

## EFFLUX-PUMPA MEDIÁLTA MULTIDROG REZISZTENCIA VISSZAFORDÍTÁSA BAKTÉRIUMOKBAN ÉS TUMORSEJTEKBEN



### BEVEZETÉS

A penicillin felfedezése óta az antibiotikum éra nagy változásokon ment keresztül. Az antibiotikumok egyre szélesebb körű, és sokszor nem megfelelő használatának köszönhetően megjelentek olyan baktériumok, amelyek már nem voltak érzékenyek a korábban hatásos antimikrobás szerekre. Ez komoly terápiás kudarcot jelentett, és jelent ma is a bakteriális infekciók kezelésében. Az antibiotikumrezisztencia megjelenéséhez az előbbieken túlmenően a baktériumok bámulatos adaptációs képessége is hozzájárult, ami elsősorban a genetikai anyaguk plaszticitásával és mobilitásával függ össze.

A baktériumok ún. *intrinsic rezisztenciája* azt jelenti, hogy bizonyos törzsek eredetileg is érzéketlenek bizonyos típusú antibiotikumokra: ez a jelenség régóta ismert, a terápia megkezdésekor kalkulálni lehet vele. Viszont a *szerezett rezisztencia* komoly problémát jelenthet: az eredetileg érzékeny baktériumok rezisztenssé válnak különböző mechanizmusoknak köszönhetően. Ilyen pl. a *mutációs rezisztencia*. Ez igen ritka, és véletlenszerű: egy baktériumpopuláció egyetlen sejtje egy mutáció következtében válik rezisztenssé egy adott drogra, és a drog hosszú távú alkalmazása során a rezisztens sejtek kisselektálódnak. Az *átvihető rezisztencia* igen gyakori, és okozza a legtöbb gondot: ennek során antibiotikum rezisztencia gének kerülnek a rezisztens törzsből az érzékenybe, és így válnak ezek rezisztenssé. Ezek a gének előfordulhatnak kromoszómán vagy mobilis genetikai elemeken, mint plazmidok, transzpozonok vagy integronok. A **transzfermechanizmusok** a következők: 1. *Transzformáció*: ennek során elpusztult baktériumsejtből DNS darabok kerülnek az élő baktériumba. 2. *Transzdukció*: bakteriofágok által közvetített DNS-transzfer a fág által elpusztítottból egy újonnan fertőzött baktériumba. 3. *Konjugáció*: DNS transzfer két élő baktérium között, melyhez a sejtek közvetlen kontaktusára van szükség, ami egy plazmahíd képződésével jön létre. E mechanizmus plazmidok (fertilitási plazmid) segítségével megy végbe, és akár az egész kromoszóma átvihető egyik sejtől a másikba. Különös jelentősége abban rejlik, hogy a rezisztencia plazmidok is konjugációval terjednek, és okozzák az érzékeny törzsek multidrog rezisztenciáját (MDR).

Az antibiotikum **rezisztencia mechanizmusok** igen széleskörűek: 1. a drog bakteriális enzimek általi inaktivációja, módosítása, 2. a drog célpontjának megváltozása, 3. a drogok által befolyásolandó biokémiai mechanizmus megváltozása, és ezzel a drog hatásának

kikerülése, 4. a membrán permeabilitásának változása elsősorban a porinacsatornák számának csökkenésével, és 5. **aktív efflux**, melynek során a baktérium kipumpálja a sejtéből a drogokat energia felhasználásával. Vannak drog transzporterek, melyek csak kevés számú anyagot pumpálnak ki. Az ún. multidrog transzporterek a legkülönbözőbb kémiai anyagokat képesek a sejtéből kipumpálni, okozva ezzel a multidrog rezisztenciát. A bakteriális transzportereknek két fajtája van: 1. az ún. szekunder multidrog transzporterek a membrán proton vagy nátriumion gradiensét, míg az ABC (ATP binding cassette) transzporterek az ATP hidrolíziséből származó energiát használják fel a drogok sejtéből való eltávolítására.

A **szekunder multidrog transzporterek** egyik fő képviselője az ún. *AcrAB-TolC* efflux pumpa, mely *E. coli* törzsekben található, homológjai viszont számos egyéb gram negatív baktériumban fellelhetőek. E pumpa rendszernek hármas fehérje szerkezete van: AcrB a belső membránban lévő transzporter, mely proton gradiens létrehozásából származó energiát használ az aktív effluxhoz, TolC a külső membránban lévő csatorna protein, és AcrA a kettőt összekötő, a periplazmatikus térben lévő linker protein. Ez a szerkezet biztosítja a drogok kipumpálását a sejtéből közvetlenül az extracelluláris térbe. Az *AcrAB-TolC* efflux pumpa képes kipumpálni a legkülönbözőbb szerkezetű kemoterápiás szereket, festékeket, felületaktív anyagokat. Viszont a szubsztrátokban a közös, hogy mind nagy méretű, hidrofób jellegű molekulák, mint pl. az erythromycin. A legtöbb természetes eredetű antibiotikum ebbe a csoportba tartozik, és épp e pumpák működése következtében csak a gram-pozitív baktériumokra hatásosak. A dolgozatban két baktériumtörzset tanulmányoztunk: az *E. coli* AG100 egy vad törzs, mely rezisztens, rendelkezik az *AcrAB-TolC* efflux pumpával, míg az *E. coli* AG100A egy mutáns és érzékeny törzs, mert hasonló jellegű pumpája egy mutáció következtében inaktív.

Az **ABC transzporterek** négy fehérje doménből állnak: két hidrofób membrán doménből, és két hidrofil nukleotid-kötő doménből. A *Lactococcus lactis* baktériumban az ún. LmrA transzporter is e csoportba tartozik, valamint az *E. coli* HlyB nevű transzportere is, melynek a haemolysin transzportjában van szerepe. Mindkét transzporter homológ a humán *P-glycoprotein 170* nevű hasonló jellegű transzporterrel. Ez a fehérje felelős többfajta rosszindulatú daganat multidrog rezisztenciájáért, mert képes a sejtekből kipumpálni a citosztatikumokat. A dolgozatban vizsgált egér lymphoma sejtek (PAR) egy része (MDR) a humán P-glycoprotein *mdr-1* génjével voltak transzfektálva, minek következtében azok rezisztensek.

A dolgozat fő célja, hogy vizsgálja a multidrog rezisztencia visszafordításának lehetőségét. Ez baktériumokban történhet például a rezisztencia géneket hordozó plazmidok

eliminálásával, de ez sosem terjed ki az egész baktériumpopulációra. Hatásosabb módja lehet viszont a multidrog efflux pumpák működésének gátlása különböző kémiai anyagokkal mind a baktériumokban, mind a ráksejtekben egyaránt.

## A DOLGOZAT CÉLKITŰZÉSEI

1. Megvizsgáltuk különböző rezisztencia módosítók, mint ismert (omeprazol) és újonnan szintetizált proton pumpa gátlók (trifluoro-metilketonok –TF anyagok), és Ca-antagonisták (promethazin és verapamil) antibakteriális hatását *E. coli* AG100 és AG100A törzseken, hiszen ezek ún. szubMIC koncentrációban tudják kifejteni hatásukat.
2. A leghatékonyabb TF anyagok és ismert rezisztencia módosítók, mint promethazin és verapamil kombinációjának antibakteriális hatását vizsgáltuk *E. coli* AG100 és AG100A törzseken.
3. Klinikai szempontból nagy fontosságú törzset kaptunk, amikor a két *E. coli* törzset pBR 322 plazmiddal transzformáltuk. Az ismert antiplazmid hatású promethazinnal elimináltuk a plazmidokat a proton pumpával rendelkező, és a mutáns baktériumtörzsből.
4. A leghatékonyabb antibakteriális hatású, potenciálisan proton pumpa gátló TF anyaggal (1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanone) (TF 18) kombináltuk ún. checkerboard kombinációs módszerrel az *E. coli* AG100 és AG100A törzseken. az antibiotikumok bizonyos képviselőit: AcrAB-TolC pumpa szubsztrátjait, mint erythromycin, tetracycline, és ampicillint, ami hidrofilitása miatt nem szubsztrátja e pumpának
5. Mivel 1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanone (TF 18) potenciálisan proton pumpa gátlónak bizonyult a checkerboard kísérletben, más proton pumpa gátlókat, mint omeprazol, ill TF 18-nak egy strukturálisan közeli származékát, 1-(2-benzoxazolyl)-2-propanone-t (TF51) vizsgáltuk kombinációban erythromycinnel az *E. coli* AG100 és AG100A törzseken.
6. Ismert rezisztencia módosítókat, mint promethazin és verapamil, kombináltuk az erythromycinnel és az ampicillinnel külön-külön *E. coli* AG100 és AG100A törzseken.
7. Bizonyítandó a TF anyagok, és különösen a leghatékonyabb 2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanone (TF 18) proton pumpa gátló (és ezzel rezisztencia módosító ) hatását, *P. vulgaris* törzsen vizsgáltuk azok mozgás gátló hatását.
8. Vizsgáltuk az összefüggést a trifluoro-metilketonok kémiai szerkezete, és biológiai hatásai , mint antibakteriális hatás, mozgásgátlás, proton pumpa gátlása – rezisztencia módosítás, között.

9. Az egér lymphoma sejtekben vizsgáltuk a P-glycoprotein efflux pumpa gátlását, és ezzel a multidrog rezisztencia visszafordítását: ehhez akridinszármazékokat, mit mono, bi- és tricyklikus anyagokat, valamint benzonaphthyridine-származékokat teszteltünk.

10. Megvizsgáltuk az akridin- és benzonaphthyridine-származékok rezisztenciamódosító hatása, és kémiai szerkezetük közötti összefüggéseket, különös tekintettel az aromás gyökökre, és az oldalláncok szerkezetére.

## EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

1. A TF anyagok közül 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (TF10), 1,1,1-trifluoro-3-(4,5-dimethyloxazol-2-yl)-2-propanone(TF11) és 2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanone (TF 18) fejtették ki a legerősebb antibakteriális hatást az *E. coli* AG100 és AG100A törzseken.

2. a. A három TF anyag közül TF 10 és 11 csak mérsékelten additív hatást mutatott a Calmodulin antagonistá promethazinnal mindkét *E. coli* törzsen, viszont TF 18 szinergista volt, de csak a vad, *E. coli* AG100 törzsen, ami azt jelenti, hogy egyrészt a promethazin szubsztrátja az AcrAB efflux pumpának, másrészt viszont a TF 18 gátolni képes e pumpát.

b. A promethazinnal a vad törzsen szinergista hatást kifejtő TF 18 a Ca-csatorna blokkoló verapamillal is lett kombinálva mindkét *E. coli* törzsen. Érdekes módon a kombináció a mutáns törzsen volt szinergizmus, míg a vad törzsen antagonizmus. Ez azzal magyarázható, hogy a TF18 különbséget tehet a calmodulin antagonistá, és a Ca-csatorna blokkoló tulajdonság között, és ebben a proton efflux pumpa jelenlétének is szerepe lehet.

3. A pBR322 plazmid legmagasabb százaléku eliminációjához a promethazinnak a mutáns törzsben alacsonyabb koncentrációra volt szüksége, mint a vad törzsben. Ez ismét bizonyítja, hogy a promethazin szubsztrátja lehet a pumpának, másrészt az efflux pumpa jelenléte befolyásolja a plazmideliminációt.

4. A TF 18 és az erythromycin kombinációja során az erythromycin MIC értéke 32-ted részére csökkent a proton pumpa hordozó vad törzsben, míg a proton pumpa deficiens mutánsban csak negyed részére változott. Az ampicillin MIC értéke viszont egyik törzsben sem változott szignifikáns módon. Ezek bizonyítják, hogy a TF 18 -nak speciális gátló hatása van az AcrAB proton efflux pumpán. A gyengébb szinergizmus a TF 18 és erythromycin között a mutáns, proton pumpa deficiens törzsen azzal magyarázható, hogy a TF 18-nak önmagában is erős az antibakteriális hatása.

5. Egyéb proton pumpa gátlók, mint az omeprazol, és TF 18 közeli származéka, a TF 51 nem befolyásolták az erythromycin érzékenységét egyik *E. coli* törzsen sem. A TF 18 és 51 között,

csak a benzoxazol gyűrű oldalláncának terminálisában van különbség: TF 18-nál F<sub>3</sub>, TF 51-nél H<sub>3</sub>. Ez valószínűsíti, hogy a proton pumpa gátlókon belül is szükség van egy adott kémiai szerkezetre, ami hatásosan tudja gátolni az AcrAB proton efflux pumpa működését.

6. a. Az ismert rezisztencia módosítók, és a kétféle típusú antibiotikum (erythromycin és ampicillin) kombinációjával a két *E. coli* törzsön a következő eredményeket kaptuk: az erythromycin a promethazinnal mindkét törzsön additív hatást mutatott, míg a verapamillal a vad törzsön indifferens, a mutáns törzsön pedig szinergizmus volt tapasztalható. A verapamil tehát befolyásolhatja a membrán permeabilitását, és ez a hatás nincs összefüggésben a Ca-csatorna blokkoló hatással, hiszen a hasonló tulajdonságú promethazinnál ez nem volt tapasztalható.

b. Az ampicillin mindkét Ca-csatorna blokkolóval antagonista hatást mutatott a mutáns törzsben. Valószínűleg a mutáns törzsben mindkét rezisztencia módosító csökkentheti a membrán permeabilitását az ampicillin számára. A verapamil hatása a mutáns törzsben továbbá attól is függ, hogy milyen tulajdonságú antibiotikummal kombináljuk: a hidrofób erythromycinnel szinergizmus, a hidrofil ampicillinnel antagonizmus állapítható meg. Ez az antibiotikumok különböző membrán permeabilitási igényeit bizonyítja.

7. Mivel a baktériumok mozgása alapvetően proton pumpa mechanizmusnak köszönhető, a potenciálisan proton pumpa gátló TF anyagok ilyen jellegű hatását a bakteriális mozgás gátlásával próbáltuk bizonyítani. A baktériumok mozgása a flagellumok rotációjának irányától függően kétféle lehet: előrehaladó és bukfencező. A sejtek a mozgásukat irányítani képesek a kétféle mozgásforma közötti váltással. A TF anyagok vizsgálatokor a *P. vulgaris* törzsön nem csak a mozgásukban teljesen gátolt, hanem az előző kettő mozgásformával rendelkező sejtek arányát is vizsgáltuk. Amint várható volt, azt kaptuk eredményül, hogy a TF 18 gátolta leghatékonyabban a baktériumok mozgását koncentráció-függő módon: már 50% MIC érték alkalmazásakor a sejteknek csak 10 %-a mutatott előrehaladó mozgást, és 90 % MIC értéknél a baktériumok 90,9 %-a teljesen mozdulatlan volt. Ez megerősíti azt a feltételezést, amit az interakciós kísérletek során tapasztaltunk, miszerint a TF 18-nak gátló hatása van a proton pumpára.

8. Megvizsgálva a TF anyagok kémiai szerkezete és biológiai hatása közötti összefüggést a következők állapíthatóak meg: mind az antibakteriális, mind a mozgásgátló, és egyben a proton pumpa gátló hatás eléréséhez az alábbi szerkezetre van szükség: 1. benzoxazol gyűrű jelenléte, mert a benzene és az azol származékok hatástalanok voltak hasonló oldallánc mellett. 2. Megtartva a benzoxazol gyűrűt, a TF 18 -ban található oldallánc szerkezete

esszenciális, mert a láncterminális F<sub>3</sub> csoport, ill. metilencsoport eltávolítása drasztikus csökkenést eredményezett az antibakteriális és proton pumpa- / mozgásgátló hatásban.

9. Az egér lymphoma sejtekben az akridin származékok drog rezisztencia visszafordító hatásának vizsgálata során kíváncsiak voltunk, hogy mely funkcionális csoportok lépnek interakcióba a P-glycoproteinnel, és gátolják annak működését. Ennek érdekében különböző variációkat vizsgáltunk, mely érintette az: 1. különböző aromás gyökök szerepét, mint pyridin, quinolin, akridin és pyridoquinolin, 2. az oldalláncban levő atomok szerepét (mint O, N, S), és az oldallánc méretét. A legerősebb rezisztencia módosító hatást észleltük, ha az aromás gyök akridin vagy pyridoquinolon volt. A két oldalon lévő, hosszú oldallánccal rendelkezők hatásosabbak voltak, mint a rövid oldallánccal rendelkező származékok. Az anti MDR hatás korrelált két vagy három hidrogén akceptor jelenlétével. Megállapítottuk, hogy a heterociklusos szerkezet aromás hidrofób interakcióval lép kapcsolatba a P-glycoproteinnel.

10. Mivel közeli a strukturális hasonlóság az akridin származékokkal, benzonaphthyridin származékokat is vizsgáltunk az egér lymphoma sejteken. A különböző természetű oldallánccok szerepét tanulmányoztuk az efflux pumpa gátlásban. A leghatásosabbak azok a származékok voltak, melyek a heterociklusos gyököket (mint pyrrolidin, morpholin, piperidin) hordoztak. Fiziológiás körülmények közt protonálható amino csoportok jelenléte szintén szükséges az MDR reverzióhoz.

## ÖSSZEFOGLALÓ

A manapság egyre növekvő multidrog rezisztencia problémája sürgős megoldásra vár. Egyik lehetőség újabb és újabb antibiotikumok, citosztatikumok bevezetése, de rövid időn belül e drogokra is megjelenik a megfelelő rezisztencia mechanizmus. Egy másik mód azonban a kombinált terápia alkalmazása, miszerint a drogot kombináljuk a rezisztencia mechanizmust gátló szerrel. Erre már régóta példa a  $\beta$ -laktámok és  $\beta$ -laktamáz gátlók együttes alkalmazása. Speciális megoldás lehet az efflux mechanizmus következtében már hatástalan antibiotikum / citosztatikum kombinációja a megfelelő efflux pumpákat gátló anyagokkal, mellyel elérhető lehet a drogok akkumulációja a baktériumokban és tumorsejtekben egyaránt.

Az eredményeink modell kísérletekből származnak. A rezisztencia módosító anyagok kémiai szerkezetei és biológiai hatásai között megállapított összefüggések információul szolgálhatnak a multidrog rezisztencia reverziójának területén végzett további kísérletekhez.