

Xenobiotikum transzporterek vizsgálata humán keratinocitákban és bőrben

Ph.D. értekezés

Bebes Attila

Témavezető: Széll Márta Ph.D., D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK, Szeged

2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. ABC transzporter fehérje szupercsalád	8
2.2. Xenobiotikumok.....	9
2.3. Xenobiotikum transzporterek	10
2.4. Xenobiotikum transzporterek és az epidermisz.....	14
2.5. A pikkelysömör	15
2.6. A fotodinámiás terápia	17
2.6.1. A fotodinámiás terápia mechanizmusa	17
2.6.2. Az ABCG2 xenobiotikum transzporter és a fotodinámiás terápia.....	19
3. Célkitűzés.....	20
4. Anyagok és módszerek	22
5. Eredmények.....	30
5.1. ABC transzporterek kifejeződése humán keratinocitákban	30
5.1.1. ABCC4 és ABCG2 transzporterek proliferáció függő indukciója szinkronizált HaCaT keratinocitákban	30
5.1.2. Normál humán keratinociták in vitro differenciációs modellje	32
5.1.3. Az ABCC4 és ABCG2 gének expressziója csökken normál humán keratinociták differenciációja során.....	33
5.1.4. Az ABCC4 és ABCG2 transzporter fehérjék a keratinocita proliferációhoz kapcsoltan fejeződnek ki	35
5.2. ABCC4 és ABCG2 transzporterek szerepe humán keratinociták proliferációjában.....	37
5.3. ABCC4 transzporter kifejeződése humán bőrben: terápiás vonatkozások 41	
5.3.1. Az ABCC4 transzporter nagymértékben kifejeződik pikkelysömörös epidermiszben	41
5.3.2. A HaCaT keratinociták nagymértékű rezisztenciát mutatnak a rövidtávú, négyórás methotrexát kezelésre	43
5.3.3. Az ABCC típusú transzportereket gátló probenecid jelentős mértékben csökkenti a HaCaT sejtek rövid távú methotrexát rezisztenciáját	45
5.3.4. Az ABCC gátló indomethacin alkalmazása jelentősen csökkenti a methotrexát rezisztenciát	46
5.3.5. Az ABCC4 transzporter specifikus gátlószereként jellemzett 4-(2- aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid toxikus a HaCaT sejtekre	47
5.3.6. További xenobiotikum transzporterek gátlásának hatása a HaCaT sejtek rövidtávú methotrexát rezisztenciájára	48
5.4. ABCG2 transzporter funkcionális vizsgálata, mint fotodinámiás terápiás támadáspont	49
5.4.1. Az ABCG2 transzporter kifejeződése bőrbetegségekben	49
5.4.2. A szabad porfirin felhalmozódása HaCaT sejtekben az ABCG2 funkciójától függ	53
5.4.3. A fumitremorgin C nem toxikus származéka, a Ko-134 nagy hatékonysággal növeli a keratinociták in vitro fotodinámiás terápiára való érzékenységét	55
6. Diszkusszió.....	57

Irodalomjegyzék.....	63
Saját közlemények	70
Köszönetnyilvánítás	71
Summary.....	73
Összefoglalás.....	76

Rövidítések jegyzéke

ATP:	adenozin trifoszfát
ABC:	<i>adenosine triphosphate binding cassette</i>
AEBSF:	4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid hidroklorid
ALAD:	aminolevulinsav dehidrogenáz
ALAS:	aminolevulinsav szintáz
BCIP/NBT:	5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát/nitroblue-tetrazólium
BCRP:	<i>breast cancer resistance protein</i>
BSA:	borjú szérum albumin
Ca ⁺ :	1,7 mM Ca ²⁺ tartalmú tápfolyadék
Ca ⁻ :	0,09 mM Ca ²⁺ tartalmú tápfolyadék
CPOX:	koproporfirinogén III oxidáz
DALA:	delta-aminolevulinsav
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , tápfolyadék
DMSO:	dimetil-szulfoxid
EDTA:	etilén-diamin tetraecetsav
FBS:	fötális borjú szérum
FECH:	ferrokelatáz
FPGH:	folylpoli- γ -glutamát hidroláz
FPGS:	folylpoli- γ glutamát szintetáz
HIF1:	hipoxia indukálható transzkripció faktor
HMBS:	hidroximetil bilán szintáz
IND:	indomethacin
INV:	involucrin
ITGA5:	alfa5-integrin
KC-SFM:	keratinocita szérummentes tápfolyadék
KRT1:	keratin 1
MRP:	<i>multidrug resistance-related protein</i>
MTT:	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MTX:	methotrexát
NaOH:	nátrium-hidroxid
NHK:	normál humán keratinocita
PBG:	porfobilinogén

PBS:	foszfáttal pufferolt sóoldat
PDT:	fotodinámiás terápia
PPIX:	protoporfirin IX
PPOX:	protoporfirinogén IX oxidáz
PRO:	probenecid
RFC1:	<i>reduced folate carrier</i> , redukált folát vivő fehérje
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> tápfolyadék
SDS:	nátrium dodecilszulfát
siC4:	ABCC4 specifikus siRNS
siG2:	ABCG2 specifikus siRNS
siK:	kontroll siRNS
TBS:	Tris-pufferolt sóoldat
UPL:	<i>Universal Probe Library</i>
UROD:	uroporfirinogén III dekarboxiláz
UROS:	uroporfirinogén III szintáz

1. Bevezetés

A sejtek működésének egyik alapvető feltétele a környezettől való elhatárolódás biológiai membránok által. A membránoknak azonban legalább annyira fontos feladata az elhatárolás mellett a környezettel való kapcsolattartás is, többek között különféle anyagok transzportja a lipid kettősrétegen keresztül. Irányított és szabályozott transzport folyamat csak fehérje közvetítő segítségével valósítható meg. A transzport folyamatok fontosságát jelzi, hogy a membránfehérje kódoló gének 15-30%-a transzport fehérjéket kódol. Egy adott molekula átjuttatása a membrán egyik oldaláról a másikra koncentráció vagy elektrokémiai gradiens ellenében kizárólag energia befektetésével valósulhat meg. Az ilyen típusú transzporthoz a legtöbb esetben az adenozin-trifoszfát (ATP) biztosítja az energiát. Az ATP függő transzport folyamatok nagy részét az ABC fehérjecsalád tagjai végzik.

Az emberi szervezet a környezet számos nem kívánatos káros anyagával kerül kapcsolatba, ami elkerülhetetlen a táplálkozás, a légzés és egyéb, környezettel való kapcsolattartást igénylő folyamatok működése közben. A szervezet számára idegen anyagok – az úgynevezett xenobiotikumok – szerkezetükben, kémiai tulajdonságaikban és méretükben is igen különböző molekulák. Többszintű védekező rendszer áll rendelkezésre, hogy megakadályozza a xenobiotikumok szervezetbe való bejutását, illetve megbirkózzon a már felszívódott anyagokkal, és mielőbb megszabaduljon tőlük. Ennek a védelmi rendszernek a tagjai az ABC transzporter fehérjecsaládba tartozó xenobiotikum transzporter fehérjék. Ezen fehérjék kutatása több szempontból is kiemelkedő jelentőségű, egyrészt azok a tumorsejtek, amelyek xenobiotikum transzportereket fejeznek ki a membránjukon, ellenállóvá válnak számos kemoterápiás gyógyszerrel szemben. A kemoterápia sikere érdekében ezért ma már fontos a tumorok xenobiotikum transzporter expressziós profiljának a meghatározása, amely így segíti a megfelelő rákellenes gyógyszerek kiválasztását. Másrészt a gyógyszeripar számára egy másik kutatási irány szempontjából is fontos a xenobiotikum transzporterek vizsgálata. Gyógyszerek széles skálájának felszívódását és metabolizmusát befolyásolják a különböző határfelületeken fiziológiás körülmények között kifejeződő xenobiotikum transzporterek. A modern gyógyszerfejlesztés során figyelembe veszik azt is, hogy a gyógyszerjelöltek szubsztrátjai-e az egyes transzportereknek. Különösen lényeges ez, ha a gyógyszer hatása speciálisan védett célterületen, például az agyban kívánatos.

Jelen munkában a célunk a xenobiotikum transzporterek tanulmányozása volt humán bőrben, különös tekintettel ennek a nagykiterjedésű határfelületnek a legkülső rétegét, az epidermiszt felépítő legfontosabb sejtípusra, a keratinocitákra. Emellett a transzporterek szerepét különböző bőrgyógyászati kórképekben kívántuk vizsgálni, főként arra fókuszálva, hogy ennek milyen terápiás vonatkozási lehetnek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. ABC transzporter fehérje szupercsalád

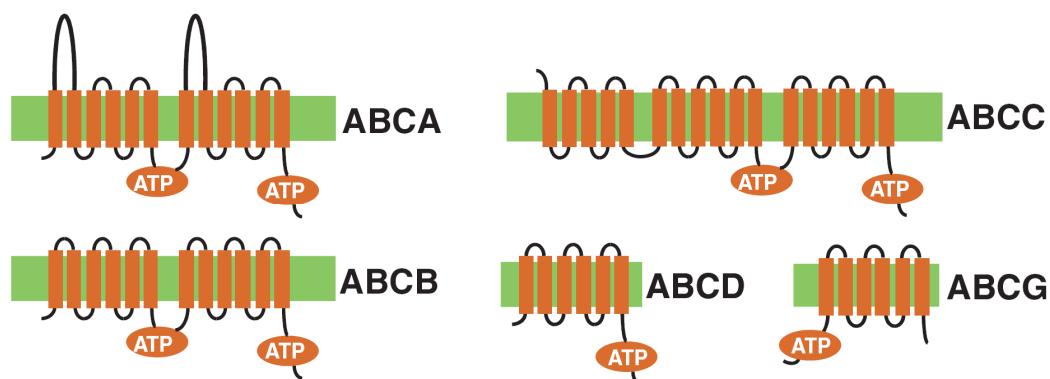
Az *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC) transzporter fehérjék az élőlények nagy többségében megtalálhatóak. Funkciójuk, az ATP energiája által közvetített aktív transzport, amely a sejtek metabolizmusához elengedhetetlen. Számos különböző molekula biológiai membránokon való átjuttatásáért felelősek. A humán genomban 49 ABC transzportert azonosítottak (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>, hozzáférve 2011. november 13.).

Az ABC transzporter szupercsalád tagjai aminosavsorrend tekintetében eltérő felépítésű fehérjék. Szerkezetükre általánosan jellemző két funkcionális domén, a rendkívül konzervált citoplazmatikus nukleotidkötő domén, illetve a szubsztrátspecifitást meghatározó transzmembrán domén. A transzmembrán doméneket hat-tizenegy α -hélix alkotja, amelyek egy csatornát alakítanak ki, ezzel biztosítva a membránon keresztül történő transzport folyamatot (Dean és mtsai, 2001).

A nukleotidkötő doménben egymástól 100-200 aminosav távolságra helyezkedik el az ATP kötő fehérjékre jellemző és különösen konzervált „Walker A” és „B” szekvencia (Walker és mtsai, 1982). A „Walker A” motívum lizin oldallánca az ATP β -foszfátjának kötésében játszik szerepet, míg a „Walker B” szekvencia aszparaginja a magnéziumionnal lép kapcsolatba. Csak az ABC fehérjékre jellemző egy harmadik, szintén konzervált szekvencia, a C motívum megléte, amely a „Walker A” és „B” motívumok között helyezkedik el, és bár nyilvánvaló szerepet játszik az ATP molekula felismerésében, megkötésében és hidrolízisében, pontos funkciója még nem teljesen tisztázott (Leslie és mtsai, 2005).

Az alapvető szerkezeti hasonlóságok alapján az ABC transzporter fehérjecsalád hét alcsaládra tagolódik (Ueda, 2011). Az ABC transzporterek jelentős része, amelyek az ABCA, ABCB és ABCC alcsaládba tartoznak, két nukleotidkötő doménből és két transzmembrán doménből épül fel, ezek az úgynevezett egész transzporterek. Az ABC transzporterek egy kisebb csoportja úgynevezett féltranszporter, a fehérjében egy nukleotidkötő és egy transzmembrán domén található. Ezek a proteinek, az ABCD és ABCG alcsalád tagjai, elősorban homodimerizáció útján lesznek funkcióképesek. A főbb alcsaládok szerkezeti felépítése az 1. ábrán látható. Szekvencia analízisek alapján a humán genomban az ABCE alcsaládnak egy, az ABCF alcsaládnak három tagját

ismerjük, ezek funkciójáról és pontos szerkezetükről kevés adat van az irodalomban, de transzport folyamatokban nem működnek közre (Kerr, 2004).



1. ábra: A legfontosabb ABC transzporter alcsaládok szerkezete. Az ATP kapcsolódási helye, a nukleotid kötő domén a citoplazma felőli oldalon található (Ueda (2011) nyomán).

2.2. Xenobiotikumok

Azokat az élő szervezetekben található kémiai anyagokat, amelyek az adott szervezet metabolizmusa során nem keletkeznek, valamint a szervezet számára biokémiaiilag idegenek, xenobiotikumnak nevezzük. Természetes, élőlények által termelt molekulák is xenobiotikumnak tekintendők, amennyiben az adott szervezetben a jelenlétük nem természetes. Az ember által mesterségesen előállított molekulák gyakran az egész élővilág számára idegen anyagok, ide tartoznak például különféle környezetszennyező molekulák, de a gyógyászatban alkalmazott hatóanyagok is. A xenobiotikumok sok esetben káros anyagok, hiszen a normál metabolizmusban nem vesznek részt, veszélyes mértékben felhalmozódhatnak, vagy egyéb toxikus hatást fejthetnek ki (Parvez és Reiss, 2001). Az élőlények azonban nem védtelenek a környezetükből származó idegen anyagokkal szemben.

A következőkben csak az emberben is megtalálható védekező rendszereket részletezem. A xenobiotikumokkal való interakció során az első lépcsőben egy fizikokémiai gát akadályozza meg, hogy a szervezetbe bejussanak a káros anyagok. A sejtmembránnak és a benne található transzport folyamatokban résztvevő fehérjéknek köszönhetően minden sejt rendelkezik korlátozott formában ezzel a gáttal. A környezettel való kapcsolattartásban leginkább érintett területeken, mint például a bélfalban, erre a feladatra specializálódott szövet alakult ki. A sejtek közötti

anyagáramlás sejt-sejt kapcsolatok révén extrém módon korlátozott, a molekulák kizárólag a sejteken áthaladva, szabályozott módon kerülhetnek be a szervezetbe. A hasznos molekulák fehérje közvetítőkön keresztül jutnak be, a lipid kettősréteg kizárja a legtöbb poláros molekula sejtbe való bejutását. A membránon főként hidrofób jellegű molekulák képesek átjutni – nem szabályozott – módon, ezek jó része a xenobiotikum transzporterek által kerül kipumpálásra (Parvez és Reiss, 2001).

Az elsődleges védekező rendszereken átjutó xenobiotikumok főként a májban és a vesékben, egy speciális metabolikus útvonal segítségével kerülnek eliminálásra (Jakoby és Ziegler, 1990). A xenobiotikumok detoxifikációja három fő lépésben megy végbe. Az első fázis a modifikációs lépés, amelyre azért van szükség, mert az adott formájukban hidrofób jellegű molekulákkal a szervezet metabolikus rendszere nem tud mit kezdeni. Széles szubsztrátspecifitással rendelkező enzimek oxidációs, redukációs vagy hidrolitikus lépések katalizálásával reaktív és poláros csoportokat helyeznek a szervezettől idegen molekulákra. A leggyakoribb modifikációt végző enzimcsalád a citokróm P450-függő oxidázok családja (Guengerich, 2001).

A második fázis során transzferáz enzimek az aktivált xenobiotikum metabolitokhoz a reaktív csoporton keresztül töltéssel rendelkező molekulákat konjugálnak. A konjugált molekulák közé tartozik például a glutation, a glicin, a glükuronsav, a szulfátcsoport és az acetilcsoport. A legfontosabb transzferáz enzimek a glutation S-transzferázok (Commandeur és mtsai, 1995). A töltéssel rendelkező konjugátumnak köszönhetően a továbbiakban a sejtmembránon keresztül nem diffundálhatnak a hidrofób xenobiotikumok, így lehetővé válik szabályozott eltávolításuk.

A harmadik fázisban egyrészt a konjugátum további kémiai módosítására kerülhet sor, másrészt végső lépésként – főként a máj és a vese kiválasztó rendszerein keresztül – eltávolításra kerülnek. Ebben a fázisban szintén óriási szerepük van a xenobiotikum transzportereknek, amelyek képesek a különböző konjugátumok segítségével megjelölt molekulák aktív kipumpálására, hogy a szervezet végleg megszabaduljon tőlük (Parvez és Reiss, 2001; Homolya és mtsai, 2003).

2.3. Xenobiotikum transzporterek

A humán ABC transzporterek 10 tagjáról ismert, hogy szerepet játszanak a multidrog rezisztencia kialakításában, ezeket a fehérjéket xenobiotikum

transzportereknek is nevezik (Scotto, 2003). Ezen proteinek közös tulajdonsága a rendkívül széles szubsztrátspecifitás, ezért a tumorokban való megjelenésük számos kemoterápiás szerrel szemben teszik ellenállóvá a tumorsejteket, így jelentősen csökkentve a terápia hatékonyságát. Kezdeti kutatások főként a xenobiotikum transzporterek kemoterápiára rezisztens tumorokban játszott szerepére fókuszáltak, azonban számos érdekes adat látott arról is napvilágot, hogy fiziológiai körülmények között is fontos feladatokat látnak el a szervezetben (Borst és Elferink, 2002).

A hetvenes évek végén azonosítottak egy citotoxikumnak, a kolhicinnek, ellenálló sejtvonalat, ami nagymértékben kifejezett egy membrán glikoproteint, és a fehérjét P-glikoproteinnek nevezték el (az új nevezéktan szerint ABCB1, Riordan és Ling, 1979). Később számos gyógyszerrezisztens tumorban azonosították az ABCB1-et, mint a rezisztencia fő okozóját és sokáig úgy tűnt, hogy a jelenség csupán ezen fehérje működéséhez köthető. A kilencvenes évektől kezdve azonban a xenobiotikum transzporterek további tagjai is felfedezésre kerültek, elsőként a *multidrug resistance-related protein*-ek (MRP, az ABCC alcsaládba tartozó xenobiotikum transzporterek, (Cole és mtsai, 1992), később az eredetileg *breast cancer resistance protein*-ként (BCRP) ismert fehérje, az ABCG2 (Doyle és mtsai, 1998).

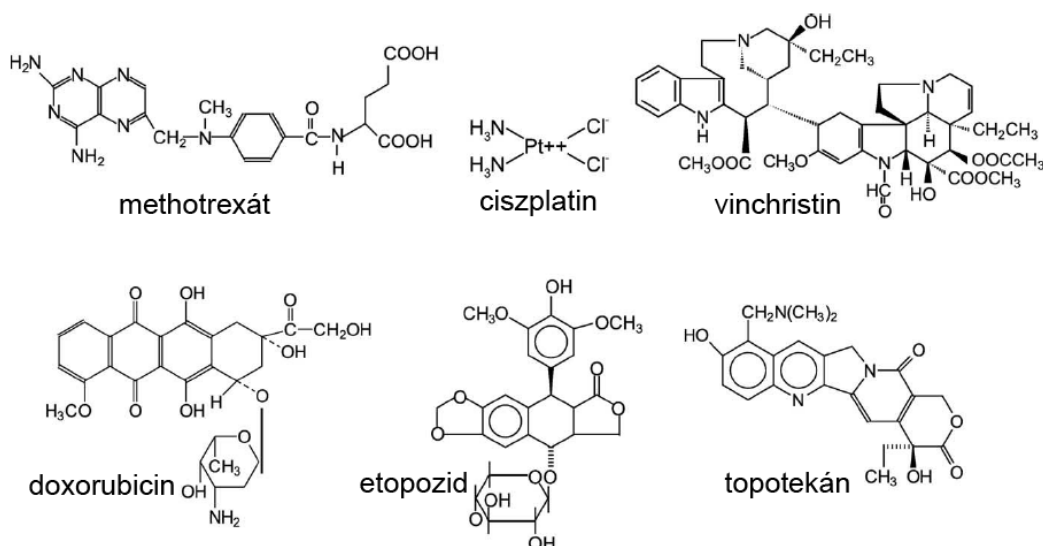
A legrészletesebb kutatások szubsztrátjaik és szervezetben való jelenlétük tekintetében az ABCB1, az ABCC1, az ABCC2, az ABCC4, illetve az ABCG2 által állnak rendelkezésre így a következőkben ezen fehérjék különböző jellemzőinek részletezésére kerül sor.

Aminosav sorrendjüket tekintve még az azonos alcsaládba tartozó ABCC1 és ABCC2 is csupán 49%-os egyezést mutatnak. Fehérje szerkezetbeli különbségek ellenére számottevő az átfedés a szubsztrátjaik között (1. táblázat, 2. ábra).

1. táblázat A fontosabb xenobiotikum transzporterek szubsztrátjai (Leslie és mtsai (2005) alapján)

Xenobiotikum transzporter	Citotoxikus exogén eredetű szubsztrátok	Endogén eredetű szubsztrátok
ABCB1	anthraciklinek (doxorubicin, daunorubicin) kolhicin, <i>Vinca</i> alkaloidok (például vincristin), taxol	szteroidok, béta-amiloid, glutamát
ABCC1	anthraciklinek, kolhicin, etopozid, nehézfémek (arzén és antimon konjugátumok), methotrexát	szteroidok, leukotriének, konjugált bilirubin
ABCC2	ciszplatin, etopozid, doxorubicin, topotekán, vincristin, methotrexát	szteroidok, leukotriének, konjugált bilirubin
ABCC4	methotrexát, leukovorin, topotekán, furosemid	szteroidok, ciklikus nukleotidok, urát, prosztaglandinok, epesavak
ABCG2	anthraciklinek, camptothecin, flavopiridol, mitoxantron, topotekán, methotrexát	porfirinek

A tumorok megfelelő gyógyszeres kezelése jelentős nehézségekbe ütközhet, amennyiben a xenobiotikum transzporterek kifejeződnek a tumorsejtekben. Ennek kiküszöbölésére többféle megoldás kínálkozik. Egyrészt a kemoterápiás szerek kombinációkban kerülnek alkalmazásra, a nagyobb hatékonyság érdekében; másrészt az új hatóanyagok fejlesztésénél figyelembe veszik, hogy azokat a xenobiotikum transzporterek milyen mértékben képesek kijuttatni a sejtekből; harmadrészt igen intenzíven fejlesztik az egyes transzporterek specifikus gátlószereit. Ezeket a gátlószereket kemoszenzitizáló szereknek is hívják, a tumorelles gyógyszerrel szemben érzékenyítik a célsejteket. Az ABCB1 esetén ismert kemoszenzitizáló szerek például a verapamil és a ciklosporin-A, az ABCC alcsoad tagjainál az indomethacin, az MK571 és a probenecid, az ABCG2 gátlószerei pedig a fumitremorgin C és szintetikus analógjai, a Ko-134 és a Ko-143 molekulák (Choi, 2005).



2. ábra Néhány kemoterápiás gyógyszer kémiai szerkezete

A xenobiotikum transzporterek kifejeződésének igen nagy a jelentősége a különböző határfelületeken, hiszen egyrészt meggátolják a környezetből érkező idegen anyagok felszívódását, másrészt szerepet játszanak a szervezetbe jutott és a detoxifikációs rendszer által feldolgozott idegen molekulák kiszűrésében is.

A légzés során a tüdő toxikus anyagok széles skálájával kerülhet kapcsolatba, a szöveti védelemben a xenobiotikum transzporterek is közreműködnek. Az ABCB1 a bronchiális és brochioláris epitélium sejteinek apikális membránján, valamint az alveoláris makrofágokban fejeződik ki. Az ABCC1 fehérjét szintén detektálták ezekben a szövetekben, továbbá a fehérje a szeromucinosus mirigyekben is jelen van. Az ABCG2 nagyon alacsony szintű jelenlétét mutatták ki a tüdő epitéliumban. Erre a transzporterre általánosan jellemző, hogy szinte minden szövetben erősen kifejeződik a kis vénás kapillárisok endotéliumában (Kool és mtsai, 1997; Scheffer és mtsai, 2002).

A táplálkozás során a szervezetbe került xenobiotikumoknak a gasztrointesztinális traktus szűrőrendszere állja útját. A bélfal epiteliális sejtei apikális felszínükön kifejezik az ABCB1, az ABCC1 és az ABCG2 fehérjét is. Az egyes transzporterek expressziójának mértéke eltérhet a bél különböző szakaszain, például az ABCB1 fehérje szintje nő a duodéniumtól a vastagbél felé, míg az ABCC2 legnagyobb mértékben a duodénium epitéliumban figyelhető meg, a vastagbélben már alig észlelhető (Dietrich és mtsai, 2003). Az ABCC1 fehérje kifejeződését egyes gasztrointesztinális sejtek bazolaterális membránját mutatták ki (Peng és mtsai, 1999).

A máj a szervezetbe jutott xenobiotikumok eliminálásának legfőbb helyszíne. A májsejtek apikális felszínén számos xenobiotikum transzporter kifejeződik, többek

között az ABCB1 az ABCC2 és az ABCG2 is, szubsztrátjaikat az epecsatornák felé ürítik ki (Borst és Elferink, 2002). Az ABCC4 mind az apikális, mind a bazolaterális felszínen kimutatható a hepatocitákban (Ritter és mtsai, 2005).

A vese proximális tubulusaiban a vizelet útján ürülnek a szervezetbe jutott idegen anyagok. Az ABCB1, az ABCC2 és az ABCC4 kifejeződését mutatták ki az epitel sejtek apikális membránjában (Schaub és mtsai, 1999; Gutmann és mtsai, 2000; Russel és mtsai, 2008), míg a vese glomerulusokban az ABCC1 expresszióját detektálták (Peng és mtsai, 1999).

A szervezetben kitüntetett védelmet élvező szerv az agy, a vér-agy gát komplex védelmi rendszerének fontos alkotóelemei a xenobiotikus transzporterek. A vér-agy gát kapilláris endotéliumában az apikális oldalon az ABCB1, az ABCC1, az ABCC2, az ABCC4 és az ABCG2 fehérje is megtalálható (Leslie és mtsai, 2005; Russel és mtsai, 2008).

2.4. Xenobiotikum transzporterek az epidermiszben

Az epidermisz az egyik legnagyobb kiterjedésű és legfontosabb mechanikai és kémiai permeabilitási gát a szervezetben. Feltehetően az epidermisz biokémiai védekező rendszerének fontos elemei a xenobiotikumok metabolizmusában részt vevő fehérjék, mint például a citokróm P450 proteinek és a xenobiotikum transzporterek (Merk és mtsai, 1996). A xenobiotikum transzporterek számottevően befolyásolhatják a különböző gyógyszermolekulák szervezetben való eloszlását, valamint akár a gyógyszerallergia során fellépő bőrtüneteket is. Meglehetősen korlátozott az irodalomban rendelkezésre álló információ a xenobiotikum transzporterek szerepéről keratinocitákban és a bőrben. Baron és mtsai (2001) számos transzporter expresszióját figyelték meg normál humán keratinocitákban (NHK), valamint az ABCB1 és az ABCC1 transzporterek sejtmembránhoz asszociált festődését is leírták humán epidermiszben. Egy másik tanulmányban az összes ismert ABC transzporter kifejeződését megvizsgálták *in vitro* NHK és HaCaT sejtes rendszerekben, ahol a sejtek differenciációját Ca^{2+} alkalmazásával indukálták, itt azonban a lipidek transzportjára és az ezzel kapcsolatos fehérjékre fókuszáltak (Kielar és mtsai, 2003). A xenobiotikum transzporterek a gyógyszermolekulák szervezetben való eloszlására és hozzáférhetőségére is hatást gyakorolnak, egy egér bőrben végzett vizsgálat során az ABCC1 fehérje grepofloxacin effluxban játszott szerepét mutatták ki (Li és mtsai,

2005). Az ABCC1 transzporter transzkripció kifejeződését tanulmányozták egészséges humán bőrben, valamint különböző stresszhatások által befolyásolt mintákban, mint például pikkelysömörben és ultraibolya fénnel kezelt bőrben (Smith és mtsai, 2003).

2.5. A pikkelysömör

A pikkelysömör (psoriasis) elsősorban a bőrt, a körmöket, a hajas fejbőrt, ritkábban a nyálkahártyát érintő krónikus lefolyású gyulladásos bőrbetegség. Egyes esetekben a gyulladásos folyamatok az ízületeket is érintik. A betegség tünetei a száraz, pikkelyesen hámló gyulladt plakkok, amelyek klasszikus esetben a könyök, térd és a fejbőr területén jelentkeznek, de generalizálódva a test egészén megjelenhetnek (2. ábra).

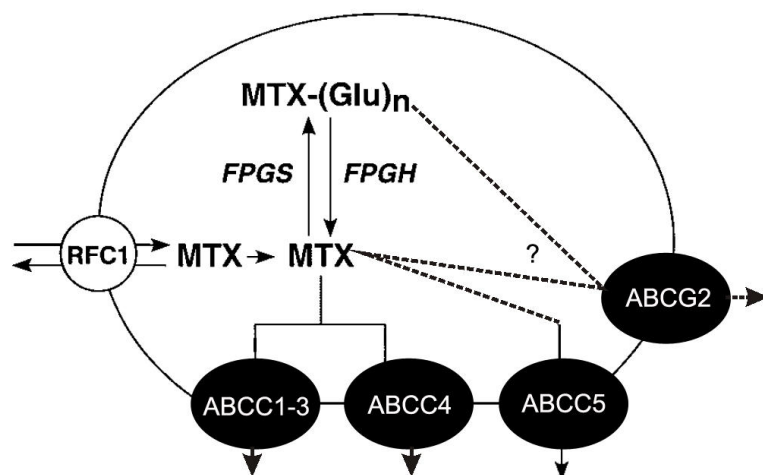


3. ábra: (a-c) a test különböző részein megjelenő pikkelysömörös plakkok, léziók.

A léziós területeken az epidermiszben a keratinociták hiperproliferációja jellemző, amely az epidermisz jelentős megvastagodását eredményezi az egészséges vagy tünetmentes bőrhez képest. A léziók területén a keratinociták differenciációja is

zavart szenved. A nem megfelelő keratinizációs folyamatok eredményeképpen jönnek létre a betegségre jellemző pikkelyek. Igen jellegzetes az epidermisz legfelső rétegében, a *stratum corneum*-ban a sejtmagot tartalmazó keratinociták jelenléte, ezek az úgynevezett parakeratotikus sejtek. A betegség mindkét nemet és minden korcsoportot érinti, de a tünetek első megjelenése alapján két csoport különíthető el: a 40 éves kor előtti megjelenés a fiatalkori forma (I. típus), az ezt követően megjelenő betegség az idősebb kori forma (II. típus). Ma Magyarországon 140-200 ezren szenvednek pikkelysömörben, ez a lakosság kb. 2 százaléka. A pikkelysömör kialakulásában a genetikailag meghatározott hajlam és a külső környezeti faktorok is szerepet játszanak. A genetikai tényező mind a bőr, mind az ízületi betegségben bizonyított (Hebert és mtsai, 2011). A genetikai faktorokon kívül számos környezeti tényező provokálhatja a klinikai tünetek kialakulását: ilyen a stressz, a dohányzás, az elhízás és az anyagcsere betegségek, illetve a fertőzések, elsősorban a felső légúti hurut és a mandulagyulladás (Chandran és Raychaudhuri, 2010). A betegség patomechanizmusában fontos tényező a krónikus gyulladás, melyben a kialakult léziók T-sejtes infiltrációja dominál. Számos citokin és kemokin vesz részt a gyulladás kialakulásában (Bowcock és Krueger, 2005; Bos, 2007). A psoriasis bőr- és ízületi tüneteinek szisztémás kezelésére a methotrexát (MTX) régóta alkalmazott, viszonylag kevés mellékhatással rendelkező, hatékony szer.

A MTX a tumor-kemoterápiában széles körben használt gyulladásellenes és immunszuppresszív hatással rendelkező folsav antagonistája. Egyes daganatok kezelésében, valamint különböző autoimmun betegségek, mint például a reumatoid arthritisz terápiájában alkalmazott citotoxikus szer (Kremer, 2004). Felvétele a sejtekbe a folsavval azonos úton, aktív transzport mechanizmus által megy végbe. A MTX a redukált folát vivő fehérje (*reduced folate carrier*, RFC1) segítségével jut a citoplazmába, ahol a folytpoli- γ -glutamát szintetáz (FPGS) enzim által katalizált folyamatban poliglutamálódik. Ebben a formában többek között a pirimidin és a purin szintézis kulcsenzimeit gátolja (mint például a dihidrofolát-reduktázt és a timidilát-szintázt). A MTX-ot a xenobiotikum transzporterek, az ABCG2, illetve az ABCC alcsalád számos tagja, így az ABCC4 aktív transzporttal pumpálja ki a sejtől (4. ábra), a poliglutamált forma egyáltalán nem megfelelő szubsztrátja ezen fehérjéknek (Hooijberg és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2002; Volk és Schneider, 2003; van der Heijden és mtsai, 2007).

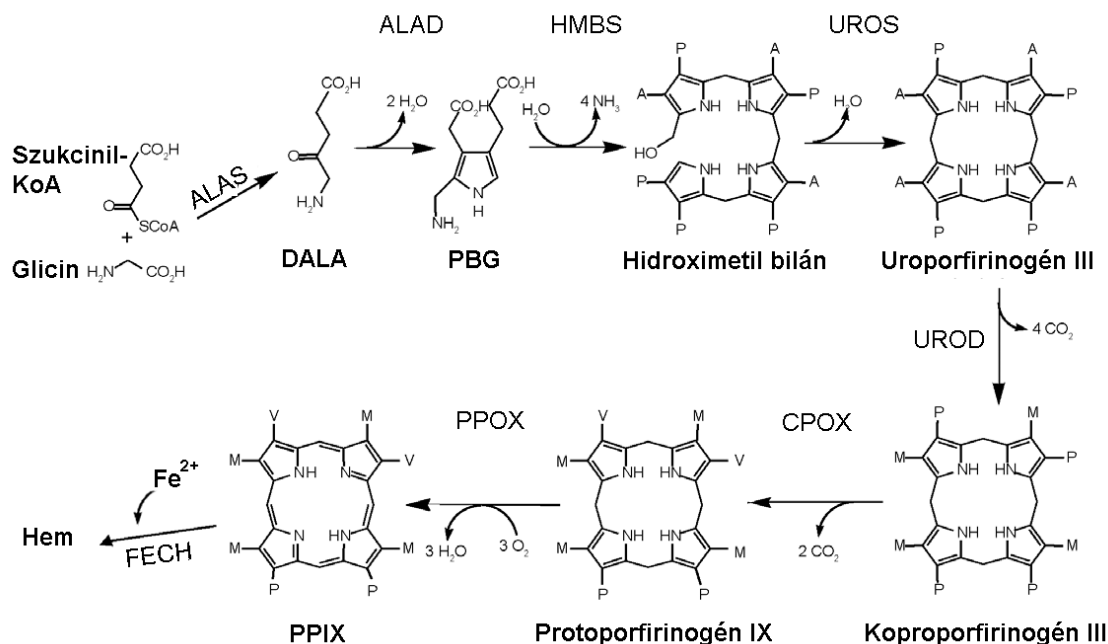


4. ábra: A MTX sejten belüli sorsa (magyarázat a szövegben). RFC1: reduced folate carrier, MTX-(Glu)_n: poliglutamált MTX, FPGS: folytpoli-γ-glutamát szintetáz, FPGH: folytpoli-γ-glutamát hidroláz (Chen és mtsai (2002) nyomán).

2.6. A fotodinámiás terápia

2.6.1. A fotodinámiás terápia mechanizmusa

A fotodinámiás terápia (PDT) alapja egy fényérzékenyítő anyag szelektív felhalmozása a célsejtekben, ezt követi egy specifikus fényforrással való besugárzás. A fényérzékenyítő anyaggal kezelt területet adott hullámhosszúságú fénnel (390 nm, valamint 630 nm hullámhosszúság környékén) megvilágítva a fényérzékenyítő molekulák gerjesztett állapotba kerülnek, ami reaktív oxigén gyökök és egyéb szabadgyökök keletkezését indítja el, ami végül a célsejt pusztulásához vezet (Nielsen és mtsai, 2005). A PDT lehetséges alkalmazási területe között számos tumor kezelése szerepel, de különösképpen hatékonynak bizonyult a bőr felszínén található tumoros léziók gyógyításában, főként bazalióma és aktinikus keratózis esetében (Gaál és mtsai, 2007; Choudhary és mtsai, 2009).



5. ábra: A hem bioszintézise. ALAS: aminolevulinsav szintáz, DALA: delta-aminolevulinsav, ALAD: aminolevulinsav dehidrogenáz, PBG: porfobilinogén, HMBS: hidroximetil bilán szintáz, UROS: uroporfirinogén III szintáz, UROD: uroporfirinogén III dekarboxiláz, CPOX: koproporfirinogén III oxidáz, PPOX: protoporfirinogén IX oxidáz, PPIX: protoporfirin IX, FECH: ferrokelatáz.

A legelterjedtebben használt fényérzékenyítő molekula a protoporfirin IX (PPIX), amely gyakorlatilag minden sejtben keletkezik a hem bioszintézise során. A bioszintézis útvonal utolsó lépésében a PPIX-ből Fe²⁺ ion csatlakozásával szintetizálódik a hem, amely számos fehérje működéséhez elengedhetetlen. A porfirin bioszintézis sebességmeghatározó lépése – és ezáltal kulcsfontosságú szabályozó eleme – amikor szukcinil-koenzim-A-ból és glicinből delta-aminolevulinsav (DALA) keletkezik (Schultz és mtsai, 2010). Ezt a lépést az aminolevulinsav szintáz (ALAS) nevű enzim katalizálja. DALA vagy metil-észter származékának adagolásával ez a szabályozó lépés megkerülhető, melynek eredményeképpen a sejtek nagy mennyiségű PPIX-t halmoznak fel. PDT alkalmazása során a legtöbbször gyógyszer előanyagként DALA-t alkalmaznak a célsejtek fényérzékenyítésére. A sejtekben szabadon előforduló PPIX citotoxikus, megfelelő hullámhosszúságú fény segítségével gerjesztett állapotba hozható, amely aztán a sejt halálát előidéző szabad gyökök generálásához vezet (Ponka, 1999). A szabad porfirinek intracelluláris koncentrációja ezért szigorúan szabályozott bioszintetikus/katabolikus, valamint influx/efflux rendszerek által.

2.6.2. Az ABCG2 xenobiotikum transzporter és a fotodinámiás terápia

Az ABC transzporter szupercsaládba tartozó ABCG2 fehérje a hem efflux rendszer nemrég jellemzett tagja. A 70 kDa méretű polipeptid homodimer formában válik funkcióképesé. Az ABCG2 protein jól ismert a tumorok szerzett multidrog rezisztenciájával kapcsolatban, a tumorsejtekből kemoterápiás gyógyszerek széles skáláját képes eltávolítani, így biztosítva azok túlélését (Krishnamurthy és Schuetz, 2006). Az ABCG2 transzporter endogén szubsztátjai sokáig nem voltak ismertek. Amikor ABCG2 knock-out egereket módosított *peophorbide(a)*-t nagy mennyiségben tartalmazó étrenden tartottak, az állatok bőrén fototoxikus tünetek jelentkeztek (Jonker és mtsai, 2002). A *pheophorbide(a)*, amely szerkezetileg jelentős hasonlóságot mutat a porfirinekkal, szájon át adva felhalmozódik az ABCG2 knock-out állatokban, ami fényérzékenységhez vezet. Krishnamurthy és mtsai (2004) kimutatták, hogy az ABCG2 transzporter jelentős mértékben hozzájárul a sejtek védelméhez a káros porfirinek toxikus hatása ellen, különösen érvényes ez hipoxiás körülmények között. Az ABCG2 fehérje magas szintű kifejeződése elősegíti a porfirinek sejtől való eliminációját, ami megnövekedett rezisztenciát jelent a PDT kezelés ellen. A fényérzékenyítő anyagok hatékonyságának növelése fontos kutatási szempont a PDT-vel kezelt léziók könnyebb gyógyulása érdekében, valamint a káros mellékhatások enyhítése miatt. Az ABCG2 transzporter lehet az egyik támadáspontja a PDT hatékonyságának javítására irányuló vizsgálatoknak.

3. Célkritizálás

- Az ABC transzporter fehérjecsaldba tartozó xenobiotikum transzporterek humán b3rben bet3lt3tt funkci3ir3l kevés adat 3ll rendelkez3sre az irodalomban. Els3dleges c3lunk az ABCB1 (Pgp/MDR1), ABCC1-6 (MRP1-6) 3s az ABCG2 (BCRP) g3nek r3szletes expresszi3s vizsg3lata volt, *in vitro* hum3n keratinocita prolifer3ci3s/differenci3ci3s modell rendszerekben. A xenobiotikum transzporterek csoportj3nak fennmarad3 k3t tagja, az ABCB11 (BSEP) 3s ABCC11 (MRP8) g3nr3l ismert, hogy keratinocit3kban nem fejez3dn3k ki, 3gy ezeket nem vizsg3ltuk k3s3rleteinkben.
- Az ABCC4 3s ABCG2 g3nek eseten kapott expresszi3s eredm3nyek prolifer3ci3hoz kapcsolt kifejez3d3sre utaltak.
 - o C3lul t3zt3k ki az ABCC4 3s ABCG2 fehérj3k kifejez3d3s3nek vizsg3lat3t a m3r eml3tett *in vitro* keratinocita modellekben.
 - o Elhat3roztuk tov3bb3, hogy az ABCC4 3s ABCG2 transzporterek keratinocita prolifer3ci3ban bet3lt3tt funkci3j3t siRNS 3ltal k3zvet3tett g3nspecifikus csendes3t3ssel, valamint k3miai g3tl3szerek alkalmaz3s3val fogjuk tanulm3nyozni.
- *In vitro* vizsg3lataink eredm3nyei alapj3n az ABCC4 3s ABCG2 transzporterek kifejez3d3s3nek vizsg3lat3t kiterjesztett3k hum3n b3rre is, k3l3n3s tekintettel a felmer3l3 ter3pi3s lehet3s3gekre.
 - o Az ABCC4 transzporter fehérje expresszi3j3t pikkelys3m3r3s betegek b3r3ben tanulm3nyoztuk, majd c3lul t3zt3k ki a pikkelys3m3r ter3pi3j3ban alkalmazott methotrex3t (MTX) keratinocit3kra gyakorolt hat3s3nak vizsg3lat3t *in vitro*, k3l3nb3z3 transzporter g3tl3szerek alkalmaz3sa mellett.
 - o C3lul t3zt3k ki az ABCG2 transzporter kifejez3d3s3nek vizsg3lat3t k3l3nfele nem-melan3ma t3pus3 b3rgy3gy3szati k3rk3pekben. C3lunk volt az ABCG2 transzporter, mint lehets3ges c3lmolekula, szerep3nek tanulm3nyoz3sa egyes b3rgy3gy3szati eredet3 k3rk3pek eseten alkalmazott fotodin3mi3s ter3pia (PDT) hat3konys3g3nak n3vel3se 3rdek3ben. Munk3nk sor3n arra kerest3nk v3laszt, hogy az ABCG2 fehérje mennyiben j3rul hozz3 a porfirinek keratinocit3kb3l val3

eltávolításához, amely kulcsfontosságú lehet a PDT hatékonyságának növelése szempontjából.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Normál humán keratinociták szeparálása

A normál humán keratinociták (NHK) szeparálása egészséges személyek plasztikai műtétből származó bőréből történt. A bőrt tisztítás után diszpáz enzimmel emésztettük egy éjszakán át 4 °C-on, amely lehetővé tette az epidermisz elválasztását a dermisztől. A leválasztott epidermiszből tripszin kezelés segítségével epidermális szuszpenziót nyertünk. A sejteket centrifugálást követően 4×10^4 sejt/cm² sűrűségben 75 cm² alapterületű flaskákba (Becton Dickinson) passzáltuk és komplett keratinocita szérumentes tápfolyadékban (KC-SFM, Invitrogen) tenyésztettük.

4.2. HaCaT sejtek és NHK tenyésztése

A HaCaT keratinocita sejtvonal, amely normál humán keratinociták spontán immortalizációjával létrejött sejtvonal, Prof. N. E. Fusenig laboratóriumából származik (Boukamp és mtsai, 1988). A HaCaT sejteket 75 cm² alapterületű flaskában tartottuk fenn, 4,5 g/l glükóz tartalmú *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma) tápfolyadékot használtunk 10% főtális borjú szérummal (FBS, HyClone), 1% L-glutaminnal és 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal (Sigma) kiegészítve.

A NHK-kat 75 cm² alapterületű flaskában tartottuk fenn KC-SFM-ban, amelyet Supplement Kit-tel (Invitrogen) és 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal egészítettünk ki. A kísérletekhez harmadik passzázsban levő sejteket használtunk.

A sejteket 37 °C hőmérsékletű termosztátban 100% páratartalom mellett tenyésztettük, a tápfolyadékot kétnaponta cseréltük. Amikor a sejtek a tenyésztő flaska felületét teljesen benőtték, foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk, amely 0,05% etilén diamin tetraecetsavat (EDTA) tartalmazott, majd tripszin (Sigma) alkalmazásával 37 °C-on inkubálva elválasztottuk őket egymástól és a flaska aljától. A jól felszuszpendált sejteket megszámoltuk, 10 percig 4 °C-on 250 g-vel centrifugáltuk, majd kipasszáltuk a 75 cm²-es új tenyésztő flaskákba, $1,5 \times 10^6$ db sejtet tettünk egy tenyésztő edénybe.

4.3. Keratinocita differenciációs modellek

A HaCaT sejtek szinkronizálása a Pivarcsi és mtsai (2001) által beállított és leírt módszerrel történt. A sejteket a teljes konfluencia elérését követően a kontakt gátlás állapotában egy héten keresztül, majd szérumentes tápfolyadékban további egy hétig tenyésztettük. Ezután a HaCaT keratinocitákat 5×10^3 sejt/cm² sűrűségben kipasszáltuk szérumot tartalmazó tápfolyadékban. A szinkronizálási eljárás végétől számított 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 168 óra elteltével vettünk mintákat.

A másik differenciációs modellben harmadik passzázsban levő NHK-kat 90-95%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük. A sejtek differenciációját magas Ca²⁺ tartalmú (1,7 mM) tápfolyadékkal (Ca⁺) váltottuk ki. A kontroll sejt kultúrát (Ca⁻) normál KC-SFM tápfolyadékban tartottuk, amelynek Ca²⁺ tartalma 0,09 mM. A mintákat a magas Ca²⁺ tartalmú médiumra való váltást követő 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 nap után vettük, értelemszerűen mind a Ca⁺, mind a Ca⁻ sejt kultúrákból.

4.4. Valós idejű reverz-transzkriptáz PCR

A sejtekből az RNS-t TRIzol reagens (Invitrogen) segítségével vontuk ki a gyártó által megadott protokoll szerint. A cDNS-t iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) felhasználásával 1 µg RNS-ből írtuk át. A valós idejű RT-PCR kísérleteinkhez a Universal Probe Library (UPL, Roche) rendszert használtuk a gyártó által megadott reagenseket és reakciókörülményeket alkalmazva. A fehasznált UPL primereket és próbákat a 2. táblázatban soroltuk fel. A reakciókat és kiértékelésüket egy iQ5 Real-Time PCR Detection Machine (Bio-Rad) és a hozzá tartozó program segítségével végeztük el. A relatív mRNS szintek meghatározásához a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittgen, 2001). Minden gén kifejeződését a 18S riboszómális RNS gén expressziójához normalizáltuk.

2. táblázat A valós idejű PCR-hez felhasznált Universal Probe Library (UPL) primerek

Gén transzkript (GenBank azonosító)	Primer szekvenciák (f – <i>forward</i> primer, r – <i>reverse</i> primer)	UPL próba száma
18S rRNS (X03205.1)	(f) 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' (r) 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'	77
ABCB1 (NM_000927.3)	(f) 5'-GAGTATCTTCTTCCAAAATTCACG-3' (r) 5'-CCCCTTCAAGATCCATTCC-3'	49
ABCC1 (NM_004996.2)	(f) 5'-ACTCTCTTGGGCATCACCAC-3' (r) 5'-GCATGATCCCTGAAGACTGAA-3'	55
ABCC2 (NM_000392.1)	(f) 5'-AGCATGCTTCCCATGATGA-3' (r) 5'-TCTAGCCGCTCTGTGGAAAC-3'	1
ABCC3 (NM_020037.1)	(f) 5'-TGCTCTCCTTCATCAATCCA-3' (r) 5'-TGGGGTTGGAGATAAACCTG-3'	89
ABCC4 (NM_005845.2)	(f) 5'-AAGCGCTGGAATCTACAAC-3' (r) 5'-CCCCTGGAGAGAAGATGACA-3'	47
ABCC5 (NM_005688.2)	(f) 5'-GCCTACAATAAAGGGCAGGA-3' (r) 5'-GCATCGCACACGTAAACAAA-3'	42
ABCC6 (NM_001171.2)	(f) 5'-GATCGTGGTCTGCTTCGTCT-3' (r) 5'-AGACAGCGATGGCAGTGAG-3'	17
ABCG2 (AY333756.1)	(f) 5'-TGGCTTAGACTCAAGCACAGC-3' (r) 5'-TCGTCCCTGCTTAGACATCC-3'	56
Ki67 (NM_002417.3)	(f) 5'-CAAGACTCGGTCCCTGAAAA-3' (r) 5'-TTGCTGTTCTGCCTCAGTCTT-3'	50
ITGA5 (NM_002205.2)	(f) 5'-ACATCTGTGTGCCTGACCTG-3' (r) 5'-CCAGGTACACATGGTTCTGC-3'	11
KRT1 (NM_006121)	(f) 5'-GCCTCCTTCATTGACAAGGT-3' (r) 5'-GCTCCCATTTTGTTCAGT-3'	1
IVL (NM_005547.2)	(f) 5'-CAGCAGGAGAGGCAGGTG-3' (r) 5'-CTCCAGATGCTTCAGTTGTCC-3'	1

4.5. Western blott analízis

A sejteket fehérje lízis pufferben (Sigma) óvatosan felfuszpendáltuk, a puffert 0,5% proteáz inhibitor koktéllal (Sigma) egészítettük ki. Harminc percig 4 °C-on inkubáltuk, majd 10 000 *g* centrifugálást követően a felülúszót használtuk a továbbiakban. A lizátumok fehérje tartalmát BCA Protein Assay (Pierce) segítségével határoztuk meg. Nátrium dodecilszulfát-(SDS) poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel 7,5%-os gél alkalmazásával méret szerint elválasztottuk a fehérjéket, a gélre 40 µg összfehérjét vittünk fel mintánként. A gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk transzfer pufferben 1,5 órán keresztül 4 °C-on, 115 V feszültséggel. A membránt 3%-os tejport tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban (TBS, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7.4, Sigma) egy órán át szobahőn tartottuk. Patkány

anti-humán ABCC4 (1:150 hígítás, M4I-10 klón, GeneTex), egér anti-humán ABCG2 (1:300 hígítás, BXP-21 klón, Calbiochem) és egér anti-humán α -aktin (1:500 hígítás, Sigma) elsődleges ellenanyagokat használtunk a vizsgált fehérjék kimutatásához. 3% tejport tartalmazó TBS-ben kihígított elsődleges ellenanyagokkal egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on, majd mosást követően patkány és egér IgG ellen termeltetett alkalikus foszfátáz konjugált másodlagos ellenanyagot és SigmaFast 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát/nitroblue-tetrazólium (BCIP/NBT, Sigma) előhívó oldatot használtunk a fehérje sávok megjelenítéséhez.

4.6. Immuncitokémia

A tenyészdőedény aljáról a sejteket tripszin segítségével leválasztottuk, a sejtszuspenziót centrifugálást követően PBS-ben vettük fel, majd 10^5 db sejtet centrifugáltunk egy tárgylemezre citocentrifugával (Cytopro, Wescor). A lemezeket egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk. A mintákat 2%-os paraformaldehidben fixáltuk 7 percig szobahőn, ezután blokkoló oldatban (0,5% borjú szérum albumin (BSA)-TBS, 1% kecske szérum) inkubáltuk fél órán keresztül. Az elsődleges ellenanyagokat (patkány anti-humán ABCC4, egér anti-humán ABCG2) és a megfelelő izotípus kontroll antitesteket (patkány IgG2a és egér IgG2a, Sigma) 0,5%-os BSA-TBS-ben hígítottuk ki, és a tárgylemezeket egy éjszakán keresztül inkubáltuk benne 4 °C-on. Mosást követően, patkány IgG és egér IgG ellen termeltetett biotinilált másodlagos ellenanyagokkal (Vector Laboratories, 1:200 hígításban) jelöltük meg a mintákat. A festést a Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) segítségével hívtuk elő 9-aminetilkarbazol kromogén (Sigma) felhasználásával. A sejtmagokat Mayer hematoxilinnel (Sigma) festettük meg. A képeket a sejtekről Zeiss AxioImager (Zeiss) mikroszkóppal készítettük, amely egy PixeLink CCD kamerával (PixeLink) volt felszerelve.

4.7. Áramlási citometriás vizsgálatok

A porfirin autofluoreszcencia méréséhez a sejteket 4 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 1 mM delta-aminolevulinsavval (DALA) (Sigma, 500 mM törzsoldat desztillált vízben oldva). Eközben a sejteket 1 μ M Ko134-gyel (Solvo, 500 μ M törzsoldat DMSO-ban oldva) vagy annak vivőanyagával kezeltük. Ezután tripszines

kezelést és centrifugálást követően PBS-ben szuszpendáltuk fel a sejteket és a mérésig sötétben, jégen tartottuk őket.

Az ABCG2 fehérje felszíni festéséhez a sejteket tripszinezés és centrifugálás után 1% BSA-PBS-ben vettük fel, és anti-humán ABCG2 antitesttel (1:100, 5D3 klón, R&D Systems) vagy egér IgG2b izotípus kontroll antitesttel jelöltük őket 45 percen át jégen inkubálva. Mosást követően anti-egér IgG Alexa647 (Invitrogen) konjugált másodlagos antitesttel festettük a sejteket 45 percig jégen, majd a mérésig sötétben 4 °C-on tartottuk őket.

A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel (Beckton Dickinson) mértük és elemeztük, a detektálást 635 nm gerjesztés mellett az FL4 csatornán végeztük. Összesen 15000 sejtet mértünk le mintánként.

4.8. A transzporterek expressziójának csendesítése siRNS módszerrel

Az ABCC4 és ABCG2 specifikus siRNS-t, a kontroll siRNS-t, a transzfekciós tápfolyadékot és a transzfekciós reagenst a Santa Cruz Biotechnology Inc.-től szereztük be. A transzfekciót a gyártó protokollja alapján végeztük el, az siRNS-ek végkoncentrációja 50 nM volt. A transzfekciós hatékonyságot áramlási citométerrel mértük, a transzfekciót követő 24 óra múlva, FITC konjugált siRNS segítségével. A HaCaT sejteket egy nappal a tenyésztő edényekbe való passzálás után transzfectáltuk.

4.9. Viabilitás mérés 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid esszével

A sejteket a méréshez minden esetben 96 lyukú mikrotiter lemezekben tenyésztettük és kezeltük. A mérés kezdetén a sejtekről a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 37 °C-ra felmelegített színtelen *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma) tápoldattal helyettesítettük, amelyet 10% 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid törzsoldattal (MTT, 5 mg/ml, Sigma) egészítettünk ki. Négyórás, 37°C-on történő inkubációt követően az élő sejtek mitokondriumaiban található enzimek a sárga színű MTT-t lila színű formazánná redukálják. A keletkezett formazán kristályokat feloldottuk 100 µl 0,04 M HCl tartalmú izopropanolban, majd kiegészítettük 20 µl 10% SDS oldattal, végül az oldatot alaposan szuszpendáltuk. Spektrofotométer (Multiscan EX, Thermo Labsystems) segítségével mértük meg az

egyes lyukakban az 540 nm hullámhosszon mutatott abszorbanciát, amely arányos az adott lyukban levő sejtek számával. A kapott abszorbancia értékeket mindig a kontrollként használt kezeletlen minta abszorbancia értékéhez hasonlítottuk.

4.10. Valós idejű sejtproliferációs analízis

5×10^3 db sejtet 96 lyukú speciális arany mikroelektrodákkal borított tenyésztőedényekbe passzáltuk (E-plates, Roche). A valós idejű sejtproliferációs analízist az XCELLigence rendszerrel (Roche) végeztük. A tenyésztőedényekbe alacsony feszültségű váltóáramot vezetve a mikroelektrodák között egy elektromos mező generálódik, amelyet az elektrodákat borító sejtek modulálnak. A készülék a tenyésztőedényekben keletkező impedanciát méri, a sejtek proliferációjával ez változik. A leolvasott impedancia adatokat a készülék úgynevezett sejtindex érték megadásával jeleníti meg. A passzálást követően egy napig tartottuk a sejteket a tenyésztő edényben a megfelelő letapadás érdekében. Ezt követően 0,5 mM probeneciddel (PRO, 350 mM koncentrációjú, 1 M NaOH-ban oldott törzsoldatból hígítva, Sigma) és 1 μ M Ko-134-el (500 μ M koncentrációjú, DMSO-ban oldott törzsoldat, Solvo Zrt.), valamint kontrollként a vivőanyagaikkal kezeltük a sejteket. A sejtindexet 72 órán keresztül vettük fel, 15 percenként történt a leolvasás.

4.11. Immunhisztokémia

Pikkelysömörös betegek (n=7) és egészséges személyek bőréből (n=4) deréktájáról 4 mm *punch*-biopsziát vettünk. A szövetminta vételről a páciensek írásbeli tájékoztatásban részesültek, a vizsgálatok a helyi etikai bizottság engedélyével történtek. A kísérleteket a Helsinki Deklaráció alapelveit figyelembe véve végeztük el. A bőrmintákat 4%-os pufferolt formalin oldatban fixáltuk egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten, paraffinba ágyaztuk, és 3 μ m-es metszeteket készítettünk belőlük. A bőr egyéb patológiás elváltozásaiból származó, paraffinba ágyazott mintákat a SZTE Bőrgyógyászati Klinika Dermatopathológiai Laboratóriuma biztosította a vizsgálatainkhoz. Deparaffinálást követően hőindukált antigén feltárást végeztünk EDTA tartalmú TBS-ben (pH=9) 20 percen keresztül 95 °C-on. A metszeteket blokkoló oldatba (0,5% BSA-TBS, 1% kecske szérum) helyeztük 30 percre szobahőmérsékleten.

Az ezt követő lépéseket az immuncitokémia fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük el.

4.12. ABCC4 és ABCG2 gátlási vizsgálatok HaCaT sejteken

Viabilitás vizsgálatok céljából a HaCaT sejteket 96 lyukú tenyésztő edényekbe passzáltuk, 5×10^3 db sejt került egy lyukba. A keratinocitákat 24 órán keresztül termosztátban inkubáltuk. Ezután különböző koncentrációkban és kombinációkban MTX-tal (10^{-3} M koncentrációjú, 0,1 M nátrium-hidroxidban (NaOH) oldott törzsoldatból hígítva, Sigma), valamint transzporter gátlószerekkel, vagy oldószerekkel kezeltük a sejteket négy órán keresztül, 37 °C-os termosztátban. Az ABCC típusú transzporterek gátlásához PRO-det, valamint indomethacint (IND, 100 mM koncentrációjú, dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott törzsoldatból, Sigma) használtunk. Az ABCC4 transzporter specifikus gátlásához 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid hidrokloridot (AEBSF, 210 mM koncentrációjú desztillált vízben oldott törzsoldat, Sigma), az ABCG2 transzporter specifikus gátlásához Ko-134-et használtunk. Négy óra elteltével a sejteket 10 perces időközönként DMEM tápfolyadékkal mostuk, összesen három alkalommal. Három nap inkubációt követően a sejtek viabilitását MTT kolorimetrikus méréssel detektáltuk.

4.13. Delta-aminolevulinsav kezelés és in vitro fotodinámiás terápia

HaCaT keratinocitákat 4 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-n 1 mM DALA-val és 1 μ M Ko134-el vagy a vivőanyagával. A sejteket 1,5 J/cm² dózisú besugárzásnak tettük ki egy Aktelite 128 PDT lámpa felhasználásával (635 nm emissziós csúcs, Photocure ASA). A besugárzás idejére a sejteken a tápfolyadékot vékony rétegben PBS-el helyettesítettük. A sejtek viabilitását a besugárzás után 24 órával mértük MTT esszé alkalmazásával.

4.14. Eredmények kiértékelése, statisztika

Statisztikai összehasonlítás céljából az eredményeket egytényezős varianciaanalízis módszerével (ANOVA), a Vassarstats weboldalon (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) található program segítségével

értékeljük ki. A $p < 0,05$ szignifikancia szintet tekintettük a statisztikailag szignifikáns eltérés határának.

5. Eredmények

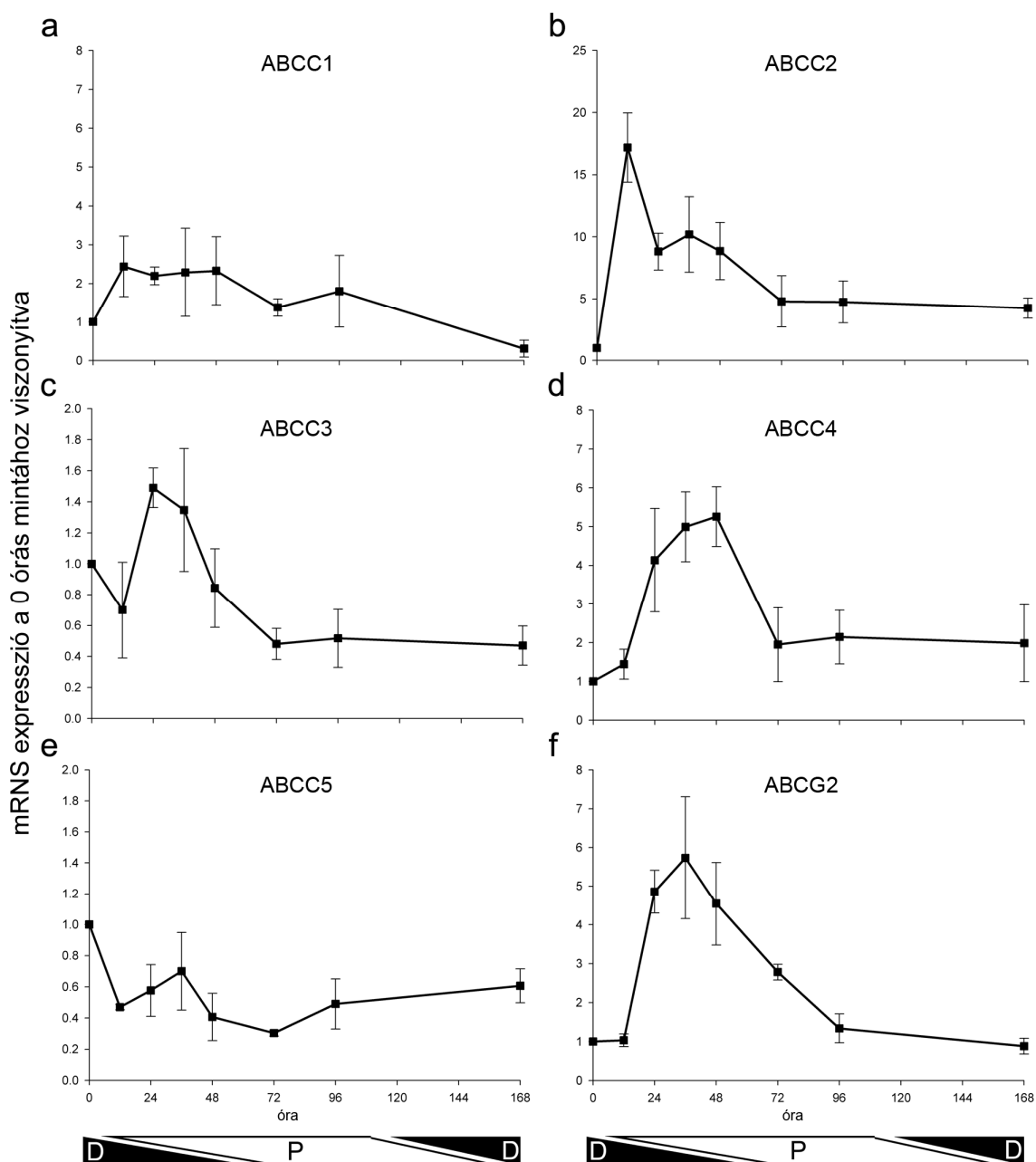
5.1. ABC transzporterek kifejeződése humán keratinocitákban

5.1.1. ABCC4 és ABCG2 transzporterek proliferáció függő indukciója szinkronizált HaCaT keratinocitákban

Annak a megválaszolására, hogy a xenobiotikum transzporterek milyen szerepet játszanak a keratinocita proliferáció/differenciáció szabályozásában, különböző *in vitro* keratinocita modell rendszerekben vizsgáltuk a transzporter gének kifejeződését. Az ABC fehérje szupercsaládból nyolc xenobiotikum transzporter gén kifejeződési mintázatát tanulmányoztuk; ezek az ABCB1 (Pgp/MDR1), ABCC1-6 (MRP1-6) és az ABCG2 (BCRP) gének voltak. Az ABCB11 (BSEP) és ABCC11 (MRP8) gének szintén xenobiotikum transzporter fehérjéket kódolnak, azonban irodalmi adatok alapján nem fejeződnek ki keratinocitákban, ezért nem szerepeltek a vizsgált gének között (Kielar és mtsai, 2003).

Elsőként a laborunkban korábban Pivarcsi és mtsai (2001) által beállított és leírt módszert, a szinkronizált HaCaT sejtek modell rendszerét használtuk. A kéthetes kontakt gátláson és szérum éheztetésen alapuló folyamat során a HaCaT sejtek proliferációsan inaktívvá válnak és jelentősen differenciált állapotba kerülnek. Ebből a sejtnyugalmi fázisból lépnek ki a sejtek a kontakt gátlás megszűnése és a tápfolyadék szérummal való kiegészítése után. Ezzel párhuzamosan a differenciációs markerek kifejeződése csökken, a proliferációs markerek kifejeződése nő, valamint gyors szinkron osztódások sorozata figyelhető meg. Ebben a HaCaT szinkron modellben követtük nyomon a xenobiotikum transzporterek kifejeződését egy héten keresztül.

Az ABCC6 gén expresszióját nem tudtuk kimutatni HaCaT keratinocitákban, az ABCB1 gén kifejeződése pedig meglehetősen alacsonynak bizonyult, bár stabil jelet kaptunk, de az a kimutathatóság határán volt (35 feletti küszöbciklus). Az ABCC1, ABCC3 és ABCC5 transzporterek nem mutattak jelentős génexpressziós változást a kísérlet folyamán (6.a, c, e ábra). Az ABCC2 gén kifejeződése nagymértékben emelkedett 12 órával a sejtnyugalmi állapotból való kilépés után, amely aztán csökkent, de a kiindulási értékhez képest végig magasabb maradt (6.b ábra).



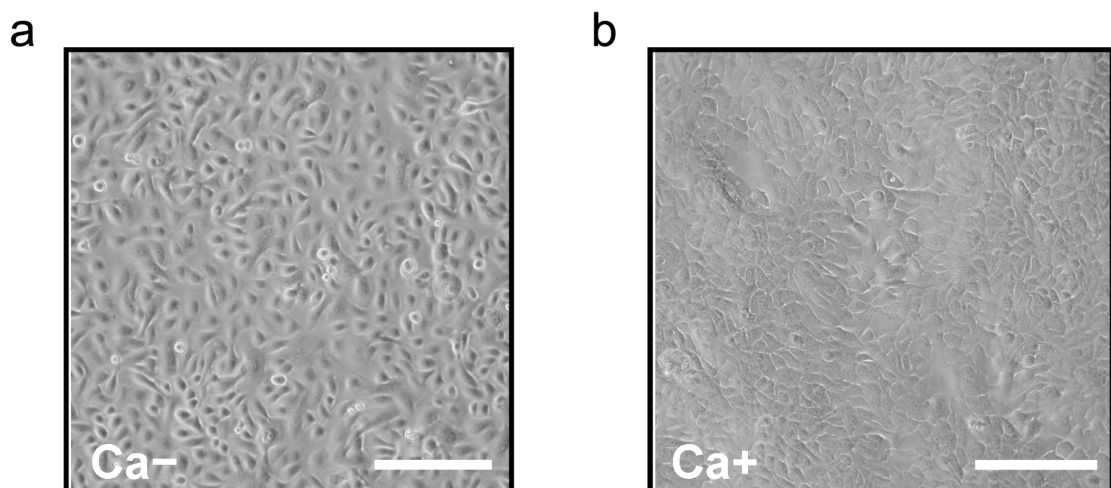
6. ábra: Az ABCC1 (a), ABCC2 (b), ABCC3 (c), ABCC4 (d), ABCC5 (e) és ABCG2 (f) gének expressziója valós idejű RT-PCR vizsgálatok alapján szinkronizált HaCaT sejtekben. A grafikonokon három független kísérlet átlagát $\pm$ SEM tüntettük fel. D: differenciációs fázis, P: proliferációs fázis.

Az ABCC4 és ABCG2 transzporter gének jelentősen indukálódtak a 24 és 72 órás mintavételi időpontok között, ezt követően a 0 órás mintához közeli relatív mRNS szinteket figyeltünk meg (6.d, f ábra). A szinkronizált HaCaT sejtes modellben a propídium jodid festéssel végzett sejtproliferációs analízis azt mutatta, hogy a 24 órás és a 96 órás mintavételi időpontok között intenzív proliferáció zajlik. Ezt az időszakot a proliferációs marker D1 ciklin génkifejeződésének indukciója, és a keratin 1 és 10

gének kifejeződésének csökkenése is jellemezte (Pivarcsi és mtsai, 2001). Az ABCC4 és ABCG2 gének kifejeződésében tapasztalt emelkedés tehát a sejtek intenzív proliferációjával mutatott jó korrelációt, ez kisebb mértékben az ABCC2 mRNS szintjének változására is jellemző volt.

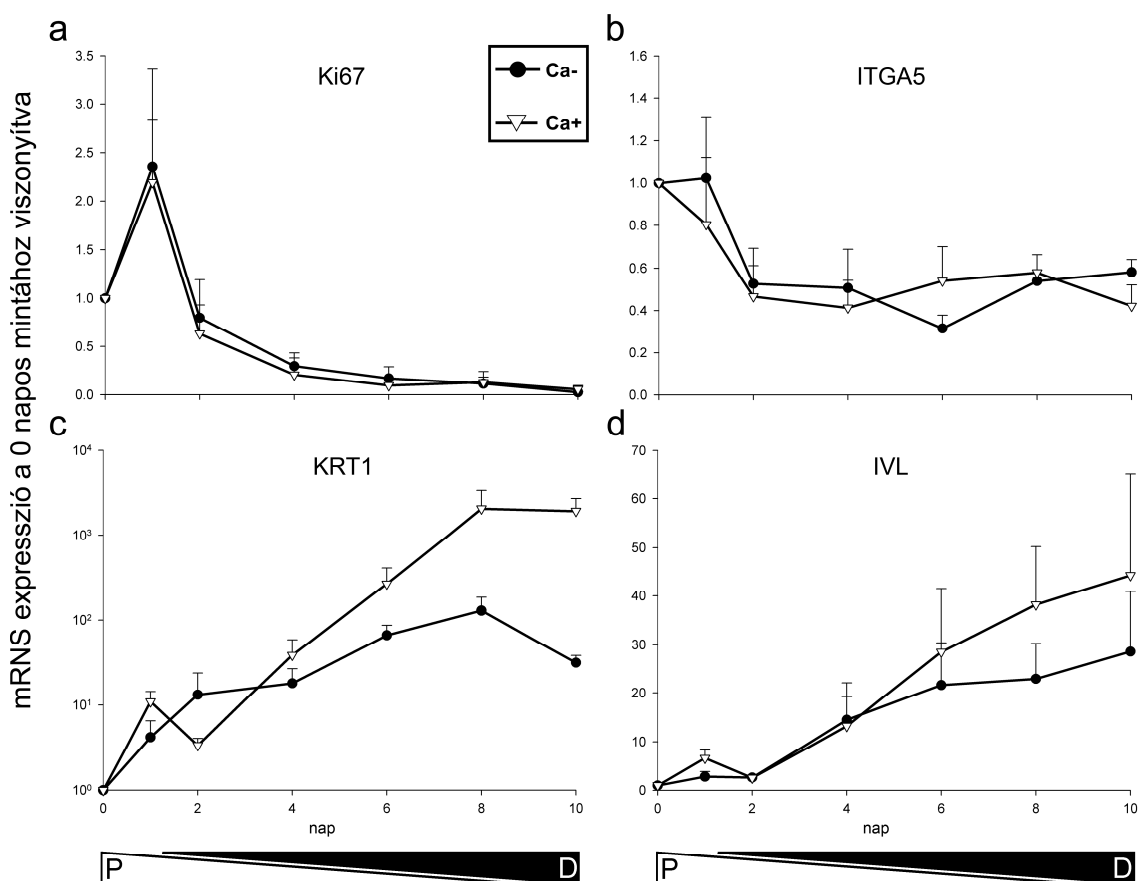
5.1.2. Normál humán keratinociták *in vitro* differenciációs modellje

A HaCaT sejtek számos tekintetben megfeleltethetőek a human keratinocitáknak, azonban egy immortalizált sejtvonalról lévén szó fontosnak tartottuk a xenobiotikum transzporterek kifejeződésének vizsgálatát egészséges bőrből szeparált NHK-k esetében is. Ennek érdekében jellemeztünk egy alternatív *in vitro* keratinocita differenciációs modellt, ahol a tápfolyadék magas Ca^{2+} koncentráció terminális differenciációt vált ki a sejtekben. Kontroll NHK tenyésztetben alacsony Ca^{2+} koncentráció mellett a teljes konfluenciát elérő sejtekben létrejövő differenciációs folyamatokat figyeltük meg. A NHK-k differenciációját ismert proliferációs (Ki67 és alfa5-integrin (ITGA5)) és differenciációs (keratin 1 (KRT1) és involucrin (IVL)) markerek kifejeződésének követésével vizsgáltuk. Magas Ca^{2+} koncentráció mellett a sejtek egy nap elteltével jelentős morfológiai változásokat mutattak. A kontroll sejtek továbbra is nagyméretű, szétterült sejtalakkal voltak jellemezhetők (7.a ábra), ellenben magas Ca^{2+} szint hatására a sejtek mérete csökkent és szögletes morfológiát mutattak (7.b ábra).



7. ábra: NHK-k morfológiája alacsony (a, „Ca-” – 0,09 mM Ca^{2+}) és magas Ca^{2+} (b, „Ca+” – 1,7 mM Ca^{2+}) koncentráció mellett tenyésztve egy nap elteltével. Skála: 100 μm .

A Ki67 és ITGA5 gének expressziója fokozatosan csökkent az első két napon, ahogy a sejtek a teljes konfluenciát érték, majd a kísérlet végéig (10 nap) alacsony mRNS szinteket detektáltunk, a Ca^{2+} koncentrációtól függetlenül (8.a, b ábra). A KRT1 és IVL marker gének kifejeződése fokozatos emelkedést mutatott, majd hat nap után mindkét differenciációs markergén expressziója nagyobb mértékben növekedett magas Ca^{2+} koncentráció mellett (8.c, d ábra).

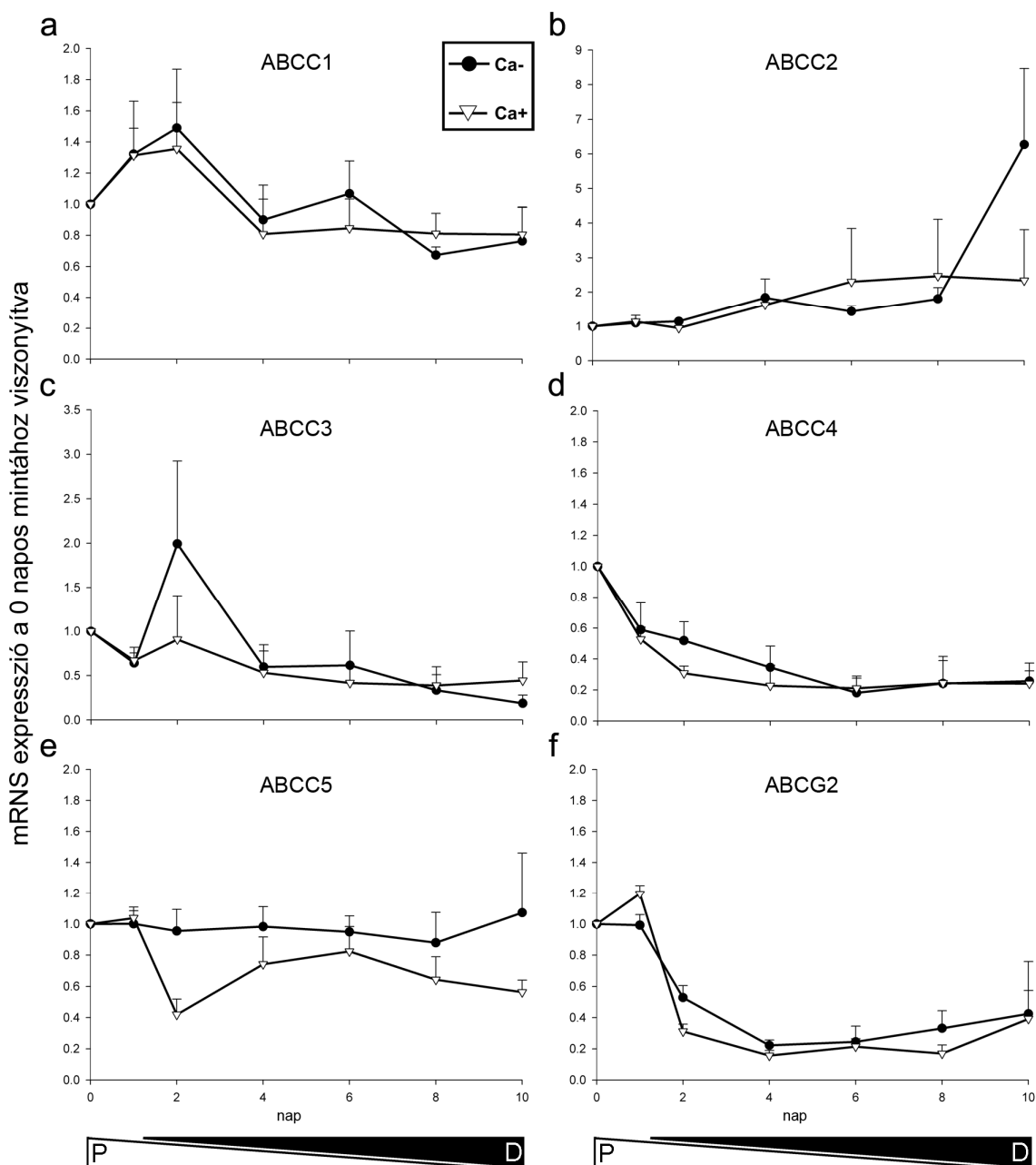


8. ábra: A Ki67 (a), ITGA5 (b), KRT1 (c) és IVL (d) gének expressziója valós idejű RT-PCR vizsgálatok alapján NHK-k differenciációja során alacsony Ca^{2+} („Ca-” – 0,09 mM Ca^{2+}) illetve magas Ca^{2+} koncentráció („Ca+” – 1,7 mM Ca^{2+}) mellett tenyésztve. A grafikonokon három független kísérlet átlagát $\pm$ SEM tüntettük fel. P: proliferációs fázis, D: differenciációs fázis.

5.1.3. Az ABCC4 és ABCG2 gének expressziója csökken normál humán keratinociták differenciációja során

A fentebb jellemzett *in vitro* NHK modell rendszerben megvizsgáltuk az ABCB1, ABCC1-6 és ABCG2 gének transzkripció aktivitását. Mindegyik vizsgált transzporter mRNS jelenlétét sikerült kimutatnunk a mintákban valós idejű RT-PCR

segítségével. Az ABCB1 és ABCC6 gének kifejeződése igen alacsony szinten, a kimutathatósági határon mozgott, de minden mintában stabilan detektálható volt. Az ABCC1 és ABCC5 mRNS szintekben nem találtunk jelentős változást Ca^{2+} kezelés hatására, az ABCC5 gén kifejeződése csökkent valamelyest a 2. és 10. napos, magas Ca^{2+} koncentráció mellett tenyésztett mintákban (9.a, e ábra).



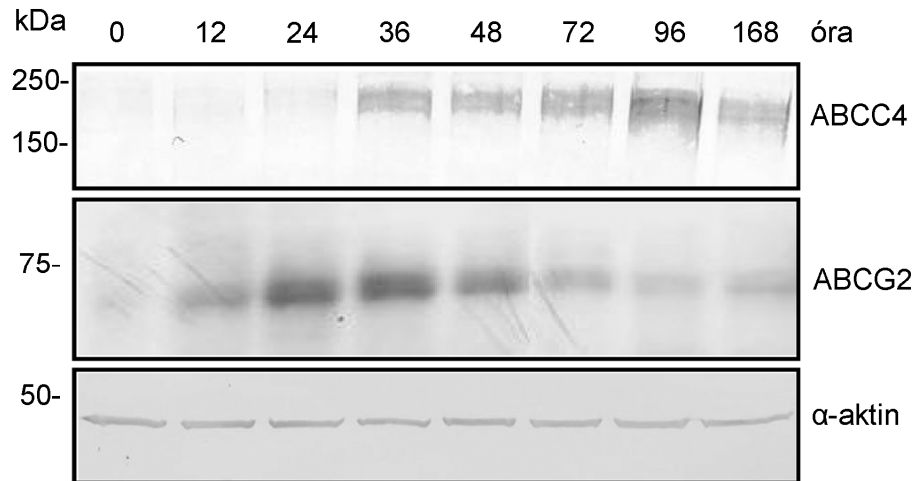
9. ábra: Az ABCC1 (a), ABCC2 (b), ABCC3 (c) ABCC4 (d), ABCC5 (e) és ABCG2 (f) gének expressziója valós idejű RT-PCR vizsgálatok alapján NHK-k differenciációja során alacsony Ca^{2+} („Ca-” – 0,09 mM Ca^{2+}) illetve magas Ca^{2+} koncentráció („Ca+” – 1,7 mM Ca^{2+}) mellett tenyésztve. A grafikonokon három független kísérlet átlaga $\pm$ SEM van feltüntetve. D: differenciációs fázis, P: proliferációs fázis.

Az ABCC2 gén expressziójában kismértékű emelkedést detektáltunk a sejtek differenciációja során, az utolsó (10. napos) minta esetén alacsony Ca^{2+} szint mellett kiugróan emelkedett a gén kifejeződés átlagos értéke, azonban az egyes mérési adatok között nagy szórást tapasztaltunk (9.b ábra). Az ABCC3 mRNS fokozatosan csökkent a 4. napot követően (9.c ábra). Komolyabb változás mutatkozott az ABCC4 és ABCG2 gének expressziójában, mindkét esetben a kiindulási érték ötödére esett vissza az mRNS szint négy nap elteltével (9.d, f ábra). Az ABCC3, ABCC4 és ABCG2 transzporter gének kifejeződése a kísérlet végéig alacsony szinten maradt, Ca^{2+} szinttől függetlenül.

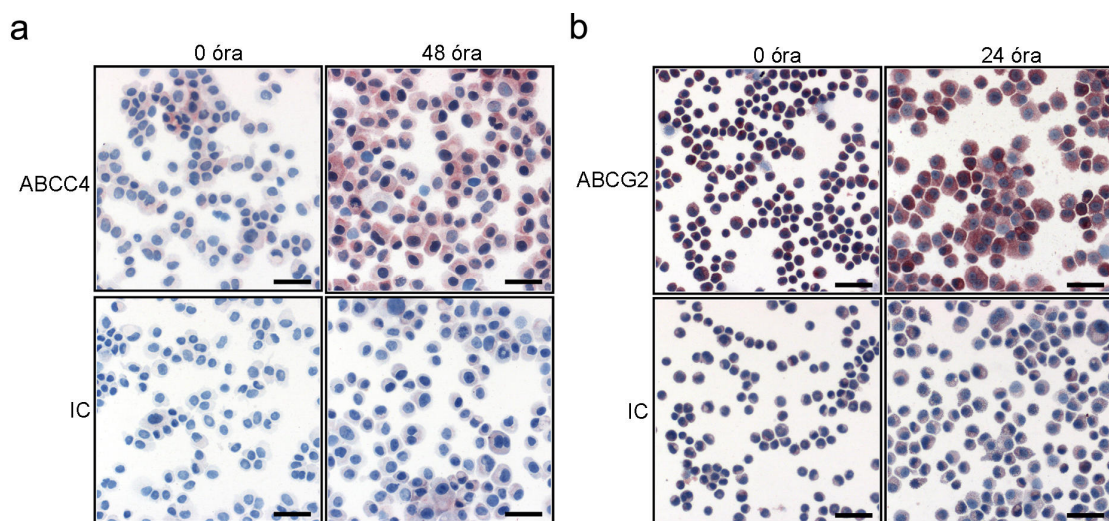
5.1.4. Az ABCC4 és ABCG2 transzporter fehérjék a keratinocita proliferációhoz kapcsoltn fejeződnek ki

A vizsgált xenobiotikum transzporter gének közül az ABCC4 és az ABCG2 kifejeződésében figyelemreméltó keratinocita proliferációhoz kapcsolt mintázatot figyeltünk meg az általunk használt *in vitro* modellekben. Western blott és immuncitokémia segítségével megvizsgáltuk, hogy ezen transzporterek fehérjeszintjét is befolyásolja-e a proliferáció-differenciáció függő szabályozás.

Nagymértékű differenciációt mutató HaCaT sejtekben (0-órás időpontban) sem az ABCC4, sem az ABCG2 transzporter fehérje nem volt detektálható Western blottal. A sejtnyugalmi fázisból való kilépést követően 36 óránál erőteljes indukciót figyeltünk meg az ABCC4 fehérje kifejeződésében, amely a 168 órás mintánál mutatott csak némi visszaesést. Az ABCG2 fehérjeszint gyors emelkedésnek indult, amely már 12 óra elteltével kimutatható volt, 36 óra elteltével érte el a maximális szintet, majd 48 óra elteltével fokozatosan csökkent a kifejeződése (10. ábra). Az ABCC4 és ABCG2 fehérjék mennyiségében megfigyelt proliferáció/differenciáció függő különbséget immuncitokémiai festéssel is kimutattuk (11.a, b ábra).



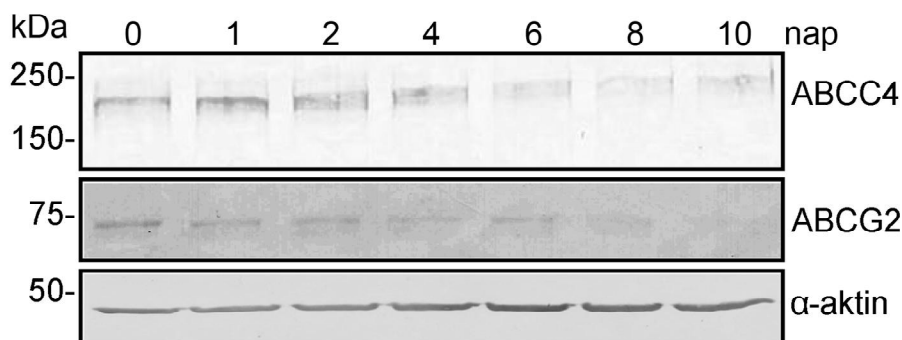
10. ábra: Az ABCC4 és ABCG2 fehérjék detektálása Western blottal szinkronizált HaCaT sejtekben. Három független kísérletből egy reprezentatív blot látható az ábrán, mennyiségi kontrollként α-aktint használtunk.



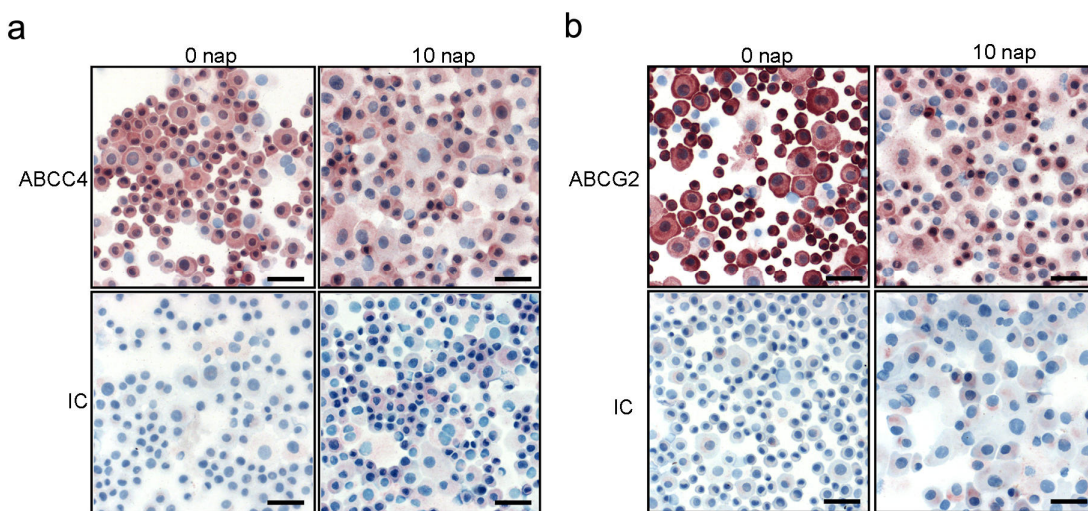
11. ábra: Immuncitokémiai festéssel jelöltük az ABCC4 (a) és az ABCG2 (b) fehérjét szinkronizált HaCaT sejtekben az ábrán feltüntetett időpontokban. Kontroll festéshez (IC) izotípus kontroll elsődleges ellenanyagot használtunk. Skála: 50 μm.

Normál humán keratinocitákban az ABCC4 és ABCG2 fehérjék magas szintű expresszióját figyeltük meg a 0 napos mintákban. Mindkét transzporter expressziója csökkent a keratinociták differenciációjának előrehaladtával, a 10. napon szinte alig volt kimutatható (12. ábra). Ezeket a változásokat mind alacsony, mind magas Ca^{2+} koncentráció mellett megfigyeltük. Immuncitokémiai festéssel a 0 és a 10 napos

kontroll Ca^{2+} szint mellett tenyésztett mintákat hasonlítottuk össze, a differenciált keratinocitákban jelentősen csökkent az immunpozitivitás (13.a, b ábra).



12. ábra: Az ABCC4 és ABCG2 fehérjék detektálása Western blottal differenciálódó NHK-kban ($0,09 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ mellett tenyésztve). Három független kísérletből egy reprezentatív blot látható az ábrán, mennyiségi kontrollként α -aktint használtunk.

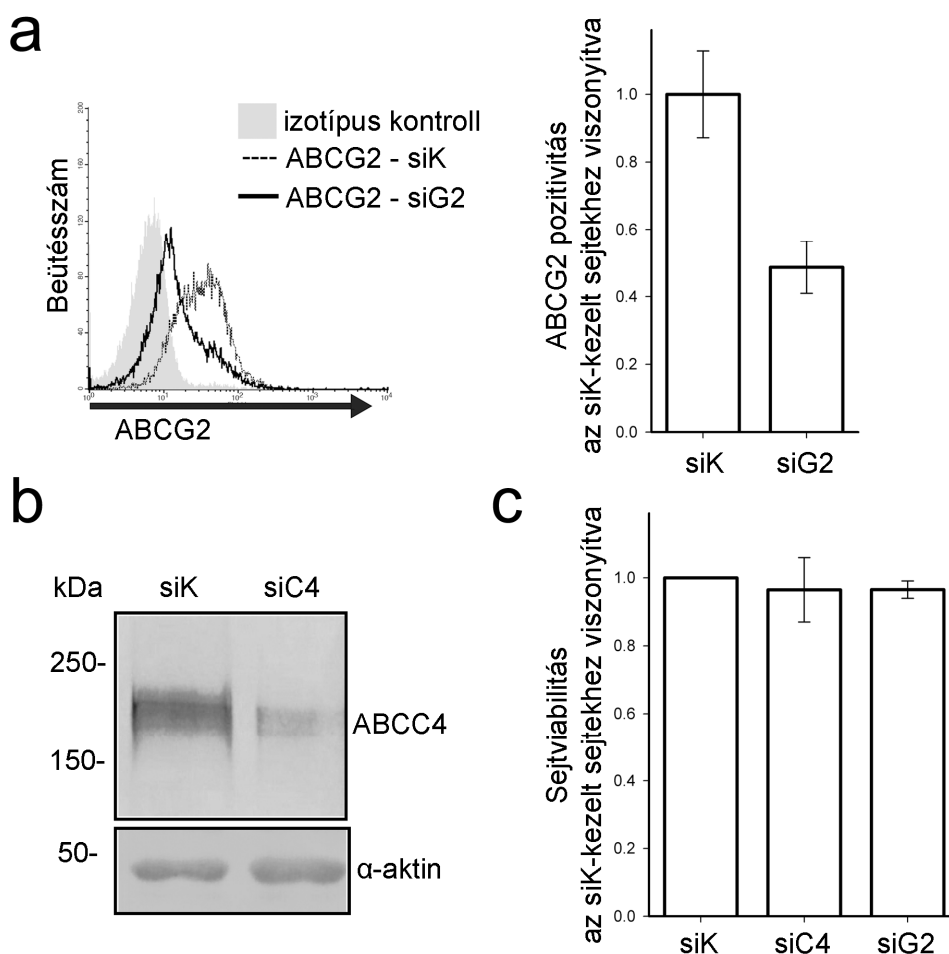


13. ábra: Immuncitokémiai festéssel jelöltük az ABCC4 (a) és az ABCG2 (b) fehérjét differenciálódó NHK-kban az ábrán feltüntetett időpontokban. Kontroll festéshez (IC) izotípus kontroll elsődleges ellenanyagot használtunk. Skála: $50 \mu\text{m}$.

5.2. ABCC4 és ABCG2 transzporterek szerepe humán keratinociták proliferációjában

HaCaT sejtekben és NHK-kban megfigyeltük az ABCC4 és ABCG2 transzporterek proliferációhoz kapcsolt kifejeződését. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy ezen fehérjék működése szükséges-e a keratinocita proliferációhoz. A

transzporterek funkciójának csökkentése céljából génspecifikus csendesítést végeztünk HaCaT sejteken, illetve a sejteket az ABCC4 és ABCG2 proteinek funkcionális gátlószereivel kezeltük.

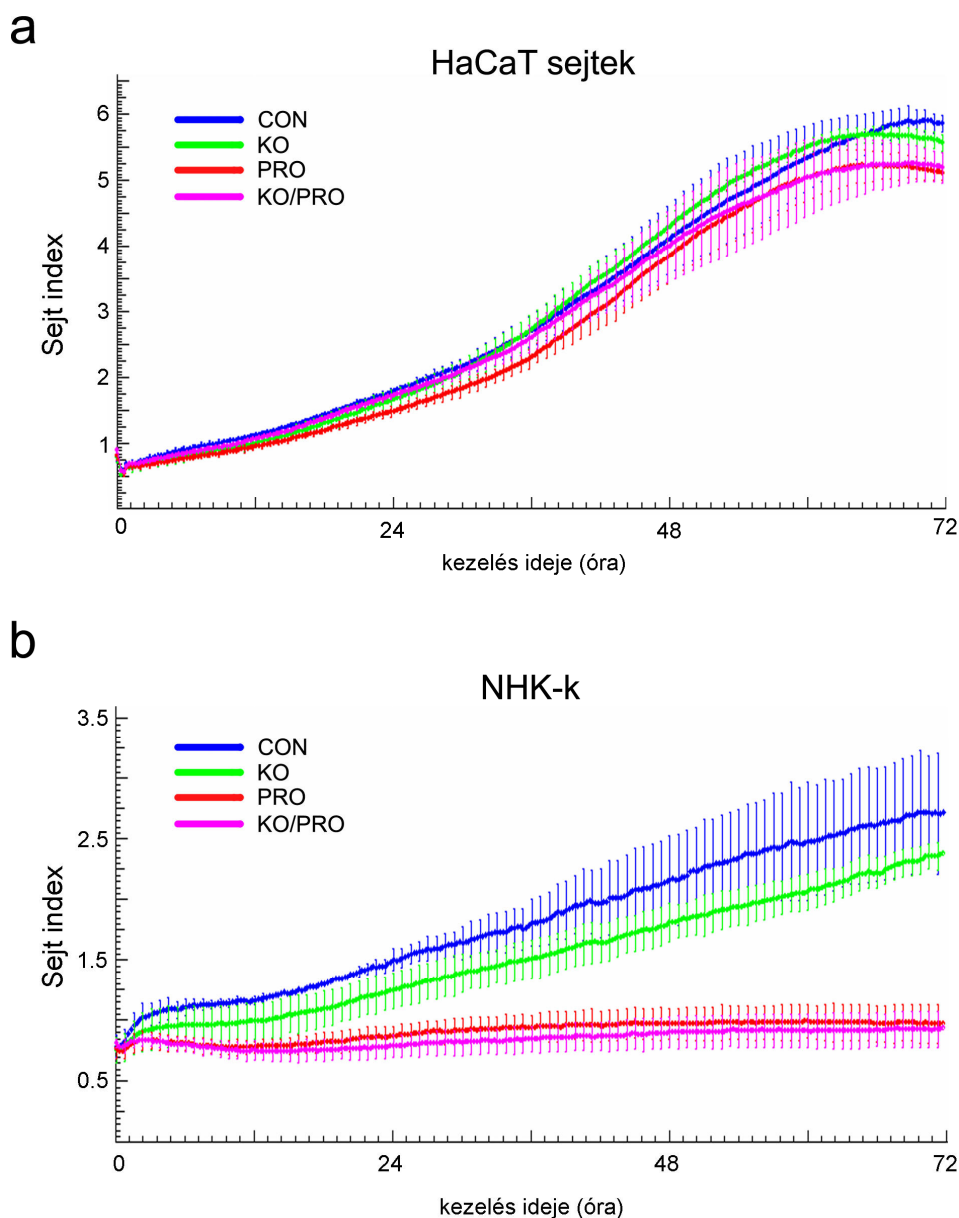


14. ábra: Az ABCC4 és ABCG2 transzporter gének csendesítése specifikus siRNS-ekkel (siC4 és siG2) HaCaT sejtekben. **(a)** A sejtmembránban jelenlevő ABCG2 fehérje mennyisége csökken az siG2-kezelt sejtekben az siK-kezeltetekhez képest. Három független kísérlet során készített áramlási citometriás mérésekből egy reprezentatív hisztogramot, valamint a mérések átlagát $\pm$ SEM ábrázoltuk. **(b)** Az ABCC4 fehérje mennyisége csökken az siC4-kezelt mintában a kontroll siRNS-el (siK) kezeltéhez viszonyítva. Három független kísérletből egy reprezentatív Western blot látható az ábrán, mennyiségi kontrollként α -aktint használtunk. **(c)** A csendesített sejtek viabilitása az siRNS kezelést követő 72 óra elteltével. Három független kísérletből készített MTT viabilitási esszé átlagát $\pm$ SEM ábrázoltuk a grafikonon.

Az ABCG2 gén csendesítését megfelelő ellenanyag segítségével áramlási citométerrel követtük nyomon. Az anti-humán ABCG2 5D3 monoklonális ellenanyag a fehérjének egy extracellulárisan elhelyezkedő epitópjához kötődik, ami lehetővé teszi a sejtmembránon jelenlevő, feltehetően funkcionálisan aktív transzporter kimutatását. Eredményeink szerint az ABCG2 specifikus siRNS-sel (siG2) transzfektált HaCaT

sejtekben a fehérjeszint 48,7%-ra esett vissza az siK-sel kezelt sejtekhez viszonyítva (14.a ábra). Az ABCC4 fehérje esetében nem állt a rendelkezésünkre olyan ellenanyag, amely az ABCG2 detektálásához felhasznált tulajdonságokkal rendelkezik. Ezért összfehérje lizátumból, Western blott vizsgálattal ellenőriztük az ABCC4 gén siRNS általi csendesítésének a hatékonyságát. Az ABCC4 specifikus siRNS-sel (siC4) kezelt HaCaT keratinocitákban jelentősen csökkent az ABCC4 fehérje szintje a kontroll siRNS-sel (siK) transzfektált sejtekhez képest (14.b ábra). 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) esszé segítségével vizsgáltuk a géncsendesített sejtek viabilitását, ami nem mutatott különbséget az siC4, siG2 és siK transzfektált HaCaT sejtek esetében (14.c ábra).

Az ABCC4 és ABCG2 transzporterek keratinocita proliferációban betöltött szerepét egy másik megközelítésben is vizsgáltuk. A fehérjék működését gátló anyagokkal HaCaT sejteket kezeltünk 72 órán keresztül. Az ABCC4 funkcióját az ABCC-típusú transzporterekre ható probeneciddel (PRO, 0,5 mM) gátoltuk, az ABCG2 specifikus gátlásához a fumitremorgin C analóg Ko-134-et (1 μ M) használtuk. Ezek a gátlószerek irodalmi adatok alapján hatékonyan gátolják a vizsgált fehérjék működését (Allen és mtsai, 2002; van Aubel és mtsai, 2002). A sejtek állapotának vizsgálatához az MTT viabilitási tesztnél érzékenyebb, nem invazív, valós idejű xCELLigence rendszert használtuk. Az ABCC4, ABCG2, vagy mindkét transzporter fehérje működésének egyidejű gátlása sem volt hatással HaCaT sejtek életképességére és proliferációjára. A detektált sejt index értéke minden kezelés esetében folytonos növekedést mutatott, ami zavartalan proliferációra utal. Amikor a sejtek a rendelkezésükre álló teret benövik, a görbék telítésbe futnak (15.a ábra).



15. ábra: HaCaT sejtek (a) és NHK-k (b) valós idejű sejtproliferációs analízise során a sejteket az ABCG2 transzportert specifikusan gátló Ko-134-el (KO, 1 μ M), az ABCC-típusú transzportereket gátló probeneciddel (PRO, 0.5 mM) és a kettő kombinációjával (KO/PRO) kezeltük. Kontrollként a gátlószerek vivőanyagával kezeltük a sejteket (CON). A sejtek állapotát a kezelést követően 72 órán keresztül követtük nyomon. Három független kísérlet átlagát $\pm$ szórás tüntettük fel az ábrákon.

Eredményeink szerint sem a génspecifikus csendesítés, sem az ABCC4 és ABCG2 transzporter fehérjék funkciójának gátlása nem befolyásolta a HaCaT sejtek viabilitását és proliferációját (14.c és 15.a ábra). A HaCaT keratinocita sejtvonal immortalizált jellege miatt azonban fontosnak tartottuk ezen eredmények megerősítését NHK-kban.

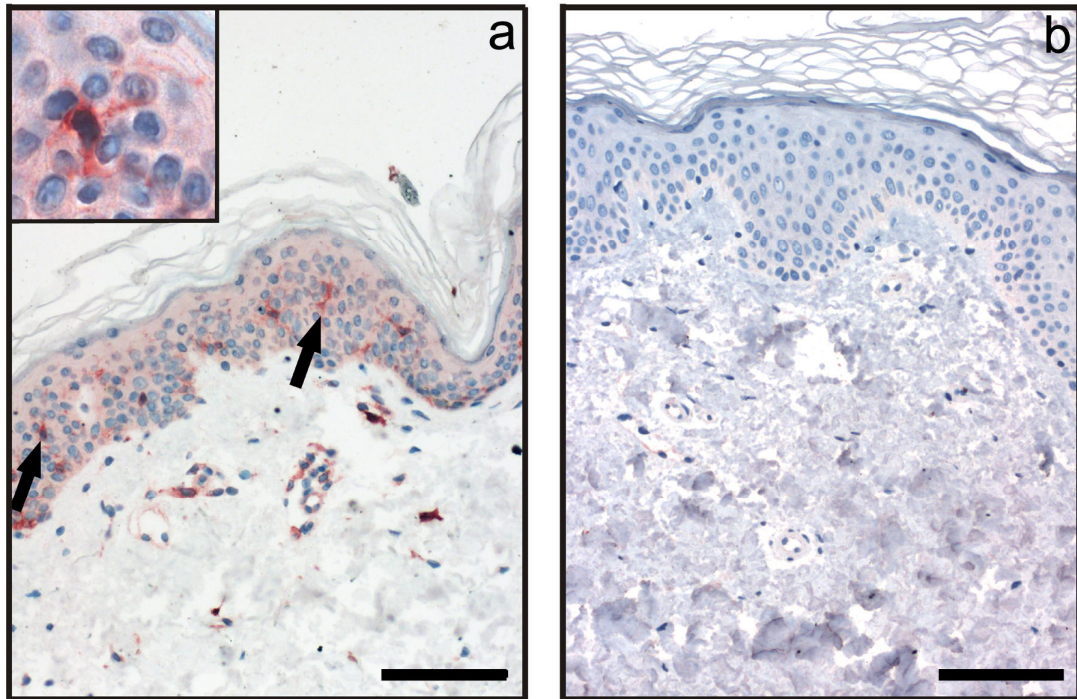
Normál humán keratinocitákat PRO-del, valamint Ko-134-gyel kezeltünk 72 órán keresztül, az ABCC4, az ABCG2, valamint mindkét transzporter egyidejű gátlásának hatását az xCELLigence rendszer segítségével követtük nyomon. A vivőanyagokkal, valamint a Ko-134-gyel kezelt sejtek proliferációjában nem volt kimutatható különbség, a PRO-del való inkubáció azonban jelentősen gátolta a NHK-k osztódását (15.b ábra). Sejtpusztulást ugyan nem tapasztaltunk, hiszen a sejt index nem csökkent, hanem konstans értéket mutatott a kísérlet során PRO kezelés hatására. Fontos megjegyezni, hogy a NHK-kra az immortalizált HaCaT sejtvonalhoz képest lassabb proliferáció jellemző, ezért a sejt index értékek kisebbek NHK-k esetén.

Összefoglalva, az ABCG2 transzporter gátlása nem befolyásolta sem a HaCaT sejtek, sem a NHK-k proliferációját. Az ABCC-típusú xenobiotikum transzporterek funkcióját gátló probenecid azonban megakadályozta a NHK-k osztódását, ez a hatás a HaCaT keratinocita sejtvonalban nem volt megfigyelhető.

5.3. ABCC4 transzporter kifejeződése humán bőrben: terápiás vonatkozások

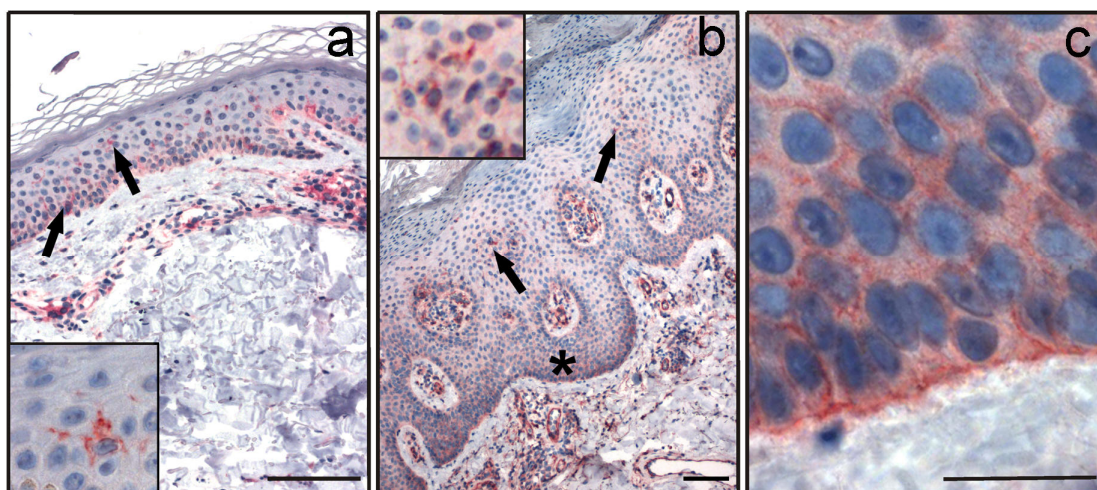
5.3.1. Az ABCC4 transzporter nagymértékben kifejeződik pikkelysömörös epidermiszben

In vitro eredményeinkből arra következtettünk, hogy az ABCC4 transzporter esetleg szerepet játszhat a keratinocita proliferációban. A kísérleteinket kiterjesztettük humán bőrre is. Az ABCC4 transzporter kifejeződését immunhisztokémiai festéssel hasonlítottuk össze egészséges bőrben, valamint a keratinociták hiperproliferációjával is jellemzett pikkelysömörös betegek bőrében az ABCC4. Az ABCC4 immunpozitivitás nem mutatott különbséget az egészséges (16.a, b ábra), valamint pikkelysömörös nem-léziós epidermiszben (17.a ábra), ahol a festődő sejtek elszórtan voltak jelen és dendritikus morfológiát mutattak. Pikkelysömörös léziókban a bazálisan elhelyezkedő, gyorsan proliferáló keratinocita sejtrétegek nagymértékben expresszálták az ABCC4 fehérjét (17.b, c ábra). A szuprabazális sejtrétegekben elszórtan itt is megtalálhatóak voltak a dendritikus morfológiával jellemezhető sejtek. Fontos megjegyezni, hogy a léziós bőrben a dermiszben az erek fala, valamint a nagy számban beszűrődő limfociták is pozitívnak mutatkoztak az ABCC4 transzporterre, ez az egészséges és a nem-léziós dermiszre kevésbé volt jellemző.



16. ábra: ABCC4 transzporter kifejeződésének vizsgálata egészséges bőrben immunfestéssel. **(a)** Az epidermiszben elszórtan található ABCC4 pozitív sejtek dendritikus morfológiát mutatnak (nyilakkal jelölve, a kép sarkában egy ABCC4 fehérjét expresszáló sejt látható az epidermiszből nagyobb nagyításban). **(b)** Izotípus kontroll festés. Skála: 100 μ m.

Az ABCC4 nagymértékű kifejeződése pikkelysömörös léziókban felvetette annak a lehetőségét, hogy xenobiotikum transzporterként képes lehet befolyásolni a betegség tüneti kezelésére alkalmazott egyes gyógyszerek hatékonyságát. Ezért elhatároztuk, hogy a következőkben *in vitro*, HaCaT sejtekben vizsgáljuk, hogy a különböző xenobiotikum transzporterek működésének gátlása hogyan befolyásolja a pikkelysömör terápiájában gyakran használt MTX hatását.



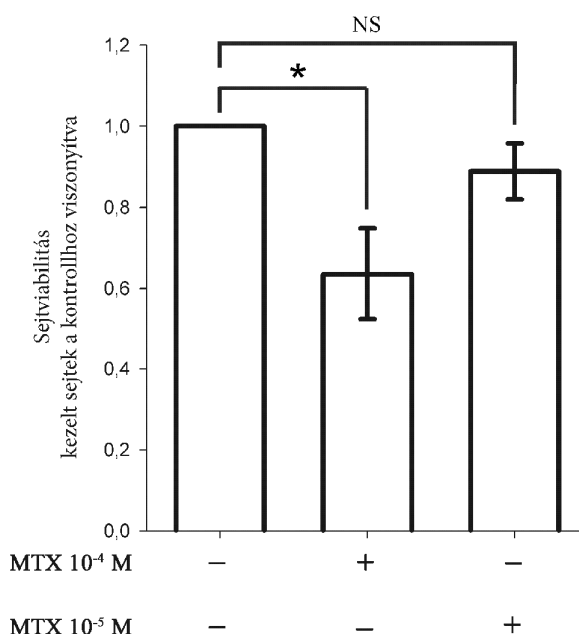
17. ábra: ABCC4 transzporter kifejeződésének vizsgálata pikkelysömörös betegek bőrmintáiban immunfestéssel. Pikkelysömörös nem-léziós (a) és léziós (b) bőrben az epidermiszben elszórtan dendritikus morfológiát mutató sejtek találhatók (nyilakkal jelölve, valamint a sarokban levő képen nagyobb nagyításban) A pikkelysömörös léziókban az epidermisz hiperproliferáló bazális keratinocitáiban jelentős ABCC4 immunpozitivitás látható (csillaggal jelölt rész), kinagyítva ezt a régiót (c) jól megfigyelhető a sejtek membránjára lokalizálódó festődés. Skála: a, b – 100 μm ; c – 25 μm .

5.3.2. A HaCaT keratinociták nagymértékű rezisztenciát mutatnak a rövidtávú, négyórás methotrexát kezelésre

A MTX keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából előkísérleteket végeztünk HaCaT sejteken és NHK-kon, melyek során 72 órán keresztül MTX kezelésnek vetettük alá a sejteket. A NHK-kon a 72 órás kezelés során magas MTX koncentrációk (10^{-5} - 10^{-6} M) esetében sem tapasztaltunk toxikus hatást. HaCaT keratinocitákban az irodalomban leírt, HEK293 sejtek esetében tapasztalt IC_{50} (inhibitory concentration, 50%-os gátlást előidéző koncentráció) értékhez hasonló nagyságrendű eredményt kaptunk (HEK293 $\text{IC}_{50}=2,4 \times 10^{-8}$ (Shafran és mtsai, 2005), HaCaT $\text{IC}_{50} \sim 5 \times 10^{-8}$). A NHK-k esetében tapasztalt rezisztencia a tenyésztésükhöz használt tápfolyadék timidin tartalmának (a gyártó közlése szerint a KC-SFM tartalmaz timidint) volt köszönhető, amelyről ismert, hogy a MTX hatását kivédi (Schwartz és mtsai, 1992). Mivel NHK esetében a tápfolyadék hatása miatt nem vizsgálható a MTX sejtekre gyakorolt hatása, ezért további kísérleteinket HaCaT keratinocitákon végeztük.

Ismert, hogy különböző xenobiotikum transzportereket nagy mennyiségben kifejező sejtvonalak, ugyan érzékenyek a hosszútávú MTX kezelésre, azonban jelentős

mértékű rezisztenciát mutatnak rövid távú, négyórás MTX inkubáció esetén (Hooijberg és mtsai, 1999). Ennek oka, hogy a legtöbb MTX-t kipumpáló xenobiotikum transzporter a sejtben keletkező poliglutamált MTX származékokat már nem képes eltávolítani. 72 órás MTX inkubáció esetén a poliglutamált formák felhalmozódása jellemző. Emellett az *in vitro* rövid távú MTX inkubáció modellként szolgálhat a MTX klinikai gyakorlatban történő alkalmazásához, ahol az antifolátok rövid, pulzus-szerű adagolása jellemző (Maughan és mtsai, 2002).



18. ábra: Négyórás MTX kezelés hatása HaCaT sejtek viabilitásának alakulására. A sejtek életképességét MTT esszével mértük 72 órával a kezelést követően. Három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát±szórás tüntettük fel a grafikonon. Statisztikailag szignifikáns eltérés: *: $p < 0,01$, NS: nem szignifikáns.

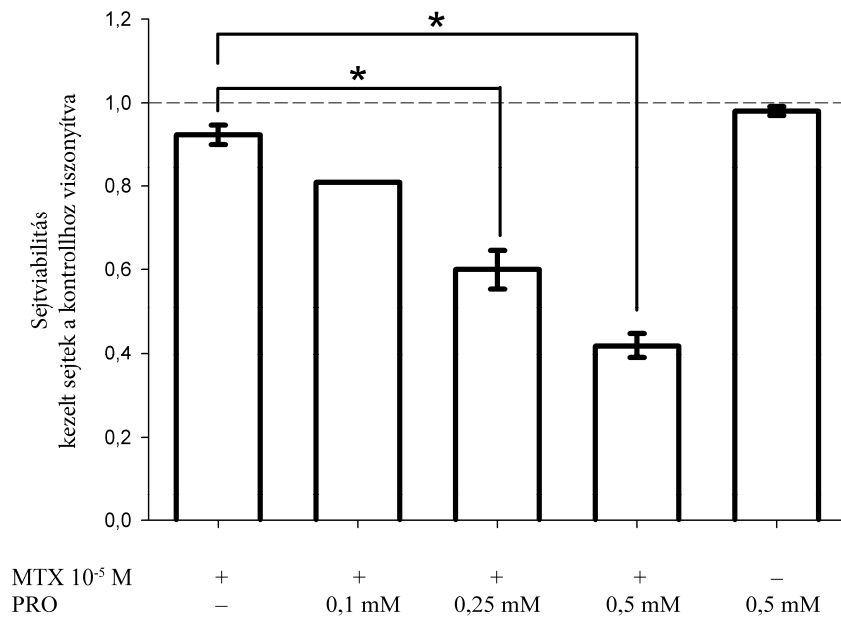
HaCaT keratinocitákban rövid távú, négyórás MTX inkubációt követően három nap elteltével mértük az antifolát sejtvitalitására gyakorolt hatását. Eredményeink azt mutatták, hogy a HaCaT sejtek, amelyek nincsenek szelektálva és nem termelnek túl mesterségesen egyetlen ismert xenobiotikum transzportert sem, nagyfokú rezisztenciát mutatnak négyórás MTX pulzuskezelésre. 10^{-4} M koncentrációjú MTX kezelést követően a sejtek $63,5\% \pm 11,3\%$ -a, míg 10^{-5} M MTX koncentrációval történő kezelés esetén a sejtek több, mint 88%-a életképes maradt (18. ábra). HEK293 sejtek esetében irodalmi adatok alapján a MTX $3,9 \times 10^{-6}$ M koncentrációban, négyórás inkubációt követően a sejtek 50%-ának pusztulását okozza (Shafran és mtsai, 2005). Ehhez képest

a HaCaT sejtek rezisztenciája mintegy két nagyságrenddel nagyobbak bizonyult. A MTX rezisztenciát a különféle xenobiotikum transzporterek működése idézheti elő, amely folyamat során a sejtől a MTX kipumpálásra kerül. Az ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, valamint az ABCG2 transzporterekről ismert, hogy szubsztrátjuk a MTX. A továbbiakban különféle transzporter gátlók HaCaT sejtek rövid távú MTX rezisztenciájára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

5.3.3. Az ABCC típusú transzportereket gátló probenecid jelentős mértékben csökkenti a HaCaT sejtek rövid távú methotrexát rezisztenciáját

A HaCaT sejtekben kifejeződő xenobiotikum transzporterek pumpafunkciója következtében a MTX távozik a sejtől, amely így citotoxikus hatását nem fejtheti ki. Transzporter inhibitorok alkalmazásával azonban a MTX efflux gátolható, ezzel elősegíthető a MTX sejten belüli felhalmozódása.

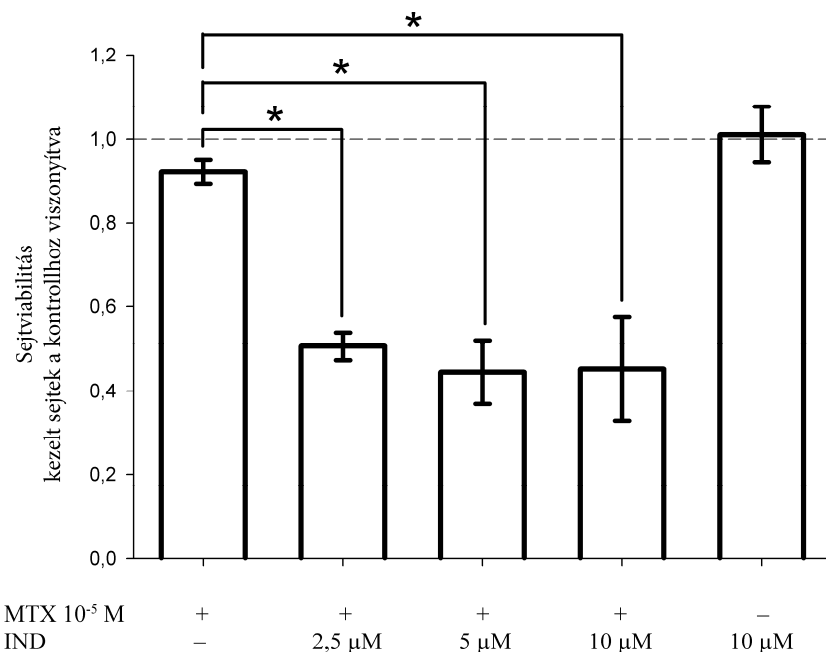
Korábbi eredményeink szerint az ABCC4, valamint az ABCG2 fehérjék magas szinten fejeződnek ki proliferáló HaCaT keratinocitákban. Mindkét proteinről ismert, hogy részt vesz a MTX sejtől való eliminációjában, feltételezésünk szerint ezen transzporterek lehetnek felelősek a HaCaT sejtekben megfigyelt MTX rezisztenciáért. Ennek további vizsgálatára elsőként az ABCC típusú transzporterek egy ismert gátlószerét, a PRO-et alkalmaztuk a HaCaT sejtek MTX kezelése során. A négyórás MTX inkubáció alatt 0,1 mM koncentrációjú PRO kezelés csökkenést okozott a sejtek viabilitásában, a keratinociták mintegy 80%-a maradt életben. A PRO koncentrációt emelve szignifikánsan csökkent a sejtek életképessége MTX kezelés hatására. 0,25 mM koncentrációt alkalmazva a HaCaT sejtek 60%-a maradt életképes, míg a vizsgált legmagasabb, Hooijberg és mtsai által is alkalmazott 0,5 mM PRO koncentrációnál a viabilitás mindössze 42% volt a kontrollhoz viszonyítva (19. ábra). A PRO kezelés önmagában nem befolyásolja a sejtek életképességét, így a toxikus hatás kizárólag a MTX-nak tulajdonítható, amely a gátolt transzporter funkció mellett felhalmozódik a sejtekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy feltehetően valamely ABCC típusú transzporter szerepet játszik a HaCaT keratinociták MTX rezisztenciájában. Ennek további megerősítésére egy másik gátlószerrel is elvégeztük a kísérleteket.



19. ábra: A PRO-del való inkubáció a négyórás MTX kezelés során a feltüntetett koncentrációkban a HaCaT sejtek által mutatott MTX rezisztenciát jelentősen csökkentette. Az MTT esszével mért sejtviabilitást a kontroll mintákéhoz (MTX és PRO vivőanyagávká kezelt) képest adtuk meg (szaggatott vonal). Három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát±szórás tüntettük fel a grafikonon. Statisztikailag szignifikáns eltérés: *: $p < 0,01$.

5.3.4. Az ABCC gátló indomethacin alkalmazása jelentősen csökkenti a methotrexát rezisztenciát

Az indomethacin (IND) ismert gátlószere az ABCC alcsaládnak és egyben az ABCC4 transzporternek is. A nem-szteroid gyulladáscsökkentő szer bizonyítottan csökkenti a humán ABCC1, valamint az ABCC4 transzporter mediálta transzport folyamatokat (Draper és mtsai, 1997; Reid és mtsai, 2003). Kísérletünkben az IND MTX rezisztenciára kifejtett hatását vizsgáltuk HaCaT sejtekben. A PRO-hez hasonlóan az IND kezelés is sikeresen csökkentette a sejtek MTX rezisztenciáját, a PRO-hez képest jóval kisebb koncentrációban is. Már 2,5 μ M IND-t alkalmazva az MTX kezelés során, a sejteknek csupán 50,5%-a maradt életben (20. ábra).

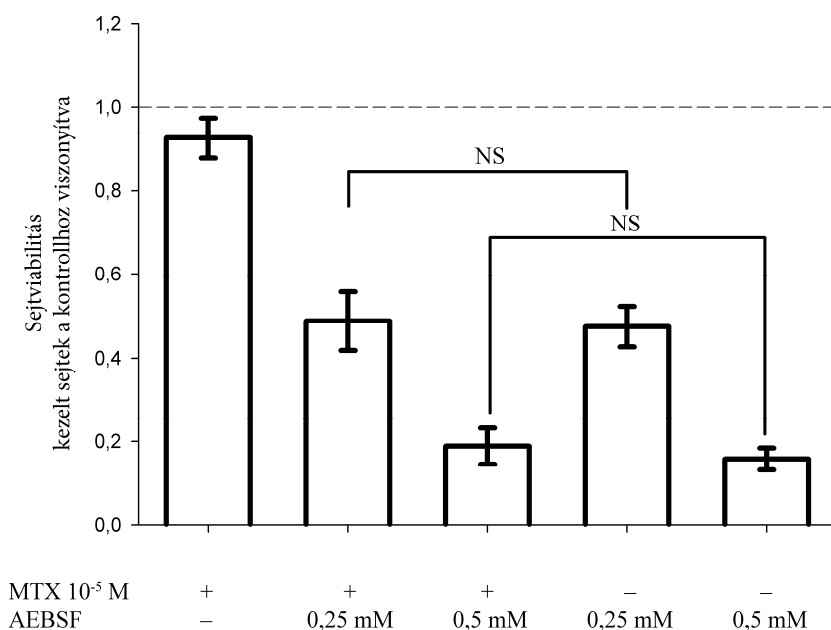


20. ábra: A IND-nal való inkubáció a négyórás MTX kezelés során a feltüntetett koncentrációkban a HaCaT sejtek által mutatott MTX rezisztenciát jelentősen csökkentette. Az MTT esszével mért sejtvitalitást a kontroll mintákéhoz (MTX és IND vivőanyagával kezelt) képest adjuk meg (szaggatott vonal). Három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát±szórás tüntettük fel a grafikonon. Statisztikailag szignifikáns eltérés: *: $p < 0,01$.

5.3.5. Az ABCC4 transzporter specifikus gátlószereként jellemzett 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid toxikus a HaCaT sejtekre

A fentebb leírt eredményeink szerint proliferáló HaCaT keratinocitákban az ABCC4 fehérje magas szintű kifejeződése jellemző, valamint ez a transzporter pikkelysömörös léziók proliferáló bazális keratinocitáiban is nagy mennyiségben van jelen. Ezek alapján az ABCC4 specifikus gátlásával kívántuk tovább vizsgálni a HaCaT sejtek rövid távú MTX kezelésre mutatott rezisztenciáját. ABCC4 fehérjét tartalmazó membrán vezikula preparátumokon történő vizsgálatok során de Wolf és mtsai (2007) arra jutottak, hogy a proteáz inhibitor 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid hidroklorid (AEBSF) a transzporterre specifikus gátló hatással bír. Kísérletünkben a HaCaT sejteket AEBSF kezelésnek vetettük alá, hogy megvizsgáljuk az ABCC4 gátlás hatását a keratinociták MTX rezisztenciájára. Eredményeink azt mutatták, hogy az AEBSF 0,25 mM, illetve 0,5 mM koncentrációban alkalmazva önmagában is toxikus volt a HaCaT sejtekre (21. ábra). Nem találtunk szignifikáns különbséget a sejtek viabilitásában a MTX és az AEBSF kombinációjával, valamint az AEBSF-fel kezelt

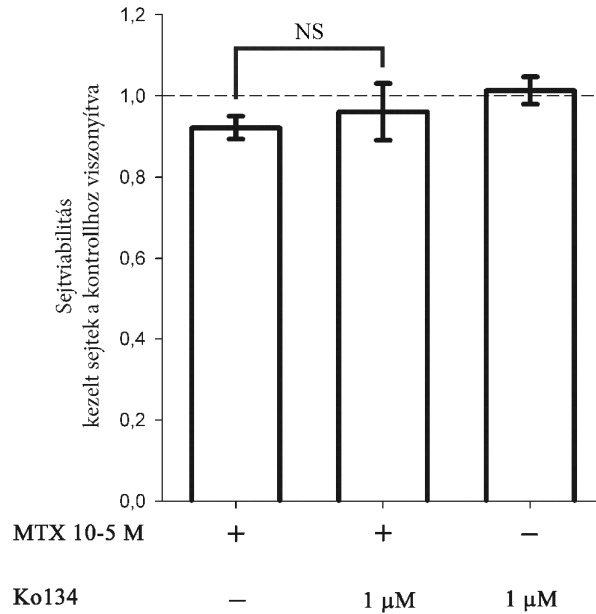
csoportok között, egyik vizsgált koncentrációban sem. Mindebből arra a következtetésre jutottunk, hogy az élő sejtekben az AEBSF transzporter gátló hatása valószínűleg nem mérhető, mivel a szer önmagában nagymértékű toxikus hatással van a HaCaT sejtekre.



21. ábra: Az ABCC4 specifikus inhibitor, az AEBSF alkalmazása a HaCaT sejtek négyórás MTX kezelése során a sejtek jelentős pusztulását eredményezte, ami a gátlószer önmagában kifejtett toxikus hatásának volt köszönhető. A sejtek viabilitását MTT esszével mértük és a kontroll mintákéhoz (MTX és AEBSF vivőanyagával kezelt) képest adtuk meg (szaggatott vonal). Három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát $\pm$ szórás tüntettük fel a grafikonon. NS: nem szignifikáns.

5.3.6. További xenobiotikum transzporterek gátlásának hatása a HaCaT sejtek rövidtávú methotrexát rezisztenciájára

Korábbi kísérleteinkben detektáltuk az ABCG2 transzporter kifejeződését a HaCaT sejtekben, ezért megvizsgáltuk az ABCG2 specifikus gátlószer, a Ko134 MTX transzportra gyakorolt hatását. 1 μ M Ko134 alkalmazása a MTX kezelés során nem befolyásolta a sejtek viabilitását (22. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy az ABCG2 HaCaT sejtekben nem vesz részt számottevő mértékben a MTX transzportjában.

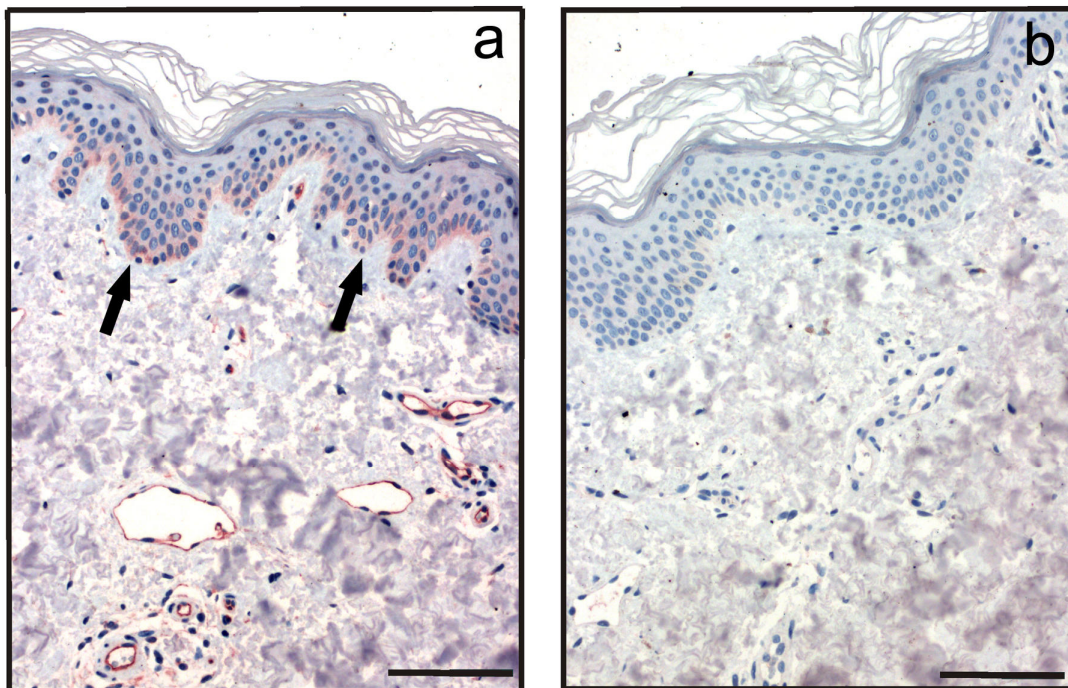


22. ábra: HaCaT sejtekben négyórás MTX kezelés során a Ko-134 ABCG2 specifikus gátlószer alkalmazása nem befolyásolta a sejtek viabilitását. A sejtek viabilitását MTT esszével mértük és a kontroll mintákéhoz (MTX és Ko-134 vivőanyagával kezelt) képest adtuk meg (szaggatott vonal). Három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát±szórás tüntettük fel a grafikonon. NS: nem szignifikáns

5.4. ABCG2 transzporter funkcionális vizsgálata, mint fotodinámiás terápiás támadáspont

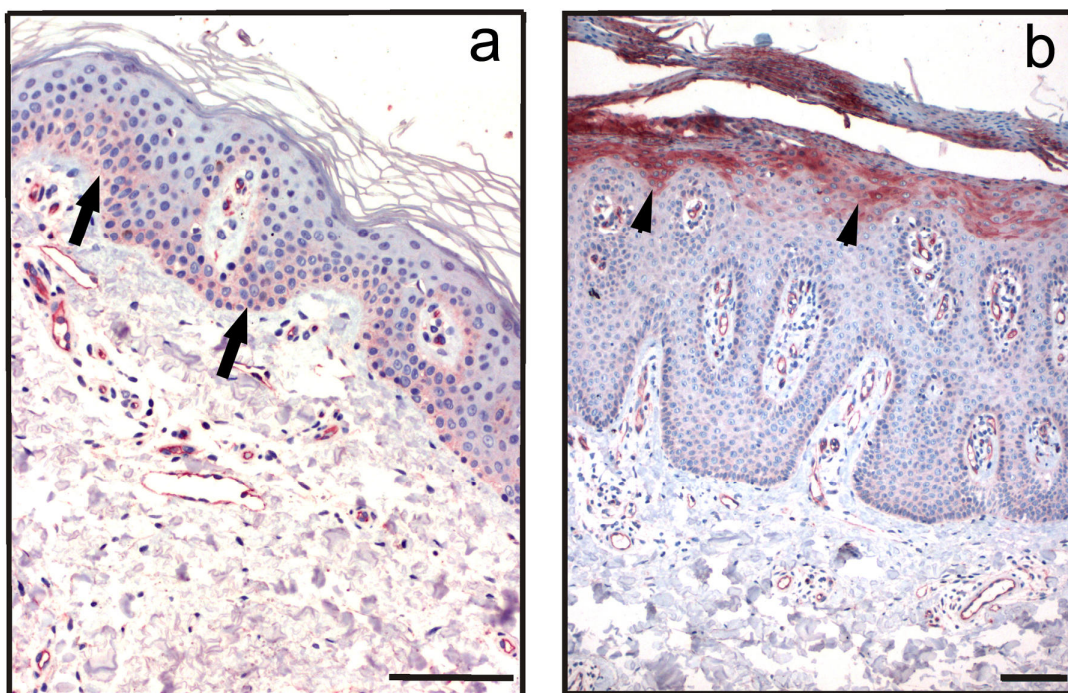
5.4.1. Az ABCG2 transzporter kifejeződése bőrbetegségekben

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az ABCG2 fehérje milyen szerepet játszhat az epidermiszben, ezért megvizsgáltuk a transzporter kifejeződését humán bőrben. Egészséges bőrben ABCG2 specifikus immunhisztokémiai festéssel az interfollikuláris epidermisz bazális keratinocitái mutattak enyhe pozitivitást, szuprabazálisan negatív volt az epidermisz (23. ábra). A dermiszben a follikulusok, a verejtékmirigyek, a faggyúmirigyek, valamint az erek fala festődött számottevő mértékben.



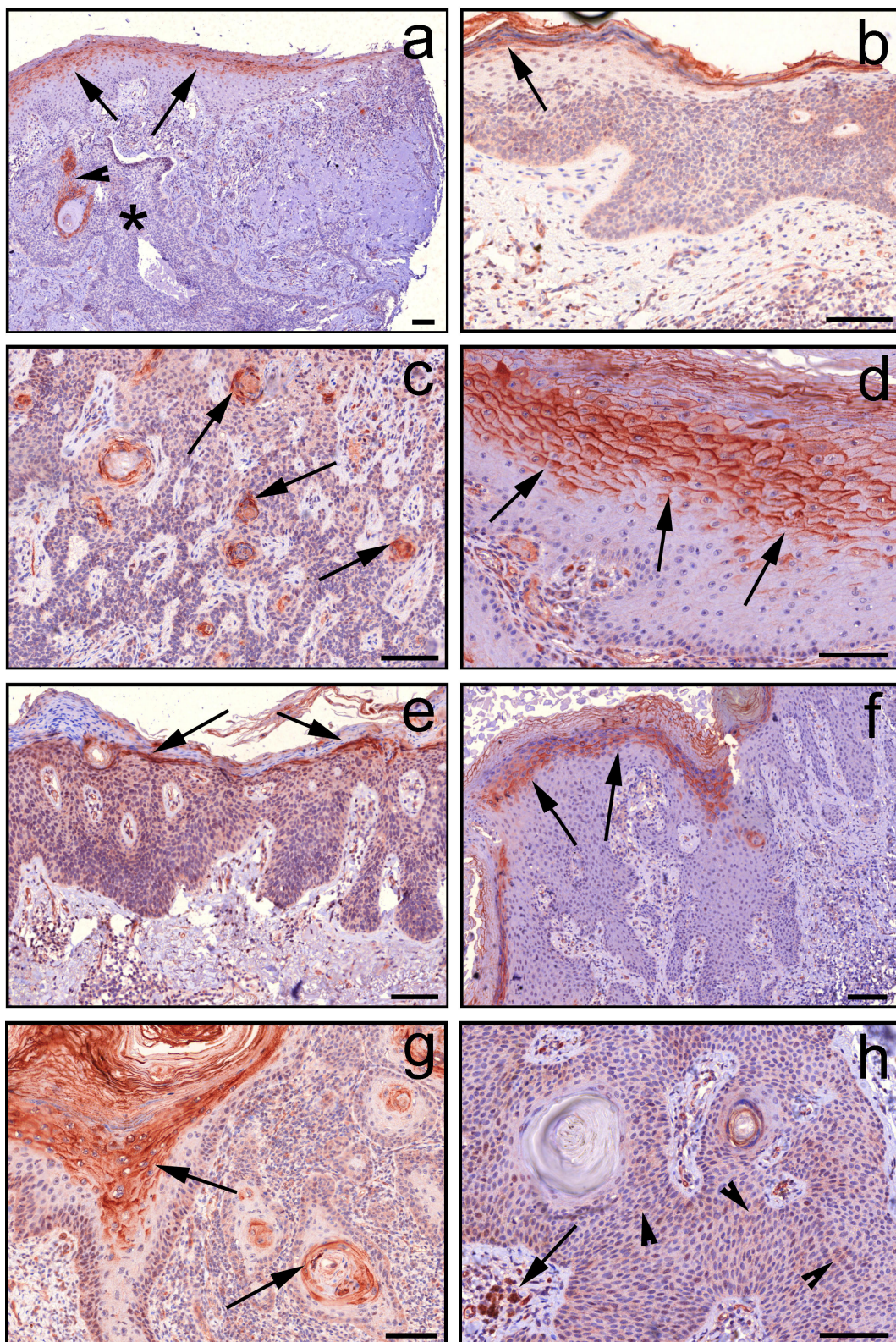
23. ábra: ABCG2 transzporter kifejeződésének vizsgálata egészséges bőrben immunfestéssel. (a) Az epidermiszben a bazális sejtsor keratinocitái mutatnak ABCG2 pozitivitást (nyilakkal jelölve). A dermiszben megfigyelhető az erek falának festődése (b) Izotípus kontroll festés. Skála: 100 μ m.

Ezt követően megvizsgáltuk az ABCG2 fehérje kifejeződését a bőrben különböző bőrgyógyászati kórképek esetén. Elsőként a keratinocita hiperproliferációval is jellemzett pikkelysömörben vizsgáltuk az ABCG2 protein jelenlétét. Pikkelysömörös betegek esetén a léziós területekből vett mintákat ugyanazon személy tünetmentes, nem-léziós bőréhez hasonlítottuk. Az ABCG2 transzporter tekintetében a pikkelysömörös nem-léziós bőr az egészséges bőrhöz hasonló képet mutatott (24.a ábra). A pikkelysömörös léziós epidermiszben nagymértékű ABCG2 fehérje expressziót detektáltunk a szuprabazális rétegekben (24.b ábra). Érdekes módon a hiperproliferáló bazális régióban elhelyezkedő keratinociták kismértékű ABCG2 pozitivitást mutattak. Ezek az eredményeink egybecsengenek az *in vitro* keratinocitákon végzett funkcionális vizsgálataink eredményeivel, amely szerint az ABCG2 transzporter a keratinocita proliferációban nem játszik kiemelkedő szerepet.



24. ábra: ABCG2 transzporter kifejeződésének vizsgálata pikkelysömörös betegek bőr mintáiban immunfestéssel. Pikkelysömörös nem-léziós (a) bőrben az egészséges bőrhöz hasonlóan a bazális keratinociták jelölődnek (nyilak). A pikkelysömörös léziókban (b) a bazális sejtek alig festődnek, azonban szuprabazálisan nagymértékű ABCG2 expresszió figyelhető meg (nyílhegyek). Skála: 100 μ m.

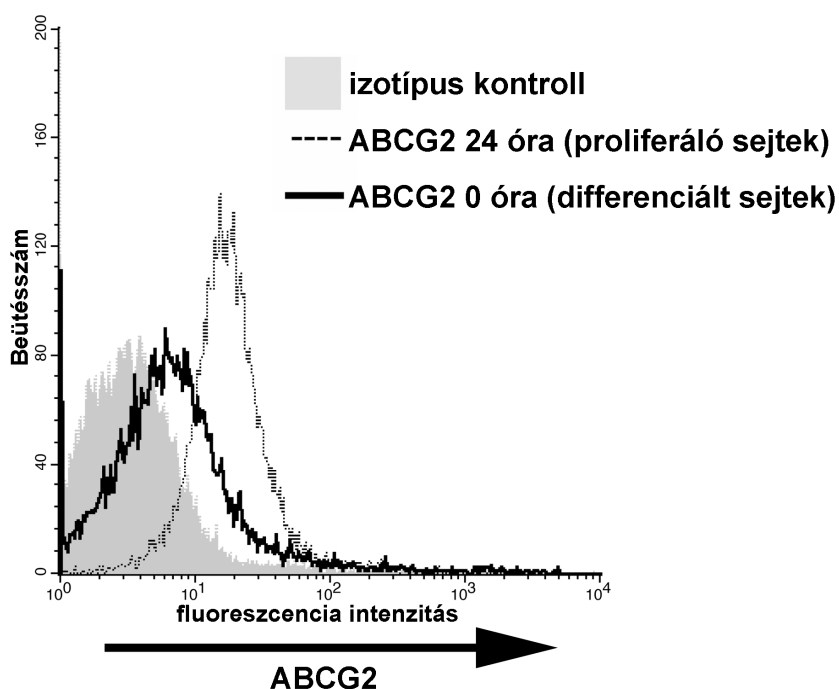
Különféle nem-melanóma típusú bőrtumorokban számos esetben jelentős ABCG2 fehérje felhalmozódást tapasztaltunk. Bazális keratinocitákból kiinduló bazaliómák esetén a tumorsejtek festődése kevésbé volt jellemző, azonban az elváltozás közelében, az epidermiszben szuprabazálisan nagymértékű ABCG2 pozitivitás mutatkozott. Laphám karcinóma, Bowen karcinóma, keratoakantóma, hám hiperplázia esetén a tumorsejteket az ABCG2 fehérje jelentős kifejeződése jellemezte. (25. ábra)



25. ábra: ABCG2 transzporter kifejeződése nem-melanóma típusú bőrelváltozásokban: (a) bazalióma: * - tumorszövet, nyílhegy - festődő keratotikus rész a tumorban, nyíl – tumor környéki ABCG2 pozitív epidermisz (b) szuperficiális bazalióma, (c) bazoskvamózus karcinóma, (d) keratoakantóma, (e), Bowen karcinóma, (f) hám hiperplázia, (g) laphám-karcinóma (b-g) nyíl – festődő tumorsejtek (h) seborrhoeás keratózis: nyílhegy – tumorszövet, nyíl – festődő stróma sejtek. Skála: 100 μ m.

5.4.2. A szabad porfirin felhalmozódása HaCaT sejtekben az ABCG2 funkciójától függ

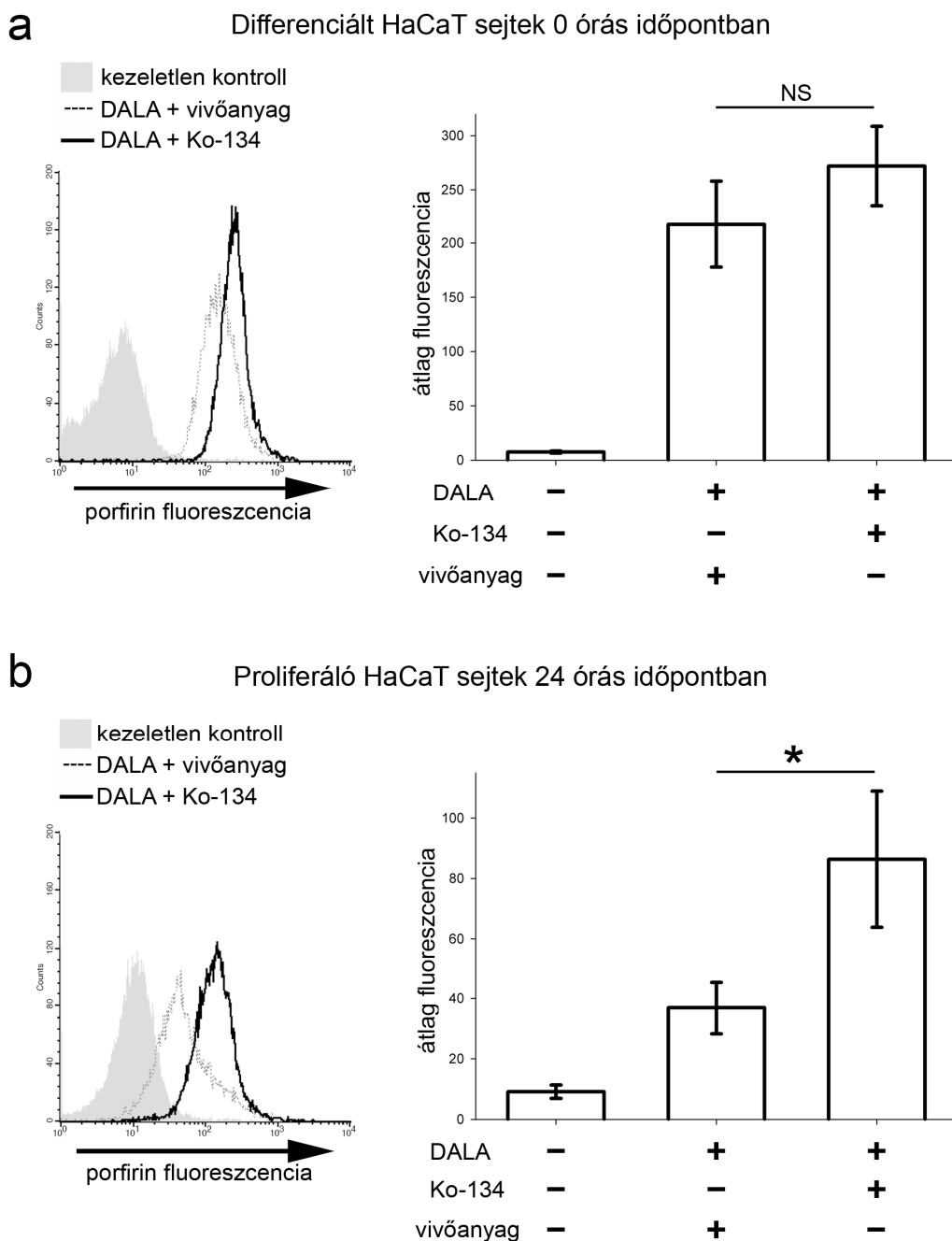
Az ABCG2 transzporter nagymértékben kifejeződik az epidermiszben különböző patológias bőrelváltozásokban, mint például a bazalióma körülöttei epidermiszben, valamint a laphám karcinómában. Ezen betegségek gyógyításában fontos szerepe van a fotodinámiás terápiának. Az ABCG2 fehérjéről ismert, hogy közreműködik a porfirinek sejtekből való kipumpálásában. Ez a kísérlet felveti annak a lehetőségét, hogy az ABCG2 fehérje szerepet játszhat a fotodinámiás terápia hatékonyságának javításában, mint lehetséges célmolekula. Ennek a hipotézisnek a modellezésére *in vitro* PDT kísérletet terveztünk HaCaT keratinociták felhasználásával. A sejteket DALA-val kezeltük, amely az intracelluláris szabad porfirinszintet jelentősen megnöveli. Négyórás 1 mM DALA előkezelést követően a sejtek porfirin tartalmát áramlási citometria segítségével határoztuk meg.



26. ábra: Proliferáló és differenciált HaCaT sejtekben a plazmamembránon található ABCG2 fehérje mennyiségének vizsgálata áramlási citométerrel.

Megvizsgáltuk az összefüggést a HaCaT keratinociták ABCG2 expressziója, valamint a felhalmozódó porfirin mennyisége között. Korábbi kísérleteink alapján tudtuk, hogy szinkronizált HaCaT sejtekben az ABCG2 xenobiotikum transzporter csak igen kismértékben fejeződik ki a differenciált keratinocitákban, míg mind mRNS, mind fehérje szinten jelentősen indukálódik a proliferáló keratinocitákban. A

plazmamembránban található ABCG2 fehérje mennyiségét is megmértük áramlási citometriával, ugyanis az itt található transzporter képes a porfirinek sejtől való eltávolítására. Huszonnég órával a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követően a proliferáló HaCaT sejtek plazmamembránjának ABCG2 szintje is jelentősen emelkedik a differenciált keratinocitákat reprezentáló 0 órás mintához képest (26. ábra).

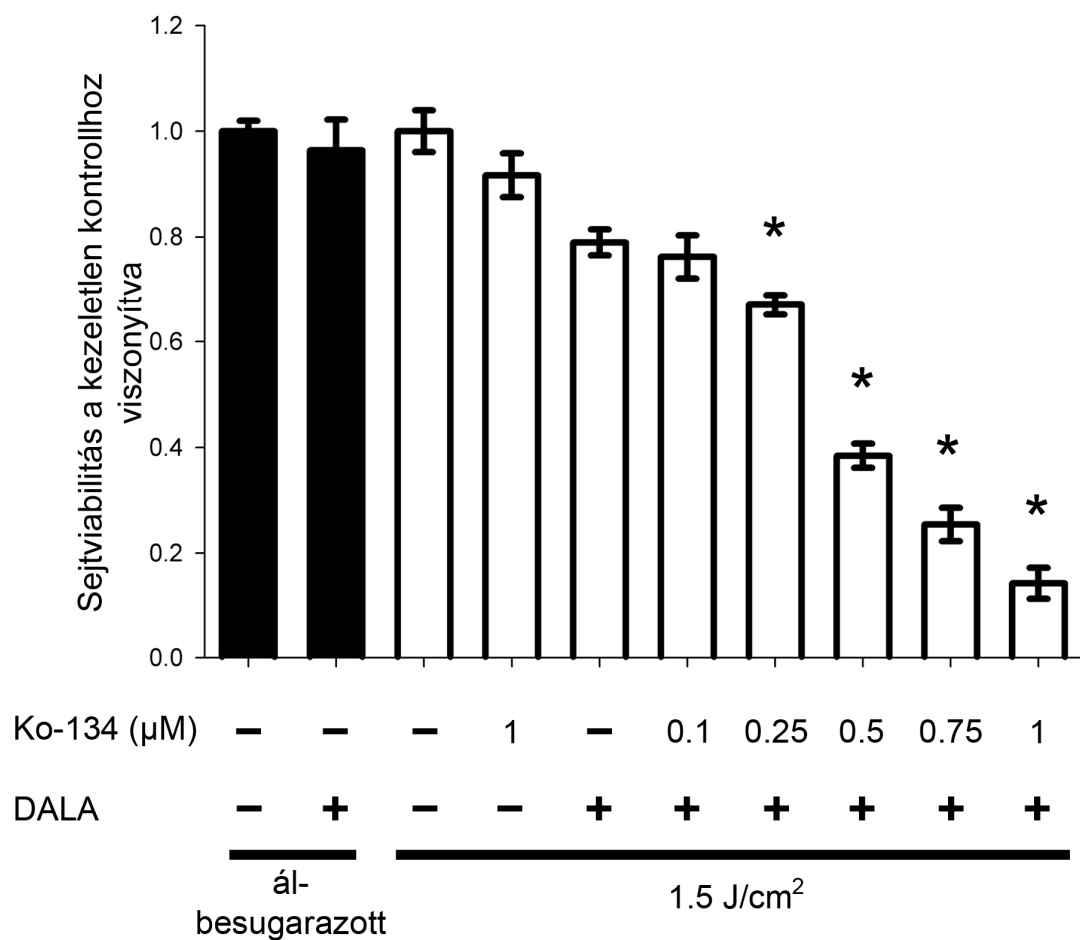


27. ábra: DALA-indukált porfirin felhalmozódás mérése áramlási citometriával differenciált (a) és proliferáló (b) HaCaT sejtekben. Négyórás DALA kezelést követően mértük a sejtek porfirin tartalmát. Az ABCG2 transzporter szerepét az intracelluláris porfirin felhalmozódásban a DALA kezelés során alkalmazott specifikus ABCG2 gátlószerrel (1 μ M Ko-134) vizsgáltuk. Reprezentatív hisztogramokat, valamint három független kísérlet átlagát $\pm$ SEM ábrázoltuk. NS: nem szignifikáns, *: $p < 0.05$.

Összehasonlítottuk a DALA kezelést követően felhalmozott porfirin szinteket szinkronizált HaCaT sejtekben differenciált és proliferáló állapotokban. A nagymértékben differenciálódott 0 órás mintákban mintegy 7,5-szerese volt a porfirin mennyiség a 24 órás proliferáló sejteket tartalmazó mintákhoz képest. Megfigyeltük azt is, hogy az ABCG2 fehérje funkcióját Ko-134-gyel specifikusan gátolva a 4 órás DALA kezelés során a differenciált keratinocitákban nem volt szignifikáns porfirin szint változás (27.a ábra), míg a proliferáló sejtekben nagy mennyiségben kifejeződő ABCG2 transzportert Ko-134 kezeléssel gátolva a keratinociták porfirin tartalma jelentős emelkedést mutatott (27.b ábra). Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az ABCG2 transzportert expresszáló keratinociták jobban ellenállnak a porfirin közvetítette PDT-nak, ez azonban kiküszöbölhető a fehérje nem-toxikus és specifikus gátlószerének, a Ko-134-nek a segítségével.

5.4.3. A fumitremorgin C nem toxikus származéka, a Ko-134 nagy hatékonysággal növeli a keratinociták *in vitro* fotodinámiás terápiára való érzékenységét

HaCaT sejtek felhasználásával egy *in vitro* PDT modellben vizsgáltuk az ABCG2 specifikus gátlásának hatékonyságát a sejtek porfirin közvetítette fényérzékenységre. Előkísérletekben határoztuk meg az optimális dózist. Egy nappal az Aktelite PDT készülékkel történő $1,5 \text{ J/cm}^2$ dózisú besugárzást követően a 4 órás DALA előkezelésen átesett, jól proliferáló HaCaT sejtek 78,9%-a maradt élve az MTT viabilitási teszt alapján. Ennél a dózisonál tehát már látszott a PDT kezelés hatása a porfirinnal érzékenyített sejteken, de a nagy részük túlélte a kezelést. Ezután a DALA előkezeléssel együtt az ABCG2 specifikus gátlószerével, Ko-134-gyel is kezeltük a sejteket. Eredményeink szerint a Ko-134 kezelés dóziszfüggő módon növelte a DALA-val előkezelt HaCaT sejtek érzékenységét a PDT kezelésre (28. ábra).



28. ábra: Az ABCG2 transzporter specifikus gátlása növeli a PDT hatékonyságát HaCaT sejteken. Négyórás DALA előkezelést követően a sejteket PDT lámpával besugaraztunk $1,5 \text{ J/cm}^2$ dózisban. A Ko-134 alkalmazása a feltüntetett koncentrációkban növelte a sejtek érzékenységét a fénykezelésre, kontrollként minden esetben a szer vivőanyagát (DMSO) használtuk. A sejtek viabilitását MTT esszével mértük 24 órával a besugarazást követően. A grafikonon három független kísérlet átlaga $\pm$ szórás látható. *: $p < 0,01$.

6. Diszkusszió

A tumorsejtek számára széleskörű kemoterápiás gyógyszer rezisztenciát biztosító xenobiotikum transzporterek igen alapos kutatás tárgyát képezték az elmúlt közel negyed évszázadban. Azonban számos eredmény utalt arra, hogy ezen fehérjék szerepe túlmutat a multidrog rezisztencia jelenségén. Az elmúlt időszakban rengeteg adat halmozódott fel a xenobiotikum transzporterek fiziológiás funkcióiról (Leslie és mtsai, 2005), az epidermiszben jelenlevő transzporter fehérjékről azonban kevés információ áll rendelkezésre. Az ABC fehérjecsaládba tartozó xenobiotikum transzporter gének expressziójának szisztematikus vizsgálatát végeztük el két *in vitro* keratinocita proliferációs-differenciációs modell rendszerben. A laborunkban korábban jellemzett szinkronizált HaCaT sejteken alapuló modell mellett egy NHK terminális differenciációt modellező rendszert is karakterizáltunk. A NHK differenciációs programját a teljes konfluencia során létrejövő sejt-sejt kapcsolatok és megnövelt extracelluláris Ca^{2+} koncentráció által aktiváltuk. Korábbi irodalmi adatok szerint a magas külső Ca^{2+} szint a keratinocita tenyészetek differenciálódását idézi elő (Hennings és mtsai, 1980; Yuspa és mtsai, 1989; Tu és mtsai, 2001). *In vivo* eredmények alapján az epidermiszben egy Ca^{2+} grádiens van jelen, amely a differenciálódó rétegek irányában egyre emelkedik, a legmagasabb Ca^{2+} koncentráció a *stratum corneum* magasságában detektálható (Vicanova és mtsai, 1998). Azt, hogy a Ca^{2+} elengedhetetlen a NHK differenciációjához mindeddig nem sikerült minden kétséget kizáróan bizonyítani, sőt egyes közelmúltban napvilágot látott adatok alapján a sejt-sejt kapcsolatok nagyobb jelentőséggel bírnak a keratinocita differenciációs program aktiválásában, mint a külső Ca^{2+} szint (Kolly és mtsai, 2005). A csoportunk által beállított *in vitro* NHK differenciációs modell validálásához a Ki67 és ITGA5 proliferációs marker gének és a KRT1 és INV differenciációs marker gének expressziós változásait követtük nyomon. Eredményeink összhangban vannak a Kolly és mtsai (2005) által közöltekkel, miszerint a keratinociták terminális differenciációs programjának inicializálásában a külső Ca^{2+} nem meghatározó tényező. Az általunk használt NHK differenciációs modellben detektált xenobiotikum transzporter expressziós eredményeink nagy vonalakban megegyeznek az irodalmi adatokkal, azonban néhány különbség is mutatkozott. Kielet és mtsai (2003) szerint az ABCC1, ABCC3 és ABCC4 gének indukálódtak, míg az ABCG2 gén expressziója nem változott differenciálódó keratinocitákban. Ezek az

eltérések feltehetően a felhasznált *in vitro* modell különbözőségéből következnek. Igaz ugyan, hogy mind a két modell alapja a sejtek differenciációs programjának a megemelt Ca^{2+} koncentráció általi aktiválása, azonban Kielar és munkatársainak modelljében a sejtek a passzálást követően azonnal magas Ca^{2+} tartalmú tápba kerültek, az általunk alkalmazott rendszerben ez csupán a teljes konfluencia határán levő sejtek esetén következett be. A sejt-sejt kölcsönhatások így nagyobb szerephez jutottak az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben.

Mindkét általunk használt modellben – HaCaT sejtek és NHK-k esetén is – az ABCC4 és ABCG2 fehérjék expressziójának alakulása hasonló a génexpressziós szintek változásaihoz. Más sejtípusokban is megfigyeltek ehhez hasonló eredményeket, amelyek az ABCC4 (Sassi és mtsai, 2008; Copsel és mtsai, 2011) és az ABCG2 (Krishnamurthy és Schuetz, 2006; Chen és mtsai, 2010) transzporterek, valamint a sejtek proliferációja közötti összefüggésre utalnak.

Az ABCC4 és ABCG2 gének transzkripciók aktivitásában nagymértékű hasonlóság mutatkozott mindkét általunk használt kísérleti rendszerben. Az ABCG2 gén részletes promoter analízisét Bailey-Dell és mtsai (2001) végezték el. Mind az ABCC4, mind az ABCG2 esetében azonosítottak ún. „*xenobiotic responsive*” elemeket, amelyek az aril-hidrokarbon receptor nevű transzkripciók faktor irányítása alatt állnak, ismert, hogy ennek a fehérjének a stressz szignalizációban van fontos szerepe (Tompkins és mtsai, 2010; Xu és mtsai, 2010).

Funkcionális vizsgálataink adatai szerint az immortalizált HaCaT sejtek proliferációjához sem az ABCC4, sem az ABCG2 transzporter közreműködése nem elengedhetetlen. Azt is bizonyítottuk, hogy az ABCG2 funkciójának gátlása NHK-ban sem befolyásolta a sejtosztódást. Chen és mtsai (2010) azt találták, hogy az ABCG2 szerepet játszik az A549 és az MCF7/MX tumoros sejt vonalak sejt ciklusának alakításában, ez arra utalhat, hogy a normál, vagy immortalizált sejtektől eltérően a tumoros sejtek proliferációjában lehet szerepe a fehérjének. Az ABCC-típusú transzporterek PRO-del való gátlása azonban a NHK-k proliferációját szinte teljes mértékben megakadályozta. Ez összefügg Sassi és mtsai (2008) eredményeivel, miszerint az ABCC4 alapvető fontosságú a patkány simaizomsejtek osztódásában, még hozzá a cAMP másodlagos hírvivő molekula intracelluláris szintjének befolyásolásával. A HaCaT sejt vonal immortalizált jellege hatással lehet a sejt proliferációt irányító szignalizációs útvonalakra, amely megmagyarázhatja a PRO-re mutatott csökkent érzékenységet.

A xenobiotikum transzporterek – köztük az általunk részletesen vizsgált ABCC4 és ABCG2 – szubsztrátok széles skáláját képesek a sejtekből eltávolítani, ezek között számos bőrgyógyászatban is alkalmazott gyógyszermolekula található. Fontos tehát a transzporterek vizsgálata egészséges humán bőrben, valamint különböző betegségek által érintett bőrtületeken is.

Immunhisztokémiai vizsgálataink eredménye szerint az ABCC4 fehérje az epidermiszben a dendritikus morfológiájú sejtekben mutatott pozitivitást. Az ABCC4 transzporter expresszióját néhány évvel ezelőtt írták le epidermális Langerhans sejtekben, ahol fő funkciója a sejtek migrációjához kapcsolódott (van de Ven és mtsai, 2008). Pikkelysömörös betegek léziós epidermiszében azonban a hiperproliferáló bazális keratinocitákban is kimutattuk az ABCC4 jelenlétét. Ez egyrészt alátámasztja azokat az ABCC4 sejtproliferációval kapcsolatos szerepére vonatkozó *in vitro* megfigyeléseinket, másrészt felveti annak a lehetőségét, hogy a pikkelysömör terápiájában használt MTX hatékonyságának befolyásolásához hozzájárulhat az ABCC4 transzporter. Az ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, és ABCC5, valamint az ABCG2 ismert tagjai a MTX efflux rendszernek (Hooijberg és mtsai, 1999; Chen és mtsai, 2002; Volk és Schneider, 2003; van der Heijden és mtsai, 2007). *In vitro* vizsgálataink HaCaT sejteken azt mutatták, hogy az ABCC típusú transzporterek szükségesek a MTX rezisztenciához. Az IND-vel végzett vizsgálataink alátámasztják azokat az eredményeket miszerint az MTX-al gyakran kombinációban alkalmazott nem-szteroid gyulladásgátlók, köztük az IND is, jelentősen befolyásolhatják a MTX farmakokinetikáját (El-Sheikh és mtsai, 2007). Az ABCG2 szerepéről ellentmondásos eredményeket közöltek arra vonatkozóan, hogy a vad típusú, vagy az R482G aminosav cserét hordozó fehérjének jobb szubsztrátja-e a MTX (Volk és Schneider, 2003; Shafran és mtsai, 2005). Az általunk vizsgált rendszerben az ABCG2 specifikus gátlása nem befolyásolta a HaCaT sejtek MTX rezisztenciáját. Az ABCC4 transzporter egy szelektív gátlószerének alkalmazásával vizsgáltuk, hogy ez a fehérje hogyan járul hozzá a HaCaT keratinociták MTX rezisztenciájához. Amíg azonban az AEBSF membrán vezikula preparátumokon az ABCC4 fehérje működését szelektíven gátolta (de Wolf és mtsai, 2007), eredményeink szerint élő sejteken a gátlószernek erőteljes toxikus hatása jelentkezett. Ezért további kísérletekre ezt a szert nem tudtuk felhasználni rendszerünkben.

Az ABCG2 fehérje bőrben való eloszlását tanulmányozva megfigyeltük, hogy az epidermiszben különböző bőrbetegségek által érintett területeken a fehérje expressziója

jelentősen indukálódik. Ennek egyik magyarázata lehet a kóros folyamatok kísérőjelensége, a sejtekre ható jelentős stressz. Az ABCG2 gén promoterében számos funkcionális *cis*z elemet találtak, például a hipoxia indukálható transzkripció faktor 1 (HIF1) által regulált „*hipoxia responsive*” elemet, és az aril-hidrokarbon receptor által szabályozott „*xenobiotic responsive*” elemet (Krishnamurthy és mtsai, 2004; Tompkins és mtsai, 2010). Mindkét transzkripció faktor kapcsolatba hozható különböző stressz szignalizációs útvonalakkal. A tumorok mikrokörnyezete, valamint számos betegség esetén az érintett sejtek stressz faktorok széles skálája által befolyásolt terület.

Nemrégiben derült fény arra, hogy az ABCG2 fehérje a hem-efflux transzporterek egyike, amely különböző stresszhatások során a sejteket megvédi a toxikus porfirinek felhalmozódásától (Latunde-Dada és mtsai, 2006; Krishnamurthy és mtsai, 2007). Az ABCG2 transzporter magas szintű kifejeződése jelentősen csökkenti a PPIX mennyiségét ABCG2 transzfektált HEK293 sejtekben, ezzel szemben egyéb multidro g rezisztencia asszociált xenobiotikum transzporterek esetében viszont nem figyeltek meg ilyen hatást (Robey és mtsai, 2005). Kimutatták, hogy az ABCG2 fontos szerepet játszik az egerek porfirin homeosztázisában, mivel a porfirinben gazdag étrenden tartott ABCG2 *knock-out* egerek vörösvértestjeiben jelentősen emelkedik a porfirin típusú molekulák szintje (Jonker és mtsai, 2002). Az ABCG2 fehérje tehát kulcsfontosságú lehet a porfirin alapú terápiás és diagnosztikus alkalmazásokban, ezért ez egy igen intenzíven kutatott terület (Ishikawa és mtsai, 2010).

Az ABCG2 fehérje kifejeződése irodalmi adatok, valamint saját eredményeink alapján is a bazális keratinocitákra jellemző mind a humán (Triel és mtsai, 2004), mind az egér epidermiszben (Yano és mtsai, 2005). Egészséges humán bőr *ex vivo* tenyésztése során a DALA-val inkubált mintákban jelentkező porfirin autofluoreszcencia a szuprabazális sejtekben volt megfigyelhető, a bazális sejtek nem halmoztak fel porfirineket (Smits és mtsai, 2009). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ABCG2 szerepet játszik a keratinociták porfirin homeosztázisában, és befolyásolhatja, hogy a sejtek milyen mértékben képesek porfirinek kipumpálására *in vivo*. Egér keratinocita tenyészetben kimutatták, hogy a sejtek differenciációs állapotától is függ a PPIX intracelluláris felhalmozódása (Ortel és mtsai, 1998). Ezzel összhangban vannak azok az eredményeink, amelyek szerint az ABCG2 fehérje kifejeződésében megfigyelt különbség proliferáló és differenciált HaCaT sejtekben arányos a DALA előkezelést követően felhalmozott porfirin mennyiségével. Anand és mtsai (2009) közölték, hogy az alacsony dózisú MTX kezelés növeli a PDT hatékonyságát SCC13 és A431

epidermális karcinóma sejtekben. A MTX az ABCG2 transzporter egy ismert, bár nem túl jó szubsztrátja, de elképzelhető, hogy interferál az ABCG2 közvetítette porfirin transzporttal.

A PDT egy klinikailag széles körben alkalmazott kezelési lehetőség főként a nem-melanóma típusú bőrtumороknál (Choudhary és mtsai, 2009; Sidoroff és Thaler, 2010). Számos klinikai kísérlet hozott biztató eredményeket a PDT felhasználásáról különböző bőrelváltozások gyógyításában, például súlyos akne (Riddle és mtsai, 2009) és kután T-sejtes limfóma (Zane és mtsai, 2006) esetében. A PDT legfontosabb lépései a betegség által érintett szövet kezelése a fotoszenzitivizáló anyaggal, majd annak felhalmozódása után a célsejtek elpusztítása látható fény besugárzással. Mindeddig egy részletes vizsgálat ismert, amelyben az ABCG2 fehérje szerepét vizsgálták a különböző fényérzékenyítők sejtekből való eltávolításában, az eredmények szerint az ABCG2 transzporter jelentős hatással lehet a PDT hatékonyságára (Robey és mtsai, 2005). A szerzők egy, az ABCG2 fehérjét túltermelő sejtvonalat használtak, és egy 100 W teljesítményű halogén lámpával végezték a fénykezelést. ABCG2 gátlási kísérletekben a transzporter funkcióját fumitremorgin C segítségével blokkolták, amelyről ismert, hogy egérben neurotoxikus mellékhatásokat idéz elő. Robey és mtsai (2005) tehát igen értékes eredményekről számoltak be, azonban igen fontosnak találtuk, hogy eredményeik kiegészítésre kerüljenek, és a PDT-re közvetlenül értelmezhetőek legyenek. Munkánk során a HaCaT keratinocita sejtvonalat használtuk, amely az ABCG2 fehérjét sem transzfekció, sem szelekció útján nem túltermelő sejtvonal. Az általunk beállított *in vitro* PDT modellben terápiásan elfogadott fényforrást (Aktilite PDT lámpa) használtunk, amely szűk hullámhossz tartományban, a porfirinek specifikus gerjesztésére alkalmas, 635 nm emissziós csúcsú vörös fényt emittál. A specifikus ABCG2 gátlást lehetővé tevő Ko-134 alkalmazásával nyert adataink szerint már igen kis mennyiségben adagolva is jelentősen növelte az *in vitro* PDT hatékonyságát. A Ko-134 orális vagy intraperitoneális adagolásakor a kísérleti egerekben nem figyeltek meg neurotoxikus tüneteket, a Robey és mtsai által is alkalmazott fumitremorgin C-vel ellentétben (Allen és mtsai, 2002).

In vitro vizsgálataink eredményei tehát arra utalnak, hogy a DALA előkezelés során alkalmazott Ko-134 szignifikáns mértékben csökkentheti a besugárzási dózist is, ami a PDT során jelentkező nem kívánatos hatásokat csökkentheti. Eredményeink felhasználhatóak a PDT humán bőr léziók kezelésében mutatott hatásának további javításához. Összefoglalva, az ABCG2 működését gátló, nem mérgező, specifikus

inhibitorok, mint például a Ko-134 nagyon hasznosak lehetnek a bőr, vagy akár belső szervek PDT kezelésének további fejlesztése szempontjából.

Eredményeinkből összességében azt a következtetést vontuk le, hogy indokolt a xenobiotikum transzporterek szerepének további kutatása bőrben, valamint az egyes transzporterekre szelektív gátlószerek fejlesztése is kiemelt fontosságú feladat, hiszen ezek a molekulák a bőrgyógyászatban is hasznosítható, terápiás hatékonyságot befolyásoló tényezők.

Irodalomjegyzék

- Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J. H. M., Koomen, G. J., Schinkel, A. H. (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* **1**: 417-425.
- Anand, S., Honari, G., Hasan, T., Elson, P., Maytin, E. V. (2009) Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **15**: 3333-3343.
- Bailey-Dell, K. J., Hassel, B., Doyle, L. A., Ross, D. D. (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta* **1520**: 234-241.
- Baron, J. M., Holler, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H. F., Jugert, F. K. (2001) Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**: 541-548.
- Borst, P., Elferink, R. O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**: 537-592.
- Bos, J. D. (2007) Psoriasis, innate immunity, and gene pools. *J Am Acad Dermatol* **56**: 468-471.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**: 761-771.
- Bowcock, A. M., Krueger, J. G. (2005) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* **5**: 699-711.
- Chandran, V., Raychaudhuri, S. P. (2010) Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun* **34**: J314-J321.
- Chen, Z., Liu, F., Ren, Q., Zhao, Q., Ren, H., Lu, S., Zhang, L., Han, Z. (2010) Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *Int J Cancer* **126**: 841-851.
- Chen, Z. S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R. B., Kuwano, M., Zeng, H., Kruh, G. D. (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* **62**: 3144-3150.
- Choi, C. H. (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* **5**: 30-42.

- Choudhary, S., Nouri, K., Elsaie, M. L. (2009) Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci* **24**: 971-980.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R. G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**: 1650-1654.
- Commandeur, J. N., Stijntjes, G. J., Vermeulen, N. P. (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev* **47**: 271-330.
- Copsel, S., Garcia, C. I., Diez, F., Vermeulen, M., Baldi, A., Bianciotti, L. G., Russel, F. G., Shayo, C., Davio, C. (2011) Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*
- de Wolf, C. J., Yamaguchi, H., van, d. H., I, Wielinga, P. R., Hundscheid, S. L., Ono, N., Scheffer, G. L., de, H. M., Schuetz, J. D., Wijnholds, J., Borst, P. (2007) cGMP transport by vesicles from human and mouse erythrocytes. *FEBS J* **274**: 439-450.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**: 1156-1166.
- Dietrich, C. G., Geier, A., Oude Elferink, R. P. (2003) ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* **52**: 1788-1795.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, D. D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15665-15670.
- Draper, M. P., Martell, R. L., Levy, S. B. (1997) Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *Br J Cancer* **75**: 810-815.
- El-Sheikh, A. A. K., van den Heuvel, J. J. M. W., Koenderink, J. B., Russel, F. G. M. (2007) Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-Mediated Methotrexate Transport. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: 229-235.
- Gaál, M., Gyulai, R., Baltás, E., Kui, R., Oláh, J., Kemény, L. (2007) Fotodinámiás terápia a bőrgyógyászatban. *Orv Hetil* **148**: 2227-2233.
- Guengerich, F. P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**: 611-650.
- Gutmann, H., Miller, D. S., Droulle, A., Drewe, J., Fahr, A., Fricker, G. (2000) P-glycoprotein- and mrp2-mediated octreotide transport in renal proximal tubule. *Br J Pharmacol* **129**: 251-256.

- Hebert, H. L., Ali, F. R., Bowes, J., Griffiths, C. E., Barton, A., Warren, R. B. (2011) Genetic Susceptibility to Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Implications for Therapy. *Br J Dermatol*
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., Yuspa, S. H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**: 245-254.
- Homolya, L., Varadi, A., Sarkadi, B. (2003) Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* **17**: 103-114.
- Hooijberg, J. H., Broxterman, H. J., Kool, M., Assaraf, Y. G., Peters, G. J., Noordhuis, P., Scheper, R. J., Borst, P., Pinedo, H. M., Jansen, G. (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* **59**: 2532-2535.
- Ishikawa, T., Nakagawa, H., Hagiya, Y., Nonoguchi, N., Miyatake, S., Kuroiwa, T. (2010) Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis. *Adv Pharmacol Sci* **2010**: 587306.
- Jakoby, W. B., Ziegler, D. M. (1990) The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* **265**: 20715-20718.
- Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., van, d., V, Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R. P., Rosing, H., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15649-15654.
- Kerr, I. D. (2004) Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 166-173.
- Kielar, D., Kaminski, W. E., Liebisch, G., Piehler, A., Wenzel, J. J., Mohle, C., Heimerl, S., Langmann, T., Friedrich, S. O., Bottcher, A., Barlage, S., Drobnik, W., Schmitz, G. (2003) Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: a potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganization. *J Invest Dermatol* **121**: 465-474.
- Kolly, C., Suter, M. M., Muller, E. J. (2005) Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *J Invest Dermatol* **124**: 1014-1025.
- Kool, M., de, H. M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F., Borst, P. (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**: 3537-3547.

- Kremer, J. M. (2004) Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* **50**: 1370-1382.
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., Schuetz, J. D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **279**: 24218-24225.
- Krishnamurthy, P., Schuetz, J. D. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 381-410.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., Schuetz, J. D. (2007) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* **114**: 345-358.
- Latunde-Dada, G. O., Simpson, R. J., McKie, A. T. (2006) Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci* **31**: 182-188.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**: 216-237.
- Li, Q., Kato, Y., Sai, Y., Imai, T., Tsuji, A. (2005) Multidrug resistance-associated protein 1 functions as an efflux pump of xenobiotics in the skin. *Pharm Res* **22**: 842-846.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Maughan, T. S., James, R. D., Kerr, D. J., Ledermann, J. A., McArdle, C., Seymour, M. T., Cohen, D., Hopwood, P., Johnston, C., Stephens, R. J. (2002) Comparison of survival, palliation, and quality of life with three chemotherapy regimens in metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* **359**: 1555-1563.
- Merk HF, Jugert FK, Frankenberg S (1996) Biotransformation in the skin. In: *Dermatotoxicology* (Marzulli FN, Maibach H eds) Taylor & Francis: Washington, 61-73.
- Nielsen, K. P., Juzeniene, A., Juzenas, P., Stamnes, K., Stamnes, J. J., Moan, J. (2005) Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion. *Photochem Photobiol* **81**: 1190-1194.
- Ortel, B., Chen, N., Brissette, J., Dotto, G. P., Maytin, E., Hasan, T. (1998) Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer* **77**: 1744-1751.
- Parvez, H., Reiss, C. (2001) *Molecular Responses to Xenobiotics*. Elsevier, Amsterdam
- Peng, K. C., Cluzeaud, F., Bens, M., Duong Van Huyen, J. P., Wioland, M. A., Lacave, R., Vandewalle, A. (1999) Tissue and cell distribution of the multidrug

- resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem* **47**: 757-768.
- Pivarcsi, A., Szell, M., Kemeny, L., Dobozy, A., Bata-Csorgo, Z. (2001) Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **293**: 206-213.
- Ponka, P. (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci* **318**: 241-256.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van, d. H., I, Kuil, A., de, H. M., Wijnholds, J., Borst, P. (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9244-9249.
- Riddle, C. C., Terrell, S. N., Menser, M. B., Aires, D. J., Schweiger, E. S. (2009) A review of photodynamic therapy (PDT) for the treatment of acne vulgaris. *J Drugs Dermatol* **8**: 1010-1019.
- Riordan, J. R., Ling, V. (1979) Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* **254**: 12701-12705.
- Ritter, C. A., Jedlitschky, G., Meyer zu, S. H., Grube, M., Kock, K., Kroemer, H. K. (2005) Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev* **37**: 253-278.
- Robey, R. W., Steadman, K., Polgar, O., Bates, S. E. (2005) ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biol Ther* **4**: 187-194.
- Russel, F. G., Koenderink, J. B., Masereeuw, R. (2008) Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 200-207.
- Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V. O., Hatem, S. N., Cohen, A. F., Russel, F. G., Mougenot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., Lompre, A. M., Hulot, J. S. (2008) Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* **118**: 2747-2757.
- Schaub, T. P., Kartenbeck, J., Konig, J., Spring, H., Dorsam, J., Staehler, G., Storkel, S., Thon, W. F., Keppler, D. (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **10**: 1159-1169.
- Scheffer, G. L., Pijnenborg, A. C., Smit, E. F., Muller, M., Postma, D. S., Timens, W., van, d., V, de Vries, E. G., Scheper, R. J. (2002) Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* **55**: 332-339.

- Schultz, I. J., Chen, C., Paw, B. H., Hamza, I. (2010) Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *J Biol Chem* **285**: 26753-26759.
- Schwartz, P. M., Barnett, S. K., Atillasoy, E. S., Milstone, L. M. (1992) Methotrexate induces differentiation of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 594-598.
- Scotto, K. W. (2003) Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* **22**: 7496-7511.
- Shafran, A., Ifergan, I., Bram, E., Jansen, G., Kathmann, I., Peters, G. J., Robey, R. W., Bates, S. E., Assaraf, Y. G. (2005) ABCG2 harboring the Gly482 mutation confers high-level resistance to various hydrophilic antifolates. *Cancer Res* **65**: 8414-8422.
- Sidoroff, A., Thaler, P. (2010) Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer--the place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis Photodyn Ther* **7**: 24-32.
- Smith, G., Dawe, R. S., Clark, C., Evans, A. T., Comrie, M. M., Wolf, C. R., Ferguson, J., Ibbotson, S. H. (2003) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of drug metabolizing and cytoprotective genes in psoriasis and regulation by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* **121**: 390-398.
- Smits, T., van Laarhoven, A. I., Staassen, A., van de Kerkhof, P. C., van Erp, P. E., Gerritsen, M. J. (2009) Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol* **160**: 849-857.
- Tompkins, L. M., Li, H., Li, L., Lynch, C., Xie, Y., Nakanishi, T., Ross, D. D., Wang, H. (2010) A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem Pharmacol* **80**: 1754-1761.
- Triel, C., Vestergaard, M. E., Bolund, L., Jensen, T. G., Jensen, U. B. (2004) Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* **295**: 79-90.
- Tu, C. L., Chang, W., Bikle, D. D. (2001) The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* **276**: 41079-41085.
- Ueda, K. (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 401-409.
- van Aubel, R. A., Smeets, P. H., Peters, J. G., Bindels, R. J., Russel, F. G. (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* **13**: 595-603.

- van de Ven, R., Scheffer, G. L., Reurs, A. W., Lindenberg, J. J., Oerlemans, R., Jansen, G., Gillet, J. P., Glasgow, J. N., Pereboev, A., Curiel, D. T., Scheper, R. J., de Gruijl, T. D. (2008) A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. *Blood* **112**: 2353-2359.
- van der Heijden, J. W., Dijkmans, B. A., Scheper, R. J., Jansen, G. (2007) Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs--from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**: 26-34.
- Vicanova, J., Boelsma, E., Mommaas, A. M., Kempenaar, J. A., Forslind, B., Pallon, J., Egelrud, T., Koerten, H. K., Ponec, M. (1998) Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* **111**: 97-106.
- Volk, E. L., Schneider, E. (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* **63**: 5538-5543.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.
- Xu, S., Weerachayaphorn, J., Cai, S. Y., Soroka, C. J., Boyer, J. L. (2010) Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G126-G135.
- Yano, S., Ito, Y., Fujimoto, M., Hamazaki, T. S., Tamaki, K., Okochi, H. (2005) Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* **23**: 834-841.
- Yuspa, S. H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M., Roop, D. R. (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* **109**: 1207-1217.
- Zane, C., Venturini, M., Sala, R., Calzavara-Pinton, P. (2006) Photodynamic therapy with methylaminolevulinate as a valuable treatment option for unilesional cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **22**: 254-258.

Saját közlemények

Attila Bebes, Kornélia Kis, Tünde Nagy, Anita Kurunczi, Hilda Polyánka, Zsuzsanna Bata-Csörgő, Lajos Kemény, Attila Dobozy, Márta Széll: **The expressions of ABCC4 and ABCG2 xenobiotic transporters in human keratinocytes are proliferation-related.** *Arch Dermatol Res* (2011) *in press*, doi:10.1007/s00403-011-1174-4

Attila Bebes, Tünde Nagy, Zsuzsanna Bata-Csörgő, Lajos Kemény, Attila Dobozy, Márta Széll: **Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy.** *J Photochem Photobiol B* (2011) **105** (2): 162-166

Köszönetnyilvánítás

Nagyon nagy köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Széll Mártának, amiért az elmúlt öt évben gondos figyelemmel követte az előrehaladásomat, valamint mindig segített abban, hogy pozitívan lássam a dolgokat; köszönöm az útmutatást, a rengeteg időt, amit arra fordított, hogy jobbra tegye a munkám. Köszönöm Bata-Csörgő Zsuzsanna Professzor Asszonynak, hogy a Lymphocyta Laborban végezhettem a munkám, köszönöm a hasznos tanácsokat, a tanítást, az eredményeim közös megvitatását és hogy kellő eréllyel próbált a megfelelő irányba terelni. Köszönöm Kemény Lajos Professzor Úrnak az öt évvel ezelőtt megadott bizalmat, aminek köszönhetően a Bőrgyógyászati Klinikán kezdettem el doktorandusz hallgatóként dolgozni, így lehetőségem nyílt számos modern kutatási módszerrel megismerkedni.

Köszönöm Dr. Kormos Bernadettnek és Lászlóné Editnek, hogy a kezdetektől fogva nem csupán munkatársaim voltak a laborban, hanem a legjobb barátaim is. Köszönöm mindkettőjüknek a sok támogatást, hogy mindig meghallgattak, a rengeteg segítséget munkában és azon kívül egyaránt. Köszönöm Prihoda Juditnak, Dr. Kovács-Sólyom Ferencnek és Bacsa Saroltának, hogy az együtt töltött munka és a szabadidő is kellemesen és jó hangulatban telt.

Rengeteget köszönhetek Dr. Vámos Enikőnek, külön kiemelve azt, hogy nagyon nagy szerepet játszott abban, hogy bekopogtam Kemény Professzor Úr irodájába öt évvel ezelőtt.

Hálás vagyok Dr. Szabó Kornéliának a biztatásért, a tanításért, és a sok hasznos tanácsért az eredmények kiértékelésében és a felmerült problémák megoldásában. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kiss Máriának, Dr. Dallos Attilának, Behány Zoltánnak és Horváthné Tündének a hasznos ötletekért, a munkám előmozdításáért, és a kellemes hangulatért az Immunlaborban.

Köszönöm Dr. Belső Nórának, Dr. Vas Krisztinának és minden orvos kollégának a Klinikán akik segítettek a kutatás klinikai vonatkozásaiban. Nagyon köszönöm a Dermatopathológiai Laboratórium munkatársainak, Veszprémi Évának, Dr. Németh Istvánnak, Függ Róbertnének és Csillag Istvánnénak a szövettani és immunfestési munkákban nyújtott segítséget és a tanítást.

Természetesen köszönet illeti a Lymphocyta labor és a Molekuláris biológiai labor és összességében a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika minden volt és

jelenlegi munkatársát, akikkel az öt év során együtt dolgoztam, valamilyen formában mindenki hozzájárult ahhoz, hogy ez a munka létrejöjjön.

Köszönöm a Solvo Zrt. munkatársainak, Dr. Nagy Tündének és Dr. Kurunczi Anitának a kooperációt és a kritikai észrevételeket.

A munka a következő pályázatok támogatásával valósult meg: Asbóth Oszkár Program XTTPSRT1, OTKA NK77434, OTKA K61541, OTKA K68680, TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0001 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012.

Végezetül nagyon hálás vagyok a családomnak, szüleim és testvéreim támogatása nélkül nem juthattam volna el idáig.

Summary

Members of the ABC transporter protein superfamily are found in all known living species. Their main function is the transport of a wide variety of molecules through biological membranes using the energy of ATP. The ABC transporter superfamily comprises the group of xenobiotic transporters, which proteins are known of their extremely wide substrate specificity. Studies on tumors revealed that chemotherapy resistant cancer cells are continuously expressing these xenobiotic transporters resulting in the extrusion of chemotherapeutic drugs out of the cells. Xenobiotic transporters act in normal tissues as a barrier against environmental toxins or harmful endogenous compounds. They play an important role in the biochemical defense system in several organs, such as the gut, the liver and the kidney. According to recent research they have several other functions beyond tissue protection as they transport key molecules regulating inflammatory processes or cell proliferation.

Epidermal keratinocytes are the main building blocks of the outmost layer of the skin, which is one of the most important and largest barrier of the body. However, the function of xenobiotic transporters in the protection and homeostasis of the skin is poorly known. We set out to determine which transporter proteins are involved in the regulation of proliferation and differentiation of keratinocytes, using the *in vitro* model systems of HaCaT cells and normal human keratinocytes.

According to our gene expression studies on eight xenobiotic transporters, the ABCC4 and ABCG2 genes showed an expression pattern associated with keratinocyte proliferation. Our data on the protein expression of these transporters together with results in the literature further supported the presumed connection with cell proliferation, thus we set out to perform functional studies to uncover their role in proliferating keratinocytes. We silenced the ABCC4 and ABCG2 genes with the use of specific siRNAs in HaCaT cells, however there was no detectable effect on cell proliferation. Next, we disrupted the function of the transporters with the use of specific chemical inhibitors and followed cell proliferation in a real-time, non-invasive detection system. ABCC-type transporters were inhibited by probenecid and ABCG2 function was blocked by Ko-134, but HaCaT cells showed a proliferation rate similar to control, even when the two inhibitors were applied in combination. Normal human keratinocytes were affected similarly upon Ko-134 treatment, however probenecid significantly

inhibited cell proliferation. These results suggest that ABCC-type transporters, including ABCC4 could play an important role in the proliferation of normal keratinocytes.

Our *in vitro* results on keratinocytes implied that it is important to evaluate the expression of ABCC4 and ABCG2 transporters in human skin.

We investigated the expression of ABCC4 protein in human skin. We compared the immunohistochemical staining pattern of ABCC4 in healthy skin and in skin samples of psoriatic patients. ABCC4 immunopositivity was present in healthy and in psoriatic epidermis, mainly in cells showing dendritic morphology. According to the literature, ABCC4 protein is expressed in epidermal Langerhans cells. In psoriatic lesions – characterized by keratinocyte hyperproliferation and abnormal differentiation – the ABCC4 transporter was overexpressed in the excessively proliferating basal cell layers.

One of the known substrates of ABCC4 transporter is methotrexate, which is a frequently applied drug in psoriasis. We aimed to determine the effect of methotrexate on HaCaT cells, treated with different transporter inhibitors. The cells showed increased resistance to short-term methotrexate treatment. Blocking the function of ABCC-type transporters with probenecid and indomethacin resulted in an increased sensitivity to the incubation with methotrexate. In a recent publication 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride was introduced as a specific inhibitor of ABCC4 function in membrane vesicles. Our results showed, however, a highly toxic effect of the compound on living cells, therefore this inhibitor molecule is not feasible to study ABCC4 function in our system. The specific blockade of ABCG2 transporter function with Ko-134 did not affect the resistance of HaCaT cells on short-term methotrexate treatment, suggesting that this protein does not play a role in the extrusion of methotrexate from the cells.

We carried out immunohistochemical experiments in order to study the expression of ABCG2 in human skin. In healthy epidermis, ABCG2 was detected in the basal layer of keratinocytes. We examined the expression of the transporter in psoriatic skin, characterized by keratinocyte hyperproliferation, since our results on *in vitro* keratinocyte proliferation/differentiation models suggested a proliferation-associated expression. The ABCG2 protein was induced in the suprabasal layers in psoriatic lesional epidermis, while hyperproliferating basal keratinocytes showed only very low expression of the transporter. This is in accordance with the results of our *in vitro*

functional studies showing that ABCG2 is not indispensable for cell proliferation and suggested that ABCG2 expression is regulated by other factors, for instance by cellular stress. We detected high level ABCG2 positivity in non-melanoma skin cancers. In basal cell carcinoma, the tumor itself was negative, however, in the surrounding epidermis near the cancerous tissue, the transporter was highly expressed. In the case of squamous cell carcinoma and epidermal hyperplasia, ABCG2 protein was overexpressed in the abnormally dividing cancer cells.

Photodynamic therapy is a widely applied therapeutic modality in the treatment of non-melanoma skin cancers. It is based on the photosensitization of the diseased tissue, mainly by porphyrins, which is followed by an irradiation with a light source emitting at excitatory wavelengths. One of the functions of the ABCG2 transporters is the extrusion of free intracellular porphyrins out of cells. The presence of the protein in skin cancers suggests that the efficacy of photodynamic therapy could be modulated by ABCG2. We investigated the relationship between ABCG2 expression and porphyrin accumulation in HaCaT cells. Our results showed that the protein can significantly affect the amount of accumulated intracellular porphyrin. We characterized an *in vitro* model of photodynamic therapy using HaCaT cells that can be applied to study the impact of blocking the function of ABCG2 on the efficacy of photodynamic treatment. Ko-134, the specific and non-toxic inhibitor of ABCG2 increased the sensitivity of HaCaT cells to photodynamic treatment in a dose-dependent manner in our model.

In summary, the results of our detailed investigation on the expression and function of ABCC4 and ABCG2 xenobiotic transporters suggest potential therapeutic impact of these proteins in dermatology.

Összefoglalás

Az ABC transzporterek az egész élővilágban előforduló fehérjék, amelyek molekulák széles skálájának szállítását végzik biológiai membránokon keresztül ATP energiájának felhasználásával. Az ABC transzporter fehérjecsalád magába foglalja a xenobiotikum transzporterek csoportját, amelyek közös jellemzője a rendkívül széles szubsztrátspecifitás. Tumorokkal kapcsolatos kutatások világítottak rá arra, hogy a kemoterápiás szereknek ellenálló daganatsejtek olyan xenobiotikum transzporter fehérjéket fejeznek ki, amelyek eltávolítják a sejtől a gyógyszermolekulákat. Fiziológiai körülmények között a különböző szöveti határfelületeken ismert a működésük, többek között a vér-agy gát, a bél, a máj biokémiai védekező rendszerének fontos elemei, ahol a környezeti toxinok, vagy endogén eredetű károsító molekulák szervezetből való eltávolítása a feladatuk. Mindezen túl eddig kevésbé ismert módon számos egyéb funkciót is elláthatnak, endogén szubsztrátjaik között gyulladásos folyamatokban, sejtosztódásban szerepet játszó kulcsfontosságú szabályzó molekulák vannak.

Az epidermális keratinociták egy igen fontos és nagy kiterjedésű határfelület, a bőr legkülső rétegét felépítő sejtek. Viszonylag kevés ismeretünk van arról, hogy a xenobiotikum transzporterek hogyan járulnak hozzá a bőr védelméhez és homeosztázisának fenntartásához. Munkánk kiindulópontjaként arra kerestük a választ, hogy a keratinociták proliferációs és differenciációs folyamataiban mely transzporter fehérjék játszanak szerepet. In vitro keratinocita modell rendszerekben tanulmányoztuk az ABCC4 és ABCG2 transzporterek gén- és fehérjeszintű kifejeződését, és a sejtek proliferációjához kapcsolt expressziót mutattunk ki. Mindkét fehérjével kapcsolatban rendelkezésre áll olyan irodalmi adat, amely a sejtek proliferációját befolyásoló funkciójukra utal. Eredményeink szerint immortalizált HaCaT sejtekben az ABCC4 és ABCG2 gének specifikus csendesítésének nincs kimutatható hatása a sejtek proliferációjára. Egy másik megközelítésben a transzporterek működését specifikus gátlószerekkel akadályoztuk, majd valós időben követtük nyomon a sejtek proliferációját. Az ABCC-típusú transzportereket probeneciddel, az ABCG2 fehérjét a Ko-134 molekulával gátoltuk, de a HaCaT sejtek még a két szer kombinációjával történő kezelésre is a kontrollhoz hasonló proliferációt mutattak. Normál humán keratinociták a Ko-134 kezelésre a HaCaT sejtekhez

haszonlón reagáltak, azonban a probenecid kezelés teljes mértékben gátolta a proliferációjukat. Az ABCC-típusú transzporterek – köztük az ABCC4 – tehát fontos szerepet játszhatnak a normál keratinociták sejtosztódási folyamataiban.

Az *in vitro* vizsgálataink alapján arra jutottunk, hogy az ABCC4 és az ABCG2 transzporter kifejeződésének részletes vizsgálata humán bőrben is indokolt.

Az ABCC4 transzporter esetében összehasonlítottuk a fehérje kifejeződését egészséges személyek, valamint pikkelysömörben szenvedő betegek bőrében. Egészséges, valamint pikkelysömörös nem-léziós epidermiszben az ABCC4 immunpozitív sejtek elszórtan voltak jelen, és elsősorban dendritikus morfológiát mutattak. Irodalmi adatok is megerősítik saját eredményeinket, miszerint egészséges bőrben az ABCC4 fehérje az epidermális Langerhans-sejteken figyelhető meg. Az epidermális keratinociták túlzott proliferációjával és abnormális differenciációjával jellemzett pikkelysömörös léziókban az ABCC4 transzporter nagymértékű expresszióját figyeltük meg a hiperproliferáló bazális keratinocitákban. Mivel az ABCC4 transzporter egyik ismert szubsztrátja a pikkelysömör terápiájában is alkalmazott methotrexát, ezért elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a gyógyszer hatását HaCaT sejteken, különböző transzporter-gátlókkal való kezelés mellett. A sejtek rövidtávú methotrexát kezelésre nagyfokú rezisztenciát mutattak. Az ABCC-típusú transzporterek gátlása probeneciddel és indomethacinnal jelentősen növelte a sejtek érzékenységet a methotrexát pulzuskezelésre. Egy nemrég napvilágot látott közlemény alapján egy proteáz gátló, a 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid specifikusan gátolja az ABCC4 működését membrán vezikula preparátumokon. Eredményeink alapján azonban élő sejteken toxikus hatása jelentkezik, ezért a szer nem használható az ABCC4 funkciójának további vizsgálatára. Az ABCG2 transzporter specifikus gátlószere, a Ko-134, nem okozott változást a HaCaT sejtek methotrexát pulzuskezelésre mutatott rezisztenciájában, amiből arra lehet következtetni, hogy ez a fehérje nem vesz részt számottevő mértékben a methotrexát sejtől való eltávolításában.

Az ABCG2 transzporter további részletes tanulmányozása során az *in vitro* proliferációs/differenciációs keratinocita modellekben mutatott proliferációhoz kapcsolt kifejeződési mintázat nyomán elindulva a keratinocita hiperproliferációval jellemzett pikkelysömörben is megvizsgáltuk a fehérje kifejeződését. Egészséges epidermiszben a bazális sejtekben figyeltünk meg ABCG2 expressziót. A pikkelysömörös léziós epidermiszben azonban az ABCG2 fehérje a szuprabazális rétegekben mutatott nagymértékű kifejeződést, míg a bazális réteg hiperproliferáló keratinocitái nem

expresszálták a transzportert. Ez összhangban van *in vitro* funkcionális vizsgálataink eredményeivel, miszerint az ABCG2 transzporter kifejeződése nem elengedhetetlen a keratinocita proliferációhoz. További immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei szerint a nem-melanóma típusú bőrtumorokat magas szintű ABCG2 transzporter kifejeződés jellemezte. Bazaliómák esetén inkább az elváltozás környezetében található epidermisz, laphámkarcinómák és hám hiperpláziák esetében pedig maguk a rendellenesen osztódó sejtek expresszálják az ABCG2 fehérjét.

A nem-melanóma típusú bőrdaganatok gyógyítására gyakori megoldás a fotodinámiás terápia, aminek alapja a porfirinekkal való fényérzékenyítés, majd az ezt követő besugárzás gerjesztő hullámhosszon emittáló fényforrással. Az ABCG2 fehérjéről ismert, hogy egyik funkciója az intracelluláris szabad porfirinek sejtől való eltávolítása. Az ABCG2 transzporter jelenléte különböző bőrtumorokban felveti annak lehetőségét, hogy a fotodinámiás terápia hatékonyságát befolyásolhatja annak funkciója. HaCaT sejtekben vizsgáltuk az ABCG2 transzporter kifejeződése és a porfirinek felhalmozódása közötti kapcsolatot, és az általunk kapott eredmények azt mutatták, hogy a fehérje jelentős mértékben képes befolyásolni a sejtekben felhalmozódó szabad porfirinek mennyiségét. Ezt követően HaCaT sejtek felhasználásával egy *in vitro* fotodinámiás terápiás modellt állítottunk be, ahol vizsgálni tudtuk az ABCG2 transzporter gátlásának hatását a fotodinámiás kezelés hatékonyságára. Eredményeink szerint az ABCG2 specifikus és nem-toxikus gátlószere, a Ko-134 dózisfüggő módon növelte a fotodinámiás terápia hatékonyságát az általunk alkalmazott modellben.

Összességében az ABCC4 és ABCG2 xenobiotikum transzporterekén végzett részletes expressziós és funkciós vizsgálataink arra utalnak, hogy ezen fehérjék fontos terápiás célpontok lehetnek bőrgyógyászati eredetű kórképek gyógyításában.