriás mérésekhez – antitest kompetíciós teszt

Kísérleteink első lépése egy rövid, szubsztráttal/modulátorral való ill. anélküli előkezelés volt, 37 °C-on. Ezután a sejteket a telítő koncentrációban alkalmazott Pgp ellenes antitestekkel (UIC2, MRK16, 4E3 ill. MM12.10, MM6.15, MM4.17) inkubáltuk, szintén 37 °C-on. Antitestek kompetíciójának vizsgálatához az elsőként szereplő mAt inkubációját egy további kezelés követte a második antitest jelenlétében. Indirekt jelölés esetén a sejteket a jelöletlen antitestekkel inkubáltuk (előzőek szerint), majd a festékekkel konjugált poliklonális másodlagos antitesttel 4 °C-on jelöltünk. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk és mérésig jégen tartottuk vagy formaldehid oldattal fixáltuk. Fluoreszcens mikroszópos kísérletekhez mintáinkat a sejtszuspenzióból polilizinnel előkezelt tárgylemezre kicseppentve készítettük el.

Detergens rezisztens membrán domének kimutatásához az antitestekkel megfelelően jelölt sejtekhez 0.5 % Nonidet P-40 (NP-40) vagy 0.1 % Triton X-100 (TX-100) végkoncentrációban detergenst adtunk. Ezekben a kísérletekben, a sejtfelszíni Pgp molekulák keresztkötését ellenanyaggal végeztük, míg a Pgp és más sejtfelszíni fehérjék egymáshoz rögzítését formaldehides fixálással hoztuk létre. A detergenssel való membrán kioldást 4 °C-on végeztük és időben áramlási citometriásan követtük nyomon.

Az ellenanyagok kötődésének mértékét áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg, Becton Dickinson FACScan ill. FACSCalibur áramlási citométerek segítségével. A sejtörmelékeket és az elpusztult sejteket az előre irányuló fényszórás és propidium-jodidos festés segítségével kapztuk ki.

Fluoreszcens festék akkumuláció meghatározása áramlási citometriával

Áramlási citometriás festék akkumuláció méréséhez a szubsztrátokkal/modulátorokkal történő előkezelést a daunorubicinnel (DNR) ill. a calcein-AM-mel történő inkubáció követte. Az áramlási citometriás mérés előtt a mintákat hideg PBS-ben mostuk és a mérés megkezdéséig jégen tartottuk. A Pgp modulátorok toxicitási vizsgálatához a mérések előtt propidium-jodidos festést alkalmaztunk. Azokban a kísérleteinkben, ahol a monoklonális antitestek kötődését és a festék akkumulációt együttesen kívántuk vizsgálni, a szubsztráttal/modulátorral való előkezelést a monoklonális antitestekkel való inkubáció és mosás követte, majd ezután következett a festék akkumulációs lépés.

Áramlási citometriás energiatranszfer mérések

Áramlási citometriás energiatranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer, FCET) méréseink során a transzfer hatásfokot intézetünk munkatársai által kifejlesztett módszerrel a donor kioltás és a szenzitizált akceptor emisszió kombinált felhasználásával, optimálisan megválasztott fluorofór-konjugátumok alkalmazásával, sejtenként határoztuk meg.

Konfokális pásztázó lézer mikroszkópiás kísérletek

Konfokális mikroszkópos képeink elkészítéséhez Bio-Rad MRC 1024ES és Zeiss 420 típusú pásztázó lézer mikroszkópot használtunk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

1. Antitest-kötődésen alapuló fluoreszcenciás módszer kidolgozása a Pgp modulációja során bekövetkező konformáció-változások detektálására: antitest kompetíciós teszt (AKT)

A Pgp ellen termeltetett konformáció-érzékeny antitestek alkalmazása a fehérje transzport-folyamata során bekövetkező konformáció-változások tanulmányozására ad lehetőséget. Vizsgálataink középpontjában a konformáció-érzékeny UIC2 monoklonális antitest szubsztrát függő kötődési sajátosságai és az abban manifesztálódó konformációs változások állnak.

A Pgp-re specifikus, két mAt kompetíciójának vizsgálata, különböző szubsztrátok/modulátorok jelenlétében

NIH 3T3 MDR1 sejtvonalon vizsgáltuk kétféle mAt, az UIC2 és az MM12.10 esetleges kompetícióját, modulátorok jelenlétében ill. azok nélkül. Az UIC2 antitesttel való előinkubációt követően alkalmazva a fluoreszcens festékekkel konjugált MM12.10 mAt-et, megfigyeltük, hogy az UIC2 antitest csak kevésbé befolyásolta a nem konformáció-érzékeny antitest kötődését. Az UIC2 után még jelentős mennyiségű MM12.10 tudott a fehérje megfelelő epitópjaival kölcsönhatást kialakítani. Azonban, ha a Pgp-t kifejező sejtvonalat a nagymértékű UIC2-shift-et okozó ciklosporin A-val (CSA) előkezeltük, az UIC2 antitesttel való inkubáció után az MM12.10 kötődése nagymértékben lecsökkent, vagy teljesen megszűnt. A verapamil, közel maximális

Pgp funkció gátlást okozó dózisban sem eredményezi a fenti jelenséget, azaz az UIC2 kötődés „főlényének” kialakulását. Vagyis a két revertáló szer nem viselkedik hasonlóan. Kontroll kísérletekben kimutattuk, hogy az alkalmazott drogok jelenléte nem befolyásolta jelentősen az MM12.10 mAt kötődését.

Bár a fenn bemutatott jelenség nyilvánvalóan az UIC2-shift következménye, annak nem egyszerű negatív képe, az UIC2 által el nem „fogalt” Pgp-epitópok egyszerű visszatitrlása, hiszen az eljárás reprodukálható különbséget tesz verapamil és CSA között, míg az UIC2-shift nem. A továbbiakban a két eljárás viszonyát, a kettő közötti eltéréseket és azok magyarázatát vizsgáljuk.

A jelenségen alapuló, funkcionális Pgp kimutatására alkalmas eljárást *antitest kompetíciós teszt*nek neveztük el, a továbbiakban így (ill. röviden: AKT eljárásként) hivatkozunk rá.

Az itt bemutatott, antitestek kompetícióján alapuló eljárás alkalmasnak ígérkezett a Pgp különböző revertáló szerekkel és szubsztrátokkal való kölcsönhatása során bekövetkező konformáció-változásainak észlelésére és kétféle konformáció-változás – és ez alapján kétféle modulátor/szubsztrát kategória – elkülönítésére. Ezért az AKT eljárást kiterjesztettük számos Pgp szubsztrát/modulátor vizsgálatára (ld. később).

A mAt-ek kompetíciójának vizsgálata különböző antitest kombinációk esetén

A rendelkezésünkre álló, nem konformáció-érzékeny anti-Pgp antitestek bármelyikét alkalmazva az UIC2 párjaként, ugyancsak jelentős különbség mutatkozott a másodikként hozzáadott antitest felkötődésében CSA jelenlétében ill. távollétében. Pl. az MRK16, 4E3, MM6.15 vagy MM4.17 antitest kötődése modulátor távollétében nem változott jelentősen az UIC2 kötődését követően, míg CSA jelenlétében az UIC2 teljesen meggátolta az előbb felsorolt antitestek bármelyikének kapcsolódását a fehérjéhez, élő, Pgp-pozitív sejteken. Fordított antitest sorrend alkalmazásakor, ha jelöletlen MM12.10-zel inkubáltunk először, az teljesen megakadályozta a másodjára adott UIC2 antitest felkötődését (modulátorok távollétében is).

Az AKT-teszt, az UIC2-shift és a pumpa-gátlás szimultán mért eredményeinek korrelációs vizsgálata

Szimultán, azonos sejtmintákon végzett kísérletekben hasonlítottuk össze az antitest kompetíció mértékét, a Pgp pumpa funkcióját és az UIC2-shift nagyságát, drogok (verapamil, vinblasztin és CSA) jelenlétében és távollétében. A revertáló szerek eltérő viselkedése (a CSA és a verapamil élesen különböző hatása az antitestek kompetíciójára), valamint az AKT-eljárás és az UIC2-shift korrelációs analízise arra enged következtetni, hogy a CSA és az antitestek együttes jelenlétében kialakuló konformációs állapotot a másodikként alkalmazott antitest kötődése érzékenyebb módon detektálja, mint magának a konformáció-érzékeny antitestnek (UIC2) a kötődése.

Az antitest kompetíciós jelenség vizsgálata UIC2 Fab fragmentumainak alkalmazásával

A teljes antitesttel tapasztalt kompetíciós jelenséget CSA előkezelés esetén a monovalens UIC2 Fab fragmentummal is észleltük, azaz ekkor az UIC2 egy variábilis régiója is elegendő az epitóppal való kapcsolat kialakítására és azon keresztül a másodikként alkalmazott, jelölt mAt kötődésének megghiúsítására.

A kompetíciós jelenségben manifesztálódó konformációs állapot kialakításában érintett fehérje-domén meghatározása

Az antitestek között a Pgp-vel kialakítható kötésekkért végbemenő versengés legegyszerűbb magyarázata, ha epitópjaik közeliak vagy átfedőek.

Az MM12.10 antitest komplex epitóppal rendelkezik a Pgp-n, mely magába foglal a 4. és a 6. extracelluláris hurkon lévő peptid szekvenciákat. Az UIC2 ellenanyag epitópját kialakító peptidszakaszok az MM12.10-zel azonos extracelluláris (e.c.) hurkokon, részint átfedésben találhatóak, illetve az 1. e.c. hurkon rendelkezik egy diffúz, a kötésben valószínűleg érintett területtel. Hasonló átfedést tapasztalunk az MM6.15 antitest esetében is. Az általunk leírt kompetíciós jelenség és az a megfigyelésünk, mely szerint az MM12.10-zel történő inkubáció teljesen meggátolja a későbbi UIC2 antitest kötődését, arra utalnak, hogy a két mAt a fehérje 4. vagy a 6. e.c. hurkai kötéséért verseng. Mivel a 4. extracelluláris hurokra specifikus MM4.17 antitest helyettesíteni képes akár az MM12.10, akár az MM6.15 antitestet az UIC2 antitesttel való versengésen alapuló kísérletben, az UIC2 Pgp-hez való

kapcsolódásában is megnyilvánuló konformáció-változás kritikus mozzanata feltehetően a 4. e.c. hurok területén zajlik.

ATP-depléció hatása a mAt kompetíciós jelenségre

Az UIC2 reaktivitását fokozza, vagyis UIC2-shift-et idéz elő a sejtek ATP-depléciója is. Ezért ATP hiányos állapotot idéztünk elő Pgp-t kifejező sejteken és vizsgáltuk annak hatását az UIC2 és MM12.10 kompetíciójára.

Oligomicin, vagy 2-deoxi-D-glükóz és nátrium-azid együttes hatására bekövetkező ATP-depléció után az UIC2 teljes mértékben meggátolta az MM12.10 későbbi felkötődését, hasonlóan a CSA-hoz. Tehát a CSA és a vinblasztin ugyanolyan hatást vált ki az antitestek kompetíciójában, mint amit a sejtek ATP-depléciója eredményez. Ebből az a következtetés adódik, hogy a katalitikus ciklus azon stádiumaiban kedvező a fehérje konformációja az UIC2 antitest kötődése számára, amelyben a Pgp-hez vagy még nem kötődik ATP, vagy már megtörtént az ATP hidrolízise.

Az UIC2 antitest kötődésének vizsgálata az inkubációs idő függvényében

Az UIC2 antitest kötődését az inkubációs idő függvényében követtük nyomon. Kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy az UIC2 kötődése a pumpa jó szubsztrátja, a verapamil jelenlétében sem közelítette meg a CSA mellett kapott értéket, még több órás inkubálás esetén sem. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a Pgp katalitikus ciklusa verapamil jelenlétében vagy gyorsan áthalad azon a stádiumon, vagy kihagyja azt a stádiumot, melyben kialakulhatna az UIC2 kötődés számára kedvező konformációs állapot, amelyet viszont a CSA létrehoz. Elképzelhető az is, hogy az UIC2 mAt másképpen kötődik CSA, vinblasztin jelenlétében, ill. ATP-depletált körülmények között, mint pl. verapamil mellett.

Az UIC2 antitest pumpa-gátló hatásának modulátor függése

Ismert az UIC2 azon tulajdonsága, hogy MDR sejtekben gátolni képes a Pgp-szubsztrátok kiáramlását és szignifikánsan növeli az alkalmazott, Pgp által is szállított drogok citotoxicitását, míg azonos kísérleti körülmények között más Pgp ellenes antitestek erre nem képesek.

Kimutattuk, hogy a CSA ugyanolyan hatást vált ki az antitestek kompetíciójában, mint amit a sejtek ATP-depléciója eredményez, továbbá feltehetően az UIC2 a Pgp-t egy olyan átmeneti konformációban fogja meg, ahol sem ATP-t, sem ADP-t nem köt, gátolva ezzel annak további ATP kötését és így a pumpa működését. Mivel feltételezhető, hogy CSA mellett az UIC2 mAt másképpen kötődik, mint pl. verapamil mellett, ezért azt vártuk, hogy a CSA vagy a verapamil jelenlétében felkötődött UIC2 a pumpa-gátlásban is különbözőképpen viselkedik. Ezért CSA és verapamil mellett kötöttük fel az UIC2 mAt-et, majd BSA tartalmú oldattal mosva a sejteket a modulátorokat kvantitatíve eltávolítottuk, majd a pumpa működését daunorubicin vagy calcein akkumulációján keresztül követtük nyomon.

Megállapítottuk, hogy a CSA mellett felkötődött UIC2 a CSA kimosása után is teljesen gátolja a Pgp működését. Feltételezzük, hogy a CSA hatására kialakuló konformáció az UIC2 segítségével rögzíthető, míg a verapamil esetén vagy nem alakul ki ez a konformáció, vagy ekkor az UIC2 azt nem képes rögzíteni. Valószínűleg ez az állapot manifesztálódik az AKT jelenségben is és ebben a „befagyasztott” állapotban a fehérje nem képes pumpafunkcióját ellátni.

A mAt-ek Pgp-n elfoglalt relatív pozíciójának tanulmányozása fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérésekkel

Eddig bemutatott eredményeink arra engednek következtetni, hogy két különböző Pgp ellenes antitest egyszerre egyazon Pgp molekulára is felkötődhet. Ez az elképzelés (CSA távollétében felkötött) UIC2 és pl. az MM12.10 molekuláris közelségét prediktálja, melyet FCET metodikával vizsgáltunk meg. A CSA jelenlétében és távollétében is elvégezett FCET méréseink magas energiatranszfer eredményei alapján két elképzelés is lehetséges, nem zárva ki azok egyidejű jelenlétét sem:

- egyetlen fehérje képes megkötni a kétféle anti-Pgp antitestet,
- Pgp-homoaggregátumok vannak jelen a sejtfelszínen.

2. A Pgp topológiai viszonyainak vizsgálata a plazmamembránban

A Pgp sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata konfokális lézermikroszkópia alkalmazásával

Az AKT jelenség és az UIC2-shift egyik olvasata az, hogy kétféle Pgp populáció van jelen a sejteken: az UIC2 által modulátorok nélkül is megjelölhető Pgp-k és azok, amelyek UIC2-t csak pl. CSA jelenlétében kötnek (de más anti-Pgp mAt-eket, pl. MRK16-ot vagy MM12.10-et stb. modulátorok nélkül is). A másik olvasata a két, egymással szoros kapcsolatban álló jelenségnek az, hogy CSA jelenlétében az UIC2 nagyobb aviditással kötődik és így a sejtfelszíni Pgp-k nagyobb hányadát jelöli. Utóbbi lehetőség, mint kizárólagos magyarázat ellen szól az a tény, hogy telítő mAt koncentrációk alkalmazása esetén észlelhető mindkét jelenség.

Konfokális lézermikroszkópia segítségével megvizsgáltuk a P-glikoprotein eloszlását a sejtmembránban. A fehérjék heterogén eloszlását tapasztaltuk: az UIC2-vel modulátorok távollétében is jelölhető Pgp-k a sejtmembránban a CSA mellett felkötődött mAt-től többé-kevésbé elkülönült doménekben foglalnak helyet. Ez az elkülönültség lehet magának az antitest-kötésnek az eredménye, ill. megelőzheti azt. A mikroszkópiás megközelítésben a „repräsentatív” sejtek kiválasztása szubjektív elemektől nem mentes, ezért egy másik stratégiát is kipróbáltunk a fenti heterogenitás igazolására. Ez a stratégia egyben a Pgp intramembrán és citoszketalis asszociációinak mértékéről is felvilágosítást adott és egy széles körben alkalmazható eljárás kidolgozásához is vezetett.

A Pgp intramembrán és citoszketalis asszociációinak tanulmányozása

Sejtfelszíni Pgp Triton X-100-zal való kioldhatóságának vizsgálata

A KB-V1 sejtek plazmamebránjában lévő Pgp Triton X-100 kioldási kinetikáját vizsgáltuk a fehérje és detergens rezisztens mikrodomének kapcsolatának tanulmányozásához.

KB-V1 sejteken mind a CSA kezelés mellett, mind az anélkül UIC2 antitesttel azonosítható Pgp-k egy része detergens rezisztens lipid mikrodoménekben található. Megfigyelhető, hogy a detergens rezisztens Pgp-k aránya (vagyis azok átlagos detergens rezisztenciája) CSA mellett és CSA távollétében egymástól különböző. Ez utóbbi megfigyelés arra utalhat, hogy a CSA kezeléssel elkülöníthető kétféle Pgp populáció eltérő lipid mikrokörnyezetben található, hiszen a CSA jelenlétében a Pgp

nagyobb arányban oldódik ki a membránból. Hasonló eredményeket kaptunk Pgp-t expresszáló transzfektált NIH 3T3 sejtvonalon is.

Ha a sejtfelszíni Pgp molekulákat az UIC2 antitestek közvetítésével (poliklonális antitest alkalmazásával) keresztkötöttük, TX-100 hatására a minták fluoreszcencia intenzitása jelentősen nem csökkent, vagyis a – megjelölt – Pgp-k többsége lipid tutajokhoz rögzülve maradt. Tehát a keresztkötések hatására a kezdetben kismértékű detergens rezisztencia jelentősen megnő, ami legegyszerűbben úgy magyarázható, hogy az újabb Pgp molekulák a már előzőekben tutaj-asszociált Pgp-khez keresztkötődnek és így immobilizálódnak.

Sejtfelszíni Pgp Nonidet P-40-nel való kioldhatóságának vizsgálata

A citoszkeletális rögzítettség vizsgálatára KB-V1 sejtek membránjában lévő Pgp molekulák Nonidet P-40 kioldási kinetikáját tanulmányoztuk.

CSA kezelés alkalmazása nélkül az UIC2 mAt-tel jelölhető Pgp többsége az NP-40 hatására a membránból nagymértékben eltávolítható, amely a modulátorral való kezelés hatására sem változik jelentősen. Ha a kisszámú rögzítettséget mutató Pgp molekulához a többi ellenanyag segítségével keresztkötöttük, akkor ez jelentősen megnövelte a sejthez rögzült molekulák arányát. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmamembránban kifejeződő Pgp-k antitest indukálta citoszkeletális rögzítettsége csak kismértékű, amely keresztkötés hatására megnövekszik.

3. Konformáció-változások detektálásán alapuló módszer lehetséges gyakorlati alkalmazásai

3.1. Klinikai, elsősorban hemoproliferatív kórképekben a Pgp kifejeződés vizsgálatára alkalmas eljárás

Az első fejezetben bemutatott, az UIC2/MM12.10 antitestek kompetíciójára épülő eljárásban – az UIC2-shift-hez képest – lényegesen nő a Pgp konformáció-változása/változásai kimutathatóságának érzékenysége. A teszt alkalmas lehet emberi diagnosztikus célra, ahol elsősorban multidrog-rezisztens, vagy ilyennek gyanított sejteken mutathatja ki funkcionális, vagyis modulátorok által befolyásolható konformációjú és aktivitású Pgp-k jelenlétét.

Az *AKT-eljárás* jól reprodukálható volt nem csupán a humán *mdr1* transzfektált NIH 3T3 sejtvonalon, hanem a szelektált KB-V1 sejtvonalon és a Pgp-t alacsonyabb fokban kifejező KB-8-5 sejteken is.

Az AKT eljárásban alkalmazott szubsztrát/modulátor koncentráció meghatározásához széles koncentráció tartományban vizsgáltuk különböző drogok pumpa gátló hatását a calcein AM tesztben. Kísérleteinkhez a legnagyobb mértékű Pgp gátlást eredményező, még nem toxikus drog-koncentrációt választottuk. Abban az esetben, ha a drog nem volt képes maximálisan gátolni a pumpa funkciót, akkor a legmagasabb, de még nem citotoxikus koncentrációt alkalmaztuk. Az AKT teszt kidolgozásakor figyelmet kellett fordítanunk arra, hogy a sejtpusztulás kezdeti fázisa ATP-depléciót okozva az AKT-ban „CSA-szerű” (magas $R_{\text{kompetíció}}$ értékben megnyilvánuló) választ is eredményezhet. Vagyis az AKT artefaktum mentes analíziséhez nélkülözhetetlen az áramlási citometriás analízis, amelyben lehetőség van a már elpusztult ill. a sejtelhalás membrán-permeabilizációs szakaszába lépő és az élő sejtpopulációk elkülönítésére.

A szubtoxikus koncentrációban alkalmazott, vagy az ATP-áz aktivitását serkentő, de valójában a magas AKT-értékre jellemző konformáció változást nem indukáló drogok esetén az intracelluláris ATP-szint csökkenésének hatására is növekedhet UIC2 kötődése, amely a fluoreszcencia eloszlási hisztogram heterogenitását eredményezheti. A fentiek miatt az AKT hatás diagnosztizálásában a kis AKT értéket mutató sejtpopuláció jelenlétét vagy hiányát és a heterogenitás koncentráció-függését tekintettük mérvadónak.

A sejtvonalakon szerzett pozitív tapasztalataink hatására a DE OEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Pathológiai Intézetével kollaborációban elkezdtük hematológiai beteganyag mintáinak AKT-tesztelését.

3.2. Vegyület-panelek szűrése, új, hatékony revertáló szerek kifejlesztése céljából

Harminc anyagon elvégzett AKT teszt és párhuzamosan végzett calcein-AM teszt eredményét összegeztük. A Pgp szubsztrátjai, modulátorai – e két teszt tükrében – három csoportba sorolhatóak, szemben az UIC2-shift eljárással (vagy akár a calcein AM tesztrel), melyek lényegében nem különböztetik meg pl. a CSA, a taxol, vagy az aktinomicin D hatását. A vegyületek különböző csoportba sorolása azok pumpa-gátló és az antitest-pár kompetíciójában manifesztálódó, a fehérje konformációjára való hatásukon alapul. A CSA-szerű modulátorok közé tartoznak a Pgp funkcióját teljes mértékben gátolni tudó és az AKT tesztben nagymértékű antitest-kompetíciót előidéző anyagok, mint pl. az ivermektin, a vinblasztin vagy a CSA analóg-SDZ PSC 833. A verapamil-típusú vegyületek (verapamil, emetin, kinin, kinidin, mibefradil stb.) a calcein-akkumuláció erős gátlására képesek, azonban a hatásukra fellépő antitest-kompetíció, a kezeletlen kontrol sejtekhez képest csak gyenge, vagy közepes mértékű. A harmadik csoportba sorolhatóak azok az anyagok, melyeknek nincs számottevő hatásuk sem a festék-akkumulációban, sem az AKT-ban.

Eredményeinket tanulmányozva érdekes korreláció figyelhető meg, mely szerint a CSA-szerű vegyületek mindegyike hatékony revertáló szere a Pgp-nek. Továbbá, a CSA-szerű anyagok idézik elő azt a konformációt, melyhez kapcsolódva az UIC2 egyben gátolni képes a fehérje pumpa funkcióját.

Az azonos csoportba tartozó ágensek jellemzőit (kémiai szerkezet, molekulásúly, sejtbeni célpont, ATP-áz aktiváció) összehasonlítva egyelőre nem találtunk olyan közös tulajdonságot, mely molekuláris vagy fizikokémiai szinten megmagyarázhatná a fentiek szerinti eltérő viselkedésüket.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kidolgoztunk egy, a funkcionális Pgp kimutatására alkalmas fluoreszcenciás módszert, az AKT eljárást, mely egy konformáció-érzékeny (UIC2) és egy nem konformáció-érzékeny mAt kompetícióján alapul. Megállapítottuk, hogy a Pgp modulációja során bizonyos revertáló szerek (pl. CSA, vinblasztin) és az UIC2 mAt együttes hatására kialakuló konformációs állapotot a másodikként alkalmazott mAt kötődése érzékenyebb módon detektálja (AKT eljárás), mint magának az UIC2 antitestnek a kötődése (UIC2-shift).
2. Az AKT teszt eredményein és irodalmi adatok alapján arra következtettünk, hogy a Pgp – az UIC2 mAt fehérjéhez való kötődése mértékében megnyilvánuló – konformáció-változásának kritikus mozzanata valószínűleg a 4. e.c. hurok területén zajlik. ATP-depléciós kísérletekben kimutattuk, hogy az UIC2 számára kedvező konformációs állapotban a fehérjéhez nem kapcsolódik ATP vagy az ATP hidrolízise már megtörtént.
3. Kidolgoztunk egy gyors kísérleti eljárást, amely a más munkacsoportok által korábban leírt, variábilis és közepes mértékű UIC2 pumpa-gátló hatást reprodukálhatóan teljessé teszi. Ezen eljárás alkalmazásával megállapítottuk, hogy a CSA hatására kialakuló, az UIC2 segítségével rögzíthető konformációs állapotban a fehérje pumpa funkcióját ellátni nem képes.
4. A Pgp topológiai viszonyainak konfokális lézer mikroszkópiás vizsgálata során a fehérje heterogén elhelyezkedését figyeltük meg a sejtmembránban. Sejtfelszíni Pgp Triton X-100-zal való kioldhatóságának vizsgálatával arra következtettünk, hogy a CSA kezeléssel elkülöníthető kétféle Pgp populáció eltérő lipid mikrokörnyezetben található. Nonidet P-40 detergenssel végzett membrán kioldási kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a sejtfelszíni Pgp-k citoszkéletális rögzítettsége modulátor nélkül kismértékű, azonban keresztkötés hatására jelentősen megnövekszik.
5. Az általunk kifejlesztett AKT eljárás jól reprodukálható a Pgp-t alacsonyabb mértékben kifejező sejtvonalakon is. Így várhatóan a módszer alkalmas lesz klinikai diagnosztikai célokra is.

6. Harminc különböző vegyület és az AKT teszt kapcsolatát vizsgálva megállapítottuk, hogy a CSA-szerű vegyületek csoportjába tartozó anyagok mindegyike hatékony revertáló szere a Pgp-nek, ami a teszt hatékony modulátorok szűrésére való alkalmasságára utal.

GYAKORLATI JELENTŐSÉG

A dolgozatban bemutatott AKT módszer alkalmas lehet multidrog-rezisztens, vagy ilyennek gyanított sejteken funkcionális Pgp kimutatására. Továbbá, az eljárást alkalmasnak véljük hatékony(abb) modulátorok kimutatására, keresésére, szűrésére ill. szelektív tesztelésére, mely célt az e tárgyban beadott szabadalmunkat vizsgáló nemzetközi szabadalomügyi eljárás során elfogadták (PCT/HU02/00025 02/03/2001, 74.523/SZE; 02707028.3-2404-PCT/HU0200025). A multidrog rezisztenciát okozó pumpa-fehérjék kimutatásának calcein AM akkumuláción alapuló diagnosztikus eljárását az antitest-kötődés nyújtotta specificitással ötvözve, kidolgoztunk egy kombinált kísérleti eljárást, amely azt fontos diagnosztikai információval egészítheti ki, annak klinikai hasznosíthatóságát javíthatja.

Az AKT jelenség általánosítható lehet más biológiai rendszerekben is a következő feltételrendszer teljesülésekor: két, azonos receptorhoz kapcsolódó antitest vagy ligandum alkalmazott koncentrációik ill. affinitásuk arányában kapcsolódnak a fehérjéhez. Utóbbi paraméterek megváltozhatnak a fehérje konformáció-változásával. Az egyes antitestekre vagy ligandumokra értelmezhető affinitás-változás általában csekély, kimutatása pusztán egyetlen antitest vagy ligandum felkötődött hányadának meghatározásával pontatlan, nem kellő érzékenységű. Ha a két antitest vagy ligandum ugyanazon, vagy átfedő, esetleg egymással allosztérikusan csatolt receptorhoz, vagy epitóphoz kötődik, akkor az egyik kötődésének növekedése a másik csökkenésével járhat együtt. Így az AKT módszer általában alkalmas lehet különböző fehérjék (élő sejtekben kifejeződő vagy izolált-, ill. mesterségesen előállított receptorok, antigének, pumpák) konformációs változásainak, ligandumokkal, antitestekkel, szubsztrátokkal, modulátorokkal való kapcsolatának vizsgálatára.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Nagy, H.**, Goda, K., Arceci, R., Cianfriglia, M., Mechetner, E. and Szabó, G. P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition
Eur. J. Biochem. 268:2416-2420. 2001. **IF: 2.849**
2. **Nagy, H.**, Goda, K., Fenyvesi, F., Bacsó, Zs., Szilasi, M., Kappelmayer, J., Lustyik, Gy., Cianfriglia, M., Szabó, G.
Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are sharply distinguished by competition of P-glycoprotein specific antibodies
(*közlésre elküldve*)
3. Goda, K., **Nagy, H.**, Mechetner, E., Cianfriglia, M., Szabó, G. Jr.
Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells
Eur J Biochem. 269(11):2672-7. 2002. **IF: 2.849**
4. Szabó, G., **Nagy, H.**, Goda, K. Antitest kompetíciós teszt (AKT) P-glikoprotein konformáció-függő kvantitatív kimutatására és annak alkalmazásai
(*szabadalmi beadvány*, PCT/HU02/00025 02/03/2001, 74.523/SZE; 02707028.3-2404-PCT/HU0200025)

Egyéb közlemények és absztraktok

1. Goda, K., **Nagy, H.**, Bene, L., Balázs, M., Arceci, R., Mechetner, E., Szabó, G. Conformational heterogeneity of P-glycoprotein
Cancer Detect Prev. 24(5):415-21. 2000. **IF: 1.324**
2. Gombos, I., Bacsó, Zs., Detre, C., **Nagy, H.**, Goda, K., Andrásfalvy, M., Szabó, G., Matkó, J.
A Rapid Flow Cytometric Detergent-Resistance Assay (FCDRA) Detecting Raft-Association of Membrane Proteins in Cells (*előkészületben*)
3. Márián, T., Szabó, G., Goda, K., **Nagy, H.**, Szincsák, N., Juhász, I., Galuska, L., Balkay, L., Mikecz, P., Trón, L., Krasznai, Z.
In vivo and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance
Eur J Nucl Med Mol Imaging 30(8):1147-54. 2003. **IF: 3.464**
4. Goda, K., Szakács, G., **Nagy, H.**, Szabó, G. and Sarkadi, B.
Flow cytometric functional assays for the detection of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein
In: Practical guide to physical analysis of cell surface receptors. (ed. Krasznai Z. and Mátyus L.)
ISBN: 963 9070 31 9, pp. 110-125, 1998.

5. Goda, K., Szakács, G., **Nagy, H.**, Szabó, G. and Sarkadi, B.
Flow cytometric functional assays for the detection of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein
In: EMBO conference handbook, "Practical guide to physical analysis of cell surface receptors"
ISBN: 963 9070 31 9, pp.64-92, 1998.