

„XXXI. OTDK Biológia Szekció”

A multidrog rezisztencia kialakításáért felelős ABC transzporterek
és gyógyszermolekulák közötti kölcsönhatások tanulmányozása

Vaskó Balázs

Biológus Msc szakos hallgató, II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Solvo Biotechnológiai Zrt.

Témavezető: Dr. Kis Emese
SOLVO Biotechnológiai Zrt.

Konzulens: Dr. Rákhely Gábor
SZTE Biotechnológiai Tanszék



2012

Tartalmi összefoglaló

Az ABC (ATP-Binding Cassette) transzporterek membránkött proteinek, amelyek az egyik legnagyobb fehérjecsaládot alkotják és minden élő organizmusban megtalálhatók. Jelentőségük abban rejlik, hogy sokféle anyag biológiai membránokon keresztüli transzportját mediálják, így számos az élet számára nélkülözhetetlen folyamatban játszanak központi szerepet úgymint a szervezet mérgező vegyületekkel szembeni védekezésében, a sejtek tápanyag felvételében. Megtalálhatók a szervezet fontos fiziológiás, „barrier” funkciót ellátó szöveteiben, sejtjeiben, a vér-agy gátban, a gyomor-bél rendszerben, a máj-, vese- és epitélisejteken, a placentában és a testisben.

Egyik legjobban tanulmányozott funkciójuk az, hogy képesek befolyásolni a xenobiotikumok ADME-TOX (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity = felszívódás, eloszlás, lebomlás, kiválasztás, mérgező hatás) tulajdonságait, ezért a gyógyszerkutatás során már korai fázisban vizsgálják a gyógyszerjelölt vegyületek különböző transzporterekkel való kölcsönhatását.

A tumorsejtek az egészséges sejtekhez képest túltermelnek egy-, vagy többféle olyan ABC transzportert, amelyek az alkalmazott gyógyszert kipumpálják a sejtekből és ezzel megakadályozzák, hogy azok kifejtsék a hatásukat a sejt belsejében. Ezt a jelenséget hívjuk a tumorok multidrog rezisztenciájának, amely kialakulásában három ABC transzporter vesz részt: ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1) és ABCG2 (BCRP).

Kísérleteink során olyan indikációs területeken (daganatos, gyulladásos és autoimmun betegségek) alkalmazott gyógyszermolekulákat teszteltünk amelyeknél fellép a multidrog rezisztencia jelensége, célunk volt a még nem leírt kölcsönhatások karakterizálása.

Kulcsszavak: multidrog rezisztencia, ABCB1, ABCC1, ABCG2, citosztatikum

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az ABC transzporterek.....	5
2.2. A multidrog rezisztencia.....	7
2.3. A multidrog rezisztencia kialakításáért felelős transzporterek	8
2.3.1. MDR1 (ABCB1).....	8
2.3.2. MRP1 (ABCC1)	9
2.3.3. BCRP (ABCG2)	9
2.4. A transzporter–gyógyszer kölcsönhatások tanulmányozása során alkalmazott tesztrendszerek.....	10
2.4.1. Sejtes vizsgálati módszerek	11
2.4.2. Membránvezikula-alapú eljárások	13
3. Célkitűzések	14
4. Anyagok és módszerek	15
4.1. Tesztelt molekulák.....	15
4.2. Sejtenyésztes.....	16
4.3. Az ATPáz esszé kivitelezése	16
4.4. Áramlási citometria (FACS).....	19
4.5. A Calcein esszé kivitelezése	20
4.6. A Hoechst esszé kivitelezése	22
4.7. A citotoxicitás esszé kivitelezése.....	24
5. Eredmények és értékelésük	27
5.1. Citotoxicitási esszé eredmények	27
5.2. Eredmények ATPáz esszével.....	29
5.3. Festéktranszport esszével kapott eredmények	30
5.4. Transzporterek szerint csoportosított eredmények bemutatása	30
6. Összefoglalás	35
7. Függelék	36
8. Nyilatkozat	42
9. Irodalomjegyzék	43
10. Ábrák és táblázatok jegyzéke	51
11. Köszönetnyilvánítás	52

1. Rövidítések jegyzéke

ADME-TOX – felszívódás, eloszlás, lebomlás, kiválasztás, mérgező hatás (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity)

ABC – ATP-kötő egység (ATP binding cassette)

ATP – adenosin-trifoszfát

NBD – nukleotidkötő domén (nucleotide binding domain)

TMD – transzmembrán domén (transmembrane domain)

MDR – multidrog rezisztencia

MDR1 – multidrog rezisztencia fehérje

MRP1 – multidrog rezisztencia-asszociált fehérje 1

BCRP – emlőrák rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)

ABCC – az ABC transzporterek C alcsaládja

Calcein AM – calcein acetoxi-metilészter

LTC₄ – leukotrién C₄

IC₅₀ – 50%-os gátláshoz tartozó koncentráció (half maximal inhibitory concentration)

Sf9 sejt – *Spodoptera frugiperda* ovárium sejtvonal

ER – endoplazmatikus retikulum

CHO – kínai aranyhörcsög petefészeksejt (Chinese hamster ovary cell)

MHC – fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)

DMSO – dimetil szulfoxid

FBS – magzati borjúsvó (fetal bovine serum)

Pen-Strep – Penicillin-Streptomycin

FACS – áramlási citometria

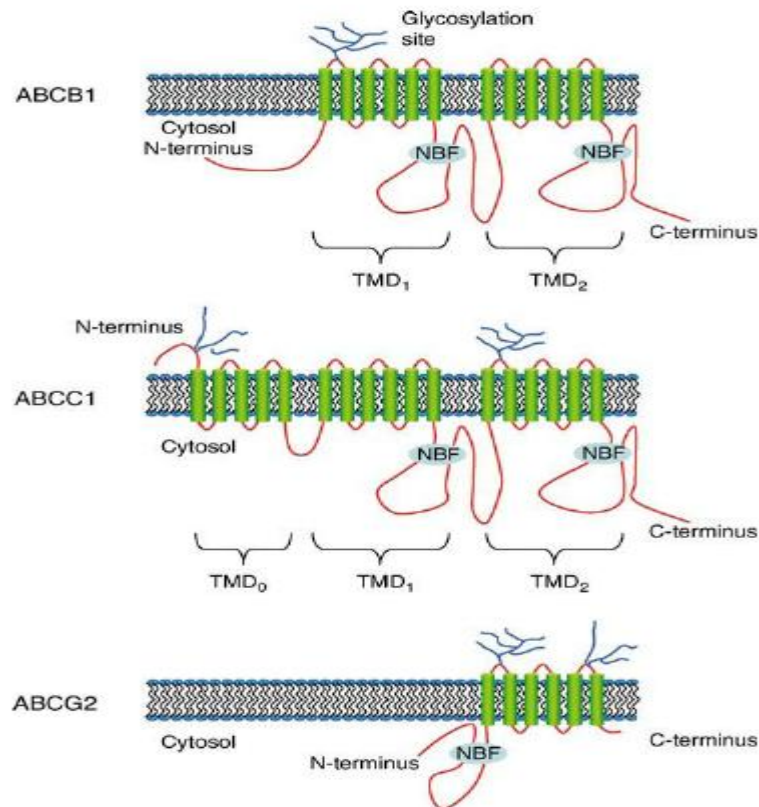
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az ABC transzporterek

Az ABC transzporterek alkotják az egyik legnagyobb fehérjecsaládot, a prokariótáktól az emberig minden élő organizmusban megtalálhatók. Nagyfokú konzerváltságuk a bizonyítéka annak, hogy az evolúció korai szakaszában jöttek létre és rendkívül fontos szerepet töltenek be az élő szervezetben. Jelentőségük abban rejlik, hogy sokféle anyag biológiai membránokon keresztüli transzportját mediálják, így számos az élet számára nélkülözhetetlen folyamatban játszanak központi szerepet. Emellett még részt vesznek a sejtek tápanyag felvételében, a mérgező vegyületekkel szembeni védekezésben, vegyületek kiválasztásában.

Az ATP hasításának energiáját felhasználva aktív transzporterként, ioncsatornaként vagy modulátorként vesznek részt a különböző szubsztrátok sejtből történő eltávolításában. Az általuk transzportált anyagok között elsősorban cukrok, aminosavak, kisebb peptidek, különféle sók, valamint kismolekulájú ($MW \sim 500\text{--}1000$) xenobiotikumok találhatók. Egyik legjobban tanulmányozott funkciójuk az, hogy képesek befolyásolni a xenobiotikumok ADME-TOX (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity = felszívódás, eloszlás, lebomlás, kiválasztás, mérgező hatás) tulajdonságait, ezért a modern gyógyszerek fejlesztése során már korai fázisban indokolt a gyógyszerjelölt vegyületek releváns transzporterekkel való kölcsönhatásának vizsgálata. Valamennyi eddig ismert ABC fehérjére jellemző, hogy membránasszociáltak, és működésük során ATP-t hidrolizálnak. E két tulajdonság szerkezeti alapjául a membránba ágyazódó transzmembrán domén (TMD), illetve az ATP megkötéséért felelős intracellurális nukleotidkötő domén (NBD) szolgál.

Megkülönböztetünk egész transzportereket amelyek 2 TMD-t és 2 NBD-t tartalmaznak, illetve féltranszportereket amelyek 1 TMD-ból és 1 NBD-ól épülnek fel [1. ábra]. A féltranszporterek kapcsolódhatnak azonos illetve más féltranszporterrel, előbbi esetben homodimer, utóbbinál heterodimer transzporterről beszélünk^{1,2}.



1. ábra Az ABC transzporterek szerkezete

Az ABC fehérjék citoplazmatikus nukleotidkötő doménjében 3 konzervált szekvenciát azonosítottak: a Walker A (GXXGXXGKS/T) és B (hhhhD) konszenzus szekvenciák, amelyek más ATP-t hasító fehérjékben is megtalálhatók, és az ún. „ABC-signature” szekvencia (LSGGQQ/R/KQR), amely csak az ABC fehérjékben található meg³. A lipofil transzmembrán domének struktúrája adja a háttérrel a funkció betöltéséhez. A közös szerkezeti séma alapján feltételezhető, hogy az ABC fehérjék hasonló mechanizmussal működnek. Az ABC fehérjék elsődlegesen aktív transzporterek, amelyek konformációja megváltozik az ATP hidrolíziséből nyert energia terhére és képesek anyagokat juttatni a membrán egyik oldaláról a másikra koncentráció gradiens ellenében.

Prokariótákban az ATP-kötő és a transzmembrán domének külön génekben kódolódnak, a fejlettebb eukariótákban viszont egész transzporterek esetében mind a négy, féltranszportereknél pedig mind a két domén együtt kódolódik egy nyitott leolvasási kereten belül. Eddig 49 humán ABC fehérjét kódoló gént írtak le, amelyeket a NBD-k és a TMD-k szekvencia homológiája alapján 7 alcsoportba soroltak. A nevezéktani anomáliák kiküszöbölése érdekében egységes nomenklatúrát vezettek be és az ABC fehérjéket A-tól G-ig nevezték el³.

2.2. A multidrog rezisztencia

Az ABC transzporterek családjának tagjai akkor kerültek a figyelem középpontjába, amikor felfedezték, hogy működésük zavara betegséghez vagy olyan állapothoz vezet, amely a betegség gyógyítását lassítja illetve megakadályozza. A legismertebb a tumorok multidrog rezisztenciája (MDR). Ez a jelenség nagymértékben megnehezíti egyes ráktípusok gyógyítását, ugyanis a tumorsejtek az egészséges sejtekhez képest túltermelhetnek egy-, vagy többféle olyan ABC transzportert, amelyek az alkalmazott gyógyszert kipumpálják a sejtekből és ezzel megakadályozzák, hogy azok kifejtsék a hatásukat a sejt belsejében⁴.

Erre a mechanizmusra az egyértelmű klinikai bizonyítékok még hiányoznak, de az egyértelmű, hogy az MDR transzporterek magas expressziója összekapcsolható a klinikai multidrog rezisztenciával. Az elnevezés onnan származik, hogy nemcsak a kiváltó ágenssel szemben alakul ki rezisztencia, hanem akár teljesen más szerkezetű, tulajdonságú molekulákkal szemben is rezisztens lesz az adott sejt a széles szubsztrátspecifitás következtében fellépő keresztrezisztencia miatt^{5,6,7,8}.

A ABCB1 (MDR1, P-glikoprotein, Pgp) mediált multidrog rezisztenciát fedezték fel először^{9,10,17} és valószínűleg még most is a legszélesebb körben tanulmányozott a klinikai multidrog rezisztencia területén^{5,6,7,8}. Nem sokkal az MDR1 klónozását és karakterizálását követően nyilvánvalóvá vált, hogy más efflux transzporterek is jelentős szerepet játszanak a transzport-függő drog rezisztenciában. Két másik ABC transzporterről bizonyosodott be, hogy szerepet játszanak a tumorok multidrog rezisztenciájának kialakulásában: ABCC1 (MRP1, multidrog rezisztencia-asszociált fehérje 1) és az ABCG2 (BCRP, emlőrák rezisztencia fehérje)^{8,11,12,13,14}. Az említett három fehérjén kívül 8-10 ABC transzporter képes a citosztatikumokat aktív módon kipumpálni a sejtekből, így bizonyos esetekben ezek is részt vehetnek a rezisztencia kialakításában^{15,16}.

2.3. A multidrog rezisztencia kialakításáért felelős transzporterek

2.3.1. MDR1 (ABCB1)

Az 1970-es években megfigyelték, hogy a kínai hörcsög ovárium epiteliális sejtek (CHO) kolhicinnel történt szelekciója után a sejtek nemcsak a kiváltó ágenssel szemben mutattak rezisztenciát, hanem egészen más szerkezetű molekulákkal szemben is¹⁷. Juliano és Ling 1976-ban fedezte fel az első ABC transzportert a rezisztens sejtekben, amelyet P-glikoproteinnak (P-gp, MDR1, ABCB1) neveztek el¹⁸. Ezt a transzporter nem tudták kimutatni a vad típusú sejtekben, tehát ez a szelekció eredményeképpen jelent meg és ennek volt köszönhető a megváltozott drogpermeabilitás. Shen és munkatársai 1986-ban kolhicinnel szelektált humán epidermoid karcinoma sejteket (KB) vizsgálva felfedezték, hogy a multidrog rezisztencia kialakulásával egyidejűleg megemelkedik az *mdr1* mRNS szintje és bizonyították, hogy az *mdr1* gén kódolja a ABCB1 (MDR1) fehérjét. Sikertelenül azonosítaniuk az ABCB1 két nukleozid-trifoszfát kötőhelyét és homológiát fedeztek fel az ABCB1 fehérje és számos bakteriális transzporterfehérje között^{19,20,21,22,23}. Hamada és kutatócsoportja bizonyította, hogy az ABCB1 ATP hidrolízisének energiáját felhasználva aktív transzporterként funkcionál²⁴. Schinkel és munkatársai 1994-ben *Mdr1a* knockout egereket hoztak létre. Ezek az egerek szaporodóképesek voltak és nem mutattak semmi rendellenességet, viszont ivermectinnel történt kezelés után -amely egy központi idegrendszerre toxikus peszticid- 100-szor érzékenyebbé váltak a vad típusú állatokhoz képest. A knockout egerek szöveteiben szignifikánsan magasabb ivermectin koncentrációt mutattak ki, mint a vad típusú egyedekben²⁵. Ez volt az első bizonyíték arra, hogy az ABCB1 részt vesz a szervezet toxikus anyagokkal szembeni védekezésében.

Az ABCB1 egész transzporter, olyan glikozilált protein, amely a sejtek apikális membránjában expresszálódik. Magas ABCB1 expressziót lehet kimutatni a vér-agy gát endotél sejtjeinek apikális membránjában, a placenta trophoblastban, a herében, a csontvelőben és a bélnyálkahártya sejtjeiben, ahol az a szerepe, hogy meggátolja a káros anyagok bejutását a szervezetbe. Ezenkívül szerepe van még a káros anyagok eltávolításában a bélben, májban és a vese sejtjeiben található ABCB1 fehérjéknek²⁶. Magas transzport kapacitása és széles szubsztrátfelismerő képessége van. Habár főként semleges/kationos hidrofób molekulákat transzportál²⁷, rákellenes gyógyszerek, HIV-proteáz gátlók, antibiotikumok, antidepresszánsok, antiepileptikumok és fájdalomcsillapítók is szubsztrátjainak bizonyultak²⁸. A fluoreszcens festékek közül a CalceinAM, a Rhodamine 123 (R123) és a Hoechst 33342 szintén az ABCB1 szubsztrátjai.

2.3.2. MRP1 (ABCC1)

Az ABCC alcsalád egyik legtöbbet tanulmányozott képviselője az ABCC1/MRP1 (Multidrog Resistance associated Protein 1) transzporter, amelynek fontos szerepe van a multidrog rezisztencia kialakításában. Az ABCB1 fehérje után ez volt a második transzporter, amelyet felfedeztek a multidrog rezisztenciával kapcsolatban^{29,30,31,32}. Az ABCC1 fehérjék a sejtek bazolaterális membránjában expresszálódnak³³. Különös tulajdonsága, hogy a legtöbb ABC transzportertől eltérően nem kettő, hanem három transzmembrán domént (TMD) tartalmaz. A kiegészítő TMD öt transzmembrán hélixet tartalmaz és N-terminálisan helyezkedik el^{34,35}.

Az MRP fehérjék organikus aniontranszporterként működnek, mert képesek számos gyógyszer metabolizmus során keletkező glutation-, glükuronát- és szulfát-konjugátumok eltávolítására, ezenfelül konjugátlan amfifil anionok szabad GSH-val történő együttes kotranszportjáért is felelősek. Az Mrp1 knockout egerek élet- és szaporodóképesek, de hiányosságokat mutatnak a Leukotrién C₄-mediált gyulladásos reakciókban, amelyből arra lehet következtetni, hogy ABCC1-nek szerepe van ennek a nagyon jelentős szignalizációs molekulának a szállításában is^{36,37,38}. Wijnhold és munkatársai írták le, hogy a choroid epitel sejtek bazolaterális membránjában expresszálódó ABCC1 transzporterek védik a cerebrospinális folyadékot (CSF) a xenobiotikumokkal szemben³⁹.

2.3.3. BCRP (ABCG2)

A ABCG2 az egyik legfontosabb efflux transzporter az endotél és epitel sejtekben, amelyek képesek szabályozni a különböző gyógyszermolekulák és xenobiotikumok ADME-TOX tulajdonságait⁴⁰. A 90-es évek végén három laboratórium egymástól függetlenül azonosította az ABCG2 molekulát. Két helyen drogszelektált sejtvonalból, a harmadik helyen pedig humán cDNS könyvtárból^{41,42,43}. Mindhárom helyen más nevet adtak az újonnan felfedezett fehérjének. Doyle csoportja rezisztens emlőrák sejtvonalból azonosította és ezért BCRP-nek (breast cancer resistance protein) nevezte el, Allikmets csoportjának verapamillal blokkolt ABCB1 funkciójú mitoxantronra rezisztens sejtvonalból sikerült az azonosítás, így MXR-nek (mitoxantrone resistance protein) nevezték el, míg Miyake csoportja ABCP-nek írta le, mivel a placentában expresszálódott magas szinten. Hamarosan kiderült, hogy csak az Allikmets kutatócsoportja által izolált

protein vad típusú, a másik két csoport által izolált fehérje a 482-es pozícióban glicint tartalmaz és ez a pontmutáció hatással van a transzporter szubsztrátspecifitására.

Az ABCG2 féltranszporter, amely homodimerizációt követően válik funkcióképes fehérjévé⁴⁴ és a sejtek plazmamembránjában lokalizálódik⁴⁵. Széles szubsztrátspecifitással rendelkezik, egyaránt képes hidrofób, anionos és kationos molekulák transzportjára⁴¹. Meghatározó szabályozó szerepe van a metabolitok és xenobiotikumok felszívódásában⁴⁶, májban a szulfát konjugátumok szekréciójában⁴⁷, vesében a szulfát konjugátumok kiválasztásában⁴⁸ és megakadályozza, hogy a xenobiotikumok bejussanak az agyba^{49,50}. Az ABCG2 transzporternek jelentős szerepe van a xenobiotikumok anyatejbe való kiválasztásában⁵¹, valamint a placentában is magas az expressziója így védi a magzatot a toxikus anyagoktól és csökkenti a szteroid szintet a magzati szövetekben⁵². Az ABCB1 és ABCC1 transzporter mellett a ABCG2 is felelős a tumorterápia során kialakuló rezisztenciáért^{3,53}.

2.4. A transzporter–gyógyszer kölcsönhatások tanulmányozása során alkalmazott tesztrendszerek

A szervezetbe bejutó gyógyszermolekulák, xenobiotikumok és toxikus anyagok ABC transzporterekkel való kölcsönhatását *ex vivo*, *in vivo* és *in vitro* módszerekkel lehet tanulmányozni és így információt kaphatunk a vizsgált molekulák ADME-TOX tulajdonságairól. Az efflux transzportereknek jelentős szerepe van a farmakokinetikai vizsgálatokban.

Az *ex vivo* modellek közé tartozik például a perfúziós agy, máj és vese, melyek használatával információkat kaphatunk a xenobiotikumok ADME tulajdonságairól.

Az *in vivo* módszerek közé soroljuk például a transzgénikus vagy a knock-out állatokon végrehajtott kísérleteket illetve a mikrodialízis eljárást. A knock-out modellek esetében kiütik a vizsgálni kívánt transzporter génjét és megfigyelik, hogy ez milyen fiziológiai változásokat eredményez. *In vivo* vizsgálatokat vad típusú állatokon specifikus gátlók alkalmazásával lehet transzporter-specifikussá tenni. A mikrodialízis-technika olyan *in vivo* módszer, amely lehetővé teszi különböző szövetek intersticiális állományának kémiai elemzését, így egy adott gyógyszermolekula koncentrációjának a vérben és az agykéreg extracelluláris terében történő követését is. A szimultán végzett vénás és agyi mikrodialízis alkalmas a tesztanyag vér-agy gáton történő

áthatolóképességének elemzésére, illetve a molekulák agyi szintjének aktív csökkentéséért felelős efflux transzportereket befolyásoló kölcsönhatások észlelésére is⁵⁴.

Az *in vitro* eljárások két nagyobb csoportba oszthatók, egyik az egész sejttes módszerek, másik pedig az adott transzportert túlexpresszálo sejtekből készült membránpreparátumokon végzett kísérletek.

Az *in vivo* eljárások nagy előnye, hogy az élő szervezetben lejátszódó folyamatokhoz nagyon hasonló környezetben teszi lehetővé a vizsgálatokat, ezzel szemben az *in vitro* technikák egy leegyszerűsített modellt alkotnak. A gyógyszerfejlesztés korai szakaszában az *in vitro* technikákat alkalmazzák, mert nagyobb az áteresztőképességük és költséghatékonyabbak, mint az *in vivo* technikák. Az *in vitro* módszerek további előnye, hogy humán fehérjék is vizsgálhatók, illetve fajspecifitás vizsgálatok végezhetők rajtuk.

A következőkben a kísérletek során alkalmazott *in vitro* módszerek kerülnek bemutatásra.

2.4.1. Sejtes vizsgálati módszerek

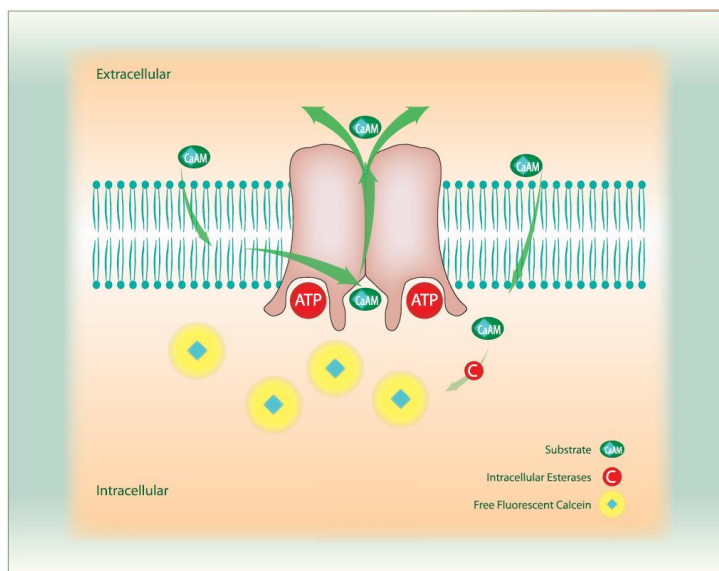
Festéktranszport esszék

A festéktranszport esszék működési elve az, hogy a gátlószerek vagy az ABCB1, ABCC1 illetve az ABCG2 transzportálódó szubsztrátjai módosíthatják a festék felhalmozódását a sejt belsejében. Az ABCG2 esetében Hoechst 33342, ABCB1 és ABCC1 estében calcein AM prekursorz adnak a sejtekhez.

Calcein esszé

A calcein AM hidrofób, nem-fluoreszcens molekula, amely könnyen át tud jutni a sejtmembránon. Azt követően, hogy bejutott a sejtbe, az intracelluláris calcein AM-et endogén észterázok hidrolizálják calceinné [2. ábra]. Az így keletkező calcein hidrofil tulajdonságú és csapdázódik a citoplazmában, mert a sejtmembrán már átjárhatatlan számára. Az esszé alapja az, hogy a calcein-AM szubsztrátja az ABCB1-nek és az ABCC1-nek. A kísérlet során a termelődő szabad fluoreszcens molekula mennyiségét fluoriméter segítségével detektáljuk. Az ABCB1 és ABCC1 kölcsönható molekulái gátolják a kifelé irányuló transzportot és csökkentik a kijuttatott festék mennyiségét. Így az intracelluláris calcein koncentráció megemelkedik és nő a fluoreszcencia intenzitása. Ez egy közepes áteresztőképességű rendszer, amely alkalmas a fejlesztés alatt álló

gyógyszermolekulák és a transzporter kölcsönhatásának vizsgálatára. Mivel az ABC fehérjék efflux transzportot végeznek, a vizsgálni kívánt gyógyszermolekuláknak be kell jutniuk a sejten belülre, hogy kapcsolatba lépjenek a transzporterrel, de azok a molekulák, amelyeknek kicsi a membrán permeabilitásuk nem képesek bejutni, ezért nem tapasztalható kölcsönhatás⁵⁵.



2. ábra: A calcein esszé működési elve

Hoechst esszé

A Hoechst 33342 membránon átjutó DNS-festék, amely preferenciálisan a DNS AT bázispárjaihoz köt. Minél több az AT-pár, annál több festék kötődik be és annál intenzívebb lesz a fluoreszcens jel. A Hoechst esszé ugyanazon az elven működik, mint a calcein esszé. A festékmolekula, amely bejut a sejt belsejébe, az ABCG2 transzporter kiváló szubsztrátja. Az ABCG2-t túlexpresszálo sejtek drog-transzporter kölcsönhatás esetén aktív transzporttal kipumpálják a hoechst-öt.

Citotoxicitás esszé

A citotoxicitás esszé lehetővé teszi xenobiotikumok, citosztatikumok és gyógyszermolekulák tesztelését élő sejteken. A vizsgálni kívánt transzportert túlexpresszálo sejtek abban az esetben, ha a drog szubsztrátja az adott transzporternek magasabb drog koncentrációt képesek tolerálni, mint a vad típusú, kontroll sejtek. A drog-transzporter kölcsönhatás IC_{50} értékkel jellemezhető, amely megadja azt a drog koncentrációt, amelynél a sejtek 50%-a életképes. Az élő sejtek arányának meghatározására számos módszer áll rendelkezésre; alapulhat pl. a sejtmembrán

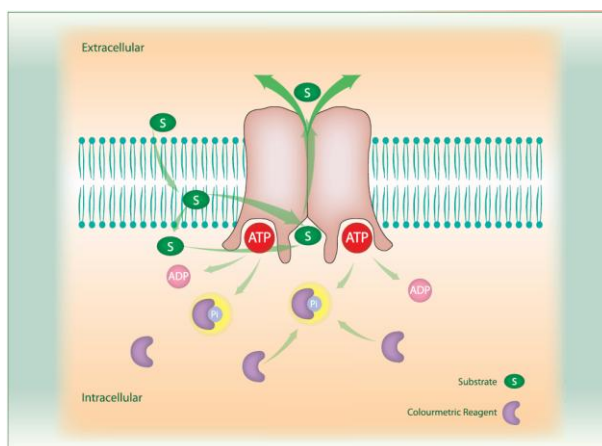
intaktságának vizsgálatán (propidium-jodid, trypan-kék), a mitokondriális enzimek működésén (resazurin, formazan), illetve különböző funkcionális alapokon.

2.4.2. Membránvezikula-alapú eljárások

A membránvezikula-alapú eljárások esetében nem egész sejteket, hanem a vizsgálni kívánt transzportert túlexpresszálo sejtekből származó membránvezikulákat használunk.

ATPáz esszé

Az ABC transzporterek az ATP hidrolíziséből származó energiát használják fel arra, hogy a szubsztrátjaikat kipumpálják a sejtéből. Ezen hidrolízis eredményeképp anorganikus foszfát (P_i) keletkezik, amely detektálható egy egyszerű kolorimetriás reakció segítségével [3. ábra]. A hidrolízis következtében felszabaduló foszfát mennyisége arányos a transzporter protein aktivitásával. Minden membránpreparátum tartalmaz más ATPáz molekulákat is, nem csak a kívánt transzportereket. Fontos megkülönböztetni a specifikus ABC transzporterekhez köthető ATPáz aktivitást és a nem specifikus aktivitást. Az ABC transzporterek specifikusan gátolhatók nátrium-ortovanadáttal, ezért a transzporter aktivitás meghatározható, mint a teljes ATPáz aktivitás vanadát érzékeny része. Mind aktiválási, mind gátlási tesztet is lehet ezzel a módszerrel végezni: az aktiválás a kölcsönható szubsztrát jelenlétében bekövetkező ATPáz aktivitás növekedésében jelenik meg, a gátlás pedig egy ismert aktiválószerrel kiváltott ATPáz aktivitás gátlásában. Ha a gátlási tesztben észlelünk kölcsönhatást, az nem ad egyértelmű felvilágosítást arról, hogy a tesztanyag a transzporter valódi gátlószere, vagy egy lassan transzportált szubsztrátja.



3. ábra: Az ATPáz esszé működési elve

3. Célkitűzések

Kísérleteink során olyan indikációs területen (daganatos megbetegedések) alkalmazott gyógyszermolekulákat teszteltünk sejtes és membránvezikula-alapú eljárásokkal, amelyeknél fellép a multidrog rezisztencia jelensége.

Célunk volt egyrészt a korábban már ugyan leírt, de nem pontosan karakterizált kölcsönhatások jellemzése kinetikai paraméterek megadásával. Másrészt kiválasztásra került néhány olyan molekula is, amelyek ABC transzporterekkel való kölcsönhatása még nem ismert.

A multidrog rezisztencia nagymértékben megnehezíti a rák gyógyítását, ugyanis a tumorsejtek az egészséges sejtekhez képest túltermelnek egy-, vagy többféle olyan ABC transzportert, amelyek az alkalmazott gyógyszert kipumpálják a sejtekből és ezzel megakadályozzák, hogy azok kifejtsék hatásukat a sejt belsejében

4. Anyagok és módszerek

4.1. Tesztelt molekulák

A dolgozat során vizsgált molekulákat, azok permeabilitási paramétereit és a szakirodalomban leírt efflux transzporterekkel való kölcsönhatásait az 1. táblázat foglalja össze. A Lipofilitás (logP) oszlopban ChemAxon Molconvert programmal kalkulált logP értékek lettek feltüntetve.

Molekulák	Lipofilitás (logP)	Efflux transzporter
Carboplatin	1,06	-
Camptothecin	1,22	MDR1 szubsztr, BCRP szubsztr + inhib
Cyclophosphamid	0,1	MRP1 szubsztr
Cisplatin	0	MDR1 szubsztr
Dacarbazine	-0,43	-
Daunorubicin	1,67	MDR1 szubsztr + inhib, MRP1, BCRP szubsztr
Doxorubicin	0,86	MDR1, MRP1, BCRP szubsztr
Etoposide	1,16	MDR1, MRP1, BCRP szubsztr
Hydroxiurea	-1,37	-
Melphalan	0,12	(csak a glutation konj.melphalan MRP1 szubsztr)
Mitoxantrone	1,17	MDR1, MRP1, BCRP szubsztr
Tamoxifen	6,35	MDR1, BSEP inhib, BCRP szubsztr + inhib
Taxol	3,54	MDR1 szubsztr + inhib, MRP1, BSEP szubsztr + inhib
Topotecan	-0,55	MDR1, BCRP szubsztr
Vinblastine	4,18	MDR1 szubsztr + inhib, MRP1 szubsztr + inhib
Vincristine	3,13	MDR1 szubsztr +inhib, MRP1 szubsztr + inhib
Methotrexate	-0,51	MRP1, BCRP szubsztr
Cytarabine	-2,8	-
Thioguanine	-0,35	-
Fludarabine	-3,97	-
Chlorambucil	3,94	(csak a glutation konj. chlorambucil MRP1 szubsztr)
Clofarabine	-0,29	-
Pixantrone	-	-

1. táblázat: A dolgozat során tesztelt molekulák listája

4.2. Sejttenyésztés

A membránvezikula-alapú eljárások során a vizsgálni kívánt ABC transzporter génjét tartalmazó bakulovírussal fertőzött *Spodoptera frugiperda* rovarsejtekből nyert membrán preparátumokat használtunk, míg a sejtes vizsgálati módszerek során az adott ABC transzportert kifejező sejtvonalakat.

Mind a HL60-MDR, MRP, CTRL; PLB985-BCRP, CTRL sejteket és a membrán preparátumokat a Solvo Zrt. bocsátotta rendelkezésünkre. A HL60-MDR és HL60-MRP sejtek MDR1 illetve MRP1 transzporterek túlexpresszáására szelektált humán leukémia sejtvonalból, míg a PLB985-BCRP sejtek myelomonoblastos leukémia sejtvonalból származnak. A kontroll sejtek drogszelekció nélküli, ABC transzportert nem túlexpresszáló sejtek. Sejtfelvétel során a sejteket a folyékony N₂ tartályból történt kivétel után 37 °C-os vízfürdőben felolvasztottuk és 2000 RPM-en, szobahőn, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó leszívását követően a pelletet tápfolyadékkal felfuszpendáltuk és 75 cm² –es műanyag sejttenyésztő flaskában tenyésztettük. A sejtek növekedéséhez az optimális környezet 37 °C és 5% CO₂ tartalom, melyet a CO₂ inkubátorban tudunk biztosítani számukra. A sejteket hetente 2-3 alkalommal passzáltuk, a passzálas során megszámloltuk és 300 000-400 000-et tettünk vissza a flaskába, majd felöntöttük 20-30 ml friss tápoldattal. Mind az öt sejtvonal tenyésztéséhez Advanced RPMI tápoldatot használtunk, amelyet 10% FBS-sel, 1 % L-glutaminnal és 0,5 % Pen-Strep antibiotikummal egészítettünk ki.

4.3. Az ATPáz esszé kivitelezése

Az ATPáz esszéket tisztított, az adott ABC transzportert túlexpresszáló membránpreparátumokon végeztük a SOLVO Biotechnológiai ZRt. PREDEASYTM ATPase Kit protokoll alapján. Az abszorbancia értékekből meghatározható a foszfát mennyisége ismert mennyiségű foszfátot tartalmazó oldatok mérési adataiból előállított kalibrációs egyenessel. Az anorganikus foszfát nem csak az aktív transzporter szubsztrát jelenlétében történő ATP hidrolíziséből származhat, hanem előfordulhat, hogy az MgATP oldatban, vagy a membránszuspenzióban volt jelen szennyeződés következtében. Ennek elkerülése végett a minták feléhez Na-ortovanadátot kell adni, amely ADP-vel együtt

kapcsolódik a transzporterek ATP-kötő helyéhez, ezáltal megakadályozza az ATP kötődését és hidrolízisét⁵⁶. Az ezekben a mintákban mért értékeket ki kell vonni a vanadátmentes közegben mért értékekből, mivel azok nem a transzporter aktivitásához köthetők és így megkapjuk a transzporter működése során keletkező foszfátmennyiséget. Ebből az értékből kiszámítható a transzporter aktivitása oly módon, hogy a kapott foszfátmennyiséget elosztjuk a reakcióidővel és a lyukankénti fehérjemennyiséggel, így nmol Pi/mg protein/perc mértékegységben kapjuk meg eredményt.

Az ATPáz esszé végrehajtásához az alábbi anyagok szükségesek (2. táblázat):

Anyagok	Koncentráció	Tárolás
Membrán	-	-80 °C
10×Medium	-	-80 °C
Foszfát-oldat	0,4 mM	≤-20 °C
Foszfát-oldat	0,8 mM	≤-20 °C
Na-ortovanadát	600 mM	≤-20 °C
Referencia szubsztrát	-	-
3×Előhívó	-	≤-20 °C
10×Stabilizáló	-	≤-20 °C
Referencia inhibitor	-	-
MgATP-oldat	0,2 mM	≤-20 °C

2. táblázat: Az ATPáz esszéhez szükséges anyagok listája

A kivitelezés főbb lépései:

1. Esszémix elkészítése
2. A tesztanyagok törzsoldataiból kiindulva 8 lépcsős, 3-szoros hígítási sort készítettünk DMSO-ban. A reakcióelegybe 1-1 µl-t kell tenni a tesztanyagokból.
3. Membránsuszpenzió elkészítése esszémixben
4. Az elkészült membránsuszpenzió kettéosztása, majd a gátlási esszéhez tartozó membránsuszpenzióhoz a referencia szubsztrát hozzáadása.
5. Mindkét membránsuszpenzió kettéosztása és az egyik feléhez Na-ortovanadát hozzáadása. A membránsuszpenziók kiosztása 96-lyukú mikrotiter lemezre a 4. ábrán feltüntetett elrendezésben.
6. Foszfát kalibráció, majd a négyféle kontroll elkészítése.

7. A tesztdrogok hozzáadása az 5-12. oszlopokba.
8. Előinkubálás 37 °C-on, majd az Mg ATP oldat hozzáadásával a reakció elindítása
9. Inkubálás 37 °C-on, majd a reakció leállítása az előhívó hozzáadásával.
10. Stabilizálószer hozzáadása, majd inkubálás 37 °C-on.
11. A képződött foszfát-komplex abszorpciójának mérése spektrofotométerrel 620 nm hullámhosszon.
12. Eredmények kiértékelése a kapott OD értékekből a foszfát kalibráció felhasználásával.

Az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 transzportereket túlexpresszálo membránvezikulákkal végzett ATPáz esszék az alábbiakban különböznek egymástól (3. táblázat):

Transzporter	Alkalmazott membrán mennyiség (µg/lyuk)	Inkubációs idő (perc)	Szubsztrát próba (koncentráció)	Referencia inhibitor (koncentráció)
ABCB1	4	10	verapamil (40 µM)	cyclosporine A (40 µM)
ABCC1	8	10	NEM-GS (10 mM)	benzbromarone (100 µM)
ABCG2	4	10	sulfasalazine (10 µM)	Ko134 (1 µM)

3. táblázat: A három transzporterrel végzett kísérletek paramétereit összefoglaló táblázat

Plate térkép	Kontrollok				tesztdrog (µM)		tesztdrog (µM) + vanadát		tesztdrog (µM) + aktivátor		tesztdrog (µM) + aktivátor + vanadát	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vak				200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
B	4 nmol Pi				66,67	66,67	66,67	66,67	66,67	66,67	66,67	66,67
C	8 nmol Pi				22,22	22,22	22,22	22,22	22,22	22,22	22,22	22,22
D	Kontroll 1				7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41
E	Kontroll 2				2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47
F	Kontroll 3				0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
G	Kontroll 4				0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
					0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09

Vak	Esszé mix + 10 µl desztillált víz
4 nmol Pi	Esszé mix + 10 µl 0.4 mM Pi
8 nmol Pi	Esszé mix + 10 µl 0.8 mM Pi
Ctrl1	Membrán szuszpenzió + 1 ul oldószer
Ctrl2	Membrán szuszpenzió + vanadát (1.2 mM) + 1 ul oldószer
Ctrl3	Membrán szuszpenzió + aktivátor + 1 ul oldószer
Ctrl4	Aktivált membrán szuszpenzió + vanadát (1.2 mM) + 1 ul oldószer
	Membrán szuszpenzió + 1 ul teszt drog a drog plate-ről
	Membrán szuszpenzió + vanadát + 1 ul teszt drog a drog plate-ről
	Aktivált membrán szuszpenzió + 1 µl teszt drog a drog plate-ről
	Aktivált membrán szuszpenzió + vanadát + 1 ul teszt drog a drog plate-ről

5.ábra Az ATPáz esszéhez szükséges mikrotiter lemez felépítése

Az ATPáz esszével kapott eredmények kiértékelésének módja

Az alkalmazott foszfát kalibráció felhasználásával meghatározható, hogy a mért OD értékek hány nmol foszfátnak felelnek meg. A felhasznált membránfehérje mennyiségének és az inkubációs időnek az ismeretében az aktivitás meghatározható nmol foszfát/mg fehérje/perc mértékegységben. Ezt a tesztelt molekula koncentrációjának függvényében lehet ábrázolni. A kontroll 1 és kontroll 2 különbsége adja a vanadát érzékeny ATPáz aktivitást, míg a kontroll 3 és kontroll 4 különbsége a transzporter vanadát érzékeny maximális ATPáz aktivitását.

4.4. Áramlási citometria (FACS)

A multidrog rezisztenciában részt vevő transzporterek (ABCB1, ABCC1, ABCG2) aktivitásának vizsgálatát a Solvo MDQ kittel (Solvo Biotechnológiai ZRt. Szeged) a gyártói utasításnak megfelelően végeztük el. Az áramlási citometriás méréseket egy Partec CyFlow space áramlási citométeren végeztük. Az adatgyűjtést az előre és oldalirányba történő szórás, valamint az elhalt sejtek propidium-jodiddal (PI) történő festődése alapján 20 000 élő sejtre korlátoztuk. A FACS méréseket a citotoxicitás, Calcein és Hoechst esszék elvégzése előtt kontrollként végeztük, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a sejtek megfelelő mértékben expresszálják az adott ABC transzportert. A sejtes esszéket akkor végeztük el, ha a FACS mérés eredményeként a HL-60 MDR sejtek esetében a MAF érték nem volt kisebb, mint 95; HL-60 MRP-nél 50 és PLB985-BCRP esetében 60.

4.5. A Calcein esszé kivitelezése

A Calcein esszé méréseket HL60-MRP és HL60-MDR sejteken végeztük a SOLVO Biotechnológiai Zrt. Calcein esszé protokollja alapján. Az esszéhez szükséges anyagok listája alább látható:

Anyagok	Koncentráció	Tárolás
Calcein AM	100 μ M	-20 °C
BSA	10mg/ml	4 °C
Verapamil	60 μ M	szobahőmérséklet
DMSO	-	szobahőmérséklet
10xHBSS	-	4 °C
MilliQvíz	-	szobahőmérséklet

4. táblázat: A Calcein esszéhez szükséges anyagok listája

A kivitelezés fontosabb lépései:

1. Verapamil és kontroll hígítási sor, valamint a vizsgálandó molekulákból 8 lépcsős hígítási sor készítése DMSO-ban.
2. Calcein AM és BSA oldatok összeállítása
3. Sejtek centrifugálása 1500 rpm, 5 perc, 25 °C paraméterekkel és visszavétele 1x Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) oldatban.
4. Centrifugálás az előző kondíciókkal és a 1×10^6 /ml sejtkoncentráció beállítása 1x-es HBSS-sel.
5. A 96-lyukú mikrotiter lemez minden lyukába 100 μ l sejtszuszpenzió pipettázása.
6. A tesztanyagból illetve a verapamil és kontroll hígítási sorból 2 μ l pipettázása a megfelelő lyukakba, a plate térképen ábrázoltaknak megfelelően [5.ábra]

	Verapamil	Kontrollok	Tesztanyagok									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	60 μ M	60 μ M Ver	A tesztelendő anyagok 8 lépcsős 3-szoros hígítási sora, A-tól H-ig csökkenő koncentrációban.									
B	20 μ M	60 μ M Ver										
C	6.6 μ M	60 μ M Ver										
D	2.2 μ M											
E	741 nM											
F	246 nM											
G	82 nM	DMSO										
H	DMSO	DMSO										

5. ábra A Calcein esszéhez használt lemez térkép

7. Plate inkubálása 37 °C-on 15 percig.
8. Festékkoldat elkészítése 1x-es HBSS, BSA és CalceinAM felhasználásával.
9. Az inkubációs idő letelte után 100 μ l festékkoldat hozzáadása a lemez mindegyik lyukához.
10. A fluoreszcencia mérése 8 percen keresztül minden 60 másodpercben 485 nm excitációs és 538 nm emissziós hullámhosszon fluoriméterrel.
11. Az adatok kiértékelése a protokollhoz mellékelt Microsoft Excel kiértékelő fájlal történik.

A Calcein esszével kapott eredmények kiértékelésének módja

A kiértékelésnél az egyes időpontokban mért fluoreszcencia értékeket ábrázoljuk az idő függvényében és meghatározzuk az egyes koncentrációkhoz tartozó fluoreszcencia görbék meredekségét.

MAF: a transzportert expresszáló sejtekben inhibitor vagy más szubsztrát jelenléte nélkül is halmozódik fel calcein. Az ezt ábrázoló görbe meredeksége az esszé alapértéke, amelyet 0%-nak veszünk (R_{base}), míg a 60 μ M verapamil mellett mért calcein felhalmozódást ábrázoló görbe meredekségét (R_{ver}) vesszük 100 %-nak. A MAF értéket a maximális calcein felhalmozódáshoz normalizált különbség adja meg [6. ábra].

$$MAF = \frac{R_{ver} - R_{base}}{R_{ver}} * 100$$

6. ábra A MAF érték meghatározásához használt képlet

Alap calcein felhalmozódásnak hívjuk azt a folyamatot, amikor a transzportert expresszálo sejtekben halmozódik fel a calcein. Ez az érték a kontrollt tartalmazó lyukakból állapítható meg. A maximális calcein felhalmozódás a 60 µM-os verapamil tartalmazó lyukakból számítható, ahol a verapamil teljesen legátolja a transzportert és a calcein nem távozik el a sejtekből. Minden kísérlet során szükséges megállapítani a sejtek verapamil érzékenységét.

A gátlószert nélkül (R_{base}), a 60 µM verapamil mellett (R_{ver}) és a vizsgálni kívánt gyógyszerrel (R_{drug}) meghatározott görbék meredekségeiből meghatározható a százalékos gátlás az alábbi képlet szerint [7. ábra]:

$$\% \text{ gátlás} = \frac{R_{drug} - R_{base}}{R_{ver} - R_{base}} * 100$$

7. ábra Százalékos gátlás kiszámításának képlete

A vizsgálandó szer jelenlétében kapott meredekség (R_{drug}) elvileg kisebb, vagy egyenlő, mint a 100% gátlásnak megfelelő R_{ver} , és R_{drug} mindig nagyobb vagy egyenlő, mint R_{base} , ezért a gátlás mértéke (%gátlás) várhatóan 0% és 100% közé esik.

4.6. A Hoechst esszé kivitelezése

A Hoechst esszé méréseket PLB985-BCRP sejteken végeztük a SOLVO Biotechnológiai Zrt. Hoechst esszé protokollja alapján. Az esszéhez szükséges anyagok listája:

Anyagok	Koncentráció	Tárolás
Hoechst 33342	10 mM	-20 °C
Ko134	100 µM	-20 °C
DMSO	-	szobahőmérséklet
10xHBSS	-	4 °C
MilliQvíz	-	szobahőmérséklet

5. táblázat: A Hoechst Az esszéhez szükséges anyagok listája

A kivitelezés fontosabb lépései:

1. Ko134 és kontroll hígítási sor, valamint a vizsgálandó molekulákból 8 lépcsős hígítási sor készítése DMSO-ban.
2. 10 mM-os Hoechst oldat elkészítése
3. Sejtek centrifugálása 1500 rpm, 5 perc, 25 °C paraméterekkel és visszavétele 1x Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) oldatban.
4. Centrifugálás az előző kondíciókkal és 5×10^6 /ml sejtkoncentráció beállítása 1x-es HBSS-sel.
5. A 96-lyukú mikrotiter lemez minden lyukába 50 μ l 1x-es HBSS pipettázása.
6. A tesztanyagból illetve a Ko134 és kontroll hígítási sorból 2 μ l pipettázása a megfelelő lyukakba, a plate térképen ábrázoltaknak megfelelően [8. ábra].

	Ko134	Controls	Tesztanyagok									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 μ M	1 μ M KO	A tesztelendő anyagok 8 lépcsős 3-szoros hígítási sora, A-tól H-ig csökkenő koncentrációban.									
B	333 nM	1 μ M KO										
C	111 nM	1 μ M KO										
D	37 nM											
E	12.3 nM											
F	4.12 nM											
G	1.37 nM	DMSO										
H	DMSO	DMSO										

8. ábra A Hoechst esszéhez használt lemez térkép

7. A 96-lyukú mikrotiter lemez minden lyukába 100 μ l sejtszuszpenzió pipettázása.
8. Plate inkubálása 37 °C-on 30 percig.
9. Festékoldat elkészítése 1x-es HBSS és 10mM-os Hoechst felhasználásával.
10. Az inkubációs idő letelte után 50 μ l festékoldat hozzáadása a lemez mindegyik lyukához.
11. A fluoreszcencia mérése 15 percen keresztül minden 60 másodpercben 355 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon spektrofotométerrel.

12. Az adatok kiértékelése a protokollhoz mellékelt Microsoft Excel kiértékelő fájlal történik.

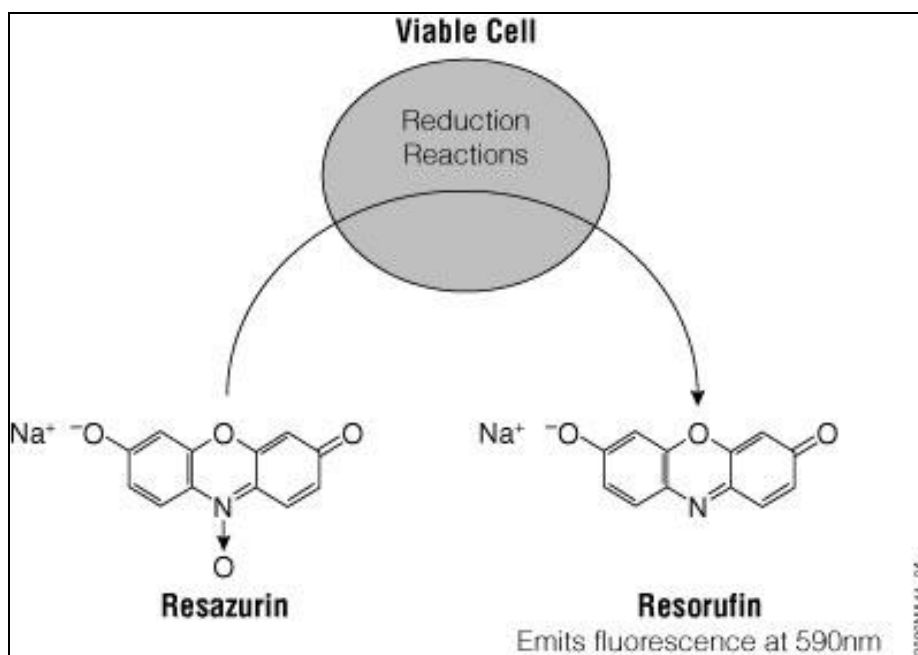
A Hoechst esszével kapott eredmények kiértékelésének módja

A Hoechst 33342 molekula a BCRP transzportert expresszáló sejtekben inhibítor jelenléte nélkül is felhalmozódik kis mennyiségben és ez jelenti az esszé háttérét. Ko134 inhibítort alkalmazva a BCRP teljes mértékben gátolható és ily módon nem képesek a festéket aktív transzporttal kipumpálni a sejtéből, ebben az esetben beszélünk maximális Hoechst akkumulációról. Ko134 gátlási görbét is szükséges készíteni, hogy meghatározhassuk, a sejtek hogyan reagálnak különböző koncentrációban adagolt inhibítorokkal szemben. Az esszé alapvonalát (R_{base}) a gátlószer nélküli minták görbéinek meredeksége, a maximális jelet (R_{max}) az 1 μM -os Ko134-el legátolt minták görbéinek meredekségei adják. A relatív gátlás értékének kiszámítása a Calcein esszénél leírtak alapján történik.

4.7. A citotoxicitás esszé kivitelezése

A citotoxicitás esszé olyan eljárás, amely xenobiotikumok, citosztatikumok és gyógyszermolekulák élő sejtek viabilitására gyakorolt hatását vizsgálja. Az adott molekula hígítási sorának alkalmazásával meghatározható IC_{50} érték azt a drog koncentrációt jelenti, amelynél a sejtek 50%-a életben marad. A transzporter-drog kölcsönhatás esetén a kontroll és az adott ABC transzportert túlexpresszáló sejtvonalak IC_{50} értékei között jelentős különbségek lehetnek, mert az ABC transzporterek kipumpálják a sejt belsejéből a citosztatikumot, amelyek ezáltal magasabb drogoncentrációt képesek tolerálni.

A kísérlet során resazurint használtunk, amelyet az élő sejtben található mitokondriális enzimek redukálnak fluoreszcens resorufinná és így megállapítható a metabolikusan aktív, életképes sejtek száma [9. ábra]



9. ábra A resazurin átalakítása fluoreszcens resorufinná

A kísérlet körülményeit optimalizáltuk, melyet az eredmények fejezetben tárgyalunk részletesebben. Vizsgáltuk a sejtszámot, az elnyelési illetve a kibocsátási hullámhosszakot az inkubációs időt és a mérési intervallumot. A sejtszám optimalizálás eredményeként a HL60-MRP és HL60-CTRL sejtek esetében 5000 sejt/lyuk, a HL60-MDR, PLB985-BCRP és PLB985-CTRL sejteknél 10 000 sejt/lyuk sejtszámokkal végeztük a kísérleteket. A detektáláshoz az 544 nm gerjesztési és 620 nm elnyelési értékeket választottuk. A sejteket a kiültetést követően 24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-os 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban, majd a drogok hozzáadását követően 72 órán keresztül inkubáltuk az előbb leírtakkal megegyező körülmények között. Az előhívó reagens hozzáadását követően 4 órát inkubáltuk a lemezeket az inkubátorban. A kísérletet hat párhuzamos mérési pontban végeztük, majd ezekből szórást és átlagot számoltunk. Megállapítottuk az IC₅₀ értékeket, amelyek megadják azt a drogkoncentrációt, amelynél a sejtek 50%-a életképes maradt.

A kivitelezés fontosabb lépései:

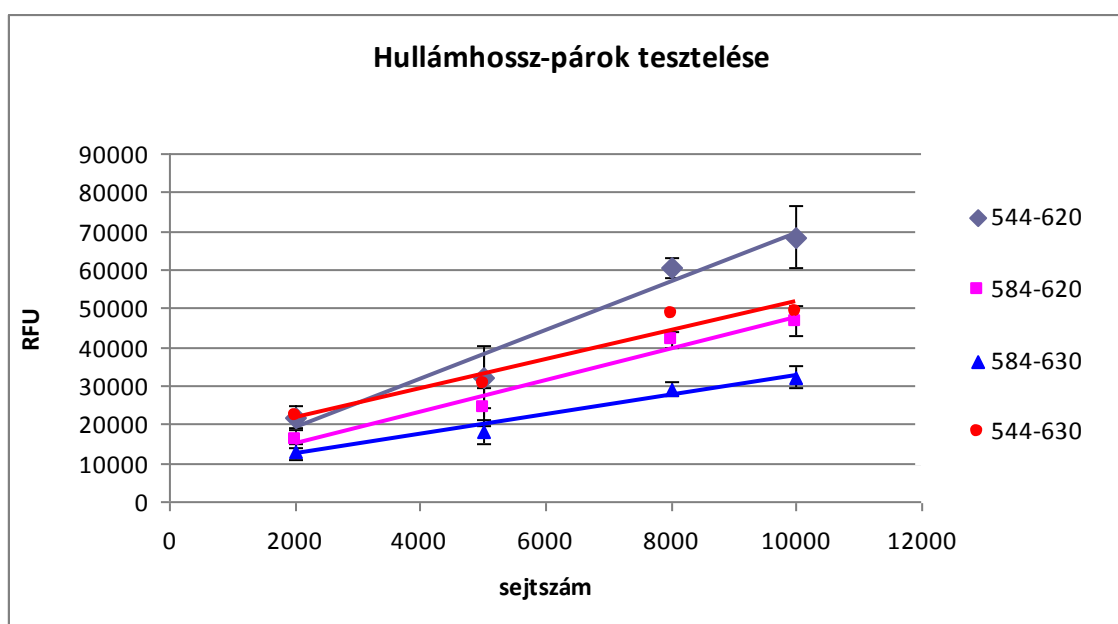
1. A sejtek megszámlálása automata sejtszámlálóval. A sejtszuspenziók hígítása tápfolyadékkal (Advanced RPMI), hogy az alábbi koncentrációkat kapjuk:
 - HL60-MDR => 10 000 sejt/150 μ l
 - HL60-MRP => 5 000 sejt/150 μ l
 - HL60-CTRL => 5 000 sejt/150 μ l
 - PLB985-BCRP => 10 000 sejt/150 μ l
 - PLB985-CTRL=> 10 000 sejt/150 μ l
2. 96 lyukú plate minden lyukába repeater segítségével 150 μ l sejtszuspenzió pipettázása, kivéve a H6-os és H12-es lyukakat, melyekbe 150 μ l tápfolyadék kerül.
3. A plate 24 órán keresztüli inkubációja 37 °C-on CO₂ termosztátban.
4. A tesztelni kívánt drog 200x-ára hígul az esszzében. Egy üres 96 lyukú plate első 2 oszlopába 200 μ l/lyuk tápfolyadék pipettázása, ezután az első oszlophoz 7,3 μ l/lyuk "A" drog, majd a második oszlophoz 7,3 μ l/lyuk "B" drog hozzáadása. A drogok tesztelése 6 párhuzamosban történik. A tápfolyadékban hígított drokból 25 μ l/lyuk pipettázása a sejtszuspenziót tartalmazó lemezre. (Célszerű minden kivételnél felsuszpendálni a drog-tápfolyadék elegyet.) A plate legalsó (H) sorába nem kerül drog. H1-H5-ig, illetve H7-H11-ig 25 μ l/lyuk DMSO-t, H6-os és H12-es lyukakba 25 μ l/lyuk tápfolyadékot kerül.
5. A lemez inkubálása 72 órán keresztül 37 °C-on CO₂ termosztátban.
6. 10 μ l/lyuk 1,3 mM-os Alamar Blue (resazurin) munkaoldatot hozzáadása minden lyukhoz.
7. Lemez befedése alufóliával és inkubálása 4 órán keresztül 37 °C-on CO₂ termosztátban. (Alamar Blue végkoncentrációja 70 μ M lesz egy lyukban. Az Alamar Blue port 1xHanks-ben kell feloldani és tovább hígítani)
8. Fluoreszcencia detektálása fluoriméterrel 544 nm gerjesztési és 620 nm elnyelési hullámhosszon
9. Adatok kiértékelése Microsoft Excel programmal.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Citotoxicitási esszé eredmények

A kiválasztott molekulák tesztelését megelőzően szükség volt az esszé optimalizálására a különböző sejttípusokra; ez az optimális elnyelési és kibocsátási hullámhossz, valamint a lyukankénti sejtszám meghatározását jelentette.

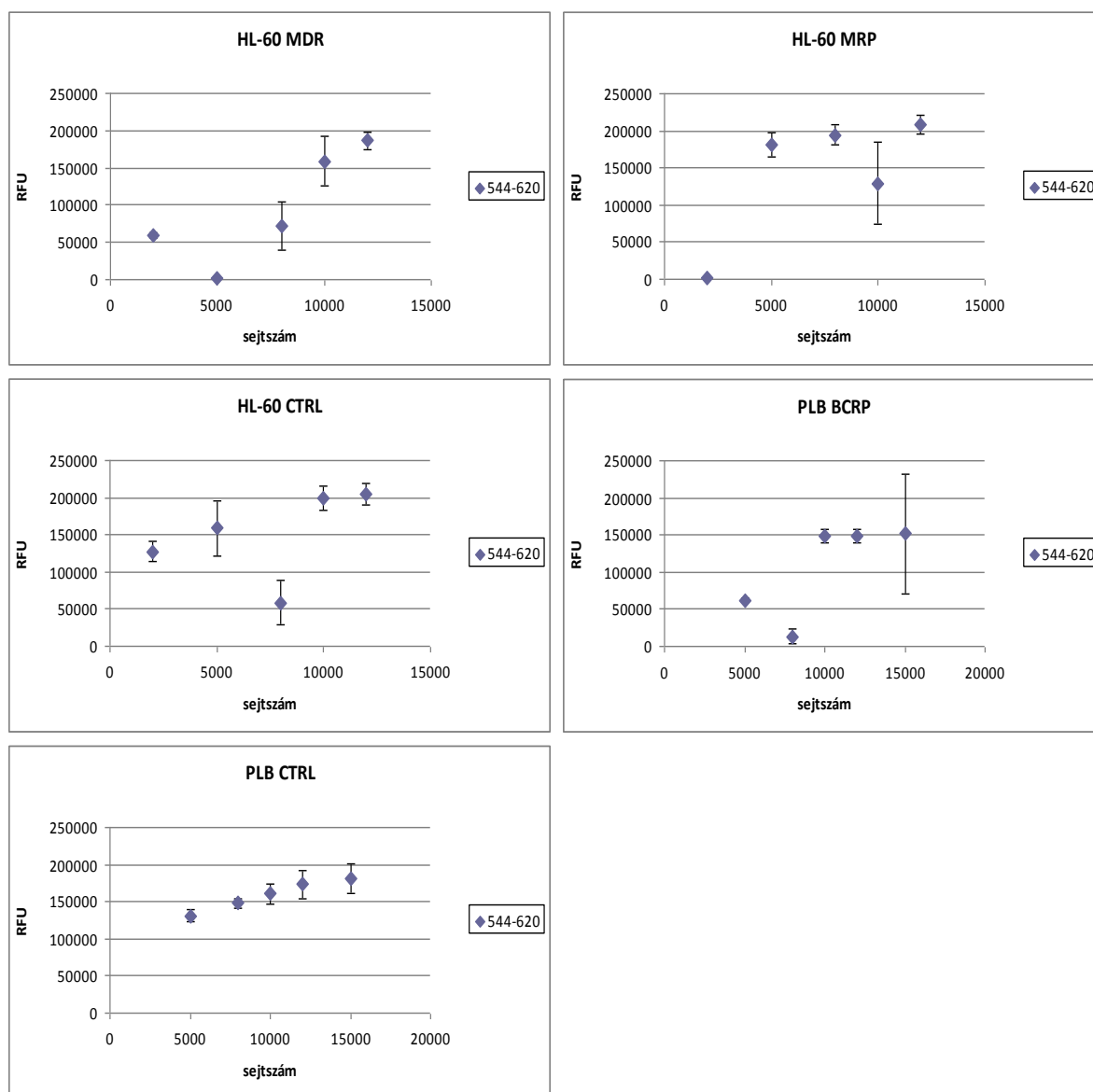
Az esszé optimalizálását az ideális elnyelési és kibocsátási hullámhossz kiválasztásával kezdtük. Kísérletünk során négy hullámhossz-párt teszteltünk 4 különböző sejtszám mellett [10.ábra]. Ezek alapján az 544 nm gerjesztési és 620 nm elnyelési értékeket választottuk, hiszen ebben az esetben tapasztaltuk a legmeredekebb pontokra illesztett egyenest.



10. ábra Hullámhossz-párok tesztelése

Az alkalmas hullámhossz-pár kiválasztását követően az optimalizálást az ideális sejtszám kiválasztásával folytattuk. A kísérletek során 2000/5000/8000/10000/12000 sejtet ültettünk ki lyukanként tápfolyadékban és 96 órán keresztül 37 °C-os 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban tartottuk a mikrotiter lemezeket. A cél az volt, hogy olyan értéket találjunk, melynél a sejtek még nem nőnek túl a mikrotiter plate egy lyukjában, de elegendően sokan vannak ahhoz, hogy megfelelő fluoreszcencia értékeket kapjunk. A 11. ábrán feltüntetett

eredmények alapján a továbbiakban HL60-MRP és HL60-CTRL sejtek esetében 5000 sejt/lyuk, a HL60-MDR, PLB985-BCRP és PLB985-CTRL sejteknél 10 000 sejt/lyuk sejtszámokkal végeztük a kísérleteket



11. ábra A sejtszám optimalizálás eredményei

A kiválasztott molekulákkal a kísérleteket hat párhuzamos mérési pontban végeztük, majd ezekből szórást és átlagot számoltunk. Megállapítottuk az IC_{50} értékeket, amelyek megadták azt a drogonkoncentrációt, amelynél a sejtek 50%-a életképes maradt.

ABCB1 és ABCC1 transzporert kifejező HL60 sejteken és ABCG2 fehérjét kifejező PLB985 sejteken illetve a két kontroll sejtvonalon végzett kísérletek eredményeit a 6. táblázatban foglaltuk össze

Citotoxicitás esszé / IC ₅₀ értékek (nM)					
Tesztanyagok	HL60-CTRL	HL60-MDR	HL60-MRP	PLB985-CTRL	PLB985-BCRP
Carboplatin	27 012	81 091	15 249	13 028	35 234
Camptothotecin	14,31	15,6	8,15	15,27	16,63
Cyclophosphamid	nk	nk	nk	nk	nk
Cisplatin	28 854	85 798	14 300	12 833	33 072
Dacarbazine	10 640	94 070	271 800	6 565	6 972
Daunorubicin	11,74	1 528	931,5	11,19	12,54
Doxorubicin	23,44	2 651	2 017	54,23	43,6
Etoposide	292,2	53 102	36 213	88,63	155,4
Hydroxiurea	nk	nk	nk	nk	nk
Melphalan	3 250	15 265	1 928	2 235	2 540
Mitoxantrone	5,73	226,3	784,2	5,769	66,69
Tamoxifen	12 920	20 340	12 490	16 070	29 010
Taxol	1,72	3 896	3,98	2,59	3,17
Topotecan	29,97	172,4	35,23	23,97	189,9
Vinblastine	2,03	378,1	4,35	1,66	1,85
Vincristine	1,02	8 063	14,9	3,33	3,16
Methotrexate	10,01	24,3	102,8	16,18	26,38
Cytarabine	22,32	81,65	102,1	422,9	1 146
Thioguanine	438,5	6 421	16 790	3 624	3 902
Fludarabine	2 868	1 854	8 230	4 521	6 449
Chlorambucil	3 215	8 255	1 901	2 787	5 575
Clofarabine	38,75	35,5	89,4	61,66	118,60
Pixantrone	65,72	2 309	6 421	76,82	447,3

6. táblázat: A citotoxicitási esszével kapott eredményeket összefoglaló táblázat

5.2. Eredmények ATPáz esszével

A dolgozatban korábban ismertetett molekulákat ABCB1, ABCC1 valamint ABCG2 transzportereket magas szinten kifejező sejtekből készült membránpreparátumokon teszteltük ATPáz esszében. A kísérletek során aktiválási és gátlási tesztet is végrehajtottunk. Eredményeinket transzporterek szerint csoportosítva, összefoglaló

táblázatokban mutatjuk be (7-9 táblázatok). A táblázatban a + jel azt jelenti, hogy megfigyeltünk kölcsönhatást, a – jel pedig azt, hogy nem.

5.3. Festéktranszport esszével kapott eredmények

A festéktranszport kísérleteket, a Calcein és Hoechst esszét, az adott transzportert expresszázó sejteken végeztük. Így az ABCB1 esetében HL60-MDR, az ABCC1 esetében HL60-MRP, az ABCG2 esetében pedig PLB985-BCRP sejtvonalat alkalmaztunk. Eredményeinket transzporterek szerint táblázatba rendeztük, ahol az *nk* a kölcsönhatás hiányát jelzi.

5.4. Transzporterek szerint csoportosított eredmények bemutatása

Színkódok a 7-9 táblázatokban

- zöld: kísérleteinkkel alátámasztottuk az irodalomban közölt eredményeket
- kék: a tesztanyag és az adott transzporter kölcsönhatását még nem vizsgálták, nem találtunk kölcsönhatást
- piros: a tesztanyag és az adott transzporter kölcsönhatását még nem vizsgálták, eredményeink alapján feltételezhetően szubsztrát a vizsgált anyag

A korrelációk oszlopban az „A” az ATPáz esszét, a „B” a festéktranszport esszét, a „C” a citotoxicitás esszét, míg az „I” az irodalmat jelenti. A +/- jelek azt jelzik, hogy kimutatható volt-e kölcsönhatás az adott tesztrendszerrel a tesztanyag és a transzporter között. Az irodalom oszlopban a „0” azt jelzi, hogy nincs irodalmi adat a transzporter és a molekula kölcsönhatását illetően.

ABCB1/MDR1

Az ABCB1 transzportert tartalmazó vezikulákon végzett ATPáz esszé, valamint a HL60-MDR sejteken végzett Calcein és citotoxicitási esszé eredményeit a következő táblázat foglalja össze.

Tesztanyagok	Lipofilitás (logP)	ATPáz esszé aktiválás/ gátlás	Calcein esszé		Citotoxicitás esszé		Korrelációk			
			HL60-MDR		HL60-CTRL	HL60-MDR				
			kölcsönhatás	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	A	F	C	I
Carboplatin	1,06	-/-	nk		27 012	81 091	-	-	+	0
Camptothotecin	1,22	-/+	nk		14,31	15,6	+	-	-	+
Cyclophosphamid	0,1	-/-	nk		nk	nk	-	-	-	-
Cisplatin	0	-/-	nk		28 854	85 798	-	-	+	+
Dacarbazine	-0,43	-/+	nk		10 640	94 070	+	-	+	0
Daunorubicin	1,67	-/+	11 uM-nál 25% inh.		11,74	1 528	+	+	+	+
Doxorubicin	0,86	-/+	nk		23,44	2 651	+	-	+	+
Etoposide	1,16	-/+	nk		292,2	53 102	+	-	+	+
Hydroxiurea	-1,37	-/-	nk		nk	nk	-	-	-	0
Melphalan	0,12	+/+	nk		3 250	15 265	+	-	+	-
Mitoxantrone	1,17	-/+	nk		5,73	226,3	+	-	+	+
Tamoxifen	6,35	+/+	11 uM felett toxikus		12 920	20 340	+	-	-	+
Taxol	3,54	+/-	33 uM-nál 25% inh.		1,72	3 896	+	+	+	+
Topotecan	-0,55	+/-	33 uM-nál 25% inh.		29,97	172,4	+	+	+	+
Vinblastine	4,18	+/-	gátol	179	2,03	378,1	+	+	+	+
Vincristine	3,13	+/+	nk		1,02	8 063	+	-	+	+
Methotrexate	-0,51	-/-	nk		10,01	24,3	-	-	-	-
Cytarabine	-2,8	-/-	nk		22,32	81,65	-	-	+	0
Thioguanine	-0,35	-/-	nk		438,5	6 421	-	-	+	0
Fludarabine	-3,97	-/-	nk		2 868	1 854	-	-	-	0
Chlorambucil	3,94	+/+	nk		3 215	8 255	+	-	+	-
Clofarabine	-0,29	-/-	nk		38,75	35,5	-	-	-	0
Pixantrone	-	-/-	nk		65,72	2 309	-	-	+	0

7. táblázat: Az ABCB1 transzporterrel végzett kísérletek eredményei

Az MDR1 transzportert túlexpresszázó sejtekkel illetve a sejtekből készült membránpreparátumokkal végzett kísérletek eredményeként elmondható, hogy a Cyclophosphamid, Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposide, Mitoxantrone, Taxol, Topotecan, Vinblastine, Vincristine és a Methotrexate esetében sikerült alátámasztanunk az irodalmban közölt adatokat. A Hydroxiurea, Fludarabine és Clofarabine kölcsönhatását az MDR1 transzporterrel eddig nem vizsgálták, ezek a molekulák a kísérleteink alapján nem hatnak kölcsön a transzporterrel. A nem vizsgált anyagok közül a citotoxicitás esszével kapott eredmények alapján a Carboplatin, Dacarbazine, Cytarabine, Thioguanine és Pixantrone feltételezhetően az MDR1 transzporter szubsztrátjai.

ABCC1/MRP1

Az alábbi táblázatban láthatók az ABCC1 transzportert tartalmazó vezikulákon végzett ATPáz esszé és a transzportert túlexpresszálo HL60-MRP sejteken végzett Calcein és citotoxicitási esszé eredményei.

Tesztanyagok	Lipofilitás (logP)	ATPáz esszé aktiválás/ gátlás	Calcein esszé		Citotoxicitás esszé		Korrelációk			
			HL60-MRP		HL60-CTRL	HL60-MRP				
			kölcsönhatás	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	A	F	C	I
Carboplatin	1,06	-/-	nk		27 012	15 249	-	-	-	0
Camptothecin	1,22	-/+	33 μM-nál 25% inh.		14,31	8,15	+	+	-	-
Cyclophosphamid	0,1	-/-	nk		nk	nk	-	-	-	+
Cisplatin	0	-/-	1,2 μM-tól 25% -os inh.		28 854	14 300	-	+	-	-
Dacarbazine	-0,43	-/-	nk		10 640	271 800	-	-	+	0
Daunorubicin	1,67	-/+	gátol	2,408	11,74	931,5	+	+	+	+
Doxorubicin	0,86	-/+	nk		23,44	2 017	+	-	+	+
Etoposide	1,16	-/+	gátol	~156 047	292,2	36 213	+	+	+	+
Hydroxiurea	-1,37	-/-	nk		nk	nk	-	-	-	0
Melphalan	0,12	+/-	400 μM-nál 35% inh.		3 250	1 928	+	+	-	+
Mitoxantrone	1,17	-/-	3,7 μM felett toxikus		5,73	784,2	-	-	+	+
Tamoxifen	6,35	-/-	3,7 μM felett toxikus		12 920	12 490	-	-	-	-
Taxol	3,54	-/+	gátol, 33 μM felett toxikus	1,954	1,72	3,98	+	+	+	+
Topotecan	-0,55	-/-	33 μM felett toxikus		29,97	35,23	-	-	-	-
Vinblastine	4,18	-/+	gátol	5,508	2,03	4,35	+	+	+	+
Vincristine	3,13	-/+	nk		1,02	14,9	+	-	+	+
Methotrexate	-0,51	-/-	nk		10,01	102,8	-	-	+	+
Cytarabine	-2,8	-/-	nk		22,32	102,1	-	-	+	0
Thioguanine	-0,35	-/-	nk		438,5	16 790	-	-	+	0
Fludarabine	-3,97	-/-	3,7 μM felett toxikus		2 868	8 230	-	-	+	0
Chlorambucil	3,94	+/-	gátol, 11 μM felett toxikus	0,2742	3 215	1 901	+	+	-	+
Clofarabine	-0,29	-/-	nk		38,75	89,4	-	-	+	0
Pixantrone	-	-/-	3,7 μM felett toxikus		65,72	6 421	-	-	+	0

8. táblázat: Az ABCC1 transzporterrel végzett kísérletek eredményei

A Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposide, Tamoxifen, Taxol, Topotecan, Vinblastine és Vincristine molekuláknál tudtuk alátámasztani az irodalomban szereplő eredményeket. Az eddig nem vizsgált anyagok közül a Carboplatin és a Hydroxiurea nem mutatott kölcsönhatást egyik tesztrendszerrel végzett kísérletben sem, a Dacarbazine, Cytarabine, Thioguanine, Fludarabine, Clofarabine és Pixantrone a citotoxicitás esszé alapján feltételezhetően szubsztrátjai az MRP1 transzporternek.

ABCG2/BCRP

Az 9. táblázatban az ABCG2 transzportert tartalmazó vezikulákon végzett ATPáz kísérletek illetve az ABCG2 transzportert magas szinten kifejező PLB985-BCRP sejteken végzett Hoechst és citotoxicitási esszé eredményeit foglaltuk össze.

Tesztanyagok	Lipofilitás (logP)	ATPáz esszé aktiválás/ gátlás	Hoechst esszé		Citotoxicitás esszé		Korrelációk			
			PLB-BCRP		PLB-CTRL	PLB-BCRP				
			kölcsönhatás	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	A	F	C	I
Carboplatin	1,06	-/-	nk		13 028	35 234	-	-	+	0
Camptothotecin	1,22	+/-	gátol	30	15,27	16,63	+	+	-	+
Cyclophosphamid	0,1	-/+	nk		nk	nk	+	-	-	-
Cisplatin	0	-/-	nk		12 833	33 072	-	-	+	-
Dacarbazine	-0,43	-/-	nk		6 565	6 972	-	-	-	0
Daunorubicin	1,67	+/-	0,41 μM felett toxikus		11,19	12,54	+	-	-	+
Doxorubicin	0,86	+/-	nk		54,23	43,6	+	-	-	+
Etoposide	1,16	-/-	nk		88,63	155,4	-	-	-	+
Hydroxiurea	-1,37	-/-	nk		nk	nk	-	-	-	0
Melphalan	0,12	-/-	nk		2 235	2 540	-	-	-	-
Mitoxantrone	1,17	-/-	nk		5,769	66,69	-	-	+	+
Tamoxifen	6,35	-/+	nk		16 070	29 010	+	-	-	+
Taxol	3,54	-/-	100 uM-nál 25% inh.		2,59	3,17	-	+	-	-
Topotecan	-0,55	+/-	nk		23,97	189,9	+	-	+	+
Vinblastine	4,18	-/-	0,05 μM felett toxikus		1,66	1,85	-	-	-	-
Vincristine	3,13	-/-	1,23 μM felett toxikus		3,33	3,16	-	-	-	-
Methotrexate	-0,51	-/-	nk		16,18	26,38	-	-	-	+
Cytarabine	-2,8	-/-	3,7 μM felett toxikus		422,9	1 146	-	-	+	0
Thioguanine	-0,35	-/-	nk		3 624	3 902	-	-	-	0
Fludarabine	-3,97	-/-	3,7 μM felett toxikus		4 521	6 449	-	-	-	0
Chlorambucil	3,94	-/-	nk		2 787	5 575	-	-	-	-
Clofarabine	-0,29	+/+	gátol	102,8	61,66	118,6	+	+	+	0
Pixantrone	-	NA	11μM felett toxikus		76,82	447,3	0	-	+	0

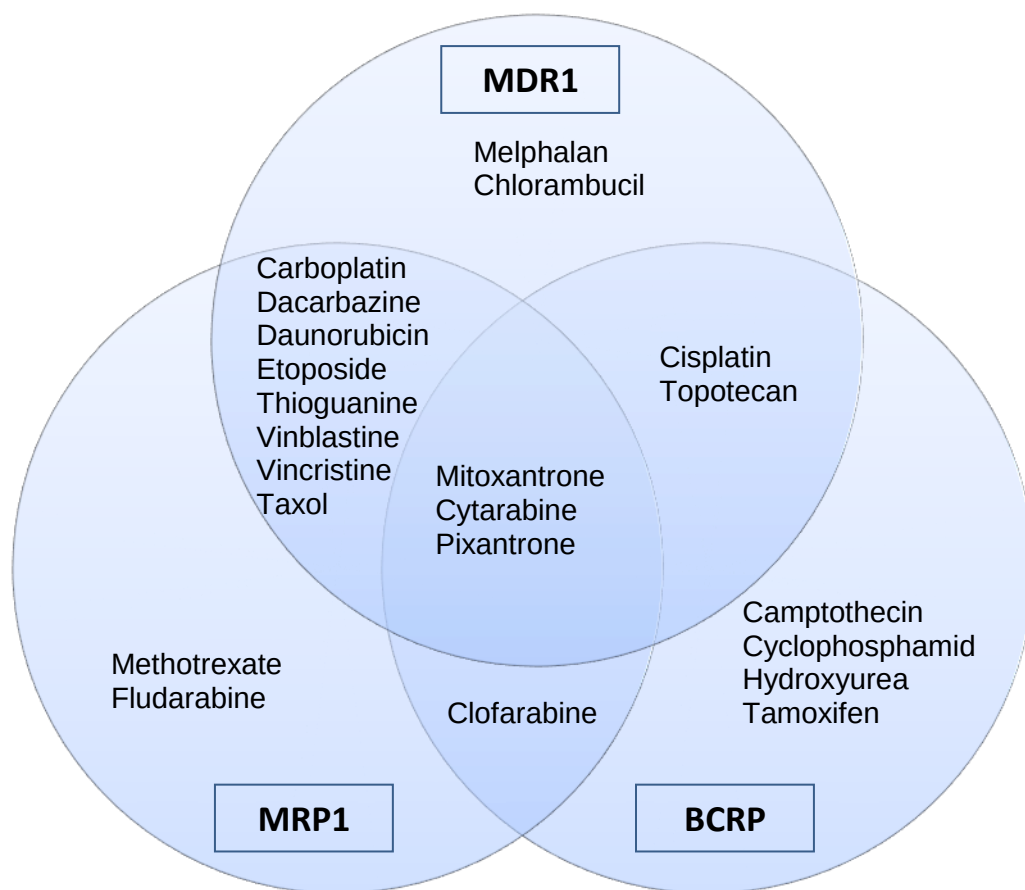
9. táblázat: Az ABCG2 transzporterrel végzett kísérletek eredményei

Az irodalomban leírt kölcsönhatást a Melphalan, Topotecan, Vinblastine, Vincristine és Chlorambucil esetében sikerült megerősítenünk a kísérleteinkkel. A Dacarbazine, Hydroxiurea, Thioguanine és Fludarabine BCRP transzporterrel való kölcsönhatását még nem vizsgálták, adataink alapján egyik anyag sem hat kölcsön. A Carboplatin, Cytarabine, Clofarabine és Pixantrone kölcsönhatását eddig szintén nem vizsgálták, a kapott eredmények alapján feltételezhetően a BCRP szubsztrátjai.

Az irodalomban eddig nem publikált új kölcsönhatásokat a citosztatikus anyagok és az ABC transzporterek között a citotoxicitás esszével végzett kísérletek alapján a 10. táblázat szemlélteti.

Tesztanyagok	MDR1 transzporter	MRP1 transzporter	BCRP transzporter
Cytarabine	+	+	+
Pixantrone	+	+	+
Thioguanine	+	+	-
Dacarbazine	+	+	-
Clofarabine	-	+	+
Carboplatin	+	-	+
Fludarabine	-	+	-

10 táblázat: Új kölcsönhatások a citosztatikumok és az MDR1/MRP1/BCRP transzporterek között



12. ábra: A tesztanyagok ábrázolása Venn-diagram segítségével a citotoxicitás esszével kapott eredmények alapján. Jól látható az MDR1, MRP1, BCRP transzporterek átfedő szubsztrátspecifitása.

6. Összefoglalás

Az ABC transzporterek egyik legjobban tanulmányozott funkciója az, hogy képesek befolyásolni a xenobiotikumok ADME-TOX (felszívódás, eloszlás, lebomlás, kiválasztás, mérgező hatás) tulajdonságait, ezért a modern gyógyszerek fejlesztése során már korai fázisban indokolt a gyógyszerjelölt vegyületek releváns transzporterekkel való kölcsönhatásának vizsgálata.

A tumorok multidrog rezisztenciájának (MDR) kialakulásában három ABC transzporter vesz részt: ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1) és ABCG2 (BCRP). Célunk volt egyrészt a korábban már ugyan leírt, de pontosan nem karakterizált kölcsönhatások jellemzése kinetikai paraméterek megadásával, másrészt néhány olyan molekula tesztelése amelyek ABC transzporterekkel való kölcsönhatása ezidáig még nem volt ismert.

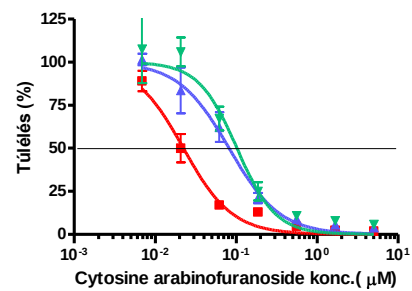
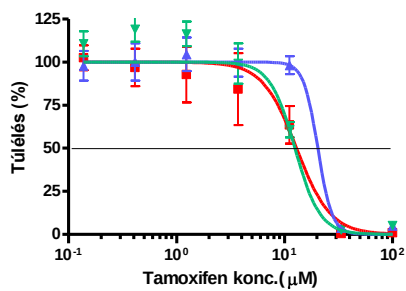
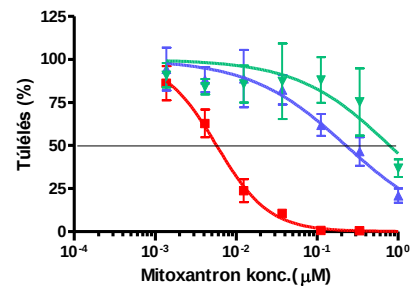
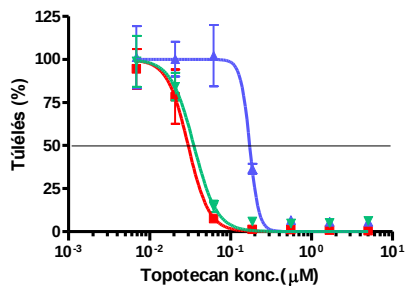
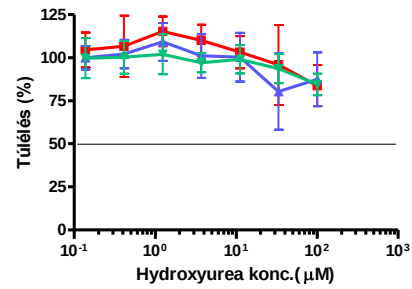
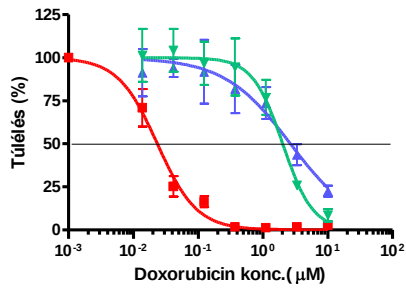
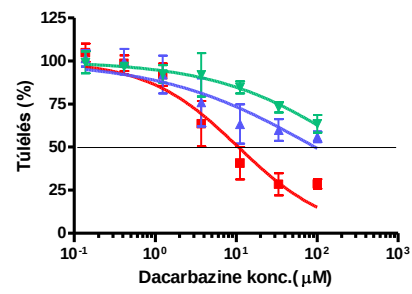
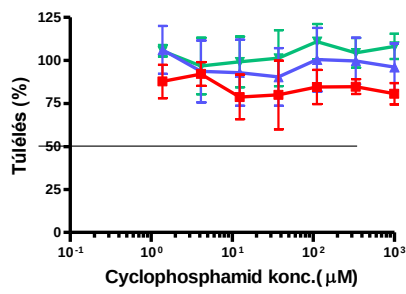
A kísérleteket az MDR kialakulásában szerepet játszó transzportereket magas szinten expresszáló sejteken végeztük Calcein, Hoechst és citotoxicitási esszé formájában illetve az adott transzportereket tartalmazó vezikulákon ATPáz esszével. A Calcein és Hoechst módszer jól alkalmazható a magas permeabilitású molekulák kölcsönhatásának vizsgálatához, azonban az ATPáz esszével kapott adatokhoz viszonyítva figyelembe kell venni, hogy az eredményeit nagyban befolyásolja az egyes molekulák permeabilitása.

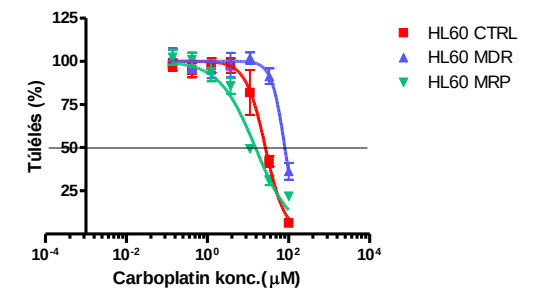
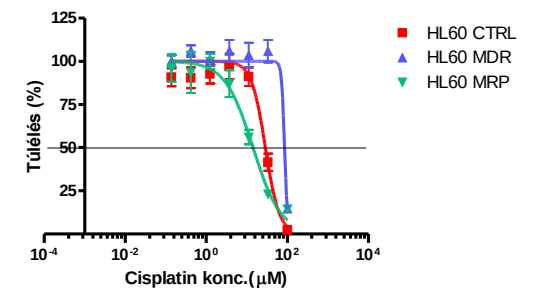
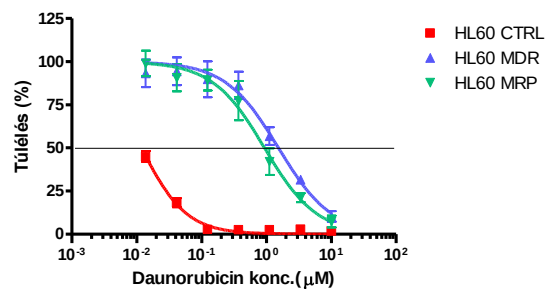
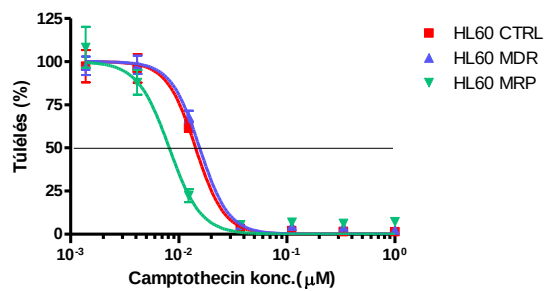
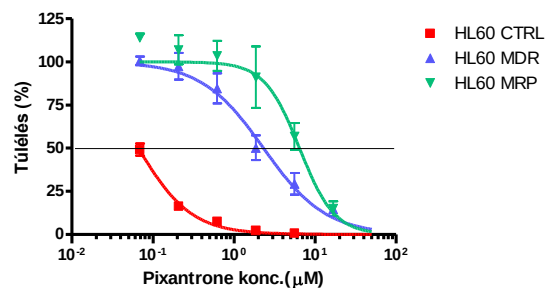
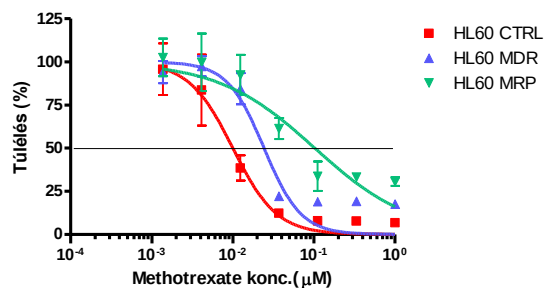
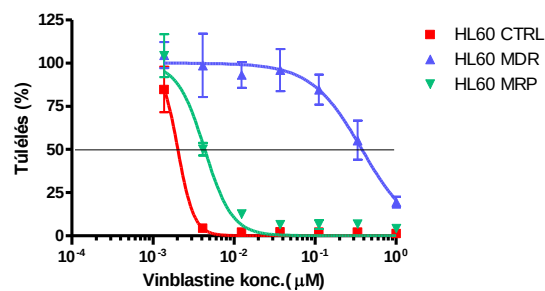
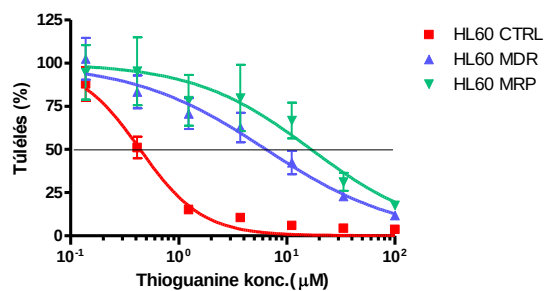
A citotoxicitás esszé eredményei a legrelevánsabbak, mert itt több napig inkubálódnak a sejtek a tesztanyag hozzáadását követően, szemben a festéktranszport esszék pár perces inkubációs idejével, tehát az alacsonyabb lipofilitási értékű molekulák nagyobb eséllyel képesek bejutni a sejt belsejébe.

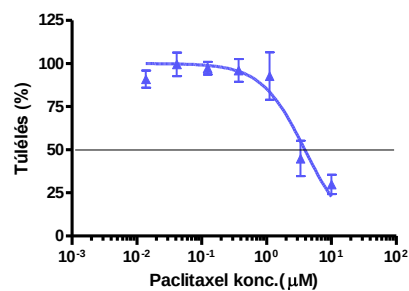
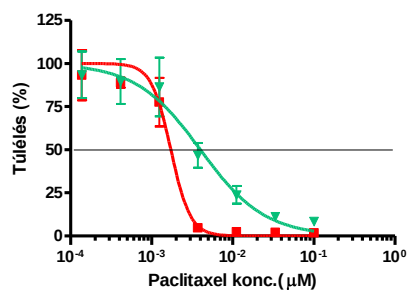
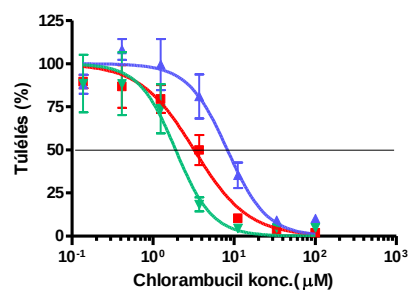
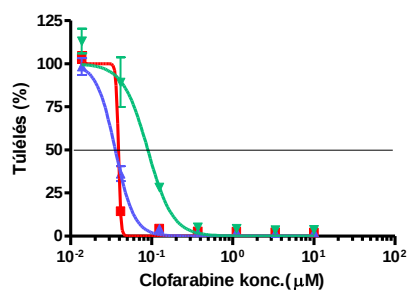
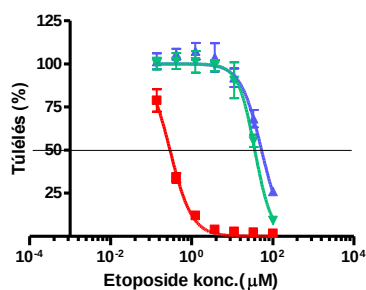
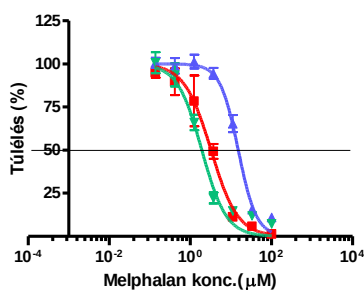
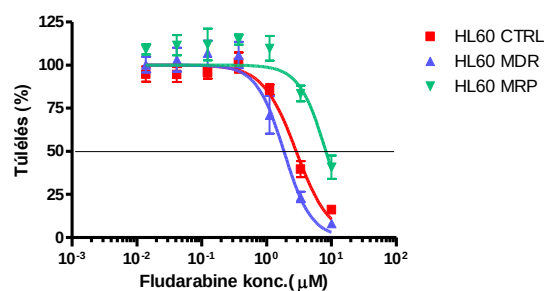
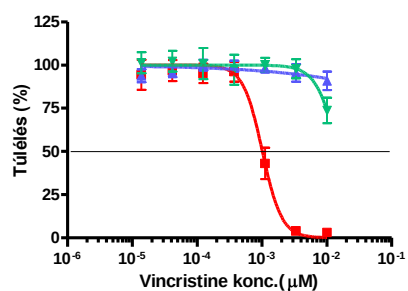
Összegzésként elmondható, hogy a citotoxicitás esszét sikeresen optimalizáltuk, számos, az irodalomban leírt kölcsönhatást alátámasztottunk kísérleteinkkel illetve eddig nem ismert kölcsönhatásokat jellemeztünk kinetikai paraméterek megadásával.

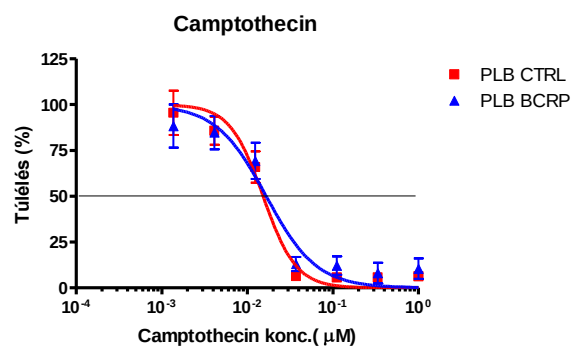
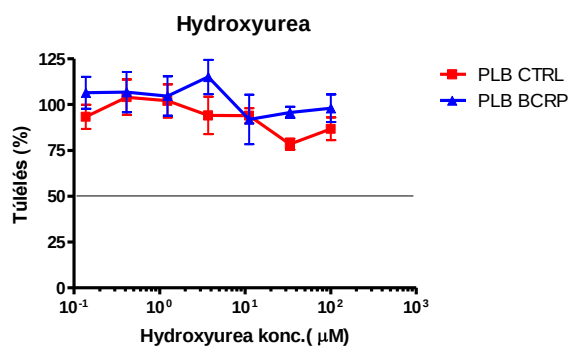
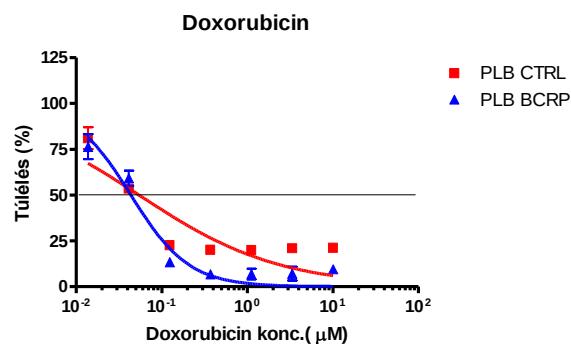
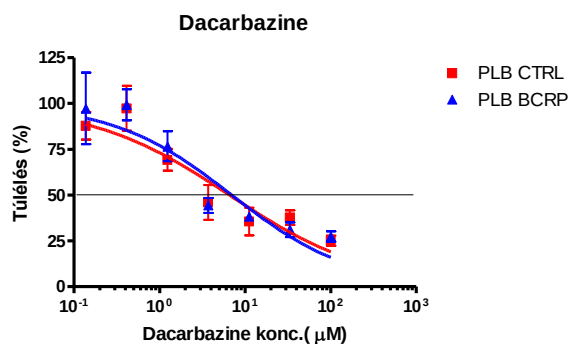
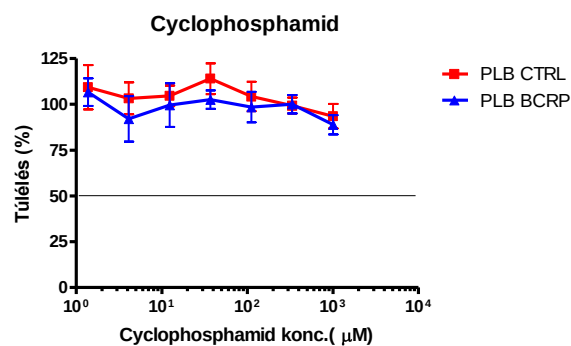
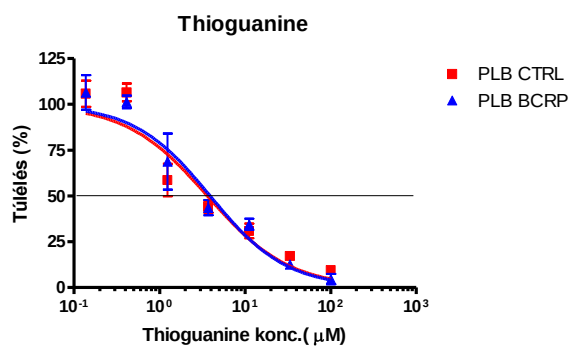
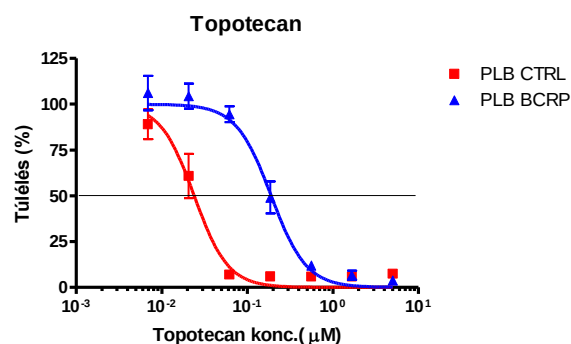
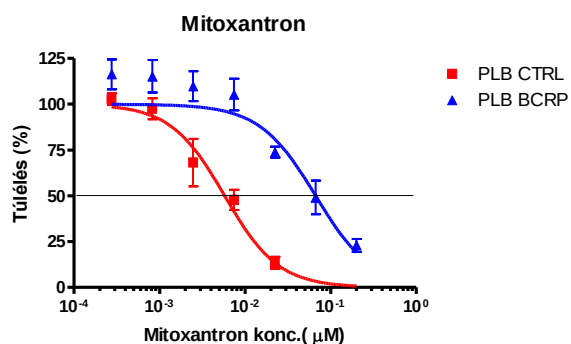
Jövőbeli céljaink közé tartozik a még nem közölt kölcsönhatások további vizsgálata, a különböző módszerek és a lipofilitási értékek közötti további korrelációk keresése. Az alacsonyabb lipofilitású anyagokkal direkt vezikuláris transzport esszé, a magasabb lipofilitású anyagokkal monolayer esszé kivitelezését tervezzük.

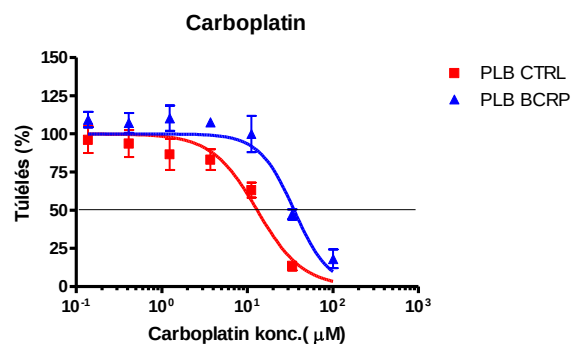
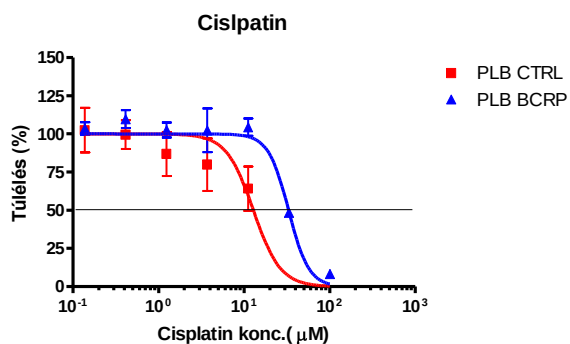
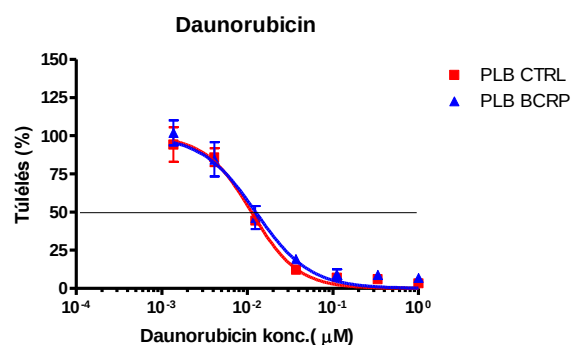
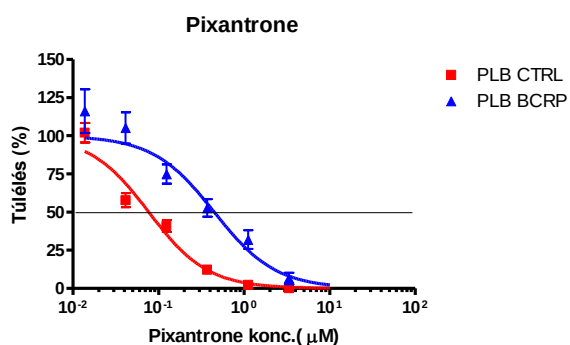
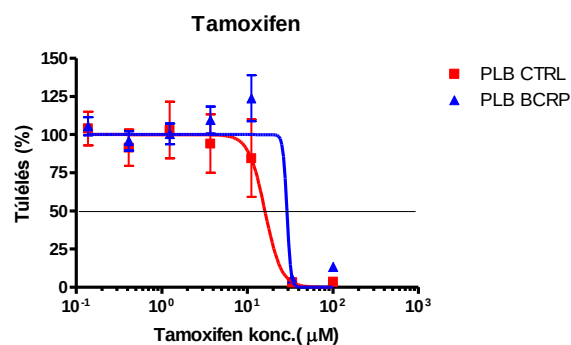
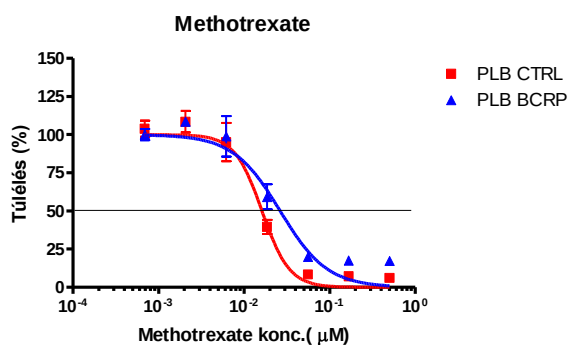
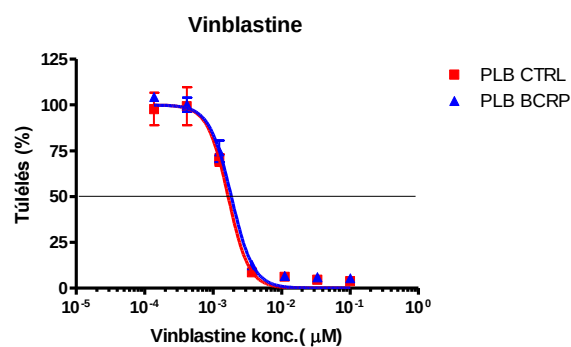
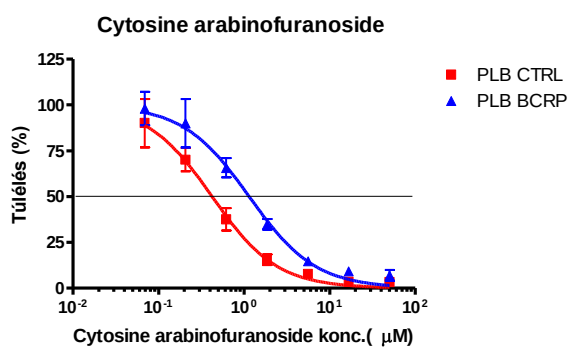
7. Függelék

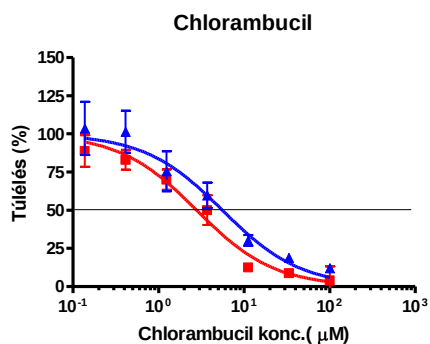
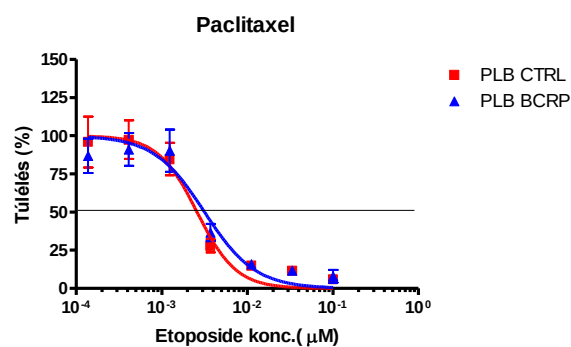
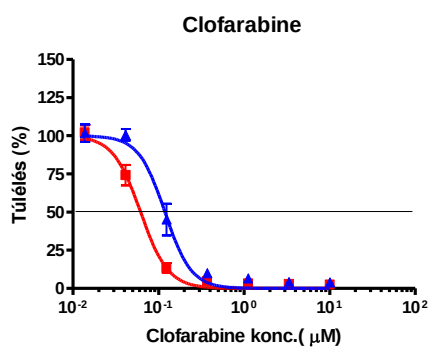
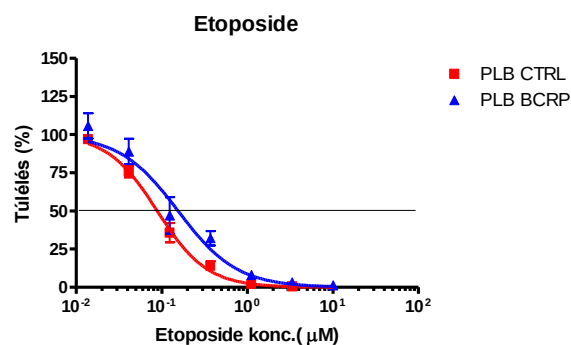
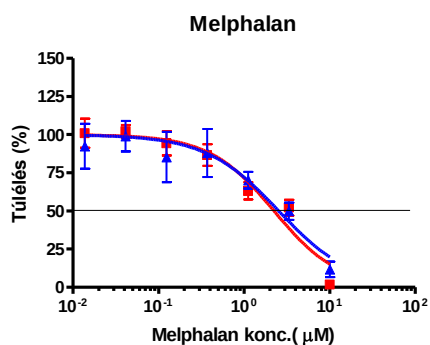
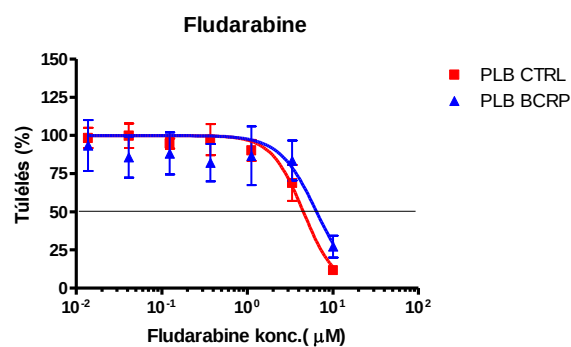
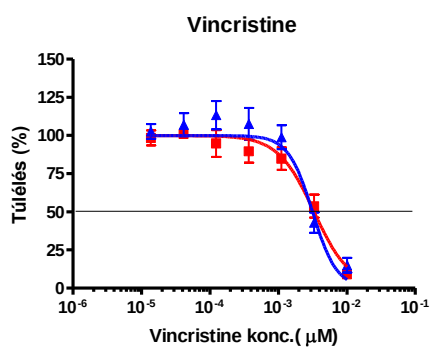












8. Nyilatkozat

Alulírott Biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

.....
Vaskó Balázs

Szeged, 2012. május

9. Irodalomjegyzék

- ¹ **Mikihisa Takano et al.:** Expression and function of efflux drug transporters in the intestine Pharmacology & Therapeutics, 2006, 109:137-161
- ² **Michael Dean:** The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily
- ³ **Hristos Glavinas, Péter Krajcsi, Judit Cserepes and Balázs Sarkadi:** The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. Current Drug Delivery, 2004, 1:27-42
- ⁴ **Glavinas et al.:** Current Drug Delivery, 2004, 1, 000-000
- ⁵ **Endicott JA, Ling V.** The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem. 1989;58:137-71.
- ⁶ **Higgins CF.** ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol. 1992;8:67-113.
- ⁷ **Gottesman MM, Pastan I.** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu Rev Biochem. 1993;62:385-427.
- ⁸ **Gottesman MM, Fojo T, Bates SE.** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58.
- ⁹ **Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB.** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell. 1986 Nov 7;47(3):381-9.

-
- ¹⁰ **Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I.** Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(9):3004-8.
- ¹¹ **Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG.** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992 Dec 4;258(5088):1650-4.
- ¹² **Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J.** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16;92(16):1295-302.
- ¹³ **Deeley RG, Cole SP.** Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol.* 1997 Jun;8(3):193-204.
- ¹⁴ **Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE.** From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Jun;58(7):931-59.
- ¹⁵ **Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM.** Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Mar;5(3):219-34.
- ¹⁶ **Michael Dean, Tito Fojo, Susan Bates:** Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* 5, 275-284 (April 2005) | doi:10.1038/nrc1590
- ¹⁷ **Ling V (1975)** Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells. *Can J Genet Cytol* 17:503-15.

-
- ¹⁸ **Juliano RL and Ling V** (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.
- ¹⁹ **Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I and Gottesman MM** (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232:643-645.
- ²⁰ **Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V and Riordan JR** (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 141:956-962.
- ²¹ **Gros P, Croop J, Housman D** (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47:371-80.
- ²² **Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB** (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-9.
- ²³ **Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V** (1986) Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324:485-9.
- ²⁴ **Hamada H, Tsuruo T** (1988) Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J Biol Chem* 263:1454-8.
- ²⁵ **Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP**

(1994) Disruption of the mouse *mdr1a* Pglycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502.

²⁶ **Borst P, Elferink RO** (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-92.

²⁷ **Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ.** Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004 Jan;126(1):322-42. Review.

²⁸ **Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G and Varadi A** (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 86:1179-1236.

²⁹ **Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG** (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-4.

³⁰ **Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG** (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54:5902-10.

³¹ **Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG** (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* :357-61.

³² **Deeley RG, Cole SP** (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* 8:193-204.

-
- ³³ **Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirla SE, Grindstaff KK.** (2008) Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*. 155:423-38.
- ³⁴ **Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A, Sarkadi B.** Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 1998;273:32167–32175. [PubMed: 9822694]
- ³⁵ **Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG, Cole SP.** The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem* 2001;276:16076–16082. [PubMed: 11279022]
- ³⁶ **J. Wijnholds, R. Evers, M.R. van Leusden, C.A.A.M. Mol, G.J.R. Zaman, U. Mayer, J.H. Beijnen, M. van der Valk, P. Krimpenfort, A. Berns, P. Borst,** Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking MRP, *Nature Med.* 3 (1997) 1275–1279.
- ³⁷ **Lorico, G. Rappa, R.A. Finch, D. Yang, R.A. Flavell, A.C. Sartorelli,** Disruption of the murine MRP (multidrug resistance-protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione, *Cancer Res.* 57 (1997) 5238–5242.
- ³⁸ **D.F. Robbiani, R.A. Finch, D. Jaeger, W.A. Muller, A.C. Sartorelli, G.J. Randolph,** The leukotriene C transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3b, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes, *Cell* 103 (2000) 757–768.
- ³⁹ **Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P** (2000) Multidrug

resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 105:279-85.

⁴⁰ **Mao, Q. and Unadkat, J.D.** (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 7: E118-133.

⁴¹ **Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V and Dean M** (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58:5337-5339.

⁴² **Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD** (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15665-15670.

⁴³ **Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE** (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59:8-13.

⁴⁴ **Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A. and Sarkadi, B.** (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 111-117.

⁴⁵ **Rocchi E, Khodjakov A, Volk EL, Yang CH, Litman T, Bates SE, Schneider E.** The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 29;271(1):42-6.

⁴⁶ **Polli, J.W., Baughman, T.M., Humphreys, J.E., Jordan, K.H., Mote, A.L., Webster, L.O., Barnaby, R.J., Vitulli, G., Bertolotti, L., Read, K.D. and Serabjit-Singh, C.J.** (2004) The systemic exposure of an N-methyl-D-aspartate

receptor antagonist is limited in mice by the P-glycoprotein and breast cancer resistance protein efflux transporters. *Drug Metab Dispos* 32: 722-726.

⁴⁷ **Zamek-Gliszczyński, MJ., Nezasa, K., Tian, X., Kalvass, JC., Patel, NJ., Raub, TJ., Brouwer, KL.** (2006) The important role of Bcrp (Abcg2) in the biliary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in mice. *Mol Pharmacol* 70, 2127-213

⁴⁸ **Mizuno N, Takahashi T, Kusuhara H, Schuetz JD, Niwa T, Sugiyama Y.** Evaluation of the role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the urinary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). *Drug Metab Dispos.* 2007 Nov;35(11):2045-52. Epub 2007 Aug 6.

⁴⁹ **Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Wielinga, P., van Tellingen, O., Schinkel, A.H. and Schellens, J.H.** (2005) The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res* 65: 2577-2582.

⁵⁰ **Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y.** Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol.* 2007 Oct;72(4):967-75. Epub 2007 Jul 20.

⁵¹ **Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C. and Schinkel, A.H.** (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11: 127-129.

⁵² **Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. and Schinkel, A.H.** (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92: 1651-1656.

⁵³ **Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE.** The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci.* 2000 Jun;113 (Pt 11):2011-21

⁵⁴ <http://www.xenobiotech.hu>

⁵⁵ **Holló Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B.** Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1994 May 11;1191(2):384-8.

⁵⁶ **Chen J, Sharma S, Quicho FA, Davidson AL.** Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 Feb 13;98(4):1525-30. Epub 2001 Feb 6.

10. Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra: <http://www.springerimages.com>
2. ábra: <http://www.solvobiotech.com>
3. ábra: <http://www.solvobiotech.com>
4. ábra: Solvo ATPase Kit Assay Protocol
- 5.-7. ábra: Solvo Calcein Assay Protocol
8. ábra: Solvo Hoechst Assay Protocol
9. ábra: <http://www.promega.com>
- 10.-12. ábra: saját készítésű

1. táblázat: saját készítésű
2. táblázat: Solvo ATPase Kit Assay Protocol
3. táblázat: saját készítésű
4. táblázat: Solvo Calcein Assay Protocol
5. táblázat: Solvo Hoechst Assay Protocol
- 6.-10. táblázat: saját készítésű

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kis Emesének**, témavezetőmnek, aki türelemmel végigkísérte a munkámat és kifogásolhatatlan szakmai felkészültségével, tanácsaival és ötleteivel segítette, hogy ez a dolgozat létrejöhessen.

Dr. Krajcsi Péternek, a Solvo Biotechnológiai Zrt. tudományos igazgatójának, amiért lehetővé tette számomra, hogy a Solvo Biotechnológiai Zrt. szakdolgozója lehessenek.

Dukai Mártnak és Sánta Erzsébetnek a sejtenyésztő laborban nyújtott segítségükért.

A Solvo Biotechnológiai Zrt. összes munkatársának, akik a mindennapokban a kellemes légkörrel elősegítették munkámat, valamint, hogy tanácsaikkal és munkájukkal hozzájárultak ezen dolgozat megszületéséhez.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani belső konzulensemnek, **Dr. Rákhely Gábornak**, aki kapcsolatot teremtett az SZTE-TTIK és a Solvo Biotechnológiai Zrt. között.