

Ph.D. értekezés tézisei

**Gyógyszermolekulák és ABC transzporterek  
kölsönhatásának vizsgálatára  
alkalmas *in vitro* rendszerek fejlesztése és validálása**

**Kis Emese**

Témavezető: Dr. Krajcsi Péter  
Belső konzulens: Prof. Dr. Kovács Kornél

Biológia Doktori Iskola  
Biotechnológia Tanszék, SZTE TTIK  
Solvo Biotechnológiai ZRt.  
2010

## Bevezetés

Az ABC transzporterek egy nagy fehérjecsalád tagjai, amelyek szerteágazó funkciót töltenek be az élő szervezetben; többek között a detoxifikációt (ABCB1, ABCC1, ABCG2), a xenobiotikumokkal és oxidatív stresszel szembeni védelmet (ABCC család tagjai), a lipid metabolizmusban való részvételt (ABCA1, ABCB4, ABCG család tagjai), fiziológiaszubsztrátok eltávolítását (ABCB11, ABCC1) valamint az antigénprezentációt is (TAP1, TAP2), stb.

Ennek ellenére, a tumorok multidrog rezisztenciája (MDR) az, amely elsőként eszünkbe jut a fehérjecsalád említésekor. Az ABCB1 felfedezése óta nyilvánvalóvá vált, hogy egy, a membránban elhelyezkedő fehérje milyen jelentősen tudja befolyásolni az alkalmazott terápia eredményességét. Hiszen az ABCB1 expresszió szelektív előnyt jelent a tumoros sejtek a citosztatikumkezelés során, mivel az adott szerre, illetve más molekulákra is keresztrezisztens populáció fog túlélni és szaporodni. A multidrog rezisztencia jelenség kapcsán az ABCB1 mellett még két ABC transzportert emelhetünk ki, ezek az ABCC1 és az ABCG2. Az MDR jelensége nemcsak a daganatos betegségek kezelése esetén merülhet fel, hanem pl. olyan gyulladásos,- és autoimmunbetegségek esetében is, ahol a gyógyszerek – melyek között sok citosztatikus hatású – viszonylag hosszantartó alkalmazása szükséges.

A rheumathoid arthritis (RA) egy olyan krónikus betegség, amely a csontok és ízületek gyulladásával jellemezhető. Az ún. DMARD (disease modifying anti-rheumatic drug), vagy másnéven bázisterápiás vegyületek a RA kezelésében alkalmazott olyan elsővonalbeli szerek, melyek a tünetek enyhítésére és a strukturális károsodás progressziójának lassítására szolgálnak. Korai alkalmazásuk rendkívül fontos az ízületi deformitás és a rokkantság megelőzése érdekében. Ezen molekulákra jellemző, hogy hetekig, akár hónapokig is kell alkalmazni őket ahhoz, hogy hatékonyak legyenek. A kialakult rezisztencia azonban meglehetősen összetett, köszönhető egyrészt az ABC transzportereknek, de a sérült gyógyszerfelvétel, aktiváció és megnövekedett detoxifikáció is szerepet játszik. Egyes bázisterápiás vegyületek bizonyítottan szubsztrátjai az ABC transzportereknek és több esetben sikerült a kezelés hatására, megemelkedett ABC fehérje expressziót detektálni. Megfigyelték pl, hogyha humán T limfocitákat szulfaszalazin jelenlétében tenyésztettek, akkor a rezisztens populáció ABCG2-t expresszált és leflunomidra is rezisztens volt.

A leflunomid az első, kifejezetten a RA kezelésére kifejlesztett bázisterápiás gyógyszer. Ez a molekula egy izoxazol származék, amely a mitogén-stimulált T- és B-limfociták proliferációját gátolja, oly módon, hogy blokkolja a *de novo* UMP-szintézis kulcsenzimét a dihydroorotát

dehydrogenázt. Prodrug-nak tekinthető, hiszen a szervezetbe kerülve egy gyors reakció során a biológiai hatásért felelős molekula, az A771726, vagy más néven teriflunomid képződik belőle.

Az utóbbi évek kutatásai világítottak rá arra tényre, hogy a sejtmembránt nem tekinthetjük egy homogén kettős lipidrétegnek, hiszen különböző lipidekben és fehérjékben gazdag régiókból, doménekből épül fel. Raftoknak vagy kaveoláknak nevezik azokat a 10-200 nm nagyságú struktúrákat, amelyek rendkívül gazdagok szfingolipidben és koleszterinben, valamint rezisztensek olyan nemioinos detergenssel szemben, mint a Triton X-100. Ezekről a mikrodoménekről bebizonyították azt is, hogy számos különböző fehérjét lokalizálnak, pl. az ABC transzporterek közül az ABCB1-et, az ABCC1-et, az ABCC2-t és az ABCG2-t. Korábban laboratóriumunkban ABCG2-t expresszáló Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz kísérletekkel sikerült bizonyítani, hogy a membránkörnyezet koleszterintartalma pozitívan befolyásolja a fehérje működését, ezáltal a koleszterinnel feltöltött ABCG2-t expresszáló Sf9 membránpreparátumok ugyanolyan jól használhatóvá válnak, mint az emlős rendszerek. Ugyanis korábbi tanulmányok bebizonyították, hogy az Sf9 rovarsejtek membránjának megközelítőleg 20-szor alacsonyabb a koleszterintartalma az emlős sejtek plazmamembránjához képest.

Az ABCB11 mikrodomén lokalizációjára vonatkozólag korábban az irodalomban nem volt egyértelmű adat. Ugyanakkor tény, hogy a korábban már említett membrán koleszterintartalomra érzékeny pumpák – úgy mint ABCB1, ABCC2, ABCG2 – szintén részt vesznek a különböző szervezetből eltávolítandó molekulák epén keresztüli eliminációjában.

Az ABCB11 fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a kanalikuláris epesó transzportban, szabályozza a hepatocitákban, valamint gyakorlatilag az egész szervezetben az epesó koncentrációját. A hepatotoxicitás manapság az egyik legkritikusabb pontja a gyógyszerfejlesztésnek. Az esetek egy részében a toxicitás oka az, hogy az ABCB11 drogok általi gátlása miatt az epesók nemkívánt mennyiségben halmozódnak fel a hepatocitákban.

Számos molekuláról már a preklinikai kísérletek során kiderül, hogy májkárosodást okoz, ugyanakkor sok esetben – a molekulák közel 50%-ánál- erre csak a Fázis I klinikai kísérletei során derül fény. Ez többek között azzal magyarázható, hogy az adott molekula a preklinikai vizsgálatokhoz alkalmazott kísérleti állatban és az emberi szervezetben eltérő mértékben okoz hepatotoxicitást.

A patkány és az egér a leggyakrabban alkalmazott faj a gyógyszerek preklinikai fejlesztése során a gyógyszer farmakokinetikai sajáságainak *in vivo* becslésére. Ezekből az *in vivo* eredményekből szokás a humán *in vivo* farmakokinetika becslése, ami elengedhetetlen része a klinikai

kipróbálások megkezdésének. Ahhoz, hogy korrekt *in vivo* korrelációra esélyünk legyen, összehasonlító vizsgálatokat kell végezni egy olyan rendszeren, ahol azonos expressziós rendszerben vagy a humán vagy az egér vagy a patkány transzporter expresszálódik.

## **Célkitűzések**

1./ A bevezetőben említett terápiás területeken (daganatos betegségek, gyulladásos, -és autoimmunbetegségek) alkalmazott gyógyszermolekulák tesztelése a multidrogrezisztenciában szerepet játszó transzportereket kifejező MDR1-Sf9 (ABCB1-et), MRP1-Sf9 (ABCC1-et), valamint korábban a laboratóriumunkban kifejlesztett HT-BCRP-HAM-Sf9 (high-throughput) membránpreparátumok alkalmazásával abból a célból, hogy a korábban nem karakterizált kölcsönhatásokat leírjuk. Előzetes kísérleteink alapján specifikus kölcsönhatást figyeltünk meg az ABCG2 fehérje és a leflunomid molekula között. Célunk volt ezen kölcsönhatás természetének jellemzése különböző *in vitro* tesztrendszerek segítségével.

2./ Kíváncsiak voltunk arra, hogy a koleszterinnek az ABCG2-re való potencírozó hatása tapasztalható-e más olyan ABC transzporter esetében is, mint az ABCB11, amely az ABCG2-höz hasonlóan szintén a hepatociták koleszterinben gazdag kanalikuláris membránjában fejeződik ki. Célul tűztük ki, az így kifejlesztett BSEP-HAM-Sf9 (ABCB11-et expresszáló) membránok jellemzését, valamint korrelációs vizsgálatok végrehajtását a már rendelkezésre álló ABCB11 membránokkal vezikuláris transzport kísérletekben. Ezzel párhuzamosan ismert hepatotoxikus gyógyszerek fajok közötti affinitáskülönbségeinek vizsgálatát is el kívántuk végezni.

3./ Az egér Bsep-HAM-Sf9 (egér Abcb11-et kifejező) membrán ATPáz esszéjének adaptálásával egy széleskörűen alkalmazható nem radiokatív teszt kifejlesztése és optimalizálása is célunk volt. Ismert ABCB11 szubsztrátok segítségével validálni kívántuk az ATPáz esszében mért értékeket.

## **Anyagok és módszerek**

### **Sejtvonalak és membránpreparátumok**

A HEK293 sejtvonalat, és ennek ABCG2-t expresszáló változatát (HEK293-BCRP) 10%(v/v) hőinaktivált szérummal, 100 units/ml penicilinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2 mM L-Glutaminnal kiegészített MIX MEM (Hank's F12 : DMEM ,1:1) tápoldatban tartottuk 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó 37°C-os inkubátorban. 10%(v/v) hőinaktivált szérummal, 100 units/ml penicilinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2 mM L-Glutaminnal kiegészített Advanced RPMI 1640 tápoldatot alkalmaztunk a PLB985, PLB985-BCRP (ABCG2-t magasan expresszáló), K562-MDR (ABCB1-et magasan expresszáló) és HL60-MRP (ABCC1-et magasan expresszáló) sejtvonalak esetében, melyeket szintén 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó 37°C-os inkubátorban szaporítottunk.

A kísérletek során alkalmazott ABC transzportereket- úgymint ABCB1-et, ABCC1-et, ABCG2-t, egér, patkány és humán ABCB11-t expresszáló membránpreparátumok a Solvo Biotechnológiai ZRt-től származtak.

### **Western blott**

Az ABCG2 és ABCB11 fehérjék elválasztása poliakrilamid denaturáló gélen történt, vizualizálása pedig az anti-ABCG2 (BXP-21), valamint az anti-ABCB11 ellenanyag segítségével történt.

### **Koleszterin kezelés és a membránvezikulák koleszterin tartalmának meghatározása**

A membrán koleszterin töltését közvetlenül a membránpreparálás előtt végeztük oly módon, hogy a fertőzött sejteket 30 percig 37 °C-on 1 mM cholesterol@RAMEB komplex jelenlétében inkubáltuk.

A membrán koleszterintartalmának meghatározása a koleszterin-oxidáz módszeren alapul. A reakcióelegyhez membránt adtunk és ezt inkubáltuk koleszterol-oxidáz enzim jelenlétében 30 percig 37 °C-on. Centrifugálás után a felülúszót C18 fordított fázisú kromatográfiás oszlopot tartalmazó HPLC-vel analizáltuk. Az oxidált koleszterint 241 nm-en UV detector segítségével detektáltuk.

### **ATPáz esszé**

Az ATPáz aktivitások meghatározására a PREDEASY BCRP-HAM-ATPase Kit-et, a PREDEASY defBCRP-HAM-ATPase Kit-et, a PREDEASY MDR1-ATPase Kit-et, a

PREDEASY MRP1-ATPase Kit-et és a PREDEASY egér Bsep-HAM-ATPase Kit-et alkalmaztuk. Mindegyik esszét a gyártó által meghatározott paraméterek, úgymint  $\mu\text{g}$  membrán/lyuk, inkubációs idő és hőmérséklet mellett végeztük.

### **Vezikuláris transzport esszé**

Az "inside-out" vezikulákat is tartalmazó membránszuszpenziót a megfelelő esszé elegyben – amely tartalmazta a transzportált szubsztrátot is – ATP jelenlétében és hiányában  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A reakciókat hideg mosópufferrel állítottuk le. Ezt követően a reakcióelegyeket  $1\text{ }\mu\text{m}$  pórusméretű B típusú üvegfiltert tartalmazó lemezekre szűrtük és hideg mosó pufferrel mostuk. A filtereken maradt radioaktivitást folyadékszintillátor segítségével mértük az ATP-függő transzportot pedig az ATP-t tartalmazó és nem tartalmazó lyukakban mért értékek különbségéből számoltuk.

### **Festéktranszport esszék (Hoechst esszé és Calcein esszé)**

A mikrotiter lemezekre meghatározott számban kiosztott sejteket  $1\times\text{Hank's}$  oldatban  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk a specifikus inhibitor jelenlétében.

Hoechst esszé esetén az inkubációt követően  $1\times\text{Hank's}$ -ben oldott Hoechst 33342 festéket adtunk elindítva ezzel a reakciót. A fluoreszcenciát spektrofotométer segítségével mértük 15 percig 30 másodpercenként kinetikus mérési módban, ahol az excitációs fény hullámhossza  $350\text{ nm}$ , az emissziós fényé pedig  $460\text{ nm}$  volt. A maximális gátlást  $300\text{ nM}$  Ko134 jelenlétében értük el.

A Calcein esszénél CalceinAM-et és BSA-t tartalmazó  $1\times\text{Hank's}$  oldatot adtunk hozzá a reakció elindítása céljából. Ebben az esetben  $60\text{ }\mu\text{M}$  verapamil segítségével kaptuk a maximális gátlást. A Calcein esszé esetében  $485\text{ nm}$  hullámhosszú excitációs fényt és  $538\text{ nm}$  hullámhosszú emissziós fényt alkalmaztunk, a mérést 8 percig végeztük 30 másodpercenként kinetikus mérési módban .

Meghatároztuk az inhibitor jelenlétében ( $R_{\text{max}}$ ) és távollétében ( $R_{\text{alap}}$ ) kapott egyenesek meredekségét, valamint az egyes drogkoncentrációk esetében mért egyenesek meredekségét ( $R_{\text{drog}}$ ). Az így kapott értékek segítségével a következő képlet felhasználásával meghatároztuk az adott koncentrációjú gyógyszer molekula által okozott gátlást:

$$\text{Gátlás}(\%) = \frac{R_{\text{drog}} - R_{\text{alap}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{alap}}} * 100$$

Az egyes drogkoncentrációkhoz tartozó gátlási értékek ábrázolásával meghatároztuk az adott vegyület  $\text{IC}_{50}$  értékét.

### Citotoxicitási esszé

A mikrotiter lemezekre tápfolyadékban meghatározott számú sejtet osztottunk ki, amelyeket 24 órán keresztül 37 °C-os 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubátorban tartottunk. Ezt követően a DMSO-ban oldott molekulákat tápfolyadékban előre higítottuk és ezt adtuk a sejtszuspenzióhoz. Az inkubáció 96 órán keresztül tartott 37 °C-os 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubátorban. A HEK293 és HEK293-BCRP sejtvonalak esetében a kiindulási sejtsűrűség 2x10<sup>4</sup> sejt/ml volt.

A 96 óra elteltével a túlélő sejtek arányát MTS reakció segítségével határoztuk meg a gyártó által ajánlott kísérleti körülmények mellett. A kapott értékeket ábrázoltuk az alkalmazott drogoncentrációk függvényében és meghatároztuk az IC<sub>50</sub> értékeket.

### Adatok kiértékelése

Az ATPáz esszé, a vezikuláris transzport esszé, valamint a festéktranszport esszék két, a citotoxicitási esszé pedig három párhuzamos mérési pontban készültek, ezeket átlagoltuk és szórást számoltunk.

ATPáz esszé esetében a vizsgált molekula által kiváltott hatást a következő egyenlet alapján számoltuk ki:

$$v = V_{\min} + \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} + [A]) \times n_H}}$$

ahol  $v$  = hatás (nmol Pi/mg protein/min),  $V_{\min}$  = minimális hatás,  $V_{\max}$  = maximális hatás,  $EC_{50}$  = az 50%-os hatáshoz tartozó drogoncentráció,  $A$  = a tesztdrog koncentráció,  $n_H$  = a kooperativitást jellemző Hill-szám.

A VT esszé esetében a  $K_I$  értékek meghatározására a Cheng-Prusoff képletet használtuk:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

ahol  $K_I$  = az inhibitor affinitását jellemző paraméter,  $IC_{50}$  = az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció,  $S$  = a szubsztrát koncentráció,  $K_M$  = a szubsztrát affinitását jellemző paraméter.

Citotoxicitási esszé esetében az IC<sub>50</sub> értékeket – amelyek az 50%-os túléléshez tartozó drogoncentrációt jelentik – a mért hatásgörbékből kaptuk meg.

A görbeillesztésekhez, valamint a kinetikai paraméterek számításához a PRISM 3.0 szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Wilcoxon-próba és ANOVA segítségével vizsgáltuk a koleszterin hatását az ABCB11/Abcb11 általi epesótranszportra.

## Eredmények és azok megbeszélése

### Új szubsztrát-transzporter kölcsönhatások detektálása és karakterizálása HT *in vitro* esszékkel

Kísérleteink során egy meglehetősen specifikus, az irodalomban még nem publikált interakciót figyeltünk meg az ABCG2 és a rheumathoid arthritis terápiájában gyakran alkalmazott leflunomid között. Különböző membránalapú és egész sejt alapú *in vitro* esszék segítségével sikerült karakterizálni az ABCG2 és leflunomid, valamint a metabolitja, az A771726 között megfigyelt kölcsönhatást. Azt tapasztaltuk, hogy a fent említett molekulák az ABCG2 fehérje szubsztrátjai, ugyanis aktiválják az ABCG2-t ATPáz esszében, kompetitíven gátolják az ABCG2 általi metotrexát transzportot, valamint az ABCG2-nek köszönhetően kevésbé toxikusak a transzportert magasan expresszáló sejtvonalra.

A metotrexát egy ismert ABCG2 szubsztrát, amelyet gyakran alkalmaznak vezikuláris transzport kísérletekben. Ez a gátláson alapuló *in vitro* esszé alkalmas arra, hogy metotrexát-drog kölcsönhatásokra derítsen fényt. A leflunomid és a metabolitja is koncentrációfüggően gátolta az ABCG2 általi metotrexát transzportot a kifordított BCRP-HAM-Sf9 vezikulákba. A két molekula affinitása azonban eltérő, hiszen míg a leflunomid esetén  $1,86 \mu\text{M}$ , addig az A771726 esetében  $0,093 \mu\text{M}$   $K_I$  értéket számoltunk. Továbbá a Dixon-féle ábrázolással azt is sikerült megállapítani, hogy ez a gátlás kompetitív típusú.

A kinetikai paraméterekben, az  $EC_{50}$ -ekben észlelt eltérés az ATPáz esszé esetében is megfigyelhető volt ( $3,93 \mu\text{M}$  és  $0,78 \mu\text{M}$ ). Mindkét molekula koncentrációfüggően stimulálta az ABCG2 ATPáz aktivitását, amely szubsztrát természetűre utalhat.

A Hoechst 33342 egy membránpermeábilis festék, amely kiváló szubsztrátja az ABCG2-nek. A festéket alkalmazó esszé, amelyet a transzportert expresszáló sejteken végeztünk, alkalmas a tesztanyagok és a transzporter közötti kölcsönhatás nyomonkövetésére. A leflunomid és a metabolitja is gátolta az ABCG2 általi Hoechst 33342 transzportot azonos nagyságrendbe eső  $IC_{50}$  értékekkel ( $4,53 \mu\text{M}$  és  $2,87 \mu\text{M}$ ).

Citotoxicitási esszét végeztünk a transzportert expresszáló és üres vektorral transzfektált HEK293 sejteken abból a célból, hogy igazoljuk ezen molekulák nem csupán kölcsönhatói, hanem szubsztrátjai is az ABCG2 fehérjének. Az ABCG2-t expresszáló sejtek 20,6-szor, valamint 7,5-ször voltak rezisztensebbek a leflunomidra és az A771726-ra a HEK293-mock sejteknél. Mivel ez a rezisztencia ABCG2 specifikus inhibitor segítségével visszafordítható volt, sikerült bizonyítani, hogy ez folyamat az ABCG2-nek köszönhető oly módon, hogy a transzporter csökkenti a drogok intracelluláris koncentrációját.



A leflunomid egy viszonylag új bázisterápiás vegyületnek számít, amelyet monoterápiában, valamint más bázisterápiás szerekkel és nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentőkkel kombinálva is alkalmaznak a RA terápájában. Több tanulmány is beszámol arról hogy, ha egy hosszabb, már kevésbé hatékony metotrexát-kezelést leflunomiddal egészítenek ki, akkor a beteg állapotának javulása figyelhető meg. Ez kísérleti eredményeink szerint magyarázható a vizsgált molekulák, valamint a metotrexát között fellépő kompetitív inhibícióval, amely az egyik vagy másik gyógyszer intracelluláris koncentrációjának emelkedését eredményezi. Ezen eredmények képezhetik az alapját a RA-terápia egy újfajta megközelítésének, amelyben kezelés mellett fontos lehet az ABCG2 transzporter gátlása is specifikus inhibitorral vagy akár más bázisterápiás vegyülettel is. Feltételezzük, hogy az ABCG2 fehérje fontos szerepet játszik az ABCG2 szubsztrát bázisterápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztenciában. Ez a hipotézisünk azóta megerősítést nyert, hiszen van der Heijden és munkatársai megmutatták, hogy a metotrexátra illetve leflunomidra rezisztens betegek szinoviális makrofágjaiban az ABCG2 szintje szignifikánsabban magasabb, mint a terápiára jól reagáló betegek esetében.

A közeljövőre vonatkozóan azt a célt tűztük ki, hogy a fent említett terápiás területekről kiválasztott gyógyszerek és a releváns ABC transzporterek közötti különböző, általunk kifejlesztett és alkalmazott *in vitro* esszékből megfigyelt kölcsönhatást kinetikai szempontból karakterizáljuk. Az így kapott paraméterek, úgy, mint  $EC_{50}$  és  $IC_{50}$  értékek segítségével egy kisebb adatbázist szeretnénk létrehozni, illetve az irodalomban korábban még nem leírt interakciókat jellemezni. Ezen adatok alapját képezhetik az egyénre szabott terápiának, hiszen ha a beteg MDR-ABC transzporter profilja ismert olyan gyógyszer kerülhet alkalmazásra, amely esetén nem lép fel MDR-jelenség. A hematológiai tumorok esetében rendelkezésre áll egy olyan teszrendszer, amely a Calcein-esszén alapulva a funkcionális ABCB1 és ABCC1 mennyiségét határozza meg és jelenleg dolgozunk a kit ABCG2 szint mérésére alkalmas bővítésén.

### **A membrán koleszterintartalmának hatása az egér, patkány és humán ABCB11 működésére**

Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az egér, patkány és humán ABCB11 is érzékeny a membrán koleszterintartalmára, hiszen megemelkedett transzportsebességeket mértünk abban az esetben, ha megnöveltük az Sf9 sejtek plazmamembránjának koleszterin tartalmát. Ez a potenciórozó hatás a  $V_{max}$  növekedésén túl jelentős mértékben nem befolyásolta az epesó transzportok  $K_M$  értékét, azaz nem volt hatással az affinitásra. A koleszterin ezen hatása az ABCB11/Abcb11 fehérjékre nem teljesen tisztázott. Feltételezésünk szerint allosztérikus modulátorként hat a fehérjére, vagy pedig a membrán fluiditását változtatja meg. A legújabb

publikációk alátámasztják ezen eredményeinket, ugyanis Paulusma és munkatársai ATP8B1 hiányos egér kanalikuláris membránját vizsgálva – amelynél a koleszterintartalom jelentősen lecsökkent – azt tapasztalták, hogy az Abcb11 fehérje általi transzport kb. negyedannyi, mint a vad típus esetében. A kísérleteket a koleszterin *in vitro* kivonásával elvégezve is hasonló eredményeket kaptak. Saját munkánkkal párhuzamosan Ismair és munkatársai által az is bizonyítást nyert, hogy az ABCB11 a kanalikuláris membrán koleszterinben gazdag raft régióiban lokalizálódik.

Vizsgálataink során a kiválasztott bizonyítottan hepatotoxikus gyógyszerek epesó transzportra gyakorolt hatásaiknál az affinitásban jelentős különbségeket tapasztaltunk. A glibenclamid és a troglitazon esetében a humán fehérje rendelkezett a legnagyobb affinitással, legkisebbel pedig az egér ortológ. A ciklosporin A kapcsán mért  $IC_{50}$  értékek között nemcsak a fajok között, hanem egy fajon belül a különböző epesók között is jelentős különbségek voltak. Az általunk kapott eredményeket összehasonlítva az irodalomban található TC transzportra vonatkozó adatokkal elmondható, hogy a glibenclamid és CSA esetében 2-szeres különbség van a humán ABCB11-nél és 3-6-szoros a patkánynál, ugyanakkor az affinitási sorrendje a drogoknak – CSA < troglitazon ~ glibenclamid – megegyezik.

Annak érdekében, hogy a megváltoztatott lipidkörnyezetű membránban kifejezett fehérjékkel mért kísérletek során kapott eredményeket validáljuk kiválasztottunk egy kilenc kolesztatikus molekulából álló szettet, amelyeket kontrol és HAM humán ABCB11-en is megmértünk. A molekulák  $IC_{50}$  értékeit figyelembe véve nem tapasztaltunk különbséget a kontrol és koleszterinnel feltöltött vezikulák között egy kivételtől eltekintve. Ez a gyógyszer a ciklosporin A, amely esetében a különbség közel 10-szeres volt. Ez a molekula úgy tűnik nemcsak a különböző epesókra, hanem a membrán koleszterintartalmára is meglehetősen érzékeny.

### **Az egér Bsep-HAM ATPáz esszé kifejlesztése**

Kísérleteink során sikerült megmutatni, hogy az egér Abcb11 transzporter is érzékeny a membrán koleszterintartalmára. TCDC-ot szubsztrátként alkalmazva az Sf9 membrán koleszterinfeltöltésének hatására ATPáz esszében nagyobb ATPáz aktivitást, vezikuláris transzport esszében pedig magasabb transzport értéket mértünk. A megemelkedett koleszterinszint ATPáz esszében az alapaktivitás szignifikáns csökkenésével járt, amely így egy jobb jel/zaj arányú esszét eredményezett.

Az egér Abcb11-HAM vezikulák ATPáz aktivitása idő, hőmérséklet, valamint ATP függőnek bizonyult. Az esszé körülményeinek optimalizálása után egy kiválasztott molekulaszett

segítségével – amely vegyületekről az irodalomban leírták, hogy hepatotoxicitást okoznak – a mért  $IC_{50}$  értékeket összehasonlítottuk a vezikuláris transzportban mért  $IC_{50}$ -ekkel. A vizsgált molekulák mindkét esszében kölcsönhatottak az egér Abcb11 transzporterrel, ugyanakkor az is elmondható, hogy az ATPáz esszével 2-3-szor alacsonyabb  $IC_{50}$  értékeket kaptunk. A különbségre egyelőre magyarázatot adni nem tudunk.

Több különböző *in vitro* esszé áll rendelkezésre a toxicitás tesztelésére az *in vivo* kísérleteket megelőzőleg, mint pl. a kanalikuláris vezikula preparátumok, vagy a hepatocitákból álló ún. szendvicskultúrák. Azonban ezek egy részéhez radioaktív anyagok használata szükséges, más esszétípusok pedig bonyolult analitikát igényelnek. A kanalikuláris vezikula preparátumok további hátránya, hogy több, fiziológiásan jelenlévő transzportert is tartalmaz, amely megnehezíti a gyógyszerjelölt és egy adott transzporter kölcsönhatásának detektálását. Ezekkel szemben rendkívül nagy előnye az Sf9 sejtekből preparált membránvezikulákon végzett ATPáz esszének, hogy gyors, a vizsgálni kívánt fehérjét nagy mennyiségben tartalmazza (kb. 3%), a detektálás pedig egyszerű kolorimetriás mérésből áll. Így lehetőség nyílik arra, hogy nagyon sok molekulát viszonylag rövid idő alatt teszteljünk az adott transzporterre, kiegészítve ezzel a más *in vitro* és *in vivo* esszékből kapott eredményeket.

Az Sf9 sejtek membránjának koleszterinnel való feltöltése, a fiziológiához közelebb álló lipidkörnyezetet teremt az ABCB11/Abcb11 transzporter számára, megtartva ugyanakkor e rendszer előnyeit, az egyedülállóan magas fehérjeexpressziót és membránvezikula hozamot. A koleszterinfeltöltés által stimulált egér Abcb11-HAM membránvezikulák ATPáz esszéje által egy rendkívül robusztus és nagy áteresztőképességű tesztelésre alkalmas rendszert sikerült kifejlesztenünk.

## Publikációk listája

### A doktori értekezés alapját képező közlemények:

**Kis E**, Rajnai Z, Ioja E, Herédi Szabó K, Nagy T, Méhn D, Krajcsi P (2009) Mouse Bsep ATPase assay: a nonradioactive tool for assessment of the cholestatic potential of drugs. *J Biomol Screen* 14(1):10-5.

**IF:2,395**

**Kis E**, Nagy T, Jani M, Molnár E, Jánossy J, Ujhellyi O, Német K, Herédi-Szabó K, Krajcsi P (2009) Leflunomide and its metabolite A771726 are high affinity substrates of BCRP: implications for drug resistance.

*Ann Rheum Dis* 68(7):1201-7.

**IF:8,111**

**Kis E**, Ioja E, Nagy T, Szente L, Herédi-Szabó K, Krajcsi P (2009) Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos* 37(9):1878-86.

**IF:3,743**

### Egyéb közlemények:

Jani M, Makai I, **Kis E**, Szabó P, Nagy T, Krajcsi P, Lespine A (2010) Ivermectin interacts with human ABCG2. *J Pharm Sci* 2010 Jun 22. [Epub ahead of print]

**IF:2,176**

Herédi-Szabó K, Glavinas H, **Kis E**, Méhn D, Báthori G, Veres Z, Kóbori L, von Richter O, Jemnitz K, Krajcsi P (2009) Multidrug resistance protein 2-mediated estradiol-17beta-D-glucuronide transport potentiation: in vitro-in vivo correlation and species specificity. *Drug Metab Dispos* 37(4):794-801.

**IF:3,743**

Herédi-Szabó K, Jemnitz K, **Kis E**, Ioja E, Jánossy J, Vereczkey L, Krajcsi P (2009) Potentiation of MRP2/Mrp2-mediated estradiol-17beta-glucuronide transport by drugs--a concise review. *Chem Biodivers* 6(11):1970-4.

**IF:1,926**

Jani M, Szabó P, **Kis E**, Molnár E, Glavinas H, Krajcsi P (2009) Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2. *Biol Pharm Bull* 32(3):497-9.

**IF:1,81**

Herédi-Szabó K, **Kis E**, Molnár E, Gyórfi A, Krajcsi P (2008) Characterization of 5(6)-carboxy-2,'7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4. *J Biomol Screen* 13(4):295-301.

**IF:2,365**

Glavinas H, **Kis E**, Pál A, Kovács R, Jani M, Vági E, Molnár E, Bánsághi S, Kele Z, Janáky T, Báthori G, von Richter O, Koomen GJ, Krajcsi P (2007) ABCG2 (breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance-associated protein) ATPase assay: a useful tool to detect drug-transporter interactions. *Drug Metab Dispos* 35(9):1533-42.

**IF:3,907**

Pál A, **Kis E**, Méhn D, Glavinas H, Nagy T, Mészáros P, Báthori G, Krajcsi P, Falkay G (2007) In vitro methods suitable for the prediction of drug and ABC transporter, especially ABCG2 interactions. *Acta Pharm Hung* 77(4):205-16.

Fantin M, Quintieri L, Kúsz E, **Kis E**, Glavinas H, Floreani M, Padrini R, Duda E, Vizler C (2006) Pentoxifylline and its major oxidative metabolites exhibit different pharmacological properties. *Eur J Pharmacol* 535(1-3):301-9.

**IF:2,522**