

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 SEJTBOLÓGIAI INTÉZET

DEBRECEN, 2003

*“Az ember ismeri a tényeket, mégis
tudatlan.”*

Victor Hugo

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1. A multidrog rezisztencia fenotípus és a kezdet	4
1.2. Az ABC-transzporterek	7
1.3. Az ABC-transzporterek szerkezete.....	9
1.4. Az ABCB alosztály	10
1.5. Az ABCB1 vagy P-glikoprotein.....	10
1.6. A katalitikus ciklus.....	15
1.7. A Pgp konformáció-változásaira érzékeny monoklonális ellenanyagok.....	18
1.8. A Pgp és lipidkörnyezete.....	20
1.9. A Pgp szubsztrátjai és modulátorai	21
1.10. A Pgp klinikai jelentősége.....	23
2. CÉLKITŰZÉSEK	26
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
3.1. Sejttenyésztés	28
3.2. Pgp ellenes monoklonális antitestek.....	28
3.3. Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése	29
3.4. Fluoreszcens festék akumuláció meghatározása áramlási citometriával.....	30
3.5. Áramlási citometriás energiatranszfer mérések	31
3.6. Konfokális pásztázó lézer mikroszkópiás kísérletek	32

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	33
4.1. Érzékeny, antitest-kötődésen alapuló fluoreszcenciás módszer kidolgozása a Pgp modulációja során bekövetkező konformáció-változásainak detektálására: antitest kompetíciós teszt (AKT).....	33
4.1.1. A Pgp-re specifikus, két mAt (UIC2 és MM12.10) kompetíciójának vizsgálata különböző szubsztrátok/modulátorok jelenlétében	34
4.1.2. Az AKT-eljárás és az UIC2-shift összehasonlító vizsgálata	36
4.1.3. A mAt-ek kompetíciójának vizsgálata különböző antitest kombinációk esetén.....	37
4.1.4. Az AKT-teszt, az UIC2-shift és a pumpa-gátlás szimultán mért eredményeinek korrelációs vizsgálata	38
4.2. A detektált konformáció-változások és a katalitikus ciklus fázisai közötti összefüggés tanulmányozása	40
4.2.1. Az antitest kompetíciós jelenség vizsgálata UIC2 Fab fragmentumainak alkalmazásával.....	40
4.2.2. A kompetíciós jelenségben manifesztálódó konformációs állapot kialakításában érintett fehérje-domén meghatározása	41
4.2.3. Az ATP-depléció és a mAt kompetíciós jelenség kapcsolatának vizsgálata	42
4.2.3.1. Az UIC2 antitest kötődésének vizsgálata az inkubációs idő függvényében.....	44
4.2.3.2. Az UIC2 antitest pumpa-gátló hatásának modulátor függése	45
4.2.4. Javasolt modell a fenti észleletek magyarázatára	47
4.2.5 MAt-ek Pgp-n elfoglalt relatív pozíciójának tanulmányozása fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérésekkel.....	48
4.3. A Pgp topológiai viszonyainak vizsgálata a plazmamembránban	49
4.3.1. A Pgp sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata konfokális lézermikroszkópia alkalmazásával.....	49
4.3.2. A Pgp intramembrán és citoskeletális asszociációinak tanulmányozása	52
4.3.2.1. Sejtfelszíni Pgp Triton X-100-zal való kioldhatóságának vizsgálata.....	52
4.3.2.2. Sejtfelszíni Pgp Nonidet P-40-nel való kioldhatóságának vizsgálata	53
4.4. Konformáció-változások detektálásán alapuló módszer lehetséges gyakorlati alkalmazásai.....	55
4.4.1. Klinikai, elsősorban hemoproliferatív kórképekben a Pgp kifejeződés vizsgálatára alkalmas eljárás ..	55
4.4.1.1. AKT jelenség reprodukálhatóságának tanulmányozása különböző sejtvonalakon.....	55
4.4.1.2. Modulátorok toxicitásának hatása az AKT kimenetelére.....	56
4.4.2. Vegyület-panelek szűrése új, hatékony revertáló szerek kifejlesztése céljából	58
5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	63
6. GYAKORLATI JELENTŐSÉG	64
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	65
8. KÖZLEMÉNYEK.....	77
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP-kötő domén (ATP Binding Cassette)
ABCA-ABCG	ABC-transzporterek hét alosztálya és az azokba tartozó fehérjék (alosztályokon belüli számozással: pl. ABCA1)
biotin	biotinamido-kapronsav-N-szukcinimidil észter
BSA	albumin marha vérsavóból (Bovine serum albumin)
calcein AM	calcein acetoxi-metilészter
Cy3 és Cy5	szulfoindocianin-szukcinimidil észter típusú festék származékok
CSA	ciklosporin A
DNR	daunorubicin
EM	elektronmikroszkópia
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
FCET	áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
LmrA	<i>Lactococcus lactis</i> (tejsav baktérium) multidrog rezisztencia fehérjéje
mAt	monoklonális antitest
MDR	multidrog rezisztencia (általánosan)
<i>mdr1</i>	az emberi P-glikoproteint kódoló gén
NBD	ATP-kötőhely (Nucleotide Binding Domain)
NP-40	Nonidet P-40, detergens
Pgp	P-glikoprotein, ABCB1 vagy MDR1 fehérje
PI	propidium-jodid
RaMIgG	nyúlban termeltetett egér ellenes antitest (Rabbit anti-Mouse Immunglobulin)
sFx	6-(fluoreszcein-5-karboxiamido)-hexanoilsav szukcinimidil észter
TMD	transzmembrán domén (Transmembrane Domain)
TX-100	Triton X-100, detergens
UIC2-shift	jelenség, mely során az UIC2 mAt kötődése 2-4-szeresére növekszik pl. vinblasztin, taxol, ciklosporin származékok, stb. jelenlétében a Pgp-t kifejező sejteken (Mechetner és <i>mtsai</i> , 1997)

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A multidrog rezisztencia fenotípus és a kezdet

Rosszindulatú daganatos megbetegedések kezelésére a sugárterápiás és sebészeti megoldások mellett a kemoterápiát alkalmazzák. Sajnos a daganatos sejtpopuláción belüli klonális evolúciós folyamatok eredményeként számos különböző kemoterápiás szerrel szemben alakulhat ki rezisztencia, ami csökkenti a gyógyulás, illetve a túlélés esélyét. A daganatos megbetegedések egy részében a kemoterápiás kezelés hatására kezdeti gyógyulás figyelhető meg, majd később a daganatos szövetekben megjelenő egyes géntermékek (ld. később) ún. „szerzett” rezisztenciát eredményeznek, mely hatására a gyógyulásban visszaesés következik be. Ezzel szemben például a tüdő, vagy a bél karcinómái esetén az egészséges szövetekre eleve jellemző úgynevezett „intrinsic” rezisztencia ill. annak fokozódása okozza a kezelés eredménytelenségét.

Mivel a malignus tumorokban a különböző kemoterápiás szerek alkalmazása nyomán fellépő gyógyszer-rezisztencia *in vivo* tanulmányozása rendkívül nehéz, a jelenség farmakológiai, biokémiai és molekuláris alapjainak megismeréséhez a rezisztenciát mutató sejtvonalakra volt szükség. 1970-ben Biedler és Riehm aktinomicin D-vel szelektált kínai aranyhőrcsög sejtkultúrát, amely rezisztenssé vált egyidejűleg több, szerkezetében és funkciójában eltérő ágensre is, azaz többszörös kereszt-rezisztencia alakult ki (Biedler & Riehm, 1970). Az 1970-es évek során számos olyan humán és rágcsláló sejtvonalat szelektáltak különböző kutatócsoportok, melyek nem csupán rezisztensek voltak, hanem kereszt-rezisztenciát is mutattak valamely lipofil sajátságú, elsősorban a növényi alkaloidok vagy antitumor antibiotikumok családjába tartozó citosztatikus vegyületre. Az ilyen sajátságokkal jellemezhető fenotípus megjelenése a multidrog rezisztencia (MDR) jelensége. A multidrog rezisztencia hátterében álló mechanizmusok megértésére való igen intenzív törekvés egyik fontos oka a jelenség rendkívüli klinikai jelentősége.

A daganatos sejtpopulációk túlélésének többféle biokémiai mechanizmus is okozója lehet, így például a terápiában alkalmazott szerek transzportja, a metabolizmusukat irányító enzimek fokozottabb működése, a target enzim, pl. a topoizomeráz II mutációja, vagy az apoptózis folyamatában bekövetkező valamilyen rendellenesség (McClean & Hill, 1992; Bosch & Croop, 1996). Ezen mechanizmusok hatására csökkenhet a gyógyszerek felvétele,

aktivációja, eloszlása, kötődése, esetleg nőhet azok inaktivációja, kipumpálásának mértéke, a szervezet toleranciája (Gottesman & Pastan, 1993; McClean & Hill, 1992; Bosch & Croop, 1996). Ezen védekezési mechanizmusok egy része csak egyféle vegyületcsoporttal szemben okoz rezisztenciát, mások a vegyületek széles spektrumával szemben, az apoptotikus útvonalak megváltozásának jelentősége pedig vitatott.

A "klasszikus" multidrog rezisztencia a citosztatikumok „széles spektrumával” szemben alakulhat ki. Olyan amfifil-lipofil természetű anyagok sejtből kifelé irányuló szállítását foglalja magába, melyek szerkezete kevés hasonlóságot mutat és méretükben is eltérőek; általában a 300-1200 g/mol tartományba esnek. A számos különböző sajátosságú lipofil vegyület elszállítására Dano, egy aktív efflux pumpa működését tétélezte fel a multidrog-rezisztens sejteken (Dano, 1973). Ezt a modellt támasztotta alá az a megfigyelés is, mely szerint a sejtekben az anyagcserét gátló szerek hatására a drogok akkumulációja megnövekedett. Ezzel szemben Skovsgaard és Ling az MDR jelenségét a csökkent drog-influxszal magyarázták, míg Beck és munkatársai elképzelése szerint a rezisztens sejtekben a drogok megváltozott intracelluláris kötődése/eloszlása okozza a megfigyelt csökkent akkumulációt (Skovsgaard, 1978; Ling és *mtsai*, 1983; Beck és *mtsai*, 1983).

Ezen korai (influx-efflux) tanulmányok rávilágítottak annak lehetőségére, hogy a multidrog-rezisztens sejtek drog transzportja szoros összefüggésben lehet a plazmamembránban bekövetkező változásokkal. 1976-ban Ling munkacsoportja egy általuk szelektált kolhicin-rezisztens sejtvonalon egy glikoprotein megnövekedett expresszióját írta le (Juliano & Ling, 1976). Ez a kb. 170 kDa méretű molekula a P-glikoprotein (MDR1). Ezen fehérje magas expressziós szintjét találták más emlős MDR sejtvonalakon is, Bell és munkatársai néhány, kemoterápiára rezisztens petefészek daganatban is kimutatták (Bell és *mtsai*, 1985). Kartner különböző drogokra szelektált humán eredetű leukémiás és petefészek karcinóma sejtvonalakon korrelációt figyelt meg a P-glikoprotein expressziós szintje és a multidrog rezisztencia mértéke között (Kartner és *mtsai*, 1983; Kartner és *mtsai*, 1985). Roninson egy 1986-ban megjelent publikációjában rámutatott két kapcsolt DNS szekvencia, az *mdr1* és az *mdr2* gén amplifikációja és a multidrog rezisztencia mértéke közötti összefüggésre (Roninson és *mtsai*, 1986). Még ebben az évben Ueda és munkacsoportja bebizonyította, hogy az *mdr1* gén kódolja a Pgp-t (Ueda és *mtsai*, 1986), majd az *mdr1* mRNS jelenlétét normál humán szövetekben is kimutatták (Fojo és *mtsai*, 1987).

Az MDR sejtvonalak további vizsgálata során felmerült egy, nem a Pgp-hez kapcsolódó, de mechanizmusában nagyon hasonló MDR fenotípust okozó fehérje jelenléte is

a drog-rezisztens sejtvonalakon. Ezeket a sejteket a Pgp-t kifejező sejtekhez hasonlóan, a drogok lecsökkent intracelluláris akkumulációja jellemzi, amely P-glikoprotein expresszió nélküli energia-függő drog efflux hatására alakul ki. 1992-ban azonosították az ún. MDR-kapcsolt fehérjét (MRP1) (Cole és *mtsai*, 1992), majd 1998-ban a BCRP-t (Breast Cancer Resistance Protein) (Doyle és *mtsai*, 1998), amelyek multidrog rezisztenciát eredményeztek Pgp-negatív MDR sejtvonalakon.

További jelentős összefüggésekre világított rá a P-glikoproteint kódoló *mdr1* gén DNS szekvenciájának analízise. Az 1980-as években DNS és fehérje adatbázisokban jelentős homológiát találtak a Pgp és számos bakteriális fehérje nukleotid-kötőhelyének szekvenciájában ill. ezen fehérjék membrán transzport-funkcióval kapcsolatos szerepében (Chen és *mtsai*, 1986; Gerlach és *mtsai*, 1986; Gros és *mtsai*, 1986). Trezise jelentős hasonlóságot talált a cisztikus fibrózis (CFTR, cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor) gén terméke és a Pgp között a fehérjék szerkezeti jellemzői alapján (Trezise és *mtsai*, 1992). Nagy számú prokarióta és eukarióta membrán-transzporter összehasonlításával egy nagy fehérje család körvonalazódott, melynek a Pgp egy prototípusa és amelyek szekvencia- és molekuláris mechanizmusbeli hasonlósággal és közös evolúciós eredettel jellemezhetők. Ezen új membrán-transzporter családot ABC-transzporter fehérje-családnak nevezték el (Higgins, 1992). Az elnevezés a fehérjék ATP-kötőhelyének (ATP-binding cassette) nagymértékű evolúciós konzerváltságára, valamint az ATP kötésének és hasznosításának hasonló mechanizmusára utal (Higgins, 1992). Az ABC-transzporterek az eddig vizsgált összes fajban a baktériumoktól az emberig megtalálhatók. A fehérjék az ATP hidrolízisének energiáját felhasználva szállítják szubsztrátjaikat, melyeknek kémiai természete rendkívül széles skálán mozog – az inorganikus ionoktól kezdve, a lipideken keresztül nagyméretű polipeptidekig. A család változatos tulajdonságú tagjai a kutatás középpontjába kerültek, mivel számos fontos biológiai folyamat és klinikai probléma (mint például az antigén prezentáció, a cisztikus fibrózis és az MDR) hátterében állnak.

1.2. Az ABC-transzporterek

Az ABC „szuper-család” a legnagyobb és egyik legjelentősebb fehérje transzporter család, melynek számos tagja van mind a prokariótákban, mind az eukariótákban. Az ABC-transzporter fehérjék a sejtek plazmamembránjában vagy sejtorganellumainak membránjában elhelyezkedve szabályoznak különböző fiziológias funkciókat, így például: mérgező anyagok kiválasztását, sejtek anyagfelvételét, jelátadást (Higgins, 1992; Childs & Ling, 1994; Dean & Allikmets, 1995). Tagjai számos különböző vegyület szállítását végzik a sejt extra-, ill. intarcelluláris membránjain keresztül, pl. cukrok, aminosavak, rövid szénláncú peptidek, szerves ionok transzportját, vagy lipidek, epesavak, glutation konjugátumok, esetleg anyagcsere termékek pumpálását (Higgins, 1992). A fehérjék egy része ATP energiájának felhasználásával koncentráció gradienssel szemben képes szubsztrátjait pumpálni (pl: Pgp és MRP1), más tagjai csatornaként működnek (pl. CFTR), vagy esetleg egy nem ABC-transzporter fehérje működését szabályozzák (pl. SUR1 (szulfonurea receptor1)).

Mai tudásunk szerint a humán genom mintegy 49 különböző ABC-transzporter génjét tartalmazza, ebből 24-ről ismert, hogy olyan fiziológias funkcióval bír, mely egy-egy emberi veleszületett megbetegedés hátterében áll. A fehérjéket hét alosztályba soroljuk, ABCA-tól ABCG-ig, génstruktúrabeli hasonlóságuk, a különböző szerkezeti egységek sorrendje valamint nukleotid-kötő és transzmembrán doménjeik homológiája alapján.

A következő táblázat (**1. táblázat**) néhány fontosabb ABC-transzportert és szerepüket foglalja össze:

1. táblázat

<i>Elnevezés</i>	<i>Név</i>	<i>Méret (aminosa- vak száma)</i>	<i>Szöveti specificitás</i>	<i>Funkció</i>	<i>Jelentőség (túlzott expresszió vagy működésképtelenség)</i>
-	LmrA	590	citoplazmamembrán	hidrofób vegyületek transzportja, <i>bakteriális</i>	antibiotikum rezisztencia
-	STE6	1290		hidrofób vegyületek, szaporodási feromon transzportja, <i>eukarióta</i>	sterilitás
ABCA1	ABC1	2261	számos szövetben megtalálható/ plazmamembrán (apikális)	koleszterin és foszfolipid transzport, <i>humán</i>	Tangier kór
ABCB1	Pgp vagy MDR1	1279	számos epithélium, vér-agy gát, vese/ plazmamembrán (apikális)	hidrofób vegyületek transzportja, <i>humán</i>	multidrog rezisztencia
ABCB2 ABCB3	TAP1 TAP2	808 653	számos szövetben megtalálható/ endoplazmatikus retikulum	antigén prezentáció oligopeptidek transzportja, <i>humán</i>	immunodeficiencia ún. egyes-típusú „bare” limfocita szindróma
ABCB4	MDR3 vagy MDR2	1279	hepatocita	foszfatidilkolin transzport, <i>humán</i>	ún. hármas-típusú progresszív familiáris interhepatikus cholestasis
ABCB11	sPgp	1321	hepatocita	epesav transzport, <i>humán</i>	ún. kettes-típusú progresszív familiáris intrahepatikus cholestasis
ABCC1	MRP1	1531	számos szövetben megtalálható/ plazmamembrán (bazolaterális) és endoszómák	hidrofób vegyületek, glutation-konjugátumok transzportja, <i>humán</i>	multidrog rezisztencia
ABCC2	MRP2 (cMOAT)	1545	máj, bél, vese/ plazmamembrán (apikális)	multispecifikus szerves anion transzporter, konjugált bilirubin kiválasztása az epébe, <i>humán</i>	Dubin-Johnson szindróma
ABCC7	CFTR	1480	tüdő, bél/ plazmamembrán (apikális)	Cl ⁻ csatorna, <i>humán</i>	cisztikus fibrózis
ABCC8	SUR1	1581	pancreas	inzulin szekréció, K ⁺ - csatorna regulátor, <i>humán</i>	gyermekkori familiáris hiperinulinémiás hipoglikémia
ABCG2	BCRP vagy MXR	655	placenta, emlő, máj, endothelium/ plazmamembrán (apikális)	szteroidok, szerves anionok transzportja, <i>humán</i>	multidrog rezisztencia

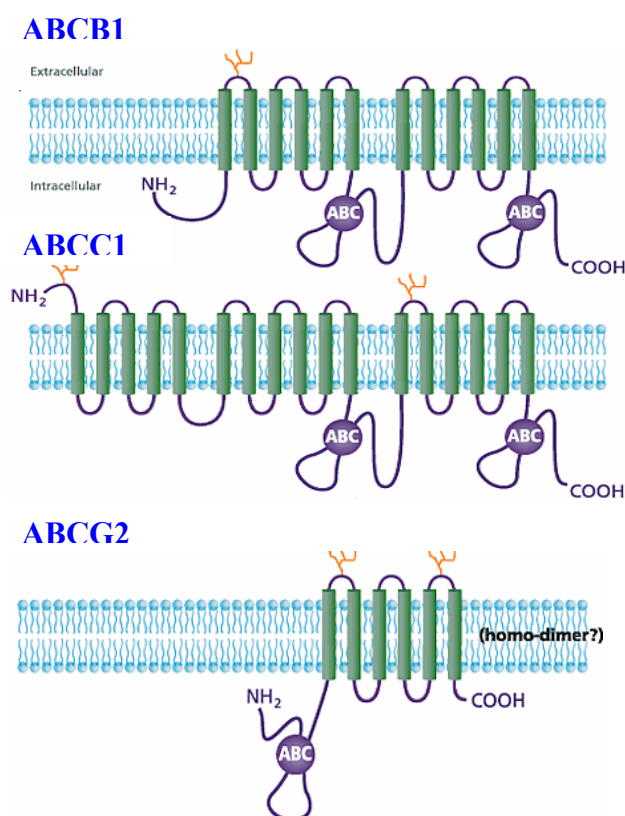
1.3. Az ABC-transzporterek szerkezete

Az ABC-fehérjék ATP-kötő doménje három jellegzetes peptid szekvenciát tartalmaz: a Walker A és B motívumokat és az úgynevezett „ABC-signature” régiót. A Walker A és B motívumok számos ATP-t kötő fehérjében jelen vannak, azonban az ABC-signature aminosav szekvencia csak az ABC-transzporter család tagjaira jellemző (Hyde és *mtsai*, 1990). Ennek a motívumnak valószínűleg fontos szerepe van az ATP kötését illetve bontását kísérő kölcsönhatások kialakításában. Az ABC-transzporter fehérjék funkcionális alapegysége általában két, a membránon többször

átívelő transzmembrán doménből (TMD) és két, a citoplazmatikus térrészbe eső ATP-kötőhelyből (NBD) áll. Az ún. teljes-transzporterek (pl. ABCB1, ABCC1) esetében ezen doméneket egyetlen polipeptid lánc tartalmazza (1. ábra).

Működőképes transzportert hozhat létre egy TMD-t és egy NBD-t tartalmazó fél-transzporter is, vagy azok homo- (pl. ABCG2, 1. ábra), vagy heterodimerizációja (pl. ABCB2-B3, ABCD1-D3 vagy -D2, ABCD2-ABCD3) (Ueda és *mtsai*, 1997; Klein és *mtsai*, 1999; Liu és *mtsai*, 1999; Özvegy és *mtsai*, 2001; Kage és *mtsai*, 2002; Gottesman és

mtsai, 2002). Az egy TMD-ból és egy NBD-ből álló molekulafeleket összekötő ún. „linker” szakasz eltérő hossza a család tagjainak jelentős változatosságát eredményezi. A ABCC7/CFTR esetén az összekötő aminosav szekvencia egy egészen hosszú, 245 aminosavból álló regulátor domén (Riordan és *mtsai*, 1989), míg a ABCB1/Pgp esetén ez csak kb. 60 aminosav hosszúságú. Továbbá a fehérje kiegészülhet egy rövidebb transzmembrán doménnel, mint pl. az ABCC1/MRP1 N-terminálisa.



1. ábra A multidrog rezisztenciáért felelőssé tehető ABC-transzporterek membrán topológiai modellje (Sarkadi és *mtsai*, 2002)

1.4. Az ABCB alosztály

Az ABCB alosztály négy teljes-transzporterből és hét fél-transzporterből áll. Ez az egyetlen olyan alosztály, melyben mindkét transzporter típus megtalálható.

Az ABCB1/Pgp az elsőként és egyben a legjobban jellemzett humán ABC-transzporter. A multidrog rezisztenciáért is felelőssé tehető fehérje valószínű elsődleges élettani funkciója a szervezet védelme toxikus ágensekkel szemben.

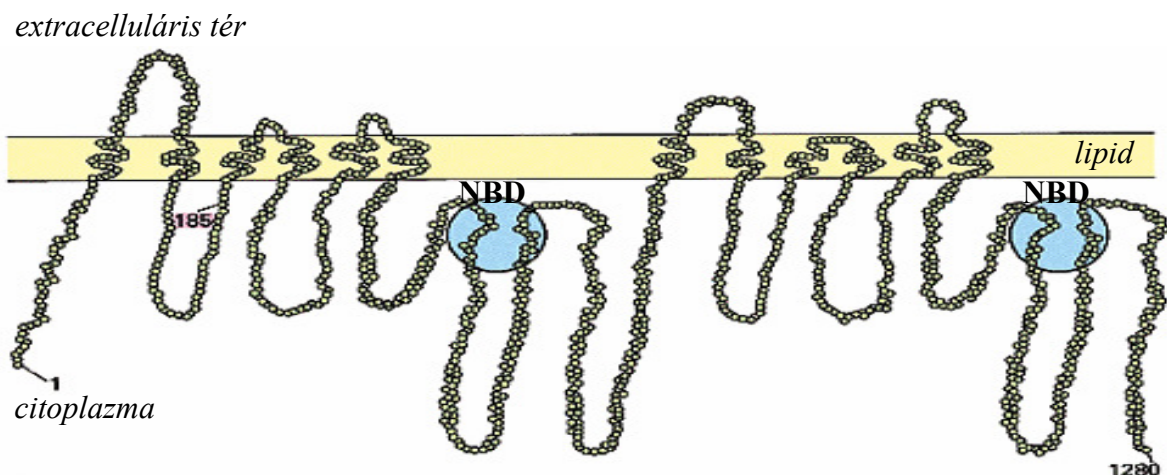
A májban található ABCB4 és ABCB11 fehérjék szerepe a foszfatidil-kolin és az epe sók szállítása. Mutációjuk eredményeként progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis alakul ki.

Az ABCB2 és ABCB3 (TAP1 és TAP2) az immunsejtek antigén-prezentációs működésében játszanak szerepet. A két fél-transzporter heterodimert képezve, saját és idegen fehérjék lebontásából keletkező peptidek szállítását végzi a citoplazmából az endoplazmatikus retikulum lumenébe. A TAP fehérjékkel közeli homológiát mutat a lizoszómákban lokalizálódó ABCB9, mely szintén fél-transzporter.

Az alosztály többi fél-transzportere a mitokondriumban (ABCB6, B7, B8 és B10) fejeződik ki és ott a vas metabolizmusában, valamint a Fe/S fehérje prekursorok transzportjában játszik szerepet.

1.5. Az ABCB1 vagy P-glikoprotein

A humán Pgp-t kódoló *mdr1* gén a 7-es kromoszóma hosszú karján található és több fizikailag kapcsolt génnel, így például a vele nagyfokú homológiát mutató *mdr2* génnel gyakran együtt amplifikálódik. A rácsáló és az emberi ABCB1-et összehasonlítva, igen magas, kb. 70%-os az aminosav szekvencia hasonlóság, azonban az ABCC1 transzporterrel csak 15% homológiát mutat.



2. ábra A Pgp aminosav sorrend alapján, hidrofobicitási plot segítségével meghatározott szerkezete (Chen és mtsai, 1986)

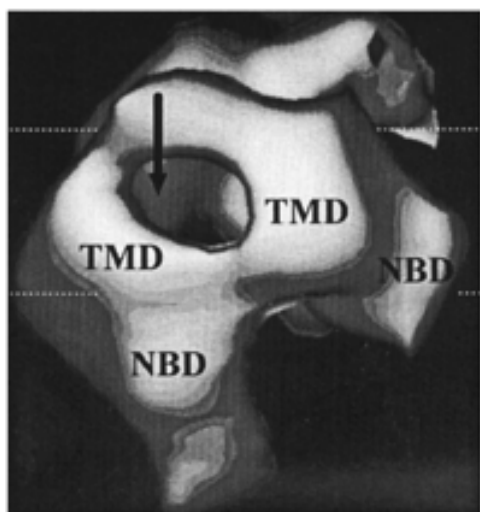
Az 1280 aminosavból felépülő fehérje két, a plazmamembránon hatszor átvélő homológ félből áll, melyek tartalmazzák az ABC-transzporterekre jellemző transzmembrán szakaszokat ill. az ATP-kötőhelyeket (2. ábra) (Chen és mtsai, 1986; Bakos és mtsai, 1997; Loo és mtsai, 1999).

Bizonyos intron-párok konzerváltsága arra enged következtetni, hogy a Pgp-t kódoló gén az evolúciós fejlődés során egy ősi, hat transzmembrán doménnel rendelkező fehérje molekula („fél-ABC-transzporter”) génjének megkettőződésekként jöhetett létre, mely további mutációs változásokon mehetett keresztül (Raymond & Gros, 1989). Erre utal a homodimerként funkcionáló bakteriális eredetű LmrA és a Pgp között tapasztalható nagymértékű szekvencia, topológiai és funkcionális hasonlóság (Higgins & Linton, 2001).

A Pgp két, szimmetrikus fele között nagymértékű szekvencia homológia figyelhető meg (Gottesman & Pastan, 1993). A két homológ molekula-felet 75 aminosavból álló peptid szakasz köti össze, mely valószínűleg a Pgp szekunder szerkezetének flexibilitásáért felelős és biztosítja a két molekula-fél megfelelő kölcsönhatását (Sharom, 2003). A Pgp első extracelluláris hurkán glikolizációs helyek találhatóak (Schinkel és mtsai, 1993), de a glikolizáció mértékének változása, vagy akár teljes hiánya nem befolyásolja a fehérje transzport-funkcióját (Ichikawa és mtsai, 1991). Nincs lényeges hatással a molekula működésére a „linker” szakaszon elhelyezkedő foszforilációs helyeken történő aminosav csere, vagy annak foszforilációja/defoszforilációja sem (Hrycyna és mtsai, 1998; Germann és mtsai, 1996).

Felvetődik a kérdés, hogyan képes a Pgp kémiai szerkezetüket, méretüket tekintve nagyon eltérő, főként hidrofób sajátosságú vegyületek felismerésére és szállítására? Vajon az ATP kötése és hidrolízise a NBD-en hogyan idézi elő a TMD-ben azt a konformáció-változást, mely lehetővé teszi a szubsztrátok transzportját? Az ABCB1 fehérje különleges sajátosságainak megértéséhez szükség van szerkezetének mélyebb megismerésére.

Loo és Clarke a transzmembrán szegmensek elhelyezkedésének és flexibilitásának modellezésére cisztein mutációkat tartalmazó fehérjéken végzett diszulfid-hidas keresztkötéseket. A kísérleteikben keresztkötő ágensként alkalmazott metán-tio-szulfonát analógok specifikusan a fehérje felszínén jelen levő tiol-csoportokkal lépnek reakcióba. Az immunoblot mintázatok alapján feltételezhető a TMD6 közelsége a 10, 11 és 12-es transzmembrán doménekkel, illetve a TMD12 közelsége a TMD4, TMD5 és TMD6-tal (Loo & Clarke, 2000/1). Ezen transzmembrán szegmensek és az azokat összekötő peptid szakaszok fontos szerepet játszhatnak a Pgp szubsztrát-kötőhelyének kialakításában, melyre a keresztkötés mértékének szubsztrátok ill. ATP és vanadát jelenlétében tapasztalható változása utal. Fotoaktiválható szubsztrát-analógokkal kapott eredmények alapján szintén ezek a transzmembrán hélixek felelősek a drog-fehérje kölcsönhatás kialakításáért (Brugemann és *mtsai*, 1989; Demmer és *mtsai*, 1997). Még nem tisztázott, hogy vajon a fehérjének egy komplex drog-kötőhelye van-e, vagy a drog-Pgp kölcsönhatás kialakításában résztvevő fehérje szakaszok külön-külön alkotnak egymástól független, vagy akár kooperatív szubsztrát-kötőhelyet, ill. kötőhelyeket (Shapiro és *mtsai*, 1999; Dey és *mtsai*, 1997; Pascaud és *mtsai*, 1998; Pawagi és *mtsai*, 1994; Ferry és *mtsai*, 1995; Ayesh és *mtsai*, 1996; Orłowski és *mtsai*, 1996; Safa és *mtsai*, 1996; Martin és *mtsai*, 1997; Shapiro & Ling, 1997; Garrigos és *mtsai*, 2002). Loo és Clarke elképzelése szerint a fehérje egy olyan komplex kötőhellyel rendelkezik, ahol a transzmembrán domének megfelelő peptid szakaszainak „összehangolásával” az adott Pgp-szubsztrát képes kialakítani a számára megfelelő ún. szubsztrát-indukálta kötőhelyet (Loo & Clarke, 2002). Komplex kötőhellyel rendelkezik a *Bacillus Subtilis* BmrR transzkripciósfaktora, mely (a Pgp-hez hasonlóan) aktivációja során számos különböző szubsztrát megkötésére képes. A BmrR esetében a fehérje és szubsztrátja között elsősorban Van der Waals kölcsönhatások jönnek létre, melyek kialakulásához nem szükséges a kötésben résztvevő molekula-domén speciális orientációja, hanem elegendő a fehérje kismértékű struktúrabeli változása is (Zheleznova és *mtsai*, 1999 és 2000; Vazques-Laslop és *mtsai*, 2000).



— 1.7 nm

3. ábra A Pgp térbeli szerkezete EM felvételek rekonstrukciója alapján (Rosenberg és mtsai, 1997)

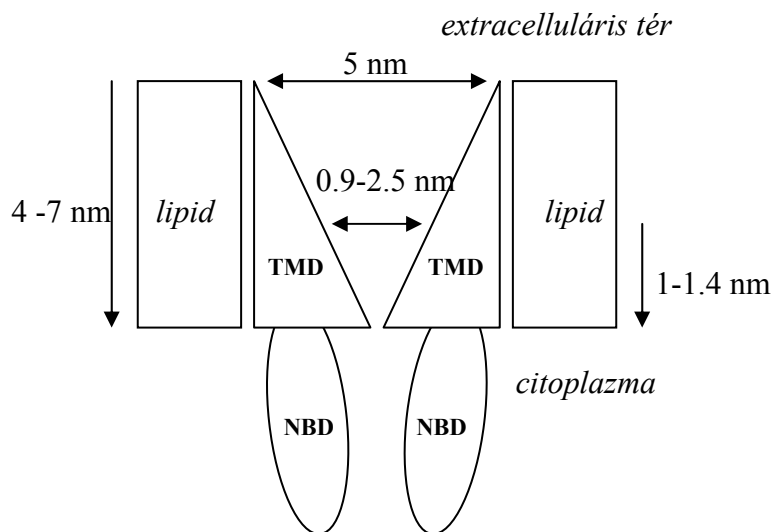
A **3. ábra** a Pgp térbeli szerkezetéről elektronmikroszkópos felvételek (EM) alapján készült rekonstrukciót mutatja (Rosenberg és mtsai, 1997).

A Pgp egy kb. 10 nm átmérőjű és 8 nm magasságú hengerbe illeszthető, melynek közepén egy kb. 5 nm átmérőjű, a citoplasma irányából zárt, de a lipid tartományba nyitható üreg található. Egy picike virághoz hasonlítható, amint úszik az őt körülvevő közegben (a membránban). A pórust bélelő fehérje-rész, valószínűleg a transzmembrán hélixeknek megfelelően, hatos szimmetriát mutat. A nukleotid-kötőhelyekre (NBD) a citoplasma felőli oldalon megfigyelhető két, 3 nm-es képlet utal (Rosenberg és

mtsai, 1997). Stein – a fent bemutatott szerkezeti elképzelést alátámasztva és kiegészítve – olyan negyedleges fehérje szerkezetet feltételez, melyben a fehérje egy „vizes” (water-accessible) póruson (3. ábra, ↓) keresztül engedné ki a szubsztrátokat az extracelluláris térbe (Stein, 1997).

A Pgp fenti, az EM kép analízisének alapuló 3D-s rekonstrukciójával összhangban van a Loo és Clarke által valószínűsített Pgp modell (**4. ábra**) (Loo & Clarke, 2001).

A modell szerint a megfelelő transzmembrán domének egy tölcsérformát hoznak létre, amely extracelluláris tér felől a



4. ábra A Pgp feltételezett térbeli szerkezetének keresztmetszeti képe (Loo & Clarke, 2001)

citoplasma felé beszűkül (Rosenberg és mtsai, 1997; Loo & Clarke, 2000/1.; Loo & Clarke, 2001). A drog-Pgp kölcsönhatás kialakításában résztvevő (korábban részletezett) transzmembrán domének a kúp középső részén alakítják ki a feltételezett kötőhelyet.

A kötőhely mérete 0.9-2.5 nm, ami még olyan viszonylag nagy molekulák beilleszkedését is lehetővé teszi, mint például a vinblasztin és a ciklosporin A, amelyeknek legnagyobb átmérője kristályos formában kb. 2-2.5 nm (Bau & Jin, 2000; Jegorov és mtsai, 2000). Sharom és munkatársai fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérései szerint a Pgp fluoreszkáló szubsztrátja, a Hoechst 33342, a membrán lipid kettősrétegének a citoplazma felőli rétegében kötődik, a plazmamembrán felszínétől kb. 1-1.4 nm távolságra (Qu & Sharom, 2002). A szubsztrát- és az ATP-kötőhely távolsága körülbelül 4 nm (Qu & Sharom, 2001). Loo és Clarke a nukleotid-kötőhelyek egymáshoz viszonyított helyzetére következtet ciszteín-mutáns Pgp-k segítségével. Az NBD1 és NBD2 oxidatív keresztkötése szinte teljes mértékben meggátolja a drog-indukálta ATP-áz aktivitást, mely gátlás a diszulfid-kötés felszakításával megszüntethető (Loo & Clarke, 2000/2.). A két nukleotid-kötőhely Walker A motívumainak (nagyértékben konzervált) ciszteint tartalmazó rövid peptid szakaszához kovalensen kötött fluorofórok között fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérhető, amely szintén a katalitikus helyek 10 nm-en belüli közelségét feltételezi (Qu & Sharom, 2001).

A Pgp térbeli szerkezetének leírására irányuló kutatásokkal párhuzamosan számos kutatócsoport a fehérje működését próbálta modellezni. A Pgp működésének modellezésére általánosan elfogadott a „pumpa” modell, mely a transzporttal kapcsolatos megfigyelések többségét meggyőzően képes magyarázni. A pompa fehérje egyik lehetséges modellje a „hidrofób porszívó”, mivel szubsztrátjai elsősorban hidrofób természetű vegyületek közül kerülnek ki és a kísérleti tapasztalatok alapján azokat a membránból az extracelluláris médiumba szállítja (Gottesman & Pastan, 1993; Qu & Sharom, 2002; Roepe és mtsai, 1996). (Hasonló működési modellel írható le a *Lactococcus lactis* ABC-transzportere, az LmrA is (Bolhuis és mtsai, 1996)). Higgins és Gottesman elképzelése szerint a Pgp flippázként működik, ahol a fehérje a szubsztrátjait a membrán belső rétegéből a külsőbe szállítja, aszimmetrikus eloszlást idézve elő a membránon belül, amely azután új egyensúly kialakulásához vezet az extracelluláris térrel (Higgins & Gottesman, 1992). Ezen elképzelést támogatják azok az eredmények is, melyek szerint a drogok megkötésében a fehérje citoplazma felőli részének transzmembrán régiói vesznek részt (Qu & Sharom, 2002; van Helvoort és mtsai, 1996; van Helvoort és mtsai, 1997; Stein, 1997). Az ABCB1/Pgp közeli rokona, az ABCB4/MDR3 is flippázként működik és képes egyes Pgp-szubsztrátok, rövid-láncú lipid-analógok transzportjára (Ruetz & Gros, 1994; van Helvoort és mtsai, 1996). Egyes korai elképzelések szerint a Pgp a daganat ellenes szerek felhalmozódását és sejten belüli

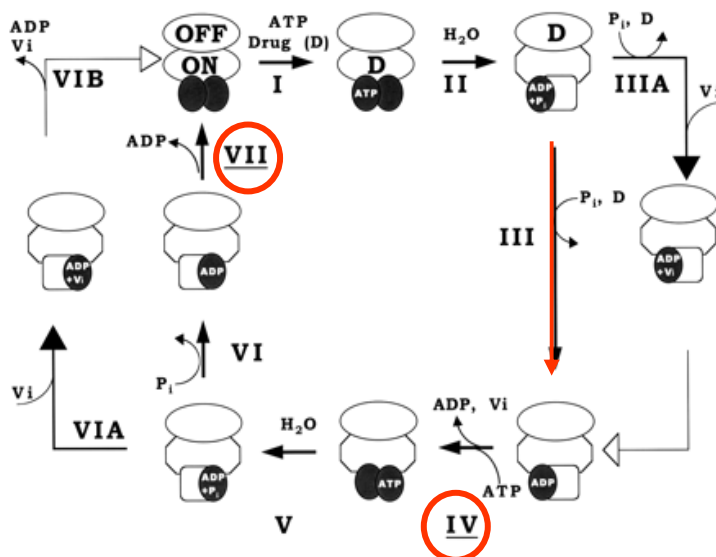
megoszlását indirekt úton, a membránpotenciál és/vagy az intracelluláris pH megváltoztatásával is szabályozhatja (Roepe, 1995).

Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy a katalitikus ciklus során a Pgp jelentős konformáció-változáson/változásokon megy keresztül, melyek tanulmányozása nélkülözhetetlen egy funkcionális Pgp modell elkészítéséhez. Wang és munkatársai legalább négy, különböző konformációs állapotot feltételeznek, amelyek szorosan összefüggnek a nukleotid kötődésével és/vagy hidrolízisével (Wang és *mtsai*, 1997). Pgp-n végzett tripszines emésztések különböző mintázatokat eredményeztek ATP vagy ATP és vanadát jelenlétében, ami feltehetőleg a nukleotid-kötőhelyeken okozott szerkezeti és funkcionális változásokat jelez (Julien & Gros, 2000). Vigano és Gros infravörös spektroszkópiás eredményei valószínűsítik, hogy a transzport-folyamat során az egyik nukleotid-kötőhelyen történő ATP-hidrolízis felelős a szubsztrát-kötőhelyet kialakító membrán domének átrendeződéséért, a másik ATP-kötőhelyen történő hidrolízis a további konformáció-változásért, mely során újra kialakul a szubsztrát-kötőhely kezdeti stabilitása és szubsztrátok számára való hozzáférhetősége (Vigano és *mtsai*, 2002).

1.6. A katalitikus ciklus

A Pgp katalitikus ciklusát leíró első modellt Senior és *mtsai* mutatták be, melynek legfontosabb vonása a nukleotid-kötőhely alternáló működése (Senior és *mtsai*, 1995). Senior elképzelését is alapul véve, Sauna és Ambudkar a katalitikus ciklust az **5. ábrán** látható összetett folyamatként modellezi (Sauna & Ambudkar, 2001). Az ATP a két nukleotid-kötőhely közül azonos valószínűséggel kötődik bármelyikhez (két *sötét korong*) (Hrycyna és *mtsai*, 1998) és egy teljes ciklushoz mindkét ATP-kötőhelyre szükség van. A modellben két független drog-kötőhelyet különböztetnek meg, melyeket valószínűleg a Pgp katalitikus ciklusa során végbemenő konformáció-változások alakítanak ki. Az egyik szubsztrát-kötőhely egy magas affinitású ún. „ON” kötőhely, míg a másik egy a drog extracelluláris térbe kerülése előtt kialakuló, alacsony affinitású „OFF” kötőhely (Ramachandra és *mtsai*, 1998). (Az ON és OFF drog-kötőhelyeket ellipszisek szimbolizálják; az ON kötőhely csökkenő drog-affinitását hatszögletű szimbólum jelzi.)

A katalitikus ciklus kezdő lépésében a drog a Pgp ON helyéhez kötődik és ATP kapcsolódik egy, vagy mindkét ATP-kötőhelyre (I.). Az (első) ATP hidrolízise (II.) egy olyan konformáció-változást idéz elő, amely a szubsztrát affinitását csökkenti (Ramachandra és *mtsai*, 1998) és így valószínűleg a drog a Pgp OFF helyére mozdul el. A hidrolízis során ADP és a

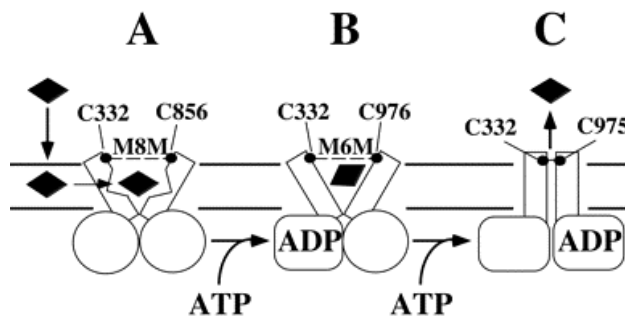


5. ábra A Pgp katalitikus ciklusának modellje (Sauna & Ambudkar, 2001)

ez az ún. katalitikus átalakulási stádium. Ez az intermedier állapot nátrium-orto-vanadáttal (P_i analóg) az ATP hidrolízise és a P_i disszociációja közötti konformációban befagyasztható. Az így keletkező $Pgp \bullet ADP \bullet V_i$ stabil komplexet képez (Sarkadi és *mtsai*, 1992; Smith & Rayment, 1996; Urbatsch és *mtsai*, 1995/2.). A hidrolízist követően, a katalitikus ciklus III. pontjában szabadul fel az inorganikus foszfát, és ezt olyan konformáció-változás kíséri, mely elősegíti a szubsztrát távozását az extracelluláris térbe. Az ADP disszociációja a következő, IV. lépésben megy végbe. Az ADP távozását további konformáció-változás kíséri, mely lehetővé teszi újabb nukleotid kötődését, de a kölcsönhatás a szubsztrát és a Pgp között továbbra is gyenge marad. Ezt követően végbemegy a második ATP hidrolízise (V.). Kinetikáját tekintve a két ATP hidrolízise (II. és V.) nem megkülönböztethető. Az első ATP-hidrolízis folyamatához hasonlóan, a második ATP hidrolízise után is blokkolható a fehérje nátrium-orto-vanadáttal (VI.A és VI.B) (Dey és *mtsai*, 1997; Senior és *mtsai*, 1995; Hrycyna és *mtsai*, 1998; Urbatsch és *mtsai*, 1998;1 Senior & Bhagat, 1998). Az újabb P_i (VI.) és ADP felszabadulása (VII.) teszi teljessé a Pgp ciklusát és állítja vissza az újrakezdéséhez szükséges fehérje konformációt, ahol újra lehetséges a szubsztrát és a nukleotid kötődése. A modell alapján egy teljes katalitikus ciklushoz két ATP hidrolízise szükséges (Sauna & Ambudkar, 2000), amely összhangban van a sztöchiometriai mérések eredményeivel (Ambudkar és *mtsai*, 1997; Shapiro & Ling, 1998). Különböző szubsztrátok esetén a vanadát indukálta ADP-blokkolás és a szubsztrát-indukálta ATPáz-aktivitás mértéke között lineáris korreláció figyelhető meg (Kerr és *mtsai*, 2001). Ez a szoros összefüggés és az inorganikus foszfát Pgp-

hez való alacsony affinitása (Urbatsch és mtsai, 1995/1.) arra engednek következtetni, hogy a katalitikus ciklus sebesség meghatározó lépése az ADP disszociációja, azaz a ciklus IV. és VII. lépése lehet (Kerr és mtsai, 2001).

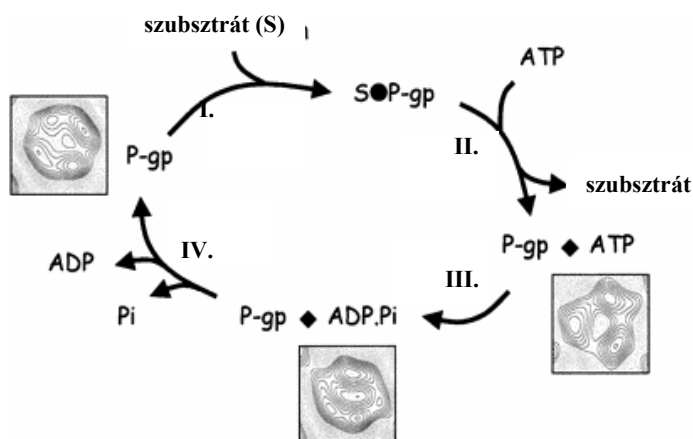
A fehérje katalitikus ciklusával összefüggő konformáció-változásai cisztein-mutáns Pgp-n, thiol-csoportok keresztkötésére alkalmas, különböző hosszúságú szulfhidril reagensekkel (M8M, 1.3 nm; M6M, 1.04 nm) nyomon követhetőek (6. ábra) (Loo & Clarke, 2002). A Loo és Clarke elképzelése szerinti modellben a transzporter fehérje egy ciklus során legalább három jelentős konformáció-változáson megy keresztül (A, B és C). A szubsztát először diffúzió útján a lipid kettősrétegbe jut és ott a kötőhelyéhez kapcsolódik. A szubsztát kötődésével a drog-kötőhelyben végbemenő konformáció-változás áterjed a nukleotid-kötő doménekre is (A) (Loo és mtsai, 2003). Az első



6. ábra A Pgp általi drog-transzport folyamat három jelentős konformáció-változását kiemelő modell (Loo & Clarke, 2002)

ATP hidrolízise egy vagy több transzmembrán domén rotációjával (Loo & Clarke, 2001) vagy laterális elmozdulásával (Loo & Clarke, 1997) megváltoztatja a transzmembrán régió konformációját, amely változást idéz elő a szubsztát-Pgp kölcsönhatásban (B). A második ATP hidrolízisével a szubsztát-kötőhely „összezáródik”, melyet a drog felszabadulása kísér (C).

Alternatív transzport ciklus modellt ír le Rosenberg és Higgins (7. ábra) (Rosenberg és mtsai, 2001; Higgins & Callaghan, 2001). A Pgp szerkezetének változásait a transzport ciklus egyes lépéseiben krio-elektron-mikroszkópia segítségével követték nyomon. A katalitikus ciklus a drognak a transzmembrán domének által kialakított, nagy affinitású kötőhelyhez való kapcsolódásával kezdődik. Az ATP kötődésével a



7. ábra A Pgp transzport-folyamatának modellezése a konformációs változásokon keresztül (Rosenberg és mtsai, 2001)

transzmembrán domének átrendeződnek, ami a drog affinitásának csökkenését eredményezi és közben kialakul egy centrális pórus, amely a drog-kötőhelyet „megnyitja” az extracelluláris milió felé. Ellentétben az előbb bemutatott modellekkel, itt a nukleotid kötődése és nem a hidrolízise vezet a drog extracelluláris térbe való transzportjához. A drogok fehérjéhez való affinitása az ATP hidrolízisét követően még mindig alacsony. A Pgp az ADP és az inorganikus foszfát disszociációjával nyeri vissza eredeti szerkezetét, amelyben újra szerveződik a nagy affinitású drog-kötőhely és a fehérje visszatér egy új ciklus kiindulópontjához, egyetlen ATP-hidrolízis energiájának felhasználásával.

Sharom és munkacsoportjának kísérletei is a katalitikus ciklus alapvető sztöchiometriai és nukleotid- ill. szubsztrát-fehérje affinitás-változásainak kérdéseire kerestek választ. A Pgp alap- és katalitikus átmeneti állapotának jellemzéséhez fluoreszcencia spektroszkópiás eszköztárat használtak. Megállapították, hogy a drog- és a nukleotid-kötés kialakulásának sorrendje egymástól független (Liu & Sharom, 1996). Újabb eredményeik szerint, a kiindulási állapotban a drog jelenléte a szubsztrát-kötőhelyen a nukleotid megnövekedett, míg az átalakulási stádiumban az ADP csökkenő affinitását eredményezi. Bár szubsztrát jelenlétében a nukleotid affinitásbeli különbsége nem nagymértékű, de valószínűleg elegendő ahhoz, hogy a katalitikus ciklust tovább vigye. Továbbá, a Pgp mindkét nukleotid-kötő doménje képes az ATP vagy ADP kötésére és azok affinitása – szubsztrátok távollétében – mind az alap, mind az átmeneti állapotban közel azonos. A drog kötés affinitása nem változik a vanadáttal blokkolt vagy az ADP-hez kapcsolt Pgp-ben a kiindulási állapothoz képest, ami valószínűsíti a drog felszabadulását még az átmeneti stádium kialakulása előtt (Qu és *mtsai*, 2003/2.). Eredményeik alapján a katalitikus ciklus egyes jellemzői részben eltérhetnek az előbbieken bemutatott modellektől.

1.7. A Pgp konformáció-változásaira érzékeny monoklonális ellenanyagok

A transzport-folyamat egyes lépéseit követő konformációs állapotok nyomon követésére lehetőséget adnak a Pgp kimutatására kifejlesztett egyes monoklonális ellenanyagok (Mechetner & Roninson, 1992; Mechetner és *mtsai*, 1997). Számos Pgp ellenes monoklonális antitest készült és ezek között van olyan, amely a humán Pgp-n kívül az egérben és hörcsögben kifejeződőt is felismeri. Ilyen tulajdonsággal rendelkezik pl. a C219 antitest is, mely egy rövid, lineáris, konzervált intracelluláris peptid szakaszt ismer fel az ATP-kötőhely közelében, a fehérje mindkét felén (Zhang és *mtsai*, 1996). A JSB1

monoklonális ellenanyag szintén intracelluláris epitóppal rendelkezik (Broxterman és *mtsai*, 1989). Jóval nagyobb számban vannak a humán Pgp extracelluláris epitópjaihoz kötődő antitestek. Az MM4.17 antitest az első olyan, humán Pgp-re specifikus ellenanyag, melynek epitópját valószínűleg egyetlen, extracellulárisan elhelyezkedő, lineáris aminosav szekvencia alkotja (Cianfriglia és *mtsai*, 1994). Az összetett epitóppal rendelkező antitestek a Pgp-hez való kapcsolódásban több extracelluláris, egymástól meglehetősen távol eső peptid szakasszal vesznek részt, pl. ilyenek az MM12.10, MM6.15, MRK16, MC57, 4E3 és az UIC2 monoklonális ellenanyagok (Romagnoli és *mtsai*, 1999; Cianfriglia és *mtsai*, 1995; Georges és *mtsai*, 1993; Poloni és *mtsai*, 1995; Arceci és *mtsai*, 1993; Mechetner & Roninson, 1992). Ezen antitestek kötődése befolyásolhatja a Pgp működését MDR pozitív sejteken: pl. az MRK16 növeli a vinca alkaloidok és az actinomycin D intracelluláris akkumulációját és ezzel citotoxikus hatását (Hamada & Tsuruo, 1986). Az ún. konformációs antitestek közé tartozik az UIC2 és az MC57, melyek kötődésének affinitása változhat a transzport-folyamathoz kapcsolódó konformáció-változások során (Mechetner & Roninson, 1992; Jachez és *mtsai*, 1994; Poloni és *mtsai*, 1995). Az UIC2 antitest kötődése igen jelentős konformáció-függést mutat és gátolva a Pgp transzport aktivitását, növelni képes számos drog akkumulációját is (Mechetner & Roninson, 1992; Mechetner és *mtsai*, 1997; Cianfriglia és *mtsai*, 1995; Arceci és *mtsai*, 1993; Schinkel és *mtsai*, 1993; Georges és *mtsai*, 1993). A szintetikus peptidek segítségével feltérképezett MM12.10 mAb érdekes tulajdonsága, hogy a klasszikus membrán topológia szerint intracelluláris térrészbe eső aminosav szekvencia is a komplex epitóp részét képezi. Ez és más adatok felvetik a Pgp alternatív, a konvencionális modelltől eltérő membránbeli elrendeződésének lehetőségét (Zhang és *mtsai*, 1996; Zhang & Ling, 1991).

Az UIC2 antitest epitópját az 1., a 4. és a 6. extracelluláris hurkokon elhelyezkedő peptid szekvenciák (Schinkel és *mtsai*, 1993; Roninson és Mechetner még nem publikált adatai), valamint a 11. transzmembrán hélix egy része alkotja (Mechetner, *személyes közlés*). Zhou és Pastan eredményei szerint, az 5. és a 6. transzmembrán régiót összekötő extracelluláris hurok épsége is szükséges az UIC2 megfelelő kötődéséhez. A 6. transzmembrán doménben bekövetkező mutáció szintén befolyásolja az antitest kötődésének mértékét. Részben ezzel összefüggésben (hiszen a 6. transzmembrán domén aktívan részt vesz a drogok transzportjában, ld. fentebb), az UIC2 változó reaktivitása valószínűleg a Pgp transzport-folyamataival összefüggő konformáció-változások eredménye (Zhou és *mtsai*, 1999). A UIC2 antitest további nagyon fontos és érdekes tulajdonsága, hogy a sejtfelszíni Pgp molekuláknak csak egy részéhez kötődik, míg szubsztrátok, revertáló ágensek jelenlétében a kötődés mértéke 2-5-szörösére növekszik (Mechetner és *mtsai*, 1997). Az ATP depléciója

növeli az UIC2 reaktivitását, míg ugyanez pl. az MRK16 kötődésének mértékét nem befolyásolja (Mechetner és *mtsai*, 1997). Intakt sejteken a Pgp-k kb. 80 % -a köt nukleotidot – tipikus (1.5-2 mM) intracelluláris ATP koncentráció mellett –, azaz alacsony UIC2 reaktivitású konformációban van (Qu és *mtsai*, 2003/1.).

A Pgp katalitikus ciklusa során olyan komplex konformáció-változásokon mehet keresztül, amely átrendezi a molekula extracelluláris hurkainak helyzetét, így befolyásolva a konformációs antitesttel való jelölhetőségét.

1.8. A Pgp és lipidkörnyezete

A Pgp és membrán-környezete szoros kapcsolatban áll egymással. A fehérje tisztítása során szoros fehérje-lipid kapcsolat marad fenn ill. a teljes delipidáció a fehérje-aktivitás teljes hiányát eredményezi (Sharom és *mtsai*, 1995; Callaghan és *mtsai*, 1997; Doige és *mtsai*, 1993). A Pgp-membrán kapcsolat vizsgálata során kimutatták, hogy bizonyos membrán-asszociált lipidek (pl. foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-szerin) jelenléte szükséges a fehérje megfelelő működéséhez, míg egyes foszfolipidek (foszfatidil-szerin, foszfatidil-inozitol) nagyobb koncentrációban gátolják a Pgp funkciót (Sharom és *mtsai*, 1995).

Az integráns membránfehérjék izolálására általában detergenseket alkalmaznak. Ugyanakkor már az MDR fenotípus leírásával egyidőben felismerték, hogy a Tween 80 kemoszenzitizáló hatású (Putman és *mtsai*, 1999) és kereszt-rezisztenciát alakít ki kationos-amfifil molekulákkal szemben (Loe & Sharom, 1993; Ramu & Ramu, 1993; Dellinger és *mtsai*, 1992). Számos nem ionos detergens befolyásolja a Pgp-szubsztrátjainak toxicitását és/vagy sejtbeli akkumulációját (Borrel és *mtsai*, 1995; Loe & Sharom, 1993; Drori és *mtsai*, 1995; Dudeja és *mtsai*, 1995; Regev és *mtsai*, 1999; Woodcock és *mtsai*, 1992; Zordan-Nudo és *mtsai*, 1993; Coon és *mtsai*, 1991). Kimutatták, hogy a Tiron X-100 alacsony koncentrációban szignifikánsan gátolni tudja a fotoaktív szubsztrát-analóg azidopin kötődését a Pgp-hez (Loe & Sharom, 1993; Zordan-Nudo és *mtsai*, 1993). Későbbi, mesterségesen előállított membránvezikulákon végzett ATP-áz mérések szerint, a legtöbb detergens – szolubilizációt nem okozó koncentrációban – gátolja a drogok kötődését és hatással van a drog-stimulálta ATP-áz aktivitásra (Callaghan és *mtsai*, 1997; Orlowski és *mtsai*, 1998). Higgins és munkacsoportja kimutatta, hogy a Triton X-100 által kiváltott ATP-hidrolízis és a drog kötődés gátlása lipidek hozzáadásával kivédhető (Callaghan és *mtsai*, 1997).

Urbatsch és Senior *E. Coli* membrán rendszerébe építette bele a Pgp-t, de az ott nem mutatott drog-stimulálta ATP-áz aktivitást, míg bárány agyvelőben és szarvasmarha májban rekonstruált lipid rendszerben igen (Urbatsch & Senior, 1995). Mivel a plazmamembrán lipid összetétele függ a sejt típusától, eredményeik arra engednek következtetni, hogy a Pgp fiziológias szerepe nagymértékben szövet-specifikus lehet. A lipidek közül a koleszterin szerepére hívja fel a figyelmet az a megfigyelés, hogy a Pgp fokozott mértékben mutatható ki kaveolin-tartalmú membrán részekben (Lavie és mtsai, 1998) illetve MDR sejteken a glikozilceramid és a kaveolin szintje jelentősen megemelkedik (Lavie & Liscovitch, 2000). A koleszterin-kötő kaveolin komponense lehet az alacsony denzitású lipid mikrodoméneknek az ún. lipid tutajoknak. A koleszterin további érdekes tulajdonsága, hogy koncentrációját emelve a Pgp aktivitása kezdetben növekszik, ugyanakkor 20% membrán koleszterin-tartalom felett csökkenő tendenciát mutat (Saeki és mtsai, 1992).

A lipideknek és detergenseknek a Pgp funkciójára való moduláló hatása és az utóbbi időben a Pgp-nek más élettani folyamatokban körvonalazódó szerepe (pl. a lipid anyagcsere (van Helvoort és mtsai, 1996)) alapján elképzelhető, hogy a fehérje működésében fontos szerepe van a Pgp és a membrán (feltehetően meghatározott lipid domének) dinamikus kapcsolatának.

1.9. A Pgp szubsztrátjai és modulátorai

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 (Zamora és mtsai, 1988). Azonban a Pgp pl. a hidrofíl természetű negatívan töltött methotrexatot is képes felismerni, akárcsak a bázikus nitrogén atomot nem tartalmazó szteroid hormonokat (Ambudkar és mtsai, 1999; Bain és mtsai, 1997; Seelig, 1998; Seelig & Landwojtowicz, 2000). A Pgp szubsztrátjai között a daganatellenes szerek mellett számos egyéb, gyógyászatban használt vegyület is megtalálható (pl. maláriaellenes szerek, narkotikumok, antidepresszánsok) (4. táblázat, 61. és 62. oldal).

Számos olyan vegyületet ismerünk, mely képes más szubsztrátok transzportját gátolni vagy teljesen megakadályozni, ezek az ún. modulátorok vagy revertáló ágensek. Mivel a modulátorok általában maguk is szubsztrátjai a Pgp-nek, így éles határvonal szubsztrát és revertáló ágens között nem húzható. A modulátorok egyik prototípusa, a verapamil, képes kompetitív módon gátolni a transzport-funkciót. A verapamil szubsztrátja is a Pgp-nek, de nagy passzív permeabilitási állandója miatt akár viszonylag kis koncentráció mellett is könnyen feldúsul a sejtekben és kiszorítja a drog-kötőhelyről a jelenlévő más szubsztrátokat (Ford, 1996; Eytan és mtsai, 1996). Ezzel szemben a ciklosporin A gátolja a szubsztrát felismerést (Tamai & Safa, 1991) és az ATP-hidrolízist is (Ramachandra és mtsai, 1998). Általában két szubsztrát közül a Pgp azt szállítja gyakrabban (nagyobb sebességgel), amely nagyobb számú és erősebb hidrogén kötés kialakítására képes (Seelig & Landwojtowicz, 2000), vagyis K_M -je kisebb. Továbbá, a hidrofób tulajdonság erősödésével a szubsztrátok viszonylag gyors mozgása a membránban azt eredményezi, hogy a Pgp nem tud lépést tartani azok beáramlásával (Eytan és mtsai, 1996; Scala és mtsai, 1997; Eytan és mtsai, 1997; Mülder és mtsai, 1995; Barnes és mtsai, 1996; Friche és mtsai, 1990), s így az aktív transzport esetleg nem, vagy nehezen mérhető.

A Pgp ATPáz-aktivitásának vizsgálata sok hasznos eredménnyel szolgált a fehérje működésének megismeréséhez. Valószínűleg endogén lipidek, vagy más endogén szubsztrátok jelenlétével magyarázható a Pgp jól mérhető alap ATPáz-aktivitása, melyet általában szubsztrátok jelenléte serkent. A szubsztrátok a Pgp ATPáz-aktivitására gyakorolt hatásuk szerint három csoportba sorolhatóak. Az I. osztályba tartozó vegyületek (pl. vinblasztin, verapamil, paclitaxel) alacsony koncentrációban serkentik az ATPáz aktivitást, míg magasabb koncentrációban gátolják azt. A II. osztály tagjai (pl. bizantron, valinomicin) dózis-függően képesek növelni az ATPáz-aktivitást, de nincs gátló hatásuk, míg a III. osztályba sorolható drogok (mint pl. ciklosporin A, rapamicin, gramicidin D), gátolják mind az alap, mind a verapamil-stimulálta ATPáz-aktivitást (Sarkadi és mtsai, 1992; Ambudkar és mtsai, 1996).

A Pgp által szállított vegyületek közötti hasonlóságok és különbségek megértése újabb, hatékonyabb szubsztrátok és revertáló ágensek keresésére és így jobb kombinált kemoterápia kifejlesztésére adhat lehetőséget.

1.10. A Pgp klinikai jelentősége

A Pgp biokémiai és klinikai jellemzése nagy jelentőséggel bír, hiszen a rosszindulatú daganatok terápiájában a kemoterápia a leggyakrabban előforduló gyógymód. A tumoros megbetegedések egy része, mint például a gyermekkori akut leukémiák esetén, a kombinált citosztatikus kemoterápiával megfelelő gyógyulási eredményeket lehet elérni. Sajnos a gyakrabban előforduló daganatos megbetegedések, pl. a vastagbél, a gyomor, a tüdő, az emlő rosszindulatú tumorai esetén az intrinsic rezisztencia, vagy a gyógyszeres kezelést követően kialakuló, szerzett rezisztencia következtében a daganatos szövet érzékenysége számottevően csökken és így a kezelés hatástalannak bizonyul (Gottesman & Pastan, 1993). A diagnózis felállításakor kimutatható MDR fenotípus rossz prognózist jelent, míg ha a fehérje expressziója nem mérhető, az esélyt adhat a hosszú távú túlélésre. Erős Pgp expressziót mutatnak azok a még kezeletlen tumoros megbetegedések, melyek proliferáló szövetei fiziológiás körülmények között is kifejezik a fehérjét, így pl. a vese, a máj, a bél daganatai, vagy a primer agytumor (Hamada & Tsuruo, 1986; Zhou és *mtsai*, 1999; Jachez és *mtsai*, 1994; Osmak, 1993; Itsubo és *mtsai*, 1994; Kawamoto és *mtsai*, 1997; Aran és *mtsai*, 1999). Malignus hematológiai betegségekben már felfedezésükkor magas Pgp expressziós szintet találnak, ami a kemoterápiás kezeléssel, illetve a betegség progressziójával fokozódik (Rochlitz és *mtsai*, 1992; Licht és *mtsai*, 1994; Marie, 1995; Marie és *mtsai*, 1996; Sonneveld, 1999; Friedenberg és *mtsai*, 1999). A non-Hodgkin limfóma a diagnózis felállításakor nem mutat Pgp pozitivitást, azonban a kezelés hatására gyógyszer-rezisztencia alakul ki (Marie, 1995). Az emlőrák és az ovárium tumorok is többnyire Pgp-negatívak és csak az alkalmazott, elsősorban doxorubicinnel történő kezelések hatására növekszik meg a multidrog rezisztenciát okozó fehérjék expressziója (Leighton, 1995).

Számos molekuláris biológiai (gén expresszió az mRNS szintjén), immunológiai (a Pgp mennyiségének meghatározása) és funkcionális megközelítésű (festék akkumuláció mérése) eljárást dolgoztak ki a Pgp kimutatására és/vagy az expresszió mértékének megbecsülésére. A legelterjedtebben használt módszer valamely fluoreszcens szubsztrát (pl. antraciklinek, rodamin 123, Hoechst, Fluo-3, verapamil-analógok, calcein-AM) és egy inhibitor együttes alkalmazása. Így különböző megközelítésben határozható meg a Pgp transzport-funkciója, pl. a fluoreszcens szubsztrát sejtekbe történő akkumulációjának, vagy kiáramlásának mérésével (Sarkadi & Müller, 1997; Kessel, 1989; Broxterman és *mtsai*, 1996; Holló és *mtsai*, 1994; Homolya és *mtsai*, 1996). Utóbbiak hátránya, hogy az alkalmazott anyagok fluoreszcencia intenzitását és felhalmozódását a sejtekben az intracelluláris pH és

ionösszetétel, a membránpotenciál vagy akár aspecifikus kötődés is befolyásolhatja. Gyakran használt fluoreszcenciás eljárás a rodamin 123 kiáramlásának mérésén alapuló teszt, bár ez nem, illetve kevésbé alkalmazható ABCC1/MRP1 és ABCG2/BCRP típusú pumpa fehérjék esetén (Kessel, 1989; Litman és mtsai, 2001; Honjo és mtsai, 2001). A legtöbb előnyös tulajdonsággal a calcein-teszt rendelkezik, mely rövid és egyszerűen kivitelezhető eljárás, az intenzív zöld fluoreszcencia könnyen mérhető pl. áramlási citometria segítségével és az intracelluláris környezet nem befolyásolja a festék akkumulációját vagy spektrális tulajdonságait (Homolya és mtsai, 1993; Homolya és mtsai, 1996; Karászi és mtsai, 2001). Továbbá, megfelelő revertáló ágensek választásával az ABCC1/MRP1 kimutatására is alkalmazható, mivel a calcein AM szubsztrátja mind a Pgp-nek, mind az ABCC1-nek (Holló és mtsai, 1996).

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 (Marie és mtsai, 1994; Lankelma és mtsai, 1996; Broxterman és mtsai, 1998). Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan nemzetközileg elfogadott és standardizált módszer, amely egy egységes, ellentmondásmentes diagnózist adó, akár összetett klinikai próba lenne (Noonan és mtsai, 1990; Marie és mtsai, 1997; Okochi és mtsai, 1997; Beck & Grogan, 1997; Huet és mtsai, 1998).

A citosztatikumok nagy része a Pgp szubsztrátja, ezért célszerűen olyan gyógyszerekre lenne szükség, amelyeket a Pgp nem ismer fel. Az ezirányú törekvések sikere azonban kétségesnek tűnik a fehérje szubsztrát-felismerő promiszkuitása ismeretében. Egy potenciális módszer lehet a kemoterápiás ágens hordozó molekulához való kötése, melynek eredményeként az a fehérje számára nem lesz felismerhető, de megtartja citotoxikus tulajdonságát és így hatásos citosztatikumként használható (Cherif & Farquhar, 1992; Thierry és mtsai, 1993; Pawlak és mtsai, 2000; Gottesman és mtsai, 2002).

Bár a Pgp-szubsztrát kölcsönhatások in vitro tanulmányozása segítséget nyújt az új drogok kifejlesztéséhez, az így azonosított ill. jellemzett inhibitorokra és szubsztrátokra vonatkozó adatok extrapolálása a humán terápia színterére számos megoldandó problémát vet fel. Mivel a Pgp in vivo számos fiziológiás szereppel rendelkezik (bár Pgp-deficiens knock-out egereken végzett kísérletek szerint a funkcionális Pgp fontos, de nem feltétlenül létfontosságú védelmi szerepet lát el (Schinkel és mtsai, 1997)), a revertáló ágensek hatása nemcsak a daganatos szövetekben lép fel, hanem az ép Pgp-t expresszáló szövetek működését is befolyásolja, így nem várt mellékhatásokat okozhat. További kérdést vet fel, hogy a modulátorok klinikailag hatékony dózisa a szervezet számára még tolerálható koncentráció-e.

Szélesebb körű klinikai tapasztalat egyelőre csak a modulátorok ún. első generációjával kapcsolatban van, mint például a verapamil, a diltiazem, ciklosporin A, vagy a kalmodulin gátlók. A fejlesztések alatt álló második generációs szerek már kisebb koncentrációban is jó Pgp modulátorok. Ilyen ígéretes revertáló ágens a ciklosporin analóg SDZ PSC 833, vagy a verapamil analóg R-verapamil, melyek alkalmazása esetén a tipikus mellékhatások (immunszuppresszió, kardiotoxicitás) kevésbé jelentkeznek (Sonneveld és *mtsai*, 1994). A legújabb modulátorok már kifejezetten egy-egy meghatározott gyógyszer-rezisztenciáért felelős transzporter gátlására irányulnak, mint például a Pgp-re szelektív és nagy affinitású reverzin (Sharom és *mtsai*, 1999).

A multidrog rezisztencia legyőzésére elméletileg a Pgp monoklonális antitestjei is bevezethetők lennének. Elsősorban azok az ellenanyagok lehetnének hatásosak, melyek a Pgp extracelluláris epitópjaihoz kötődve gátolják a fehérje funkcióját (Mechetner & Roninson, 1992; Tsuruo és *mtsai*, 1989; Pearson és *mtsai*, 1991).

Bár a Pgp által megvalósított transzport-folyamatról egyre több információval rendelkezünk, működésének részletes mechanizmusa még nem ismert. A fehérje működése még feltáratlan mozzanatainak vizsgálata hozzájárulhat a gyógyszer-rezisztencia kivédéséhez a klinikai gyakorlatban, pl. újabb, hatékonyabb és szelektívebb revertáló szerek kifejlesztésével.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A P-glikoprotein az emberi daganatos betegségeknek majdnem a 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 (Gottesman és *mtsai*, 2002). A Pgp kifejeződés mértékének diagnosztizált növekedése orientálja a kemoterápiás protokoll megválasztását, ill. a fehérje sejtfelszínen való kifejeződésének kvantitatív jellemzése prognosztikai jelentőséggel is bír számos daganat klinikumában. A kemoterápiában hatékonyan működő drog-kombinációk MDR szempontból való vizsgálatához és új, hatékonyabb revertáló szerek szűréséhez egyaránt, meg kell érteni a fehérje működését, megoldani mechanizmusának feltáratlan mozzanatait.

A jelenleg rendelkezésre álló szerkezeti modellek egyelőre nem teszik lehetővé, hogy a szubsztrátok megkötésének és sejtől 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 sajátságokkal rendelkező hidrofób vegyületeket felismerését és szállítását megvalósítja, nem ismertek a fehérje alak- (konformáció-) változásai, melyek a szubsztrát transzlokációt előidéznek 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.

Munkacsoportunk érdeklődése a fenti kérdéskörre 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. Célkitűzéseink 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.

Célkitűzéseink a következők 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.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejttenyésztés

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. A KB-3-1, a KB-V1 és az NIH 3T3 sejtvonalakat M. Gottesman (NIH, Bethesda, USA), a KB-8-5 sejtvonalat pedig J. Lankelma (Dept. Medical Oncology, Vrije Universiteit, Amsterdam) bocsátotta rendelkezésünkre. A sejteket 10% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FCS, Gibco), 5 mM glutaminsavat és 25 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco) tenyésztő folyadékban növesztettük állandó körülmények mellett (37 °C, 5 %-os CO₂ atmoszféra, 95 %-os páratartalom). A Pgp-t kifejező sejtvonalakat 180 nM vinblasztint (KB-V1), 10 nM kolhicint (KB-8-5) és 2 µM doxorubicint (NIH 3T3 MDR1) tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn és felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő oldatban növesztettük. Sejtvonalaink mindegyike a felülethez tapadva növekedett, így a kísérleteinkhez tripszines kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót.

3.2. Pgp ellenes monoklonális antitestek

Az MM12.10, MM6.15, MM4.17 monoklonális antitesteket M. Cianfriglia (Istituto Superiore di Sanita, Róma) bocsátotta rendelkezésünkre. Vizsgálataink során használtunk további Pgp ellen termeltetett antitesteket is: MRK16 (T. Tsuruo), 4E3 (R. Arceci, Dana Farber Cancer Institute) és UIC2 (E. Mechetner, Oncotech, Irvine USA). Az UIC2 antitestek egy részét tisztított formában E. Mechetner-től kaptuk ill. hibridóma sejtek felülúszójából, protein A affinitás-kromatográfia alkalmazásával magunk izoláltuk.

Az UIC2 antitest Fab fragmentumait papaionos emésztéssel állítottuk elő. Ennek során a teljes antitestet először átdializáltuk pH=8.00 PBS-be (100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), majd L-cisztein jelenlétében papainnal emésztettük (11 perc, 37 °C) és az emésztési reakciót jó-d-acetamiddal állítottuk le. Sephadex-100 oszlopon történő gélszűrőssel

nyertük az Fab és Fc fragmentumokat is tartalmazó frakciókat, melyekből az antitestek Fc részét megkötő protein A oszlop alkalmazásával választottuk el a tiszta Fab frakciót.

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) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ill. szulfoindocianin-szukcinimidil észterrel (Cy3 és Cy5) (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA) és biotinamido-kaprónsav-N-szukcinimidil észterrel (biotin) (Sigma) konjugáltuk. Az antitesthez nem kötődött festék ill. biotin, felesleget Sephadex-G25 oszlopos gél-szűrési technikával távolítottuk el. A festék-fehérje arányt spektrofotometriásan határoztuk meg, melynek értéke a teljes antitestek esetén az optimális körülbelül 3:1 ill. az Fab fragmentum esetén 1:1 volt. Jelöletlen antitesttel végzett kompetíciós kísérletben igazoltuk, hogy a festékekkel konjugált antitestek a Pgp-hez való specificitásukat megőrizték.

3.3. Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése

Immunfluoreszcens jelöléshez 7 % glükóz tartalmazó PBS-ben 1×10^6 db sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót hoztunk létre. Kísérleteink első lépése egy 10 perces szubsztráttal/modulátorral való ill. anélküli előkezelés volt, melyet 37 °C-os vízfürdőben végeztünk. A kezelések során a következő vegyületeket (Sigma) a zárójelben megadott koncentrációkban (4.4.1.2. pontban leírt szempontok alapján választva) használtuk : o- és m-amszakrin (5 μ M), oligomicin (5 μ M), SDZ PSC 833 (8.3 μ M), ciklosporin A (10 μ M), gramicidin D (10 μ M), prazosin (10 μ M), valinomicin (10 μ M), mibefradil (17.5 μ M), benzokain (20 μ M), dezipramin (20 μ M), imipramin (20 μ M), ivermektin (20 μ M), lidokain (20 μ M), maprotilin (20 μ M), mitomicin C (20 μ M), puromicin (20 μ M), kinidin (20 μ M), kinin (20 μ M), tamoxifen (20 μ M), taxol (20 μ M), trimipramin (20 μ M), aktinomicin D (40 μ M), genisztein (40 μ M), vinblasztin (70 μ M), verapamil (75 μ M), haloperidol (80 μ M), nifedipin (100 μ M), prednizon (200 μ M), tetrakain (320 μ M) és 5 mM nátrium-azid ill. 5 mM 2-deoxi-D-glükóz.

Ezután a sejteket a telítő koncentrációban alkalmazott UIC2, MRK16, 4E3 (10 μ g/ml) ill. MM12.10, MM6.15, MM4.17 (8 μ g/ml) antitestekkel, 20 percig, 37 °C-on inkubáltuk.

Antitestek kompetíciójának vizsgálatához az elsőként szereplő mAt inkubációját egy további, 20 perc időtartamú kezelés követte a második antitest jelenlétében. Amennyiben az antitest ill. Fab fragmentum fluorofórral volt konjugálva a jelöléseket sötétben végeztük. Indirekt jelölés esetén a sejteket a jelöletlen (ill. biotinált UIC2) antitestekkel inkubáltuk (előzőek szerint), majd kétszer mostuk szobahőmérsékletű PBS-ben, ezután 4 °C-on 45 percig jelöltünk az FITC-, sFx-, Cy3-, vagy Cy5-konjugált poliklonális másodlagos (nyúlban termeltetett, egér ellenes IgG, RaMIgG, Sigma) antitesttel (10 µg/ml), esetleg streptavidin-Cy5-val (10 µg/ml) (Sigma). Végül a sejteket hideg (4 °C) PBS-ben mostuk és mérésig jégen tartottuk vagy 1 %-os formaldehid oldattal fixáltuk. (Az élő illetve a fixált sejteken kapott eredmények között a mérési hibán belül nem volt eltérés.) Fluoreszcens mikroszópikus kísérletekhez mintáinkat a sejtszuspenzióból 1 mg/ml 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 keresztökötését – az UIC2 antitesteken keresztül – RaMIgG-gal (10 µg/ml, 4 °C, 45 perc) végeztük. A Pgp és más sejtfelszíni fehérjék egymáshoz rögzítését formaldehides fixálással (1 %, 4 °C, 30 perc) 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. A FITC- és sFx-konjugált antitesteknél a 488/530±30 nm, a Cy3 konjugátum esetén 488/585±21 nm, míg Cy5 esetén a 635/661±8 nm fluoreszcencia intenzitásokat detektáltunk, Becton Dickinson FACScan ill. FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) áramlási citométerek segítségével. A sejtörmelékeket és az elpusztult sejteket az előre irányuló fényszórás és propidium-jodidos festés segítségével kapuiztuk ki.

3.4. Fluoreszcens festék akkumuláció meghatározása áramlási citometriával

Áramlási citometriás festék akkumuláció méréséhez 5×10^5 db sejt/ml koncentrációjú sejtszuspenziót inkubáltunk 2 µM daunorubicin (DNR, Sigma) vagy 0.25 µM calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) és Pgp-szubsztrátok ill. modulátorok jelenlétében vagy távollétében 37 °C-on, 7 mM glükózt tartalmazó PBS-ben, gyakori rázogatas mellett. A szubsztrátokkal/modulátorokkal történő 10 perces előkezelést a DNR esetében 45 perces, a

calcein-AM esetében 15 perces további inkubáció követte. Az áramlási citometriás mérés előtt a mintákat kétszer mostuk hideg PBS-ben 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 fent bemutatott kísérleti eljárást módosítottuk: a 10 perces szubsztráttal/modulátorral való előkezelést a monoklonális antitestekkel való inkubáció (20 perc) és kétszeri 1 % BSA-t (albumin marha vérsavóból, Sigma) tartalmazó PBS-ben történő mosás követte, majd ezután következett a festék akkumulációs lépés (fent bemutatott módon).

3.5. Áramlási citometriás energiatranszfer mérések

A Förster típusú fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) egy gerjesztett állapotban lévő fluorofór (donor), valamint egy megfelelő spektroszkópiás paraméterekkel rendelkező molekula (akceptor) között dipólus-dipólus kölcsönhatás (rezonancia) révén megvalósuló, sugárzás nélküli energiaátadás. Az energiatranszfer következtében a donor alapállapotba, míg az akceptor gerjesztett állapotba kerül.

Egy adott donor és akceptor molekula között lezajló energiatranszfer valószínűsége (k_T) függ a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektruma átfedésének mértékétől (J), a donor emissziós dipólusának és az akceptor abszorpciós dipólusának relatív orientációjától (κ^2) valamint a két fluorofór közötti távolságtól (R):

$$k_T \propto JR^{-6}\kappa^2$$

Az energiatranszfer jellemezhető a transzfer hatásfokával (E), amely közvetlenül függ a donor-akceptor távolságától (R):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6},$$

ahol R_0 az a donor-akceptor távolság, amely esetében a transzfer hatásfoka pontosan 50 %.

Az E meghatározása a donor és/vagy az akceptor különböző fluoreszcenciás paramétereinek értékében bekövetkező változások mérésén keresztül történik.

Kísérleteinkben kihasználtuk, hogy a FRET alkalmas a membránfehérjék sejtfelszíni asszociációinak és biológiailag aktív molekulák konformáció-változásainak jellemzésére. A

transzferhatásfok értéke ebben az esetben több lehetséges donor-akceptor távolság statisztikus átlagából adódik, mely alapján a vizsgált fehérjék molekuláris közelségére, vagy annak hiányára következtethetünk.

Áramlási citometriás energiatranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer, FCET) méréseink során azt a tényt használtuk ki, hogy energiatranszfer hatására mind a donor, mind az akceptor által emittált fluoreszcencia intenzitás megváltozik: a donor fluoreszcenciája csökken (kioltás), ugyanakkor az akceptoré növekszik (szenzitizált emisszió). 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 (Trón és *mtsai*, 1984; Szöllősi és *mtsai*, 1998; Sebestyén és *mtsai*, 2002).

3.6. Konfokális pásztázó lézer mikroszkópiás kísérletek

Konfokális mikroszkópos képeink elkészítéséhez Bio-Rad MRC 1024ES (Pécsi Orvostudományi Egyetem) és Zeiss 420 (University of Rostock, Németország) típusú pásztázó lézer mikroszkópot használtunk. A gerjesztéshez argon lézer 488 nm-es (sFx) és argon-kripton lézer 633 nm-es vonalát (Cy5) használtuk. A gerjesztő és az emittált fény elválasztására 488/633 nm-es dupla dikroikus tükröt alkalmaztunk. Az emittált fényt 505/35 nm-es sávszűrő (sFx) illetve 700 nm-es felül áteresztő szűrő (Cy5) segítségével detektáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

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

A Pgp szubsztrátjainak megkötése és a sejtől történő eltávolítása során bekövetkező konformáció-változásokat számos kísérleti adat demonstrálja (ld. Bevezetés). A transzport-folyamat valószínűleg komplex, azonban a ma rendelkezésünkre álló eszköztár a drogok szállításának csak egy-egy markáns momentumát képes megragadni. A katalitikus ciklus egyes lépéseit követő konformációs történések nyomonkövetésére ad lehetőséget olyan, a Pgp ellen termeltetett antitestek alkalmazása is, melyek kötődési sajátosságait a pumpa szubsztrát-telítettsége befolyásolja. Ezen konformáció-érzékeny antitestek közül a legjobban jellemzett az UIC2 monoklonális antitest, melynek szubsztrát-függő kötődési sajátosságai és az abban manifesztálódó konformáció-változások álltak vizsgálataink középpontjában.

Az UIC2 antitest kötődése 2-4-szeresére növekszik pl. vinblasztin, taxol, ciklosporin származékok, stb. jelenlétében a Pgp-t kifejező sejteken (Mechetner és *mtsai*, 1997). Ez a jelenség az ún. UIC2-shift, melyet felfedezői a sejtfelszíni, „fukcionális Pgp” molekulák kimutatására, ill. a kis mennyiségben jelenlevő Pgp kimutathatóságának növelésére javasoltak (U.S. Patents: 5,994,088; 5,972,598; 5,872,014; 5,773,280; 5,434,075). 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 (vagy akár megfelelő hipotézis). Más antitestek kötődése nem, vagy csak alig változik modulátorok, szubsztrátok jelenlétében (pl. MM12.10, MM6.15, MRK16, 4E3 (Romagnoli és *mtsai*, 1999; Cianfriglia és *mtsai*, 1995; Georges és *mtsai*, 1993; Arceci és *mtsai*, 1993; Jachez és *mtsai*, 1994)). Az UIC2 a sejtfelszíni Pgp molekulák egy részéhez kötődik, a többi kötőhely – mely pl. az MRK16 antitest számára mindig hozzáférhető – csak Pgp-szubsztrátok jelenlétében válik UIC2-kötötté. Eközben az antitest kötődési állandója és a kötőhelyek száma is változik (Mechetner és *mtsai*, 1997).

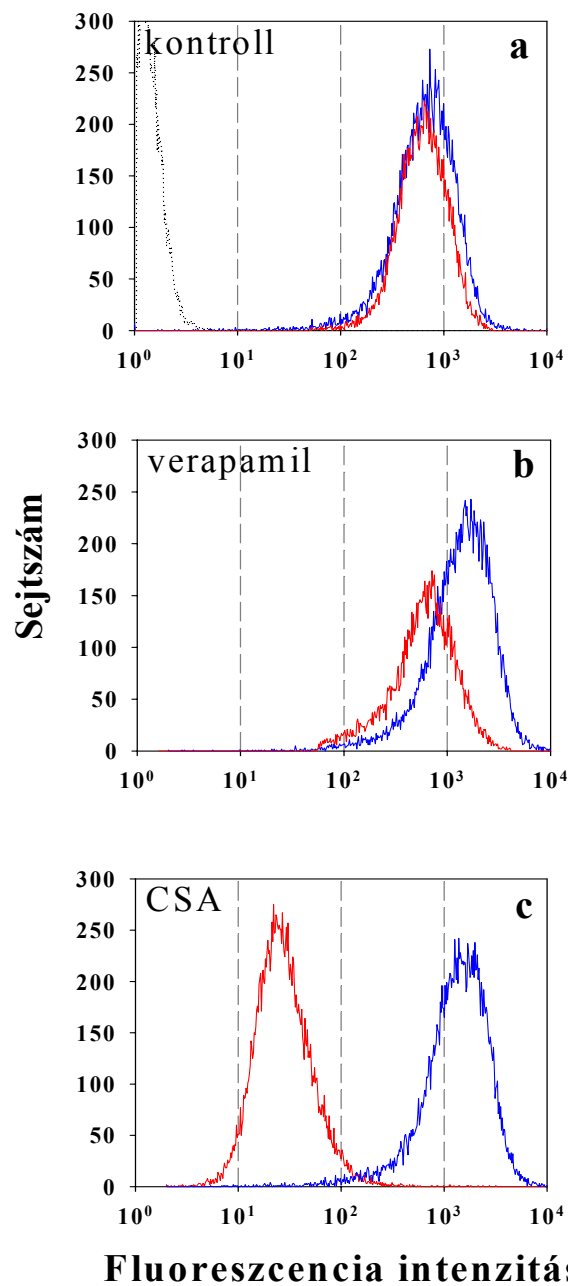
4.1.1. A Pgp-re specifikus, két mAt (UIC2 és MM12.10) kompetíciójának vizsgálata különböző szubsztrátok/modulátorok jelenlétében

A velünk együttműködő amerikai és olasz munkacsoportok (E. Mechetner, R. Arceci és M. Cianfriglia) különböző Pgp epitópok ellen termeltetett antitesteket bocsátottak rendelkezésünkre. Ezen antitestek kombinációit kezdtük el alkalmazni fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer kísérletekben. Epitóp-epitóp távolságok változásait detektálni képes, konformáció-változásokra érzékeny eljárást terveztünk kidolgozni. Kezdeti kísérleteink során, az energiatranszfer mérésekhez szükséges nem kompetáló antitest párokat keresve, észleltünk egy szokatlan jelenséget (8. ábra).

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 festékkel konjugált MM12.10 mAt-et (FITC-MM12.10), mint azt az 8.a ábra mutatja, az UIC2 antitest csak kevésbé befolyásolta a nem konformáció-érzékeny FITC-MM12.10 antitest kötődését. Az UIC2 után még jelentős mennyiségű FITC-MM12.10 tudott a fehérje megfelelő epitópjaival kölcsönhatást kialakítani. Azonban, ha a Pgp-t kifejező sejtvonalat az általában nagyobb mértékű UIC2-shift-et okozó CSA-nal előkezeltük, az UIC2 antitesttel való inkubáció után az MM12.10 kötődése jelentősen lecsökkent, vagy teljesen megszűnt (8.c ábra). A jelenségen belül fontosnak találtuk azt a megfigyelést, hogy a két alkalmazott revertáló szer nem viselkedik hasonlóan: míg a CSA a fenti jelenséget – az UIC2 kötődés „fölszívását” kialakulását – eredményezi, a verapamil közel maximális Pgp funkció gátlást okozó dózisban sem vált ki ilyen hatást (8.b ábra). Kontroll kísérletekben kimutattuk, hogy az alkalmazott drogok jelenléte nem befolyásolta jelentősen az MM12.10 mAt kötődését.

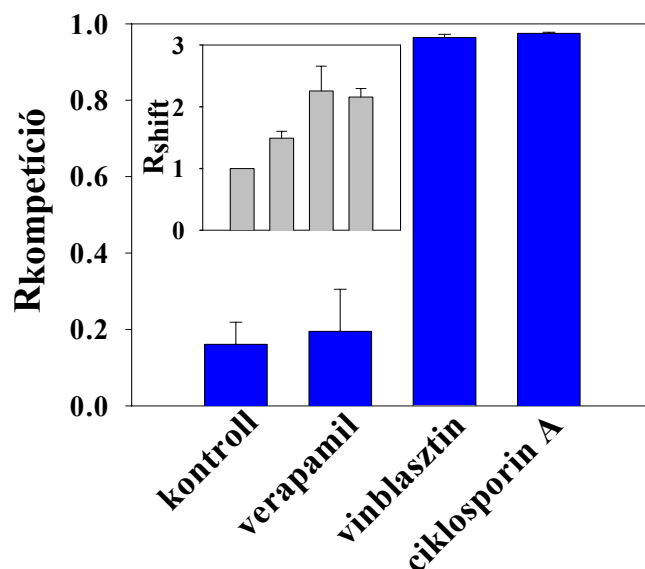
Bár a fent bemutatott jelenség nyilvánvalóan az UIC2-shift következménye, annak nem egyszerű negatív képe, az UIC2 által el nem „foglalt” Pgp-epitópok egyszerű visszatitrlása, hiszen az eljárás reprodukálható különbséget tesz verapamil és CSA között, míg az UIC2-shift nem. A továbbiakban a két eljárás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

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



8. ábra Az NIH 3T3 MDR1 sejteket modulátorokkal előkezeltük (b: verapamil, c: ciklosporin A, a: kezeletlen kontroll), ezután az UIC2 antitesttel, vagy anélkül inkubáltuk, majd FITC-MM12.10 antitestet adtunk a mintákhoz, melyeket az egyes inkubációs lépések között nem mostunk. A FITC-MM12.10 fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük. *Piros vonal:* a FITC-cel konjugált MM12.10 mAt-tel való inkubálást megelőzte az UIC2 antitesttel történő kezelés; *kék vonal:* csak FITC-MM12.10-zel jelölt minták. A *pontozott vonal* a háttér fluoreszcencia intenzitást ábrázolja. A fluoreszcencia intenzitás eloszlási hisztogramok nagyszámú mérésből kiválasztott reprezentatív adatsort mutatnak.

4.1.2. Az AKT-eljárás és az UIC2-shift összehasonlító vizsgálata

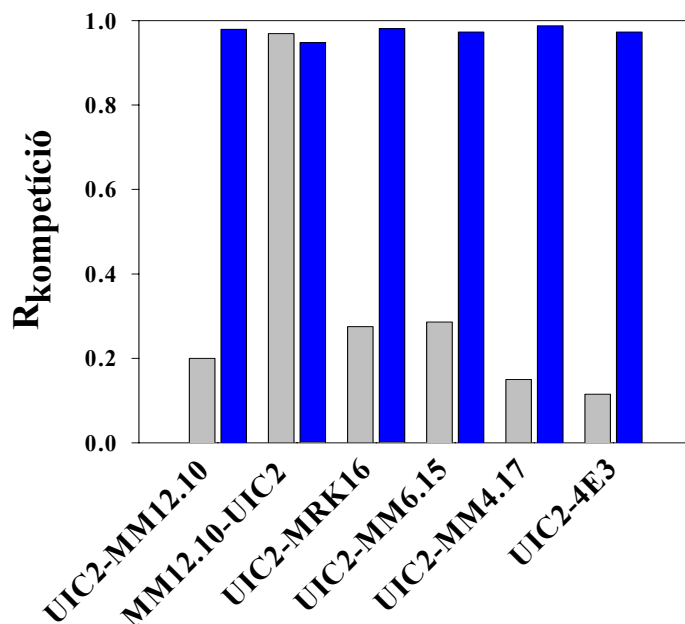


9. ábra Az antitestek kompetíciójának mértékét egy arányszámmal adtuk meg: $R_{kompetíció}$, amely az FITC-MM12.10 fluoreszcencia intenzitásának különbsége UIC2 antitest előkezelés nélkül és azt követően, normalizálva az UIC2 mAt hiányában mért fluoreszcencia intenzitásra. Az antitestekkel történő inkubálások előtt az NIH 3T3 MDR1 sejteket különböző modulátorokkal kezeltük elő. Az UIC2-shift tesztben a sejteket szubsztráttal/modulátorral előkezeltük, majd az UIC2 antitest felkötődését FITC-GaMIgG indirekt jelöléssel detektáltuk. A betét mutatja az UIC2-shift mértékét, amely a revertáló ágens jelenlétében és anélkül mért fluoreszcencia intenzitások hányadosa (R_{shift}) (a különböző előkezelések eredményeit az $R_{kompetíció}$ -s ábrával megegyező sorrendben tüntettük fel). 6 független mérés átlagát ábrázoltuk ($\pm SD$).

Amint a **9. ábra** adataiból kitűnik, a relatív (és változékony) UIC2-jel növekedést a nem konformáció-érzékeny antitest felkötődésének szinte teljes szuppressziója, megghiúsulása kíséri CSA ill. vinblasztin jelenlétében és ezáltal a mindezt előidéző konformáció-változás érzékeny módon detektálható.

4.1.3. A mAt-ek kompetíciójának vizsgálata különböző antitest kombinációk esetén

A fent bemutatott jelenséget más antitest párok esetén is megvizsgáltuk (**10. ábra**).

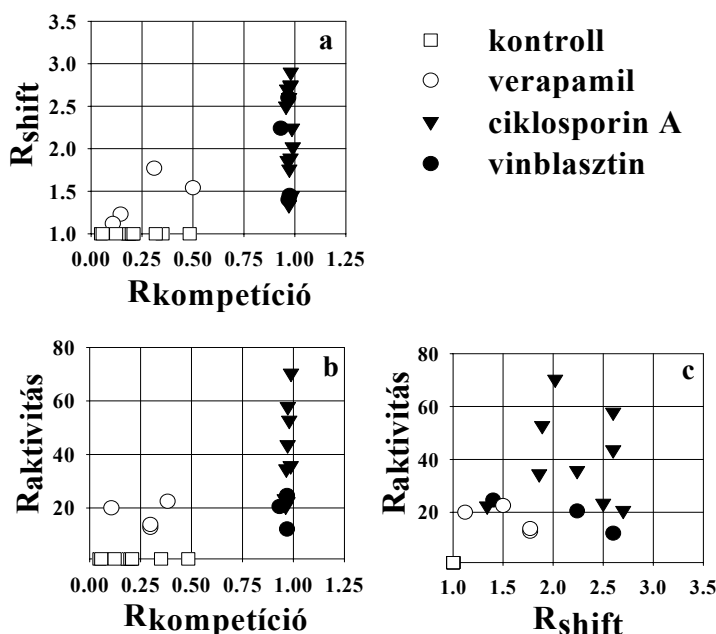


10. ábra Az ábrán látható antitest kombinációk (festékkal nem konjugált) első tagjával az NIH 3T3 MDR1 sejteket előkezeltük, majd a FITC-cel konjugált második antitestekkel jelöltünk. Az oszlopdiagrammon az egyes antitest kombinációk $R_{\text{kompetíció}}$ értékeit ábrázoltuk a CSA-val előkezelt (kék oszlopok), illetve a kezeletlen (szürke oszlopok) sejtek esetén ($\pm$ SD).

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, vagy MM6.15 ill. MM4.17 antitest kötődése modulátor távollétében nem változott jelentősen az UIC2 felkötődését 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 a jelöletlen MM12.10-zel inkubáltunk először az teljesen megakadályozta a másodjára adott FITC-UIC2 antitest felkötődését (modulátorok távollétében is).

4.1.4. 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, modulátorok jelenlétében és távollétében (11. ábra).



11. ábra A szubsztrátok/modulátorok hatását a Pgp aktivitására a daunorubicin akkumuláció megfigyelésével követtük nyomon és az $R_{\text{aktivitás}}$ értékkel jellemeztük, ami az egyensúlyban mért fluoreszcencia intenzitások aránya modulátor jelenlétében ill. anélkül. Az $R_{\text{kompetíció}}$ és az R_{shift} értékeket a 9. ábránál leírtakkal azonos módon határoztuk meg. A pontok egy-egy független mérés adatai.

Az $R_{\text{kompetíció}}$, az $R_{\text{aktivitás}}$ és az R_{shift} paramétereket, revertáló szerek nélkül, illetve jelenlétében ábrázoltuk. Megfigyelhettük, hogy míg az $R_{\text{kompetíció}}$ értékek a CSA-val kezelt minták esetében 1-hez szorosan közeli értékeket vesznek fel, addig az R_{shift} értékek viszonylag széles tartományban mozognak (1.25-2.75) és míg a CSA-hoz ill. a verapamilhoz tartozó R_{shift} értékek átfednek, addig azok teljesen elkülönülnek az AKT alapján (11.a). Továbbá, a daunorubicin felvétel a CSA-val kezelt esetekben 20 egység felett volt (20-70), míg a többi vizsgált revertáló ágens esetében ezen érték alá esett (11.b). Az alkalmazott drogok hatékony pumpa gátlása általában jelentősebb mértékű UIC2-shift-ben is manifesztálódott (11.c), ugyanakkor a nagyobb „shift” nem mindig járt magasabb $R_{\text{aktivitás}}$ értékekkel. A Pgp-funkció

mérésben általunk alkalmazott két különböző teszt, a calcein-AM és a daunorubicin akkumulációs tesztek azonos következtetésekre vezettek (itt nem bemutatott adatok). Látható az is, hogy nagy $R_{\text{kompetíció}}$ érték kis UIC2-shift esetében is észlelhető, de anélkül soha (11.a). Azaz, az antitestek kompetíciója során tapasztalt, 1-körüli $R_{\text{kompetíció}}$ érték által jelzett konformáció-változás feltétele az UIC2-shift.

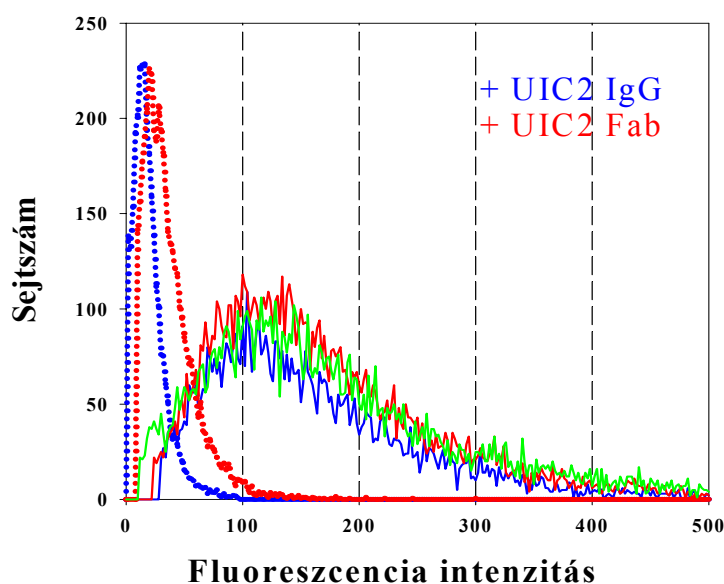
A revertáló szerek eltérő viselkedése (a CSA és a verapamil élesen különböző hatása az antitestek kompetíciójára), valamint az AKT-eljárás és az UIC2-shift korrelációs analízise arra enged következtetni, hogy az $R_{\text{kompetíció}}$ 1-körüli értékében manifesztálódó konformációs állapotot, mely a CSA ill. a vinblasztin és az antitestek együttes jelenlétében alakul ki, a másodikként alkalmazott antitest kötődése érzékenyebb módon detektálja, mint magának a konformáció-érzékeny antitestnek (UIC2) a kötődése.

4.2. A detektált konformáció-változások és a katalitikus ciklus fázisai közötti összefüggés tanulmányozása

Az előző fejezetben 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.

4.2.1. Az antitest kompetíciós jelenség vizsgálata UIC2 Fab fragmentumainak alkalmazásával

Az előbbieken bemutatott mAt kompetíciós jelenséget bivalens UIC2 antitesttel észleltük. További kísérleteinkben szeretnénk volna választ kapni arra a kérdésre, hogy vajon befolyásolhatja-e az antitest kompetíciós jelenség kimenetelét, ha abban az UIC2 csak egyik variábilis régiója vesz részt. Nem ismert ti., hogy az UIC2 csak egy vagy mindkét antigén-felismerő régiójával kapcsolódik egyazon Pgp-re, vagy esetleg két Pgp molekulát köt keresztbe. Ennek tisztázására, kísérletes rendszerünkben a monovalens UIC2 Fab alakot alkalmaztuk (12. ábra).



12. ábra AKT monovalens (*piros vonalak*) és bivalens (*kék vonalak*) UIC2 és Cy5-MM12.10 antitestpár alkalmazásával. *Pontozott vonallal* ábrázoltuk a CSA-val előkezelt, *folytonos vonallal* a modulátorral nem kezelt mintákat. A kontrollként a NIH 3T3 MDR1 sejteket csak Cy5-MM12.10-zel jelöltük (*zöld folytonos vonal*). Az ábra egy reprezentatív mérés eredményét mutatja.

Ahogy az 12. ábra mutatja, a teljes antitesttel tapasztalt kompetíciós jelenséget (CSA előkezelés esetén) a monovalens UIC2 Fab fragmentummal is észleltük, azaz az UIC2 egy variábilis régiója is elegendő a másodikként alkalmazott, jelölt mAt kötődésének meghiúsítására.

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

Nem ismert, hogy az UIC2-kötő fehérje motívumok száma változik-e a modulátorok/szubsztrátok jelenlétében.

Az antitestek között a Pgp-vel kialakítható kötésekért végbemenő versengés legegyszerűbb magyarázata, ha epitópjaik közeliak vagy átfedőek. Az **2. táblázat** a kísérleteinkben felhasznált antitestek fehérje-antitest kapcsolat kialakításában feltehetőleg részt vevő antigén peptid-motívumainak aminosav szekvenciáit mutatja be (Romagnoli és *mtsai*, 1999; Cianfriglia és *mtsai*, 1995; Cianfriglia és *mtsai*, 1994; Georges és *mtsai*, 1993; kooperációs partnereink által rendelkezésünkre bocsátott adatok).

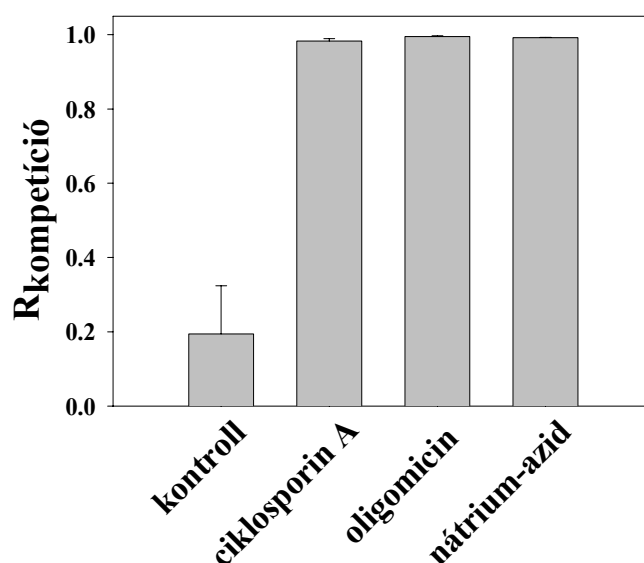
Monoklonális antitestek	mAt-ek kötőhelyeinek lokalizációja a Pgp-n		
	4. e.c. hurok	6. e.c. hurok	egyéb
UIC2	F TRIDD , RQNSNLFS	KLMSFEDV	1. e.c. hurok 11. TM
MM12.10	KRQNSNLF SSL	YLVAHKLMS	8. TM és 9. TM
MM6.15	FTRIDDP ET KRQNSNL	GAYLVAHKLMSF	1. e.c. hurok
MM4.17	TRIDDPET	-	-
MRK16	RIDDPETKR	-	1. e.c. hurok

2. táblázat

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 találhatók, 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 (10. ábra) teljesen meggátolja a későbbi UIC2 antitest kötődését, arra utalnak, hogy a két mAt a fehérje 4. vagy a 6. e.c. hurkai kötéseért verseng. Mivel a 4. extracelluláris hurokra specifikus MM4.17 antitest helyettesíteni képes akár az MM12.10, akár az MM6.15 antitestet az UIC2 antissal való versengésen alapuló kísérletben (10. ábra), az UIC2 Pgp-hez való kapcsolódásában is megnyilvánuló konformáció-változás kritikus mozzanata feltehetően a 4. e.c. hurok területén zajlik.

4.2.3. Az ATP-depléción és a mAt kompetíciós jelenség kapcsolatának vizsgálata

Mechetner és munkacsoportjának eredményei alapján ismert, hogy az ATP-depléción fokozza az UIC2 reaktivitását, vagyis UIC2-shift-et idéz elő (Mechetner és *mtsai*, 1997). Valószínűleg az UIC2-shift-ben manifesztálódó konformáció-változás a katalitikus ciklus során alakul ki: az UIC2 fokozott megkötésének képessége a Pgp ATP-mentes állapotaira lehet jellemző. Következő kísérletsorozatunkban ATP hiányos állapotot idéztünk elő Pgp-t kifejező sejteken és vizsgáltuk annak hatását az UIC2 és az MM12.10 kompetíciójára (13. ábra).



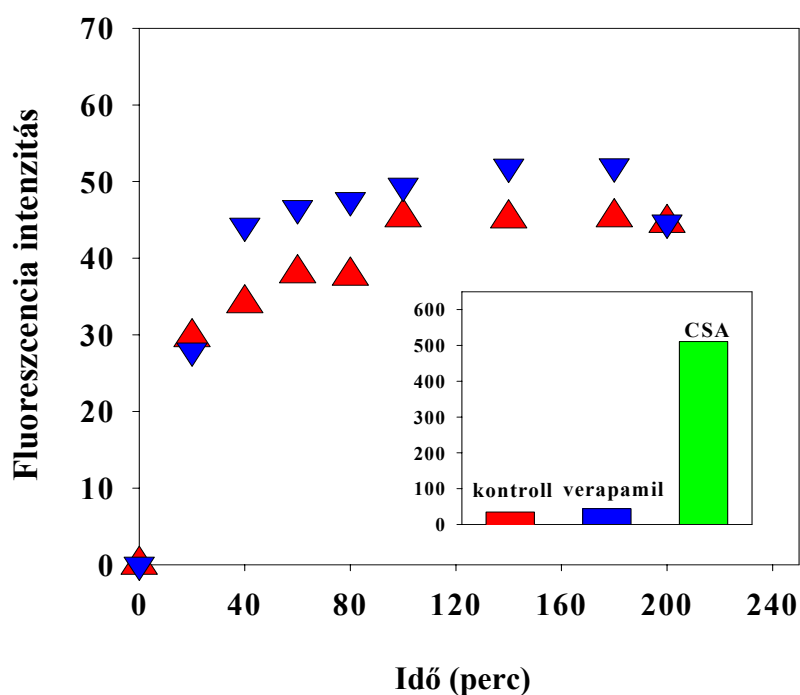
13. ábra NIH 3T3 MDR1 sejtek ATP termelését oligomicinnel vagy nátrium-azid/ 2-deoxi-D-glükóz kombinációjával történő 30 perces előkezeléssel gátoltuk meg. Az ATP-depléció hatását az UIC2/MM12.10 antitestek kompetíciójára az $R_{kompetíció}$ arányszámmal adtuk meg. 4-6 független mérés átlagát ábrázoltuk ($\pm$ SD).

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. Munkacsoportunk később kimutatta, hogy a Na-ortovanadáttal blokkolt Pgp-hez az UIC2 nem képes kötődni és ekkor a kompetíciós jelenség sem észlelhető (Goda és mtsai, 2002). Ezek alapján a katalitikus ciklus UIC2-kötődést megengedő szakasza tovább szűkíthető a Pgp-nek sem ATP-t, sem ADP-t + P_i -t nem kötő konformációs állapotaira.

Ezen kísérlet eredményei két irányba indították el további munkáinkat (4.2.3.1. és 4.2.3.2.).

4.2.3.1. Az UIC2 antitest kötődésének vizsgálata az inkubációs idő függvényében

Valószínűleg a CSA, a vinblasztin és az ATP-depléció a Pgp-t katalitikus ciklusának olyan szakaszában rekesztik meg, melyben a fehérje azonos, vagy nagyon hasonló konformációs állapotban van és amely az UIC2 antitest kötődése számára kedvező. Ebből az a feltételezés adódik, hogy a Pgp a fenti ágensek nélkül is áthalad katalitikus ciklusa során ezen az állapoton. Vagyis UIC2 jelenlétében előbb-utóbb az összes jelenlévő Pgp felveszi ezt a konformációs állapotot. Ezt a predikciót ellenőrizendő az UIC2 jelölődését az idő függvényében követtük nyomon (**14. ábra**).



14. ábra Az UIC2 mAt kötődés időfüggésének vizsgálatához KB-V1 sejteket glükóz és UIC2 mAt jelenlétében verapamillal vagy anélkül (*kék és piros háromszögek*) inkubáltuk. Az ábrán jelzett időpontokban mintákat vettünk, melyeket a szokásos módon jelöltük FITC-RaMIgG-gal. A betét ábrán a 40. percben készült modulátor kezeletlen (*piros oszlop*), verapamil- (*kék oszlop*) és CSA-kezelt (*zöld oszlop*) minták fluoreszcencia intenzitás átlagait mutatjuk.

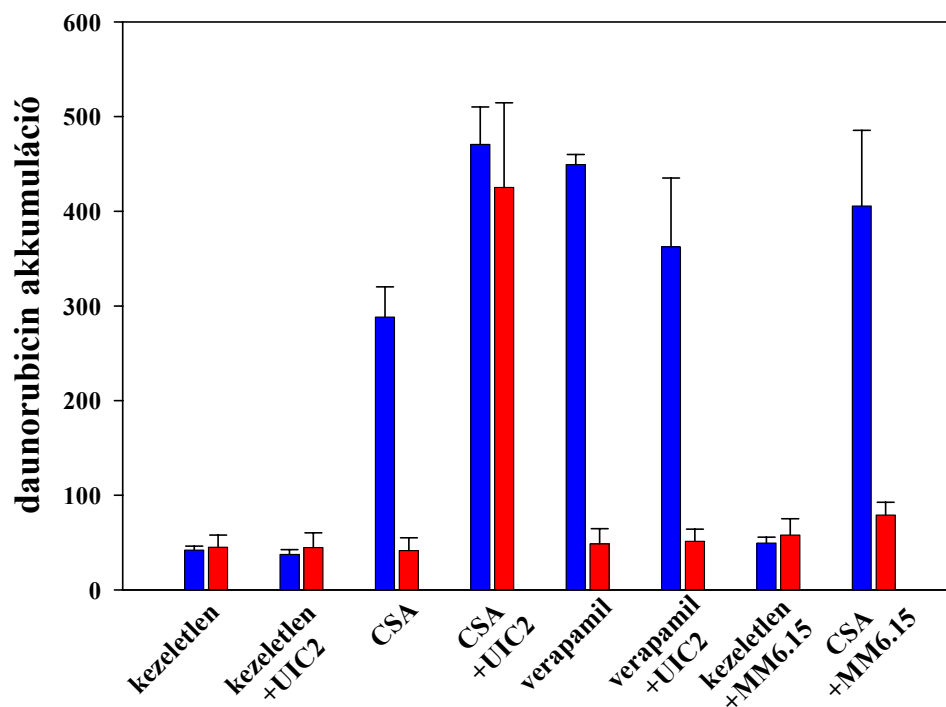
Az UIC2 kötődése a pumpa jó szubsztrátja, a verapamil jelenlétében sem közelítette meg a CSA mellett kapott értéket, még több órás inkubálás esetén sem. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a Pgp katalitikus ciklusa verapamil jelenlétében vagy gyorsan áthalad azon a stádiumon, vagy kihagyja azt a stádiumot, 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. (Nem teljesen bizonyos, hogy az ATP-deplációval létrehozott szituáció a katalitikus ciklus egy fiziológias állapotát reprodukálja, hiszen a Pgp magas intracelluláris ATP koncentráció mellett köti-bontja vagy nem köti az ATP-t, tehát a ciklustól és nem az ATP-szinttől függően.)

4.2.3.2. Az UIC2 antitest pumpa-gátló hatásának modulátor függése

Mechetner munkacsoportja kimutatta, hogy MDR sejtekben az UIC2 képes gátolni a Pgp-szubsztrátok kiáramlását és szignifikánsan növeli az alkalmazott, Pgp által is szállított drogok citotoxicitását, míg azonos kísérleti körülmények között más Pgp ellenes antitest erre nem volt képes (Mechetner & Roninson, 1992). Nem tisztázott okokból azonban az UIC2-gátlás mértéke változó, nem mindig reprodukálható (hasonlóan a „shift”-hez).

Kimutattuk, hogy a CSA ugyanolyan hatást vált ki az antitestek kompetíciójában, mint amit a sejtek ATP-deplációja 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 (ld. előbb). 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.

Eljárásunk egyszerű és gyors kísérleti protokollnak bizonyult, amely festék akkumuláción keresztül mutatja ki a sejtekhez kötve maradt UIC2 antitest pumpa-gátló hatását és amelyben annak hatásfoka gyakorlatilag 100%-os: **15. ábra.**



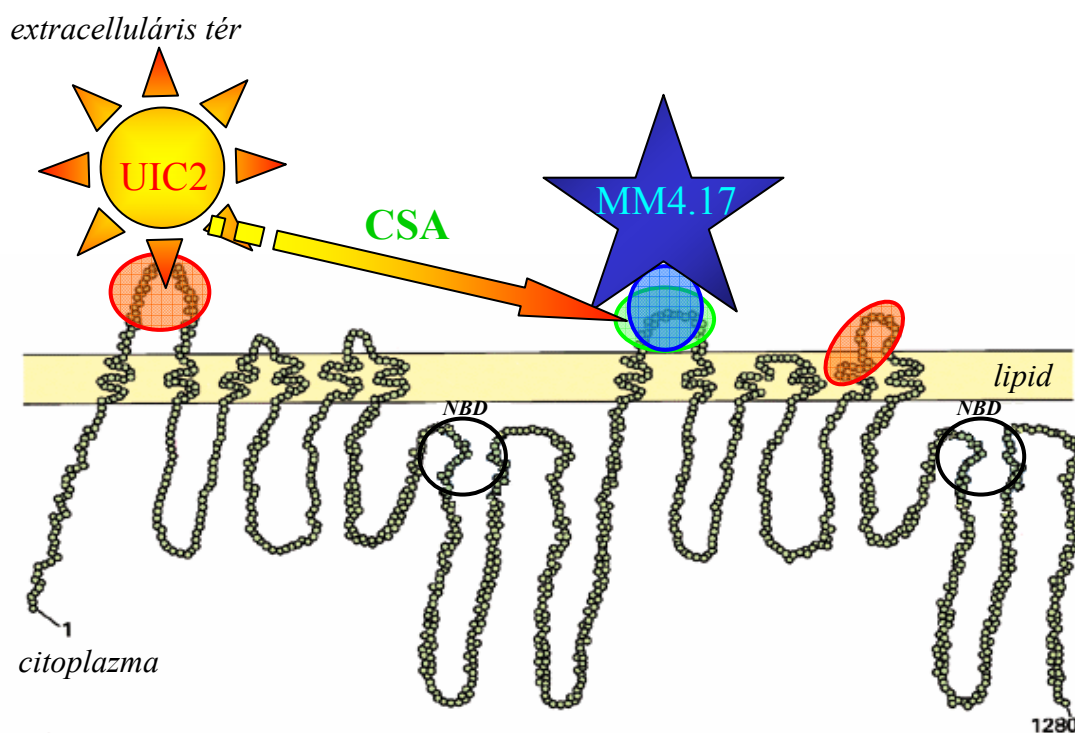
15. ábra Az UIC2 antitest pumpa-gátló hatása: daunorubicin felvétel NIH 3T3 MDR1 sejteken. A sejteket az ábrán jelzett modulátorokkal előkezeltük (10 perc), majd azok jelenlétében UIC2 antitesttel jelöltük, ezt követően a mintákat két részre osztottuk. 1%-os BSA-t tartalmazó oldattal történő mosással a minták feléből a modulátort eltávolítottuk (*piros oszlopok*; a mosás nélküli mintákat *kék oszlopokkal* jelöltük), majd az összes mintán elvégeztük a daunorubicin tesztet. Az ábra legalább 3 áramlási citometriás mérés eredményeit összegezi ($\pm$ SD).

Ahogy a 3. és az 5. oszloppáron látható, mind a CSA, mind a verapamil olyan mértékben eltávolítható mosási technikánk segítségével, hogy azoknak Pgp moduláló hatásuk az esetleg visszamaradó koncentrációban már nem érvényesül.

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.

4.2.4. Javasolt modell a fenti észleletek magyarázatára

Eddig bemutatott megfigyeléseink alapján egy olyan kép alakult ki bennünk (16. **ábra**), melyben egyetlen Pgp molekula képes a kétféle anti-Pgp antitestet egyszerre megkötni. CSA jelenlétében az UIC2 (🔴*szimbólum*) kötődése során nem csupán az 1. és a 6. extracelluláris hurkon elhelyezkedő epitóp szakaszokat (*piros ellipszis*) használja – melyek modulátor távollétében is kialakítják a kapcsolatot a fehérje és az UIC2 között –, hanem kötődése áttérjed a 4. e.c. hurok aminosav szekvenciáira (*világos zöld ellipszis*) is. A 4. e.c. hurok részvétele az UIC2 kötésében megakadályozza a másodikként alkalmazott antitest (pl. MM4.17, 🟡 *szimbólum* ill. epitóp szakasza: *kék ellipszis*) kapcsolódását a Pgp-hez. A 4. e.c. hurok részvétele az UIC2 kötődés erősségének növekedésében is megnyilvánul (Mechetner és *mtsai*, 1997; itt nem bemutatott adataink). Továbbá az ebben a konformációban befagyasztott pumpa nem működőképes.



16. ábra

4.2.5 MAt-ek Pgp-n elfoglalt relatív pozíciójának tanulmányozása fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer mérésekkel

A 16. ábrán látható modell egyik feltevése az, hogy két különböző Pgp ellenes antitest képes egyszerre egyazon Pgp molekulára felkötődni. Ez az elképzelés a (CSA távollétében felkötött) UIC2 és pl. az MM12.10 molekuláris közelségét prediktálja, melyet FCET metodikával vizsgáltunk meg. A **3. táblázat** mutatja fluoreszcencia rezonancia energiatranszferes méréseink adatait.

Energiatranszfer párok	CSA kezelés	Donor fluoreszcencia intenzitása	Akceptor fluoreszcencia intenzitása	Energia- transzfer hatásfok (%)
Cy3-UIC2 & Cy5-MM12.10	-	54.98	124.71	15.4
Cy5-UIC2 & Cy3-MM12.10	-	235.529	102.59	16
Cy3-UIC2 / Cy5-UIC2	-	86.81	38.5	23.69
Cy3-MM12.10 / Cy5-MM12.10	-	155.21	110.27	20.05
Cy3-UIC2 & Cy5-MM12.10	+	385.93	17.49	2.67
Cy5-UIC2 & Cy3-MM12.10	+	143.96	423.24	42.84
Cy3-UIC2 / Cy5-MM12.10	+	286.49	73.96	10.69
Cy5-UIC2 / Cy3-MM12.10	+	255.05	289.80	30.91
Cy3-UIC2 / Cy5-UIC2	+	424.19	171.83	24.85
Cy3-MM12.10 / Cy5-MM12.10	+	150.72	110.83	16.89

3. táblázat NIH 3T3 MDR1 sejteket CSA jelenlétében (+) vagy távollétében (-) előinkubáltunk, majd a sejteket megjelöltük a táblázat első oszlopában feltüntetett antitestekkel. Az táblázatban „&” szimbólummal jelöltük azon kísérleteket, melyekben az egyes antitestekkel való inkubációkat egymás követően végeztük el; ha a jelölés során a két különböző mAt egyszerre volt jelen azt „/” jellel szimbolizáltuk.

A CSA jelenlétében és távollétében is elvégzett FCET méréseink magas energiatranszfer eredményei (kivéve az akceptorként szereplő antitest kismértékű kötődése esetén, amikor az alacsony energiatranszfer hatásfokot az akceptor hiánya eredményezhette) alapján két elképzelés is lehetséges, nem zárva ki azok egyidejű jelenlétét sem:

- egyetlen fehérje képes megkötni a kétféle anti-Pgp antitestet, alátámasztva a 4.2.4. pontban vázolt Pgp modellünket.
- Pgp-homoaggregátumok vannak jelen a sejtfelszínen.

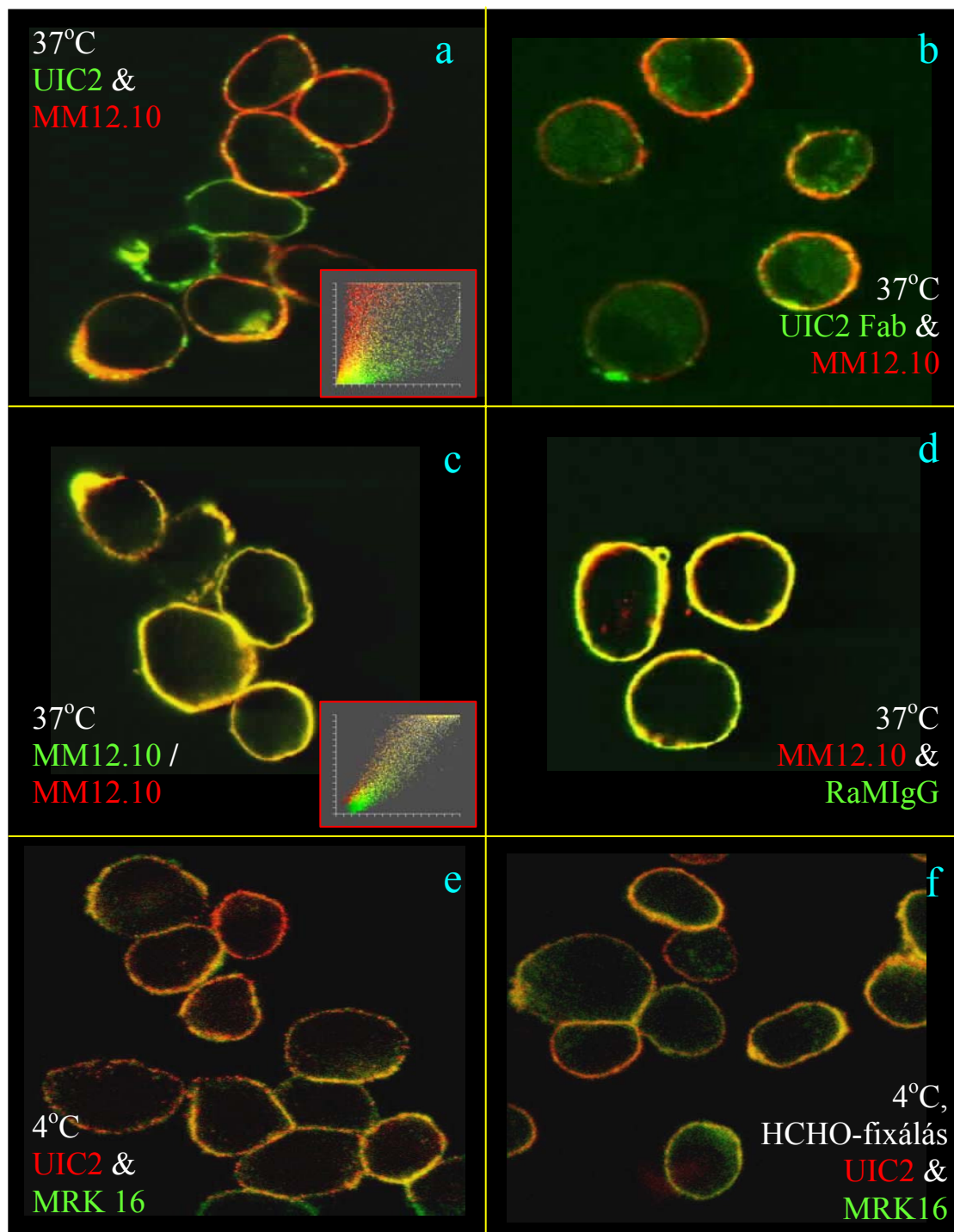
4.3. A Pgp topológiai viszonyainak vizsgálata a plazmamembránban

Az UIC2 antitest a sejtfelszíni Pgp molekuláknak csak egy részéhez kötődik, a többi kötőhely csak megfelelő Pgp-szubsztrátok jelenlétében válik elérhetővé. Ugyanakkor az UIC2 antitesttel kompetáló, tehát közeli, vagy azonos helyre kötődő más, nem konformáció-érzékeny antitestek számára mindig hozzáférhető minden sejtfelszíni Pgp. Munkacsoportunk korábbi kísérleti eredményei szerint az UIC2 antitest sejtfelszíni kötődése a sejtek metanolos fixálása, permeabilizálása hatására is megnő (Goda és *mtsai*; 2000). Továbbá, a sejteket előzetesen 4%-os formaldehiddel fixálva (a fehérjék keresztkötésével kizárva a konformáció-változások lehetőségét), majd metanollal permeabilizálva hasonló mértékű fokozódás figyelhető meg a jelölhetőségben. A sejtek CSA-val történő előkezelése (azaz az UIC2-shift létrehozása) után a permeabilizálás nem idézett elő további jelölődés növekedést. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a Pgp működése során bekövetkező konformáció-változások az UIC2 antitest által felismert epitóp, vagy annak egy részlete – pl. a kitüntetett szerepű 4. e.c. hurok – exponáltságának változásával járnak együtt. Ezt a pumpafehérje transzmembrán régióinak elmozdulása és így az antitest kötésében résztvevő extracelluláris fehérje hurkok lipidbe ágyazottságának megváltozása is okozhatja.

4.3.1. 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 (~ 100%) hányadát jelöli. Mechetner és *mtsai* közlése szerint, mindkét hatás hozzájárulhat az UIC2-shift jelenséghez (Mechetner és *mtsai*, 1997). Eddigi Scatchard-plot kísérleteinkben a fenti kérdésre nem sikerült kapnunk meggyőző választ, ezért más megközelítést választottunk a fenti alternatívák vizsgálatára.

Konfokális lézermikroszkópia segítségével megvizsgáltuk, hogy vajon a sejtek felszínén UIC2 mAt-tel jelölhető Pgp populáció homogén-e (**17. ábra**).



17. ábra Az ábra *a* és *b* részein Pgp-t kifejező NIH 3T3 MDR1 sejtek láthatóak, melyeket sFx-UIC2 antitesttel ill. sFx-UIC2 Fab-vel való immunofluoreszcenciás jelölést követően Cy5-MM12.10 antitesttel inkubáltunk. A sFx-MM12.10 és Cy5-MM12.10 antitestek azonos arányú keverékével jelölt (*c* kép), illetve a Cy5-MM12.10 inkubálás után FITC-RaMIgG-gal konjugált (*d* kép) sejteket mutatják a *c* és *d* képek. Az *f* képen bemutatott sejtek esetében az antitestekkel való jelölést 4 °C-on végeztük. Az *e* képen látható sejtek esetében a 4 °C-on történő UIC2-biotin (majd streptavidin-Cy5) és sFx-MRK16 antitestekkel való jelölést a sejtek formaldehides fixálása előzte meg. Az *a* és *c* képeket keresztkorrelációs plotokkal (betét ábra) egészítettük ki.

A sejteket sFx-UIC2 vagy sFx-UIC2 Fab és Cy5-MM12.10 (*a, b* képek) vagy biotinált UIC2 (melyet Cy5-streptavidin jelölés követett) és sFx-MRK16 (*e, f* képek) antitestekkel jelöltük. A receptor mediálta endocitózis megakadályozására a jelöléseket 4°C-on (*e* kép) is elvégeztük. A „cap”-képződést az UIC2 Fab fragmentjének felhasználásával (*b* kép) ill. a sejtek előzetes formaldehides fixálásával (*f* kép) gátoltuk.

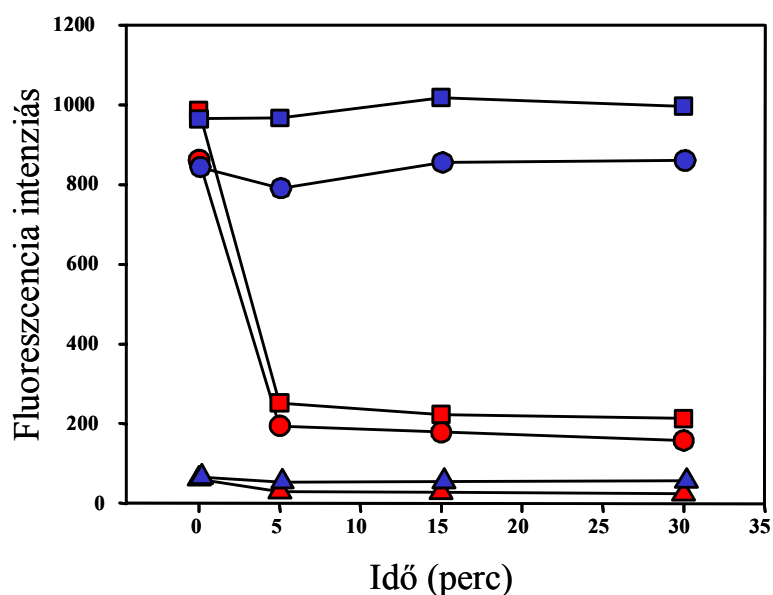
A kétféle színű jelzés térbeli elkülönültségének mértékéről ad felvilágosítást a keresztkorrelációs plot (betét ábrák), mely a kép pixelihez tartozó zöld és piros szín intenzitásokat mutatja. A zöld szín az sFx, a piros szín a Cy5 jelölésnek felel meg. Minél jobban szétterülnek a képpontok a tengelyek felé, annál kisebb a keresztkorreláció, minél inkább egy emelkedő 45°-os egyenes mentén helyezkednek el a pixelek, annál nagyobb a zöld és piros képpontok közötti átfedés. Az P-glikoprotein szemmel láthatóan is heterogén eloszlást mutat a sejtmembránban (*a, b* és *e, f* képek), a keresztkorrelációs plotokon a pixelek jelentős mértékben szétterülnek. A kontroll kísérletekben tökéletes kolokalizáció látható, sFx-MM12.10 és Cy5-MM12.10 antitestek 1:1 arányú keverékének ill. Cy5-MM12.10-val jelölt sejteket FITC-RaMIgG-os keresztkötésének alkalmazásával (*c* és *d* képek).

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az UIC2-vel modulátorok távollétében is jelölhető Pgp-k a sejtmembránban a CSA mellett felkötődött mAt-ektől többé-kevésbé elkülönült doménekben foglalnak helyet. Ez az elkülönültség lehet magának az antitest-kötésnek az eredménye, ill. megelőzheti azt. A mikroszkópiás megközelítésben a „reprezentatív” 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.

4.3.2. A Pgp intramembrán és citoskeletális asszociációinak tanulmányozása

4.3.2.1. Sejtfelszíni Pgp Triton X-100-zal való kioldhatóságának vizsgálata

A KB-V1 sejtek plazmamebránjában lévő Pgp Triton X-100 (TX-100) kioldási kinetikáját mutatja a **18. ábra**. A TX-100 enyhe, nem ionos detergens, amely a sejtmembránt felépítő lipideket micella képződés során oldja ki. Biokémiai vizsgálatok ugyanakkor azt mutatják, hogy a TX-100 0 °C-on nem képes maradéktalanul eltávolítani a citoplazma membránt, hanem bizonyos koleszterinben és szfingolipidekben gazdag lipidkomplexeket tartalmazó membrán részletek, ún. detergens rezisztens mikrodomének (*lipid tutajok*) oldhatatlanok maradnak. Az antitesttel jelölt membránfehérjék kioldásának áramlási citometriával végrehajtott kinetikai vizsgálatában mi is azt tapasztaltuk, hogy a detergens kioldás még 30 perc elteltével sem lesz teljes (lipid tutaj asszociáció) és a kioldódás döntő többsége az első 5 percen belül lezajlik.



18. ábra KB-V1 sejteket UIC2-vel jelöltünk (●, ●), majd CSA jelenlétében sFx-UIC2-vel inkubáltuk. Az ■, ■ négyzetekkel szimbolizált mintákat először CSA-nal előkezeltük, majd sFx-UIC2-vel jelöltük. A sejteket csak sFx-UIC2 mAt-tel jelöltük (CSA nélkül) két minta esetén (▲, ▲). A fenti minták egy-egy részletét egy további lépésben RaMIgG-nal inkubáltuk (kék síkidomok). A sejtszuspenziókhöz közvetlenül az áramlási citometriás mérés előtt TX-100 detergenst adtunk és mértük a jelzett időpontokban vett minták fluoreszcencia intenzitását. Az ábra egy reprezentatív mérés eredményét ábrázolja, több hasonló kísérlet közül.

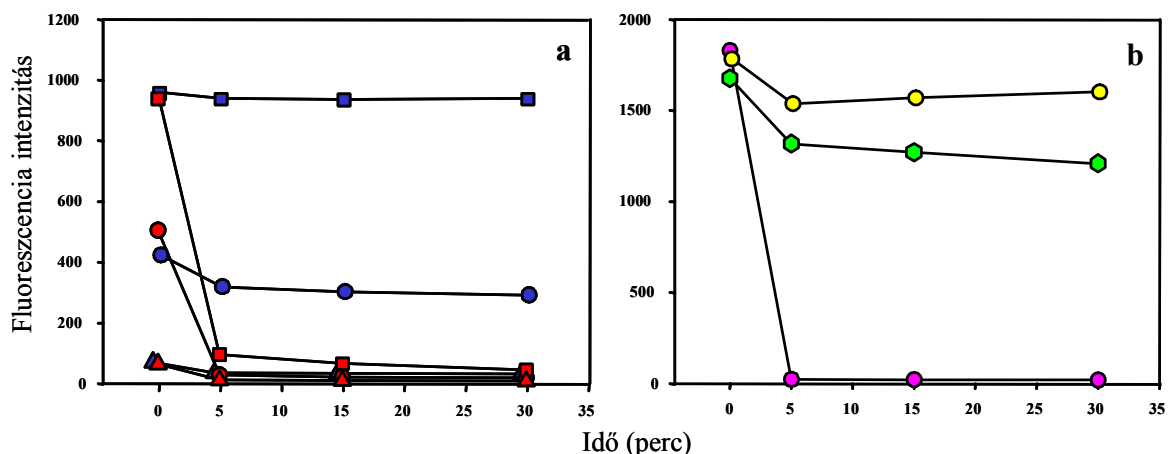
KB-V1 sejteken mind a CSA kezelés mellett, mind az anélkül UIC2 antitesttel azonosítható Pgp-k egy része detergens rezisztens lipid mikrodoménekben található: CSA kezelés mellett a Pgp-k 17%-a, míg kezelés nélkül a 30%-a ill. az összes sejtfelszíni Pgp mennyiségének ~ 20 %-a. Megfigyelhető, hogy a detergens rezisztens Pgp-k aránya CSA mellett (~ 0.17) és CSA távollétében (~ 0.3) egymástól különböző. Ez utóbbi megfigyelés arra utalhat, hogy a CSA kezeléssel elkülöníthető – UIC2-vel jelölhető – 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.

A Pgp lipid tutajokban való jelenlétét támasztják alá munkacsoportunk azon újabb eredményei, melyekben a Pgp és a lipid tutajok jellemző markerének tekintett CD59 – GPI-horgonyzott (glikozil-foszfatidil-inozitol) – sejtfelszíni fehérje molekuláris közelségét mutattuk ki (Bacsó és *mtsai*, 2003, előkészületben).

Ha a sejtfelszíni Pgp molekulákat az UIC2 antitesteken keresztül keresztkötöttük (RaMIgG-gal), a 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.

4.3.2.2. Sejtfelszíni Pgp Nonidet P-40-nel való kioldhatóságának vizsgálata

A citoskeletális rögzítettség vizsgálatára KB-V1 sejtek membránjában lévő Pgp molekulák Nonidet P-40 (NP-40) kioldási kinetikáját tanulmányoztuk (**19. ábra**). Nonidet P-40 detergenssel kezelve a sejteket, azok plazmamembránja rövid időn belül hatékonyan kioldódik (Albrecht & Noelle, 1988).



19. ábra Az a) ábra esetében a minták antitesttel való jelölését a 11. ábrával azonos módon készítettük el. A b) ábra sFx-W6/32 MHC I molekula nehézláncára specifikus antitestekkel jelölt (●), a jelölést követően RaMIgG-gal keresztkötött (●) ill. a jelölést követően formaldehiddel fixált (●) KB-V1 sejtek fluoreszcencia intenzitását ábrázolja. A membrán kioldását NP-40 detergenssel végeztük és megfelelő időközönként áramlási citométerben analizáltuk. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredményeit ábrázoltuk.

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 rögzítettséget mutató Pgp molekulákkal a többit RaMIgG segítségével keresztkötöttük, akkor ez jelentősen megnövelte a sejthez rögzült molekulák arányát. Kontrollként MHC I molekulák citoszkeletális rögzítettségét vizsgáltuk (Geppert & Lipsky, 1991). A sejtfelszínen kifejeződő MHC I transzmembrán fehérjék NP-40 detergens kezelés hatására a lipidmembránnal együtt hamar kioldódnak és a fehérje csak akkor maradt sejthez rögzült állapotban, ha ellenanyaggal (RaMIgG) a kevés citoszkeletális rögzítettségű molekulával keresztkötöttük, vagy így indukáltuk a citoszkeletális kihorgonyozottságot vagy ha formaldehides fixálást követően analizáltuk a mintákat. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmamembránban kifejeződő Pgp-k antitest indukálta citoszkeletális rögzítettsége csak kismértékű, amely keresztkötés hatására megnövekszik.

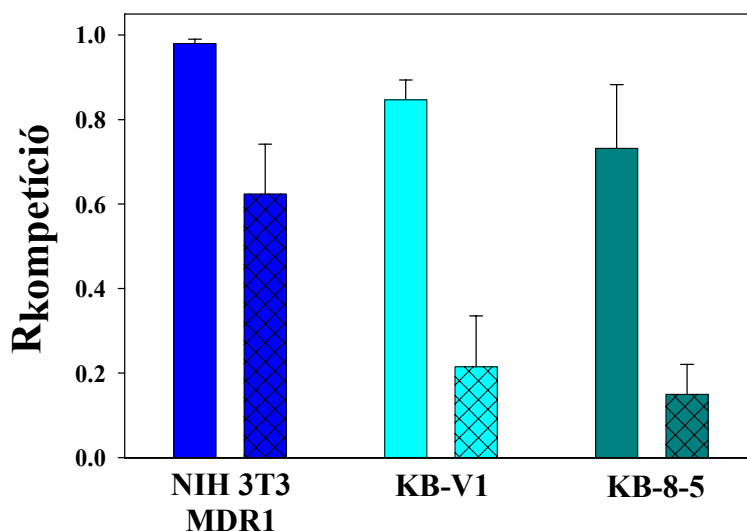
4.4. Konformáció-változások detektálásán alapuló módszer lehetséges gyakorlati alkalmazásai

4.4.1. 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.

4.4.1.1. *AKT* jelenség reprodukálhatóságának tanulmányozása különböző sejtvonalakon

Az *AKT*-eljárás jól reprodukálható volt nem csupán a humán *mdr1* transzfektált NIH 3T3 sejtvonalon, hanem a szelektált KB-V1 sejtvonalon is. Megvizsgáltuk, hogy az eljárás működik-e egy alacsonyabb fokban Pgp-t kifejező sejtvonalon, pl. KB-8-5 sejteken (20. ábra).



20. ábra A CSA (teli oszlopok) és verapamil (barázdált oszlopok) hatására bekövetkező antitest kompetíció mértékét határoztuk meg NIH 3T3 MDR1, KB-V1, és KB-8-5 sejtvonalakon. Az ábrán három független mérés átlagait ábrázoltuk ($\pm$ SD).

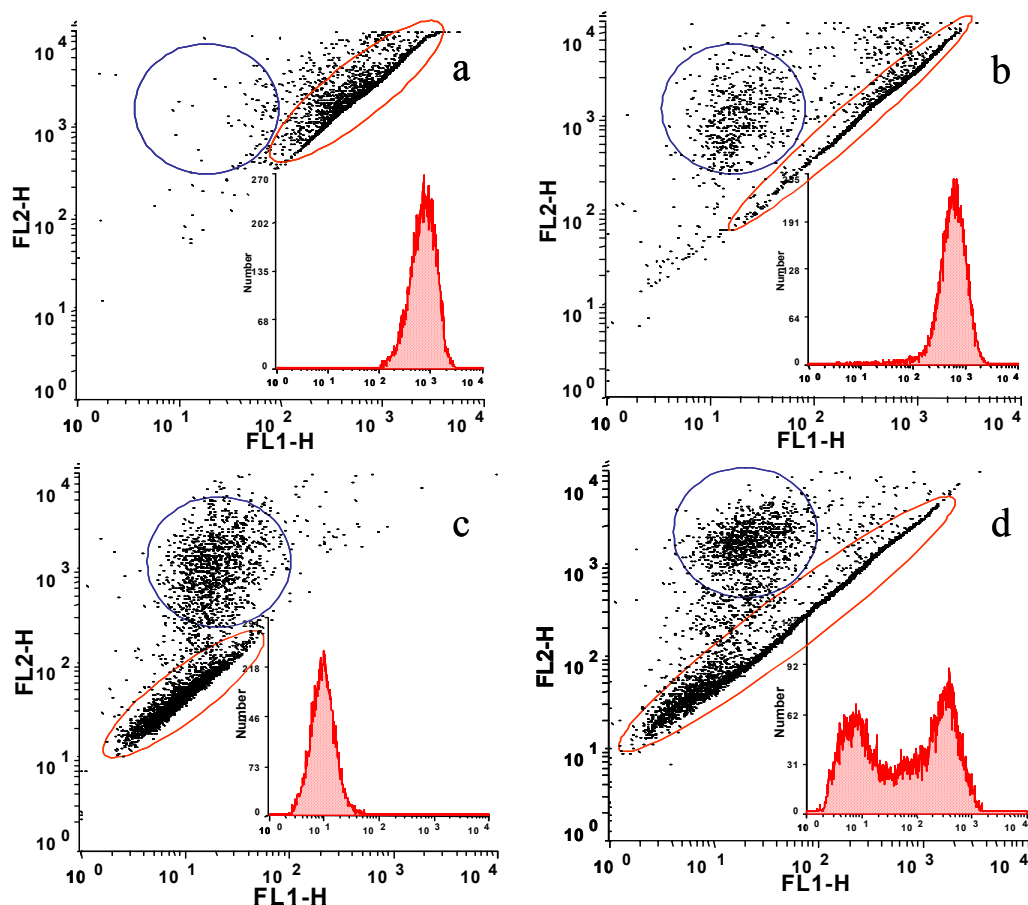
Megállapítottuk, hogy az eljárás ilyen körülmények között is működik. A KB-8-5 sejtek ugyan mutáns Pgp-t fejeznek ki, de hasonló konklúzióra jutottunk az összes eddig megvizsgált, magas expressziójú sejtvonal esetén is, amikor a Pgp-t alacsonyabb mértékben kifejező szubpopulációra kapuzva analizáltuk az adatokat. Megfigyelhető, hogy a KB-V1 és a KB-8-5 sejtvonalakon kisebb $R_{\text{kompetíció}}$ értékeket határoztunk meg az NIH 3T3 MDR1 sejtekhez képest, mind a CSA, mind a verapamil tekintetében, ami valószínűleg az alacsonyabb Pgp kifejeződéssel lehet összefüggésben.

A sejtvonalakon szerzett pozitív tapasztalataink hatására a DE OEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Pathológiai Intézetével kollaborációban elkezdtük hematológiai beteganyag mintáinak AKT-tesztelését. Az eddig vizsgált minták Pgp kifejezési szintje azonban rendkívül alacsonynak bizonyult. Ezeken a (alacsony multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF) értékekkel rendelkező) mintákon a kompetitor antitest (UIC2) általában csak alig észrevehetően kötődött, így az természetesen a másik anti-Pgp antitest kötődését sem befolyásolhatta jól mérhetően. Eljárásunk Pgp kifejeződés klinikai tesztelésére való alkalmasságának megítéléséhez ezért további adatgyűjtésre van szükség.

4.4.1.2. Modulátorok toxicitásának hatása az AKT kimenetelére

Az AKT eljárásban alkalmazott szubsztrát/modulátor koncentráció meghatározásához széles koncentráció tartományban vizsgáltuk a 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. Megjegyzendő, hogy a „CSA-szerű” (a drog és az UIC2 inkubációját követően, a nem konformáció-érzékeny antitest kötődésének jelentős csökkenésében, vagy teljes megszűnésében megnyilvánuló) hatás kevésbé függött a szubsztrát/modulátor koncentrációjától – „minden vagy semmi” jellegű volt.

A sejtpusztulás kezdeti fázisa ATP-depléciót okozva az AKT-ban CSA-szerű választ is eredményezhet (**21. ábra**). 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.



21. ábra Az AKT tesztet szimultán propidium-jodid (PI) festéssel végeztük. A dotplot-on ábrázoltuk az egyes sejtek FL1 (fluorescein, $488/530 \pm 15$ nm) ill. FL2 (PI, $488/585 \pm 21$ nm) fluoreszcencia intenzitásait. *Kék kapuval* jelöltük a propidium-jodid pozitív, azaz az elpusztult sejteket. Az élő sejtpopuláció *pirossal* visszakupuzott histogramját betétábraként tüntettük fel. Az a) ábra a csak sFx-MM6.15 antitesttel jelölt sejteket mutatja. A b) ábra a kezeletlen, a c) a CSA míg a d) az emetin kezelést követően UIC2 mAt-tel, majd sFx-MM6.15 antitesttel jelölt sejteket ábrázolja.

Ahogy az ábrán látható, a PI-pozitivitást mutató (azaz az elpusztult) sejtek a CSA-val kezeltékhez hasonló alacsony sFx-MM6.15 jelölődést mutatnak. Ezért az AKT analízist mindig a propidium-jodiddal festődő sejtek kikapuzásával végeztük és amennyiben arányuk $>10\%$ volt, a tesztet nem értékeltük.

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. Ez valószínűsíthető pl. az emetin esetében, a fluoreszcencia eloszlási histogram heterogén volta alapján (21.d). A fentiek miatt az AKT hatás diagnosztizálásában a kis AKT értéket mutató sejtpopuláció jelenlétét vagy hiányát és a heterogenitás koncentráció-függését tekintettük mérvadónak.

A teszt érzékenységének növelésére kétszínű fluoreszcens antitest jelzéssel is kísérleteztünk. Arra gondoltunk, hogy ha egy fluoreszcens festékkel konjugált UIC2 antitestet alkalmazunk kompetáló antitestként tesztünk első lépésében, az fokozhatja a teszt érzékenységét és egyszerre teszi láthatóvá az AKT-ot és az UIC2-shift-et is. Így az UIC2 kötődés mértékének növekedése, valamint az MM12.10 kötődés csökkenésének egyidejű megfigyelésével olyan fluoreszcencia arány képezhető, melynek változása nagyobb mértékű, mint amekkora pusztán az MM12.10 kötődésének csökkenéséből számítható $R_{kompeticio}$. Az antitestek jelölésére az általunk választott festék párok azonban nem váltották be reményeinket: a két leggyakrabban alkalmazott spektrálisan megfelelő tulajdonságú festék-konjugátum kombinációt kipróbálva kiderült, hogy a kompetítorként alkalmazott UIC2 antitest kötődési tulajdonságait lényegesen befolyásolja az a körülmény, hogy az antitest milyen fluoreszcens festéket hordoz.

Mivel a CSA hatására bekövetkező AKT jelenség a daganatos sejtek Pgp-pozitivitását mutatja, az általunk kifejlesztett kísérleti eljárás segítségével lehetővé válhat az AKT-teszt diagnosztikai célú alkalmazása klinikai, elsősorban hemoproliferatív kórképekben a Pgp kifejeződésének vizsgálatára.

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

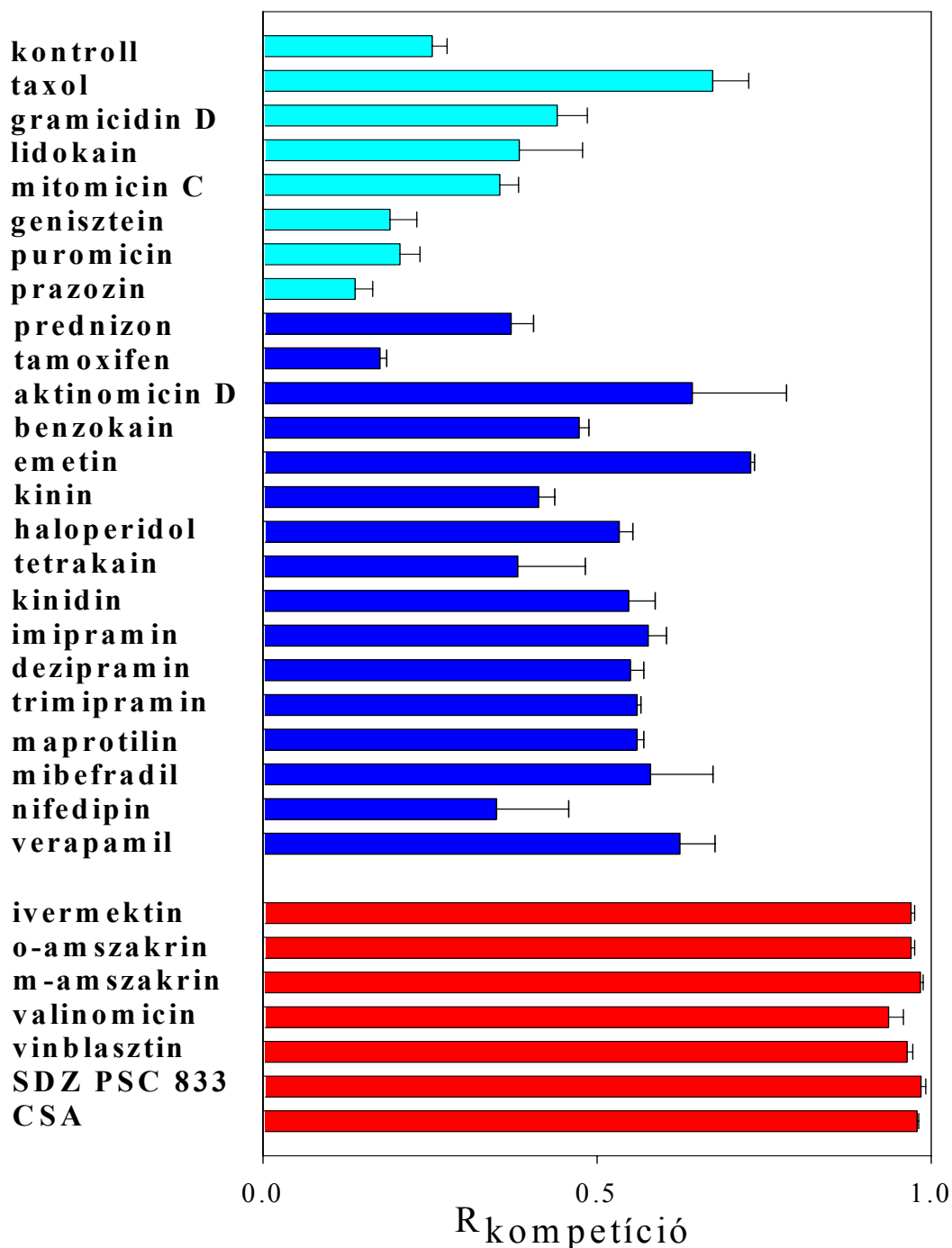
A kemoterápiás kezelések hatékonysága függ az alkalmazott citosztatikumok effektív intracelluláris koncentrációjától ill. szövetek közti megoszlásától, így új Pgp modulátorok kifejlesztése a mainál eredményesebb rákterápiához vezető fontos eszköz lehet.

A vegyületek Pgp-re való hatásának kimutatására számos metodikai eljárás ismert. A Roche Bioscience Pgp-szubsztrátok és -modulátorok fejlesztésével foglalkozó csoportja a potenciális drogok szűréseire egy többlépcsős eljárást javasol. A drogok szűrésének első stádiumában a fluoreszcencia indikátor tesztek (rodamin vagy calcein-AM teszt) kapnak szerepet, amit egy ATP-áz aktiválási teszt kísér, amely lehetővé teszi a szubsztrátok és a modulátorok megkülönböztetését. Ezen elsődleges szűrési technikákat követhetik a direkt transzport mérések, ill. az *in vivo* kísérletek (Schwab és *mtsai*, 2003).

Ha az első lépésben jelentősen szűkíteni lehetne a további vizsgálatokra érdemes vegyületek számát, az jelentősen rövidíthetné ezen vizsgálatok időigényét. Az AKT azáltal, hogy a már kis koncentrációban ható, tehát erős revertáló hatású CSA-t, vinblasztint megkülönbözteti a csak több tíz mikromolos koncentrációban ható verapamiltól, ezt az ígéretet hordozza.

Az AKT jelenségben a CSA és a vinbasztin hasonlóképpen viselkedett, szemben pl. a verapamillal, amely maximális modulációt okozó koncentrációban sem eredményezte az UIC2 antitest kötődését teszi dominánssá, míg a másik nem. Hogy a fenti dichotómia általános voltárol meggyőződjünk, egy sor további revertáló ágens illetve szubsztrát hatását is megvizsgáltuk.

A harminc anyagon elvégzett AKT teszt és párhuzamosan végzett calcein-AM teszt (nem részletezett) eredményét mutatja a **22. ábra**.



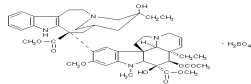
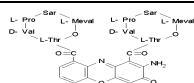
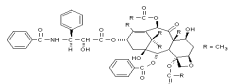
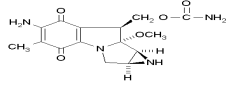
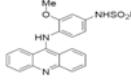
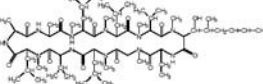
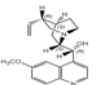
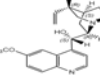
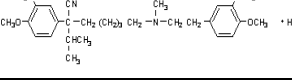
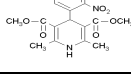
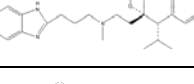
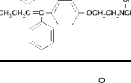
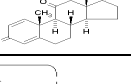
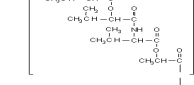
22. ábra Pgp-szubsztrátok és modulátorok hatása az AKT értékekre. A *világoskék oszlopok* olyan ismert Pgp-szubsztrátokat reprezentálnak, melyek nem befolyásolták szignifikánsan a sejtek calcein AM felvételét. A *sötétkék* és *piros oszlopokban* szereplő vegyületek jelentős növekedést eredményeznek a calcein AM akkumulációban. Az ábra legalább 3 független kísérlet eredményeinek átlagát mutatja ($\pm$ SD).

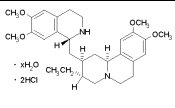
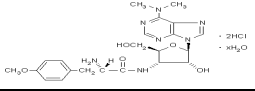
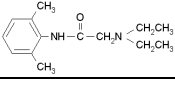
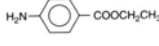
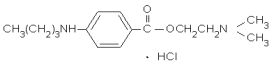
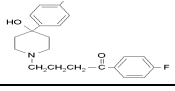
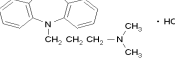
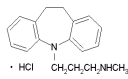
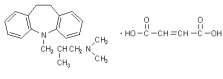
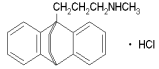
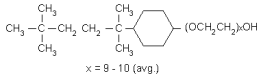
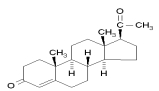
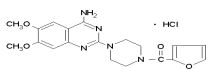
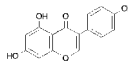
A Pgp szubsztrátjai, modulátorai – e két teszt tükrében – három csoportba sorolhatóak, szemben az UIC2-shift eljárással (vagy akár a calcein AM teszttel), melyek nem különböztetik meg pl. a CSA, a taxol, vagy az aktinomycin D hatását. A vegyületek különböző csoportba sorolása azok pumpa-gátló és az antitest-pár kompetíciójában manifesztálódó, a fehérje konformációjára való hatásukon alapul. A CSA-szerű modulátorok közé tartoznak a Pgp funkcióját teljes mértékben gátlolni tudó és $R_{\text{kompetíció}}$ értékeikben közel 1-et felvevő anyagok, mint pl. az ivermektin, a vinblasztin vagy a CSA analóg-SDZ PSC 833. A verapamil-típusú vegyületek a calcein-akkumuláció erős gátlására képesek, azonban a hatásukra fellépő antitest-kompetíció, a kezeletlen kontroll sejtekhez képest gyenge, vagy csak közepes mértékű. Az $R_{\text{kompetíció}}$ értékek ennek megfelelően a 0.2-től 0.7-ig tartó intervallumba esnek a verapamil, emetin, kinin, kinidin, mibefradil stb. csoportba sorolható anyagok esetén. 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 CSA-szerű vegyületek mindegyike hatékony revertáló szere a Pgp-nek. Továbbá, a CSA-szerű anyagok idézik elő azt a konformációs állapotot, mely az UIC2 mAt számára előnyös és amelyhez kapcsolódva az UIC2 egyben gátlolni képes a fehérje pumpa funkcióját (4.2.3.2.).

Az azonos csoportba tartozó ágensek jellemzőit (kémiai szerkezet, molekulásúly, sejtbeni célpont, ATP-áz aktiváció, ld. **4. táblázat** (Ambudkar és mtsai, 1999; Sarkadi és mtsai, 1992; Garrigues és mtsai, 2002/1; Garrigues és mtsai, 2002/2.; Regev és mtsai, 1999; Boulton és mtsai, 2002; Litman és mtsai, 1997)) összehasonlítva, egyelőre nem találtunk olyan közös tulajdonságot, mely molekuláris vagy fizikokémiai szinten megmagyarázhatná a fentiek szerinti eltérő viselkedésüket. Jelenleg molekuláris számításokat végzünk (kollaborációban), ill. további szubsztrátokat, revertáló szereket vonunk be vizsgálatainkba.

4. táblázat (A táblázatban a 22. ábrán, általunk három különböző csoportba sorolt, három különböző színnel jelölt (piros, világos- és sötétkék) vegyületeken kívül a TX-100, az NP-40 és a progeszteron szerepel.)

Alkalmazási terület		Elnevezés	Kémiai szerkezet	Molekulasúly (g/mol)	Hatása az ATP-áz aktivitásra
Daganatellenes szerek		vinblasztin		909.1	dózis függő
		actinomycin D		1255	gátló
		taxol		853.9	dózis függő
		mitomycin C		334.3	n.a.
		m-amszakrin		429.9	stimuláló
Immunosupresszánsok		ciklosporin A		1202.6	gátló
		SDZ PSC 833	ciklosporin analóg	~1200	gátló
Malária-ellenes szerek	Kálium-csatorna-blokkolók	kinin		324.4	stimuláló
Szívgyógy-szerek		kinidin		324.4	stimuláló
	Kalcium-csatorna-blokkolók	verapamil		491.1	stimuláló
		nifedipin		346.3	stimuláló
		mibefradil		568.6	n.a.
Antiösztrogének		tamoxifen		371.5	dózis függő
Szteroidok		prednizon		358.4	n.a.
Toxikus peptidek		valinomycin		1111	stimuláló
		gramicidin	lineáris polipeptid	1884 (A)	gátló

Alkalmazási terület	Vegyület elnevezése	Kémiai szerkezet	Molekulásúly (g/mol)	Hatása ATP-áz aktivitásra
Protein-szintézis gátlók	emetin		553.6	stimuláló
	puromicin		544.4	stimuláló
Helyi érzéstelenítők	lidokain		234.3	n.a.
	benzokain		165.2	n.a.
	tetrakain		300.8	n.a.
Antipszichotikumok	haloperidol		375.9	stimuláló
Antidepresszánsok	imipramin		316.9	n.a.
	dezipramin		302.9	n.a.
	trimipramine		410.5	n.a.
	maprotiline		313.9	n.a.
Detergensek	Triton X-100	$C_6H_{17}-(CH_2CH_2)_nOH$ $n \sim 10$	-	gátló
	Nonidet P-40		-	gátló
Anthelmintikumok	ivermektin	makrociklikus lakton	874	gátló
Szteroid hormonok	progeszteron		314.5	stimuláló
Antihipertenzív gyógyszerek	prazosin		419.9	stimuláló
Antiangiogén ágensek	genisztein		270.2	n.a.

5. 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. További kísérleteink arra utaltak, hogy a katalitikus ciklus verapamil jelenlétében gyorsan áthalad, vagy kihagyja az UIC2 kötődése számára kedvező konformációs állapotot, míg azt a CSA, vinblasztin vagy ATP-depléción indukálja. ATP-depléción 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 – calcein AM akkumuláción keresztül – más munkacsoportok által 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 az összes Pgp mennyiségének ~ 20 %-a lipid tutajokhoz asszociált és 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 citoskeletális rögzítettsége modulátor nélkül csak kismértékű, azonban keresztkötés hatására növekszik.

5. Az általunk kifejlesztett AKT eljárás jól reprodukálható a Pgp-t alacsonyabb mértékben kifejező sejtvonalakon is. Így várhatóan a módszer alkalmas 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.

6. GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Kísérleti adataink az alapkutatás területén hozzájárulnak a Pgp drog-transzportot kísérő konformáció-változásainak mélyebb megértéséhez.

A dolgozatban bemutatott AKT módszer alkalmas lehet multidrog-rezisztens, vagy ilyenek 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 (4.2.3.2.), 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 érzékenységgű. Ha a két antitest vagy ligandum ugyanazon, vagy átfedő, esetleg egymással allosztérikusán csatolt receptorhoz, vagy epitóphoz kötődik, akkor az egyik kötődésének növekedése a másik csökkenésével járhat együtt. Így az AKT módszer alkalmas lehet különböző fehérjék (élő sejtben kifejeződő vagy izolált-, ill. mesterségesen előállított receptorok, antigének, pumpák) konformációs változásainak, ligandumokkal, antitestekkel, szubsztrátokkal, modulátorokkal való kapcsolatának vizsgálatára.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Albrecht, D.L., Noelle, R.J. *J. Immunol.* 141:3915-3922. (1988).
- Ambudkar, S.V., Cardarelli, C.O., Pashinsky, I., Stein, W.D. *J. Biol. Chem.* 272:21160-21166. (1997).
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:361-398 (1999).
- Ambudkar, S.V., Ramachandra, M., Cardarelli, C.O., Pastan, I., Gottesman, M.M. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 37:325. (1996).
- Aran, J.M., Pastan, I., Gottesman, M.M. *Adv. in Pharmacol.* 46:1-42. (1999).
- Arceci, R., Stieglitz, K., Bras, J., Schinkel, A., Baas, F., Croop, J. *Cancer Research* 53:310-317. (1993).
- Ayesh, S., Shao, Y.-M., Stein, W.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1316:8-18. (1996).
- Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P. *Mol. Cell. Biol.* 9:5289-5297. (1989).
- Bacsó, Zs., Nagy, H., Bene, L., Goda, K., Szabó, G. *FEBS Advanced Lecture Course: „ATP Binding Cassette (ABC) Transporters: From Genetic Disease to Multidrug Resistance” Abstract Book* 142. (2003).
- Bain, L.J., McLacian, J.B., LeBlanc, G.A. *Environ. Health Perspect.* 105:812-818. (1997).
- Bakos, É., Klein, I., Welker, E., Szabó, K., Müller, M., Sarkadi, B., Váradi, A. *Biochem. J.* 323:777-783. (1997).
- Barnes, K.M., Dickstein, B., Cutler, G.B., Fojo, T.-jr., Bates, S.E. *Biochemistry* 35:4820-4827. (1996).
- Bau, R., Jin, K.K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 2079-2082. (2000).
- Beck, W.T., Cirtain, M.C., Lefko, J.L. *Molec. Pharmacol.* 24:485-492. (1983).
- Beck, W.T., Grogan, T.M. *Leukemia* 11:1107-1109. (1997).
- Bell, D.R., Gerlach, G.H., Kartner, N., Buick, R.N., Ling, V. *J. Clin. Oncol.* 3:311-315. (1985).
- Bervers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W.C., Zwaal, R.F.A. *Biochim. Biophys. Acta* 1439:317-330. (1999).
- Biedler, J. L., Riehm, H. *Cancer Res.* 30:1174-1184. (1970).

- Bolhuis, H., van Veen, H.W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J.M, Konings, W.N. *EMBO J.* 15:4239-4245. (1996).
- Borrel, M.N., Fiallo, M., Veress, I., Garnier-Suillerot, A. *Biochem. Pharmacol.* 50:2069-2076. (1995).
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:347-357. (1999).
- Bosch, I. Croop, J. *Biochim. Biophys. Acta* 1288:37-54. (1996).
- Boulton, D.W., DeVane, C.L., Liston, H.L., Markowitz, J.S. *Life Sci.* 71:163-169. (2002).
- Broxterman, H.J., Pinedo, H.M., Kuiper, C.M., van der Hoeven, J.J., de Lange, P., Quak, J.J., Scheper, R.J., Keizer, H.G., Schuurhuis, G.J., Lankelma, J. *Int. J. Cancer.* 43:340-343 (1989).
- Broxterman, H.J., Lankelma, J. Pinedo, H.M. *Eur. J. Cancer.* 32:1024-1033 (1996).
- Broxterman, H.J., Sonneveld, P., Feller, N., Ossenkoppele, G.J., Wahrer, D.C.R., Eekman, C.A., Schoester, M., Brophy-Legrand, O., Simonin, G., Perrot, J.Y., Zittoun, R., Marie, J.P. *Blood* 91:4480-4488. (1998).
- Bruggemann, E.P., Currier, S.J., Gottesman, M.M., Pastan, I. *J. Biol. Chem.* 267:21020-21026. (1992).
- Bruggemann, E.P., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Pastan, I. *J. Biol. Chem.* 264:15483-15488. (1989).
- Callaghan, R., Berridge, G., Ferry, D.R., Higgins, C.F. *Biochim. Biophys. Acta* 1328:109-124. (1997).
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D., Pastan, I. *Cell* 47:381-389. (1986).
- Cherif, A., Farquhar, D. *J. Med. Chem.* 35:3208-3214. (1992).
- Childs, S., Ling, V. *Important Adv. Oncol.* 21-36. (1994).
- Cianfriglia, M., Willingham, M.C., Tombesi, M., Scagliotti, G.V., Frasca, G., Chersi, A. *Int. J. Cancer* 56:153-160. (1994).
- Cianfriglia, M., Romagnoli, G., Tombesi, M., Poloni, F., Modugno, F.D., Falasca, G., Castagna, M., Chersi, A. *Int. J. Cancer* 61:142-147. (1995).
- Cole, S.C.P., Bhardway, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V., Deeley, G.G. *Science* 258:1640-1654. (1992).
- Coon, J.S., Knudson, W., Clodfelter, K., Lu, B., Weinstein, R.S. *Cancer Res.* 51:897-902. (1991).
- Dano, K. *Biochim. Biophys. Acta* 323:466-483 (1973).

- Dean, M., Allikmets, R. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:779-785. (1995).
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. *J. Lipid Res.* 42:1007-1017. (2001).
- Dellinger, M., Pressman, B.C., Calderon-Higginson, C., Savaraj, N., Tapiero, H., Kolonias, D., Lampidis, T.J. *Cancer Res.* 52:6385-6389. (1992).
- Demmer, A., Thole, H., Kubesch, P., Brandt, T., Raida, M., Fislage, R., Tummeler, B. *J. Biol. Chem.* 272:20913-20919. (1997).
- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10594-10599. (1997).
- Doige, C.A., Ames, G.F. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:291-319. (1993).
- Doige, C.A., Yu, X., Sharom, F.J. *Biochim. Biophys. Acta* 1146:65-72. (1993).
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:15665-1570 (1988).
- Drori, S., Eytan, G.D., and Assaraf, Y.G. *Eur. J. Biochem.* 228:1020-1029. (1995).
- Druley, T.E., Stein, W.D., Roninson, I.B. *Biochemistry* 40:4312-4322. (2001).
- Dudeja, P.K., Anderson, K.M., Harris, J.S., Buskingham, L., Coon, J.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 319:309-315. (1995).
- Ekins, S., Kim, R.B., Leake, B.F., Dantzig, A.H., Schuetz, E.G., Lan, L.-B., Yasuda, K., Shepard, R.L., Winter, M.A., Schuetz, J.D., Wikel, J.H., Wrighton, S.A. *Mol. Pharmacol.* 61:974-981. (2002).
- Endicott, J.A., Ling, V. *Ann. Rev. Biochem.* 58:137-171. (1989).
- Evers, R., Zaman, G.J.R., van Deemeter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L.C., Oude Elferink, R.P., Borst, P., Schinkel, A.H. *J. Clin. Invest.* 97:1211-1218. (1996).
- Eytan, G.D., Regev, R., Oren, G., Assaraf, Y.G. *J. Biol. Chem.* 271:12897-12902. (1996).
- Eytan, G.D., Regev, R., Oren, G., Hurwitz, C.D., Assaraf, Y.G. *Eur. J. Biochem.* 248:104-112. (1997).
- Ferry, D.R., Malkhandi, J.P., Russel, M.A., Kerr, D.J. *Biochem. Pharm.* 49:1851-1861. (1995).
- Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Fritz, J.M., Meijer, C. J., Scheper, R.J., Zaman, G.J.R. *Cancer Res.* 54:4557-4563. (1994).
- Flens, M.J., Zaman, G.J.R., van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijsers, A.B., Scheffer, G.L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C. J., Scheper, R.J. *AM. J. Pathol.* 148:1237-1247. (1996).

- Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesmen, M.M., Pastan, I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:265-269. (1987).
- Ford, J.M. *Eur. J. Cancer* 32A:991-1001. (1996).
- Friche, E., Buhl Jensen, P., Roed, H., Skovsgaard, T., Nissen, N.I. *Biochem. Pharmacol.* 39:1721-1726. (1990).
- Friedenberg, W.R., Spencer, S.K., Musser, C., Hogan, T.F., Rodvold, K.A., Rushing, D.A., Mazza, J.J., Tewksbury, D.A., Marx, J.J. *Leuk. Lymphoma* 34:171-178. (1999).
- Garrigos, M., Mir, L.M., Orlowski, S. *Eur. J. Biochem.* 244:664-673. (1997).
- Garrigues, A., Loiseau, N., Delaforge, M., Ferté, J., Garrigos, M., André, F., Orlowski, S. *Mol. Pharmacol* 62:1288-1298. (2002). / 1.
- Garrigues, A., Nugier, J., Orlowski, S., Ezan, E. *Anal. Biochem.* 305:106-114. (2002). / 2.
- Georges, E., Tsuruo, T., Ling, V. *J. Biol. Chem.* 268:1792-1798. (1993).
- Geppert, T.D., Lipsky, P.E. *J. Immunol.* 146:3298-3305. (1991).
- Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V. *Nature* 324:485-489. (1986).
- Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambudkar, S.V., Licht, T., Cardarelli, C.O., Pastan, I., Gottesman, M.M. *J. Biol. Chem.* 271:1708-1716. (1996).
- Lavie, Y., Liscovitch, M. *Glycoconj. J.* 17:253-259. (2000).
- Goda, K., Nagy, H., Bene, L., Balázs, M., Arceci, R., Mechetner, E., Szabó, G. *Cancer Det. and Prev.* 24:415-421. (2000).
- Goda, K., Nagy, H., Mechetner, E., Cianfriglia, M., Szabó, G.Jr. *Eur. J. Biochem.* 269:2672-2677. (2002).
- Gottesman, M.M., Pastan, I. *Annu. Rev. Biochem.* 62:385-427. (1993).
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. *Nat. Rev. Cancer* Vol. 2:48-58. (2002).
- Gottesman, M.M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., German, U.A., Pastan, I. *Annu. Rev. Genet.* 29:607-649. (1995).
- Greenberg, L.M. *J. Biol. Chem.* 268:11417-11425. (1993).
- Gros, P., Croop, J., Housman, D.E. *Cell* 47:371-380. (1986).
- Hamada, H., Tsuruo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:7785-7789. (1986).
- Harding, C.V., Geuze, H.J. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:596-605. (1993).

- Higgins, C.F. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113 (1992).
- Higgins, C.F., Gottesman, M.M. *Trends Pharmacol. Sci.* 17:18-21. (1992).
- Higgins, C.F., Linton, K.J. *Science* 293:1782-1784. (2001).
- Higgins, M.C., Callaghan, R. *Biochemistry*, 40:15733-15742. (2001).
- Hipfner, D.R., Deeley, R.G., Cole, S.P. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:359-376. (1999).
- Holló, Zs., Homolya, L., Hegedűs, T., Sarkadi, B. *FEBS Lett.* 383:99-104. (1996).
- Holló, Zs., Homolya, L., Davis, C.W., Sarkadi, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1191: 384-388. (1994).
- Holmes, J.A., West, R.R. *Br. J. Cancer* 69:382-384. (1984).
- Homolya, L., Holló, Zs., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesman, M.M., Sarkadi, B. *J. Biol. Chem.* 268 (29): 21493-21496. (1993).
- Homolya, L., Holló, Zs., Müller, M., Mechetner, E.B., Sarkadi, B. *Br. J. Cancer* 73:849-855. (1996).
- Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Perez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., Bates, S.E. *Cancer Res.* 61 (18): 6635-6639. (2001).
- Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Ambudkar, S.V., Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Pastan, I., Gottesman, M.M. *J. Biol. Chem.* 273:16631-16634. (1998).
- Huet, S., Marie, J.P., Gualde, N., Robert, J. *Cytometry* 34:248-256. (1998).
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F. *Nature* 346:362-365. (1990).
- Ichikawa, M., Yoshimura, A., Furakawa, T., Sumizawa, T., Nakazima, Y., Akiyama, S-I. *Biochim. Biophys. Acta* 1073:309-315. (1991).
- Itsubo, M., Ishikawa, T., Toda, G., Tanaka, M. *Cancer* 73:298-303. (1994).
- Jachez, B., Cianfriglia, M., Loo, F. *Anti-Cancer Drugs* 5:655-665. (1994).
- Jegorov, A., Cvak, L., Husek, A., Simek, P., Heydova, A., Ondracek, J., Pakhomova, S., Husak, M., Kratochvil, B., Sedmera, P., Havlicek, V. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65:1317-1326. (2000).
- Jones, P.M., George, A.M. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:187-202. (1999).
- Jones, P.M., George, A.M. *J. Membr. Biol.* 166:133-147. (1999).
- Juliano, R.L., Ling, V. *Biochim. Biophys. Acta* 455:152-162. (1976).

- Julien, M., Gros, P. *Biochemistry* 39:4559-4568. (2000).
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y. *Int. J. Cancer*. 97:626-630. (2002).
- Karasz, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakács, G., Holló, Zs., Telek, B., Kiss, A., Rejtő, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B., Kappelmayer, J. *Br. J. Haematol.* 112:308-331. (2001).
- Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., Ling, V. *Nature* 316:820-823. (1985).
- Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V. *Science* 221:1285-1288. (1983).
- Kawamoto, S., Deguchi, T., Nezesa, S., Yamada, S., Okano, M., Kawada, Y. *Urol. Res.* 25:407-412. (1997).
- Kerr, K.M., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. *J. Biol. Chem.* 276:8657-8664. (2001).
- Kessel, D. *Cancer Comm.* 1:145-149. (1989).
- Klein, I., Sarkadi, B., Váradi, A. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:237-262. (1999).
- Sharom, F.J. In: ABC Proteins: From Bacteria to Man, Edited by: Holland, I.B., Kuchler, K., Cole, S.P.C., Higgins, C.F., Chapter 6. pp.:107-133. Academic Press, An imprint of Elsevier Science (2003).
- Krupka, R.M. *J. Membr. Biol.* 172:129-143. (1999).
- Lankelma, J., Pineda, H.M., Lowenberg, B., Schurhuis, G.J. *Blood* 87:4809-4816. (1996).
- Lavie, Y., Fiucci, G., Liscovitch, M. *J. Biol. Chem.* 273:32380-32383. (1998).
- Lavie, Y., Liscovitch, M. *Glycoconj J.* 17:253-9. (2000).
- Lee, J.-Y., Urbatsch, I.L., Senior, A.E., Wilkens, S. *J. Biol. Chem.* 277:40125-31. (2002).
- Leighton, J.C. *Hematol. Oncol. Clin. of North Am.* 9:251-273. (1995).
- Lerner-Marmarosh, N., Gimi, K., Urbatsch, I.L., Gros, P., Senior, A. *J. Biol. Chem.* 274(49):34711-34718. (1999).
- Licht, T., Pastan, I., Gottesman, M.M. *Ann. Hematol.* 69:159-171. (1994).
- Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovich, L., Riordan, J.R. *Cancer Treat. Rep.* 67:869-874. (1983).
- List, A.F., Kopecky, K.J., Willman, C.L., Head, D.R., Persons, D.L., Slovak, M.L., Dorr, R., Karanes, C., Hynes, H.E., Doroshow, J.H., Shurafa, M., Appelbaum, F.R. *Blood* 98:3212-3220 (2001).

- Litman, T., Zeuthen, T., Skovsgaard, T., Stein, W.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1361:159-168. (1997).
- Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. *Cell Mol. Life Sci.* 58:931-959. (2001).
- Liu, R., Sharom, F.J. *Biochemistry* 35:11865-11873. (1996).
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., Aubourg, P. *J. Biol. Chem* 274:32738-32743. (1999).
- Loe, D.W., Sharom, F.J. *Br. J. Cancer* 68:342-351. (1993).
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 272:20986-20989. (1997).
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 276:31800-31805. (2001).
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:3511-3516. (2002).
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 278:1575-1578. (2003).
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *Biochem. Cell Biol.* 77:11-23. (1999).
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 270:22957-22961. (1995).
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 275:19435-19438. (2000). / 2.
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 276:36877-36880. (2001).
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 277:44332-8. (2002).
- Loo, T.W., Clarke, D.M. *J. Biol. Chem.* 275:5253-5256. (2000). / 1.
- Marie, J.P. *Hematol. Oncol. Clin. of North Am.* 9:239-249. (1995).
- Marie, J.P., Legrand, O., Perrot, J.Y., Chevillard, S., Huet, S., Robert, J. *Seminars in Hematology* 34, suppl, 5:63-71. (1997).
- Marie, J.P., Rojas, V.A., Warnke, R.A., McFall, P.J., Smith, S.D., Sikic, B.I. *Leukemia* 8:327-335. (1994).
- Marie, J.P., Zhou, D.C., Gurbuxani, S., Legrand, O., Zittoun, R. *Eur. J. Cancer* 32:1034-1038. (1996).
- Marks, D.C., Su, G.M., Davey, M.W. *Br. J. Haematol.* 95:587-595. (1996).
- Martin, C., Berridge G., Higgins, C.F., Callaghan, R. *Br. J. Pharmacol.* 122:765-771. (1997).
- McClean, S., Hill, B.T. *Biochim. Biophys. Acta* 1114:107-127. (1992).
- Mechetner, E.B., Roninson, I.B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:5824-5828. (1992).

- Mechetner, E.B., Schott, B., Morse, B.S., Stein, W.D., Druley, T., Davis, K.A., Tsuruo, T., Roninson, I.B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:12908-12913. (1997.)
- Morris, D.I., Greenberg, L.M., Bruggemann, E.P., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I., Seamon, K.B. *Mol. Pharmacol.* 46:329-337. (1994).
- Mülder, H.S., Dekker, H., Pinedo, H.M., Lankelma, J. *Biochem. Pharmacol.* 50:967-974. (1995).
- Nishino, J., Suzuki, H., Sugiyama, D., Kitazawa, T., Ito, K., Hanano, M., Sugiyama, Y. *Pharmacol. Exp. Ther.* 290:289-294. (1999).
- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:7160-7164. (1990).
- Okochi, E., Iwahashi, T., Tsuruo, T. *Leukemia* 11:1119-1123. (1997).
- Orlowski, S., L.M. Mir, J. Belehradek jr., M. Garrigos. *Biochem. J.* 317:515-522. (1996).
- Orlowski, S., Selosse, M.A., Boudon, C., Micoud, C., Mir, L.M., Belehradek, J.Jr., Garrigos, M. *Cancer Biochem. Biophys.* 16:85-110. (1998).
- Osmak, M. *Neoplasma* 40:97-101. (1993).
- Özvegy, Cs., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., Sarkadi, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285:111-117. (2001).
- Pascaud, C. Garrigos, M., Orlowski, S. *Biochem. J.* 333: 351-358. (1998).
- Pawagi, A.B., Wang, J., Silverman, M., Reithmeier, R.A., Deber, C.M. *J. Mol. Biol.* 235:554-564. (1994).
- Pawlak, W., Zolnieriek, J., Sarosiek, T., Szczylik, C. *Cancer Treat. Rev.* 5:333-350. (2000).
- Pearson, J.W., Fogler, W.E., Volker, K., Usui, N., Goldenberg, S.K., Gruys, E., Riggs, C.W., Komschlies, K., Wiltout, R.H., Tsuruo, T. *J. Natl. Cancer Inst.* 83:1386-1391. (1991).
- Poloni, F., Romagnoli, G., Cianfriglia, M., Felici, F. *Int. J. Cancer* 61:727-731. (1995).
- Putman, M., van Veen, H.W., Poolman, B., Konings, W.N. *Biochemistry* 38:1002-1008. (1999).
- Qu, Q., Chu, J.W.K., Sharom, F.J. *Biochemistry* 42:1345-1353. (2003). / 2.
- Qu, Q., Russell, P.L., Sharom, F.J. *Biochemistry* 42:1170-1177. (2003). / 1.
- Qu, Q., Sharom, F.J. *Biochemistry*, 40:1413-1422. (2001).
- Qu, Q., Sharom, F.J. *Biochemistry*, 41:4744-4752. (2002).

- Ramachandra, M., Ambudkar, S.V., Chen, D., Hrycyna, C.A., Dey, S., Gottesman, M.M., Pastan, I. *Biochemistry* 37:5010-5019. (1998).
- Ramu, A., Ramu, N. *Leuk. Lymphoma* 9:247-253. (1993).
- Raymond, M., Gros, P. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86:6488-6492. (1989).
- Regev, R., Assaraf, Y.G., Eytan, G.D. *Eur. J. Biochem.* 259:18-24. (1999).
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grezelczak, A., Aielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L. *Science* 245:1066-1073. (1989).
- Rochlitz, C.F., de Kant, E., Neubauer, A., Heide, I., Bohmer, R., Oertel, J., Huhn, D., Herrmann, R. *Ann. Hematol.* 65:241-246. (1992).
- Roepe, P.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1241:385-405. (1995).
- Roepe, P.D. *J. Membr. Biol.* 166:71-73. (1998).
- Roepe, P.D., Wei, L.Y., Hoffman, M.M., Fritz, F. *J. Bioenerg. Biomembr.* 6:541-555. (1996).
- Romagnoli, G., Poloni, F., Flego, M., Moretti, F., Modugno, F.D., Chersi, A., Falasca, G., Signoretti, C., Castagna, M., Cianfriglia, M. *Biol. Chem.* 380:553-559. (1999).
- Romsicki, Y., Sharom, F.J. *Biochemistry* 40:6937-6947. (2001).
- Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.-W., Gottesman, M.M., Pastan, I. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83:4538-4542. (1986).
- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C., Higgins, C.F. *J. Biol. Chem.* 272:10685-10694. (1997).
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J., Higgins, C.F. *EMBO J.* 20:5615-5625. (2001).
- Ruetz, S., Gros, P. *Cell* 77:1071-1081. (1994).
- Saeki, T., Shimabuku, A.M., Ueda, K., Komano, T. *Biochim. Biophys. Acta* 1107:105-110. (1992).
- Safa, A.R. E.d. Gupta S., Tsuruo T. pp. 231-250. (1996).
- Sarkadi, B., Müller, M. *Semin Cancer Biol.* 8:171-182. (1997).
- Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A., Scarborough, G.A. *J. Biol. Chem.* 267:4854-4858. (1992).
- Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:2515-2520. (2000).

- Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. *J. Biol. Chem.* 276:11653-11661. (2001).
- Scala, S., Akhned, N., Rao, U.S., Paull, K., Lan, L.B., Dickstein, B., Lee, J.S., Elgemeie, G.H., Stein, W.D., Bates, S.B. *Mol. Pharmacol.* 51:1024-1033. (1997).
- Schinkel, A.H., Arceci, R.J., Smit, J.J.M., Wagenaar, E., Baas, F., Dollé, M., Tsuruo, T., Mechetner, E., Roninson, I.B., Borst, P. *Int. J. Cancer* 55:478-484. (1993).
- Schinkel, A.H., Kemp, S., Dolle, M., Rudenko, G., Wagenaar, E. *J. Biol. Chem.* 268:7474-7481. (1993).
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, A.M., Deemter, L., Smit, J.J.M., Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., Telling, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:4028-4033. (1997).
- Schwab, D., Fischer, H., Tabatabaei, A., Poli, S., Huwyler, J. *J. Med. Chem.* 46:1716-1725. (2003).
- Sebestyén, Zs., Nagy, P., Horváth, G., Vámosi, Gy., Debets, R., Gratama, J.W., Alexander, D.R., Szöllösi, J. *Cytometry* 48:124-135. (2002).
- Seelig, A. *Eur. J. Biochem.* 251:251-261. (1998).
- Seelig, A., Landwojtowicz, E. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12:31-40. (2000).
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K., Urbatsch I.L. *FEBS Lett.* 377:285-289. (1995).
- Senior, A.E., Bhagat, S., *Biochemistry* 37:831-836. (1998).
- Shapiro, A.B., Ling, V. *Eur. J. Biochem.* 254:189-193. (1998).
- Shapiro, A.B., Ling, V. *Eur. J. Biochem.* 250:130-137. (1997).
- Shapiro, A.B., Fox, K., Lam, P., Ling, V. *Eur. J. Biochem.* 259:841-850. (1999).
- Sharom, F.J., Yu, X., Chu, J.W., Doige, C.A. *Biochem. J.* 308:381-390. (1995).
- Sharom, F.J., Yu, X., Lu, P., Liu, R., Chu, J.W., Szabo, K., Muller, M., Hose, C.D., Monks, A., Varadi, A., Seprodi, J., Sarkadi, B. *Biochem. Pharmacol.* 58:571-586. (1999).
- Skovsgaard, T. *Cancer Res.* 38:1785-1791. (1978).
- Smith, C.A., Rayment, I. *Biochemistry* 35:5404-5417. (1996).
- Sonneveld, P. *Pathol. Biol.* 47:182-187. (1999).
- Sonneveld, P., Marie, J.P., Groenewegen, A. *Blood* 84:abs111. (1994).
- Stein, W.D. *Physiol. Rev.* 77:545-590. (1997).
- Tamai, I., Safa, A.R. *J. Biol. Chem.* 266:16796-16800. (1991).

- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C. *J. Histochem. Cytochem.* 37:159-164. (1989).
- Thierry, A.R., Vige, D., Coughlin, S.S., Belli, J.A., Dritshilo, A., Rahman, A. *FASEB J.* 7:572-579. (1993).
- Trezise, A.E.O., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepulveda, F.V., Buchwald, M., Higgins, C.F. *EMBO J.* 11:4291-4303. (1992).
- Tsuruo, T., Hamada, H., Sato, S., Heike, Y. *Jpn. J. Cancer Res.* 80:627-631. (1989).
- Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I., Roninson, I.B., Ling, V., Riordan, J.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141:956-962. (1986).
- Ueda, K., Taguchi, Y., Morishima, M. *Semin. Cancer Biol.* 8:151-159. (1997).
- Urbatsch, I.L., Beaudet, L., Carrier, I., Gros, P. *Biochemistry* 37:4592-4602. (1998).
- Urbatsch, I.L., Gimi, K., Wilke-Mounts, S., Senior, A.E. *J. Biol. Chem.* 275:25031-25038. (2000).
- Urbatsch, I.L., Sankaran, B., Bhagat, S., Senior, A.E. *J. Biol. Chem.* 270:26956-26961. (1995). / 1.
- Urbatsch, I.L., Sankaran, B., Weber, J., Senior, A.E. *J. Biol. Chem.* 270:19383-19390. (1995). / 2.
- Urbatsch, I.L., Senior, A.E. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:135-140. (1995).
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G. *Cell* 87:507-517. (1996).
- van Helvoort, A., Giudici, M.L., Thielemans, M., van Meer, G. *J. Cell Sci.* 110:75-83. (1997).
- Vazques-Laslop, N., Zheleznova, E.E., Markham, P.N., Brennan, R.G., Neyfakh, A.A. *Biochem. Soc. Trans.* 28:517-520. (2000).
- Vigano, C., Julien, M., Gros, P., Ruysschaert J.M. *J. Biol. Chem.* 277:5008-5016. (2002).
- Wadkins, R.M., Roepe, P.D. *Int. Rev. Cytol.* 171:121-165. (1997).
- Wang, G., Pincheira, R., Zhang, M., Zhang, J.-T. *Biochem. J.* 328:897-904. (1997).
- Woodcock, D.M., Linsenmeyer, M.E., Chojnowski, G., Kriegler, A.B., Nink, V., Webster, L.K., Sawyer, W.H. *Br. J. Cancer* 66:62-68. (1992).

Yusa, K., Naito, M. and Tsuruo, T. pp. 331-344. In: Gupta S., Tsuruo T. Multidrug resistance in cancer cells. Molecular, biochemical, physiological and biological aspects. John Wiley & Sons 1996.

Zamora, J.M., Pearce, H.L., Beck, W.T. *Mol. Pharmacol.* 33:454-462. (1988).

Zhang, J.T., Ling, V. *J. Biol. Chem.* 266:18224-18232. (1991).

Zhang, M., Wang, G., Shapiro, A., Zhang, J.T. *Biochemistry* 35:9728-36. (1996).

Zhang, X., Collins, K.I., Greenberger, L.M. *J. Biol. Chem.* 270:5441-5448. (1995).

Zheleznova E.E., Markham, P.N., Edgar, R., Bibi, E., Neyfakh, A.A., Brennan, R.G. *Trends Biochem. Sci.* 25:39-42. (2000).

Zheleznova E.E., Markham, P.N., Neyfakh, A.A., Brennan, R.G. *Cell* 96:353-362. (1999).

Zhou, Y., Gottesman, M.M., Pastan, I. *Arch. Biochem. Biophys.* 367:74-80. (1999).

Zordan-Nudo, T., Ling, V., Liu, Z., Georges, E. *Cancer res.* 53:5994-6000. (1993).

8. 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.
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.
- — — — —
6. Márián, T., Szabó, G., Goda, K., **Nagy, H.**, Szincsák, N., Juhász, I., Galuska, L., Balkay, L., Mikecz, P., Trón, L., Krasznai, Z.
A noninvasive method to diagnose MDR related Pgp expression by parallel administration of 18FDG and 99mTc-MIBI
Eur. J. Nucl. Med. 2001. Aug;28 (8): PS376 Suppl. S. (*absztrakt*) **IF:3.464**
 7. **Nagy, H.**, Goda, K., Szakács, G., Arceci, R., Váradi, A., Sarkadi, B., Mechetner, E., Szabó, G.
Fluorescence resonance energy transfer studies of function-related changes in the oligomerization and conformational state of Pgp
Cytometry 42 (2): 151-152. 2000. (*absztrakt*) **IF: 2.22**
 8. Goda, K., **Nagy, H.**, Bene, L., Balázs, M., Arceci, R., Mechetner, E., Szabó, G.
Conformational heterogeneity of P-glycoprotein
Cancer Detect Prev. 24 (5): 415-421. 2000. (*absztrakt*) **IF: 1.324**

Poszterek és előadások

1. Goda, K., **Nagy, H.**, Wielinga, P., Bene, L., Lankelma, J., Mechetner, E., Szabó, G.:
Complex drug binding interactions and extensive conformational changes in Pgp-mediated drug pumping. Nice, France 1998. (The abstract is published in *Cancer Detection and Prevention*, 22:215. 1998.) (*poszter*)
2. **Nagy, H.**, Goda, K., Szakács, G., Arceci, R., Váradi, A., Sarkadi, B., Mechetner, E., Szabó, G.:
Fluorescence resonance energy transfer studies of function-related changes in the oligomerization and conformational state of Pgp. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette Transporters: From Multidrug Resistance to Genetic Disease” Gosau, Austria 1999. (*poszter*)
3. Goda, K., **Nagy, H.**, Wielinga, P., Bene, L., Lankelma, J., Arceci, R., Mechetner, E., Szabó, G.:
Complex drug binding interactions and extensive conformational changes in Pgp-mediated drug pumping. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette Transporters: From Multidrug Resistance to Genetic Disease” Gosau, Austria 1999. (*előadás*)

4. **Nagy, H.**, Goda, K., Szabó, G.: A P-glikoprotein konformáció-változásaira érzékeny antitest kompetíciós jelenség. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen 2001. *(poszter)*
5. Szabó, G., Goda, K., **Nagy, H.**, Arceci, R., Cianfriglia, M., Mechetner, E.: P-glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 42, March 2001. Abstract Number: 4937. *(poszter)*
6. **Nagy, H.**, Goda, K., Arceci, R., Cianfriglia, M., Mechetner, E., Szabó, G.: P-glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance” Gosau, Austria 2001. *(előadás)*
7. **Nagy, H.**, Goda, K., Lustyik, Gy., Mechetner, E., Cianfriglia, M., Rychly, J., Szabó, G.: Conformal heterogeneity of P-glycoprotein associated with topological heterogeneity at the cell surface. FEBS Advanced Lecture Course: „ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Genetic Disease to Multidrug Resistance” Gosau, Austria 2001. *(poszter)*
8. **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)*
9. 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)*
10. 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)*

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Szabó Gábornak, szakmai előrehaladásom irányításáért és támogatásáért és emberi problémáim megoldásában nyújtott önzetlen segítségéért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Damjanovich Sándornak és Dr. Gáspár Rezsőnek, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatóinak, hogy lehetőséget adtak a kutatáshoz. Szerencsésnek érzem magam, hogy az intézet Ph.D. hallgatója lehettem. Nagyon szépen köszönöm az intézet valamennyi dolgozójának munkám során nyújtott áldozatkész segítségét és hogy mind szakmailag, mind emberileg formáltak, tanítottak.

Köszönettel tartozom Dr. Joachim Rychlynek (Universitát Rostock, Németország), akinek a labortriumban számos módszert elsajátíthattam.

Ksznm férjem, szüleim és testvérem szeretetét és kitartast, amely erőt és biztonságos hátteret adott munkám végzéséhez.

s végül, de nem utolsó sorban ksznm kisfiam, PatrikBuci szeretetét, amely nélkül ez a dolgozat bizonyosan nem születhetett volna meg.

**10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**