ABC transzporterek és lipidkörnyezetük kölcsönhatásának vizsgálata – membrán koleszterin tartalom hatása az ABCG2 (BCRP/MXR) fehérje működésére

Ph.D. tézis összefoglaló

Pál Ákos

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Szeged
2007

Tézis tárgyköréhez kapcsolódó tudományos közlemények

I.
Pal A, Mehn D, Molnar ED, Gedey S, Meszaros P, Nagy T, Glavinas H, Janaky T, von Richter O, Bathori G, Szente L, Krajcsi P. **Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system - improved *in vitro* model to study function of humanABCG2.**
J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007 Jun; 321(3):1085-94.
IF: 3.956 (2006)

II.
Glavinas H, Kis E, Pal A, Kovacs R, Jani M, Vagi E, Molnar E, Banshagi S, Kele Z, Janaky T, Bathori G, von Richter O, Koomen GJ, Krajcsi P.
ABCG2 (BCRP/MXR) ATPase assay – a useful tool to detect drug – transporter interactions.
Drug. Metab. Dispos. 2007 Sep; 35(9):1533-42.
IF: 3.638 (2006)

III.
Bathori Gy, Mehn D, Pal A, Krajcsi P, Szente L, Fenyvesi E, Telbisz A, Sarkadi B, Varadi A, Kis E, Molnar E, Gedey S, Glavinas H, Nagy T, Nemeth A.
Test systems for transporter proteins
Patent, P0600408 (2006)

IV.
Pál Á, Kis E, Méhn D, Molnár É , Glavinas H, Nagy T, Mészáros P, Báthori Gy., Krajcsi P és Falkay Gy.
ABC transzporterek - különös tekintettel az ABCG2 - és gyógyszerjelölt molekulák kölcsönhatásának perdikciójára alkalmas *in vitro* módszerek
Acta. Pharma. Hung. (2007), a kézirat közlésre elfogadva

1. Bemutatás

1.1 Az ABC transzporter fehérjék családja

Az emberi genomban 49 ABC fehérjét kódoló gént azonosítottak, valamennyi eddig megismert genomban ezeknek a fehérjéknek megfelelői megtalálhatók. Az ABC (ATP binding cassette) transzporterek a fehérjék egyik legnagyobb családját alkotják. A fehérjecsalád tagjai azonos építőelemekből, transzmembrán domének (TMD) és nukleotidkötő domének (NBD) kombinációjából épülnek fel. Megkülönböztetünk 12 transzmembrán domént és 2 ATP kötő alegységet tartalmazó, úgynevezett egész-transzportereket, valamint 6 transzmembrán domént és 1 ATP kötő alegységet tartalmazó hetero- illetve homodimer fél-transzportereket.

Az ABCC alcsaládba tartozó egész-transzporterek egy csoportja további 5, tehát összesen 17 transzmembrán domént tartalmaz.
Az ABC fehérjecsalád tagjai az ATP kötése és hidrolízise révén felszabaduló energiát úgy alakítják át konformációs mozgássá, hogy különböző fiziológiai funkciókat látnak el: lehetnek aktív transzporterek, ion-csatorna regulátorok / ion csatornák, vagy receptorok.

Az ABC fehérjék többsége aktív membrán transzporter, amelyek ATP energiájának felhasználásával, a koncentráció gradiens ellenében képesek különféle anyagok membránon keresztül történő szállítására. Ezeket a fehérjéket az ATP-kötő, ABC doménjük alapján soroljuk egy családba. A 200-250 aminosavból felépülő szakaszban található az ATP kötésben szerepet játszó, egyéb ATPázokban is előforduló Walker A és Walker B szekvencia. A két Walker motívum között helyezkedik el az egyedi, igen konzervatív ABC ujjlenyomat, vagy 'ABC fingerprint'.
Az ABC proteinek nevezéktana a szekvencia homológián alapul. A közel 50 fehérjét magába foglaló család tagjait 7 alcsaládba sorolják be ABCA-tól ABCG-ig.

Az ABC fehérjék akkor kerülnek az általános érdeklődés előterébe, ha működésük zavara valamilyen betegséghez, vagy olyan állapothoz vezet, amely a betegség gyógyítását befolyásolja, esetleg valamely gyógyszer hatását módosítja. Legismertebb ezek közül a tumorok multidrog rezisztenciája, amely a rák sikeres gyógyszeres gyógyításának egyik legfőbb akadálya. A tumor sejtekben egyik vagy másik aktív transzporterként működő ABC fehérjéből nagyon sok termelődik, és a sejtből kifelé "pumpálva" megakadályozza, hogy a gyógyszermolekulák a sejten belül felhalmozódjanak.
A tumorok egy része reagál a kezelésre, a betegség gyógyítható, míg más daganatok ellenállóak (rezisztensek). Ez utóbbi esetben a terápia során hiába történik hatóanyagváltás, a daganatos sejtek ellenállnak a legeltérőbb kémiai szerkezetű gyógyszermolekuláknak is. Ezt a jelenséget hívják multidrog rezisztenciának. Az utóbbi években elfogadottá vált az a nézet, hogy a jelenségért az esetek egy részében az ABC transzporterek fokozott termelődése és működése tehető felelőssé.
Eddig az MDR1 (ABCB1), az MRP1 (ABCC1), és a BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*, ABCG2) fehérjéről bizonyították, hogy részt vesznek a klinikumban megfigyelt multidrog rezisztencia kialakulásában.

Az egyik nézet szerint a sejteket károsító anyagok kipumpálása lehetett az a szelekciós előny, amely az ABC fehérje család kialakulásához és az egész élővilágban tapasztalható elterjedéséhez vezetett: egy ilyen pumpa-funkciójú fehérje általános védelmet biztosíthat a környezetből az élőlénybe bejutó mérgező vegyületekkel (xenobiotikumokkal) szemben.

Az ABC transzportereknek ismert endobiotikumok is szubsztrátjai. Ezen molekulák homeosztázisának fenntartásával fontos szerepet játszanak, további élettani funkciókat látnak el. Számos olyan öröklődő betegséget ismerünk, amelynek kialakulásáért valamelyik ABC fehérjét kódoló génben bekövetkezett mutáció a felelős. Ezekben az esetekben az adott fehérjefunkció hiánya vagy csökkent mértéke okozza a patológiás megbetegedést.

1.2 ABCB1

Az ABCB alcsalád tartalmaz mind egész- mind fél- transzportereket, vannak közöttük transzmembrán gyógyszer-, vas- és speciális fehérje transzporterek is.
Az ABCB alcsalád tagjai a sejtekben a legkülönbözőbb membrán kompartmentekben helyezkednek el: plazmamembrán, endoplazmatikus retikulum, lizoszómális és mitokondriális membránok.
A család legismertebb tagját, a 170 kDa méretű **ABCB1** fehérjét (**MDR1**[1]**/P-glycoprotein**) 1976-ban írták le – elsőként – CHO (Chinese Hamster Ovary, Kínai hörcsög ovárium) sejtekben, amelyeket citotoxikus szerrel – colchicinnel – kezeltek. A glikolizált MDR1 fehérje a polarizált sejtek lumináls membránjában helyezkedik el olyan élettanilag kulcsfontosságú helyeken, mint a bélbolyhok, az epe kanalikulusok és a vese proximális tubulusok hámsejtjei, valamint a vér-agy gát endothél sejtjei. Az előbbi 'barrier' funkciók következményeként a széles szubsztrát spektrummal rendelkező ABCB1 nagyon fontos élettani szerepet tölt be a szervezetben, a sejtek és a szervek védelmével. A 'túlzott védelem' következménye a tumor terápia során kialakuló citosztatikumokkal szembeni multidrog rezisztencia.

1.3 ABCB11

Az **ABCB11/BSEP** [2]fehérje részt vesz az epesók transzportjában. Mutációja eredményezheti a különböző formájú *progresszív örökletes intrahepatikus kolesztázis* kialakulását, valamint jelentős szerepet játszhat a gyógyszer-indukált hepatotoxicitás kialakulásában, melyet igen gyakran tapasztalnak a gyógyszerfejlesztések során.

[1] MDR1: multiple drug resistance protein 1
[2] BSEP: bile salt export pump

1.4 ABCG2

A humán ABCG fehérje alcsalád tagjai jellegzetes domén szerkezettel rendelkező aktív ABC fél-transzporterek, amelyek jelentősen befolyásolják a gyógyszermolekulák farmakokinetikáját; valamint kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek lipid anyagcseréjében. A transzmembrán domének (TMD) a C-terminálison, míg a nukleotidkötő domének (NBD) az N-terminálison helyezkednek el. Az **ABCG2/MXR/**[3]**BCRP**[4]az alcsalád legjobban jellemzett tagja, fél-transzporter, mely a sejtek apikális membránjában helyezkedik el. Fiziológiásan a legkülönbözőbb szövetekben jelenik meg a szervezetben: a placentában, a vékony- és vastagbélben, a májban, a központi idegrendszerben (a vér-agy gátban), a herében, az ováriumban és az érfalban. A placentában látott különösen magas szint a magzat toxikus hatásokkal szembeni védelmében játszott szerepére utal.
Az egyik legjelentősebb transzporter –az MDR1 és az MRP1 mellett – a tumor terápia során fellépő rezisztenciában, felelős a *mitoxantron* rezisztencia kialakulásáért a tumorsejtekben (MXR). Az ABCG2 fehérje alkalmas lehet orvos diagnosztikai szempontból - mint potenciális őssejt marker- a pluripotens őssejtek szelektálására.
Kimutatták, hogy az ABCG2 overexpressziója megvédi az őssejteket az ischémiás sejthaláltól. Azt feltételezik, hogy a védelem mechanizmusa ebben az esetben a prooxidáns hemszármazékok transzportja, amely csökkenti a szövetet terhelő oxigén szabadgyökök mennyiségét.

1.5 ABC transzporterek és a koleszterin kölcsönhatása

Az eddigi tudományos publikációk alapján kevés tanulmány vizsgálta a koleszterin hatását az ABC transzporterek működésére. Az ABCB1 az egyetlen fehérje, melyet több kutató csoport is tanulmányozott részletesen.

[3] MXR: mitoxantrone resistance protein
[4] BCRP: breast cancer resistance protein

2. Efflux transzporterek funkcionális vizsgálatára alkalmas membrán alapú *in vitro* kísérleti eljárások (esszék)

2.1 Vezikuláris transzport esszé (VT)

A legtöbb ABC transzporter ATP-t használ energiaforrásként a szubsztrátok sejtmembránon keresztül történő transzportálásához. A transzport direkt mérésére alkalmas módszerek közül az egyik legegyszerűbb a vezikuláris transzport esszé.
A vezikuláris transzport esszék tisztított membrán vezikulákon végezhetők, amelyeket baculovírussal fertőzött Sf9 (Spodoptera frugiperda) rovar, valamint a vizsgálni kívánt emlős/humán transzporter fehérjét magas szinten expresszáló sejtekből nyerhetünk ki. A membránpreparátumok jelentős százalékban tartalmaznak olyan zárt vezikulákat, amelyek kifordított „inside-out" orientáltságúak. Ezen vezikulák esetében a transzporter a molekulákat a vezikula belsejébe transzportálja. A transzport hőmérséklet és ATP függő.

A membrán szuszpenzió üvegfilteren, vagy nitrocellulóz membránon történő gyors leszűrésével a vezikulák elválaszthatók. A transzportált molekula mennyiségi meghatározása többféle módszerrel történhet pl.: HPLC, LC/MS, de erre alkalmas a fluoreszcens és radioaktív jelölés is. Talán a legelterjedtebb módszer a tríciummal jelölt szubsztrátok használata, amelynek mérése folyadék szcintillációs technikával történik, de fontos megemlíteni a fluoreszcens úgynevezett „riporter" molekulák növekvő népszerűségét, mely a nagy gyógyszergyárak által támasztott igényeket próbálja kielégíteni.
A VT gátlási teszt azon alapul, hogy a tesztelendő anyag és a transzporter interakciója esetén a jelölt szubsztrát transzportja csökken. A teszt nem tesz különbséget a szubsztrát és inhibitor gátlás között, de kitűnően alkalmas esetleges gyógyszer kölcsönhatások előrejelzésére.

2.2 ATPáz esszé

A különböző gyógyszermolekula-jelölt vagy egyéb vegyületek ABC transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére használt egyik legismertebb módszer a transzporter ATPáz aktivitásának mérése. Az esszé az ABC transzporterek ATPáz működésén alapul, a fehérje a szubsztrát molekulák transzportjához az ATP hidrolízise során keletkező energiát használja fel, a keletkező anorganikus foszfát komplexe kolorimetriásan detektálható.

A transzportált szubsztrát jelenlétében a transzporter ATPáz aktivitása nő (aktiválási teszt). Bizonyos transzporterek esetében, amelyek magas alapaktivitással rendelkeznek, a tesztmolekula és a transzporter közötti kölcsönhatás az alapaktivitás gátlásában nyilvánulhat meg. Az esszék tisztított membrán vezikulákon végezhetők. Az ATPáz esszé rendkívül nagy előnye, hogy a vizsgált anyagok permeabilitása a legtöbb transzporter esetében tetszőleges lehet és megkülönböztethető, hogy a kölcsönható anyagok, szubsztrátjai vagy inhibitorai a vizsgált transzporternek.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Reagensek

A kísérletek során használt kémiai és biokémiai vegyületek kereskedelmi forgalomban beszerezhetőek.

3.2 Membrán preparátumok

A humánsejtből származó ABCG2 fehérjét tartalmazó membrán vezikula preparátumok (ABCG2-M) és a rekombináns baculovírussal fertőzött rovarsejtből származó preparátumok, melyek tartalmazták a humán ABCG2 (ABCG2-Sf9), ABCB1 (ABCB1-Sf9), ABCB11 (ABCB11-Sf9) és az egér Abcb11 (Abcb11-Sf9), patkány Abcb11 (Abcb11-Sf9) fehérjéket a Solvo Biotechnológiai ZRt. szolgáltatta.

3.3 Western blotting

A membrán preparátumokban az ABCG2 fehérje mennyiségének és méretének detektálására „*sodium-dodecyl-sulphate*” (SDS) tartalmú poliakrilamid gélt és BXP-21 monoklonális antitestet használtunk.

3.4 ATPáz esszé

ATPáz aktivitás mérése a PREDEASY ATPase Kit-tel történt. (Solvo Biotechnológiai ZRt., Szeged)

3.5 Vezikuláris transzport esszé

A vizsgált transzportert tartalmazó, úgy nevezett „inside-out” membrán vezikulák ATP jelenlétében és ATP nélkül inkubáltuk a riporter szubsztráttal. A membrán szuszpenzió üvegfilteren történő gyors leszűrésével a vezikulákat elválasztottuk. A transzportált molekula mennyiségi meghatározása folyadék szcintillációs technikával történt.

3.6 Koleszterin tartalom meghatározása

A membránok koleszterin tartalmának meghatározásához a mintákat koleszterol-oxidáz enzimmel oxidáltuk, majd az oxidált származékot centrifugálással kinyertük és HPLC–vel (UV detektorral) analizáltuk.

3.7 Koleszterin tartalom növelése és csökkentése

A membránkészítmények koleszterin tartalmának növelése az ABCG2-Sf9, humán ABCB11-Sf9, egér Abcb11-Sf9 és patkány Abcb11-Sf9 preparátumok esetében ciklodextrinbe (random metilezett ß-ciklodextrinbe, RAMEB-be) komplexált koleszterin alkalmazásával történt, míg a koleszterin tartalom csökkentéséhez ciklodextrint (RAMEB-et) alkalmaztunk.

Transzportereket tartalmazó membrán preparátumok koleszterin tartalmának növelésére alkalmas eljárás a SOLVO Biotechnológiai ZRt. szabadalommal védett, kizárólagos tulajdona.

4. Célkitűzések

Kísérleteink során két expressziós rendszert vizsgáltunk:

1. Sf9/baculovírus (Spodoptera frugiperda)
2. citosztatikummal szelektált emlőssejtek.

- Glikolizáció szerepének vizsgálata
- Ciklodextrin származékok koleszterin kivonó és ciklodextrinbe komplexált koleszterin hatásának tanulmányozása humán ABCG2 fehérjét tartalmazó membrán tesztrendszereken:

- Módszerbeállítás: membrán preparátumok koleszterin tartalmának mérésére HPLC-vel.
- Ciklodextrin származékok hatása a koleszterin tartalomra vezikuláris preparátumokon:
    - Koleszterin tartalom
    - Koleszterin tartalom növelése
- A koleszterin tartalom hatásának vizsgálata a humán ABCG2 működésére (ATPáz és vezikuláris transzport kísérletekkel)
    - Koleszterin tartalom csökkentése (kivonás)

- Koleszterin tartalom növelése (betöltés)
- Új vezikuláris transzport és ATPáz esszék beállítása megnövelt koleszterin tartalmú humán ABCG2-t tartalmazó rovar preparátumokon.
- A koleszterin hatás specificitásának vizsgálata humán ABC transzportereken.

5. Eredmények

Vizsgálataink során az volt a célunk, hogy megállapítsuk a két expressziós rendszerben lévő különbségek (membránösszetétel/ lipidkörnyezet, glikolizáció) mennyire változtatják meg ugyanazon humán transzporter működését. Az emlőssejt által kifejezett protein mérete nagyobb, mivel a rovarsejt rendszerben a glikolizáció nem teljes. Az emlős sejtmembrán koleszterin tartalma - irodalmi adatok és saját mérési eredményeink alapján - megközelítőleg 5-10-szer magasabb a rovar sejtmembránéhoz viszonyítva. Kísérleteink egyértelműen bizonyítják, hogy a két expressziós rendszerben lévő különbségekért a transzporter lipidkörnyezete (koleszterin tartalom) a felelős.

5.1 ABCG2 eredmények

Azonos szubsztrát specificitás, különböző ATPáz profil

Kísérleteink során két, a humán ABCG2 fehérjét tartalmazó membránkészítményt vizsgáltunk. Az ABCG2-Sf9 preparátum az Sf9/baculovírus rendszerből származik. Az ABCG2-M membrán szelektált emlőssejtekből származik.
Kísérleteink arra utalnak, hogy a két expressziós rendszerben lévő különbségek (membránösszetétel/lipidkörnyezet, glikolizáció)) alapvetően nem változtatják meg a transzporter működését, de különösen az ATPáz esszében, a rovarsejtes/baculovírusos rendszer estében jelentősen csökken/nem lehetséges a szubsztrátok esetében a transzporter aktivitásának a háttéraktivitás fölé való aktiválása.

Az ABCG2 fehérje esetében, mind a rovar, mind az emlős preparátum ATPáz és methotrexát transzport aktivitását

megvizsgáltuk különböző ATP és methotrexát koncentrációk jelenlétében. A reakció K_M értéke mindkét vegyület esetében nagyon hasonló volt a két különböző expressziós rendszerre nézve.
A két modell közötti hasonlóság alátámasztására további ATPáz kísérleteket végeztünk mindkét preparátumon. ATPáz aktivitásukat mértük ismert ABCG2-szubsztrátok (szulfaszalazin, prazosin) jelenlétében. Az ABCG2-M esetében a vizsgált anyagok a preparátum ATPáz aktivitását jóval az alapaktivitás fölé emelték. Az ABCG2-Sf9 vagy rovarsejt preparátum esetében ez az aktivitás nem volt mérhető. Ezt követően, további vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy nem a glikolizáltság mértéke okozza az emlős és rovar esszé-rendszer közötti különbséget.

A magasabb membrán koleszterin tartalom lehetővé teszi a szubsztrátok által kiváltott ABCG2 ATPáz aktivitás fokozódás kimutatását az ABCG2-Sf9 preparátumok esetében

Következő lépésként, a membrán összetételét vizsgáltuk a két rendszerben, és a koleszterin tartalomban szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Az emlős mintában megközelítőleg ötszörös mennyiségű koleszterin tartalom volt kimutatható.

Amennyiben a rovar rendszer membrán-koleszterin tartalmát (koleszterintöltéssel) növeltük, úgy az ATPáz esszében, lehetővé vált ABCG2 szubsztrátok által kiváltott ATPáz aktivitás fokozódás kimutatása az ABCG2-Sf9 preparátumok esetében.

A különböző koleszterin tartalom felelős az eltérő ATPáz aktivitásfokozódásért az ABCG2 fehérjét expresszáló rovar és emlős modell rendszerek között

Koleszterin töltés segítségével alkalmassá tettük az ATPáz eljárást, hogy a rovarsejtek által expresszált proteinek alkalmasak legyenek, az ABCG2 fehérje által transzportált szubsztrátok (prazosin, topotekán, szulfaszalazin) kimutatására hasonlóan az emlős preparátumhoz (ABCG2-M).

Megnövekedett ABCG2 mediált vezikuláris transzport a koleszterinnel töltött ABCG2-Sf9 „inside-out" vezikulák esetében

Megvizsgáltuk ismert és gyakran használt ABCG2 szubsztrát (methotrexát) és prazosin ABCG2-mediált vezikuláris transzport aktivitására gyakorolt hatását a koleszterinnek ABCG2-Sf9 vezikulák esetében. A koleszterintöltést követően drámaian megnőttek a maximális transzport sebesség értékek anélkül, hogy a K_M értékek jelentősen változtak volna. ABCG2 methotrexát vezikuláris transzport kinetikai paraméterei tekintetében alacsony koleszterin tartalom mellett: V_{max} *367 pmol/mg/min,* K_M *935 µM*; míg a megnövelt koleszterin tartalom mellett: V_{max} *2144 pmol/mg/min,* K_M *1068 µM* értkeket kaptuk. A prazosin vezikuláris transzport esetében is hasonló mértékű transzport sebesség növekedést tapasztaltunk. (V_{max}*: 85 pmol/mg/min* (alacsony koleszterin tartalom mellett) *702 pmol/mg/min* (megnövelt koleszterin tartalom mellett).

A koleszterin pozitív hatása korrelációt mutat az ATPáz és vezikuláris transzport között

Korrelációs vizsgálatokat folytattunk a magas koleszterin tartalmú rovar és emlős modell-rendszereken ugyanazon ABCG2 szubsztrátot alkalmazva (ösztron-3-szulfát) ATPáz és vezikuláris transzport esszében is hasonlóságot tapasztaltunk a kinetikai értékekre vonatkozóan

Szubsztrát ösztron-3-szulfát		ABCG2-Sf9 koleszterinnel töltve		ABCG2-M	
Eszé típusa	ATPáz	V_{max} nmol Pi/mg /min	K_M µM	V_{max} nmol Pi/mg /min	K_M µM
		35.58	26.42	38.87	15.12
	Vezikuláris transzport	V_{max} pmol /mg /min	K_M µM	V_{max} pmol /mg /min	K_M µM
		3408	14.11	455.5	5.49

5.2 További ABC transzporter eredmények

A rovarsejtben expresszált humán ABCB1 transzporter esetében a megnövelt membrán koleszterin tartalom, kizárólag a bazális ATPáz aktivitás megemelkedését eredményezte.

A koleszterin hatása az ABCB11 transzport aktivitására

A rovarsejtekből preparált humán, egér és patkány ABCB11 transzportert tartalmazó membrán vezikulákat alkalmazva ezen transzporter esetében is detektálható volt a koleszterin transzport sebességet (V_{max}) stimuláló hatása a taurokolát transzport esetében.

6. Összefoglalás

Eredményeink azt mutatják, hogy a membrán lipid összetétel optimalizálásával jelentősen javítható az igen gyakran használt rovarsejtes expressziós rendszerben expresszált heterológ fehérjék aktivitása. A koleszterintöltés közelebb viszi a rovarsejtes expressziós rendszereket az emlős expressziós rendszerekhez. Az így modulált membránok tehát az emlős expressziós rendszerek jobb modelljeinek tekinthetők.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Krajcsi Péternek és a SOLVO Biotechnológiai ZRt. Munkatársainak (különös tekintettel a Szegedi K+F labor Munkatársaira), hogy biztosították a folyamatos szakmai támogatást és a kiváló munkalégkört a munkám során.

Dr. Falkay György Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetében a doktoranduszi tanulmányaim lefolytatására, melynek során folyamatosan támogatott mind szakmailag, mind emberileg.

Pályázati támogatás

A következő magyar pályázatok segítették tudományos munkánkat: NKFP 1A/041/04, INFRA GVOP-3.3.2.-2004–04-0001/3.0, ADME GVOP-3.1.1.-2004-05-0506/3.0 és Asbóth XTTPSRT1; valamint a következő Európai Uniós pályázati források: EU-FP6 Biosim 005137 és EU FP6 Memtrans 518246.