

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

---

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

FENYVESI FERENC



Témavezető:

Dr. Szabó Gábor

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2008

## Tartalomjegyzék

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tartalomjegyzék.....                                                                                                         | 1  |
| Rövidítések jegyzéke.....                                                                                                    | 3  |
| 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....                                                                                    | 4  |
| 1.1. A P-glikoprotein és a multidrog rezisztencia .....                                                                      | 4  |
| 1.2. A Pgp katalitikus ciklusa.....                                                                                          | 8  |
| 1.2.1. A katalitikus ciklus modelljei .....                                                                                  | 8  |
| 1.2.2. Konformációváltozások a katalitikus ciklus során: az UIC2-shift jelenség.....                                         | 11 |
| 1.3. A Pgp lipidkörnyezete.....                                                                                              | 12 |
| 1.4. A Pgp transzportfunkció gátlásának lehetőségei.....                                                                     | 13 |
| 1.5. Közvetlen előzmények.....                                                                                               | 14 |
| 1.5.1. Az „AKT” teszt.....                                                                                                   | 14 |
| 1.5.2. A detergens elúciós eljárás .....                                                                                     | 17 |
| 1.5.3. Nyitott kérdések.....                                                                                                 | 17 |
| 2. Céltűzések .....                                                                                                          | 19 |
| 3. Anyagok és módszerek .....                                                                                                | 20 |
| 3.1. Sejtenyésztés .....                                                                                                     | 20 |
| 3.2. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása .....                                                                  | 20 |
| 3.3. Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése monoklonális antitesttel .....                                                      | 20 |
| 3.4. Detergens elúciós eljárás.....                                                                                          | 22 |
| 3.5. A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése.....                                                            | 22 |
| 3.6. Fluoreszcens festék akkumuláció meghatározása .....                                                                     | 22 |
| 3.7. A sejtmembrán festése merocianin 540-nel .....                                                                          | 23 |
| 3.8. Áramlási citometria.....                                                                                                | 23 |
| 3.9. Intracelluláris ATP tartalom meghatározása .....                                                                        | 23 |
| 3.10. Életképességi vizsgálatok.....                                                                                         | 24 |
| 3.10.1. Életképesség vizsgálata áramlási citometriás mérések során .....                                                     | 24 |
| 3.10.2. MTT-teszt .....                                                                                                      | 24 |
| 3.11. Sejtek koleszterin tartalmának meghatározása.....                                                                      | 25 |
| 3.12. Tumor xenograftok transzplantációja SCID egerekbe.....                                                                 | 25 |
| 3.13. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek .....                                                               | 25 |
| 3.14. Képkötő citometriás kísérletek .....                                                                                   | 26 |
| 3.15. Statisztikai analízis.....                                                                                             | 27 |
| 4. Eredmények .....                                                                                                          | 28 |
| 4.1. A szubsztrátok/modulátorok AKT-tesztben mutatott dichotóm viselkedésének<br>tesztelése nagyobb számú ágens esetén. .... | 28 |
| 4.2. Az UIC2 transzportfunkciót gátló hatásának vizsgálata AKT+ és AKT- szubsztrátok<br>jelenlétében, <i>in vitro</i> . .... | 30 |
| 4.2.1. A pumpafunkció gátlásának meghatározása szubsztrát akkumuláció méréssel...30                                          |    |
| 4.2.2. Életképességi vizsgálatok UIC2 antitest és modulátor együttes alkalmazásával ...33                                    |    |
| 4.3. Az UIC2 mAt kötőhelyei számának és kötőerősségének vizsgálata.....                                                      | 34 |
| 4.4. Az „UIC2 gátlás” tesztelése <i>in vivo</i> tumor xenograftokban.....                                                    | 35 |
| 4.5. A koleszterin Pgp pumpafunkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása .....                                             | 39 |
| 4.5.1. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása .....                                                                | 39 |
| 4.5.2. A koleszterin-modulálás hatása a Pgp raft-asszociáltságára.....                                                       | 40 |
| 4.5.3. A koleszterin szerepe a pumpafunkció fenntartásában .....                                                             | 41 |
| 4.5.4. A koleszterin-modulálás hatása az ép membránú sejtek intracelluláris ATP-<br>szintjére .....                          | 43 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 5. Megbeszélés .....         | 46 |
| 6. Összefoglalás.....        | 53 |
| 7. Irodalomjegyzék.....      | 55 |
| 8. Tárgyszavak .....         | 64 |
| 9. Köszönetnyilvánítás ..... | 65 |

## Rövidítések jegyzéke

|                  |                                                                                                                                           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABC              | ATP-kötő domén (ATP Binding Cassette)                                                                                                     |
| BSA              | marha szérum albumin (bovine serum albumin)                                                                                               |
| CSA              | ciklosporin A                                                                                                                             |
| Daunorubicin     | DNR                                                                                                                                       |
| DIMEB            | heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciklodextrin                                                                                           |
| DMEM             | Dulbecco's modified Eagle's medium                                                                                                        |
| FCDR             | áramlási citometriás detergens-rezisztencia teszt (Flow cytometric assay of detergent resistance)                                         |
| GaMIgG           | kecskében termeltetett egér ellenes antitest (Goat anti-Mouse Immunglobulin)                                                              |
| IC <sub>50</sub> | az életképesség 50%-os csökkenéséhez szükséges hatóanyag koncentráció a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (50% inhibitory concentration) |
| i.p.             | intraperitoneális (injekció)                                                                                                              |
| i.v.             | intravénás (injekció)                                                                                                                     |
| Kol-DIMEB        | DIMEB koleszterinnel alkotott komplexe                                                                                                    |
| LN <sub>2</sub>  | folyékony nitrogén                                                                                                                        |
| MC540            | Merocianin 540                                                                                                                            |
| mg/kg            | milligramm / testtömeg kilogramm                                                                                                          |
| mAt              | monoklonális antitest                                                                                                                     |
| MDR              | multidrog rezisztencia (általánosan)                                                                                                      |
| MTT              | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid                                                                               |
| NBD              | nukleotid-kötő fehérjerész (nucleotide binding domain)                                                                                    |
| Pgp              | P-glikoprotein, ABCB1 vagy MDR1 fehérje                                                                                                   |
| PI               | propidium-jodid                                                                                                                           |
| RAMEB            | random módon metilált $\beta$ -ciklodextrin                                                                                               |
| RaMIgG           | nyúlban termeltetett egér ellenes antitest (Rabbit anti-Mouse Immunglobulin)                                                              |
| SCID             | súlyosan immunhiányos (severe combined immunodeficient)                                                                                   |
| TM               | transzmembrán szakasz                                                                                                                     |
| TX-100           | Triton X-100, nemionos tenzid                                                                                                             |

## 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

### 1.1. A P-glikoprotein és a multidrog rezisztencia

A lipidmembránokon keresztül megvalósuló anyagtranszport alapvetően fontos az élő szervezet sejtjeinek megfelelő működéséhez. A transzportfehérjék legnagyobb családja az ABC (ATP Binding Cassette) szupercsalád, melynek számos tagja megtalálható prokariótákban és eukariótákban. Cukrokat, aminosavakat, fém-ionokat, peptideket, fehérjéket és hidrofób molekulákat szállítanak a sejtmembránon ill. intracelluláris membránokon keresztül (Dean, 2001). Közös jellemzőjük a jellegzetes nukleotidkötő domén, melyről a család tagjait elnevezték, s amely által megkötött ATP hidrolíziséből származó energiát használják fel működésükhöz. A mai napig 48 humán ABC gént azonosítottak, melyek mutációi állnak számos genetikai rendellenesség hátterében (pl. cisztikus fibrózis: CFTR gén (Quinton, 1999), intrahepatikus kolesztázis: ABCB4 gén (de Vree és mtsai, 1998), szitoszterolémia: ABCG5 és ABCG8 gének (Berge és mtsai, 2000)).

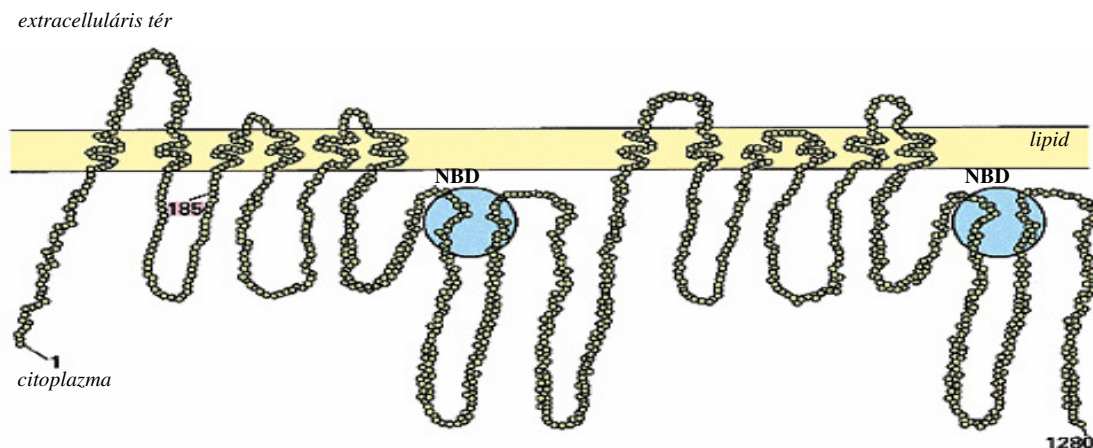
A Pgp az egyik legtöbbet tanulmányozott ABC transzporter. Transzmembrán fehérje, amely szerkezetükben és méretükben jelentősen eltérő (200 Da-tól akár 1900 Da-ig), főként hidrofób vagy amfifil karakterű molekulákat transzportál koncentrációgradienssel szemben az extracelluláris térbe (Chen és Simon, 2000; Schinkel és Jonker, 2003). Számos szubsztrátjának szerkezetében megtalálható egy vagy több aromás gyűrű, leghatékonyabban a semleges, vagy gyengén bázikus tulajdonságú anyagokat pumpálja. Egyes szerzők szerint egy Pgp szubsztrátnak meghatározott térbeli elrendeződésben kell rendelkeznie 2 vagy 3 elektron-donor csoporttal (Seelig, 1998). A fenti kritériumoknak sok gyógyszermolekula is megfelel, köztük a daganatok kezelésére használt kemoterápiás szerek jelentős hányada. A rákos sejtekben gyakran magas szinten kifejeződő Pgp molekulák a sejten belüli hatóanyag koncentrációját olyan szintre csökkentik, ami megvédi a sejtet a citotoxikus hatástól. Ez a mechanizmus a klinikumban a terápia várt hatásának elmaradását, vagy a kezdetben hatásos kezelés eredményességének gyors csökkenését, majd hatástalanságát okozza. A daganatos betegségek kemoterápiás kezelésének egyik súlyos problémája a citosztatikumok széles spektrumával szemben fellépő rezisztencia, az ún. multidrog rezisztencia (MDR). Az MDR kialakulásában fontos szerepet játszik a P-glikoprotein (Pgp) expressziója (Gottesman, 1993).

A Pgp mellett más ABC transzporterek is részt vehetnek a multidrog-rezisztens fenotípus kialakításában. Szakács és munkatársai 60 különböző rákos sejtvonal citotoxikus

szerekkel szembeni érzékenységét összehasonlítva a sejtek transzporter expressziójával azt találták, hogy a rákos sejtek érzékenysége az egyes sejtmergekkel szemben fordított arányban állt az illető szert szubsztrátként elfogadó ABC transzporterek kifejeződésével (Szakács és mtsai., 2004).

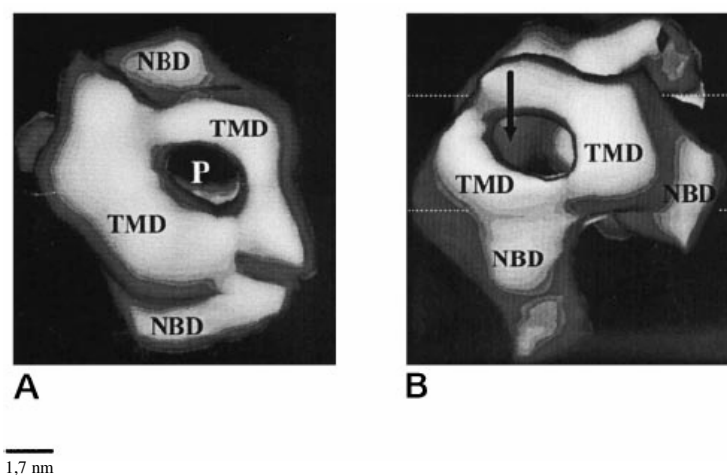
A Pgp működési módja valószínűleg nem hasonlítható a klasszikus membránpumpákéhoz, melyek az intracelluláris térből szállítják szubsztrátjukat a sejten kívülre. A Pgp a sejtmembránban feldúsult lipofil szubsztrátjait „hidrofób porszívóként” elsősorban valószínűleg a lipid kettősrétegből gyűjti össze (Pastan és Gottesman, 1991; Gottesman és Pastan, 1993). Ezt támasztja alá az a megfigyelés, amely szerint egy fluoreszcens festék, a calcein nem fluoreszkáló, lipofil észterszármazékát (calcein-AM) a pumpa azelőtt eltávolítja a sejtől, mielőtt az intracelluláris térbe belépve az észterázok fluoreszcens calceinné hasíthatnák (Homolya és mtsai, 1993). Egy másik elképzelés szerint a Pgp flippázként működve szubsztrátjait a sejtmembrán belső lemezéből a külső lemezébe átfordítva egyenlőtlen eloszlást idéz elő a lipid kettősrétegen belül. Innen a molekula az extracelluláris térbe diffundál (Higgins és Gottesmann, 1992; Sharom, 1997).

A fehérje két, egyenként hat transzmembrán szakaszt (TM) és egy nukleotid-kötő domént (NBD) tartalmazó homológ félből áll, melyeket egy 75 aminosavból álló peptid szakasz köt össze (1. ábra)



1. ábra. A Pgp hidrofobicitási plot alapján feltételezett szerkezete (Chen és mtsai, 1986)

Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a fehérje a sejtmembránban 10 nm átmérőjű, felülnézetből hatszögletű struktúrát alkot, melynek a középpontjában egy 5 nm átmérőjű, extracelluláris tér felé nyitott, citoplazma felől zárt „vizes” üreg található (Rosenberg és munkatársai, 1997; 2. ábra A.). Az üreg oldalfalán a sejtmembrán irányába egy nyílás helyezkedik el (2. ábra B.). A fehérje membrán síkjára merőleges maximális kiterjedése 8 nm, a citoplazma felőli oldalán két 3 nm képlet található, melyek az NBD-knek felelnek meg. A pumpa közepén helyet foglaló üreg mérete nagyobb bármely Pgp szubsztrátnál. Az üreg tölcsér alakú, az extracelluláris tér felől szélesebb és a citoplazmához közeledve szűkül (Loo és Clarke, 2001). Az üreg oldalfalán, a sejtmembránnal kapcsolatot jelentő nyílás létezése összhangban van a „hidrofób porszívó” modellel, de nem mond ellent egy flippáz-szerű működési elvnek sem.



2. ábra. A Pgp elektronmikroszkópos mérések alapján rekonstruált térbeli szerkezete (Rosenberg és mtsai, 1997). A. Felülnézeti kép; P központi üreg. B. Oldalnézeti kép; ↓nyílás a sejtmembrán irányába. A szaggatott vonalak a sejtmembrán határait jelölik. TMD: transzmembrán domének.

A szubsztrátkötő helyet a középső üregben a TMD1-ből a 4,5,6 TM, a TMD2-ből a 9,10,11,12 TM alakítja ki (Loo és Clarke, 2001, 2005). Mai elképzelés szerint a Pgp egy komplex szubsztrát kötő „zsebbel” rendelkezik, ahol az egyes molekulákhoz leginkább illeszkedni tudó egyedi szubsztrát kötő helyek alakulhatnak ki, szemben a számos különálló kötőhely lehetőségével (Ambudkar és mtsai, 2005). A zsebet aminosav oldalláncok bélelik, melyek az aktuális szubsztrát által megkívánt legkedvezőbb kötőhelyet formálják (Loo és Clarke, 2002; Sharom, 2006). A „szubsztrát-indukálta illeszkedés” során a Pgp a különböző molekulákat eltérő affinitással köti. Ezen illeszkedéshez a TM-ek aminosav oldalláncainak

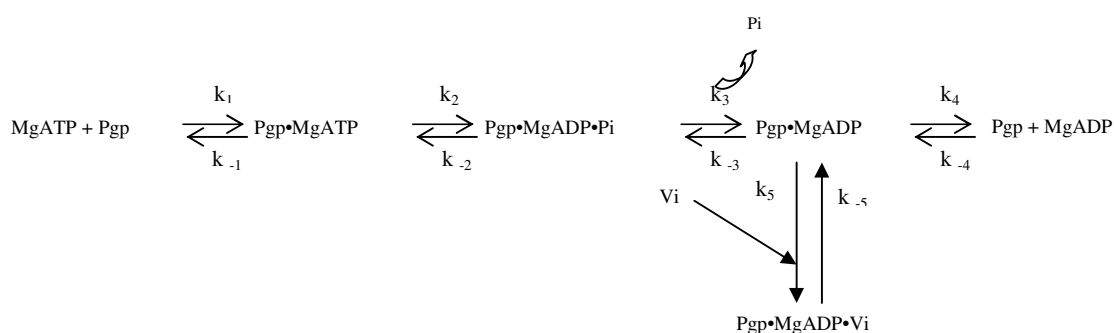
különböző kombinációi járulnak hozzá, melyek által létrehozott hidrofób és van der Waals kölcsönhatások eredői határozzák meg az egyes szubsztátok iránti affinitások mértékét (Loo és Clarke, 2002).

A Pgp megtalálható az egészséges szervezetben is, de fiziológiás szerepe nem teljesen tisztázott. Endogén szubsztátját nem ismerjük (egyes adatok szerint ilyen a koleszterin (Garrigues és mtsai, 2002)), ill. bizonyos rövid szénláncú lipidek transzportjában is részt vehet (Helvoort és mtsai, 1996). A Pgp a szervezetben többek között az agyi kapillárisok endotél sejtjein (Virgintino és mtsai, 2002), a bél lument bélelő epitél sejteken, valamint a májban (Thiebaut és mtsai, 1987) is megtalálható. A vér-agy gát egyik fontos eleme, megakadályozza a xenobiotikumok agyba történő bejutását (Schinkel és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 2001). Pgp knock-out egerekben a vér-agy gát elégtelen működése figyelhető meg, ami növeli a gyógyszermolekulák központi idegrendszeri toxicitását (Schinkel és mtsai, 1994). A bélhámban gátolja a hatóanyagmolekulák intesztinális felszívódását, csökkentve biohasznosíthatóságukat (Sparreboom és mtsai, 1997). Az az általános benyomás, hogy a Pgp – egyéb ABC transzporterekkel együtt – a szervezet különböző fiziológiás barrierjeit erősíti azáltal, hogy aktívan részt vesz a szervek xenobiotikumokkal szembeni védelmében (Sarkadi és mtsai, 2006; Szakács és mtsai, 2008).

## 1.2. A Pgp katalitikus ciklusa

### 1.2.1. A katalitikus ciklus modelljei

A Pgp működése során ATP-t hidrolizál. Megkülönböztethető egy szubsztrátok nélkül is mérhető bazális, valamint szubsztrát indukálta ATP-áz aktivitás (Doige és mtsai, 1992; Sharom és mtsai, 1995). Az ATP-áz működésének vanadáttal történő gátlása a pumpát egy nagyenergiájú tranzíciós állapotában csapdázza (3. ábra). A Pgp egyik NBD-jének vanadát kötése elegendő a teljes ATP-áz aktivitás blokkolásához, ami arra enged következtetni, hogy a két NBD nem tud egymástól függetlenül működni (Urbatsch és mtsai, 1995).

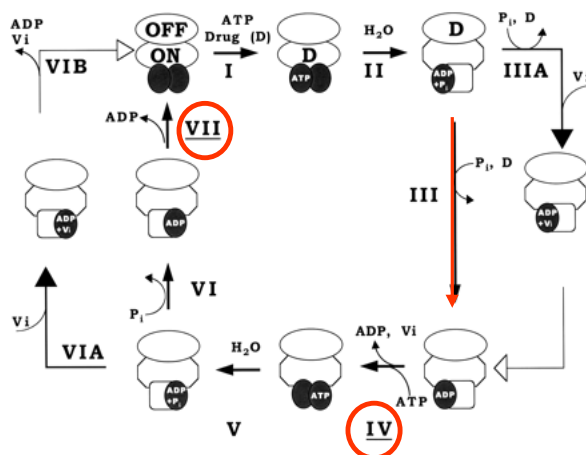


3. ábra. A Pgp ATP-áz aktivitásának vanadáttal történő gátlása, valamint ATP hidrolízise (Senior és mtsai, 1995).

A Pgp működésének egyik nagy kérdése, hogy az NBD-ken lejátszódó ATP hidrolízis hogyan hajtja a szubsztrát transzportot. Senior és munkatársai a nukleotid-kötőhelyek alternáló működését tételezték fel, amely során a szubsztrát transzportot az ATP hidrolízis eredményezte nagy energiájú konformációs állapot relaxációjával kapcsolták össze (Senior és mtsai, 1995).

Sauna és Ambudkar modellje szerint a Pgp egyetlen katalitikus ciklusa során két ATP molekula hidrolízise történik meg (Sauna és Ambudkar, 2000). A ciklus első lépéseként a szubsztrát az „ON” kötőhelyre kerül, valamint létrejön az ATP kötődése is (4. ábra I.; Sauna és Ambudkar, 2001). Az ATP hidrolízise közben a szubsztrát a kisebb affinitású „OFF”

helyre kerülve transzportálódik az extracelluláris térbe az inorganikus foszfát ( $P_i$ ) egyidejű szabadrá válásával (4. ábra II, III.). A IV. lépésben az ADP molekula disszociál a fehérjéről, egy újabb ATP molekula pedig kötődik az NBD-hez, miközben a drog-kötőhely affinitása alacsony marad. A második ATP hidrolízisét követően (4. ábra V, VI.) az ADP molekula disszociációja szükséges ahhoz, hogy a Pgp visszanyerje azt a konformációt, amelyben a szubsztrát-kötőhely affinitása újra nagy, lehetővé téve a következő ciklus elindulását (4. ábra VII.). Mindkét NBD-n a  $P_i$ -t vanadáttal helyettesítve Pgp-MgADP· $V_i$  komplex jön létre, melynek kisebb az affinitása a szubsztrátok iránt (4. ábra IIIA, VIA.).



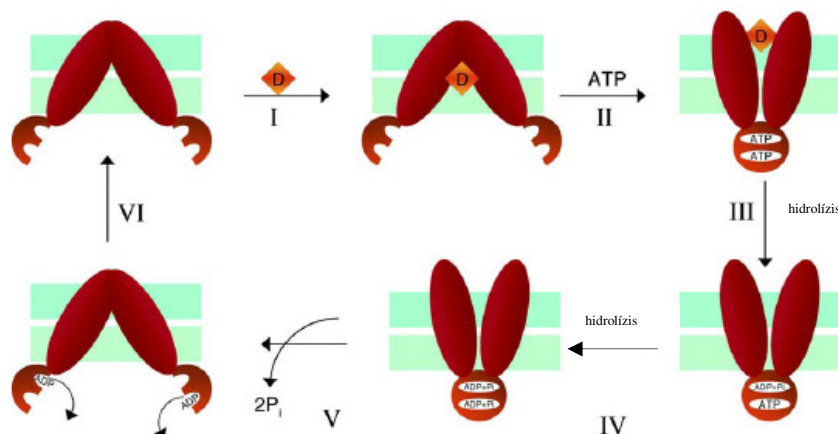
4. ábra. A Pgp katalitikus ciklusának modellje Sauna és Ambudkar szerint (Sauna és Ambudkar, 2001).

A modell alapján a két molekula ATP hidrolízisének különböző szerepe van. Az első ATP a szubsztrát transzportjához szükséges, míg a második ATP energiája a Pgp molekula konformációjának visszarendeződését fedezi, amivel a következő ciklusba tud lépni. A ciklus sebesség-meghatározó lépése az ADP disszociációja a fehérjéről. Az ATPáz aktivitás sebessége szubsztrátok jelenlétében megnő, felgyorsítva az ADP disszociációját (Kerr és mtsai, 2001).

A fenti modellek csak a szubsztráthoz kapcsolható katalitikus ciklust írják le, de figyelmen kívül hagyják a bazális ATPáz aktivitást. Al-Shawi és munkatársai Senior modelljét kiegészítették a bazális ATPáz aktivitás magyarázatával. Eszerint a bazális, szubsztráthoz nem köthető működés a Pgp belső lényegi („intrinsic”) tulajdonsága és elveti

egy esetleges endogén szubsztrát transzportjának hipotézisét. A kétféle ATPáz aktivitás összekötő eleme egy olyan Pgp állapot, melyből a transzporternek lehetősége van akár a szubsztrátok nélkül bazális aktivitáshoz tartozó, akár a szubsztrát indukálta katalitikus ciklus elindítására. A pumpa csak ebben az elkötelezetlen állapotban tud szubsztrátot kötni, ezért az ilyen állapotú Pgp-k mennyiségének a lehető legnagyobbnak kell lenni. Amennyiben a pumpa egyszerre két molekula ATP-t köt, elindul a bazális ATP-áz aktivitáshoz tartozó ciklus. Ebben a folyamatban szubsztrátot már nem képes transzportálni, ezért a folyamat minél gyorsabb lefolytatása érdekében egy ATP molekulát elhidrolizálva visszatér a transzport-kompetens állapotához. A bazális és a szubsztrát indukálta aktivitáshoz tartozó katalitikus ciklusok tehát párhuzamosan zajlanak az egyes Pgp molekulákon és az egyes ciklusok a szubsztrát koncentráció kontrollja alatt állnak. A modell szerint a szubsztrát transzportához kapcsolódó katalitikus ciklus sebességmeghatározó lépése a tranzíciós állapottal járó konformációváltozás és nem az ADP disszociációja. Ezt a tranzíciós állapotot a lipidkörnyezet is nagymértékben befolyásolja.

Higgins és Linton modelljében az ABC transzporterek katalitikus ciklusa során a drog-export hajtóereje az ATP kötés és nem az ATP hidrolízis (5. ábra, Higgins és Linton, 2004). Az ATP kötés indukálta konformációváltozás a TMD-k szubsztrát-kötő képességének csökkenését eredményezi. Az alapállapotú Pgp „nyitott-dimer” konfigurációjának ATP-affinitása alacsony. A drog-kötő hely magas affinitású és a membrán citoplazma felőli rétege felé nyitott. A szubsztrát kötődése indítja el a transzport ciklust (5. ábra I.). Az NBD-k ATP iránti affinitása megnő, két molekula ATP-t kötnek és létrehozzák a „zárt-dimer” konfigurációt (5. ábra II.). Ez az állapot a TMD-ken olyan konformációváltozást idéz elő, amely a drog-kötő helyet extracelluláris irányba kinyitja, valamint drog-kötő affinitását lecsökkenti, lehetővé téve a szubsztrát disszociációját. A következő lépésben az ATP-k hidrolizálódnak, létrehozva egy átmeneti állapotot (5. ábra III, IV.). Az ADP-k disszociációjával a transzporter visszanyeri eredeti, „nyitott-dimer” konfigurációját (5. ábra V, VI.).



5. ábra. A Pgp transzport ciklusának ATP-kapcsoló modellje (Higgins és Linton, 2004).

A katalitikus ciklus során lezajló konformációváltozásokra elektronmikroszkópos vizsgálatok is szolgáltatnak bizonyítékot. Rosenberg és munkatársai mérései alapján az ATP kötés a TMD-k reorganizációját eredményezi, ami csökkenti a szubsztrát iránti affinitást (Rosenberg és mtsai, 2001). Három dimenzióra extrapolált modelljükből kitűnik, hogy a két transzmembrán domén ATP kötés hatására átrendeződik és a konformáció változás során három domént tartalmazó szerkezetet alakít ki. A térbeli átrendeződés eredményeként a központi üreg a pumpa teljes mélységében felnyílik, szabaddá téve az utat a szubsztrátok számára a membrán felől az üreg irányába (Rosenberg és mtsai, 2003).

### 1.2.2. Konformációváltozások a katalitikus ciklus során: az UIC2-shift jelenség

A Pgp katalitikus ciklusa alatt lejátszódó konformáció-változások monoklonális antitest segítségével is detektálhatók. Az UIC2 antitest kötődésének mértéke megnő a Pgp szubsztrátjainak jelenlétében vagy ATP-depléción hatására, valamint ugyancsak nagyobb affinitással kötődik azokhoz a mutáns Pgp molekulákhoz, melyeknek mindkét NBD-je inaktív („UIC2-shift” jelenség, Mechetner és mtsai, 1997). Az antitest kötődés mértéke ezen mutáns Pgp-k esetén szubsztrátokkal, vagy ATP-deplécióval tovább nem fokozható. A fenti megfigyelések a transzport során lejátszódó ATP hidrolízis különböző lépéseire tartozó különböző Pgp konformációs állapotok léteire utalnak, melyekhez az UIC2 antitest affinitása különböző. Az ATP, ADP és a nem hidrolizálható ATP analógok csökkentik az UIC2 kötődését (Druley és mtsai, 2001), valamint az UIC2 a katalitikus tranzíciós állapotban nem

kötődik a pumpához (Goda és mtsai, 2002). Az antitest kötődése képes gátolni a pumpa funkcióját és növelni a Pgp szubsztrátok citotoxicitását intracelluláris akkumulációjuk növelésén keresztül (Mechetner és Roninson, 1992).

Az UIC2 antitest epitópját az 1., a 4. és a 6. extracelluláris hurkokon elhelyezkedő peptid szekvenciák (Schinkel és mtsai, 1993), valamint a 11. transzmembrán hélix egy része alkotja (Mechetner és mtsai, nem közölt adatok). 20 aminosav deléciója az 1. extracelluláris hurokból tökéletesen megakadályozza az UIC2 kötődését (Schinkel és mtsai, 1993). Zhou és Pastan eredményei szerint az 5. és a 6. transzmembrán régiót összekötő 3. extracelluláris hurok épsége is szükséges az UIC2 megfelelő kötődéséhez. A 6. transzmembrán szakaszban bekövetkező mutáció szintén befolyásolja az antitest kötődésének mértékét (Zhou és mtsai, 1999).

A UIC2 antitest további érdekes tulajdonsága, hogy a szubsztrátokkal/modulátorokkal nem kezelt sejtek sejtfelszíni Pgp molekuláinak csak egy részéhez kötődik, míg szubsztrátok, revertáló ágensek jelenlétében az antitest kötődés mértéke megnő. Ez a sejtfelszíni Pgp molekulák kétféleségére utal. Mechetner és munkatársai szerint a sejtfelszíni Pgp-k legalább két különböző konformációs állapotban vannak jelen, melyekhez az UIC2 affinitása eltérő (Mechetner és mtsai, 1997).

### **1.3. A Pgp lipidkörnyezete**

Az MDR kutatások kezdeti szakaszában megfigyelték, hogy ugyanazon sejtvonal rezisztens (Pgp<sup>+</sup>) és szenzitív (Pgp<sup>-</sup>) sejtjei membránjának lipidösszetétele különböző. Pgp<sup>+</sup> P388 leukémia sejtekben a trigliceridek mennyisége emelkedett (Ramu és mtsai, 1984), míg különböző rezisztens sejtvonalak esetén a glikoszfinbolipidek prekursora, a glikozilceramid szintje jelentősen magasabb (Lavie és mtsai, 1996), és magasabb koleszterin szintet találtak vinblasztin-rezisztens T limfoblasztok esetén (Mountford és Wright, 1988). Különböző rezisztenciájú humán CEM akut limfoblasztos leukémia sejteken expresszált Pgp mennyisége a rezisztencia fokával párhuzamosan csak egy bizonyos mértékig nőtt (összes sejtmembrán fehérje tartalom kb. 40%-ig), míg a membrán koleszterin tartalom a rezisztenciával párhuzamosan emelkedett (Gayet és mtsai, 2005). A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy az MDR fenotípus kialakításában a membrán lipidösszetételének megváltozása is szerepet játszhat.

A szfinbolipidek (szfinbolielin és glikoszfinbolipidek) valamint a koleszterin fő alkotóelemei a detergens-rezisztens membrán doméneknek, raftoknak, melyekben a

sejtfelszíni Pgp molekulák 10-40%-a lokalizálódik (Lavie és mtsai, 1998; Bacsó és mtsai, 2004; Luker és mtsai, 2000). A rezisztens sejtek megváltozott membrán lipidösszetétele a raftok fokozott megjelenésével is magyarázható (Lavie és mtsai, 1999).

A Pgp szoros kapcsolatban áll lipidkörnyezetével. A fehérje tisztítása után endogén foszfolipidek, elsősorban foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-szerin, kisebb mértékben foszfatidil-kolin mutatható ki a Pgp mellett (Sharom és mtsai, 1995). A lipidek a pumpa működését is befolyásolják. Tisztított Pgp-k ATPáz aktivitásban különböző foszfolipidek hatására eltérő változásokat tapasztaltak: a dipalmitoil-foszfatidil-etanolamin és a foszfatidilkolin növelte, míg a foszfatidil-inozitol és a foszfatidil-szerin csökkentette az enzimműködést (Sharom és mtsai, 1995).

A koleszterin szintén befolyásolja a transzporter működését. Membrán vezikulák koleszterin depléciója csökkentette (Garrigues és mtsai, 2002), koleszterin tartalom növelése fokozta a Pgp bazális ATPáz aktivitását (Kimura és mtsai, 2007). Kimura és munkatársai szerint a koleszterin a drog-stimulálta ATPáz aktivitásra is hatással van, de ez a szubsztrátok molekulatömegétől függ. 500 Da-nál kisebb molekulatömegű szubsztrátokhoz való affinitását a koleszterin növeli, 800-900 Da tömegű molekulák kötődését nem befolyásolja, míg 1000 Da-nál nagyobb tömegű molekulákhoz (pl. valinomicin) való affinitását csökkenti. A szerzők elképzelése szerint a koleszterin kitölti a pumpa drog-kötő zsebében az üresen maradó térrészt a kismolekulájú szubsztrátok transzportja során („cholesterol fill-in model”, Kimura és mtsai, 2007).

A Pgp működésének koleszterin-függése sejtszintű funkcionális tesztekkel is megfigyelhető. Egyes sejttípusokban az akut koleszterin-depléció vagy -szaturáció gátolta a Pgp transzportfunkcióját (Bacsó és mtsai, 2004; Santos és mtsai, 2007; Cai és mtsai, 2004), míg más sejttípusokban a koleszterin-szaturáció növelte a drog-effluxot (Troost és mtsai, 2004a,b).

#### **1.4. A Pgp transzportfunkció gátlásának lehetőségei**

Az MDR jelenség kutatásának fő gyakorlati célja a klinikumban is hatékonyan használható revertálószeres és terápiás protokollok kifejlesztése. Az első generációs gátlószeresek közül a ciklosporin A etopoziddal és vinblasztinnal történő humán kipróbálása bebizonyította, hogy kedvezőtlen farmakokinetikai hatása következtében kialakuló fokozott toxicitás miatt a klinikumban nem alkalmazható (Yahanda és mtsai, 1992; Samuels és mtsai, 1993). A második generációs szerek már kisebb koncentrációban is jó Pgp modulátorok. Ilyen

ígéretes revertáló ágensnek tűnt a ciklosporin analóg SDZ PSC 833, melynek alkalmazása esetén olyan tipikus mellékhatások mint az immunszuppresszió nem jelentkeztek (Boesch és mtsai, 1991), ezzel szemben a citokróm P450 enzimrendszer gátlásával növelte az egyidejűleg alkalmazott kemoterápiás szerek toxicitását (Thomas és Coley, 2003). 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).

Több Pgp-specifikus monoklonális antitestről ismert, hogy *in vitro* és *in vivo* képesek gátolni a pumpa működését. Az UIC2 antitest megakadályozza a Pgp-szubsztrátok transzportját és növeli a citotoxicitásukat (Mechetner és Roninson, 1992). Ez a hatás azonban nem teljes és nagyon variábilis. Az MRK16 antitest *in vitro* növeli az intracelluláris vinkrisztin akkumulációt (Broxterman és mtsai, 1988), valamint egér tumor modellekben doxorubicin egyidejű alkalmazásával gátolta a Pgp<sup>+</sup> tumorok növekedését (Iwahashi és mtsai, 1993).

A számos ígéretes lehetőség ellenére nem rendelkezünk a gyógyászatban hatékonyan és megbízhatóan használható gátlószerezrel. Nagy szükség van olyan módszerekre, melyekkel a hatékony és biztonságos revertáló ágensek kiszűrhetők és hatásuk *in vivo* is vizsgálható. A monoklonális antitestek használatához az általuk elérhető gátlás mértékének jelentős fokozása, a hatás reprodukálhatóvá tétele és a hatásukat megőrző humanizált antitestek előállítása szükséges.

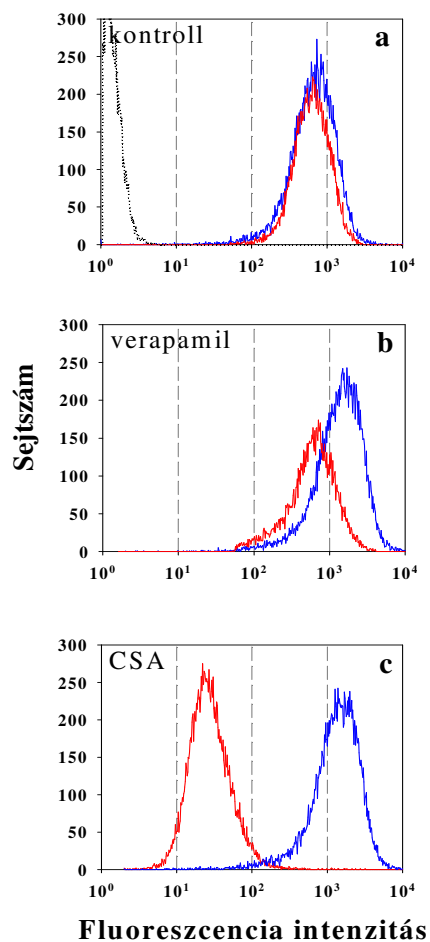
## **1.5. Közvetlen előzmények**

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

### **1.5.1. Az „AKT” teszt**

Amint az 1.2.2. fejezetben bemutatásra került, az UIC2 antitest kötődése szubsztrátok és modulátorok (pl. vinblasztin, taxol, ciklosporin származékok, stb.) jelenlétében 2-4-szeresére növekszik a Pgp-t kifejező sejteken („UIC2-shift”, Mechetner és mtsai, 1997). Ezzel a jelenséggel a sejtfelszíni „funkcionális” Pgp molekulák kimutathatók, valamint a Pgp szubsztrátok és modulátorok is beazonosíthatók.

Az UIC2 antitest kötődése modulátorok távollétében egy másik anti-Pgp antitest (MM12.10, MM6.15, MRK16) kötődését csak kis mértékben befolyásolja, a sejtfelszíni fehérjék átfedő epitópjaival még jelentős mennyiségű másik Pgp-specifikus antitest tud kölcsönhatást kialakítani. Modulátorok (pl. CSA) jelenlétében a másik antitest kötődése nagymértékben lecsökken, vagy teljesen elmarad. A jelenség különlegességét az adja, hogy egyes gátlószerek (pl. CSA, vinblasztin) mellett felkötődött UIC2 után minimális a másik antitest kötődése, míg más modulátorok, (pl. verapamil) nem idéznek elő jelentős hatást (6. ábra). Bár a jelenség az UIC2-shift következménye, mégsem jelenti csupán az UIC2 által el nem foglalt Pgp molekulák visszatitrlását egy másik antitesttel, ugyanis a módszer képes éles különbséget tenni a kétfajta („CSA-szerű” és „verapamil-szerű”) gátlószer között, míg az UIC2-shift nem, vagy sokkal kevésbé. A teszt érzékeny az ATP depléciónak hatására kialakuló konformációváltozásra is (Goda és mtsai, 2002) és lehetővé teszi markáns hatású Pgp modulátor-jelölt molekulák szűrését (*antitest kompetíciós teszt*, AKT; Nagy és mtsai, 2001, 2004).



6. ábra. Az AKT-teszt. NIH 3T3 MDR1 sejtek modulátorokkal kezelve vagy kezeletlenül UIC2, majd FITC-MM12.10 antitesttel jelölve. A FITC-MM12.10 antitest által jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitás eloszlását áramlási citometriás mérések ábrázolják. *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. (Nagy és mtsai, 2001)

### 1.5.2. A detergens elúciós eljárás

A sejtfelszíni Pgp molekulák raft-asszociációja detergenssek segítségével vizsgálható. A Triton X-100 (TX-100) egy gyenge, nem-ionos detergens, amely 0 °C-on a koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán részletek, ún. detergens-rezisztens mikrodomének vagy raftok kivételével oldja a membránt. Ennek következtében azok a fehérjék, melyek nem raftokban helyezkednek el, és általuk vagy közvetlenül a sejtvázhoz sem horgonyzódnak, a TX-100 kezelés hatására eluálódnak a membránból, elkülönülnek a sejtmaradványoktól. A raft-asszociált fehérjék nagy része a citoszkeletonon keresztül a sejthez rögzített állapotban marad. Antitesttel jelölt membránfehérjék kioldása áramlási citometriával vizsgálható és a raft- és citoszkeleton-asszociáció mértéke meghatározható. A raftok egyik fő komponense, a koleszterin ciklodextrinekkal való kivonása a raft-doméneket a membránban dezintegrálja, a ciklodextrin-kezelést követően a Triton-elúció nyomán csak a közvetlenül citoszkeletonhoz kötött sejtfelszíni molekulák maradnak a sejtmaradványhoz kötve.

A detergens-elúciós módszer szerint az LS-174-T humán colon karcinóma sejtek membránjában a Pgp-k körülbelül 34%-a helyezkedik el sejtvázhoz kötött detergens-rezisztens doménekben. A Pgp-k egy részének rafton belüli lokalizációját támasztja alá az is, hogy a CD44 és CD59 raft-markerekhez molekuláris közelségben helyezkednek el (Bacsó és mtsai, 2004).

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

### 1.5.3. Nyitott kérdések

Az UIC2-shift és a sejtfelszíni Pgp molekulák topológiai heterogenitása számos kérdést vet fel. A mai napig nem teljesen tisztázott az oka annak, hogy a kezeletlen sejtek membránjában a Pgp molekulák csak egy része ismerhető fel az UIC2 antitest által, míg a molekulák nagyobb része csak szubsztrátok jelenlétében válik hozzáférhetővé. Ennek a kérdésnek a fontosságát és érdekességét jól demonstrálja a jelenség egyik lehetséges interpretációja: nem kizárt, hogy azon Pgp-k, amelyeket felismer az antitest, endogén szubsztrátokat transzportálhatnak. Nem teljesen érthető a katalitikus ciklusban bekövetkező

konformáció változások és a topológiai heterogenitás összefüggése sem: az UIC2 kötődés nyomán az összes Pgp-nek azonos konformációs állapotban kellene „kikötnie” – nem tapasztalnánk a telítésben is észlelhető heterogenitást. Nem ismert az sem, hogy a Pgp és membránkörnyezete milyen – kétirányú – összefüggésben, kölcsönhatásokban áll egymással. A heterogenitással kapcsolatos kérdések egy része tehát nem lezárt. Az alábbiakban azokat a kérdéseket sorolom, melyeket munkám során sikerült megválaszolni, és melyek révén a fentiekben vázolt alapvető problémák megoldásához is közelebb kerültünk. Egy ilyen, saját alább részletezendő eredményeinket is szervesen magába foglaló lehetséges modellt a Megbeszélés c. fejezetben prezentálok.

Vizsgált kérdések:

- a., A szubsztrátok kétfélesége (l. AKT-jelenség, 1.5.1 fejezet) korábban csak néhány szubsztrát/modulátor viselkedése alapján szerzett impresszió volt, szeretttük volna tudni, hogy vajon a szubsztrátok, modulátorok szélesebb körében is kimutatható-e ez a dichotómia, és hogy valamilyen molekuláris sajátsággal összefügg-e? Ezen kérdések megválaszolása a pumpaműködést hatékonyan gátló modulátorok fejlesztésében nyújthat segítséget.
- b., Korábban csak részleges információnk volt arról, hogy a modulátorok jelenlétében tapasztalt UIC2 kötődés-többlet mennyiben a kötőhely-szám növekedésének eredménye és mennyiben a disszociációs konstans változásáé. Ez nem pusztán elméleti fontosságú kérdés, hiszen az egyébként részleges pumpa-gátlás teljessé ill. tartóssá válhat, amennyiben az antitesttel lefedett Pgp-k aránya növelhető.
- c., Az előbbiekkal összefüggésben, az UIC2-gátlás jelensége ellentmondásos volt: nem mindig és csak extrém antitest koncentrációk esetén tapasztaltak gátlást, mely részleges volt és mértéke variábilis. Az UIC2-kötődés teljessé tétele – reprodukálható módon – a gátlás terápiás felhasználásának perspektíváját vetítette előre.
- d., Nem volt olyan kísérleti rendszer, melyben az UIC2-gátlás in vivo megfelelően tanulmányozható lett volna.
- e. Lényegében feltáratlan volt a Pgp sejtfelszíni heterogenitásának esetleges összefüggése a membrán laterális domén szerkezetével.

Fenti kérdések megválaszolásához, ezen problémák megoldásához az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

## 2. Célkitűzések

Célkitűzéseim a következők voltak:

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

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Sejttenyésztés

Vizsgálataink során az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak *mdr1* génnel transzfektált változatát (NIH 3T3 MDR1 G185), valamint az A2780 (Pgp<sup>-</sup>) és A2780<sup>AD</sup> (Pgp<sup>+</sup>) humán ovárium karcinóma sejtvonalat használtuk. Az NIH 3T3 sejtvonalakat M. Gottesman (NIH, Bethesda, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A sejteket 10% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FCS, Gibco), 5 mM glutaminsavat és 25 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő folyadékban növesztettük állandó körülmények mellett (37 °C, 5 %-os CO<sub>2</sub> atmoszféra, 95 %-os páratartalom). A Pgp-t kifejező sejtvonalakat 670 nM doxorubicint (NIH 3T3 MDR1) vagy 2 µM doxorubicint (A2780<sup>AD</sup>) tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn és felhasználásuk előtt 2-3 nappal drogmentes tenyésztő oldatba helyeztük át. Sejtvonalaink mindegyike a felülethez tapadva növekedett, így a kísérleteinkhez tripszines kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót.

#### 3.2. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

A sejteket tripszinezést követően kétszer mostuk PBS-sel, majd a sejtkoncentrációt 6x10<sup>5</sup> sejt/ml-re állítottuk be 8 mM glükózt tartalmazó PBS-ben (pH=7.4). A sejtmembrán koleszterin tartalmának csökkentése érdekében a sejteket heptakis(2,6-di-O-metil)-β-ciklodextrinnel (DIMEB), vagy random-metilezett-β-ciklodextrinnel (RAMEB), a koleszterin tartalom növeléséhez koleszterinnel képzett komplexeikkel, Kol-DIMEB-bel, vagy Kol-RAMEB-bel kezeltük 37 °C-on 20 percen keresztül. A kezelést követően a sejtszuspenziót kétszer mostuk, majd elvégeztük a megfelelő vizsgálatot.

#### 3.3. Sejtfelszíni Pgp molekulák jelölése monoklonális antitesttel

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

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

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

AKT teszt (Antitest Kompetíciós Teszt, Nagy és mtsai, 2001) esetén  $1 \times 10^6$  db sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenziót 10 percen keresztül szubsztráttal/modulátorral illetve anélkül 37 °C-on előkezeltük. A kezelések során a következő vegyületeket (Sigma) a zárójelben megadott koncentrációkban használtuk: kolhicin (100 µM), etopozid (200 µM), galangin (50 µM), hoechst 33342 (50 µM), ketokonazol (50 µM), nonidet P-40 ( $6 \times 10^{-4}$  V/V%), ologomycin (5 µM), progeszteron (10 µM), propranolol (500 µM), quercetin (200 µM), rapamycin (20 µM), reszerpin (40 µM), tween 20 ( $1,4 \times 10^{-3}$  V/V %), ciklosporin A (10 µM). Ezután a sejteket telítő koncentrációban először festékekkel nem konjugált UIC2 antitesttel (10 µg/ml) inkubáltuk 30 percen keresztül, majd festékekkel konjugált MM12.10, MM6.15 (8 µg/ml), vagy 15D3 (15 µg/ml), antitesttel jelöltük további 30 percig 37 °C-on. Ezt követően a sejteket kétszer megmostuk és a 488/540±10 nm fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerben mértük. Az antitest kompetíciót (AKT) a következőképpen számoltuk: az UIC2 nélkül mért, sejtfelszíni Pgpk-hez kapcsolódó MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitás értékéből ( $F_1$ ) kivontuk az UIC2 jelenlétében kötődött MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitás értékét ( $F_2$ ), majd elosztottuk az UIC2 távollétében mért MM12.10-FITC fluoreszcencia intenzitásával ( $F_1$ ). [AKT érték=  $(F_1 - F_2) / F_1$ ].

### 3.4. Detergens elúciós eljárás

$3 \times 10^5$  db NIH 3T3 MDR1 sejtet Alexa 488-cal konjugált 15D3 antitesttel (15  $\mu\text{g/ml}$ ) jelöltünk 30 percen keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A sejteket 8 mM-os glükózos PBS-sel 2-szer megmostuk, majd 5 mM koncentrációban DIMEB-bel és Kol-DIMEB-bel kezeltük 20 percen keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A mintákat 2-szer újra mostuk, majd áramlási citométerben a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitást azonnal lemértük. Mérést követően a mintákhoz TX-100 oldatot elegyítettünk 0,5 % végkoncentrációban, majd a mintákat 30 percen keresztül jégen tartottuk. Ezt követően a sejtenkénti fluoreszcencia intenzitást újra megmértük és a Pgp molekulák raft-asszociációjának mértékét százalékban fejeztük ki: a TX-100 kezelés után mért fluoreszcencia intenzitást elosztottuk a TX-100 kezelést megelőző intenzitással, majd a kapott értéket megszoroztuk 100-zal.

### 3.5. A sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációjának mérése

A488-15D3 mAt-val jelölt NIH 3T3 MDR1 sejteket 5 mM RAMEB-bel vagy Kol-RAMEB-bel 20 percen keresztül kezeltünk, majd a sejtfelszínen maradt antitesteket savas kémhatású puffer segítségével mostuk le (0,5 M NaCl, 0,1 M glicin,  $\text{pH}=2,5$ ; Kandimalla és mtsai, 2004). A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerben mértük. A savas mosásra rezisztens fluoreszcencia hányadot használtuk az internalizált receptor-antitest komplexek százalékos arányának kifejezésére.

### 3.6. Fluoreszcens festék akkumuláció meghatározása

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

kimutatására a calcein-esszét követően Alexa 647-tel konjugált egér ellenes kecske IgG antitestet (GAMIG) használtunk.

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

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

### **3.7. A sejtmembrán festése merocianin 540-nel**

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

### **3.8. Áramlási citometria**

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

### **3.9. Intracelluláris ATP tartalom meghatározása**

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

Az életképes sejtek ATP tartalmának kiszámításához a minták egy másik, 100 mM EDTA-t tartalmazó lefagyasztott részletéből először meghatároztuk a teljes sejtszámot. A sejteket kiolvasztást követően 1  $\mu$ g/ml koncentrációban DAPI-val festettük 15 percen

keresztül szobahőmérsékleten, majd fekete, 96 lyukú lemezen FLUOstar OPTIMA mikroplate leolvasó (BMG Labtech, Offenburg, Germany) segítségével megmértük a fluoreszcencia intenzitását. Ismert számú sejttel felvett kalibrációs görbe alapján a mintákban lévő teljes sejtszámot meghatároztuk. A teljes sejtszámot megszorozva az áramlási citometriás mérésben mért PI negatív sejtek arányával megkaptuk a mintában lévő életképes sejtek számát. A mért ATP értékeket elosztva az élő sejtek számával megkaptuk egy életképes sejt ATP tartalmát.

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

### **3.10. Életképességi vizsgálatok**

#### **3.10.1. Életképesség vizsgálata áramlási citometriás mérések során**

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

#### **3.10.2. MTT-teszt**

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

### 3.11. Sejtek koleszterin tartalmának meghatározása

DIMEB-bel és Kol-DIMEB-bel kezelt NIH 3T3 MDR sejtek koleszterin tartalmát koleszterin-oxidáz módszerrel, HPLC mérésel (Contreras és mtsai., 1992) határozták meg kollaborációs partnereink (Prof. Janáky Tamás, Szeged). 10 µl reakciókeveréket (500 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris puffer, 10 mM dithiothreitol, 100 mg Triton X-100, pH 7.4) 10 µl koleszterin-oxidáz enzimmel (1 mg/ml; (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) és 50 µl sejtszuszpenzióval elegyítettek és 37 °C-on, 30 percig inkubálták. A reakciót 100 µl hideg metanol/etanol oldat [50% (v/v)] hozzáadásával állították le, majd további 30 percen keresztül 0 °C-on tartották. Ezután a mintákat lecentrifugálták és 50 µl felülúszót HPLC módszerrel analizáltak (1100 Series set, Agilent Technologies; C18 reverz fázisú kromatográfiás oszlop; eluens: 1% (v/v) ecetsav/metanol). Az oxidált koleszterint 241 nm-en, UV detektorral mérték és külső kalibráció segítségével meghatározták a minták koleszterin tartalmát. Az egyes minták pontos sejtszámának ismeretében a koleszterin tartalmat µg-ban kifejezve, 10<sup>6</sup> db sejtre vonatkoztatva adtuk meg.

### 3.12. Tumor xenograftok transzplantációja SCID egerekbe

4 x 10<sup>6</sup> db NIH 3T3 és NIH 3T3 MDR1 sejtet 300 µl színtelen, szérummentes DMEM oldatban B-17 SCID egerek jobb illetve bal combjának bőre alá injektáltunk. Az egerekben 10-12 nap elteltével tapintható tumorok fejlődtek ki. Az állatokat ekkor i.p. 10 mg/kg ciklosporin A-val (CSA, Sandimmun, Novartis) vagy i.v. 5 mg/kg UIC2 antitesttel kezeltük. Egyes egerek CSA és UIC2 kezelést is kaptak. 4 óra múlva i.v. 5 mg/kg daunorubicint injektáltunk az állatokba. További 4 órát követően az egereket megöltük, a tumorokat kimetszettük és azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. További felhasználásig a szövetmintákat folyékony nitrogénben tároltuk.

### 3.13. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópiás kísérletek

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

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

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

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

A szöveti morfológia megjelenítéséhez hematoxilin-eozin festést alkalmaztunk.

### **3.14. Képkalkulációs citometriás kísérletek**

A mikroszkópos vizsgálatokhoz előállított metszeteket képkalkulációs citométerrel (iCys, CompuCyte, Cambridge, MA) megvizsgálva kvantitatív módon tudtuk kiértékelni a teljes metszet daunorubicin akkumulációját és az UIC2 kötődését. A metszetek lézer letapogatására gerjesztő fényként argon-ion lézer 488 nm hullámhosszúságú fényét használtuk és az emittált fluoreszcenciát 20X-os objektíven keresztül  $530 \pm 15$  nm hullámhosszú sávszűrő segítségével detektáltuk. A mintákban a teljes metszet körvonalának előzetes gyors azonosítására először egy kis felbontású szövet pásztázást végeztünk el, majd a kvantitatív méréshez az azonosított szövethatárokon belül egy nagy felbontású pásztázás történt. Az így kapott képek képpontjainak intenzitását az u.n. „phantom contouring” eljárás segítségével mértük az iCys 2.6-os szoftver segítségével. A szoftver az eljárás során a mérendő felületet véletlenszerűen, sejtméretű egymást át nem fedő körökkel („phantom contours”) fedi le, majd a körökön belül a képpontok integrált fluoreszcenciáját meghatározza.

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

### 3.15. Statisztikai analízis

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

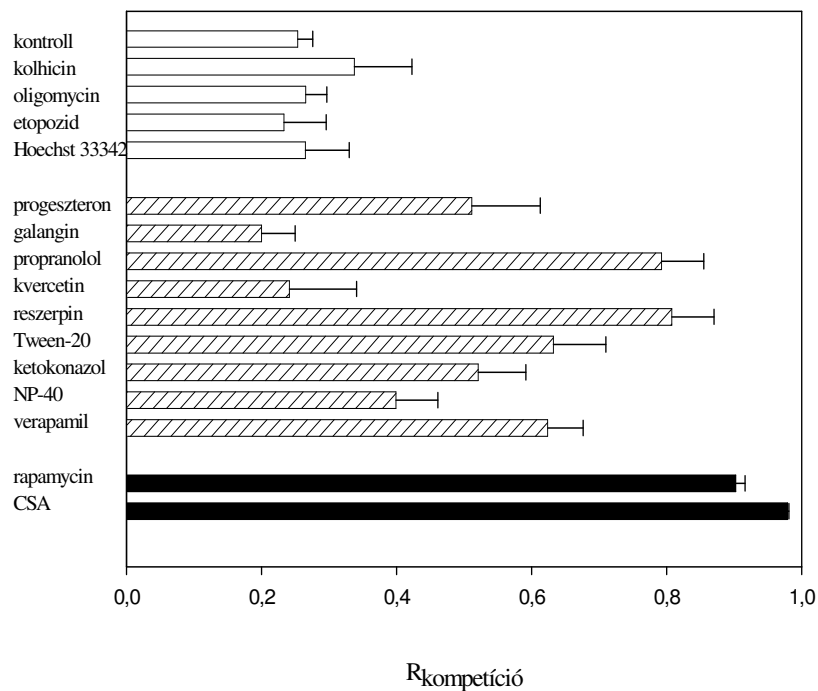
Az UIC2 mAt kötőhelyek számát ( $B_{\max}$ ) és a disszociációs állandókat ( $K_d$ ) SigmaStat (3.1. verzió; SPSS Inc.) programmal, Scatchard-analízissel, egy ligand kötőhelyet feltételezve határoztuk meg. A különböző kezelések hatására UIC2 mAt-tel elérhető kötőhelyek mennyiségét a maximálisan telíthető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

## 4. Eredmények

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

A Nagy és munkatársai által kidolgozott AKT-teszt egyedülálló módon különbséget tesz a Pgp szubsztrátok/modulátorok kétféle csoportja között (Nagy és mtsai, 2001). A teszt alapján megkülönböztethető egy CSA-szerű, „AKT-pozitív” és egy verapamil-szerű, „AKT-negatív” csoport. Munkánk során a korábban jellemzett kisszámú vegyületen kívül számos további ismert vagy potenciális Pgp modulátort teszteltünk, azt eldöntendő, hogy a szubsztrátok/modulátorok „kétfélesége” mennyire általános jelenség, és abban a reményben, hogy az valamilyen kémiai sajátáshoz köthető. Összesen 44 vegyületet vizsgáltunk meg, azokat a legnagyobb még nem toxikus dózisban alkalmazva (l. Módszerek). Az általam vizsgált vegyületek csoportját a 7. ábra szemlélteti.

A már azonosított CSA-szerű, AKT-pozitív gátlószerek csoportja a rapamycinnel bővült. A verapamil-szerű gátlószerekhez újonnan sorolható a progeszteron, galangin, propranolol, kvercetin, reszerpin, Tween-20, ketokonazol és NP-40. Gyenge antitest kompetíciót és Pgp funkciógátlást mutatott a kolhicin, ologomycin, etopozid és a Hoechst 33342 molekulák csoportja (7. ábra) (Nagy és mtsai, 2004). Az AKT-hatás szempontjából a dichotómia nagyobb számú vegyületen is szembeötlő volt, a pumpagátló hatással összevetve pedig három osztályba voltak csoportosíthatók az ágensek.



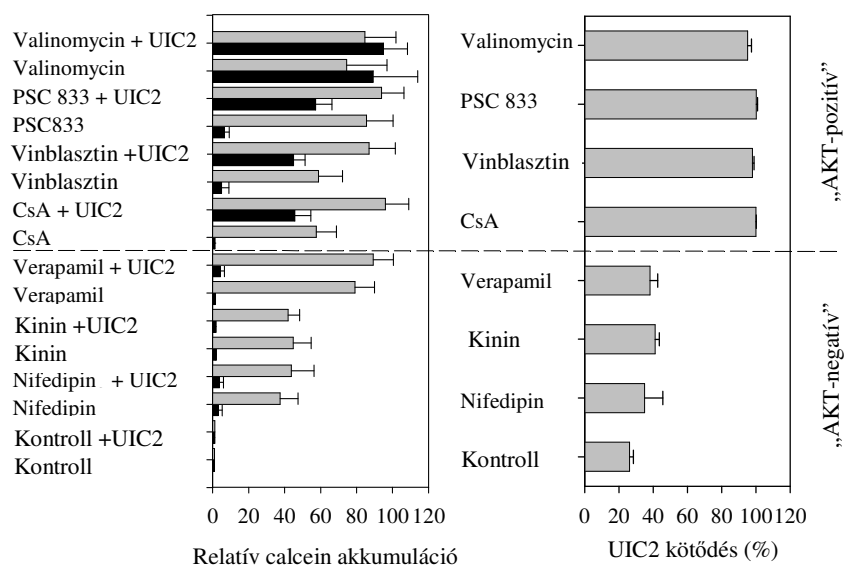
7. ábra. Pgp-szubsztrátok és modulátorok hatása az AKT-esszében. Üres oszlopok: ismert Pgp-szubsztrátok, melyek nem befolyásolták szignifikánsan a sejtek calcein-AM felvételét. Csíkozott és fekete oszlopok: a vegyületek jelentős növekedést eredményeznek a calcein-AM akkumulációban. Az ábra legalább 3 független kísérlet eredményeinek átlagát mutatja ( $\pm$ SD).

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

### **4.2.1. A pumpafunkció gátlásának meghatározása szubsztrát akkumuláció mérésével**

Az UIC2 mAt kötődése képes gátolni a pumpa funkcióját és fokozza a Pgp szubsztrátok citotoxicitását intracelluláris akkumulációjuk növelésén keresztül, míg azonos kísérleti körülmények között más Pgp ellenes antitest erre nem képes (Mechetner és Roninson, 1992). Korábban tisztázatlan okokból azonban az UIC2-gátlás mértéke variábilis és nem mindig reprodukálható volt (Chaudhary és mtsai, 1992; Holló és mtsai, 1994).

Az AKT tesztben mutatott kétféle viselkedésük alapján feltételezhető volt, hogy CSA-szerű ágensek mellett az UIC2 mAt a Pgp-hez annak más konformációs állapotában kötődik, - és/vagy több sejtfelszíni pumpa molekulához - mint pl. verapamillal és az egyéb AKT<sup>-</sup> vegyületekkel történő kezelés során, ezért várhatóan pl. a CSA vagy a verapamil jelenlétében felkötődött UIC2 a pumpa-gátlásban is különbözőképpen viselkedik. A hipotézis vizsgálatához a sejtfelszíni Pgp-khez AKT-pozitív és AKT-negatív szerek mellett kötöttük fel az UIC2 mAt-et, majd a sejteket BSA tartalmú oldattal mosva a modulátorokat eltávolítottuk és a pumpa működését calcein akkumulációján keresztül követtük nyomon. Az UIC2 mAt jelentősen növelte a festék akkumulációt NIH 3T3 MDR1 sejtekben CSA, vinblasztin, SDZ PSC 833, és valinomycin jelenlétében. Ez a hatás a modulátorok 1% BSA oldattal történő kimosását követően is megmaradt. Az AKT-pozitív szerek a valinomycin kivételével hatékonyan eltávolíthatóak voltak a fenti mosási eljárással. Az AKT-negatív verapamil, kinin, nifedipin nem mutattak hasonló hatást, eltávolításukat követően a calcein intracelluláris koncentrációja a kontroll szintjére esett vissza (8. ábra, bal oldal). Az AKT-negatív vegyületek nem növelték az UIC2-reaktív Pgp-k számát, míg az AKT-pozitív szerek hatására az UIC2 mAt kötődése 2-3-szorosára nőtt (8. ábra, jobb oldal).

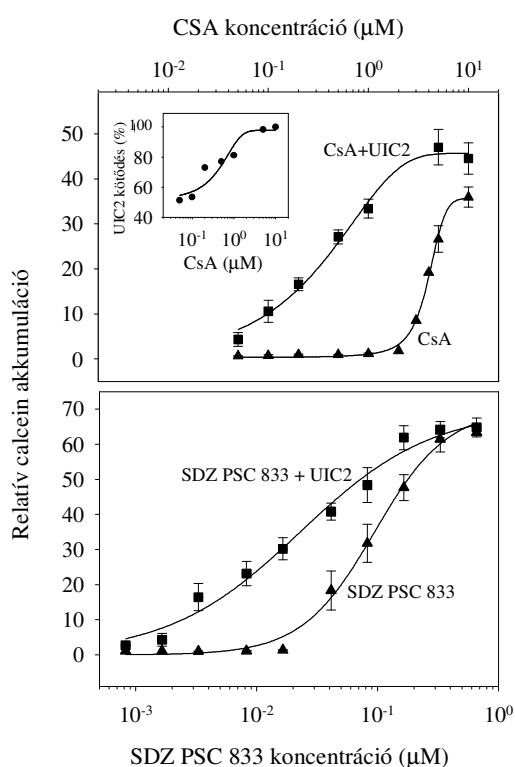


8. ábra. Pgp szubsztrátok/modulátorok hatása az UIC2 mAt Pgp pumpafunkció gátlására (bal oldali ábra). Az UIC2 kötődést indirekt immunfluoreszcens jelöléssel, párhuzamos kísérletben határoztuk meg (jobb oldali ábra). Szubsztrát/modulátor kezelés és egyes mintáknál UIC2 kötés után az NIH 3T3 MDR1 sejteket tartalmazó mintákat kétfelé osztottuk. A minták egyik felét a szubsztrát/modulátor eltávolítása érdekében 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel, majd kétszer PBS-sel mostuk (bal oldal, fekete oszlopok). A minták másik részét nem mostuk BSA-val (bal oldal, szürke oszlopok). Végül 0,25  $\mu$ M calcein-AM-mel és 1  $\mu$ g/ml PI-dal festettük a mintákat és áramlási citométerben analizáltuk. Az ábra három független kísérlet eredményeinek átlagát mutatja ( $\pm$ S.E.M). Minden vegyület (UIC2 mAt-val együtt vagy anélkül) szignifikánsan emelte a sejtekben a calcein akkumulációt a kezeletlen kontrollhoz képest (bal oldali ábra, szürke oszlopok;  $p < 0,001$ ). AKT-pozitív szerek esetén a calcein akkumuláció BSA-val történő mosást követően szignifikánsan magasabb volt UIC2 mAt kezelt mintáknál az UIC2-vel nem kezelt mintákhoz képest (bal oldali ábra, fekete oszlopok;  $p < 0,01$ ).

A Pgp gátlást a CSA koncentráció függvényében is vizsgáltuk. UIC2 és CSA együttes alkalmazásakor szignifikáns, több mint tízszeres intracelluláris calcein akkumulációt tapasztaltunk 0,2  $\mu$ M CSA koncentráció esetén. Ugyanilyen mértékű gátlás eléréséhez mintegy húszszor nagyobb CSA koncentráció szükséges a modulátor önmagában történő

alkalmazásakor (9. ábra. felső grafikon). Az UIC2 gátlás tehát a CSA egy olyan alacsony koncentrációjánál létrejön, ahol a CSA önmagában, mint Pgp inhibitor hatástalan. Párhuzamos kísérleteink alapján 0,2  $\mu\text{M}$  CSA koncentrációnál az UIC2 a sejtfelszíni Pgp molekulák mintegy 70%-ához kötődött (9. ábra. felső grafikon, belső ábra).

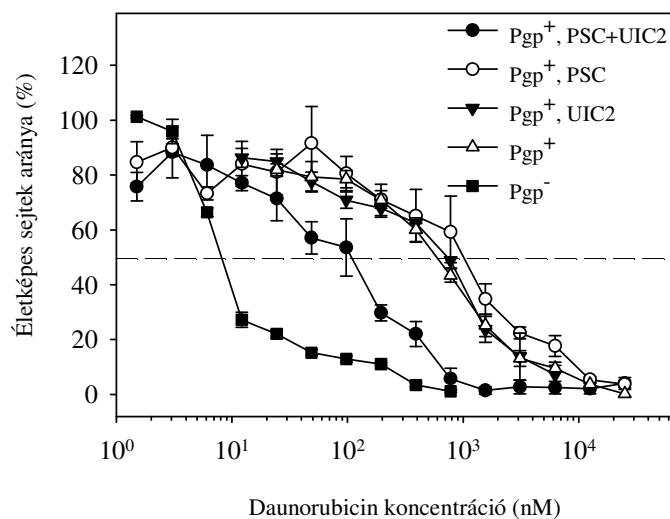
Ugyancsak nagymértékű, mintegy huszonötszörös calcein akkumuláció növekedés volt megfigyelhető 10 nM SDZ PSC 833 és UIC2 egyidejű alkalmazásakor. Ebben a koncentrációban ez a modulátor önmagában szintén hatástalan, a kombinációs kezeléshez hasonló hatás eléréséhez tízszer magasabb SDZ PSC 833 koncentráció szükséges (9. ábra. alsó grafikon).



9. ábra. CSA (felső grafikon) és SDZ PSC 833 (alsó grafikon) hatása önmagukban és UIC2 mAt-val kombinációban alkalmazva a NIH 3T3 MDR1 sejtek intracelluláris calcein akkumulációjára. A felső grafikon belső ábrája a párhuzamos kísérletben mért UIC2 kötődést mutatja, a maximálisan elérhető kötődéshez képest számított százalékos értékben kifejezve. Az ábra 3 független kísérlet eredményeinek átlagát mutatja ( $\pm$ S.E.M). Mindkét vegyület esetében a modulátor-UIC2 kombináció szignifikánsan növelte a calcein akkumulációt a modulátor önmagában történő alkalmazásához képest ( $p < 0,02$ ).

#### 4.2.2. Életképességi vizsgálatok UIC2 antitest és modulátor együttes alkalmazásával

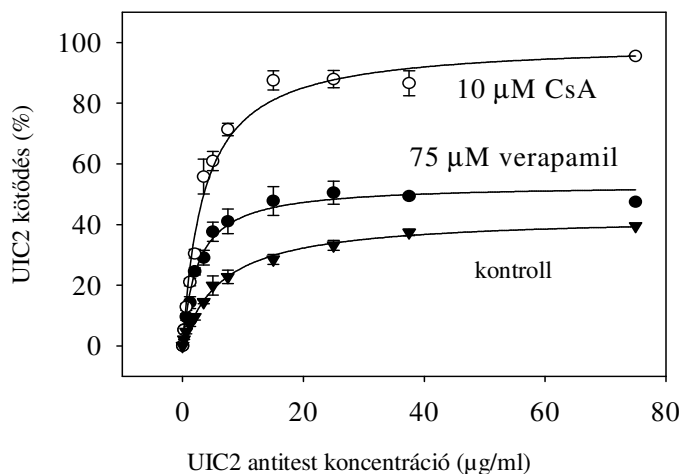
Tudni szeretnénk volna, hogy az antitest általi Pgp pumpafunkció gátlás növeli-e olyan mértékben citotoxikus szubsztrátok intracelluláris koncentrációját, ami a sejtek életképességének csökkenésében is érvényre jut. 2780<sup>AD</sup> (Pgp<sup>+</sup>) és 2780 (Pgp<sup>-</sup>) sejteket 15 nM SDZ PSC 833 modulátorral és 20 µg/ml UIC2 mAt-tel kezeltünk különböző daunorubicin koncentrációk mellett 72 órán keresztül, majd a sejtek életképességét MTT teszt segítségével mértük. Önmagában sem a modulátor, sem az UIC2 mAt nem volt képes csökkenteni a daunorubicin IC<sub>50</sub> értékét (1 µM). Az antitest és modulátor egyidejű alkalmazásával a rezisztenciát nagymértékben gátoltuk, a fenti érték egy nagyságrenddel csökkent (100 nM) (10. ábra).



10. ábra. A daunorubicin citotoxikus hatásának fokozása SDZ PSC 833 (15 nM) és UIC2 (20 µg/ml) egyidejű alkalmazásával 2780<sup>AD</sup> (Pgp<sup>+</sup>) és 2780 (Pgp<sup>-</sup>) sejteken. A sejtek életképességét MTT tesztel vizsgáltuk, és a kezeletlen kontroll értékéhez viszonyítva százalékosan fejeztük ki. Az ábra három párhuzamos mérés átlagát ábrázolja (±S.D.).

### 4.3. Az UIC2 mAt kötőhelyei számának és kötéseerősségének vizsgálata

Az UIC2 mAt a kezeletlen sejtek sejtfelszíni Pgp molekuláinak csak 10-40%-ához kötődik (11. ábra; Mechetner és mtsai, 1997). AKT-pozitív modulátorokkal kezelve a sejteket az antitest kötődése közel 100%-ra fokozható, míg ugyanez a hatás AKT-negatív szerekkel nem érhető el. Telítési görbék felvételével és azok Scatchard-analízisével vizsgáltuk, hogy az UIC2 kötődési többlet mennyiben a kötőhely szám növekedés és mennyiben a disszociációs konstans változásának eredménye. A kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy a kezeletlen kontroll esetén az UIC2 által elért kötőhelyek mennyisége ( $B_{\max} = 42,69 \pm 0,788 \%$ ) verapamil kezelés hatására csak kismértékben nőtt ( $B_{\max} = 53,17 \pm 1,39 \%$ ), míg CSA hatására az antitest számára az összes kötőhely hozzáférhetővé vált. Az disszociációs konstans tekintetében a kezeletlen kontrollhoz ( $K_d = 6,49 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$ ) viszonyítva kb. kétszeres értéken belül szórnak az eredmények. A verapamil kezelés ( $K_d = 2,49 \pm 0,265 \mu\text{g/ml}$ ) és a CSA kezelés ( $K_d = 3,49 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$ ) mellett mért állandók között csak kismértékű különbség van.

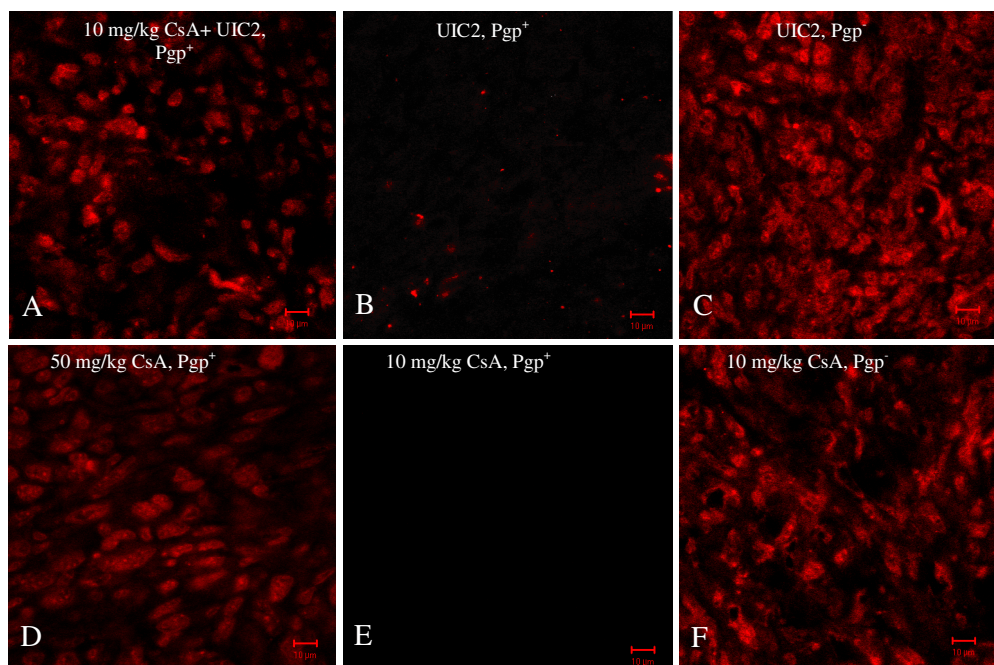


11. ábra. A CSA és verapamil hatása az UIC2 mAt kötődésére. A grafikon pontjai egy reprezentatív kísérlet legalább három párhuzamos mérési eredményének átlagát mutatja ( $\pm\text{SD}$ ).

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

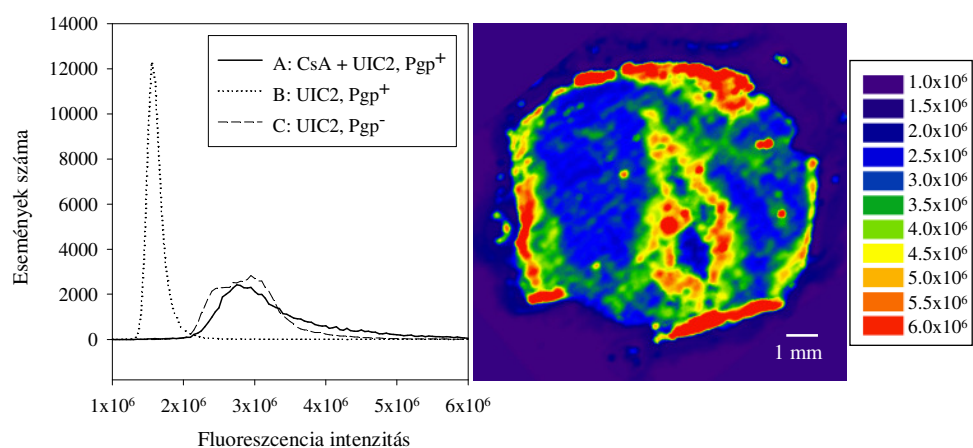
Az antitest és modulátor együttes hatásának *in vivo* teszteléséhez SCID egerek (20 db egér, 3 független kísérletben) mindkét combja bőre alá NIH 3T3 MDR1 (Pgp<sup>+</sup>) és NIH 3T3 (Pgp<sup>-</sup>) sejteket injektáltunk. 10-12 nap elteltével tapintható tumorok fejlődtek ki. Az egereket ekkor UIC2-vel és/vagy CSA-val, majd 4 óra múlva DNR-rel kezeltük. Újabb 4 óra múlva a tumorokat kimetszettük, majd LN<sub>2</sub>-ben lefagyasztva metszeteket készítettünk. A DNR akkumulációt valamint az UIC2 kötődést konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal és pásztázó lézer citométerrel vizsgáltuk.

A konfokális mikroszkópos felvételeken jól látható a DNR akkumulációja a sejtmagokban (12. ábra A, C, D, F). 10 mg/kg CSA és UIC2 együttes alkalmazása a Pgp<sup>+</sup> tumorokban a DNR akkumulációt a Pgp<sup>-</sup> tumorokkal azonos szintre növelte ugyanabban az állatban (12. ábra A, C). CSA vagy UIC2 alkalmazása a fenti koncentrációban önmagában nem emelte a tumorsejtek DNR szintjét (12. ábra B, E). A kombinációs kezeléshez hasonló DNR akkumuláció eléréséhez önmagában alkalmazva ötszörös mennyiségű CSA volt szükséges (12. ábra D).



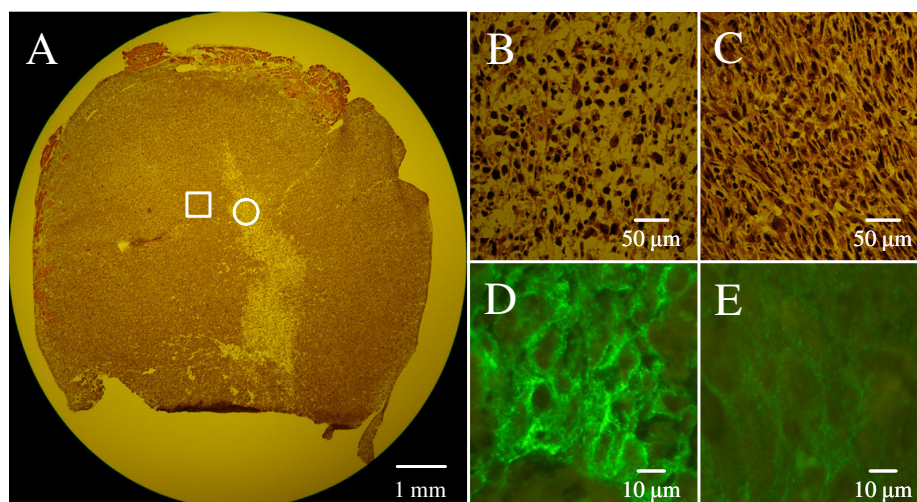
12. ábra. Daunorubicin akkumulációról készített konfokális pásztázó lézer mikroszkópos felvételek NIH 3T3 MDR1 (Pgp<sup>+</sup>) és NIH 3T3 (Pgp<sup>-</sup>) tumorok fagyasztott metszetein. A felvételeken látható jelzés 10 µm-t jelöl.

A kezelések hatásának kvantitatív jellemzésére pásztázó lézer citometriás méréseket végeztünk (13. ábra). Az átlag DNR fluoreszcencia intenzitás UIC2-vel és CSA-val kombinációban kezelt Pgp<sup>+</sup> tumorok esetén  $3,35 \times 10^6$  (CV=26,87%), ugyanabból az állatból származó Pgp<sup>-</sup> tumorok esetén  $2,98 \times 10^6$  (CV=20,43%). A csak UIC2 mAt-vel kezelt állatból származó Pgp<sup>+</sup> tumor sejtjeinek átlag DNR intenzitása  $1,64 \times 10^6$  (CV=18,12%) volt.



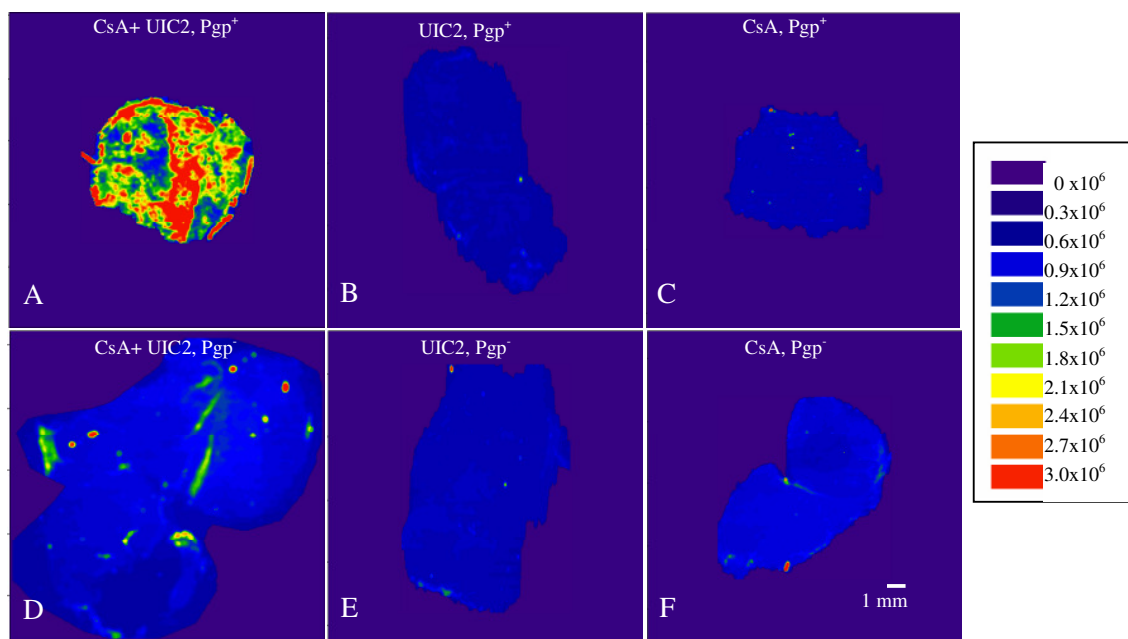
13. ábra. Pásztázó lézer citométerrel meghatározott daunorubicin akkumuláció NIH 3T3 MDR1 (Pgp<sup>+</sup>) és NIH 3T3 (Pgp<sup>-</sup>) tumorok fagyasztott metszetein. A bal oldali fluoreszcencia intenzitás eloszlást ábrázoló hisztogramok (A,B,C) a 12. ábra A, B, és C felvételeken látható metszetekhez tartoznak. A jobb oldali felvétel az „A” hisztogramhoz tartozó teljes metszet DNR fluoreszcenciáját ábrázolja.

A tumormetszetek hematoxinin-eozin festése tipikus tumorszöveti képet mutat (14. ábra A, B, C). Az UIC2 mAt-t i.v. alkalmazva penetrálódott a szolid tumorba és amint a 14. ábra D és E felvételein látható, kötődött a sejtfelszíni Pgp molekulákhoz. A tumor középső részén kisebb sejtsűrűségű terület található. Ezen a részen is intakt a sejtek többsége és az erős sejtfelszíni Pgp jelölés valószínűtlenné teszi, hogy az antitest nekrotizáló területhez kötődhetett, aspecifikus módon.



14. ábra. NIH 3T3 MDR1 (Pgp<sup>+</sup>) tumor metszetek: hematoxinin-eozinnal (HE) festve (A, B, C), valamint az UIC2 mAt kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával (D, E). A: HE festett metszet áttekintő képe (4x-es nagyítás). B: a tumormetszet körrel jelölt, középső részének kinagyított részlete. C: a tumormetszet négyzeggel jelölt területének kinagyított részlete. A metszeten mind a körrel jelölt terület (D), mind a négyzeggel jelölt részlet (E) erős UIC2 membránkötődést mutat.

Az UIC2 mAt Pgp<sup>+</sup> tumorokhoz specifikusan kötődött, a Pgp<sup>-</sup> minták esetén antitest kötődést nem tapasztaltunk (15. ábra). Kvantitatív mérések alapján az UIC2 mAt CSA jelenlétében a teljes metszet területén kötődött a tumorsejtekhez (15. ábra A), míg CSA nélkül a kötődés alig kimutatható (15. ábra B). Az UIC2 kötődés lokalizációja a metszeten összhangban van a DNR akkumuláció eloszlásával (15. ábra A és 13. ábra jobb oldal).



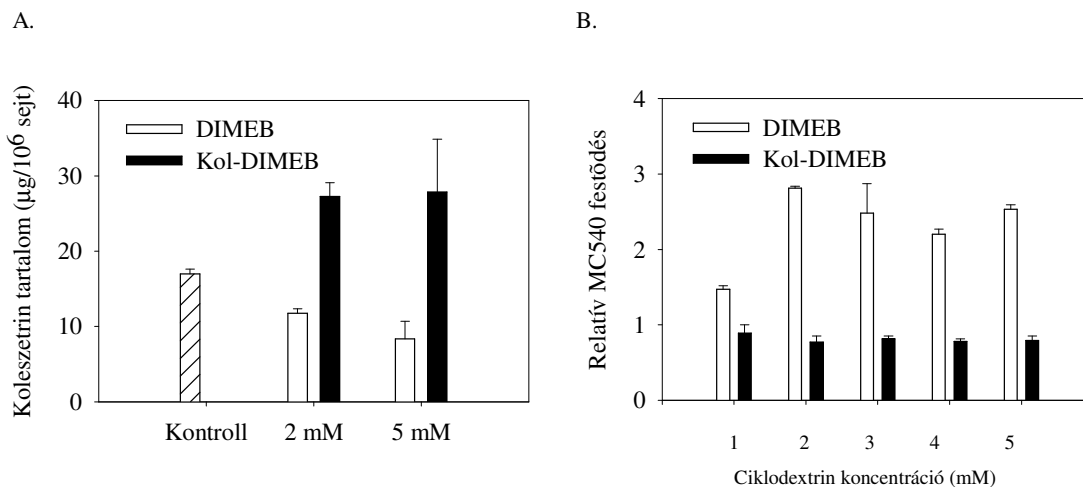
15. ábra. Az UIC2 mAt kötődése NIH 3T3 MDR1 Pgp<sup>+</sup> (A-C) és NIH 3T3 Pgp<sup>-</sup> (D-F) tumorokhoz, indirekt immunfluoreszcens jelölés alapján. A fluoreszcencia intenzitás eloszlást pásztázó lézer citométerrel vizsgáltuk.

## 4.5. A koleszterin Pgp pumpafunkciójára gyakorolt hatásának tanulmányozása

### 4.5.1. A sejtmembrán koleszterin tartalmának modulálása

A Pgp sejtfelszíni heterogenitása – UIC2 által modulátorok távollétében is felismerhető ill. csak (AKT+) modulátorok hatására elérhető Pgp-k - konfokális mikroszkópos analízis szerint (Nagy Henrietta közlés előtt álló adatai) topológiailag is elkülönülő „pool-ok” létezésére utalt. Ezért megvizsgáltuk, hogy a két Pgp „pool” érzékeny-e a membrán jólismert laterális domén (raft) szerkezetének modulálására. A sejtmembrán koleszterintartalma hatásosan modulálható  $\beta$ -ciklodextrin származékokkal (Kilsdonk és mtsai, 1995). 5 mM DIMEB-bel végzett koleszterin depléción a sejtmembrán teljes koleszterintartalmát ( $16,97 \pm 0,65 \mu\text{g koleszterin}/10^6 \text{ db sejt}$ ) mintegy 50%-kal csökkentette ( $8,34 \pm 2,35 \mu\text{g koleszterin}/10^6 \text{ db sejt}$ ), míg a Kol-DIMEB kezelés a membrán koleszterintartalmát 50%-kal növelte ( $27,83 \pm 7,01 \mu\text{g koleszterin}/10^6 \text{ db sejt}$  (16. ábra A). (Janáky és munkatársaival kollaborációban nyert adatok.)

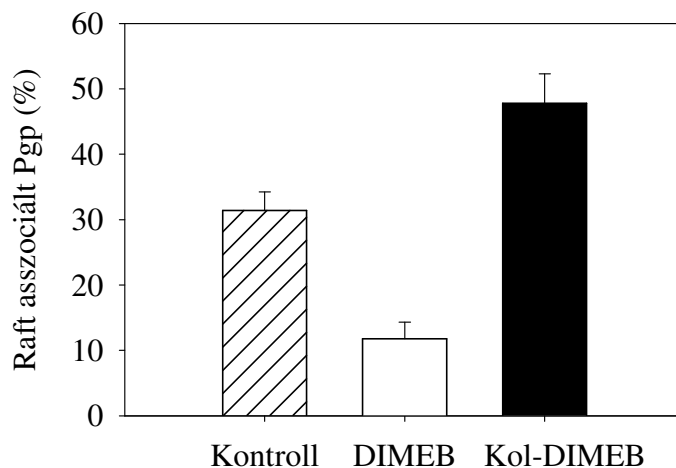
Mint az várható volt, a koleszterin tartalom megváltozása a sejtmembrán fizikokémiai tulajdonságaira is hatással volt. Koleszterin depléción hatására a sejtmembrán fluiditása megnőtt, valamint a lipidek közötti kapcsolat (packing density) „lazábbá” vált, amint ezt a sejtmembránhoz kötődött MC540 festék (Stillwell és mtsai, 1993) fluoreszcencia intenzitásának növekedése demonstrálta. Koleszterin bejuttatása a membránba ellentétes hatást fejtett ki. Magasabb koleszterintartalom esetén a membrán fluiditása csökkent és a membránlipidek elhelyezkedése is szorosabbá vált: ez az MC540 festék fluoreszcencia intenzitásának csökkenését eredményezte (16. ábra B).



16. ábra. A sejtmembrán DIMEB és Kol-DIMEB kezelésének hatása a koleszterintartalomra és MC540 festődésre. DIMEB kezelés szignifikánsan csökkentette ( $p < 0.01$ ), a Kol-DIMEB kezelés növelte ( $p < 0.05$ ) a sejtek koleszterin szintjét (A). A kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív MC540 fluoreszcencia intenzitás koleszterin depléció hatására nőtt ( $p < 0.02$ ), koleszterin bejuttatás hatására csökkent ( $p < 0.02$ ) (B). Az ábrák a mérések átlagát mutatják  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

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

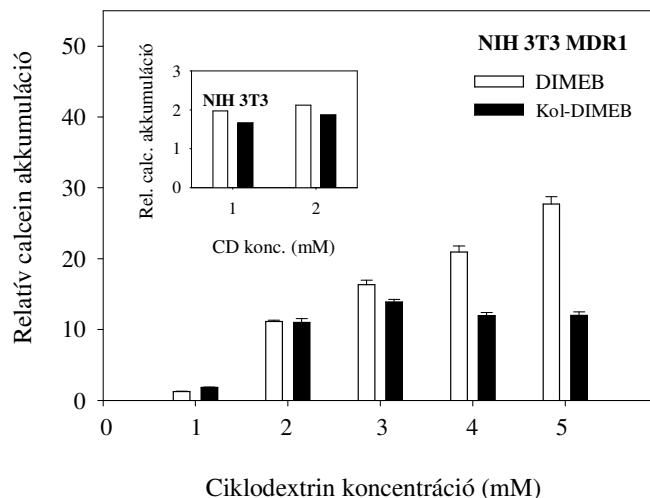
A sejtmembrán koleszterin depléciója szignifikánsan csökkentette a sejtfelszíni Pgp molekulák raft-asszociáltságát, míg a membrán koleszterintartalmának növelése emelte ezen membrán doménekben elhelyezkedő Pgp-k számát (17. ábra). Ezek az adatok felvetik azt a lehetőséget, hogy a Pgp sejtfelszíni konformációs-topológiai heterogenitása kapcsolatban áll a membrán laterális domén szerkezetével, és egyben megerősítik a Pgp (részleges) raft-asszociáltságát dokumentáló irodalmi adatokat (Bacsó és mtsai, 2004).



17. ábra. A DIMEB (5mM) és Kol-DIMEB (5mM) kezelés hatása a sejtfelszíni Pgp-k raft-asszociációjára. A raft-asszociáltság mértékét FCDR teszttel határoztuk meg (lásd Anyagok és Módszerek). A DIMEB kezelés csökkentette ( $p < 0.001$ ), a Kol-DIMEB kezelés növelte ( $p < 0.006$ ) a Pgp-k kontrollhoz viszonyított raft asszociáltságát. Az ábra három független mérés átlagát mutatja  $\pm$  SD.

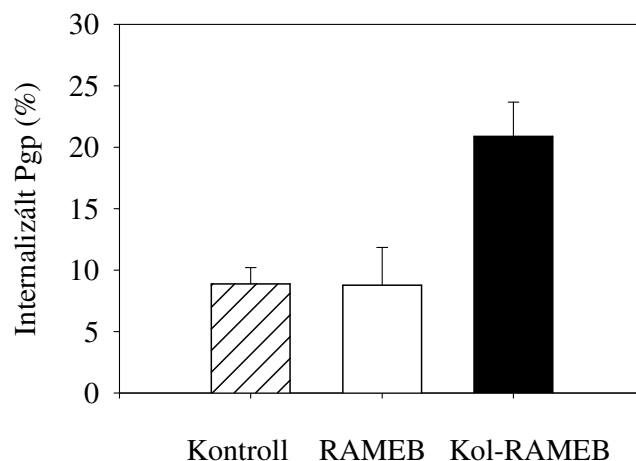
#### 4.5.3. A koleszterin szerepe a pumpafunkció fenntartásában

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a membrán koleszterin tartalmának – és ezáltal a Pgp raft-asszociáltságának – modulációja befolyással van-e a Pgp katalitikus funkciójára. A sejtmembrán DIMEB-bel történő koleszterin deplécióna növelte az intracelluláris calcein akkumulációt az életképes, Pgp<sup>+</sup> sejtekben a DIMEB koncentráció függvényében (18. ábra). (Az adatok kiértékelése során csak a PI negatív, ép membránszervezetű, tehát feltehetően életképes sejteket vettük figyelembe.) A koleszterin membránba történő bejuttatása szintén a calcein akkumuláció növekedését eredményezte, bár jóval kisebb mértékben. Pgp<sup>-</sup> sejtekben a szubsztrát kismértékű dúsulása figyelhető meg, feltehetően a sejtmembrán perturbációja, részleges permeabilizációja következményeként (18. betét ábra). (A Pgp<sup>-</sup> sejtek a ciklodextrin kezelésre érzékenyebbek voltak, 2 mM ciklodextrin koncentráció felett nem maradt életképes sejt a mintákban.)



18. ábra. A DIMEB és Kol-DIMEB kezelés hatása az NIH 3T3 MDR1 sejtek calcein akkumulációjára. A betét ábra a Pgp<sup>-</sup> sejtek ciklodextrin kezelést követő calcein akkumulációját mutatja. Az oszlopok a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív calcein akkumulációt ábrázolják. 1 mM ciklodextrin koncentráció felett mind a DIMEB, mind a Kol-DIMEB kezelés növelte a calcein akkumulációt a Pgp<sup>+</sup> sejtekben ( $p < 0,001$ ). Az ábra a mérések átlagát mutatja  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

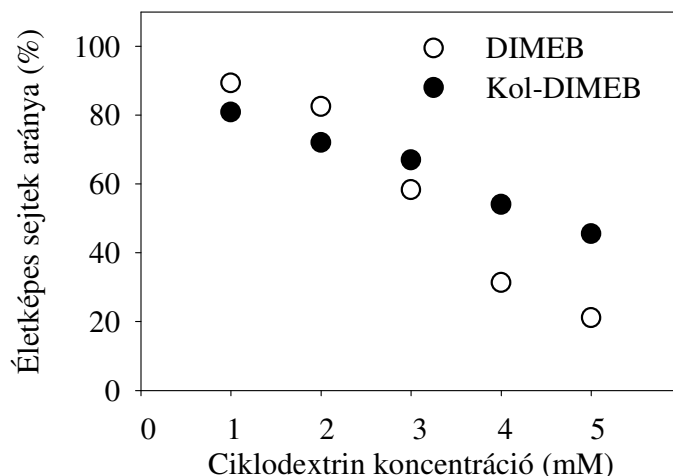
A sejtmembrán szaturációja koleszterinnel tehát szintén pumpafunkció gátlást eredményezett. Az irodalomból ismert, hogy bizonyos membránfehérjék endocitózisa fokozható a membrán koleszterinszintjének növelésével (Sharma és mtsai, 2004; Lajoie és Nabi, 2007). Ez a lehetőség csökkentheti a transzportban résztvevő Pgp-k számát, ezáltal bizonyos mértékű transzportgátlást előidézve. Megvizsgálva a jelenséget azt tapasztaltuk, hogy a membrán koleszterinnel történő szaturációja mintegy 2,5-szeresére növelte a Pgp internalizációjának mértékét. Ezzel szemben a koleszterin depléciónak nem okozott szignifikáns változást a fenti mechanizmusban.



19. ábra. A membrán koleszterintartalom változtatásának hatása a Pgp internalizációjára. NIH 3T3 MDR1 sejteket 5 mM RAMEB-bel vagy Kol-RAMEB-bel kezelve határoztuk meg, hogy az összes sejtfelszíni Pgp-k mekkora hányada internalizálódott. A membrán koleszterinnel történő dúsítása szignifikánsan növelte a Pgp-k internalizációját ( $p < 0,001$ ). Az adatokat átlagban fejeztük ki  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

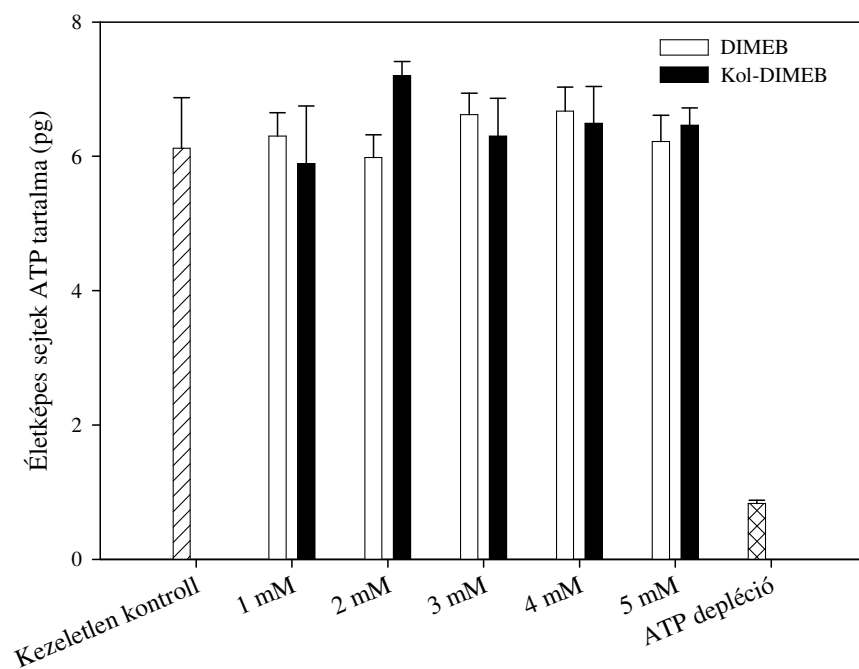
#### 4.5.4. A koleszterin-modulálás hatása az ép membránú sejtek intracelluláris ATP-szintjére

A ciklodextrin kezelés a koncentráció függvényében csökkentette a PI festés alapján életképesnek tartható sejtek arányát. A koleszterin depléciónak kisebb ciklodextrin koncentráció mellett okozott hasonló mértékű membránkárosodást, mint a membrán koleszterin szaturáció (20. ábra).



20. ábra. A ciklodextrin kezelés hatása a sejtek életképességére. A koleszterin depléció és a koleszterin szaturáció eltérő mértékben, de szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét ( $p < 0,001$ ). Az életképességi vizsgálatot PI festődés alapján, áramlási citometriás méréssel egyidőben végeztük a calcein akkumuláció és az MC540 festődés meghatározásával.

A toxicitás korrelált a ciklodextrin kezelés hatására kialakult calcein akkumulációval. Annak kizárására, hogy a pumpafunkció gátlása nem a ciklodextrin toxicitással együtt járó és a szokványos, festék-kizárásos életképességi teszttel nem kimutatható membránkárosodás eredménye, meghatároztuk az életképes, PI-negatív sejtek ATP tartalmát. Sem a koleszterin depléció, sem a koleszterin szaturáció nem csökkentette szignifikánsan az életképes sejtek ATP tartalmát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (21. ábra). Ugyanakkor glükózmentes PBS-ben, verapamillal felpörgetett Pgp aktiválás előidézte ATP-depléció (Goda és mtsai, 1996) hatására a sejtek ATP mennyisége jelentősen csökkent.



21. ábra. DIMEB-bel és Kol-DIMEB-bel kezelt, életképes sejtek ATP tartalma pikogrammban (pg). A koleszterin depléción és a szaturáción nem csökkentette szignifikánsan az életképes sejtek ATP tartalmát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ( $p > 0,05$ ). ATP depléción: 60  $\mu$ M verapamillal, glükóz mentes PBS-ben 60 percen keresztül, 37  $^{\circ}$ C-on kezelt sejtek. Az adatokat átlagban fejeztük ki  $\pm$  SD (DIMEB és Kol-DIMEB kezelt minták:  $n=4$ ; kontroll:  $n=16$ ).

## 5. Megbeszélés

A munkacsoportunk által korábban kidolgozott AKT-esszével a Pgp hatékony modulátorai jól azonosíthatók (Nagy és mtsai, 2001). Kísérleteinkben számos, szerkezetében és hatásában jelentősen különböző vegyületet teszteltünk a módszer segítségével (7. ábra). A kapott eredmények alapján a molekulák AKT-teszt alapján két, AKT+festék-akkumuláció alapján három csoportba sorolhatók.

A magas, 0,9-1  $R_{\text{kompetíció}}$  (AKT) értékeket eredményező modulátorok (pl. CSA) a Pgp funkcióját teljes mértékben gátolni képesek. Ezen szerek mellett alkalmazva, az UIC2 antitest a pumpát a katalitikus ciklusnak abban a fázisában blokkolja, melyre jellemző konformációs állapotot az ATP-depléción is előidézi (Mechetner és mtsai, 1997; Goda és mtsai, 2002). Az „AKT-pozitív” (CSA-szerű) vegyületek önállóan alkalmazva is kiváló gátlószerei a pumpának, ami transzport esszéiben kivétel nélkül erős és alacsony koncentráció mellett érvényesülő gátlásban nyilvánul meg.

A verapamil-típusú („AKT-negatív”) vegyületek a pumpafunkció gátlásával calcein-akkumulációt okoznak, azonban hatásukra az antitestek „versengése” nem, vagy csak kevésbé modulálódik. (Megjegyzendő, hogy az AKT eljárás során az UIC2-t előbb adjuk, előnyt adva ennek az antitestnek a másikkal szemben, tehát a „versengés” leegyszerűsítő - a topológiai heterogenitás felismerése előtt született, annak ismeretében félrevezető - kifejezés, valójában nem az átfedő epitópokért folyó valódi kompetíció mértékét, hanem kétféle kötőhely arányát detektáljuk.)

Az  $R_{\text{kompetíció}}$  értékek ennek megfelelően a 0,2-től 0,7-ig tartó intervallumba esnek. Tehát ezek az AKT-negatív vegyületek erős saját pumpafunkció-gátló hatásuk ellenére sem képesek a sejtfelszíni Pgp-k többségét az UIC2 által felismerhető - majd általa ebben az állapotban befagyasztott - konformációba hozni. A kétféle vegyület csoport által indukált konformációs/topológiai állapot jelentősen különbözhet, hiszen az AKT-negatív szerek csoportja még magas koncentrációban (7, 11. ábra) vagy hosszú inkubálás után (Goda Katalin közlésre előkészített adatai) sem képes ugyanolyan hatást kifejteni.

A harmadik csoportba sorolhatóak azok az anyagok, melyeknek nincs számottevő hatásuk sem festék-akkumulációban, sem AKT-ban. Az osztályozás összhangban áll Bauer és munkatársai (Bauer és mtsai, 2003) megfigyelésével is, akik a Pgp modulátorokat calcein-akkumulációt fokozó hatásuk mértéke alapján sorolták be kevésbé élesen elkülönülő csoportokba.

A vizsgált anyagok szerkezetükben jelentősen eltérőek, azonban néhány közös vonás felfedezhető bennük. Az AKT-pozitív molekulák nagy, közel 1000 Da móltömegű és hidrogén-hidak kialakítására alkalmas csoportokban gazdag vegyületek. Ez a körülmény a pumpa szubsztrátkötő helyéhez erősebb kötődést és lassabb disszociáció útján lassabb transzportot okozhat, ami az AKT-pozitív szerekre jellemző konformációs/topológiai állapot létrejöttét idézheti elő. Ez az interpretáció azonban nem magyarázná meg a kötőhelyek számának változását demonstráló ill. a topológiai heterogenitásra (részleges raft-asszociációra) utaló adatokat. Újabb adatok szerint kisebb molekulák transzportja koleszterin térkitöltő jelenlétét igényli, míg a nagyobb, 1000 Da méretű szubsztrátok önmagukban is transzportálódnak a Pgp által (Kimura és mtsai, 2007). Ez az összefüggés felveti egy olyan modellt lehetőségét, melyben az UIC2 által csak a nagyméretű, AKT+ szubsztrátok jelenlétében felismert Pgp-k („pool II”) ezen szubsztrátok távollétében ATP-kötött „készenléti” állapotban lennének. A raft-asszociált másik Pgp pool-ban („pool I”) bazálisan is folyhat transzport, és egyben a magas koleszterin tartalom lehetővé teszi, hogy kismolekulák is stimulálják az ATPáz működést. Mások kétféle szubsztrátfüggő ATPáz aktiválási kinetikát mutattak ki a raft-asszociált és raftokon kívüli Pgp-k esetében, és ezzel összefüggő topológiai heterogenitásra utaló adatokat is közöltek (Barakat és mtsai, 2005).

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

Bacsó és munkatársai az AKT-teszt segítségével nagyszámú, a Pgp-re nem ismert hatású molekula szűrését végezték FACS-array módszerrel (nem közölt adatok). A mérések néhány molekula esetén AKT-pozitív hatást mutattak ki. A teszt tehát megfelelően nagy teljesítményű mérési módszerrel kombinálva alkalmas molekulakönyvtárak szűrésére is.

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

Annak vizsgálatára, hogy a szubsztrátok/modulátorok által előidézett UIC2 kötődés növekedés a kötőhelyek számának növekedésével vagy a kötődési konstans változásával függ-e össze, UIC2 telítési görbéket vettünk fel, kezeletlen sejteken ill. verapamil és CSA kezelések esetén. A kötőhelyek számában a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva jelentős

emelkedés figyelhető meg az AKT-pozitív CSA hatására, szemben az AKT-negatív verapamillal, amely csak kismértékű növekedést eredményezett. A kezelések következtében az UIC2 mAt affinitása kismértékben javult a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva a modulátorok AKT-típusától függetlenül. Ezek alapján feltételezhető, hogy az antitest kötődés növekedésében az AKT-pozitív szerek hatására UIC2 által felismerhetővé vagy hozzáférhetővé váló kötőhelyek számának emelkedése dominál az affinitásban bekövetkező változás fölött. Ez az interpretáció harmonizál a szubsztrátok kétféle viselkedésének fenti, a részleges raft-asszociációval is kapcsolatba hozott modelljével.

Az UIC2 mAt általi, AKT-pozitív szubsztrátok jelenlétében kialakuló – majdnem teljes - gátlás a modulátorok kimosását követően is fennmarad (8. ábra), vagyis ekkor a sejtfelszíni Pgp molekulák többsége UIC2-kötött, gátolt állapotban van. Szignifikáns intracelluláris szubsztrát akkumuláció fokozódás eléréséhez a sejtfelszíni Pgp molekulák legalább 70%-át blokkolni kell az UIC2 mAt-kel (9. ábra). AKT-negatív vegyületekkel a fenti hatás nem érhető el (8. és 11. ábra), az AKT-negatív szerek kimosása után gátló hatás nem marad (8. ábra). Az antitest által elérhető Pgp-k általában kisebbségben vannak, gátlásuk a teljes sejt festék akkumulációjában nem (vagy csak kevésbé) manifesztálódik. Mindez – a fenti modell figyelembe vételével - arra is utal, hogy az összes sejtfelszíni Pgp potenciálisan aktív (megfelelő szubsztráttal aktiválható) állapotban van.

A CSA és az SDZ PSC 833 vegyületek esetén megfigyeltük, hogy az UIC2 mAt festék akkumulációt gátló kötődését már jóval kisebb koncentrációban elősegítik, mint amennyi szükséges lenne önmagukban modulátorként való alkalmazáskor (9. ábra). Feltételezhetően ebben az alacsony koncentrációban is képesek a katalitikus ciklus beindítására a sejtfelszíni Pgp molekulák korábban UIC2-t nem kötő, tehát valószínűleg pillanatnyilag inaktív („készletben” lévő; l. fenn) molekulák hányadában. Ekkor ezekben is kialakul az a konformáció, amelyben az UIC2 mAt gátló hatású kötődése csapdázza a pumpát. Ezen általunk javasolt interpretáció szerint az UIC2-shift jelenség a különböző szubsztrátok által *aktiválható* sejtfelszíni molekulák kimutatását teszi lehetővé, mintsem az éppen funkcionáló Pgp molekulákat, árnyalva a korábbi elképzelést

Összhangban állnak a fentiekkel *in vitro* citotoxicitási vizsgálataink eredményei is. Az MDR sejtek életképessége alacsony modulátor koncentráció esetén csak az UIC2 mAt egyidejű alkalmazásával csökkent (10. ábra). Egy, a fentiektől függetlennek látszó érdekes jelenség is tapasztalható volt az életképességi (MTT) vizsgálatok során: a modulátor és az antitest együttes alkalmazásával, a maximális gátló hatás elérésekor sem tudtuk az MDR sejtek DNR-rel szembeni érzékenységét a szenzitív sejtvonal érzékenységi szintjére

csökkenteni. Erre a rezisztens és a szenzitív sejtvonalak membránjának eltérő lipidösszetétele szolgálhat magyarázatul. Az MDR sejtek membránja nagyobb mennyiségben tartalmaz például koleszterint (Gayet és mtsai, 2005), ami szerepet játszhat az MDR fenotípus kialakításában a különböző vegyületek lipid/víz, majd lipid/Pgp megoszlásának megváltozásán keresztül.

Az UIC2 és modulátor kombinációjával létrehozott MDR reverziót *in vivo* SCID egér tumor modellen is teszteltük. Az állatkísérletek során, a fagyasztott metszetek LSC analízise segítségével kimutattuk, hogy az UIC2 mAt eljut és kötődik a szolid tumorok sejtfelszíni Pgp molekuláihoz (14., 15. ábra). Az AKT-pozitív CSA hatására tehát *in vivo* is megnő az UIC2 mAt által felismerhető Pgp-k száma. Az UIC2 kötődése a pumpafunkció gátlásával elősegíti a citotoxikus szubsztrát, a DNR akkumulációját a tumorsejtekben (12., 13. ábra). Összefüggést figyelhattunk meg az UIC2 kötődés és a DNR akkumulációja között. Hasonlóan az *in vitro* kísérletekhez, az antitest és a CSA együttes adásakor ötször kisebb modulátor koncentráció elégséges volt a gátló hatás eléréséhez, mint a CSA-t önmagában alkalmazva. Ez az eredmény a jövőbeli terápiás lehetőségek szempontjából is fontosnak tekinthető, ugyanis kiküszöbölhetők a nagy dózisu CSA és egyéb revertálószer alkalmazásából adódó mellékhatások (Yahanda és mtsai, 1992; Samuels és mtsai, 1993). Az UIC2 mAt-tel létrehozható Pgp gátlás nemcsak a daganatterápiában játszhat fontos szerepet. Számos hatóanyag (pl.: HIV proteáz inhibitorok) képtelen áthatolni a vér-agy gáton az ABC transzporterek, közöttük a Pgp működésének következtében.

A fenti állatmodell beállításának többféle gyakorlati hozadéka lehetséges. Amennyiben az UIC2 mAt és a kis dózisu modulátorok együttes alkalmazása esetén Pgp-szubsztrát drogokkal (pl. DNR) meg lehet akadályozni a transzplantált daganat kialakulását, felmerül az eljárás emberben való használati lehetősége. Ehhez természetesen elengedhetetlen feltétel lenne az UIC2 mAt humanizált változatának előállítása. A kísérleti rendszer célzott gyógyszerbevitelen (drug targeting) alapuló daganatterápiás eljárások tesztelésére is előnyösen alkalmazhatónak látszik.

A Pgp transzport mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. A kristályszerkezeti vizsgálatok arra utalnak, hogy a transzmembrán alfa-hélixek a membránban egy, az extracelluláris tér felé irányuló nagy hidrofób üreget hoznak létre, mely a lipid kettősréteg felé oldalról nyitott lehet. Ezzel összhangban a Pgp valószínűleg elsősorban a membránból gyűjti be hidrofób szubsztrátjait, és juttatja a membrán extracelluláris oldalára (Rosenberg és mtsai, 2003). Amennyiben ez a mechanizmus működik, akkor a fehérjét közvetlenül övező membránrészek fontosak a szubsztrát-Pgp kapcsolat kialakulásában. Kevésbé ismert

azonban a Pgp membránkörnyezetének transzportot befolyásoló szerepe. Kísérleti adataink szerint a Pgp funkció érzékeny volt a membrán koleszterin tartalmára, vagyis annak modulálása nemcsak a membrán egészére kiterjedő fiziko-kémiai paramétereket, hanem a Pgp szűkebb, közvetlen membránkörnyezetét is érintette.

A Pgp-k egy jelentős hányada (10-40%, a vizsgált sejtípustól és a módszertől függően) magas koleszterin, gliko- és szfingolipid tartalmú membrán mikrodoménekben, raftokban helyezkedik el (Lavie és mtsai., 1998; Bacsó és mtsai., 2004). Feltételezik, hogy a Pgp képes különböző rövid szénláncú foszfatidil-kolin, foszfatidil-etanolamin, szfingomielin és cerebrozid analógok, valamint a koleszterin transzportjára a membrán belső rétegéből a külsőbe, valamint ismert, hogy a bazális ATPáz aktivitás mértéke függ a membrán koleszterin tartalmától (Garrigues és mtsai, 2002; van Heelvolt és mtsai, 1996; Bevers és mtsai, 1999). Így a Pgp-nek és más széles spektrumú ABC-transzportereknek lipid transzlokáz funkciójuknál fogva része lehet a plazmamembránok funkcionális laterális szerveződésében szerepet játszó lipid mikrodomének létrehozásában és módosításában (van Heelvolt és mtsai, 1996; Bevers és mtsai, 1999). Koleszterin modulációs adataink illenek ebbe a képbe, de magának a Pgp-nek lipiddoménye létrehozásában feltételezett szerepét nem érintik.

Előbbi kísérleteinkben a koleszterin Pgp funkciójára és topológiai viszonyaira gyakorolt hatását vizsgáltuk. A membrán koleszterin modulálás egyik elfogadott módszere a különböző  $\beta$ -ciklodextrin-származékokkal végzett koleszterin deplécio illetve szaturáció (Kilsdonk és mtsai, 1995). MDR sejteket DIMEB-bel kezelve a membrán teljes koleszterintartalmát csökkentettük, valamint Kol-DIMEB-bel növeltük (16. ábra). Ezzel összhangban az életképes sejtek membránjának fluiditása, valamint a lipidek közötti kapcsolat is megváltozott. A koleszterin modulálása a Pgp sejtfelszíni lokalizációjára is hatással volt. A Pgp TX100 detergens kioldhatósága alapján a koleszterin deplécio csökkentette, míg a membrán koleszterin töltése növelte a citoszkeleton-kötött raftokban elhelyezkedő molekulák mennyiségét (17. ábra). A koleszterin modulálás nemcsak a sejtmembrán globális fizikokémiai paramétereit, hanem a Pgp közvetlen membránkörnyezetét is érintette, ami a Pgp funkciójában is tükröződött. A koleszterin deplécio koncentráció függő módon csökkentette a Pgp pumpafunkcióját (18. ábra). A koleszterin szaturáció okozta pumpagátlás a Pgp molekulák fokozott endocitózisára volt visszavezethető, ami a raft-asszociációval szoros összefüggésben állhat. A raftok kitüntetett területei a membránnak, ahonnan a membránfehérjék endocitózissal internalizálódhatnak (Sharma és mtsai, 2004; Lajoie és Nabi,

2007). A koleszterin szaturációval előidézett Pgp raft-asszociáció növekedés a Pgp internalizációját fokozta (19. ábra)

Amint várható, és a bemutatott eredmények is alátámasztják, a membránkezelés komplex hatásokat eredményez. Nem csupán a Pgp működését, hanem a sejtek számos életfolyamatát is érinti. A kezelés következményeként a sejtek életképessége a koleszterintartalom változásával párhuzamosan csökkent (20. ábra) Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a Pgp funkció csökkenése a ciklodextrinek toxicitásának és nem a membránkörnyezet modulálásának az eredménye. A membrán permeabilizálása az ATP intracelluláris szintjének csökkenéséhez vezethet még az életképesség változásának detektálását megelőzően, ami befolyásolhatja a pumpaműködést. Ezt a lehetőséget a ciklodextrin kezeléseket követő ATP-szint méréssel egyértelműen kizártuk, az intracelluláris ATP mennyisége a kontrollhoz viszonyítva nem csökkent (22. ábra). A ciklodextrinek Pgp-moduláló hatását számos közleményben leírták már előttünk (Bacso és mtsai, 2004; Santos és mtsai, 2007; Cai és mtsai, 2004), de a viabilitási markerek, a lokális és globális membránhatások korrelatív vizsgálatára ezek a vizsgálatok nem terjedtek ki.

A Pgp és membránkörnyezete között fenálló speciális kapcsolatban az egyik fontos összekötő elem tehát a koleszterin lehet. Ezen membránalkotó mennyiségének változása a membránban indirekt módon, a membránszerkezet változásán keresztül is befolyásolhatja a Pgp működését. Látható, hogy a koleszterin modulációval a raftok és a bennük helyet foglaló fehérjék szerveződése is megváltozik. Számításba véve azt a tényt, hogy az MDR sejtek membránja koleszterinben dúsabb és a raftok a szubsztrát felismerés lehetséges helyszínei lehetnek, a koleszterin modulálás hatásai további kérdéseket vetnek fel. Ismert, hogy a membrán fázisállapota hatással van a transzportra. Peihua és munkatársai kimutatták, hogy a rigid, gél fázisban a Pgp transzport mértéke nagyobb, mint a fluid fázisban. A jelenséget a szubsztrátok különböző fázisállapotokhoz tartozó eltérő lipid megoszlásával magyarázták (Peihua és mtsai, 2001). Regev és munkatársai szerint éterrel és más anesztetikumokkal létrehozott membrán fluidizáció gátolja a Pgp ATPáz aktivitását és az MDR sejtek szubsztrát effluxát is (Regev és mtsai., 1999). Mindezzel analóg módon a transzportra is kiható szubsztrát megoszlási viszonyok a koleszterin depléción útján is kialakulhatnak. Ezen gondolatmenet mentén a Pgp topológiai, mikrokörnyezeti kétféleségét úgy értelmezhetjük, hogy az a széles szubsztrátspektrum egyik feltétele lehet. Ismert, hogy a katalitikus folyamat sebességmeghatározó lépése is érzékeny a lipidkörnyezetre (Al-Shawi és mtsai, 2003).

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

## 6. Összefoglalás

1. A munkacsoportunk által korábban kidolgozott AKT teszttel további Pgp modulátorokat és szubsztrátokat vizsgáltunk meg. A teszt segítségével a vegyületek a már korábban felállított AKT-pozitív és AKT-negatív csoportokba egyértelműen besorolhatóak, így megállapíthatjuk, hogy a szubsztrátok dichotómiája nagyobb számú vegyületet összehasonlítva is kimutatható.
2. Kimutattuk, hogy az UIC2 mAt részleges Pgp gátlása AKT-pozitív modulátorokkal teljessé fokozható, és a gátlás a modulátorok kimosása után is megmarad. A gátló hatású mAt kötődéshez alacsony, önmagában még hatástalan modulátor koncentráció elégséges.
3. Az UIC2 és AKT-pozitív modulátor hatására kialakuló Pgp gátlás a rezisztens sejtek daunorubicinnel szembeni érzékenységeiben is megnyilvánult. A revertálás az antitest és a modulátor együttes alkalmazásakor bizonyult a legerősebbnek.
4. Megvizsgáltuk a modulátorok hatására kialakuló UIC2 mAt kötődés növekedés lehetséges okait. Bebizonyosodott, hogy a disszociációs állandó kismértékű változása mellett főként a kötőhelyek számának nagymértékű növekedése okozza a megemelkedett antitest kötődést.
5. az UIC2 gátlást *in vivo* tesztelve kimutattuk, hogy az antitest eljut és kötődik a tumor teljes térfogatában a tumorsejtek felszínén elhelyezkedő Pgp molekulákhoz és a kötődés az AKT-pozitív modulátor CSA kis dóziséval fokozható. A kialakuló kötődés a tumorsejtekben daunorubicin akkumulációt idéz elő, ami az antitestkötődés mértékével összhangban áll.
6. Az MDR sejtek koleszterin kivonással illetve szaturációval modulált membránjában a Pgp-k raft asszociációja a koleszterinszinttel párhuzamosan változott. Koleszterin depléciónak hatására a Pgp-k funkciója gátolt, míg szaturáció következtében az internalizáció fokozásával a transzportban résztvevő molekulák száma csökkent.
7. A koleszterin modulálás a sejtek életképességének nagymértékű csökkenéséhez vezetett, de nem járt együtt az élő sejtek ATP-szintjének változásával. A Pgp gátlást ennek megfelelően nem a kezelés toxikus volta, hanem a koleszterintartalom változásából fakadó membránkörnyezeti tényezők megváltozása okozhatja.

## Summary

1. We have tested several Pgp transported drugs by the *antibody competition test* (ACT). The tested compounds could be clearly classified into the ACT-positive or ACT-negative groups, therefore we can conclude that this kind of dichotomy can be a general feature of many Pgp substrates/modulators.
2. The partial inhibition of the pump by the UIC2 mAb could be increased by ACT-positive agents to near-complete inhibition that prevailed after the removal of the drugs. The inhibitory binding of UIC2 could be induced by low, in itself ineffective concentrations of the modulators.
3. The coadministration of UIC2 mAb and these modulators could more effectively reduce the resistance of MDR cells than either the mAb or the modulators alone, also reflected in the *in vitro* cytotoxicity test.
4. We have investigated the possible causes of increased binding of UIC2 by the transported drugs (UIC2-shift). We have found that besides a small change in the dissociation constant the elevated UIC2 binding is brought about by the increase in the number of available binding sites.
5. The UIC2 mAb reached and was bound to the cell surface Pgps of solid tumors *in vivo*. The amount of bound UIC2 could be increased by the coadministration of low-dose, ACT-positive cyclosporin A. The mAb binding elicited increased daunorubicin accumulation in tumor cells *in vivo* and this was accompanied by an elevated daunorubicin uptake.
6. The raft association of Pgps could be decreased by membrane cholesterol depletion or increased by cholesterol saturation in MDR cells. Cholesterol depletion caused Pgp inhibition in living cells, while cholesterol saturation induced an increased rate of Pgp internalization.
7. Although cholesterol modulation was accompanied by decreased cell viability, we didn't observe a lowered ATP content in the dye-excluding, apparently viable cells that might have been the result of nonspecific membrane permeabilization. Thus, we could confirm that Pgp inhibition was effected by the altered lipid environment that perturbed drug transport efficiency and not to the toxicity of the cell treatment.

## 7. Irodalomjegyzék

- Al-Shawi, M. K., Polar, M.K., Omote, H., Figler, R.A. (2003) Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol.Chem.* 278: 52629-52640
- Ambudkar, S.V., Kim, I.W., Sauna, Z.E. (2005) The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur. J. Pharm. Sci.* 27: 392-400.
- Bacso, Z., Nagy, H., Goda, K., Bene, L., Fenyvesi, F., Matko, J., Szabó Jr., G. (2004) Raft and cytoskeleton association of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytometry Part A.* 61A: 105-116.
- Barakat, S., Gayet, L., Dayan, G., Labialle, S., Lazar, A., Oleinikov, V., Coleman, A.W., Baggetto, L.G. (2005) Multidrug-resistant cancer cells contain two populations of P-glycoprotein with differently stimulated P-gp ATPase activities: evidence from atomic force microscopy and biochemical analysis. *Biochem. J.* 388: 563-571.
- Bauer, B., Miller, D.S., Fricker, G. (2003) Compound profiling for P-glycoprotein at the blood-brain barrier using a microplate screening system. *Pharm. Res.* 20: 1170-1176.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H.H. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 290: 1771-1775.
- Bervers, E.M., Comfurius, P., Dekers, D.W.C., Zwaal, R.F.A. (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1439: 317-330.
- Boesch, D, Gaveriaux, C, Jachez, B, Pourtier-Manzanedo, A., Bollinger, P, Loor, F. (1991) In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res.* 51: 4226-4233.
- Broxterman, H.J., Kuiper, C.M., Schuurhuis, G.J., Tsuruo, T., Pinedo, H.M., Lankelma, J. (1988) Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2389-2393.
- Cai, C., Zhu, H., Chen, J. (2004) Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 868-874.
- Chaudhary, P., Mechetner, E.B., Roninson, I.B. (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80: 2735-2739

- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D., Pastan, I. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47: 381-389.
- Chen, Y., Simon, S.M. (2000) In situ biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *J. Cell. Biol.* 148: 863-870.
- Contreras, J.A., Castro, M., Carlos Bocos, C., Herrera, E. and Lasuncion, M.A. (1992) Combination of an enzymatic method and HPLC for the quantitation of cholesterol in cultured cells. *J. Lipid Res.* 33: 931-936.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42: 1007-1017.
- De Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desroches, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., Hadchouel, M. (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 282-287.
- Doige, C.A., Yu, X., Sharom, F.J. (1992) ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1109(2): 149-160.
- Druley, T.E., Stein, W.D., Roninson, I.D. (2001) Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity. *Biochemistry.* 40 (14): 4312-4322.
- Garrigues, A., Escargueil, A.E., Orlowski, S. (2002) The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10347-10352.
- Gayet, L., Dayan, G., Barakat, S., Labialle, S., Michaud, M., Cogne, S., Mazane, A., Coleman, A.W., Rigal, D., Bagetto, L.G. (2005) Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry.* 44: 4499-4509.
- Goda, K., Balkay, L., Márián, T., Trón, L., Aszalós, A., Szabó, G. (1996) Intracellular pH does not affect drug extrusion by P-glycoprotein. *J. Photochem. Photobiol. B.* 34: 177-182.
- Goda, K., Nagy, H., Mechetner, E., Cianfriglia, M., Szabó, G., (2002) Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation on live cells. *Eur. J. Biochem.* 269: 2672-2677.
- Gottesman, M.M., Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385-427.
- Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A., Borst, P., Meer, G. (1996) MDR1 P-Glycoprotein is a lipid translocase of broad Specificity, while MDR3 P-Glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell.* 87: 507-517.

Higgins, C. F., Gottesmann, M.M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? Trends. Biochem. Sci. 17: 18-21.

Higgins, C.F., Linton, K.J. (2004) The ATP switch model for ABC transporters. Nat. Struct. Mol. Biol. 11: 918-926.

Holló, Z., Homolya, L., Davis, C.W., Sarkadi, B. (1994) Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. Biochim. Biophys. Acta. 1191: 384-388.

Homolya, L., Holló, Zs., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesmann, M., Sarkadi, B., (1993) Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. J. Biol. Chem. 268: 21493-21496.

Iwahashi, T., Okochi, E., Ariyoshi, K., Watabe, H., Amann, E., Mori, S., Tsuruo, T., Ono, K., (1993) Specific targeting and killing activities of anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK16 directed against intrinsically multidrug-resistant human colorectal carcinoma cell lines in nude mouse model. Cancer Res. 53: 5475-5482.

Kandimalla, V.B., Neeta, N.S., Karanth, N.G., Thakur, M.S., Roshini, K.R., Rani, B.E.A., Pasha, A., Karanth, N.G.K., (2004) Regeneration of ethyl parathion antibodies for repeated use in immunosensor: a study on dissociation of antigens from antibodies. Biosens. Bioelectron. 20: 903-906.

Kerr, K.M., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. (2001) Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in human P-glycoprotein. J. Biol. Chem. 276: 8657-8664.

Kilsdonk, E.P.C., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. J. Biol. Chem. 270:17250-17256.

Kimura, Y., Kioka, N., Kato, H., Matsuo, M., Ueda, K. (2007) Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. Biochem. J. 401: 597-605.

Kimura, Y., Kodan, A., Matsuo, M., Ueda, K. (2007) Cholesterol fill-in model: mechanism for substrate recognition by ABC proteins. J. Bioenerg. Biomembr. 39: 447-452.

Lajoie, P., Nabi, I.R., (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. J. Cell. Mol. Med. 11:644-653.

Lavie, Y., Cao, H.T., Bursten, S.L., Guiliano, A.E., Cabot, M.C., (1996) Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* 271: 19530-19536.

Lavie, Y., Fiucci, G., Liscovitch, M. (1998) Up-regulation of caveole and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* 273: 32380-32383.

Lavie, Y., Fiucci, G., Czarny, M., Liscovitch, M. (1999) Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells. *Lipids.* 34: S57-S63.

Lee, G., Schlichter, L., Bendayan, M., Bendayan, R. (2001) Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 204-212.

Loo, T.W., Clarke, D.M., (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J. Biol. Chem.* 276: 36877-36880.

Loo, T.W., Clarke, D.M., (2002) Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 277: 44332-44338.

Loo, T.W., Clarke, D.M., (2005) Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membrane Biol.* 206: 173-185.

Luker, G.D., Pica, C.M., Kumar, S.A., Covey, D.F., Piwnica-Worms, D. (2000) Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membranedomains. *Biochemistry.* 39: 7651-7661.

Mechetner, E.B., Roninson, I.B. (1992) Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5824-5828.

Mechetner, E.B., Schott, B., Morse, B.S., Stein, W.D., Druley, T., Davis, A.K., Tsuruo, T., Roninson, I.B., (1997) P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12908-12913.

Mountford, C.E., Wright, L.C. (1988) Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model. *Trends. Biochem. Sci.* 13: 172-177.

Nagy, H., Goda, K., Arceci, R., Cianfriglia, M., Mechetner, E., Szabó, G., (2001) P-glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. *Eur. J. Biochem.* 268: 2416-2420.

Nagy, H., Goda, K., Fenyvesi F., Bacsó, Zs., Szilasi, M., Kappelmayer, J., Lustyik, Gy., Cianfriglia, M., Szabó, G., (2004) Distinct groups of multidrug resistance modulating agents

are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 942-949.

Pastan, I., Gottesmann, M.M. (1991) Multidrug resistance. *Annu. Rev. Med.* 42: 277-286.

Quinton, P.M. (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol. Rev.* 79: S3-S22.

Ramu, A., Glaubiger, D., Weintraub, H. (1984) Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells. *Cancer Treat Rep.* 68: 637-41.

Regev, R., Assaraf, Y.G., Eytan, G.D. (1999) Membrane fluidization by ether, other anesthetics and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells. *Eur. J. Biochem.* 259: 18-24.

Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C., Higgins, C.F., (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2,5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem.* 272: 10685-10694.

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. (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* 20: 5615-5625.

Rosenberg, M.F., Kamis, A. B., Callaghan, R., Higgins, C.F., Ford, R.C., (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* 278: 8294-8299.

Samuels, B.L., Mick, R., Vogelzang, N.J., Williams, S.F., Schilsky, R.L., Safa, A.R., O'Brien, S.M., Ratain, M.J. (1993) Modulation of vinblastine resistance with cyclosporine: a phase I study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54: 421-9.

Santos, S.M., Weber, C.C., Franke, C., Müller, W.E., Eckert, G.P. (2007). Cholesterol: Coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 216-221.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol. Rev.* 86: 1179-1236.

Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2515-2520.

Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V. (2001) Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 276: 11653-11661.

Schinkel A.H., Arceci, R.J., Smit, J.J., Wagenaar, E., Baas, F., Dollé, M., Tsuruo, T., Mechetner, E.B., Roninson, I.B., Borst, B. (1993) Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. *Int. J. Cancer*. 55: 478-84.

Schinkel A.H., Smit, J.J.M., Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., Deemter, L., Mol, C.A.A.M., Valk, M.A., Robanus Maandag, E.C., Riele, H.P.J., Berns, A.J.M., Borst, P. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77: 491-502.

Schinkel A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A.A.M., Deemter, L. (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97: 2517-2524.

Schinkel, A.H., Jonker, J. W. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Del. Rev.* 55: 3-29.

Seelig, A. (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 251: 252-261.

Seelig, A., Landwojtowicz, E. (2000) Structure-affinity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 31-40.

Senior, A.E., Al-Shawi, M.K., Urbatsch, I.L. (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letter.* 377: 285-289.

Sharma, D.K., Brown, J.C., Choudhury, A., Peterson, T.E., Holicky, E., Marks, D.L., Simari, R., Parton, R.G., Pagano, R.E., (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3114-3122.

Sharom, F.J., Yu, X., Chu, J.W.K, Doige, C.A. (1995) Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 308: 381-390.

Sharom, F.J. (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* 160: 161-175.

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. (1999) Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems and intact cells. *Biochem. Pharmacol.* 58: 571-586.

Peihua, L., Ronghua, L., Sharom, F.J. (2001) Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators and dependence on bilayer phase state. *Eur. J. Biochem.* 268: 1687-1697.

Sharom, F.J. (2006) Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem. Cell. Biol.* 84: 979-992.

Sparreboom, A., Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A.H., Smit, J.W., Meijer, D.K.F., Borst, P., Nooijen, W.J., Beijnen, J.H., Telling, O. (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2031-2035.

Stillwell, W., Wassal, S.R., Dumaual, A.C., Ehringer, W.D., Browning, C.W., Jenks L.J. (1993) Use of merocyanine (MC540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1146: 136-144

Szakács, G., Váradi, A., Özvegy-Laczka, Cs., Sarkadi, B. (2008) The role of ABC transporter in drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADME-TOX). *Drug Discovery Today.* 13: 379-393.

Szakács, G., Annereau, J.P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K.J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G.D., Reimers, M., Weinstein, J.N., Gottesman, M.M. (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell.* 6: 129-137.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, N.C. (1987) Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7735-7738.

Thomas, H., Coley, H.M. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10(2): 159-165.

Troost, J., Albermann, N., Haefeli, W.E., Weiss, J. (2004a). Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 705-711.

Troost, J., Lindenmaier, H., Haefeli, W.E., Weiss, J., (2004b) Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug resistant cells. *Mol. Pharmacol.* 66: 1332-1339.

Urbatsch, I.L., Sankaran, B., Weber, J., Senior, A.E. (1995) P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J. Biol. Chem.* 270: 19383-19390.

Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Girolamo, F., Maiorano, E., Roncali, L., Bertossi, M. (2002) Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J. Histochem. Cytochem.* 50(12): 1671-1676.

Yahanda, A.M., Alder, K.M., Fisher, G.A., Brophy, N.A., Halsey, J., Hardy, R.I., Gosland, M.P., Lum, B.L., Sikic, B.I. (1992) Phase I trial of etoposide with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *Clin. Oncol.* 10: 1624-34.

Zhou, Y., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1999) The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 74-80.

## Közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák jegyzéke

1. **Fenyvesi F**, Fenyvesi É, Szenté L, Goda K, Bacso Zs, Bácskay I, Váradi J, Kiss T, Molnár É, Janáky T, Szabó G, Vecsernyés M. (2008) P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. Eur. J. Pharm. Sci. 34(4-5): 236-242. **IF: 3,127**
2. Goda K\*, **Fenyvesi F\***, Bacso Zs, Nagy H, Marian T, Megyeri A, Krasznai Z, Juhasz I, Vecsernyes M, Szabo G Jr. (2007) Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. J Pharmacol Exp Ther. 320 (1): 81-88. **IF: 4,003**
3. Nagy H, Goda K, **Fenyvesi F**, Bacso Zs, Szilasi M, Kappelmayer J, Lustyik G, Cianfriglia M, Szabo G Jr. (2004) Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. Biochem Biophys Res Commun. 315 (4): 942-949. **IF: 2,904**

\*A szerzők a közleményhez egyenlő arányban járultak hozzá.

### Az értekezéshez fel nem használt közlemények

1. Szilagyi A, **Fenyvesi F**, Majercsik O, Pelyvas IF, Bacsakay I, Feher P, Varadi J, Vecsernyes M, Herczegh P. (2006) Synthesis and cytotoxicity of leinamycin antibiotic analogues. J Med Chem. 49 (18): 5626-5630. **IF: 5,115**
2. Bacso Zs, Nagy H, Goda K, Bene L, **Fenyvesi F**, Matko J, Szabo G. (2004) Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. Cytometry A. 61(2): 105-116. **IF: 1, 601**
3. Kiss T., **Fenyvesi F.**, Pasztor N., Feher P., Varadi J., Kocsan R., Szenté L., Fenyvesi É., Szabo G., Vecsernyes M., Bacsakay I. (2007) Cytotoxicity of different types of methylated  $\beta$ -cyclodextrins and ionic derivatives, Die Pharmazie. 62(7): 557-558. **IF: 0,606**

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

## **8. Tárgyszavak**

Mutidrog rezisztencia, P-glikoprotein, UIC2 monoklonális antitest, xenotranszplantáció, koleszteroin, ATP, citotoxicitás

## **Keywords**

Multidrug resistance, P-glycoprotein, UIC2 monoclonal antibody, xenotransplantation, cholesterol, ATP, cytotoxicity

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Szabó Gábornak szakmai irányításáért és önzetlen segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Goda Katalinnak és Dr. Bacsó Zsoltnak, akiktől számtalan segítséget kaptam. Köszönöm továbbá a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi munkatársának a munkám során nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Vecsernyés Miklós, valamint a Gyógyszertechnológiai Tanszék valamennyi dolgozójának támogatását.

Köszönöm Feleséget, Szüleim és Családom szeretetét és kitartását, valamint azt, hogy erőt és biztatást adtak munkám végzéséhez.