

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Multidrog-rezisztens rákos sejtekre szelektíven
toxikus vegyületek azonosítása, csoportosítása, és
hatásvizsgálata



Kanta Eszter

PPKE-ITK molekuláris bionika, III. évfolyam

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Témavezető: Dr. Szakács Gergely

Belső konzulens: Dr. Gáspári Zoltán

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Bevezető	3
2.1. MDR jelensége, P-glikoprotein	4
2.1.1 Multidrog rezisztencia	4
2.1.2. Az ABC transzportercsalád, az ABC-B1 fehérje	4
2.1.3. MDR leküzdésének módjai, járulékos érzékenység	5
2.2. A multidrog rezisztencia számokban	6
2.2.1. Félmaximális gátló koncentráció	6
2.2.2. A rezisztencia és a szelektivitás mérése	7
2.3. DTP adatbázis	8
3. Célkitűzés	9
4. Anyag és módszer	10
4.1. Vegyületek keresése, szűrése, csoportosítása	10
4.1.1. <i>In silico</i> screening	10
4.1.2. Klaszterezés, szerkezeti csoportosítás	12
4.2. <i>In vitro</i> tesztek – a toxicitás vizsgálata	13
4.2.1. A felhasznált sejtvonalak	13
4.2.2. Citotoxicitási esszé összeállítása	13
4.3. <i>In vitro</i> tesztek – a szelekció	15
4.3.1. Pgp sejtfelszíni expressziójának mérésére: MRK16 esszé	16
4.3.2. Pgp funkciójának igazolására: efflux esszé (CalceinAM)	17
4.3.3. RNS szint mérése	18
4.3.4. Fehérjeszint mérése	19
5. Eredmények és értékelésük	21
5.1. Számítógépes keresési és csoportosítási eredmények	21
5.1.1. <i>In silico</i> eredmények	21
5.1.2. A vegyületek csoportosítása	22
5.2. <i>In vitro</i> tesztek eredményei – citotoxicitási esszék	24
5.3. <i>In vitro</i> kísérletek - a szelekció hatásossága	25
5.3.1. MRK16 esszé a Pgp sejtfelszíni jelenlétének igazolására	25

5.3.2. Calcein-AM (Ca-AM) esszé a Pgp funkció kimutatására	27
5.3.3 RNS vizsgálat, real time-PCR mérés	29
5.3.4 Western blot	30
5.3.5 Citotoxicitási esszék	30
6. Összefoglalás	34
7. Irodalom	35
8. Köszönetnyilvánítás.....	37
9. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez.....	38

2. Bevezető

A huszadik század kezdete óta egyre nagyobb léptékben nő a tumoros megbetegedések, ezzel együtt a rákban elhunytak száma a világon. 2011-ben Magyarországon 33 ezernél többen haltak meg tumoros megbetegedésben, ez a teljes halálozási esetek több mint 25%-a [01]. A WHO (*World Health Organization*, Világ Egészségügyi Szervezete) becslései szerint a 2008-ban diagnosztizált 12,7 millió új megbetegedés 2030-ra 21,4 millióra fog emelkedni [02] [03].

Daganatos megbetegedésnek a korlátlan sejtosztódással járó betegségeket nevezzük. A tumor kialakulása a sejt szabályozási mechanizmusaiban bekövetkező változások eredménye, melyet genetikai és környezeti tényezők egyaránt okozhatnak. A mértéktelen sejtburjánzást leggyakrabban a sejtek DNS-ének károsodása indítja be. A malignus (rosszindulatú) daganatból származó sejtek egy része a kontrollálatlan osztódáson túl képes a vér- és a nyirokerekben keresztül eljutni a szervezet többi részébe is, ahol áttéteket képezhet [04] [05].

A ráknak sok típusa létezik, azonban minden tumoros sejtben megvannak bizonyos tulajdonságok, amik megkülönböztetik az egészséges sejtektől. Ilyenek például az apoptózis képességének elvesztése, a korlátlan sejtosztódás, és különböző védekező mechanizmusok kifejlődése. Egy további fontos különbség az egészséges és beteg sejtek között a fehérjék expressziós szintjében mutatkozik meg: azonos fehérjéket egészen eltérő mennyiségben tartalmazhatnak [04].

A betegség kezelésére több elterjedt módszer létezik: a műtéti eltávolítás vagy a sugárkezelés hatékony lehet megfelelően körülhatárolt tumor esetében, olyan esetekben viszont, amikor a rák már áttéteket hozott létre, általában elengedhetetlen a kemoterápia alkalmazása. A hatékony gyógyszeres kezelés során, melyet igyekeznek a lehető legjobban a rák típusához és a beteg állapotához igazítani, a tumor térfogata csökken, azonban a terápia előrehaladtával szinte minden esetben fellép a kezelést megghiúsító gyógyszer-rezisztencia. Ennek oka, hogy a tumoros sejtek képesek ellenállást (rezisztenciát) kialakítani a testidegen kémiai anyagokkal szemben, így nem csak túlélnek a terápiát, de gyakran a tumor repopulációját is elindítják. Ennek eredményeként a folyamatos gyógyszeres kezelés ellenére a daganat tömege

újra növekedésnek indulhat. A gyógyszer-rezisztenciának nagy szerepe van a rákterápia sikertelenségében, így leküzdése nagy lépést jelentene a betegség elleni harcban [04] [06].

2.1. MDR jelensége, P-glikoprotein

2.1.1 Multidrog-rezisztencia

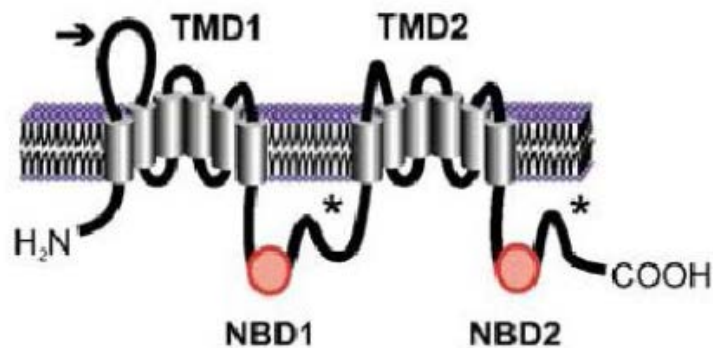
A kemoterápia során gyakran előfordul, hogy nem tűnnek el teljesen a malignus ráksejtek a szervezetből, és az átmeneti javulás után a kezdeti állapotnál is súlyosabb, rezisztens formában tér vissza a betegség. (Ez a sejtekben olykor inherens tulajdonságként is megjelenhet.) Legtöbb esetben a rezisztens sejtek olyan molekuláknak is képesek ellenállni, melyeket nem használtak a kezelésük során. Az ilyen sejteket multidrog-rezisztens rákos sejteknek, a jelenséget pedig multidrog-rezisztenciának (MDR) nevezzük [05] [06] [07].

A multidrog-rezisztencia összefüggésbe hozható a rosszindulatú daganatos sejtek membránfehérjéivel. Több olyan membrántranszportert is képesek kifejezni a sejtek, melyek segítségével kipumpálják a kemoterápiás gyógyszereket, így azok nem tudják kifejteni a toxikus hatásukat. Ezen fehérjék közül az ABC-B1 transzporter tekinthető a legjelentősebbnek [08].

2.1.2. Az ABC transzporter család, az ABC-B1 fehérje

Az ABC (*ATP-binding cassette*) fehérjék olyan transzporter családot alkotnak, melyek energia felhasználásával, vagyis ATP-bontással kisebb molekulákat juttatnak át a sejthártyán. A legtöbb ilyen pumpa egyirányú, eukariótákban általában az ABC fehérjék a citoplazmából az extracelluláris térbe, vagy intracelluláris sejt szervecskékbe (az endoplazmatikus retikulumba, vagy a mitokondriumokba) juttatják a vegyületeket. A humán ABC transzporter család hét alcsaládra osztható ABCA-tól ABCG-ig. Az eddigi kutatások alapján a multidrog-rezisztenciában legnagyobb szerepe az ABC-B1, az ABC-C1, az ABC-C2 és az ABC-G2 fehérjéknek van. Ezek széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, így ha egy tumoros sejt túlexpresszálja valamelyiket, akkor sokféle gyógyszernek képes ellenállni [07][08]. Kutatásom középpontjában az ABC-B1 fehérje áll.

Az ABC-B1, más néven P-glikoprotein (*permeability glycoprotein*, Pgp), vagy MDR1 az egészséges szervezetben fontos szerepet tölt be: védi a sejteket azáltal, hogy kipumpálja belőlük az idegen molekulákat. Megtalálható a májban, a vesékben, a belekben, és nagyon fontos fehérjéje a vér-agy-gát sejteinek. Szerkezeti felépítése a 2.1. ábrán látható [06].



2.1. ábra – teljes (4 doménből álló) ABC-B1
transzporter a sejtmembránban [09]

Ugyanakkor ez a fehérje felelős a csökkent gyógyszer-akkumulációért a multidrog-rezisztens sejtekben. Azokat a molekulákat, amelyeket felismer és képes a sejten kívülre juttatni, szubsztrátjainak, amelyek pedig valamilyen módon gátolni tudják a működését, inhibitorainak nevezzük. Mivel a Pgp-nek a legtöbb ma használatos kemoterápiás gyógyszer a szubsztrátja, azokat el tudja távolítani a tumoros sejtekből, amik így nem tudják kifejteni a hatásukat [07] [10].

2.1.3. MDR leküzdésének módjai, járulékos érzékenység

A multidrog-rezisztencia többféle módszerrel támadható. Az egyik lehetőség a Pgp megkerülése olyan gyógyszerek fejlesztésével, amelyek nem szubsztrátjai a pumpának, de képesek bejutni a rákos sejtekbe, és így elpusztítani azokat. Másik lehetséges módszer a Pgp gátlása, azonban ez komoly mellékhatásokat idézhet elő a szervezetben, hiszen az egészséges sejtekben nagy szükség van a működőképes transzporterre. Ezen a két kutatási területen azonban még nem születtek jelentős eredmények [05] [07].

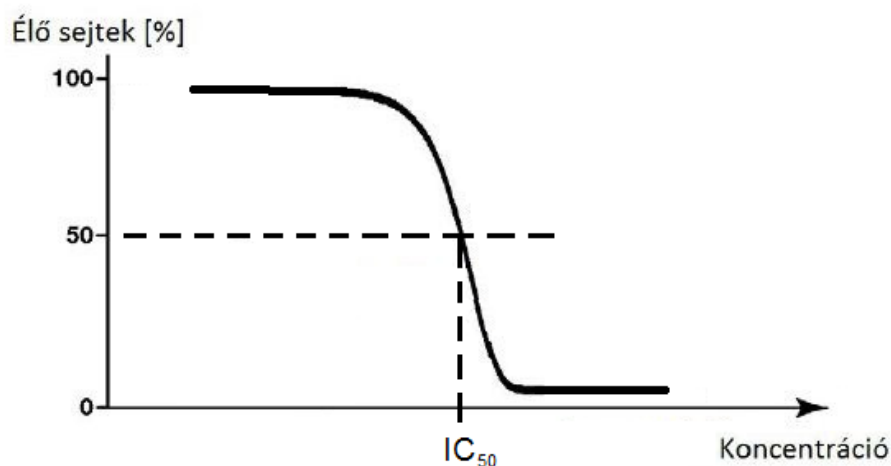
Laborunkban mi a Pgp jelenlétének kihasználását választottuk. Paradox módon léteznek olyan molekulák, amelyek annál könnyebben pusztítják el a daganatos sejteket, minél több Pgp van a sejtek felszínén. Ezt a tulajdonságot járulékos érzékenységnak (*collateral sensitivity*, CS), a jelenséget okozó molekulákat pedig MDR-szelektív vegyületeknek nevezzük. Ezek a molekulák tehát toxikusabbak a multidrog-rezisztens sejtekre [07] [11].

2.2. A multidrog-rezisztencia számokban

Ahhoz, hogy a rezisztencia mérhető legyen, és a kutatások eredményeit össze lehessen hasonlítani, számszerűsíteni kell ezt a tulajdonságot.

2.2.1. Félmaximális gátló koncentráció

Egy vegyület toxikusságát citotoxicitási esszékkel tudjuk mérhetővé tenni. Ez azt jelenti, hogy a vegyületet különböző koncentrációkban hozzáadjuk a sejtekhez, majd adott idő elteltével lemérjük, hogy hány sejt élte túl a kezelést. Az eredményeket a 2.2. ábrán látható dózis-hatás görbékkel ábrázoljuk.



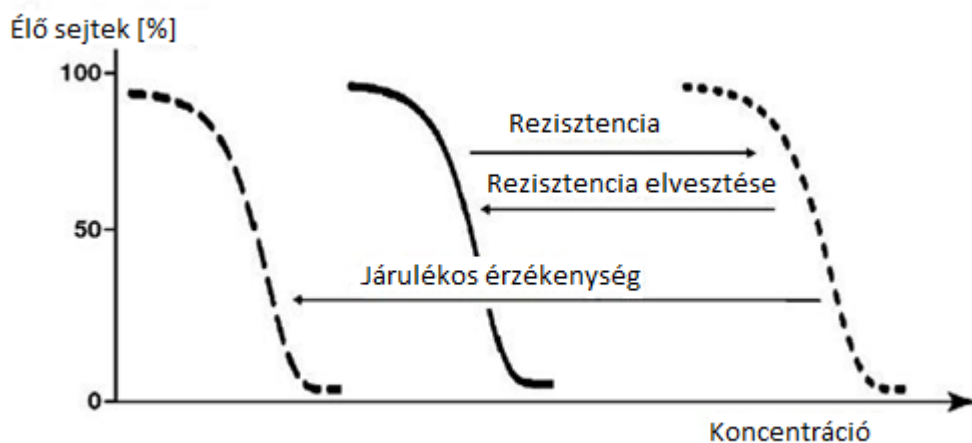
2.2. ábra – a kezelést túlélő sejtek a koncentráció függvényében

IC_{50} -nek (*inhibitory concentration*) nevezzük azt az értéket, amely koncentráción az adott vegyület a sejtszám 50%-át öli meg (a kezelést nem kapott kontroll sejtekhez képest) *in vitro*

kísérletben. Az IC_{50} tehát: félmaximális gátló koncentráció. A 2.2. ábrán látható módon az eredményül kapott grafikonról is le lehet olvasni ezt az értéket [12].

2.2.2. A rezisztencia és a szelektivitás mérése

A rezisztens sejtek elpusztításához egy Pgp-szubsztrátból magasabb koncentrációjú kezelésre van szükség, az MDR-szelektív molekula esetén viszont sokkal kisebb dózis is elegendő a fellépő járulékos érzékenység miatt (lásd a 2.3. ábrán) [12].



2.3. ábra – parentális és rezisztens sejtvonalak viabilitása [16 nyomán]

A multidrog-rezisztens sejtekben mért IC_{50} értéke hagyományos kemoterápiás szer (Pgp-szubsztrát) esetén mindig nagyobb, mint a parentális „párjukban”, míg járulékos érzékenység esetén az MDR-szelektív vegyületre megfordul az arány. Egy sejtvonallal szembeni ellenálló képessége a következő képlettel számszerűsíthető:

$$RR = \frac{IC_{50}(\text{rezisztens})}{IC_{50}(\text{parentális})},$$

ahol RR az ún. rezisztencia hányados (*resistance ratio*), az IC_{50} érték pedig egy adott vegyülethez tartozó félmaximális gátló koncentráció az adott parentális és az abból származtatható rezisztens sejtvonallal. Abban az esetben, ha ez a szám nagyobb egynél, akkor rezisztencia, ha pedig kisebb, akkor járulékos érzékenység áll fent. [12]

Hasonló módon kiszámítható a szelektivitási hányados (SR, *selectivity ratio*) is:

$$SR = \frac{1}{RR}.$$

2.3. DTP adatbázis

A tumoros sejtek sokféleségének köszönhetően új vegyületek teszteléséhez nehéz megfelelő modellt találni. Az amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet (*National Cancer Institute* – NCI) összeállított egy gyűjteményt, amelybe a klinikumban előforduló 60 különböző humán rákos sejtvonalat vettek fel, ez az NCI-60. Ezen a listán különböző eredetű tumoros sejtvonalak szerepelnek: agy-, vér-, csontvelő-, mell-, vese-, tüdő-, petefészek-, prosztatata- és bőrrák. 1992 óta ezek a sejtvonalak adják számos tudományos kísérlet alapját: immár több mint 100 000 kémiai vegyület farmakológiai karakterizációja, kromoszóma kariotipizálás, és különböző DNS microarray platformok segítségével génexpresszió analízise valósulhatott meg [14].

Az NCI egyik fő fejlesztési részlege a Developmental Therapeutics Program (DTP), melynek része egy egyedülálló adatbázis (NCI-60 Tumoros Sejtvonal Vizsgálat - *NCI-60 Tumor Cell Line Screen*), amelyben majdnem 50 000 vegyület citotoxicitási értékei szerepelnek. A molekulákat az NCI-60 panel összes sejtvonalán letesztelték, így információt kapunk az összes vegyület sejtvonal-specifikus toxicitásáról [15].

3. Célkitűzés

Célom volt Pgp-t túlexpresszáló sejtek ellen hatékony vegyületek keresése az NCI DTP adatbázisában, matematikai algoritmus segítségével. Az algoritmus korrelációs számítást és szűrési lépéseket tartalmaz. Az azonosított MDR-szelektív vegyületek közül egyet kiválasztottam, és hosszú távon kezeltem vele egy multidrog-rezisztens rákos sejtvonalat. Ezzel az ellenállóképesség csökkentése volt a célom.

4. Anyag és módszer

4.1. Vegyületek keresése, szűrése, csoportosítása

4.1.1. *In silico screening*

Az *in silico screening*hez a DTP nyilvános és ingyenesen elérhető, 2010-ben kiadott adatbázisát vettem alapul [12]. Ez 49 169 vegyület kísérleti eredményeit tartalmazza az NCI-60 rákos sejtvonalakon. Az adatbázisban szereplő citotoxicitási értékek (X) a következő képlet alapján kaphatók meg:

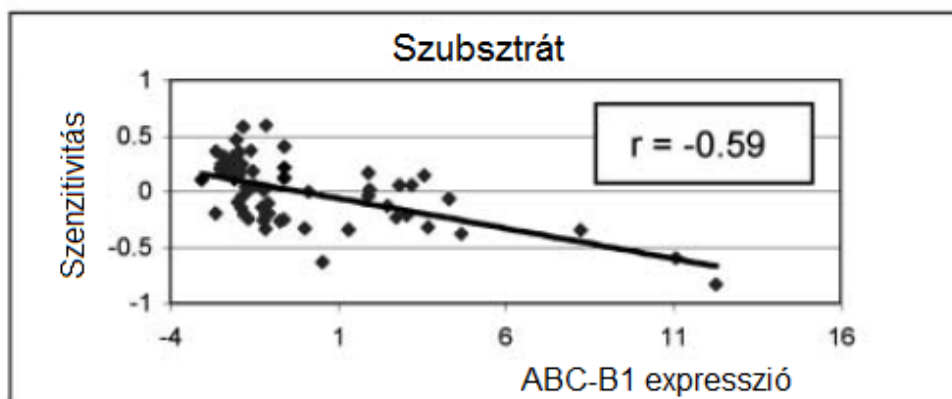
$$X = -\lg (IC_{50}),$$

ahol az IC_{50} az adott vegyület adott sejtvonalra vonatkozó IC_{50} értéke. Így tehát ha például egy molekula IC_{50} értéke 10^{-4} M, vagyis ezen a koncentráción képes elpusztítani az adott sejtek felét, akkor a táblázatban szereplő X értéke 4.

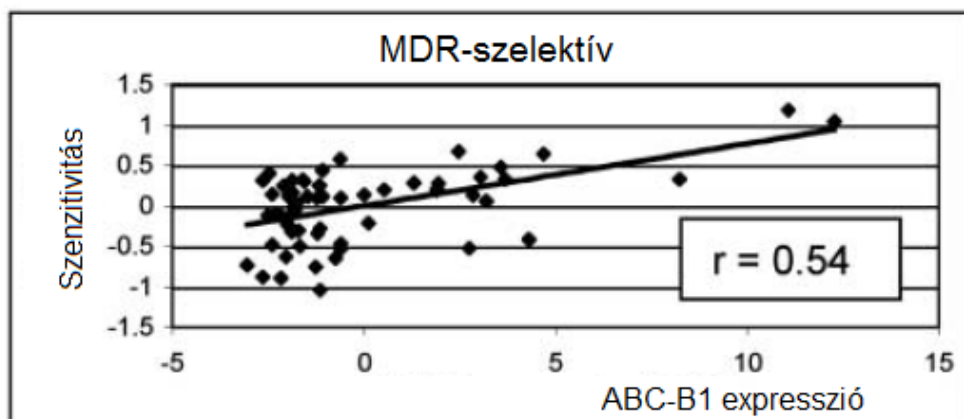
Olyan vegyületek kereséséhez, amelyek annál toxikusabbak, minél több Pgp-t tartalmaz egy adott sejt, ismernem kellett a sejtvonalak Pgp expressziójának a szintjét. Ezeket a méréseket a kutatócsoportunk már korábban elvégezte, így rendelkezésemre álltak az adatok az NCI-60 panel sejtvonalaiban a Pgp mennyiségéről. A méréseket PCR (*polymerase chain reaction*) készülékkel mérték, az mRNS szintjét határozták meg. Az eredményül kapott mRNS szintek egy relatív skálán értelmezhetők. Összehasonlítva az értékeket a rezisztens sejtekben kimagasló az ABCB1 szintje [07].

Az *in silico screening* első lépéseként Pearson-korrelációt számoltam minden vegyület toxicitási értéke (IC_{50}) és a sejtvonalak Pgp-mennyisége (mRNS szint) között. A kiszámított Pearson korreláció (egy -1 és 1 közötti szám) megmutatja, hogy van-e ilyen összefüggés közöttük. A pozitív korrelációs együttható MDR-szelektivitásra, a negatív együttható Pgp-szubsztrátra utal. Azokat a találatokat tekintettem szelektívnek, melyeknél szignifikáns volt a korreláció: $r \geq 0,4$.

A Pearson korreláció lehetséges kimeneteleit az 4.1. és 4.2. grafikonok szemléltetik. A vízszintes tengelyen a Pgp mennyisége, függőlegesen pedig a sejtek érzékenysége látható.



4.1. ábra – egy Pgp-szubsztrát korrelációja [10 nyomán]



4.2. ábra – egy MDR-szelektív vegyület korrelációja [10 nyomán]

Azon szerek lehetnek MDR-szelektívek, amelyek eredményeire pozitív meredekségű egyenes illeszthető (vagyis ahol egyenes arányban áll a toxikusság és a Pgp mennyisége). Amelyekre konstans, vagy közel konstans függvény illeszkedik, azoknál nincs összefüggés a toxicitás és a Pgp mennyisége között. Amelyeknél fordított arány figyelhető meg (negatív meredekségű egyenes illeszthető az eredményekre), azok a vegyületek feltételezhetően Pgp-szubsztrátok [07].

A következő lépésben kiszűrtem a nem értékelhető adatokat és a nem toxikus molekulákat. Ha a DTP adatbázis készítésekor a mérések során egy molekula nem bizonyult

toxikusnak, akkor az IC_{50} értéknek a legnagyobb alkalmazott koncentrációt adták meg, így lehetővé válik az ilyen vegyületek szűrése. Összesítettem, hogy egy vegyületnél az IC_{50} helyett hányszor szerepel NA (non available, hiányzó adat) a táblázatban, illetve van-e olyan érték, ami sokszor ismétlődik (ez legtöbbször a toxicitás hiányára utal). Azokat a vegyületeket is kiejtettem a szűrőn, amiknél ilyen értékek összesen 30-nál (vagyis a tesztelt sejtvonalak 50%-ánál) többször fordulnak elő. Ez azért volt fontos, mert így a Pearson korrelációt 30-nál több adatpontra vettem fel, így a kapott eredmények megbízhatóbbak.

4.1.2 Klaszterezés, szerkezeti csoportosítás

A DTP-ből azonosított vegyületek a PubChem adatbázisában is szerepelnek. A főoldalon strukturális klaszterezés (*Chemical Structure Clustering*) indítható a vegyületek kémiai azonosítói (SID - *substance identification*) alapján. A klaszterező eszköz a szerkezeti hasonlóságon alapuló egyszerű láncmódszer (*Single Linkage*) algoritmussal dolgozik (szerkezeti *fingerprint* használatával) [16] [17] [18] [19].

Az egyszerű láncmódszer összevonáson alapuló klaszterelemzési eljárás, amely két halmaz közötti távolságot a két legközelebb levő elemük távolsága alapján határozza meg [17] [19]. Így tehát C_1 és C_2 halmaz távolsága:

$$d(C_1, C_2) = \min(d(c_1, c_2)) ,$$

ahol $c_1 \in C_1$, $c_2 \in C_2$, és d a távolság jele.

A távolságot a program Tanimoto (Jaccard) koeficienssel számítja, a következő képlettel:

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|},$$

ahol A és B a két összehasonlítandó elem, J pedig a távolságuk. A J a $[0, 1]$ tartomány eleme, 0, hogyha a két összehasonlított érték teljesen különbözik, 1 pedig, ha teljesen azonosak [17].

A Chemical Structure Clustering oldalon *Substance input*-ként a molekulák azonosítóit tartalmazó SID listát adtam meg, outputként pedig az online program egy dendogramot ad, amelyet kép (png), csv (*comma-separated values* – vesszővel elválasztott értékek), xml, vagy

kódolt gráf (*graph modelling language*, GML – gráf modellező nyelv) formátumban lehet exportálni. Dolgozatomban a kép formátumú eredményt mutatom be, mert arról leolvasható a vegyületek Tanimoto távolsága, és így a dendogram szemléletes [16].

4.2. *In vitro* tesztek – a toxicitás vizsgálata

Az *in silico screening* során újonnan megtalált vegyületek közül megpróbáltunk minél többet beszerezni, hogy a laborunkban tenyésztett sejtvonalakon *in vitro* is tesztelni tudjuk a toxikusságukat.

4.2.1. A felhasznált sejtvonalak

A vizsgálatainkhoz a következő sejtvonalat használtuk fel:

- HCT-15: MDR-pozitív rezisztens sejtvonal, humán vastagbélrák eredetű, egyike az NCI-60 panel sejtvonalainak. Nincsen MDR-negatív „párja”.
- Mes-Sa: uterine szarkóma, parentális, MDR-negatív sejtvonal.
- Mes-Sa/Dx5: a Mes-Sa doxorubicinnel szelektált derivátuma, rezisztens törzs.
- KB: MDR-negatív parentális sejtvonal, HeLa eredetű.
- KB-VIN: a KB sejtek vinkrisztinnel szelektált derivátuma, rezisztens sejtvonal.

A sejteket RPMI (HCT-15, KB, KB-VIN) illetve DMEM (Mes-Sa és Mes-Sa/Dx5) médiumban tenyésztettük, melyhez antibiotikumokat (penicillin, sztreptomycin), L-glutamint és 5% FBS-t (*fetal bovine serum*) adtunk hozzá. Az inkubáció 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett történt. Hetente kétszer passzáltuk a sejteket.

A sejtszámlálás a kísérletekhez a BioRad TC20 automata sejtszámolóval történt.

4.2.2. Citotoxicitási esszé összeállítása

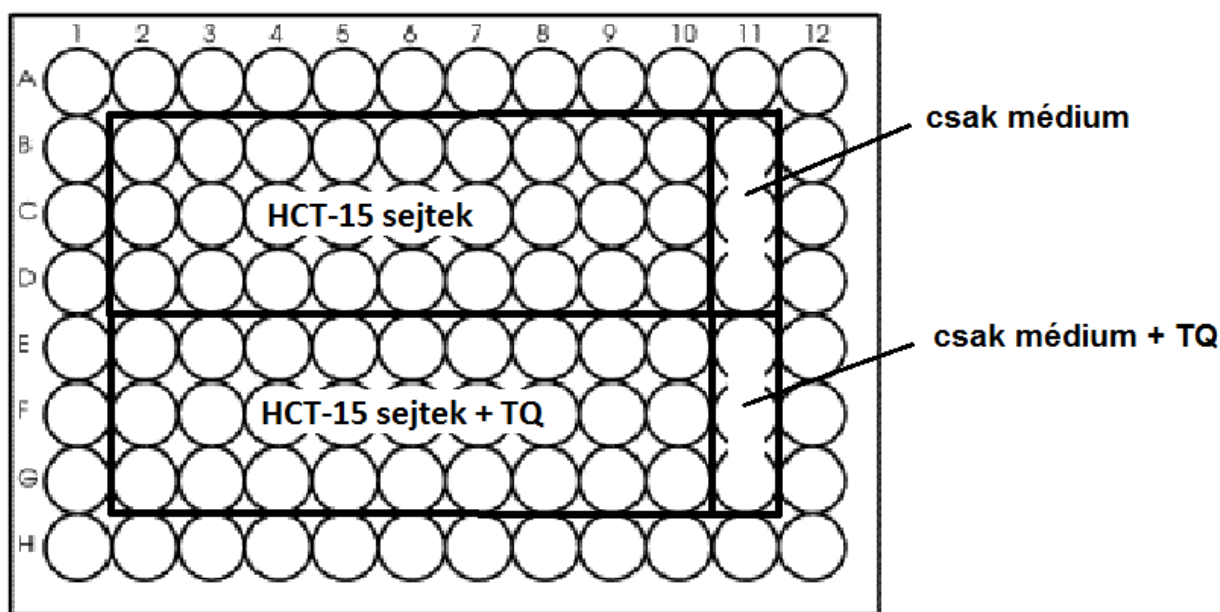
A vegyületek, amelyekkel dolgoztunk a DTP-től származnak.

A kísérleteket 96 lyukú mikrolemezeken (Greiner Bio-One) végeztük. Mindegyik kísérlethez első nap 10³/100 µl sejtszámot raktunk ki a lemezekre. *Overnight* inkubáció után, ami alatt a sejtek letapadtak a lemez aljára, hozzáadtunk 100 µl-t a tesztelni kívánt vegyületből.

Egy lemezre egy vegyület különböző koncentrációjú oldatait pipettáztuk, melyeket hígítási sor alapján készítettünk el, és koncentrációnként 3-3 párhuzamos *well*-hez adtuk hozzá (így létrehoztunk kontrollt is). 72 órával az oldatok hozzáadása után kezdtük el a mérést, amit Presto Blue esszével végeztünk el.

Mivel a HCT-15 sejtnak nincs olyan „sejtvonal-párja”, ami nem rezisztens, tehát nincs mivel összehasonlítani az eredményeket, ezért a lemezen a sejtek egyik feléhez inhibítort (Tariquidart – TQ) adtunk, ami gátolja a Pgp működését. Így igazolható, hogy egy vegyület a sejtekben expresszálandó Pgp funkciója miatt toxikusabb az adott sejtre (vagyis valóban szelektív).

A lemezeink összeállítása a 4.3. ábrán látható.



4.3. ábra – a lemezek elrendezése

A legszélső oszlopokba és sorokba csak PBS (izotóniás sóoldat) került, hogy a folyadékok párolgása miatt pontosabb adatokat kapjunk. A 2. oszlopba került a vegyület legfőnyebb koncentrációja, ami biztosan letális minden sejtre, majd egyre hígabb oldatok egészen a 10. oszlopig. A 11. oszlopba kontroll került, ahogy az ábrán látható.

A Mes-Sa és Mes-Sa/Dx5 sejtvonalakon végzett tesztek során a B-D sorokba a parentális, az E-G sorokba a rezisztens sejtvonalat tettük ki a főnti ábra mintájára. Azon szerek esetében, amelyeknél látható különbség volt a parentális és a rezisztens sejtek viabilitása között, minden esetben elvégeztük a kísérletet Tariquidaros médiumban kitett sejtekkel is, hogy igazoljuk a Pgp-mediálta hatást.

A citotoxicitási esszékkal vizsgáltuk, hogy egy szer szelektív-e, vagy szubsztrátja a Pgp-nek, vagy esetleg hatástalan a sejtvonalakra. A kísérletek végén ilyen tesztekkel tudtuk igazolni azt is, hogy a Pgp-jüket elvesztett HCT-15 sejteket el lehet pusztítani hagyományos kemoterápiás szerekkel, amelyekre eredetileg rezisztensek voltak (lásd bővebben az 5.3.5. pontban).

Presto Blue esszé menete:

A 72 óra inkubáció után eltávolítottuk a sejtekről a médiumot, majd hozzáadtunk 100 µl médiumban oldott 5%-os PrestoBlue Cell Viability Reagenst (Invitrogen). Egy óráig inkubáltuk 37°C-on a lemezeket, majd lemértük a fluoreszcenciát. 540 nm-es szűrővel (sávszélessége 8 nm) gerjesztettük a sejtek által redukált reagenst, és 579 nm-es szűrővel mértük (sávszélessége 25 nm). A méréshez a Perkin Elmer VictorX3 Multilabel Plate Reader eszközt használtuk.

4.3. *In vitro* tesztek – a szelekció

Az *in silico* kereséssel kapott, *in vitro* letesztelt és szelektívnek bizonyult vegyületek közül kiválasztottuk az Sz1079 kódú molekulát, majd IC₅₀ értéke és a citotoxicitási eredményei alapján meghatároztuk azt a koncentrációt, amin még nem öli meg a sejteket, csak kellő stresszhatást gyakorol rájuk – ez a szubtoxikus koncentráció 0,1 µM volt. Ilyen töménységű médiumban tartottuk a sejteket négy héten keresztül. Két hét pihentetés után megemeltük a koncentrációt két lépésben: 0,2 majd 0,25 µM-os, toxikus koncentrációjú oldattal kezeltük a sejteket további három hétig.

A kezelt sejtvonal mellett a kísérlet során végig fenntartottunk kontrollnak egy kezeletlen populációt is. A kezelések megkezdésekor, közben a kihagyott időszakban, és befejezésük után is folyamatosan figyelemmel kísértük a sejtekben a Pgp-szint változását. Ehhez a következő tesztek alkalmaztuk:

- a sejtfelszíni Pgp expresszió mérésére: MRK16 esszé

- a Pgp funkciójának ellenőrzésére: CalceinAM (Ca-Am) esszé
- a Pgp-t kódoló mRNS jelenlétének igazolására: qPCR mérések
- a Pgp fehérje kimutatására a sejtekben: Western blot
- 96-lyukú lemezekon végzett 72 órás citotoxicitási esszék

4.3.1. Pgp sejtfelszíni expressziójának mérésére: MRK16 esszé

Az áramlási citometriás méréseket Becton Dickinson FACS Calibur készülékkel végeztük. Az eredmények kiértékelése CellQuest Pro programmal történt.

A jelölés lényege, hogy a sejtek felszínén expresszáldó Pgp-hez egy specifikus antitest kötődik, amit egy második, fluoreszcens antitesttel láthatóvá teszünk. Kontrollnak egy elsődleges antitesttel azonos típusú antitest aspecifikus kötődését mértük.

ABCB1 indirekt jelölés (MRK16-tal):

A jelölendő sejtekből azonos mennyiséget vettünk ki beállításonként (FACS-csőenként), és 0,5%-os BSA-s PBS-sel mostuk őket a tápoldat eltávolításához. Az elsődleges jelöléshez szükséges antitestek:

- 5 µl egérből származó IgG2a került az izotípus kontroll FACS-csőbe
- 0,5 µl MRK16 (egér) antitestet tettünk a mérő FACS-csőbe.

A jelölés 50 µl térfogatú BSA-s PBS-ben, 37°C-on, rázatás közben, 30 percig tartott. Az inkubáció végeztével ismét megmostuk a sejteket BSA-s PBS-sel, így eltávolítottuk a sejtekhez nem kötődött antitesteket, majd centrifugálás után következett a másodlagos antitesttel történő jelölés: 5 µl GAM (*goat anti-mouse*)-PE IgG2a került minden FACS-csőbe.

A jelölés ismét 50 µl BSA-s PBS-ben történt az első inkubációval megegyező körülmények között. A jelölés után újra megmostuk, majd centrifugáltuk a sejteket, leöntöttük a felülúszót. A méréshez PBS-ben szuszpendáltuk fel a sejteket, illetve közvetlenül a mérés előtt 0,5 µl 1 µM-os TOPRO festéket pipettáztunk hozzájuk, amely csak a halott sejtek membránján keresztül képes a sejtekbe jutni, így lehetővé teszi az elkülönítésüket az élőktől.

4.3.2. Pgp funkciójának igazolására: efflux esszé (CalceinAM)

Akárcsak az MRK16-al való jelölés esetén, a méréseket itt is a Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométerrel végeztük, a kiértékelés CellQuest Pro programmal történt. A mérés alapja, hogy a fluoreszcens calcein vegyületet a funkcionáló Pgp-t tartalmazó sejtek képesek kipumpálni, így sejtekre lebontva kaphatunk információt a calcein akkumulációjáról.

Ca-AM felvétel protokollja:

Mintánként két FACS-csövet használtunk, egyet a verapamillal (Pgp inhibitor) kezelthez és egyet a verapamil nélkülihez.

A sejtekből beállításonként azonos mennyiséget használtunk fel. A sejtekről centrifugálással eltávolítottuk az FBS tartalmú médiumot, és csövenként 100 µl szérummentes tápban vettük fel őket. Az első lépés a verapamillal történő preinkubáció volt:

- 0,5 µl verapamilt (20 mM, DMSO-ban oldva) 50 µl DMEM-ben oldva a gátlószeres FACS csőbe pipettáztunk
- 0,5 µl DMSO 50 µl DMEM-ben oldva a gátlószer nélküli FACS csőbe került.

Ezeket a mixeket hozzáadtuk a sejtekhez, majd 5 percre 37°C-os vízfürdőben hagytuk. Ekkor 150 µl szérummentes tápban inkubálódtak a sejtek.

Az 5 perces előinkubáció leteltével ugyanolyan sorrendben, mint az első lépésnél, hozzáadtunk minden csőhöz 0,5 µl Ca-AM oldatot (100 µM-os) 50 µl DMEM-ben, majd egy óvatos vortexelés után 10 percig inkubáltuk a 37°C-os vízfürdőben a csöveket.

A főinkubáció leteltével 1 ml jéghideg PBS-el állítottuk le a folyamatot, majd 4°C-on lecentrifugáltuk a csöveket. Centrifugálás után a leülepedett sejtekről leöntöttük a felülúszót, és jéghideg FACS-hoz való PBS-ben szuszpendáltuk fel őket.

A csöveket a mérés kezdetéig jégen tartottuk. Közvetlenül a mérés előtt 0,5 µl TOPRO (1 µM-os) festéket adtunk a sejtszuspenziókhöz, hogy az apoptotizáló sejtek elkülöníthetők legyenek.

4.3.3. RNS szint mérése

RNS izolálása:

A lecentrifugált sejtekhez PeqGold TriFast reagenst adtunk, és a pipettaheggyel összekeverjük őket. A TriFast-os szuszpenziót a felhasználásig -80°C -on tároltuk az RNS bomlásának megakadályozása érdekében.

A szétesett sejtekhez kloroformot adtunk (a TriFast 20%-át), ami kicsapta a fehérjéket a szuszpenzióból, majd 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 4°C -on lecentrifugáltuk. Centrifugálás után a minta három fázisra vált szét: az alsó fázisban TriFast, a középső fázisban fehérje és DNS, a felülúszóban RNS volt. A felülúszót kipipettáztuk egy steril eppendorf csőbe. Az RNS mintához 1:1 arányban izopropanolt adtunk, összeráztuk és 10 perces inkubáció után lecentrifugáltuk. A felülúszó leöntése után 1 ml 75%-os EtOH-t adtunk a szuszpenzióhoz, vortexeltük, majd újra lecentrifugáltuk. Végül a felülúszó leöntése után a csapadékot levegőn megszárítottuk, majd RNS- és DNS-bontó enzimektől mentes vízben beoldottuk. A mintákat -80°C -on tároltuk a későbbi átírásig.

RNS-ből cDNS átírás:

Az átíráshoz a következő vegyületeket pipettáztuk össze: 4 μl MgCl_2 , 2 μl tízszeres puffer, 2 μl dNTP, 1 μl random primer, 0,5 μl RNA-zin, 1 μl reverz transzkriptáz, 9,5 μl H_2O mintánként. 10 percig 70°C -on inkubáltuk a mixeket, ezalatt történt a cDNS átírása. Az átírás befejeztével a mixet 100 μl -re egészítettük ki H_2O -val, hogy 100 μl végtérfogatot kapjunk.

RT-PCR plate összeállítása:

Egy eppendorf csőben elkészítettük a master mixet, majd egy 96 lyukú PCR lemezen szétosztottuk a megfelelő *well*-ekbe. Egy reakciótérbe a következők kerültek: 5 μl kétszeres Taqman mix, 2,5 μl cDNS (minden mintából 2,5 μl), 0,5 μl primer, 2 μl H_2O , így mindenhol 10 μl lett a végtérfogat. Optikai fóliával lefedtük a lemezt, és behelyeztük az RT-PCR készülékbe. A gépben negyvenszer futott le a következő ciklus: 10 percig inkubálódott a lemez 95°C -on, majd 1 percig 60°C -on (ekkor történt a detekció).

A mérésekhez Applied Biosystems cég StepOnePlus Real-Time PCR készülékét használtuk.

4.3.4. Fehérjeszint mérése

A Pgp mennyiségét Wester blottal ellenőriztük. A futtatáshoz szükséges a sejtes minták összfehérje mennyiségének ismerete.

Összfehérje mennyiségének meghatározása hosszú Lowry módszerrel:

BSA standarddsor: 0, 5, 10, 25, 50, 75 μ l 1 mg/ml-es BSA oldatot pipettáztunk 1 ml desztillált vízbe.

A sejtes mintákat szonikáltuk, majd 5-5 μ l-t pipettáztunk 1 ml desztillált vízbe. Minden eppendorf csőbe 10-10 μ l 2%-os DOC-ot (deoxicholat) adtunk, vortexeltük és 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután 350 μ l 25%-os TCA-t (triklór-ecetsav) adtunk hozzájuk, 3-5 perc inkubáció után vortexeltük, és lecentrifugáljuk a mintákat 4°C-on. Fugálás után eltávolítottuk a felülúszót, így tiszta fehérje csapadékot nyertünk. A csapadékokhoz Lowry reagenst adtunk (frissen készített, 98% Lowry-A, 1% Lowry-B és 1% Lowry-C reagens keveréke), majd vortexelés után desztillált víz és Folin ciocalteu's phenol reagens 1:1 arányú keverékéből adtunk hozzájuk 100 μ l-t. Keverés után 45 percig inkubáltuk. A fehérjemennyiség megállapításához 660 nm-en mértük az abszorbanciát, Perkin Elmer Lambda 12 típusú spektrofotométerrel.

A félretett fehérjeminták és a hozzájuk rendelhető összes fehérje mennyiségéből kiszámítható, hogy a futtatáshoz mennyi fehérjét kell egy-egy mintából egy-egy zsebbe bemérni.

Fehérjefuttatás:

A fehérje futtatást a hagyományos módszerrel, gélöntéssel végeztük el. A gél összetétele (7,5%-os SDS-PAGE) a 4.4. táblázatban olvasható.

	lapgél	fésűgél
H ₂ O	4,8 ml	2,7 ml
30%-os akrilamid	2,5 ml	1 ml
TRIS - HCl (0,5 M)	7,5 ml	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10% APS	100 µl	50 µl

4.4. táblázat – a fehérjefuttatáshoz használt gélek összetétele

A futtatás két szakaszban zajlott (60 V, 25 mA a fésűgél aljáig, majd 100 V, 35 mA a lapgél aljáig). Futtatás után a gélét lemostuk transzfer pufferben, majd összeállítottuk a transzfer rendszert, amit egy transzfer puffert tartalmazó kádba tettük, a kádat pedig jégre, így megakadályoztuk a fehérjék hődenaturációját. A blottolást 79 V-on, 250 mA-rel, 60 percig végeztük.

A blottolás után TBS-Tweenben mostuk a PVDF membránt, majd 1 órán keresztül 5%-os TBS-Tween-tejben áztattuk, ezzel blokkoltuk. A detektáláshoz elsődleges antitestként egérben termeltetett, humán MDR1 specifikus IgG ellenanyagot (*overnight* inkubációval, 1:1000 hígításban), másodlagos antitestként pedig kecskében termeltetett, HRP-konjugált egér IgG elleni antitestet (1 órás inkubáció, 1:20000 hígítás) használtunk. A membránt ECL (Bio-Rad) reagenssel mostuk át, detektáló ólomkazettába helyeztük, majd sötétszobában előhívtuk. Megfelelő fehérje mólsúly marker (Fermentas) mellett az MDR1 fehérje jelenléte így meghatározható.

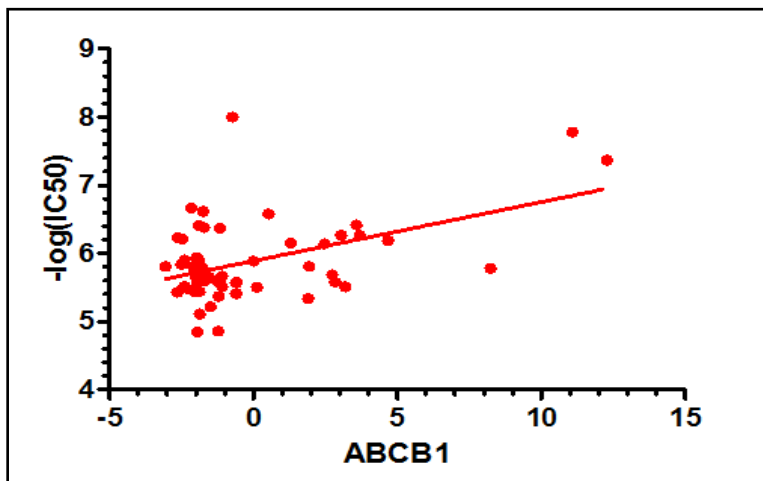
Kontrollként az aktin fehérjét is megjelöltük a membránon (egérben termeltetett humán β -aktin elleni antitestet használtunk elsődleges, és kecske egér elleni antitestjét másodlagos antitestként), majd azt is előhívtuk.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Számítógépes keresési és csoportosítási eredmények

5.1.1. *In silico* eredmények

A szűrés első lépéseként kiszámítottuk a DTP szűrésében használt NCI-60 sejtpanelben szereplő sejtek Pgp expressziójának és a rajtuk tesztelt vegyületek toxikusságának Pearson korrelációját. Ahogy a 4.1.1. pontban leírtam, azokat a vegyületeket tartottuk bent, amelyek esetében a korreláció nagyobb volt 0,4-nél. Az 5.1. ábrán látható a leghatásosabb molekula (az Sz1079, lásd: 4.3. pontban) toxikussága és a sejtek Pgp mennyiségének Pearson korrelációja, a 4.2. ábra mintájára a grafikonról is feltételezhető, hogy a vegyület MDR-szelektív.



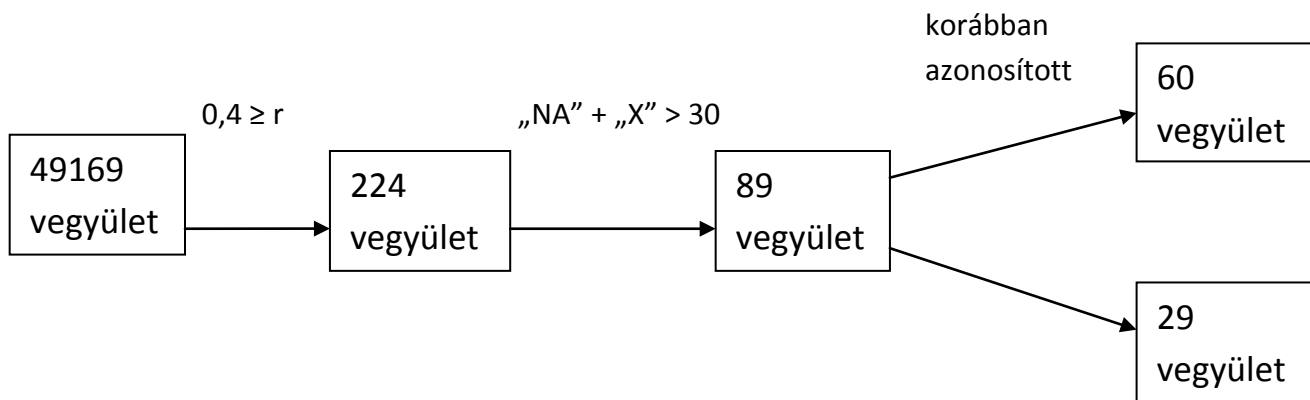
5.1. – az Sz1079-es MDR-szelektív molekula Pearson korrelációja

A szűrés után a 49169 vegyületnek csupán a 0,5%-a marad meg, az összes többi molekula esetében nincs, vagy túl kicsi, vagy esetleg negatív az összefüggés a transzporter jelenléte és a toxikusság között. Kaptunk viszont eredményül 224 potenciálisan MDR-szelektív gyógyszer-jelölt molekulát.

A következő lépésben kivettük azokat a találatokat, amelyek nem teljesen megbízhatóak, nincs elegendő mennyiségű pontos adat megadva hozzájuk. Így 89 molekulánk maradt. Ezek

közül 60-at a laborcsoportunk egy korábbi *screening* során már megtalált, és amelyek elérhetőek voltak, azokat letesztelték, az eredményeit publikálták [11]. Mi tehát 29 új vegyületet azonosítottunk, és vizsgáltunk tovább *in vitro* kísérletekben.

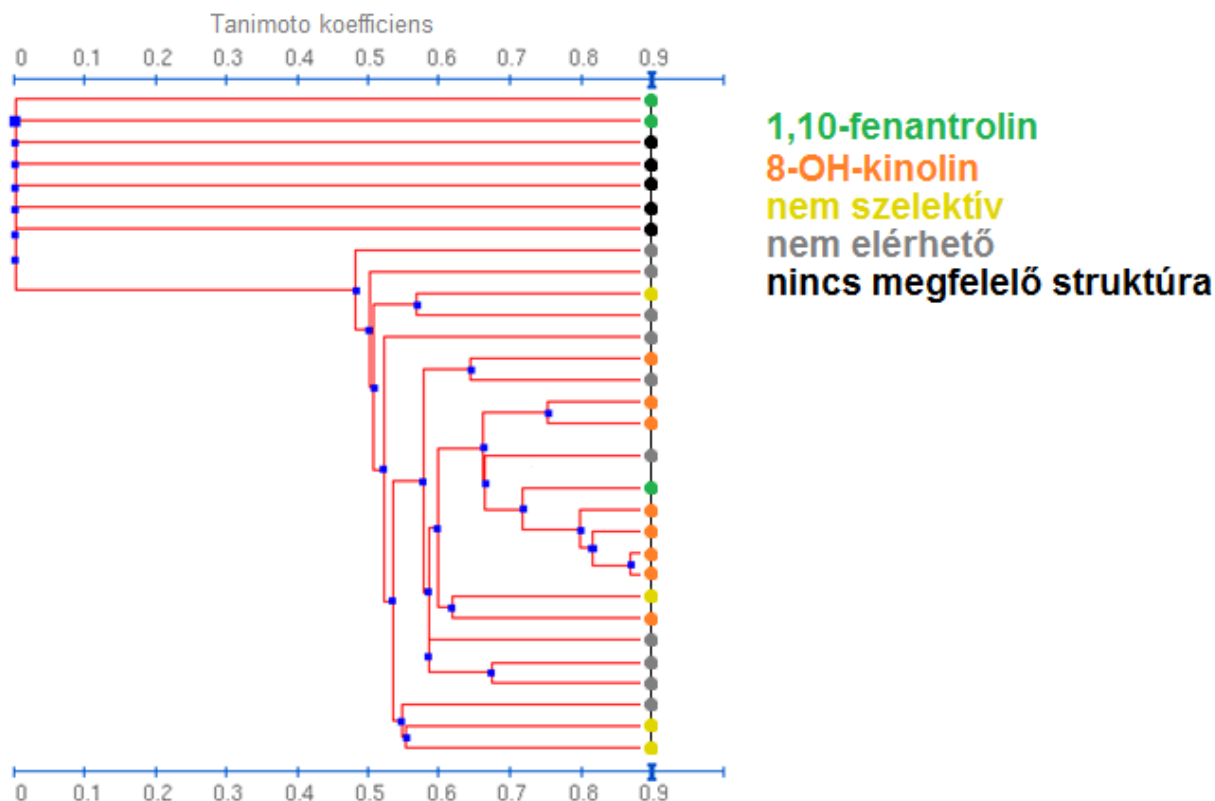
Az 5.2. folyamatábrán követhető végig a vegyületek keresése és szűrése.



5.2. ábra – *in silico* screening

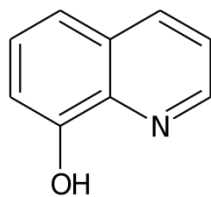
5.1.2. A vegyületek csoportosítása

A 29 újonnan azonosított molekula közül 15 nem volt elérhető számunkra, a maradék 14-et rendelkezésünkre bocsátotta a DTP, ezeket leteszteltük. A 14 vegyület közül 10 valóban szelektívnek bizonyult *in vitro* kísérletekben is. (Bővebben lásd az 5.2. pontban.)

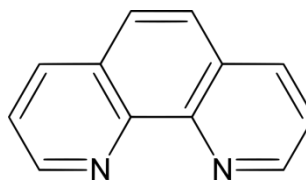


5.3. ábra – a szerkezeti csoportosítás eredménye

Az 5.3. ábra a kémiai klaszterezés eredményét mutatja be. Mind a 29 megtalált vegyületet és az 1,10-fenantrolint ábráztuk. Azokat a molekulákat, amiken *in vitro* tesztek is végeztünk (bővebben lásd: 5.2. bekezdés), színes pont jelöli. A szürke ponttal jelöltek nem voltak elérhetőek tesztelésre, a feketéknek pedig a PubChem adatbázisban nincs olyan szerkezeti leírása, amelyet össze tud hasonlítani a program a többi molekuláéval. Két fő kemotípust állapítottunk meg: 1,10-fenantrolinok (zöld színnel) és 8-hidroxi-kinolin (8-OH-kinolin) származékok (narancssárga színnel). Az 5.4. és 5.5. ábrákon látható e két kemotípus szerkezete. Ez a két csoport megfelel a korábban talált eredményeknek [11]. Mivel a fenantrolinok szerkezetét nem tudta kezelni a program, ezért tettük be az 1,10-fenantrolin alapvázat, hogy meg tudjuk becsülni az elhelyezkedésüket a klaszterekben. A négy molekula közül, amelyek nem bizonyultak szelektívnek (sárga színnel), három egyértelműen kívül esik azokon az ágakon, amelyeken a 8-OH-kinolinok és a fenantrolinok helyezkednek el. Ezekből az adatokból látszik, hogy a szelektív vegyületek szerkezeti hasonlóságot mutatnak.



5.4. – 8-hidroxi-kinolin

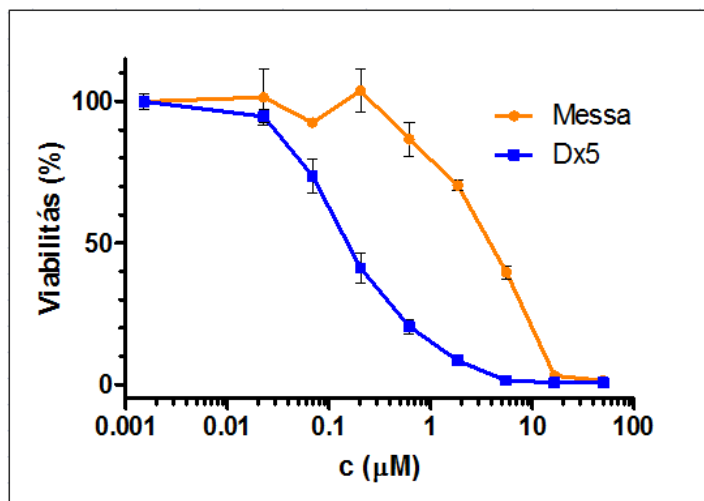


5.5. – 1,10-fenantrolin

5.2. *In vitro* tesztek eredményei – citotoxicitási esszék

A laborcsoportunk a 14 rendelkezésünkre álló vegyületre citotoxicitási esszét állított fel Mes-Sa – Mes-Sa/Dx-5 sejtvonalakon. A 14 molekula közül 10 bizonyult MDR-szelektívnek, 2 toxikusnak, de nem Pgp-vel arányosan, 2 pedig nagy koncentrációban sem volt toxikus.

A tíz MDR-szelektív vegyület közül két molekula kiemelkedő, 10 fölötti szelektivitási hányadossal rendelkezik a Mes-Sa és Mes-Sa/Dx5 sejtekre, és mindkettő 8-hidroxi-kinolin származék. Az 5.6. ábrán bemutatom a leghatékonyabb molekula (Sz1079, amelyet szelektálásra kiválasztottunk, lásd bővebben a 4.3. pontban) citotoxicitási eredményét. A grafikonon jól megfigyelhető, hogy a vegyület valóban szelektív. A 2.2.2. pontban leírt definíciónak megfelelően a szelektivitási hányadosa 26,37.



5.6. ábra – a leghatékonyabb MDR-szelektív vegyület (Sz1079) toxicitása

Mes-Sa és Mes-Sa/Dx5 sejtekre

Két vegyület, amelyek szelektivitása közepesen erős (5-6 közötti), fenantrolin komplex, míg a többi 6, viszonylag kis szelektivitással bíró molekula szintén a 8-OH-kinolinokhoz köthető.

A 10 szelektív vegyület szelektivitási hányadosa (SR) és kemotípusa az 5.7. táblázatban látható összesítve.

<i>hány darab vegyület</i>	<i>SR</i>	<i>milyen kemotípus</i>
2	10<	8-OH-kinolin
2	5-6	fenantrolin
6	1,5-5	8-OH-kinolin

5.7. táblázat – az MDR szelektív vegyületek szelektivitási hányadosa

5.3. In vitro kísérletek - a szelekció hatásossága

A HCT-15 sejtekben a leghatásosabbnak bizonyult Sz1079-el történő szelekció hatására a Pgp expresszió már szubtoxikus koncentráció alkalmazásakor is lecsökkent, majd IC₅₀ érték közeli koncentráció alkalmazásakor is folytatódott ez a tendencia. Ezt igazoltuk efflux esszékkal, 96 lyukú lemezen citotoxicitási tesztekkel, mRNS méréssel qPCR készülékkel és Western blottal a fehérjék mérésével is.

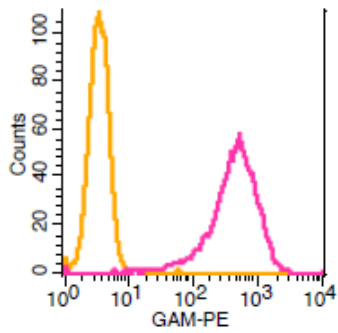
5.3.1. MRK16 esszé a Pgp sejtfelszíni jelenlétének igazolására

Az MRK16 sejtfelszíni epitóphoz kötődik, akkor is, ha az gátolva van. A kötődött antitesthez tud aztán kapcsolódni fluoreszcens antitest, így az áramlási citométer a sejtek fluoreszcens intenzitását méri le. Ilyen módon azt is igazolni tudtuk, hogy a kezelés során a sejtekben nem csupán gátoltuk a Pgp-t, hanem valóban csökkent az expresszió, eltűnt a transzporter a sejtek felszínéről.

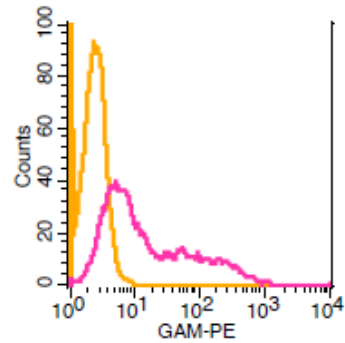
Az 5.8 – 5.13. grafikonoknál tehát a magas intenzitású jelek olyan sejtektől származtak, melyekben sok volt a Pgp, amihez sok fluoreszcens antitest kötődött. A függőleges tengelyen a sejtszám (*counts*), a vízszintesen a fluoreszcencia intenzitása ábrázolódik. Sárga jellel látható az

izotípus kontroll (isoAb), amire nem Pgp-specifikus, hanem egy aspecifikus antitest került. A rózsaszín jel pedig tulajdonképpen a sejtfelszíni Pgp mennyiségét mutatja meg.

Szubtoxikus kezelés után:

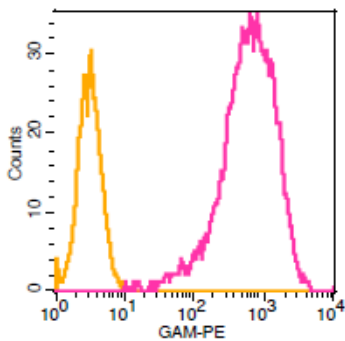


5.8. ábra – kezeletlen sejtvonal

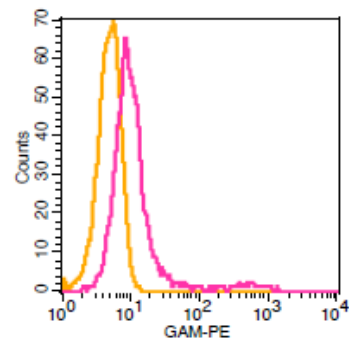


5.9. ábra – kezelt sejtvonal

Toxikus kezelés után:

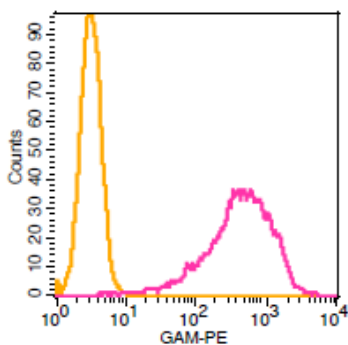


5.10. ábra – kezeletlen sejtvonal

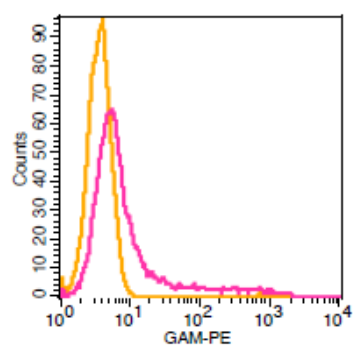


5.11. ábra – kezelt sejtvonal

Egy hónapos pihentetés után:



5.12. ábra – kezeletlen sejtvonal



5.13. ábra – kezelt sejtvonal

Ezen az ábrákon végigkövethető, hogy a sejtek elvesztették a felszínükről a fehérjét, ahhoz nem tud hozzákapcsolódni az antitest, így alacsonyabb intenzitású jelet ad, ahogy a kontroll sejtek is, amelyekben nincsen Pgp. Ez a kísérlet arra is választ ad, hogy a sejtek egy hónapos, szelekció nélküli pihentetése nem változtatta meg a sejtek Pgp szintjét, tehát egy tartósabb szelekcióról van szó.

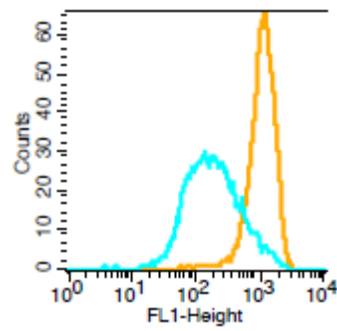
5.3.2. Calcein-AM (Ca-AM) esszé a Pgp funkció kimutatására

A Ca-AM bejut a sejtekbe, és mivel a calcein a Pgp-nek egy szubsztrátja, így azok a sejtek, amelyek sok Pgp-t tartalmaznak, képesek a calceint kipumpálni sejten kívülre. A calcein fluoreszcensen világít, így az áramlási citométer ennél a vizsgálatnál is azt méri le, hogy a detektora előtt elhaladó sejt mekkora intenzitással világít fluoreszcensen.

A verapamil a Pgp-nek egy gátlószere, vagyis azok a sejtek amelyekhez verapamilt adtunk, úgy viselkedtek, mintha nem lett volna rajtuk Pgp. Ha tehát a sejteken nem volt, vagy gátolva volt a Pgp, akkor a calceint képesek voltak felvenni, így nagy intenzitással világítottak. Míg azok a sejtek, amelyekben nem gátoltuk a Pgp-t, kipumpálták a calceint, így kisebb intenzitású jelet adtak.

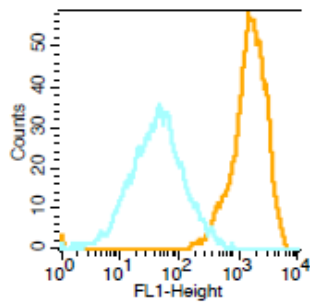
Az 5.14. – 5.18. ábrákon a vízszintes tengelyen az intenzitás, a függőleges tengelyen a sejtszám látható. Sárga színnel jelöltek a verapamillal kezelt sejtek, kézzel a kezeletlenek.

Kiinduláskor:

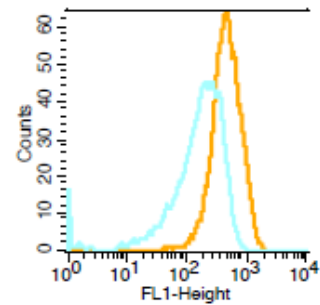


5.14. ábra – kezeletlen sejtvonál

Szubtoxikus kezelés után:

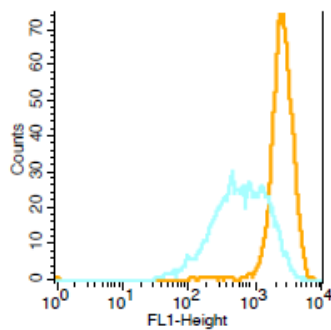


5.15. ábra – kezeletlen sejtvonál

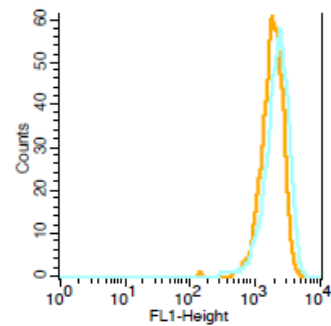


5.16. ábra – kezelt sejtvonál

Toxikus kezelés után:



5.17. ábra – kezeletlen sejtvonál

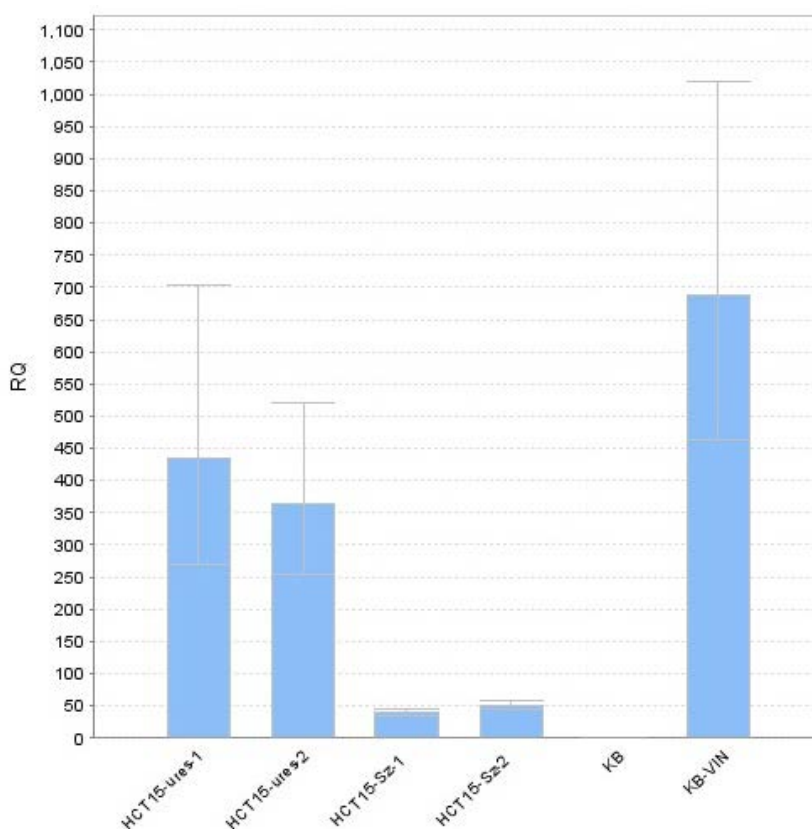


5.18. ábra – kezelt sejtvonál

Az ábrákat egymás mellé téve jól látható, ahogy a két görbe fokozatosan fedésbe került, vagyis a kezelés hatására a sejtek elvesztették a funkcionális Pgp-t, a gátlószer hozzáadása nélkül is akkumulálták a calceint, és nagy intenzitású jelet adtak.

5.3.3 RNS vizsgálat, real time-PCR mérés

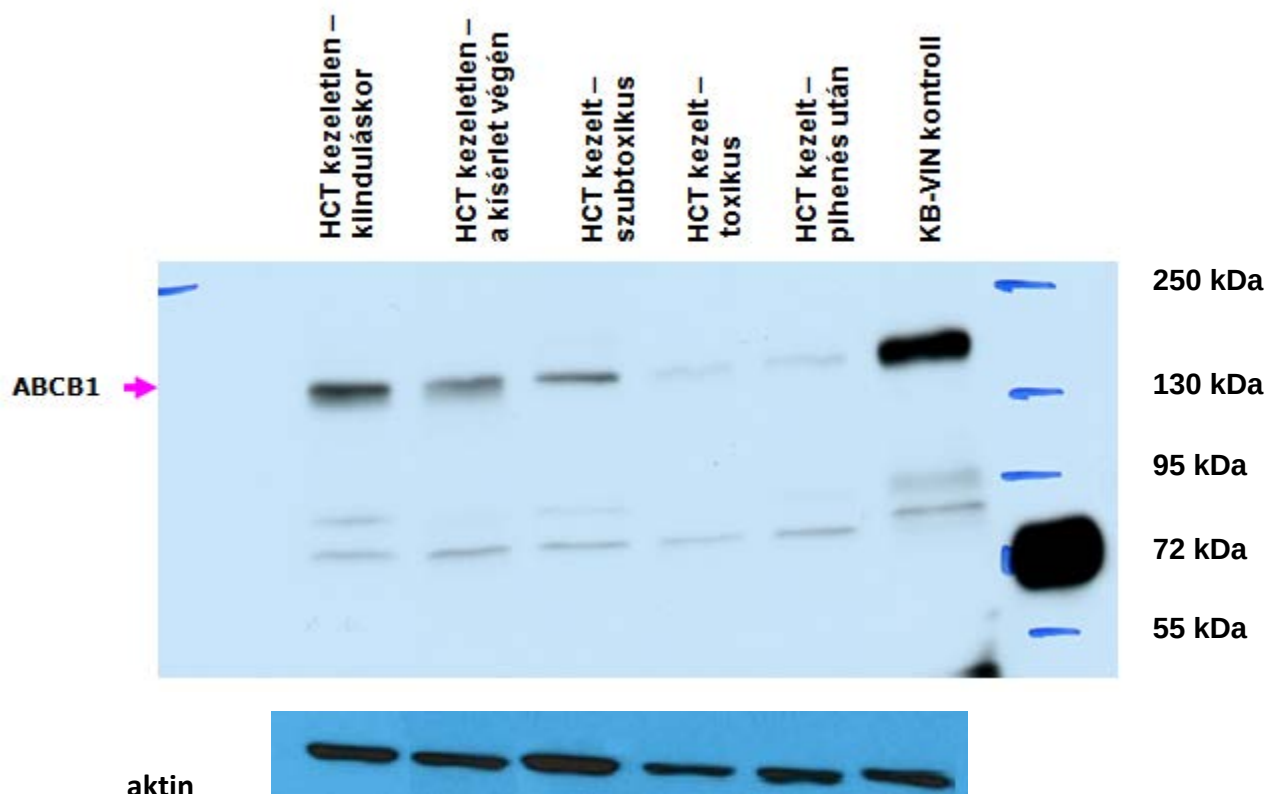
Az 5.19. ábrán látható a real time PCR mérésünk eredménye. Az első két oszlop a kezeletlen, a harmadik és negyedik oszlop pedig a Sz1079-es vegyülettel kezelt sejtekhez tartozó mRNS értékeket mutatja. Az első és a harmadik mintát a szubtoxikus, a második és negyedik mintát a toxikus koncentrációjú kezelés végén vettük a sejtekből. Az utolsó két oszlop két kontroll sejtvonal értékeit mutatja: a KB a parentális, MDR-negatív sejtvonal, a KB-VIN pedig a rezisztens, Pgp-t expresszáló derivátuma. A függőleges tengelyen relatív értékek láthatóak (*relative quantity*). Az eredmények szerint a szelekciók hatására jelentősen lecsökkent a sejtekben a Pgp mRNS-ének mennyisége, de érdekes módon nem tűnt el teljesen, amit jól látunk a kontroll sejtekkel való összehasonlításból.



5.19. ábra – RNS mérés eredménye

5.3.4 Western blot

Az 5.20. ábráról leolvasható, hogy a szubtoxikus koncentrációval kezelt sejtekben már csökkent a Pgp mennyisége, a toxikus kezelés alatt szinte teljesen eltűnt, és nem is tért vissza. Mivel a western blot csak szemikvantitatív, ezért az eredményeket nem számszerűsítettük.

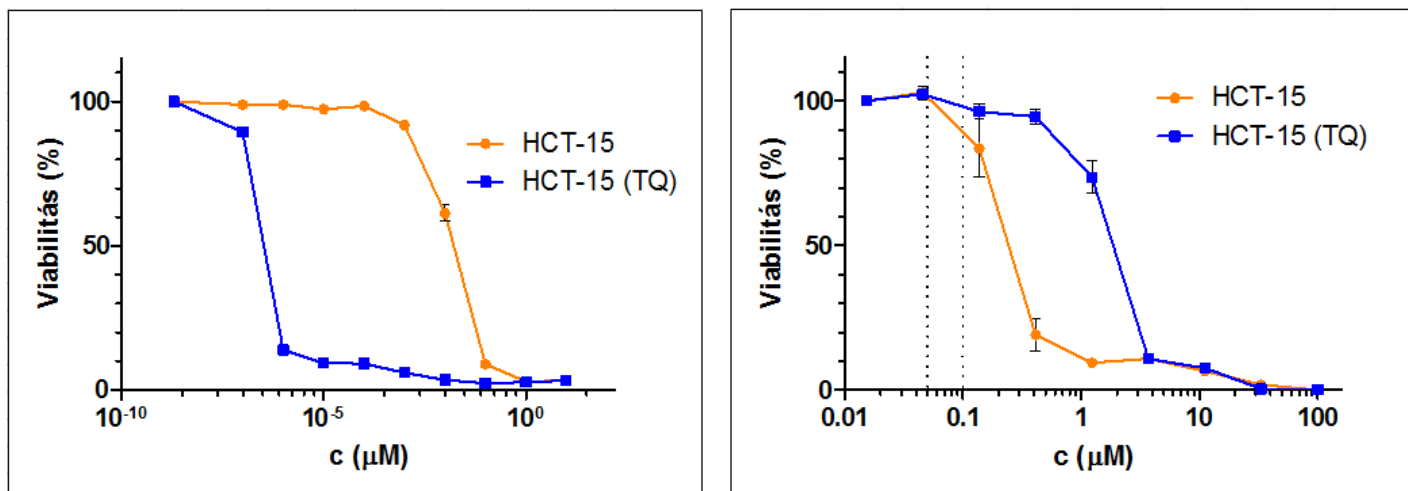


5.20. ábra – a western blot eredménye

5.3.5 Citotoxicitási esszék

Az 5.21. – 5.23. ábrákon az adott sejtvonal viabilitása látható egy-egy vegyület koncentrációjának függvényében. Ahogy az Anyagok és módszerek című fejezetben, a 4.2.2.-es pontban leírtam, a citotoxicitási esszéket úgy állítottuk össze, hogy a HCT-15 sejtek mellé kontrollnak Tariquidaros médiumban tettük ki a HCT-15 sejteket a lemezekre (HCT-15 + TQ). Így ez utóbbi tekinthető kváziparentális, szenzitív sejtvonalnak, míg a HCT-15 rezisztens, MDR-pozitív sejtvonal.

A vinblasztin mai napig használatos, hagyományos kemoterápiás szer, amire a HCT-15 sejtek rezisztensek, a Sz1079 pedig az általunk választott szelektív szer, ami célzottan a Pgp-t expresszáló HCT-15 sejteket képes elpusztítani, és kevésbé toxikus az MDR-negatív sejtvonalakra.

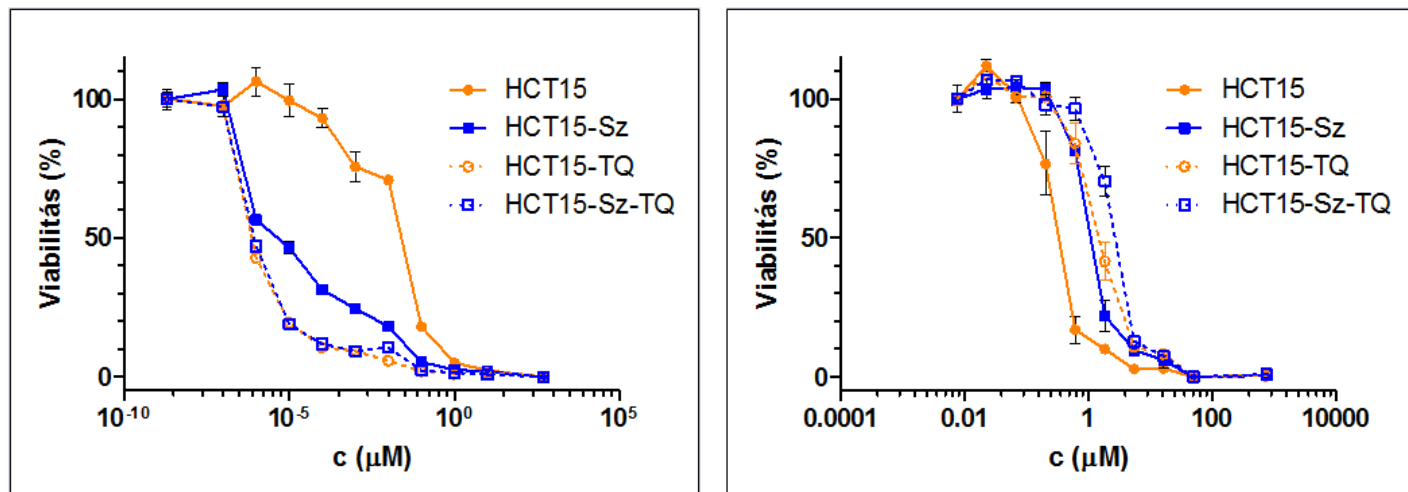


5.21. – kiinduláskor a sejtek viabilitása vinblasztinra és Sz1079-re

Az 5.21. ábrákon a még kezetlen sejtvonal citotoxicitási tesztjeinek eredménye látható. A szelektivitás definíciójának megfelelően (bővebben lásd a 2.1.3. fejezetben) a Pgp-szubsztrát vinblasztin (bal oldali grafikonon) a sima HCT-15 sejtekre kevésbé volt toxikus, mint amikor Tariquidar hozzáadásával gátoltuk a pumpát. A rezisztencia több mint negyvenezeres a vinblasztinra (RR=42900), vagyis ennyiszor nagyobb koncentrációjú oldatra lenne szükség a vegyületből, hogy ugyanolyan hatást érzünk el, mint a Pgp gátlásával együtt alkalmazva.

A jobb oldali grafikonról leolvasható, hogy az MDR-szelektív hatású Sz1079-es vegyületre hiperszenzitív a HCT-15 sejtvonal. Ez a funkcionális Pgp expresszióhoz köthető, hiszen a pumpa gátlásával a sejtek szenzitivitása közel sem ilyen jelentős. A szelektivitás közel hétszeres (SR=6,8).

Az előbb leírt állapot után elkezdtük szelektálni a sejteket. Az 5.21. ábrán a jobb oldali grafikonon szaggatott vonal jelzi a szubtoxikus koncentráció intervallumot. Első lépésben a legmagasabb értékű szubtoxikus koncentráción (1 μM -on) tartottuk a sejteket négy hétig.

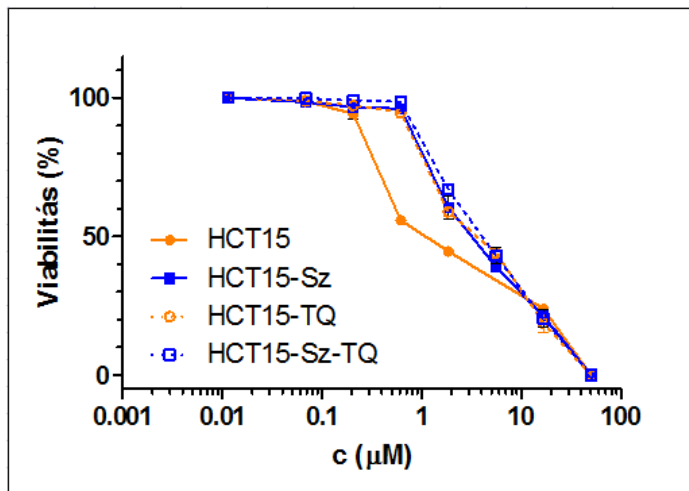
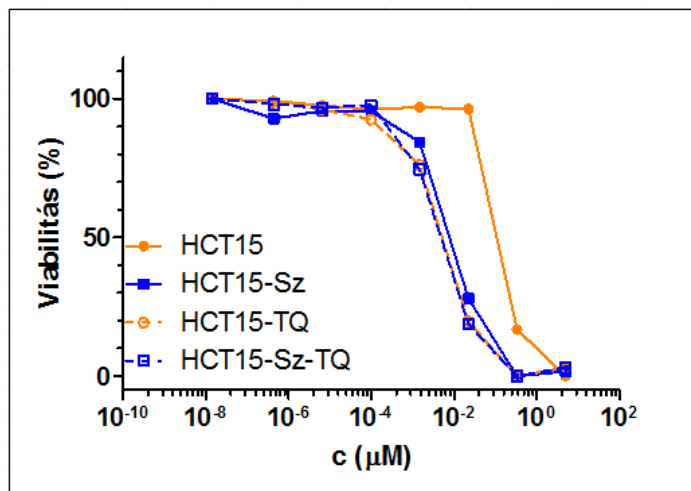


5.22. – szubtoxikus kezelés után a sejtek viabilitása vinblasztinra és Sz1079-re

Az 5.22. ábrán a kezelés első lépése utáni állapot szerepel. A vinblasztinnal végzett teszt (bal oldali grafikon) eredményén látható, hogy a HCT15-Sz jelű, kezelt sejtvonal jelentősen vesztett a rezisztenciájából, már nem ott rajzolódik ki a hozzá tartozó görbe, ahol a kezeletlen HCT-15 sejteké. A rezisztencia hányadosa szignifikánsan lecsökkent: $RR_{(\text{kezeletlen})} = 33297$, $RR_{(\text{kezelt})} = 5,54$, megközelítette a Tariquidarral gátolt sejtekre kifejtett toxicitást.

Ezzel párhuzamosan a jobb oldali grafikonon látható, hogy a kezelt sejtvonal az Sz1079-es MDR-szelektív vegyületre vesztett az érzékenységből, és itt is inkább a gátolt, kvázi parentális sejtekhez közelít a szenzitivitása. Erre a molekulára a kezeletlen HCT-15 sejtek SR értéke 4,16, míg a kezelt sejteké lecsökkent 2,4-re.

Ezek után tovább kezeltük a sejtvonalat toxikus, 2 μM -os, majd 2,5 μM -os koncentráción.



5.23. – toxikus kezelés után a sejtek viabilitása vinblasztinra és Sz1079-re

A kezelés második lépése után megfigyelhető, hogy a szelektált sejtvonal teljesen úgy viselkedik, mint a Tariquidarral gátolt sejtek. Vinblasztinra a rezisztencia hányados a kezeltetlen sejtekre 29,85, míg a hiperszenzitivitásukat veszített, szelektált sejtek esetében csak 2,05. A szelektivitási érték 1,07 a kezelt sejtek esetében, vagyis az IC_{50} értéke tulajdonképpen megegyezik a Pgp-gátolt sejtek IC_{50} értékével.

Az utolsó lépést követően megfigyelhető, hogy a nem kezelt HCT-15 sejteknek is csökkent a szelektivitása: kiinduláskor 6,8, az első kezelés után 4,16, a második kezelés után már csak 3,06 volt az SR értéke. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a szelektálás végéig több mint két hónap telt el, ekkorra a sejteknek nagy volt a passzázsszáma, és beavatkozás nélkül is csökkent a Pgp expressziójuk. Ugyanez a jelenség a western bloton is megjelenik (lásd az 5.20. ábrán). Ez a folyamat azonban lassú, és nem bizonyított, így a klinikumban, valódi terápiában nem lehet vele számolni.

6. Összefoglalás

Az NCI Developmental Therapeutics Program (DTP) interneten szabadon hozzáférhető adatbázisában található citotoxicitási adatok kiértékelésével, a toxikusság és a Pgp mennyisége között fennálló korreláció felvételével olyan vegyületeket azonosítottam, melyek toxicitása a Pgp expresszió mértékével arányos. Az azonosított vegyületek közül több szűrési lépéssel olyan molekulákat választottam ki, amelyek annál hatékonyabbak, minél nagyobb az adott sejt Pgp expressziója, azaz toxikusabbak a multidrog-rezisztens sejtekre. A szűrésen átment molekulákat szerkezetük alapján csoportosítottam, aminek eredményeként két fő kemotípust határoztam meg.

Az *in silico* keresésből eredményül kapott vegyületeket teszteltük különböző sejtvonalakon, majd ezen tesztek eredményének ismeretében kiválasztottam a legnagyobb szelektivitással rendelkező molekulát további *in vitro* tesztelésre: a HCT-15 nevű humán vastagbélrák sejtvonalat kezeltem több hónapig a kiválasztott vegyülettel. Céлом az volt, hogy a rezisztens sejtvonalban csökkenjen a Pgp expressziója, így a rezisztens sejtek elpusztíthatóvá váljanak hagyományos kemoterápiás gyógyszerekkel. A kísérlet sikeres volt, a sejtekben szignifikánsan lecsökkent a membrántranszporter mennyisége. Ezt citotoxicitási tesztekkel, antitestes jelöléses esszékkel, RNS- és fehérjeméréssel igazoltam.

Távlati célunk a módszerek finomítása és az eszközeink bővítése. Az *in silico* keresési és szűrési eljárás, amivel a vegyületeket keressük, további fejlesztésre és pontosításra szorul. Volt már arra példa, hogy olyan molekula bizonyult MDR-szelektívnek, amelyet az *in silico screening* során kiejtettünk valamelyik szűrési lépésben.

A klaszterezést tervezzük további programokkal is megismételni, pontosítani, illetve a citotoxicitási esszék tervezett automatizálásával egyre több vegyületet tudunk majd megvizsgálni, így nagy mennyiségű biológiai adathoz juthatunk. A módszerek tökéletesítése, illetve a keresés kibővítése a DTP adatbázisán túlra fontos, állandóan szem előtt levő célunk.

7. Irodalom

- [01] <http://ksh.hu>
- [02] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman: Global cancer statistics; CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61:2, p. 69–90, 2011.
- [03] WHO: Global status report on noncommunicable diseases 2010; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 9-31, 2010.
- [04] Jeney A., Kralovánszky J.: Onkofarmakológia; Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2005.
- [05] Tóth Sz.: MDR-szelektív toxicitású vegyületek *in silico* keresése és *in vitro* tesztelése; BME VBK Msc diplomamunka, 2011.
- [06] <http://www.cancer.gov/>
- [07] Szakacs G., et al.: Targeting multidrug resistance in cancer; Nat. Rev. Drug Discov. 5, p. 219-234, 2006.
- [08] Sarkadi B., Homolya L., Szakács G., Váradi A.: Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System; Physiol. Rev. 86, p. 1179-1236, 2006.
- [09] Kaminski W.E., Piehler A., Wenzel J.J.: Review ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease; Biochimica et Biophysica Acta 1762, p. 510–524, 2006.
- [10] Szakács G., et al.: Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells; Cancer Cell, 6, p. 129-137, 2004.
- [11] D. Türk, M. D. Hall, B. F. Chu, J. A. Ludwig, H. M. Fales, M. M. Gottesman, and G. Szakács: Identification of Compounds Selectively Killing Multidrug-Resistant Cancer Cells; Cancer Res. 69:21, p. 8293–8301, 2009.

- [12] K. M. Pluchino, M. D. Hall, A. S. Goldsborough, R. Callaghan, M. M. Gottesman: Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance; Drug Resistance Updates, 15:1-2, p. 98-105, 2012.
- [13] M.D. Hall, M.D. Handley, M.M. Gottesman: Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity; Trends in Pharmacological Sciences, 30, p. 546-556, 2009.
- [14] <http://dctd.cancer.gov>
- [15] <http://dtp.cancer.gov/mtargets/download.html>
- [16] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [17] D. Butina: Unsupervised Data Base Clustering Based on Daylight's Fingerprint and Tanimoto Similarity: A Fast and Automated Way To Cluster Small and Large Data Sets; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 39, p. 747-750, 1999.
- [18] H. Eckert, J. Bajorath: Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches; Drug Discovery Today, 12:5-6, p. 225-33, 2007.
- [19] P. Willett: Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints; Drug Discovery Today, 11:23-24, p. 1046-1053, 2006.

8. Köszönetnyilvánítás

Szakács Gergelynek, a témavezetésért, minden lehetőségért, amit kaptam tőle a tanulásra és a munkára.

Gáspári Zoltánnak, aki minden utolsó pillanatban előkerült problémán segített, és vállalta a belső konzulensi feladatokat.

Tóth Szilárdnak, aki az alapok tanulásától kezdve minden kísérlet összeállításánál, minden eredmény kiértékelésénél, és minden tudományos megfogalmazásnál a segítségemre volt.

Füredi Andrásnak, aki az RNS-mérésben, és az alapok megtanulásában is sokat segített.

Kucsma Nórának, aki a fehérjemérések során végtelen türelemmel rengeteget segített.

Soós Rozáliának, aki a monoton labormunkában mindig nagy energiával helytállt.

Nagy Zoltánnak és Kanta Ildikónak, akik nagy lelkesedéssel, megbízhatóan lektorálták a nyelvtani hibáimat.

9. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Kanta Eszter a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- az *in silico screening* lépéseit
- a citotoxicitási esszék összeállítását és kiértékelését
- a HCT-15 sejtvonal szelekcióját
- a fehérje sejtfelszíni expressziójának mérését
- az efflux esszéket
- a fehérjefuttatást

végeztem el.

.....

aláírás

Budapest, 2013. január 8.