

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Áramlási citometriás diagnosztikai tesztrendszer
kidolgozása szerves kation transzporterekre.**

Király Kinga Zsófia

Biológus MSc I. évfolyamos hallgató

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar, Biotechnológiai Tanszék

SOLVO Biotechnológiai Zrt.

Témavezető: Dr. Krajcsi Péter

Belső konzulens: Dr. Rákhely Gábor



2015

Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló	3
2. Bevezetés	4
2.1 A membránok és a transzporterek általános szerepe.....	4
2.2 Az SLC22A géncsalád	5
2.3 A szerves kation transzporterek szerkezete.....	9
2.4 A szerves kation transzporterek funkciója és működése.....	9
2.5 Szerves kation transzporterek szubsztrátspecifitása.....	9
2.5.1 OCT1 és OCT2.....	11
2.5.2 OCTN1 és OCTN2.....	11
2.6 Klinikai szempontból fontos polimorfizmusok.....	11
2.6.1 OCT1 és OCT2.....	11
2.6.2 OCTN1 és OCTN2.....	12
2.7 Klinikai jelentőség.....	12
2.7.1 Az OCT1 és az OCT2 szubsztrátjai	12
2.7.3 Az OCTN1 és az OCTN2 szubsztrátjai.....	13
2.8 A metformin klinikai alkalmazása	13
3. Célkitűzések	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1 Sejtvonalak	16
4.2 Sejttenyésztés	16
4.2.1. Tápoldat.....	16
4.2.2 Sejtek passzálása	16
4.3 Vizsgált anyagok	16
4.4 Kísérleti elrendezés	17
4.5 Áramlási citométer	18
5. Eredmények és értékelésük	21
6. Összefoglalás	24
10. Irodalomjegyzék.....	26
7. Köszönetnyilvánítás	30
8. Rövidítésjegyzék.....	31
9. Tételes szerzői hozzájárulás	32

1. Tartalmi összefoglaló

Napjainkban ismert, és ezért intenzíven kutatott, a különböző, sejtmembránban elhelyezkedő transzporterek szerepe a gyógyszerek felvételében, szervezeten belüli eloszlásában, leadásában, toxicitásában, a gyógyszerek egyénenként eltérő hatásának megértésében, a lehetséges, nem várt gyógyszerkölsönhatások felismerésében. Ilyen fehérjék többek közt az SLC (Solute Carrier) családba tartozó szerves kation transzporterek (Organic Cation Transporters, OCT-k) és ikerion/kation transzporterek (OCTN-ek). Az SLC család tagjai endogén szubsztátok és xenobiotikumok felvételét szabályozzák minden sejtben, létfontosságú szerepet betöltve a normál sejt- és szervműködésben.

A diabetes mellitus (2-es típusú cukorbetegség) manapság már népbetegségnek tekinthető a fejlett országokban, így komoly egészségügyi jelentősége van. Számos, a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedőknek készült szájon át adható gyógyszer egy része szerves kation (például: metformin /1,1-dimetil-biguanid/), így szervezeten belüli sorsukban kiemelt szerepet játszhatnak a szerves kation transzporterek.

Munkám célja egy áramlási citometriás tesztrendszer kidolgozása volt, specifikus, adott transzporter szubsztátjaként alkalmazható fluoreszcens festékekkel, amellyel az OCT1, OCT2, OCTN1 és OCTN2 szerves kation transzporterek vizsgálhatók. Ezért számos festéknél megvizsgáltam, hogy alkalmasak-e szubsztátjelöltnek.

Méréseimhez a vizsgálandó fehérjét túltermelő CHO sejtvonalatokat használtam. A sejtekben a fluoreszcens festékekkel való inkubálás után áramlási citometriával vizsgáltam azok mennyiségét, majd összevettem a festékmentes kontrollal. E módszer alkalmazásával kerestem transzporter-specifikus fluoreszcens festéket.

Az adatok értékelése során találtam olyan festékeket, melyek az egyes transzporterekre specifikusnak tekinthetők.

2. Bevezetés

2.1 A membránok és a transzporterek általános szerepe

A biológiai membránok különböző specifikus funkciók ellátására szolgáló komponensei a membránfehérjék. Változatos szerepet töltenek be a sejtek fiziológiás működéséhez elengedhetetlen sejt és környezete között zajló szelektív anyag- és információcsere folyamataiban, a sejtadhézióban, valamint a sejtek közötti kommunikációban. A különböző membránfehérjék így betölthetnek transzporter, receptor, antigén, energiatermelő, töltésszállító és enzimatis funkciókat is. Az adott fehérje és a membrán kölcsönhatásának típusa alapján két tágabb kategóriába sorolhatók a membránfehérjék: perifériás és integráns (transzmembrán) fehérjék. A perifériás membránfehérjék a membrán perifériás rétegéhez, vagy integráns membránfehérjéhez kapcsolódnak. Az integráns membránfehérjék lehetnek többek között aktív pumpa fehérjék, csatornafehérjék, receptorok vagy transzporter fehérjék.

A sejtek normális működése szempontjából kiemelt jelentősége van azoknak a transzport folyamatoknak, amelyek segítségével anyagok koncentráció- vagy elektrokémiai gradienssel ellentétes irányban mozognak. Elsődleges aktív transzport esetén a transzport energiaigényét a közvetlenül kapcsolt adenzin-trifoszfát (ATP) terminális foszfátjának hidrolízise fedezi, szemben a másodlagos aktív transzporttal, ahol az ATP hidrolízise nem közvetlenül része a folyamatnak.

Számos endo- és xenobiotikum, szerves anion és szerves kation található az emberi szervezetben. Ezeknek a szállításához és eltávolításához szükségesek a multispecifikus transzporterek, mint az SLC transzporterek (oldott anyagokat szállító transzporterek - Solute Carrier transporters) és ABC transzporterek (ATP-binding Cassette Transporters). Az ABC transzporterek ATP felhasználásával a sejtől kifelé szállítják szubsztrátjaikat. Az SLC transzporterek a szubsztrátok felvételét segítik a sejtbe, passzív transzporterekként (facilitált diffúzió) vagy aktív transzporterekként (antiporterek vagy szimporterek). (2012, Roth és mtsai)

Az SLC transzporter szupercsaládba 55 gén család tartozik, több mint 350 funkcionális fehérjét kódoló génnel. Ez idáig kevesebb, mint 20 transzportert karakterizáltak, mint gyógyszerkölcönhatásban részt vevő fehérjét. A főbb SLC transzporter családok: SLCO, SLC47 és SLC22A. (2012, Roth és mtsai)

Az utóbbi évtizedben a gyógyszeripari fejlesztésekben vizsgálják a molekulák szerkezet-aktivitás kapcsolatát (structure-activity relationships, SAR) többek közt a féléletidő megnövelésére, a magasabb metabolikus stabilitás elérésére. Ma már tudjuk, hogy a metabolikusan stabilabb gyógyszerek gyakran előre nem megjósolható módon kölcsönhatnak különböző transzporterekkel, és bármely transzporter expresszióban vagy működésben bekövetkező szignifikáns változás megváltoztathatja egy adott gyógyszer farmakokinetikáját. A gyógyszerfejlesztésben emiatt egyre jobban előtérbe kerül ezeknek a transzportmechanizmusoknak a tanulmányozása, hiszen az emberi szervezetbe bejuttatott gyógyszer akkor hat megfelelően, ha képes bejutni a célsejtekbe diffúzióval vagy a transzportereken keresztül.

Az *in vivo* vizsgálatoknál olcsóbbak, egyszerűbbek, és gyorsabbak az *in vitro* vizsgálatok, amelyek lehetővé teszik a potenciális gyógyszermolekula-jelöltek hatékonyabb szűrését. Ennek egyik módja, hogy az adott transzporter fehérjét túltermelő emlős sejtvonalakon, vagy az ezekből létrehozott membránpreparátumokon vizsgáljuk a gyógyszer – transzporter fehérje kölcsönhatást.

2.2 Az SLC22A géncsalád

Az SLC22A transzporter családba tartoznak a szerves kation transzporterek (OCT-k), az ikerion/kation transzporterek (OCTN-ek) és a szerves anion transzporterek (OAT-ok). A szubsztrátspecifitás és a transzport mechanizmusa alapján számos alcsoportra osztható az SLC22 család. Működhetnek uniportereként, a facilitált diffúziót elősegítve bármely irányba (OCT-k), anion cserélő transzportereként (OAT1 és OAT3), illetve Na⁺/karnitin kotranszporterként (OCTN2). Méréseim során az SLC22A géncsalád által kódolt szerves kationtranszportereket (OCT1, OCT2), valamint szerves kation és karnitin transzportereket (OCTN1, OCTN2 - organic cation transporter novel type 1, - 2) vizsgáltam. Ezek a multispecifikus transzporterek számos szerv epitél sejtjeiben expresszálódnak, ez az **1. táblázatban** látható. (2007, Koepsell és mtsai) Széles szubsztrátspecifitásuk és elhelyezkedésük miatt fontos szerepet játszanak a detoxifikációban.

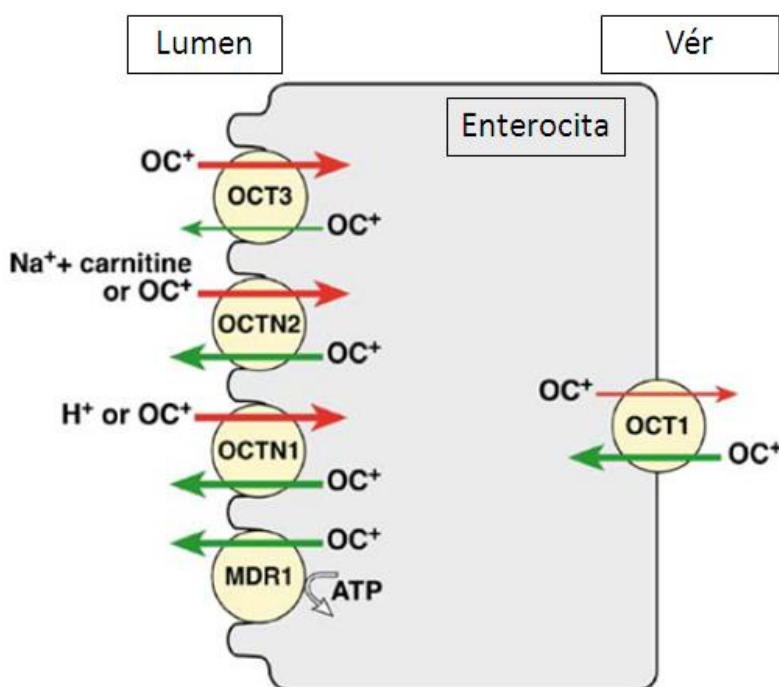
1. táblázat

A szerves kationtranszporterek eloszlása különböző szövetekben. +: erős expresszió.

Ø: nincs detektálható expresszió. -: még nem vizsgálták adott szövetben a transzporter expresszióját. (2007, Koepsell és mtsai)

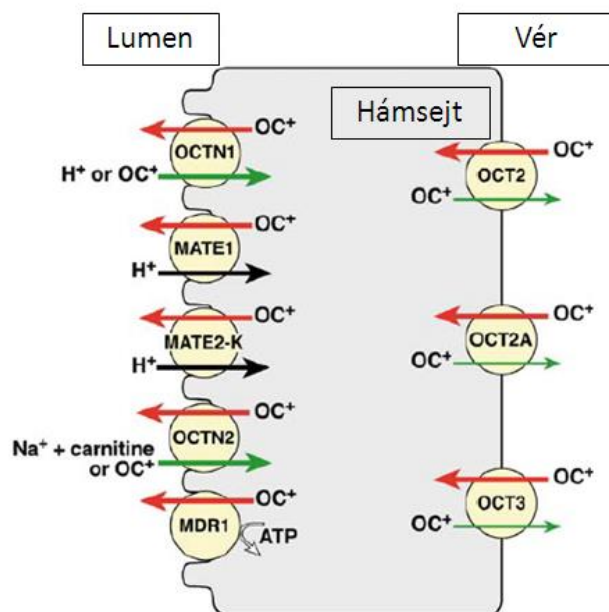
	OCT1	OCT2	OCTN1	OCTN2
Gyomor	+	-	Ø	+
Vékonybél	+	+	+	+
Vastagbél	+	Ø	+	+
Végbél	-	-	Ø	+
Máj	+	Ø	+	+
Hasnyálmirigy	-	-	-	+
Lép	+	+	+	Ø
Légcső	+	+	+	+
Tüdő	+	+	+	+
Vese	+	+	+	+
Húgyhólyag	+	Ø	-	-
Prostata	-	-	+	+
Here	-	-	+	+
Sertolli sejtek	-	-	-	+
Sperma	-	-	+	+
Bőr	+	+	-	-
Harántcsíkolt izom	+	Ø	+	+
Szív	+	-	-	+
Vérerek	-	-	-	-
Agy	+	+	+	+
Gerincvelő	-	-	+	+
Choroid plexus	-	-	-	-
Mellékvese	-	-	-	-
Emlőmirigy	+	Ø	+	+
Méh	-	-	-	+
Méhlepény	+	+	+	+
Petefészek	-	-	-	-
Pajzsmirigy	-	-	+	+
Csontvelő	-	-	+	Ø
Epitél sejtek	+	+	+	+
Neuronok	-	+	-	-
Gliasejtek	-	-	-	-
Simaizom sejtek	-	Ø	+	+
Granulociták	-	-	+	+
Límfociták	-	-	+	+
Makrofágok	-	-	+	+
Tumor sejtek	+	+	-	+

Az *uptake* transzporterek megfelelő körülmények között a külső térből a sejt belseje felé közvetítik az adott anyag transzportját. Kritikus szerepük van az endogén anyagok homeosztázisában, a terápiás szerek vizelettel való kiválasztásában. Szerepük van a bélben történő felszívódásban (**1.ábra**), a vesetubulusokban zajló reabszorpcióban (**2.ábra**), a májban zajló hepatikus exkrécióban (**3.ábra**) (2009, Kindla és mtsai), és a szervezet belső gátjain (pl. vér-agy-gát, OCTN2) keresztüli anyagszállításban.



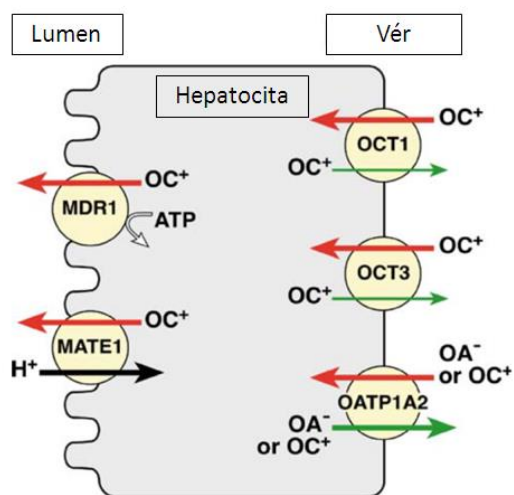
1. ábra

A vékonybél enterocitáiban a szerves kationtranszportért felelős fehérjék elhelyezkedése és működése. Az OCT1 és OCT3 fehérjék a kationok elektrogén egyirányú transzportját segítik elő mindkét irányba, az elektrokémiai grádiensből függően. -60 mV-os membránpotenciál mellett elsősorban a kationfelvétel folyik (vastag nyilak). Mindazonáltal, az OCT-k kation kiáramlást is közvetíthetnek (vékony nyilak), ha ezek koncentrációja a sejtben tízszer nagyobb, mint a sejt kívül. (2007, Koepsell és mtsai)



2. ábra

Az emberi vese proximális tubulusában elhelyezkedő hámsejtek szerves kationtranszporterei. A nyilak vastagsága az 1. ábrán leírtaknak megfelelő. A piros nyilak a kation szekréció, míg a zöldek a kation reabszorpció útvonalait jelölik. (2007, Koepsell és mtsai)



3. ábra

Az emberi máj hepatocitáiban a szerves kationtranszporterek elhelyezkedése. A nyilak vastagsága a 1. ábrán leírtaknak megfelelő. Az epe szekrécióban részt vevő folyamatok piros nyíllal, míg a zöld nyilak a kationok szinuszoidokba történő kiválasztását jelölik. (2007, Koepsell és mtsai)

2.3 A szerves kation transzporterek szerkezete

A szerves kation transzporterek 551-557 aminosavból állnak. Mint a tipikus integráns membránfehérjék, számos hidrofób transzmembrán alegységet (TMD) tartalmaznak, melyeket hidrofil intra- és extracelluláris hurok kapcsol össze. Karboxi- és amino terminálisuk is a sejtmembrán belső oldalán van. Működhetnek monomer formában vagy obligát homo- illetve heterooligomerként. Az első és második TMD között egy nagy extracelluláris hurok van, amelyen számos lehetséges N-glikolizációs hely található. A 6. és 7. TMD között egy nagy intracelluláris hurok van, amelyen vélhetően számos foszforilációs hely lehet. Az OCT1 és OCT2 fehérjék aminosavsorrendje 70%-ban (2012, Roth és mtsai; 1997, Gorboulev és mtsai), míg az OCTN1 és OCTN2-é 77%-ban egyezik meg egymással (2012, Roth és mtsai). Homológia modellezéssel megbecsült háromdimenziós szerkezetük alapján feltételezhető, hogy az OCT1 szubsztrátjai a fehérje egy régiójával lépnek kölcsönhatásba, nemcsak egy kizárólagos kötőhellyel. Más kísérletek azt igazolták, hogy a szubsztrátkötő régióban található öt olyan aminosav, ami az intra- és extracelluláris szubsztrátokkal is kölcsönhatásba léphet, így valószínűleg részt vesz a transzlokációjukban. (2012, Roth és mtsai)

2.4 A szerves kation transzporterek funkciója és működése

Az OCT1 és OCT2 transzporterek szerves kationok vagy gyenge bázisok passzív, facilitált diffúzióját teszik lehetővé azok elektrokémiai grádiense mentén. Emiatt a transzport mindkét irányba végbemehet, és kevésbé érzékeny a pH-ra, és független a Na^+ -ionok koncentrációjától (2012, Roth és mtsai). Fontos megjegyezni, hogy annak ellenére, hogy a transzportert közvetlenül nem befolyásolja a pH, a szubsztrátokra hatással lehet a protonálódás/deprotonálódás, mivel emiatt megváltozhat a molekula töltése, és így az affinitása a transzporterhez. (2002, Barendt és mtsai)

Ezzel szemben az OCTN1 transzporter működését befolyásolhatja a Na^+ - és a protonkoncentráció, az OCTN2 pedig végezhet Na^+ -függő és Na^+ -független szállítást is. (2012, Roth és mtsai; 1997, Gorboulev és mtsai)

2.5 Szerves kation transzporterek szubsztrátspecifitása

A szerves kation transzporterek szubsztrátjait és gátlószereit a **2. táblázatban** foglaltam össze.

2. táblázat

A szerves kationtranszporterek endogén szubsztátjai és gátlószerei. A K_m (Michaelis konstans) és IC_{50} (maximális gátláshoz tartozó koncentráció fele) értékeket *Xenopus laevis* oocitákban vagy epitél sejtvonalakban expresszált transzportereken mérték le. (2007, Koepsell és mtsai)

		K_m vagy IC_{50} [μM]			
		OCT1	OCT2	OCTN1	OCTN2
Metabolitok	Acetyl-L-carnitine				8.5
	Betaine				<500
	Choline	16700	210	231	<2000
	Creatinine	>20000	<2000		
	D-Carnitine	12400	13000	<2000	11.98
	Guanidine	5030	2300	24	4.3
	Thiamine		117		
Neurotranszmitterek	Acetylcholine	580	390		
	Dopamine	>20000	400		
	Epinephrine	>30000	940		
	histamine	>20000	1500		
	Norepinephrine	7100	80		
	Serotonin	>20000			
Hormonok	Aldosteron				<500
	Corticosterone	7.22	34		<100
	Progesterone	3.1	27		
	Prostaglandin E2	0.66	0.03		
	Prostaglandin F2	0.48	0.33		
	Testosterone	10	3		
Egyéb	Agmatine	24000	1400		
	Ergothioneine			21	
	Stachydrine			270	

2.5.1 OCT1 és OCT2

Az OCT1 fehérjék egyrészt az I típusú szerves kationok (protonált molekulák) Na^{+} -független transzportját végzik, például tetraetil-ammónium (TEA), 1-metil-4-fenilpiridínium (MPP), N1-methylnicotinamide (NMN), dopamin és cholin, másrészt II típusú kationok (nagyobb méretű kationok) mint methyl-quinine és quinidine. Az OCT2 fehérjék a choroid plexus epithel sejtjeinek ventrikuláris membránjában is expresszálódnak, monoamin neurotranszmittereket transzportálnak, úgy mint a dopamin, a noradrenalin, az adrenalin, az 5-hydroxitryptamin. Ezek mellett számos antivirális gyógyszer transzportjáért is felelősek. A szubsztrátok szerkezete alapján alkottak egy farmakofór modellt, miszerint az OCT1 szubsztrátjainak rendelkeznie kell egy pozitív ionizációs hellyel, egy hidrofób résszel és két hidrogén-kötés akceptorral. (2007, Moaddel és mtsai)

Az 1-metil-4-fenilpiridínium (MPP) és a tetraetil-ammónium (TEA) általánosan használt modell szubsztrátok ezen két transzporter vizsgálatára. (2012, Roth és mtsai)

2.5.2 OCTN1 és OCTN2

Az OCTN1 transzporter felelős a Na^{+} -ionok és az ergothionein kortanszportjáért, ami a természetben előforduló fontos antioxidáns. (2005, Gründemann és mtsai)

Az OCTN2 szerves kation transzporterként és Na^{+} -függő nagy affinitású L-karnitin transzporterként is működik (1998, Tamai és mtsai). Az L-karnitinnek és a TEA-nak különböző kötődési helye van, mivel számos mutáció csak az egyik anyag transzportját gátolja, a másikat nem. (2002, Ohashi és mtsai; 1999 Seth és mtsai)

2.6 Klinikai szempontból fontos polimorfizmusok

2.6.1 OCT1 és OCT2

Egér *knockout* modellek esetén semmilyen fenotípusos különbséget nem okoz az OCT1 és OCT2 transzporterek hiánya (2003, Jonker és mtsai). Hasonlóan embernél sem ismerünk olyan betegséget, ami összefüggésbe hozható az OCT transzporterek valamelyik polimorfizmusával. Viszont genetikai változataik befolyással lehetnek egyes gyógyszerek farmakokinetikájára és farmakodinámiájára, és felelősek lehetnek gyógyszerek közötti kölcsönhatásokért is. (2012, Roth és mtsai)

Az OCT1-nek 18 olyan SNP-je (single nucleotide polymorphism – egy nukleotidnyi eltérés a génben) ismert, ami megváltoztatja az aminosav- szekvenciát. Ezek közül hat variánsnak csökkent az aktivitása, míg egynek nőtt. (2002, Kerb és mtsai)

Az OCT2-nek tíz ismert variánsa van, ezek közül egy kivételével mind funkcionálisan aktív, de a szubsztrát szelektivitásuk és a transzport képességük kissé eltérhet. (2007, Koepsell és mtsai)

2.6.2 OCTN1 és OCTN2

Az OCT transzporterekkel ellentétben az OCTN transzporterek variánsai összefüggésbe hozhatók autoimmun betegségekkel. (2012, Roth és mtsai)

Az OCTN1 L503F variánsa eltérő szubsztrátspecifitású, jelentősen nagyobb az affinitása a TEA-hoz (2007, Urban és mtsai). Ez összefüggésbe hozható a familiáris és sporadikus bélgyulladásal. (2010, Lin és mtsai)

A szisztémás karnitinhiányt a karnitin vesében történő csökkent reabszorpciója okozza. Ennek oka lehet az OCTN2 számos mutációja, amelyek csökkent vagy elégtelen funkciót okoznak. (2001, Lahjouji és mtsai)

2.7 Klinikai jelentőség

Farmakokinetikai kölcsönhatás akkor jöhet létre két gyógyszer között, ha ugyanaz a célpontjuk abszorpció, disztribúció, metabolizmus és/vagy exkréción során (2009, Kindla és mtsai). Az alábbiakban néhány fontosabb gyógyszert emelnék ki, melyek jól rávilágítanak arra, miért is fontos a transzporterek szerepe a gyógyszerkölcsönhatások tanulmányozása során.

2.7.1 Az OCT1 és az OCT2 szubsztrátjai

Számos orális gyógyszer szubsztrátja ezeknek a transzportereknek, mivel más *uptake* transzporterrel együtt, ezek felelősek a hidrofil molekulák egy részének a bél lumenéből az epithelsejtekbe való bejutásáért, majd később a reabszorpciójukért és a kiválasztásukért is.

A metformint gyakran együtt adják más antihyperglykémias szerekkel 2-es típusú diabétesz kezelése során (2007, Koepsell és mtsai). Emiatt felléphet annak a kockázata, hogy ezek a gyógyszerek is kölcsönhatnak az OCT transzporterekkel, így gátolva a metformin transzportját. Ilyenek például egyes protonpumpa-inhibitorok, amelyek szignifikánsan, koncentrációjuktól függően gátolják a metformin transzportját (2011, Nies és mtsai). Mivel ezek a transzporterek magas szinten expresszálódnak a májban (2009, Nies és mtsai) és a

vesében (2002, Motohashi és mtsai), gátlásuk nagy hatással lehet a metformin felvételére a hepatocitákba, és a kiválasztására az epébe és a vizeletbe.

2.7.3 Az OCTN1 és az OCTN2 szubsztrátjai

Széles szubsztrátspecifitásuk miatt Az OCTN1 és az OCTN2 transzportereknél is jelentős a gyógyszerkölcsonhatások kialakulásának valószínűsége. Gátlószerek csökkentik a karnitin reabszorpcióját a vesetubulusokban. Ilyen OCTN2 gátlószerek a béta-laktám antibiotikumok, melyek szubsztrátjai is ennek a transzporternek, így kompetitíven gátolják a karnitin transzportját. (2000, Ganapathy és mtsai)

2.8 A metformin klinikai alkalmazása

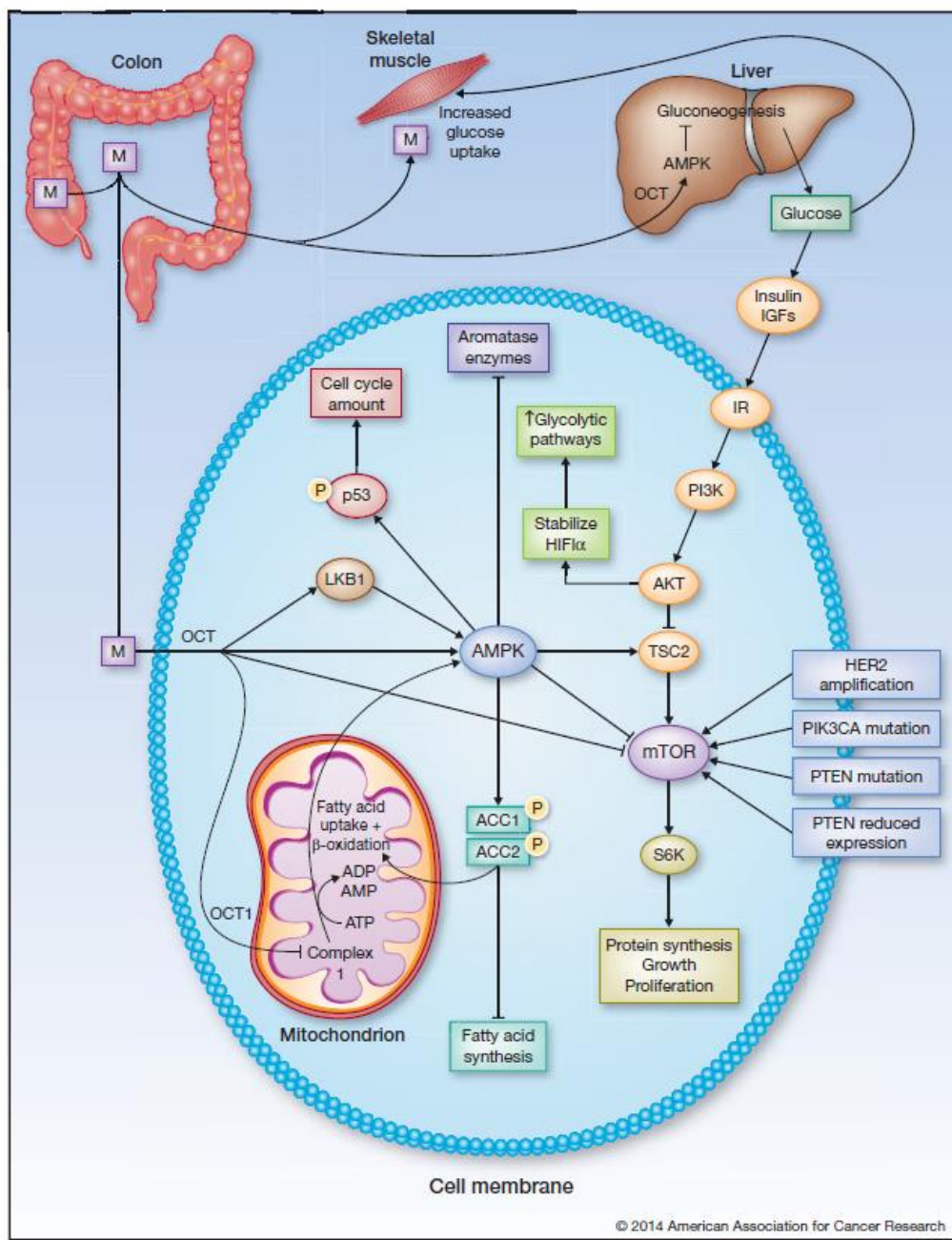
A cukorbetegségre adott gyógyszerek egy része kation, és specifikusan csak ezeken a transzportereken jut be a sejtekbe. Ilyen gyógyszer például a metformin (1,1-dimetilbiguanid), amely egy inzulin-szenzitizáló szer. A vér glükózszintjét csökkenti a hepatociták glükoneogenezisének gátlásával, az inzulin által kiváltott glükózfelvétel elősegítésével harántcsíkolt izomban és zsírszövetben (2002, Kirpichnikov és mtsai). Kimutatták, hogy a metformin felvételében jelentős szerepük van a szerves kationtranszportereknek (2002, Wang és mtsai; 2005, Kimura és mtsai).

Számos beteg eltérő funkciójú variánsát hordozza ezeknek a transzportereknek. Az eltérő funkció oka lehet az eltérő aminosavsorrend. A korábban említett polimorfizmusok egy része megakadályozza a metformin transzportját, ezáltal rezisztenssé téve az adott SNP-t hordozó beteget a kezelésre. Emellett (főleg az OCT1 változatai) okozhatnak megnövekedett vesén keresztüli kiválasztást és májba való csökkent felvételt alacsony aktivitású genotípusokban, így csökkentve a metformin hatását. (2012, Tarasova és mtsai) Az általam fejlesztett teszt segítségével vizsgálható lenne ezen fehérjék aktivitása az egyes páciensekben.

A 2-es típusú cukorbetegségre 2010-ben csak az Amerikai Egyesült Államokban 48 millió alkalommal írtak fel metformint (forrás: IMS Institute for Healthcare Informatics). Ebből az adatból jól látszik, milyen gyakran alkalmazott gyógyszerről van szó, így a terápiák eredményessége és gazdasági okok miatt is fontos, hogy időben diagnosztizáljuk a fellépő rezisztenciát.

Napjainkban intenzíven kutatott téma a metformin rákellenes hatása. Mivel ezek a kutatások csak mostanában kezdődtek, ezért klinikai vizsgálati eredmény még nincs, de *in vitro* tanulmányok alapján valószínű, hogy a metforminnak van inzulin-független sejtosztódást gátló hatása. Ezt az AMPK (AMP aktivált protein kináz) aktiválásával éri el

(2000, El-Mir és mtsai; 2000, Owen és mtsai), ami a fehérje szintéziséért felelős mTOR-t (mammalian target of rapamycin) gátolja (2012, Hardie és mtsai). Így lassítja a sejtnövekedést és a sejtosztódást. A metformin lehetséges hatásait a **4.ábra** szemlélteti.



4. ábra
A metformin lehetséges jelátviteli útvonalai. (2014, Thompson AM)

3. Célkitűzések

Célom volt egy olyan áramlási citometriás tesztrendszer kidolgozása, melyben transzporterspecifikus fluoreszcens szubsztrátmolekulákkal vizsgálható az OCT1, OCT2, OCTN1 és OCTN2 fehérjék működése.

Ezzel a módszerrel gyorsan és egyszerűen vizsgálható lenne gyógyszerfejlesztés során, hogy az adott molekula miként hat kölcsön ezekkel a transzporterekkel. Továbbá könnyebben és gyorsabban lehetne diagnosztizálni az egyes betegek eltérő transzporter- aktivitását a metformin kezelés elkezdése előtt.

Ehhez számos festéket teszteltünk úgy, hogy a különböző transzportereket túltermelő sejtekhez két koncentrációban hozzáadtuk a vizsgálandó anyagokat, majd áramlási citométerrel megmértük a sejtek fluoreszcencia-intenzitását. Megfelelő vitális festékekkel ellenőriztük a mérés során az élő sejtek arányát.

A kapott fluoreszcencia- értékeket összehasonlítottuk a vadtypus értékeivel. Olyan festéket kerestünk, amely legalább nyolcszoros intenzitás-különbséget mutat egy transzfektált sejtvonalban a vadtypushoz képest.

Az általam fejlesztett teszt főleg 2-es típusú cukorbetegség kezelése során lesz használható.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Sejtvonalak

Kísérletem során Chinese Hamster Ovary (CHO) sejtvonalakat használtam. A stabilan transzfektált CHO sejtek az adott transzportert overexpresszálják.

A CHO K1 sejtvonal az ATCC törzsgyűjteményből származik, a CHO-OCT1, -OCT2, -OCTN1, -OCTN2 sejtvonalak ennek felhasználásával a SOLVO Biotechnológiai ZRt.-nél készültek.

4.2 Sejttenyésztés

A sejteket 75 cm²-es flasksokon szaporítottam, 37°C-on, 5% szén-dioxid mellett. A letapadó sejteket 90 %-os konfluencia elérésénél, tripszines kezeléssel leemésztettem és felhasználtam őket a méréshez.

4.2.1. Tápoldat

A CHO sejteket komplettált DMEM-F12 (1:1) (Lonza) médiumban tenyésztettem. A komplett médium tartalmaz: 10 % főtális borjúsavót (GIBCO), L-Prolint (34 µg/ml), L-Glutamint (2 mM, SIGMA) és penicillin-streptomycin antibiotikumot (100 unit/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, Lonza).

4.2.2 Sejtek passzálása

A sejtekkel passzálásuk során steril fülke alatt dolgoztam. Először leszívtam róluk a tápoldatot, majd 10 ml PBS-sel (phosphate buffered saline) átmostam a flaska alját, és ezt is leszívtam róla. Ezután 2 ml tripszint öntöttem a sejtekre, és 37°C-on 3 percig inkubáltam. Utána a sejtekhez 3 ml tápoldatot adtam, felszuszpendáltam őket, és 300 µl-t visszahelyeztem a flaskába a szuszpenzióból, a többit pedig 50 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttem és ezt használtam a méréshez. A flaskát feltöltöttem 30 ml-re tápoldattal, és visszatettem az inkubátorba.

4.3 Vizsgált anyagok

Méréseim során különféle festési eljárásokhoz használatos festékeket alkalmaztam. Szabadalmi okokból ezeknek a neve titkos, csak Compound 1-17-ként nevezem meg őket a dolgozatban. A festékek kiválasztása során feltétel volt, hogy fiziológiás pH-n egyszeres

pozitív töltéssel rendelkezzenek. Az irodalmi adatok alapján számos DNS festéket és pH indikátort válogattam be, ezek közül egyiknek se ismert kölcsönhatása a vizsgált transzporterekkel. **(3. táblázat)**

3. táblázat

A tesztelt anyagokhoz használt vitális festékek A vitális festék fajtáját az határozta meg, hogy a tesztanyag fluoreszcens spektruma hova esett.

Tesztelt anyag	Vitális festék
Compound 1	SYTOX Green
Compound 2	SYTOX Green
Compound 3	Propidium-jodid
Compound 4	Propidium-jodid
Compound 5	Propidium-jodid
Compound 6	Propidium-jodid
Compound 7	SYTOX Green
Compound 8	SYTOX Green
Compound 9	Propidium-jodid
Compound 10	Propidium-jodid
Compound 11	Calcein-AM
Compound 12	Calcein-AM
Compound 13	Calcein-AM
Compound 14	Propidium-jodid
Compound 15	Propidium-jodid
Compound 16	Propidium-jodid
Compound 17	Propidium-jodid

4.4 Kísérleti elrendezés

Méréseimhez a passzálás során összegyűjtött, szuszpenzióba vitt sejteket használtam.

Első lépésben a sejtenyésztes során használt tápoldattól megtisztítottam a sejteket a következő módszerrel:

1. A szuszpenziót 5 percig centrifugáltam 300 rcf-en
2. A felülúszót leöntöttem, és a sejteket felvettem 5 ml HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution)
3. A szuszpenziót 5 percig centrifugáltam 300 rcf -en
4. A felülúszót leöntöttem, és a sejteket újra felvettem 5 ml HBSS-ben

Calcein-AM vitális festék használata esetén **(3. táblázat)**, 12,5 µl, 0,1 mM-os Calcein-AM (calcein acetoxi-metilészter) oldatot adtam a szuszpenziókhoz, így azokban a festék végkoncentrációja 0,25 µM volt. Egyéb vitális festék esetén ebben a lépésben nem adtam a

szuszpenziókhoz semmit, mivel ekkor a vitális festéket a kísérlet végén adtam hozzá a sejtekhez.

Szétosztottam minden egyes sejtvonalból 400-400 μl szuszpenziót 10-10 számozott félkémcsőbe.

A következő lépésben hozzáadtam a vizsgálandó festéket a sejtszuszenziókhoz. Mindegyik festéket 2- és 20 μM -os koncentrációban vizsgáltam. Ehhez először a festékpороkból készítettem 10 mM-os törzsoldatot Milli-Q vízben vagy dimetil-szulfoxidban (DMSO) az anyag oldódási tulajdonságainak megfelelően. Ezután ezekből készítettem 100 μM -os hígabb oldatot, majd megfelelő mennyiséget belemértem a csövekbe úgy, hogy az előbb leírt festékkoncentrációkat érjem el.

37°C-on 20 percig inkubáltam a mintákat, majd 1 percig centrifugáltam 300 rcf-en; ezáltal elválasztottam a sejteket az oldattól, így leállítottam a vizsgált anyag esetleges transzportját. A felülúszót leöntöttem. A sejteket ezután felszuszendáltam 800 μl HBSS-ben.

Újra centrifugáltam a mintákat 300 rcf-en 1 percig, majd leöntöttem a felülúszót.

Végül a sejteket attól függően, hogy milyen vitális festéket használtunk, újra felszuszendáltam:

- Propidium-jodid használatakor: 800 μl 15 μM -os Propidium-jodidban
- SYTOX Green használatakor: 100 μl SYTOX Green oldatban (a törzsoldat 1,5 μM -os, 10 nM-os végkoncentrációban alkalmazva). 10 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után 700 μl HBSS-t adtam az oldathoz.
- Calcein-AM használatakor: 800 μl HBSS-ben.

Ezután áramlási citométerrel megmértem az egyes sejtek fluoreszcencia-intenzitását.

4.5 Áramlási citométer

Méréseimhez Partec Cyflow áramlási citométert használtam a gyártó által ajánlott paraméterekkel, amiket a mérés céljaihoz optimalizáltam. A készülék 3 lézerrel (375 nm, 488 nm, 638 nm) rendelkezik, és 7 detektoron történik az adatgyűjtés. Ezek közül egy a mintából oldalra szóródó fénynyaláb intenzitását méri, a másik hat a mintából előre kilépő fénynyaláb intenzitását, különböző hullámhossz-tartományokon.

Az alábbi lézereket, az azokhoz tartozó szűrőket és detektorokat használtam:

- 488 nm-es lézer
 - 512-542 nm-es szűrő → FL1 detektor
 - 565-615 nm-es szűrő → FL2 detektor
 - 671-693 nm-es szűrő → FL3 detektor
 - 748 nm-nél hosszabb hullámhosszú fényt átengedő szűrő → FL4 detektor
- 375 nm-es lézer
 - 430-480 nm-es szűrő → FL5 detektor
- 638 nm-es lézer
 - 665-685 nm-es szűrő → FL6 detektor

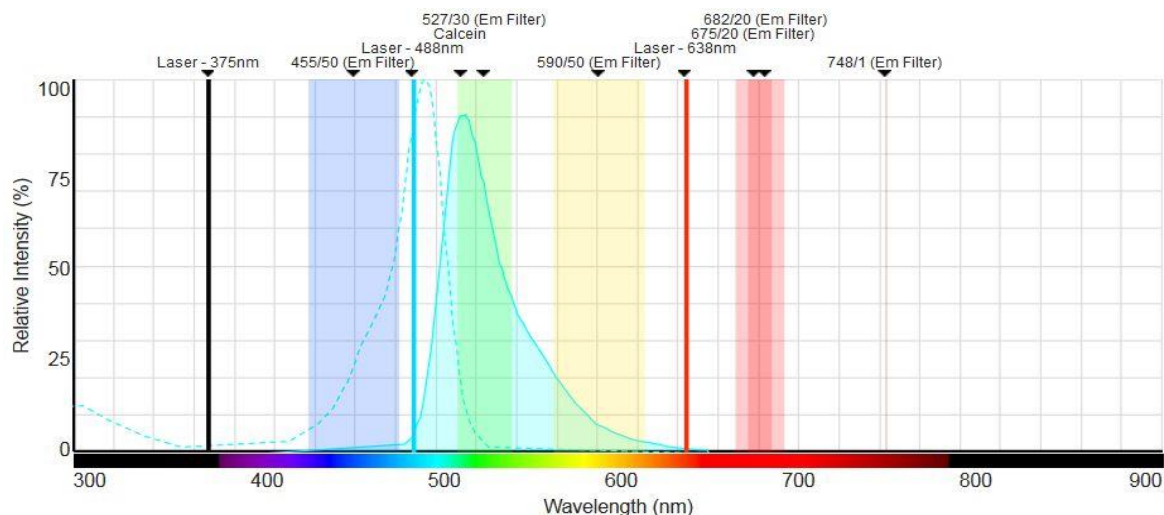
Mindegyik mintát lemértem az összes detektoron.

A minták mérése során az FSC-SSC grafikon alapján elkülönítettem az optikailag élőnek karakterizált sejteket. FSC: forward scattering - előre szóródás, ami a részecske méretéről ad hozzávetőleges információt. SSC: side scattering - oldalra szóródás, ami a részecske granularitásáról, a sejtmag tördezettségéről ad információt, ami jól korrelál az életképességgel. Ezután az optikailag élőnek tekinthető sejteken belül tovább szűrtem a megfelelő spektrumú vitális festékekkel az enzimatikusan aktív (Calcein-AM) vagy ép sejtmembránnal rendelkező (PI és SyTox Green) sejtekre, az **5.ábrán** látható fluoreszcencia-spektrumoknak megfelelően.

A Calcein-AM egy nem fluoreszcens membrán permeábilis molekula, sejten belül az észterázok elhasítják az acetoxi-metilészter csoportot és így fluoreszcens Calcein jön létre. Mivel ez egy membrán impermeábilis molekula, aktív észterázok jelenlétében felhalmozódik a sejten belül, így a fluoreszcens jel erősödése a szabad molekula felhalmozódását, közvetve az enzimaktivitást jelzi.

A propidium-jodid és a Sytox Green szintén életképesség festékek, de a sejtmembrán sértetlenségéről nyújtanak információt. Mindkettő membrán impermeábilis DNS interkaláló molekula, melyeknek a DNS-hez kötve jelentősen megnő a fluoreszcencia-intenzitásuk. A sejtek csak akkor jelölődnek propidium-jodiddal vagy Sytox Greennel, ha a sejtmembrán jelentősen sérült, ezáltal ezen sejtek halottnak tekinthetők.

A mintákból 15000 élő sejtet mértem le, melyekből az adott detektoron mért fluoreszcencia intenzitás geometriai átlagát (Geo-MFI) számoltam ki. A különböző fluoreszcencia tatományoknak megfelelő csatornákon RN kapukkal jelöltem ki a vizsgálandó sejtek Geo-MFI-jét (RN1-6).



5. ábra

A Calcein-AM excitációs és emissziós spektruma, valamint a detektorok mérési tartományai. Az ábra a Fluorescence SpectraViewer-el készült. (Life Technologies)

Calcein-AM vitális festék használata esetén az élő sejtek magas fluoreszcenciát mutatnak az FL1 és az FL2 csatornán.

Azokban az esetekben, mikor propidium-jodidot, vagy SYTOX Greent használtunk, a nagyon intenzíven jelölődött, ezáltal életképtelennek tartott sejteket kivontuk a további vizsgálatból. Mivel az életképes sejtek nem festődnek ezekkel a festékekkel, így ebben az esetben élő, kikapuzott sejtek fluoreszcens intenzitását mérve abban a hullámhossz tartományban eldönthető, hogy az ott mért fluoreszcencia a vitális festékekből vagy a tesztanyagból származik-e.

A kiértékelés során a kapott fluoreszcencia adatokat a megfelelő sejtvonal tesztanyaggal nem kezelt kontrolljának fluoreszcencia adataihoz viszonyítottam. Így megkaptam a relatív fluoreszcencia értékeket. Ezután a transzportert túltermelő minták relatív fluoreszcenciáját elosztottam a vadttípus relatív fluoreszcenciájával, ez adta a foldot.

5. Eredmények és értékelésük

Az alábbi táblázatokban a tesztanyagok foldjait ábrázolom transzporterenként és a megfelelő detektorokhoz használt kapunként csoportosítva. Narancssárgával jelöltem a 2-nél nagyobb foldot mutató tesztanyagokat, ezek kis valószínűséggel lehetnek szubsztrátjelöltek. Pirossal jelöltem a 4-nél nagyobb foldot mutató tesztanyagokat, ezek nagy valószínűséggel jó szubsztrátjelöltek.

4. táblázat

A tesztanyagok foldjai 2 μ M-os koncentrációnál

	OCT1						OCT2						OCTN1						OCTN2					
	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6
Compound 1	2.6	4.1	1.1	1.1	1.1	0.9	2.1	2.7	1.1	1.2	1.1	0.6	2.9	4.9	1.1	1.3	1.2	0.6	3.8	9.3	1.3	1.7	1.1	1.1
Compound 2	2.1	2.5	1.1	1.1	1	0.4	2.1	2.8	1.2	1.1	1	0.2	2.5	3.5	1.1	1.1	1	0.6	2.8	4.7	1.1	1.2	0.9	0.9
Compound 3	0.2	0.2	0.9	0.9	1.3	0.9	0.2	0.2	0.9	1	1.6	1.6	0.2	0.3	0.9	1	1	0.4	0.3	0.3	0.8	0.9	1.1	0.8
Compound 4	1.7	1.5	1	1.3	1.3	1.4	1.1	1.2	1	1.2	1.3	1.4	1	1.1	1	1.1	1.2	1.2	1	1.1	1	1.1	1.2	1.2
Compound 5	1	4.4	1.1	1.2	0.8	1.1	1	1.4	1	1	0.7	1.2	0.9	0.9	1	0.8	1	1.5	1	1.2	1	0.9	0.9	2
Compound 6	1.2	0.5	0.9	0.9	1.7	1.4	1.3	0.6	1	1	1.2	1.3	1.1	2.5	1.2	2.1	1.6	1.1	1.2	1	1.1	1.6	1.6	0.9
Compound 7	1.1	1	1.1	1.2	0.9	0.9	1	1	1	1	1	1	1.1	1	1.1	0.6	1.1	1	0.9	0.9	1	0.9	1	1
Compound 8	1.8	0.3	0.6	0.9	1.3	0.6	2.8	1.6	1.1	2.3	1.2	1	1.5	2.1	1.2	2.4	1.3	0.9	2	2.1	1.1	2.3	1.3	1.2
Compound 9	1	0.8	0.9	0.8	1.2	0.9	1.1	1	1	1	1.1	1	1	1	1.1	1.1	1.1	1	1	1	1.1	1.1	1	1
Compound 10	1	0.9	0.9	0.8	0.8	1.1	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1	1	0.9	0.8	0.9	0.9	1	1	0.9	0.8	1	0.9
Compound 11	1.1	1	1	1.1	1	1.1	0.9	0.9	1	1	1.2	1.1	1	1	1	1.1	1.2	1.1	1	1	1	1.1	1.3	1.1
Compound 12	1	1	1	1.1	1.1	1	1	1.1	1	1.1	1.1	0.9	1	1.1	1	1.2	1	1	1	1	1	1.1	1.1	1
Compound 13	1.2	0.3	0.7	1	0.8	1.2	1.7	1.2	1.1	1.7	0.9	1.1	1.3	2.2	0.9	1.8	1.2	1.2	1.3	1.4	1.1	1.5	1.1	0.9
Compound 14	1.9	3.6	2.9	7.1	0.8	1.3	0.8	0.9	1	1.2	0.9	1	1	1	1	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Compound 15	1	5.5	1.2	1.5	1.2	1.4	1.1	1.6	1	1	1	2.8	1	1.3	1	1.1	1.2	1.9	1.1	1.6	1.1	1.2	1.1	2.3
Compound 16	1	1.2	1.1	1.3	0.9	1.1	1	0.9	1	1.1	1	0.9	1	1	1	1.1	1	1	1	1.1	1	1.3	1	1.1
Compound 17	1	0.9	1	1	1	1.1	1	0.9	1	1	0.9	0.9	1	1.1	1	1.1	1	1	1	1	1	1.1	1	1.1

A 4.táblázatban látható, hogy a vizsgált festékek kb. fele jobban felhalmozódott a transzportert túltermelő sejekben, mint a vad típusú sejekben. Ezek közül szinte mindegyik több transzfektált sejtvonalon is felhalmozódott, ami várható volt a transzporterek átfedő szubsztrátspecifitása miatt.

5. táblázat

A tesztanyagok foldjai 20 μ M-os koncentrációnál

	OCT1						OCT2						OCTN1						OCTN2					
	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6
Compound 1	1.9	2.2	1	0.9	1.1	17	1.9	2.2	0.9	0.9	1.1	21	2	2.6	1	0.9	1.2	0.8	2.4	3.7	1.4	1.6	1	1
Compound 2	1.4	1.5	1	0.7	1	7.5	1.4	1.5	1	0.9	1	11	1.3	1.2	1	0.9	1	0.8	1.3	1.2	1.1	1.1	1	1.1
Compound 3	0	0	0.5	0.6	1.7	0.9	0.1	0.1	0.6	0.9	2.2	2	0.1	0.2	0.6	0.9	1.5	0.4	1	1.1	1.1	1.3	1.7	1
Compound 4	1.8	2.6	1	1.6	2	1.7	1.2	1.3	1	1.3	1.9	1.5	1	1.2	1	1.3	1.8	1.3	1	1.2	1	1.3	1.2	1.3
Compound 5	1	3.2	1	1.1	0.9	1.2	1	1.7	1	1.2	0.8	1.3	0.9	1.2	1	0.9	1	1.3	1	1.5	1	1	1.2	1.4
Compound 6	1.2	0.4	0.8	1.2	1.4	0.8	1.2	0.9	1	1	1.3	1.4	1.1	1.4	1.1	2.1	1.6	1.2	1.2	1.1	1.1	1.9	1.9	1.6
Compound 7	1	1	1	1.3	0.9	1	0.9	0.9	0.9	1	0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	0.9	1	1	1.1	1.1
Compound 8	1.8	0.3	0.6	0.9	1.3	0.6	2	1.2	1.1	1.7	1.1	0.9	1.9	2.7	1.3	2.8	1.2	0.9	2.1	2.2	1.2	2.4	1.3	1.2
Compound 9	1	0.5	0.8	0.9	1.1	0.9	1.6	1.5	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.5	1.1	1.1	1	1	1.4	2.3	1.1	2.4	1.3	1.5
Compound 10	1	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	1	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	1	1	0.9	0.8	0.9	0.9	1	0.9	0.9	0.8	1	0.9
Compound 11	1	1	1	1.2	1.2	1.1	0.9	0.9	1	1.1	1	1	1	1	1	1.1	1.1	0.9	1	1	1	1.1	1.1	1.1
Compound 12	1.2	1.1	1	1.2	1.1	1	1	1	1.1	1.1	1	0.9	1.2	1.1	1	1.2	1.2	1	0.9	1	1	1.1	1	1
Compound 13	1.4	0.4	0.7	0.8	0.9	0.3	1.9	1.4	1.1	1.4	0.9	0.5	1.5	2.7	0.9	1.2	1.3	0.2	1.4	1.5	1.1	1.2	1.2	0.4
Compound 14	1	1.7	2.6	5.9	0.9	1.6	0.9	1	1.1	1.4	1	1.2	1.1	1	1.1	1.1	1	1	1	1	0.9	0.8	1.1	1.1
Compound 15	1.1	2.2	1	0.7	0.9	1.6	1	0.9	1	0.6	0.8	1.6	0.9	0.8	0.9	0.7	0.9	1.6	1	0.9	1	0.6	0.8	2.4
Compound 16	1	1	1	1.1	1	1	1	0.9	1	1	1	1	1	1	1	1.1	1	1	1	1.1	1	1.2	1	1
Compound 17	1	0.2	0.7	0.6	1.1	1	0.9	0.8	1	1.1	1.2	1	0.8	1	1	1.3	1.6	1.1	0.7	0.9	1	1.2	1.5	1.1

Az 5.táblázatban látszik, hogy 20 μ M-os koncentrációnál hasonlóan viselkedett a tesztanyagok nagy része. A pirossal kiemelt anyagok mindkét koncentrációnál kettőnél nagyobb foldot mutattak, így ezek a legígéretesebb szubsztrátjelöltek.

A táblázatok alapján látszik, hogy a Compound 1 valószínűleg mindegyik transzporternek szubsztrátja lehet. Emiatt nem lehetséges szelektív tesztrendszer kidolgozása ezzel a festéssel, csak ha sikerül szelektív gátlószert találni mindegyik transzporterre. Ilyen vegyületek egyenlőre nem ismertek, a hasonló fehérjeszerkezet miatt a gátlószerek hasonlóan hatnak ezekre a transzporterekre.

A Compound 2 affinitása a különböző transzporterekhez hasonló az előző vegyülethez, ezt indokolja az is, hogy a szerkezetük hasonló. Emiatt valószínű, hogy ez az anyag is szubsztrátja lehet az itt vizsgált összes fehérjének, de további vizsgálatokkal ez megerősíthető vagy cáfolható.

A Compound 5, 14 és 15 jó eséllyel mind OCT1 szubsztrátok. Mindkét koncentrációnál magas foldjuk volt, de mindháromnál alacsonyabb koncentráció mellett volt jobban specifikus a tesztanyagok felhalmozódása. Emiatt mindháromnál érdemes alacsonyabb koncentrációtartományban vizsgálni a transzporter aktivitását.

A Compound 3, 4, 6, 8, 9, 13 foldja kisebb volt 4-nél mindkét koncentrációban, így ezekről nem jelenthetjük ki, hogy jó szubsztrát-jelöltek. Előfordulhat, hogy csak az általam használt koncentrációk mellett nem elég specifikus a transzportjuk. Ezért ezeket az anyagokat

célszerű lehet megvizsgálni szélesebb koncentrációtartományban, mert lehet, hogy ott már nagyobb affinitással szállítja a transzpoter ezeket a vegyületeket.

A Compound 7, 10, 11, 12, 16, 17 foldja minden mérésnél kisebb volt 2-nél, így ezek az anyagok nagy valószínűséggel nem szubsztrátjai a vizsgált transzportereknek. Emiatt ezekkel az anyagokkal a további munkám során nem fogok dolgozni.

6. Összefoglalás

Kísérleteim során 17 fluoreszcens kationos festéket vizsgáltam szerves kationtranszportereket túltermelő sejtekben áramlási citométer segítségével. Így szerettem volna meghatározni, hogy a vizsgált festékek közül van-e olyan, ami szubsztrátja ezen transzporterek közül valamelyiknek.

A **6 táblázat** szemlélteti azokat a festékeket, amelyek a legjobb szubsztrát-jelöltek, tehát az adott transzporterre a foldjuk 4 feletti. A ✓ azt jelöli, hogy az adott festék abban a koncentrációban jó szubsztrát-jelölt. A ✗ azt jelöli, hogy az adott festék abban a koncentrációban nem tekinthető jó szubsztrát-jelöltnak.

6.táblázat

Lehetséges szubsztrátok a vizsgált sejtvonalakra.

Tesztanyag	Koncentráció	Sejtvonal			
		OCT1	OCT2	OCTN1	OCTN2
Compound 1	2 μ M	✓	✗	✓	✓
	20 μ M	✓	✓	✗	✗
Compound 2	2 μ M	✗	✗	✗	✓
	20 μ M	✓	✓	✗	✗
Compound 5	2 μ M	✓	✗	✗	✗
	20 μ M	✗	✗	✗	✗
Compound 14	2 μ M	✓	✗	✗	✗
	20 μ M	✓	✗	✗	✗
Compound 15	2 μ M	✓	✗	✗	✗
	20 μ M	✗	✗	✗	✗

Eredményeim alapján elmondható, hogy sikerült találnom specifikus szubsztrátjelöltet az OCT1 transzporterhez. Mivel több ilyen molekulát is találtam, ezért jó esély van arra, hogy ezek között található olyan, ami ténylegesen a szubsztrátja. A többi transzporterhez specifikus szubsztrátjelöltet egyelőre nem sikerült találnom, viszont olyan festéket igen, ami a többi vizsgált transzporterrel is mutatott kölcsönhatást. Emiatt érdemes ezekkel is foglalkozni a későbbiekben, mivel a tesztrendszer úgy is működőképes lehet, ha egy kevésbé specifikus szubsztrátot olyan gátlószerral (gátlószerekkel) együtt használunk, amit csak az egyik transzporter ismer fel.

A továbbiakban célom a festékek felvételének karakterizálása. Ennek során szélesebb koncentrációtartományban fogom megismételni a kísérleteimet. Emelett az inkubációs időt is optimalizálni fogom. Végül gátlószerezrel fogom egyértelműen bizonyítani, hogy melyik anyag valódi szubsztrát.

Ha ezen mérések végén sikerül fluoreszcens szubsztrátot találni, következő lépésként humán vérmintákon szeretném beállítani a tesztrendszert.

Ha a jelöltek között nem sikerül valódi szubsztrátot azonosítani, akkor további mérések során érdemes lenne még több kationos fluoreszcens molekulát megvizsgálni, hogy szubsztrátja-e ezen transzportereknek. Elsősorban olyan molekulákat szeretnék találni, amelyek OCTN1 és OCTN2 transzportereknek szelektív szubsztrátja, mivel méréseim során ilyen festék nem volt a vizsgált anyagok között. Mivel az OCTN1 és OCTN2 fehérjéknek ismert specifikus endogén szubsztrátjuk (pl.: ergothioneine, karnitin), megoldás lehet ezeket fluoreszcens csoporttal jelölni. Ha a jelölés után is specifikusan képesek a transzporterek a nekik megfelelő molekulát szállítani, akkor nagy valószínűséggel lehet mindegyik transzporterhez megfelelő szubsztrát-jelöltet találni.

Ha nem sikerül specifikus szubsztrátot találni, akkor olyan szelektív gátlószereket próbálunk keresni ezekhez a transzporterekhez és egy, mindegyik transzporter által szállított fluoreszcens szubsztrátot.

Összefoglalásként elmondható, hogy a vizsgálataim során az OCT1-hez sikerült találnom specifikus szubsztrát-jelöltet, a többi transzporterhez pedig kis specificitású jelölteket.

10. Irodalomjegyzék

Barendt WM, Wright SH. The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *J Biol Chem* (2002) 277: 22491–22496.

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* (2000) 275:223–228

Ganapathy ME, Huang W, Rajan DP, Carter AL, Sugawara M, Iseki K, Leibach FH, and Ganapathy V. Beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *J Biol Chem* (2000) 275: 1699–1707.

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* (1997) 16: 871–881.

Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, et al. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) 102 (14): 5256–61. doi:10.1073/pnas.0408624102. PMC 555966. PMID 15795384.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13:251–262

http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/IMS%20Institute/Statistics%20File/IHII_UseOfMed_report.pdf (letöltve: 2013 Április 30.)

Jonker JW, Wagenaar E, Van Eijl S, Schinkel AH. Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* (2003) 23: 7902–7908.

Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E et al. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* (2002) 12: 591–595.

Kimura N, Okuda M, Inui K. Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm Res* (2005) 22: 255–259.

Kindla J, Fromm MF, König J. In vitro evidence for the role of OATP and OCT uptake transporters in drug-drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2009) 5(5):489-500

Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* (2002) 137: 25–33.

Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24 (2007): 1227–1251.

Lahjouji K, Mitchell GA, Qureshi IA. Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol Genet Metab* (2001) 73: 287–297.

Lin Z, Nelson L, Franke A, Poritz L, Li TY, Wu R et al. OCTN1 variant L503F is associated with familial and sporadic inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* (2010) 4: 132–138.

Moaddel R, Ravichandran S, Bighi F, Yamaguchi R, Wainer IW. Pharmacophore modelling of stereoselective binding to the human organic cation transporter (hOCT1). *Br J Pharmacol* (2007) 151: 1305–1314.

Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* (2002) 13: 866–874.

Nies AT, Hofmann U, Resch C, Schaeffeler E, Rius M, et al. Proton Pump Inhibitors Inhibit Metformin Uptake by Organic Cation Transporters (OCTs). *PLoS ONE* 6(7) (2011): e22163. doi:10.1371/journal.pone.0022163

Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, et al. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* (2009) 50: 1227–1240.

Ohashi R, Tamai I, Inano A, Katsura M, Sai Y, Nezu JI, Tsuji A. Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) 302:1286–1294.

Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* (2000) 348(Pt 3):607–614

Roth M, Obidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology* (2012) 165 1260-1287

Seth P, Wu X, Huang W, Leibach FH, Ganapathy V. Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function. *J. Biol. Chem.* (1999). 274:33388–33392

Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem.* (1998) Aug 7;273(32):20378-82.

Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, Bumbure A, Ritenberga R, Nikitina-Zake L, Fridmanis D, Vaivade I, Pirags V, Klovins J. Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients. *Pharmacogenet Genomics.* (2012) Sep;22(9):659-66. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283561666.

Thompson AM. Molecular pathways: Preclinical models and clinical trials with metformin in breast cancer *Clin Cancer Res* (2014) doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0354

Urban TJ, Yang C, Lagpacan LL, Brown C, Castro RA, Taylor TR et al. Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4). *Pharmacogenet Genomics* (2007) 17: 773–782.

Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuvara H, Schinkel AH, et al. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* (2002) 302: 510–515.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Krajcsi Péternek és Szerémy Péternek, hogy lehetőséget biztosítottak szakdolgozatom elkészítésére, segítségükért a kísérletek menetének elsajátításában és elvégzésében, valamint szakmai tanácsaikért, melyekkel munkámat segítették.

Szeretném megköszönni belső konzulensem, Dr. Rákhely Gábor szakmai tanácsait és segítségét.

Továbbá szeretném megköszönni a SOLVO Biotechnológiai ZRt. összes dolgozójának tanácsait, melyekkel munkámat segítették.

8. Rövidítésjegyzék

ABC transzporter: ATP-kötő kazettát tartalmazó transzporter

AMPK: AMP aktivált protein kináz

AMP: adenzin-monofoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

Calcein-AM: Calcein acetoxi-metilészter

DMSO: dimetil-szulfoxid

FSC: előre szóródás

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

IC₅₀: maximális gátláshoz tartozó koncentráció fele

K_m: Michaelis konstans

MPP: 1-metil-4-fenilpiridínium

mTOR: mammalian target of rapamycin

NMN: N1-methylnicotinamide

OAT: szerves anion transzporter

OCT: szerves kation transzporter

OCTN: Na⁺/karnitin kotranszporter

PBS: foszfát puffer sóoldat

SAR: szerkezet-aktivitás kapcsolat

SLC: oldott anyagokat szállító transzporterek

SNP: single nucleotide polymorphism

SSC: oldalra szóródás

TEA: tetraetil-ammónium

TMD: transzmembrán alegység

9. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Király Kinga Zsófia a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- Sejttenyésztést
- Kísérlet összeállítását
- Áramlási citométerrel a minták lemérését
- Adatok kiértékelését

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2014. április 17.