

A máj és tumorok gyógyszer transzportereinek vizsgálata

Doktori értekezés

Bujdosó-Székely Virág

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Laczka Csilla, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Külső konzulens: Dr. Bakos Éva, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tátrai Péter, Ph.D., senior kutató
Dr. Liliom Károly, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof., Dr. Enyedi Péter, Ph.D., az MTA doktora

Tagok: Dr. Enyedi Ágnes, Ph.D., az MTA doktora

Dr. Jemnitz Katalin, Ph.D., vezető kutató

Budapest
2021

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Irodalmi háttér.....	9
1.1. Bevezetés.....	9
1.2. A transzporterek szerepe a farmakokinetikában.....	10
1.3. OATP-k.....	11
1.3.1. Az OATP-k nevezéktana.....	11
1.3.2. Az OATP-k szerkezete.....	12
1.3.3. Lokalizáció és az azt befolyásoló poszttranszlációs módosulások.....	14
1.3.4. Az OATP-k transzport mechanizmusa.....	17
1.3.5. Az OATP-k szubsztrátjai.....	19
1.3.6. Az OATP-k modulátorai: szubsztrátok vagy inhibitorok?.....	21
1.3.7. Az OATP-k klinikai jelentősége.....	22
1.3.8. Az OATP-k egy pontos nukleotid-polimorfizmusai (SNP-i) és mutációi.....	23
1.3.9. OATP-mediált gyógyszer kölcsönhatások.....	27
1.3.10. OATP-k ektopikus megjelenése tumorokban.....	27
1.3.10.1. Az OATP1B3 megjelenése tumorokban.....	28
1.4. ABC transzporterek.....	31
1.4.1. MRP2.....	33
1.4.1.1. Az MRP2 expressziója, szerkezete.....	33
1.4.1.2. Az MRP2 fehérjével kölcsönható vegyületek.....	35
1.4.1.3. Az MRP2 (pato)fiziológiai jelentősége.....	36
1.4.2. ABCG2.....	37
1.4.2.1. Az ABCG2 expressziója, szerkezete.....	37
1.4.2.2. Az ABCG2 fehérjével kölcsönható vegyületek.....	38
1.4.2.3. Az ABCG2 (pato)fiziológiai jelentősége.....	39

1.5.	Vizsgálati módszerek az ADME folyamatokban jelentős OATP és ABC transzporterek gyógyszer kölcsönhatásainak jellemzésére	42
1.5.1.	Az OATP-k vizsgálatában alkalmazott in vitro módszerek	42
1.5.2.	Az ABC transzporterek vizsgálatában alkalmazott in vitro módszerek ...	43
1.5.2.1.	ATP-áz aktivitás mérés	43
1.5.2.2.	Vezikuláris transzport mérés	43
1.5.2.3.	Ép sejtes módszerek	44
1.5.3.	Az OATP és ABC transzporterek együttes vizsgálatára alkalmazott módszerek	44
1.5.3.1.	Modell rendszerek	44
1.5.3.2.	Teszt vegyületek	45
2.	Célkitűzések	47
3.	Módszerek	48
3.1.	Anyagok	48
3.2.	A431 és MDCKII sejtvonalak létrehozása és fenntartása	48
3.2.1.	Transzpozon alapú génbevitel (A431-OATP2B1, MDCKII-ABCG2)	48
3.2.2.	Lentivirális transzdukció	49
3.3.	Western blot	50
3.4.	MRP2 és ABCG2 expressziója Sf9 rovarsejtekben, inside-out vesicle (IOV) preparálás	51
3.5.	Transzport kísérletek Sf9 IOV membránokon	52
3.6.	Transzport kísérletek A431 és MDCKII sejtekben áramlási citometriával	53
3.7.	Pirandin, CB és SR101 toxikusságának vizsgálata áramlási citometriával	53
3.8.	OATP-k funkcionális vizsgálata A431 és MDCKII sejtekben 96 lyukú mikrolemezen	54
3.9.	Transzcelluláris transzport kísérletek	55
3.10.	Sejt életképességi vizsgálatok	57

3.11.	In vivo kísérletek.....	57
3.11.1.	Szubkután xenograft modell	57
3.11.2.	Állattartási körülmények.....	58
3.12.	Adatok kiértékelése és statisztika.....	58
4.	Eredmények.....	59
4.1.	Hepatikus OATP-k funkcionális vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer beállítása és validálása	59
4.2.	Az OATP-k vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer segítségével új OATP szubsztrát/inhibitor kölcsönhatások kimutatása	62
4.3.	Hepatikus detoxifikációban fontos membrán transzporterek vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer kidolgozása.....	65
4.3.1.	Pirandin: a hepatikus OATP1B1 új fluoreszcens szubsztrátja	66
4.3.2.	Az OATP1B1 és MRP2, valamint ABCG2 transzporterek új, közös fluoreszcens szubsztrátjainak azonosítása.....	68
4.3.3.	Az OATP1B1 és MRP2, vagy ABCG2 transzportereket együttesen expresszáló MDCKII sejt vonalak létrehozása, OATP1B1 expresszió beállítása MDCKII-OATP1B1 és MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtekben	72
4.3.4.	MDCKII-MRP2-OATP1B1 és MDCKII-ABCG2-OATP1B1 kotranszfectáns sejt vonalak transzporter funkciójának ellenőrzése áramlási citometriával.....	75
4.3.5.	A felfedezett új, közös fluoreszcens OATP-ABC szubsztrátok nem toxikusak	77
4.3.6.	A fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása.....	79
4.3.7.	Fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása a pirandin festékre OATP1B1 és MRP2 dupla transzfectánsokon	81
4.3.7.1.	A pirandin B-A irányú transzcelluláris transzportja	81
4.3.7.2.	A pirandin intracelluláris akkumulációja	81
4.3.7.3.	A pirandin ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportja	82

4.3.7.4.	A piranin B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása.....	83
4.3.8.	Fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása a CB és SR101 festékekre OATP1B1-MRP2 dupla transzfektánsokon.....	85
4.3.8.1.	A CB B-A irányú transzcelluláris transzportja OATP1B1 és MRP2, valamint ABCG2 dupla transzfektánsokon	85
4.3.8.2.	Az SR101 B-A irányú transzcelluláris transzportja MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánson	86
4.3.8.3.	A CB és SR101 ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportja MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánson	87
4.3.8.4.	A CB és SR101 B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánson	88
4.4.	A tumor-specifikus Ct-OATP1B3-V1 jellemzése	89
4.4.1.	A Ct-OATP1B3-V1 variáns működőképességének jellemzése A431 sejtvonalban.....	90
4.4.2.	A Ct-OATP1B3-V1 expressziójának és funkciójának időbeli nyomon követése	90
4.4.3.	A Ct-OATP1B3-V1 vizsgálata tumor terápiás szerekkel viabilitás tesztekben.....	91
4.4.4.	In vivo kísérletek előkészítése.....	94
5.	Megbeszélés	96
6.	Következtetések	105
7.	Összefoglalás.....	106
8.	Summary	107
9.	Irodalomjegyzék.....	108
10.	Saját publikációk jegyzéke	145
10.1.	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	145
11.	Köszönetnyilvánítás	146

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>RÖVIDÍTÉS</i>	<i>ANGOL</i>	<i>MAGYAR</i>
5-CFDA	5-carboxyfluorescein diacetate	5-karboxifluoreszcein-diacetát
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracil
ABC	ATP binding cassette	ATP-kötő kazetta
ADME	absorption, distribution, metabolism, elimination	abszorpció, disztribúció, metabolizmus, elimináció
ADME-Tox	absorption, distribution, metabolism, elimination, toxicity	abszorpció, disztribúció, metabolizmus, elimináció, toxicitás
AF405	Alexa Fluor 405	Alexa Fluor 405
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-5'-trifoszfát
BCRP	breast cancer resistance protein	emlőrák rezisztencia fehérje
Benz	benzbromarone	benzbromaron
BSP	bromosulphophthalein	bromoszulfoftalein
CaAM	Calcein-AM	Calcein-AM
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	ciklikus-adenozin-monofoszfát
CB	Cascade Blue Hydrazide	Cascade Blue Hidrazid
CCK-8	cholecystokinin octapeptide	kolecisztokinin oktapeptid
CD4	cluster of differentiation 4	differentiációs klaszter 4
CDF	5-(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein	5-(6)-karboxi-2',7'-diklorofluoreszcein
CF	5-carboxyfluorescein	5-karboxifluoreszcein
CLF	cholyl-l-lysyl-fluorescein	kolil-l-lizil-fluoreszcein
CMFDA	5-chloromethylfluorescein diacetate	5-klorometilfluoreszcein-diacetát
CRC	colorectal cancer	kolorektális rák
CYP	cytochrome P450	citokróm P450
CsA	Cyclosporin-A	Ciklosporin-A

DHEAS	dehydroepiandrosterone sulfate	dehidroepiandroszteron-szulfát
E1S	estrone-3-sulfate	ösztron-3-szulfát
EG	estradiol 17-(β -D-glucuronide)	ösztradiol 17-(β -D-glükuronid)
EMA	European Medicines Agency	Európai Gyógyszerügynökség
FDA	U.S. Food And Drug Administration	Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer-, És Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal
FMTX	fluorescein-methotrexate	fluoreszcein-metotrexát
FOLFIRI	folic acid, 5-FU, irinotecan	fólsav, 5-FU, irinotekán
FOLFIX	folic acid, 5-FU, oxaliplatin	fólsav, 5-FU, oxaliplatin
GSMF	glutathione methylfluorescein	glutation metilfluoreszcein
GWAS	genome-wide association study	genomszintű asszociációs tanulmány
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelluláris karcinóma
IOV	inside out vesicle	fordított orientációjú vezikula
ITC	International Transporter Consortium	Nemzetközi Transzporter Konzorcium
LDG	LIVE/DEAD® Green	LIVE/DEAD® Green
LDV	LIVE/DEAD® Violet	LIVE/DEAD® Violet
LY	Lucifer Yellow	Lucifer Yellow
MDR	multidrug resistance	multidrog rezisztencia
MOPS	4-morpholinepropanesulfonic acid	4-morfolinpropánszulfonsav
MSD	membrane spanning domain	membránt átívelő domén
MTX	methotrexate	metotrexát
NBD	nucleotide binding domain	nukleotid kötő domén
NOD-SCID	nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency	nem obéz diabetikus-súlyos kombinált immunhiány

OAT	organic anion transporter	organikus anion transzporter
OATP	organic anion transporting polypeptide	organikus anion transzporter polipeptid
OCT	organic cation transporter	organikus kation transzporter
OCTN	organic cation/carnitine transporter	organikus kation/karnitin transzporter
PGE2	prostaglandine E2	prosztaglandin E2
PI	propidium-iodide	propídium-jodid
PKA	protein kinase A	protein kináz A
PKC	protein kinase C	protein kináz C
PMDA	Pharmaceuticals And Medical Devices Agency	Gyógyszerészeti és Orvosi Eszköz Ügynökség
SLC	solute carrier	solute carrier
SNP	single-nucleotide polymorphism	egypontos-nukleotid polimorfizmus
SR101	sulforhodamine 101	szulforodamin 101
TC	taurocholate	taurokolát
TM	transmembrane domain	transzmembrán domén
TSS	transcription start site	transzkripció start hely
CAPOX	capecitabine, oxaliplatin	kapecitabin, oxaliplatin
ZV	Zombie Violet	Zombie Violet

1. IRODALMI HÁTTÉR

1.1. Bevezetés

Az emberi szervezetben a máj az elsődleges méregtelenítő szerv. Legkisebb egységében, a hepatocitákban szigorúan szabályozott folyamat során történik a különböző endogén és exogén anyagok ártalmatlanítása. A detoxifikáció főleg két nagy transzporter család, illetve a gyógyszerek átalakítását végző enzimek (citokróm P450 enzimcsalád tagjai: CYP1A2, 2B6, 2C8/9/19, 2D6, 2E1, 3A4/5/7) [1] működéséhez köthető [2]. A potenciálisan veszélyes molekulák májsejtekbe való bejuttatását, majd az ott levő enzimek segítségével módosított anyagok epébe vagy vérbe való kijuttatását az Organikus Anion Transzporter Polipeptidek (OATP) és ATP Binding Cassette (ABC) membrán transzporterek végzik [3-5]. Az OATP-k membránfehérjék, amelyek működésük révén nagyméretű, szerves molekulák sejtekbe történő felvételét segítik elő [4, 6]. Az ismert tizenegy humán OATP közül az OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérje van jelen a májsejtekben [7-9]. Az OATP1B1 és OATP1B3 máj-specifikus [7, 8], az OATP2B1 kifejeződik a májban, a vékonybélben, a vér-agy gát sejteiben, a méhlepényben, a szívben és a vázizomban is [4, 9-15]. Mindhárom fent nevezett OATP szállít epesókat és nemi hormonokat. Ezen kívül számos, a klinikumban használt gyógyszer molekulát (például antivirális és kemoterápiás szerek, sztatinok) is felismernek. Megváltozott működésük mutációk, polimorfizmusok, vagy szubsztrátjaik együttes alkalmazása révén eltérő farmakokinetikát, sőt akár nem várt toxicitást (pl. sztatinok okozta miopátia) [12, 16] is eredményezhet. Az OATP-k jelentősége egyrészt tehát farmakokinetikát befolyásoló szerepükben rejlik, másrészt abban, hogy tumorokban egyes OATP-k expressziója az egészséges szövetekétől eltérő. Sőt, létezik egy OATP variáns, OATP1B3-V1, amely csak tumorokban fejeződik ki [17, 18]. A tumorokban megváltozott expressziót mutató OATP-k ígéretes rák-terápiás célpontok.

A méreganyagok sejtekből való eltávolítását nagyrészt az ABC családba tartozó multidrog transzporter (MDR-ABC) fehérjék végzik [5]. Ezek aktív transzporterek, működésükhöz adenzin-5'-trifoszfát (ATP) hidrolízise szükséges. A multispecifikus (sokféle szubsztrátot felismerő) MDR-ABC és OATP fehérjék expressziós mintázata és szubsztrát felismerése átfedő. Mindkét fehérjecsalád esetében ismert, hogy szubsztrátjaik

együttes alkalmazása a működésük gátlásához, és akár nem várt toxicitáshoz vezethet. Emiatt vizsgálatuk a gyógyszerfejlesztés során ajánlott [19].

1.2. A transzporterek szerepe a farmakokinetikában

Az élő sejtek körül a plazmamembrán olyan szelektív határvonalként funkcionál, amelyen csak kevés vegyület, például víz, gázok, kisméretű hidrofób vegyületek, alkohol, urea, vagy kisméretű lipidek egy része tud passzívan keresztül haladni [20]. Ahhoz, hogy nagyobb méretű, töltéssel rendelkező, vagy akár hidrofil molekula a plazmamembránon átjusson, membrán transzporterekre vagy csatorna fehérjékre van szükség [20]. A membrán transzporterek olyan polipeptidek, amelyek a foszfolipid kettősrétegbe ágyazódva segítik különféle molekulák és ionok keresztül haladását a biológiai membránokon [21]. A legtöbb gyógyszer molekula biológiai membránokon való átjutását transzporterek mozdítják elő.

Egy gyógyszer szájon át alkalmazva a bélfal kapuér véráramán keresztül a májba kerül, ahol metabolikus folyamatok során enzimatisz átalakulásokon mehet keresztül. Ezután az epébe, onnan a bélbe és az exkrétumba kerül, vagy a májból a véráramba továbbítódik és végül a veséből a vizeletbe jutva kerül szekrécióna. E farmakokinetikai folyamatok során a gyógyszer számos biológiai membránon jut keresztül, amit transzporterek működése befolyásol. Gyógyszer transzportáló proteinek az emberi szervezetben számos helyen előfordulnak, például határoló, kiválasztó vagy méregtelenítő funkcióval rendelkező szervekben és szövetekben. Ilyenek például a vékonybél, máj, vér-agy gát, vese és placenta [22, 23]. Tehát a membrán transzporterek fontos szerepet töltenek be az Abszorpción, Disztribúción, Metabolizmus, Elimináción (ADME) folyamataiban, az általuk transzportált anyagok felszívódásában, eloszlásában, és kiürülésében [24, 25]. Emellett szubsztrátjaik együttes alkalmazásán keresztül vagy működésük másfajta gátlása révén toxikus állapotok is kialakulhatnak, így összefoglalóan az ADME-Tox folyamatok fontos résztvevői.

A membrán transzporterek négy nagy csoportját különböztethetjük meg. Ezek a Solute Carrier (SLC-k), ioncsatornák, vízcatornák és az aktív, azaz ATP-vel „hajtott” elsődleges transzporterek. Az SLC fehérjék többféle módon transzportálhatják szubsztrátjaikat. Az SLC-k általi transzport lehet koncentráción gradiens mentén történő

facilitált transzport, vagy akár a koncentráció gradienssel ellentétes irányú másodlagosan aktív transzport [26]. Az SLC szupercsalád mintegy 458 fehérjét foglal magába, melyeket 65 családba sorolnak (<https://www.bioparadigms.org/>). Az SLC szupercsaládon belül több olyan fehérje található, amelyek fontosak farmakokinetikai szempontból. Például az OATP családban az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, és OATP2B1, az organikus anion transzporter (OAT) alcsaládban az OAT1 és OAT3, az organikus kation transzporter alcsaládban (OCT) az OCT1 és OCT2, illetve az organikus kation/karnitin transzporter (OCTN) alcsaládban az OCTN1, és OCTN2 [24, 25, 27-29]. Az OATP család tagjai közül a leginkább tanulmányozottak a kifejezetten májspecifikusan termelődő, SLCO1B1 és SLCO1B3 génekről átíródó OATP1B1 és OATP1B3 transzporter fehérjék. Mellettük a hepatocitákban az OATP2B1 is segíti a detoxifikációt [4].

A gyógyszerek transzportjában szerepet játszó másik fehérje család az ABC transzportereké, melyek ATP hidrolízise által katalizálják szubsztrátjaik membránon való áthaladását. A májban az ADME folyamatokban szintén főszerepet játszó ABC fehérjék például az MDR1 (Pgp, ABCB1), MRP2 (ABCC2), vagy az ABCG2 (BCRP), amik a hepatocitákban átalakított anyagok epébe való továbbításáért felelnek, vagy az ABCC3 és ABCC4 fehérjék, amelyek a véráramba továbbítják a konjugált endogén, valamint gyógyszer szubsztrátjaikat [2, 24, 30].

Az OATP és ABC fehérjék szubsztrát felismerése átfedhet, ami például a hepatikus detoxifikáció esetén fontos, hiszen a máj méregtelenítése során szükséges a hepatikus OATP és ABC transzporterek összehangolt működése [31].

Doktori kutatásom során a gyógyszerek ADME-Tox folyamataiban részt vevő OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, valamint ABCG2 és MRP2 transzporterek vizsgálatával foglalkoztam.

1.3. OATP-k

1.3.1. Az OATP-k nevezéktana

Az OATP fehérjéket kódoló SLCO gencsaládot korábban SLC21A-nak nevezték, amíg ezt 2004-ben filogenetikai kapcsolatok alapján SLCO, azaz „solute carrier family of the OATPs” névre módosították [6, 32]. 11 humán OATP fehérjét kódoló SLCO gén ismert.

Az OATP fehérjék az emberi szervezetben számos helyen előfordulnak, és endogén, valamint exogén anyagok sejtekbe való felvételét végzik. Az OATP család tagjait aminosav szekvenciájuk legalább 40%-os azonossága alapján 6 (OATP1-6) családba sorolják [15], a családokon belül pedig 60% azonosság esetén további alcsoportokat különítenek el (például OATP1A, OATP1B). Az alcsoportokon és családokon belül a felfedezés sorrendjében számozzuk az egyes fehérjéket [6].

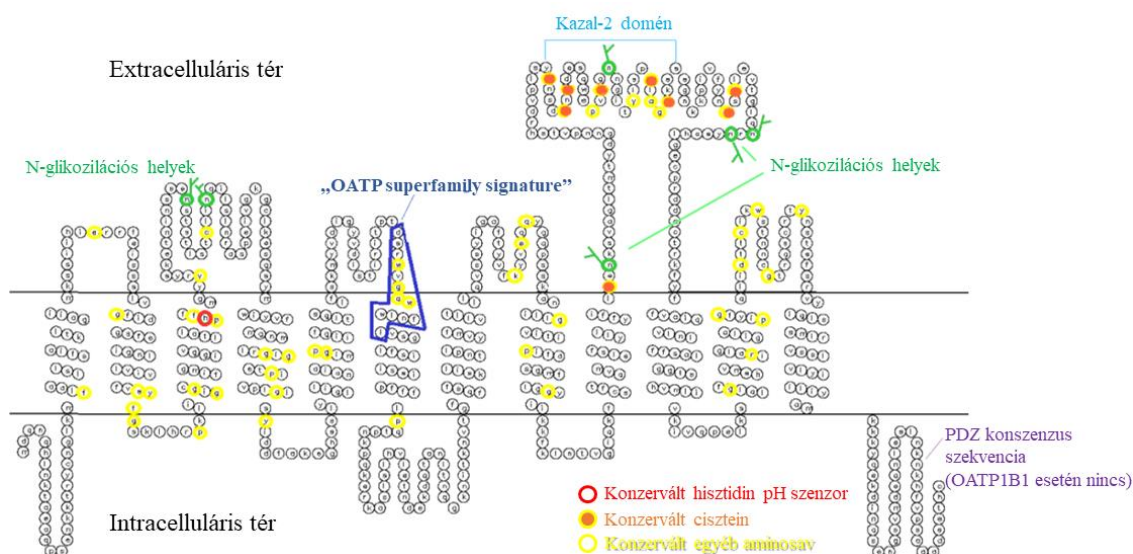
1.3.2. Az OATP-k szerkezete

Az OATP család tagjai 643-724 aminosavból állnak, kivétel az OATP5A1, mely 848 aminosavból épül fel. Pontos térszerkezetük röntgen kristallográfiás és elektronmikroszkópiás vizsgálatok hiányában egyelőre nem ismert. Az OATP-k szerkezetét illetően kizárólag membrán topológia becslési adatokra támaszkodhatunk. Ilyen predikciós modellek alapján az OATP-k 12 transzmembrán doménnel (TM) rendelkeznek, a fehérjék N-, és C-terminális végei pedig intracellulárisan helyezkednek el [13]. Az OATP-eket az SLC család többi tagjától megkülönbözteti egy konzervált motívum, az úgynevezett „OATP superfamily signature”: D-X-RW-(I,V)-GAWW-X-G-(F,L)-L [32] (1. ábra), amely a harmadik extracelluláris hurok és a 6. transzmembrán hélix határán található [33]. Jellegzetes továbbá, az SLC családon belül szintén csak az OATP családra jellemző, a 9. és 10. transzmembrán hélixet összekötő, nagy, átlagosan 100 aminosav hosszúságú 5. extracelluláris hurok, amely 11 konzervált ciszteint tartalmaz [4, 15]. Emellett Kazal-2 típusú szerin proteáz inhibitor domén is megtalálható az 5. extracelluláris hurokban [C-X3-X-C*-X6-P-V-C-X6-Y-X-S-X-C*-X-A*-G-C*] (*:konzervált aminosavak) [34], arról azonban nincs szakirodalmi adat, hogy az OATP-k proteáz gátló funkcióval rendelkeznenek. A konzervált ciszteinek az OATP2B1 esetén bizonyítottan alkalmasak diszulfid-kötések létesítésére, amelyeknek a fehérje sejt felszíni lokalizációjában van szerepe [6, 35]. Az OATP2B1 konzervált ciszteinjeit célzó mutációk hatására a fehérje intracellulárisan rekedt és ösztrol-3-szulfát (E1S) transzport funkciója lecsökkent [35]. Az extracelluláris ciszteinek szerepét a többi OATP-nél egyelőre nem vizsgálták.

Az OATP-k szubsztrát felismerő helyét kialakító aminosavak többnyire a transzmembrán régióban helyezkednek el. Az OATP1B1 és OATP1B3 esetén a 2., 6., 8., 9., 10.

transzmembrán hélixekben és a 6. extracelluláris hurokban lévő aminosavakról igazolták, hogy fontosak a transzport funkcióhoz [22, 36-39].

Az OATP1A2, OATP1C1, OATP2B1, és OATP3A1 C-terminálisukon PDZ domént is tartalmaznak [40-43] (1. ábra). A PDZ elnevezés a PSD95 (post synaptic density protein), Dlg1 (Drosophila disc large tumor suppressor) és zo-1 (zonula occludens-1 protein) fehérjék kezdőbetűiből ered, amelyekben elsőként fedezték fel ezt a fehérje szekvenciát [44]. Az OATP-k esetén ez a PDZ motívum az X(S/T)X ϕ (X: bármely aminosav, ϕ : hidrofób aminosav) szekvenciát jelenti [45], melyhez kapcsolódva a PDZ I osztályba tartozó fehérjék (például a PDZK1, NHERF1, NHERF2, vagy IKEPP proteinek [46]) a transzporterek megfelelő plazmamembránbeli lokalizációját segítik elő. Ezt a patkány Oatp1a2 és a humán OATP1A2 [43, 47], OATP3A1 és OATP1C1 [41] esetén már igazolták. Továbbá az OATP2B1 és a PDZK1 kölcsönhatása bizonyítottan befolyásolja a transzporter funkcióját és lokalizációját [40]. Az OATP1B1 és OATP1B3 szekvenciájában PDZ domén nincs jelen [43, 47], így funkciójuk és lokalizációjuk szabályozása más módon történhet.



1. ábra Az OATP-kre jellemző általános membrántopológia. Az ábra az OATP1B1 kétdimenziós szerkezetét mutatja, amely a HMMTOP program segítségével készült (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>).

1.3.3. Lokalizáció és az azt befolyásoló posztranszlációs módosulások

A 11 humán OATP az emberi test endotél és epitél sejtjeiben található. A szervezeten belüli expressziós mintázatokat többnyire mRNS adatokra alapozhatjuk, de több OATP esetében specifikus antitestekkel végzett fehérje expressziós eredmények is rendelkezésre állnak [25]. Az antitest alapú vizsgálatok alapján az OATP-k a sejtmembránban találhatóak, viszont a prosztaglandin E₂ (PGE₂)-t transzportáló OATP2A1-et a lizoszómákban is kimutatták [48]. A plazmamembrán OATP-k a polarizált sejtekben való lokalizációs mintázatukat tekintve mind apikálisan, mind bazolaterálisan előfordulhatnak. Az OATP1B1 és OATP1B3 [8, 9] a hepatocitákban, illetve az OATP4C1 [49] a vesében bazolaterálisan helyezkedik el, míg az OATP1A2 [50-52], vagy a szervezetben általánosan előforduló OATP4A1 [14, 53-55] leginkább az apikális membránokban található. Érdekes módon az OATP3A1 az agy choroid plexus sejtjeiben két különböző izoformájával is megtalálható, és ezek közül az egyik a sejtek apikális, a másik izoforma pedig a bazolaterális membránjában helyezkedik el [56]. A testszerte előforduló OATP2B1 a máj hepatocitáiban az OATP1B1 és OATP1B3 fehérjékhez hasonlóan a szinuszoidális membránban [57], ám a vékonybél enterocitáiban apikálisan található [13, 58], ahol az OATP1A2 is előfordul [59]. Ugyanakkor más tanulmányok szerint az OATP2B1 a vékonybélben és a vesében bazolaterálisan és apikálisan is detektálható [40, 60, 61]. Az OATP2B1 esetében ezt az ellentmondást még nem sikerült feloldani. További OATP-k, mint az OATP5A1, vagy OATP6A1 szöveti előfordulása már ismert, de plazmamembránbeli pontos lokalizációja egyelőre felfedetlen.

Az OATP-k szöveti megjelenését, és plazma membránban való apikális vagy bazolaterális lokalizációjukat együttesen az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: A tizenegy humán OATP szöveti előfordulása és lokalizációja Hagenbuch [4] és Svoboda [15] alapján.

Fehérje	Gén	Szöveti előfordulás	Lokalizáció
OATP1A2	SLCO1A2	általánosan előfordul: vér- agy gát, máj kolangiocitái, vese-disztális nefron, vékonybél, szem retina, placenta, vörösvértestek, neuronok	apikális
OATP1B1	SLCO1B1	májspecifikus: hepatociták, főleg lobulusokban	bazolaterális (szinuszoidális)
OATP1B3	SLCO1B3	főleg májspecifikus: hepatociták, leginkább a központi vena hepatica körül, hasnyálmirigy Langerhans szigetei	bazolaterális (szinuszoidális)
OATP1C1	SLCO1C1	vér-agy gát, here Leydig sejtjei, choroid plexus	bazolaterális
OATP2A1	SLCO2A1	általánosan előfordul: neuronok, vékony- és vastagbél, méhnyálkahártya, szem retina és ciliáris epitélium	apikális (méhnyálkahártya)
OATP2B1	SLCO2B1	általánosan előfordul: vér-agy gát, máj hepatocitái, vékonybél, vázizom, vörösvértestek, retina, méhlepény trofoblaszt sejtek	apikális (enterociták, vese proximális tubulus), bazolaterális (hepatociták, vese disztális tubulus, enterociták, trofoblaszt sejtek)
OATP3A1	SLCO3A1	agy choroid plexus, neuronok, here, vékonybél	apikális és bazolaterális (choroid plexus)

OATP4A1	SLCO4A1	általánosan előfordul: szem sugártest, vese, hasnyálmirigy, szív, vékonybél	apikális
OATP4C1	SLCO4C1	vesében proximális tubulus	bazolaterális
OATP5A1	SLCO5A1	emlő, szív, magzati agy, vázizom	nincs szakirodalmi adat
OATP6A1	SLCO6A1	agy, here	nincs szakirodalmi adat

Több tanulmányban is vizsgálták az OATP-k olyan poszttranszlációs módosításainak szerepét, mint az N-glikoziláció, vagy fehérje foszforiláció [51, 62-66].

Az OATP-k szerkezetében a második és ötödik extracelluláris hurok több potenciális N-glikozilációs helyet (N-X-S/T) tartalmaz, melyek száma fehérjénként változó lehet. Az OATP1B1 esetében a három lehetséges N-glikozilációs hely együttes mutációja csökkentette a fehérje funkcióját azáltal, hogy az az endoplazmás retikulumban rekedt, illetve expressziója lecsökkent. Érdekes módon az aszparaginok egyenkénti cseréje viszont nem csorbította az OATP1B1 funkciót [65]. Az OATP1A2 fehérje esetében is igazolták, hogy a fehérje expressziója és funkciója is csökken glikoziláció hiányában [51]. Azonban ezeket az adatokat fenntartással kell kezelni, hiszen maga az aminosav csere is okozhat funkcionális különbséget vagy fehérje instabilitást, és nem feltétlenül a glikoziláció elmaradása a felelős az észlelt fenotípusért.

OATP-k internalizációját a transzporter foszforilációja különbözőképpen befolyásolhatja. Az OATP2B1 esetén bizonyították, hogy a klatrinfüggő és a PKC-mediált jelátviteli útvonal szabályozza a fehérje plazmamembránba ékelődését [62]. Megállapították, hogy a forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) hatására aktivált PKC által a fehérje emelkedett foszforilációja, majd internalizációja következett be [62]. Egy évvel később kiderült, hogy az OATP1A2 is hasonlóképpen PKC szabályozó elemek hatására és klatrinburkos vezikulumok révén internalizálódik [66]. Emellett a kazein kináz 2 is befolyásolja az OATP1A2 internalizációs és reciklizációs folyamatait [42, 67]. Az OATP1B1 Golgiból a bazolaterális membránba való vándorlását az intracelluláris cAMP szint növekedés hatására aktiválódó PKA útvonal hajtja meg. Ezt bizonyította, hogy PKA aktivátor hatására a fehérje membrán lokalizációja és E1S transzporter funkciója megmaradt, míg

PKA inhibitor jelenlétében az expresszió és funkció lecsökkent [64]. Az OATP1B1 plazmamembránban való elhelyezkedését emellett a PKC is befolyásolja. A PKC aktivátor PMA hatására az OATP1B1 internalizálódott, és korai, valamint reciklizáló endoszómával is kolokalizált. Következésképpen a fehérje E1S transzport funkciója lecsökkent [68].

A transzporterek lokalizációját befolyásolhatja továbbá oligomerizáció is [69-71]. Az oligomerizációt elősegítendő, a fehérje partnerek között kialakulhatnak diszulfid-kötések. Az OATP1B1 esetében leírták, hogy oligomereket képes kialakítani, és az oligomereket intermolekuláris diszulfid-kötések rögzítik [42, 72]. Az OATP2B1 extracelluláris ciszteinjeit célzó mutagenézis vizsgálatok során pedig azt találták, hogy a fehérje intracellulárisan rekedt [35, 70], ami alapján felvetették annak lehetőségét, hogy a ciszteinek jelenléte a diszulfid-kötődéseken keresztül befolyásolhatja a fehérjék oligomerizációját, és így sejt felszínre kerülését, bár ezt az összefüggést eddig nem bizonyították. Az extracelluláris ciszteineken kívül más aminosavak, motívumok is részt vehetnek az oligomerizációban. Az OATP1B1 8. transzmembrán hélixében található GXXXG motívum is fontos lehet az oligomerizáció szempontjából, mivel a TMD8-ban levő Gly393Ala mutációja csökkent oligomerizációt és E1S transzportot okozott [42, 72]. Az OATP1B3 homo-, illetve az OATP1B1 transzporterrel heterooligomerizálódni is képes, ami fokozott transzport funkciót eredményez [42, 73, 74]. Az OATP1B3 plazma membránba épülését a fehérje N-terminálisa is meghatározza, még pedig a 12-28 aminosavak közötti szakasz [75]. Az OATP1B1 esetén is bizonyítottan fontos az N-terminus első 50 aminosava a plazma membránban való elhelyezkedéshez. Feltételezik, hogy mivel ezek az OATP-k a C-terminusukon PDZ domént nem tartalmaznak, az N-terminális aminosavak szabályozhatják a membránbeli lokalizációjukat [41, 42, 75]. Az organikus anion transzporter polipeptidek poszttranszlációs módosításaihoz kapcsolódó, és egyéb, sajátos szerkezeti elemeit az OATP-k általános, prediktált membrántopológiai ábráján foglaltam össze (1. ábra).

1.3.4. Az OATP-k transzport mechanizmusa

Az OATP-k transzport mechanizmusa egyelőre nem pontosan ismert. Az már bizonyított, hogy működésükhöz ATP nem szükséges, valamint nátrium-, kálium-, és klorid grádiénstől független módon transzportálják szubsztrátjaikat [15, 37]. Viszont több

elképzelés létezik arra, hogy pontosan hogyan történik a transzport. Az egyik feltevés ezt illetően az úgynevezett „rocker-switch” típusú mechanizmus, melynek során a fehérje az extra-/intracelluláris tér felé nyitott/zárt állapotban van, és ez a két állapot a kölcsönható vegyület kötődésének hatására képes egymásba átalakulni [34]. Tehát például szubsztrát kötődésének következtében a fehérje konformációja megváltozik, ezáltal annak centrumában pórus jön létre, melyen keresztül áthaladhat a szubsztrát [34]. Azonban még nem tisztázott, hogy ezzel együtt jár-e egy másik anyag átjutása is a membránon, és ha igen, megegyező vagy ellentétes irányba: ko-transzport vagy kicserélődés („exchange”) útján [76].

HeLa sejtekben expresszáltatott patkány Oatp1a1-en végzett kísérletek alapján fedezték fel először, hogy az OATP-k organikus anion kicserélőként szubsztrájukat bikarbonátra válthatják [77]. Később többen megerősítették a bikarbonátra [77, 78], glutationra [79, 80], vagy annak konjugátumára [81] való kicserélődés lehetőségét [6, 56, 76]. Ez viszont OATP-től függően eltérő is lehet, mivel a taurokolát (TC) szubsztrát glutationra való kicserélődését patkány Oatp1a1 [80] és Oatp1a4 [81] esetén is kimutatták, de a bikarbonátra való kicserélődését csak az Oatp1a1 esetében figyelték meg [77]. Velük szemben az OATP1B családtagok esetében nem tudták igazolni a glutation ellentranszportot a TC transzport során [4, 76]. *Xenopus laevis* oocitákban végzett kísérletek alapján az OATP1B1 és OATP1B3 feltételezetten bidirekcionális facilitált diffúzióval végzi transzportját [76].

Az exchanger mechanizmust támasztja alá egy újabb tanulmány is, amelyben leírták, hogy akár nagyméretű szubsztrátok is kicserélődhetnek egymásra az OATP-k működése révén [82].

Több tanulmány megerősítette, hogy savas extracelluláris pH esetén az OATP-k transzport aktivitása megnő [13, 15, 78, 83]. Az extracellulárisan savas pH kapcsán azonban egyelőre tisztázatlan, hogy a szubsztrát, vagy az OATP transzporter konzervált hisztidinjének protonálódása történik-e meg [78, 84]. Mindezekon túl a transzportot a proton gradiens is szabályozhatja [83]. Saját kísérleteink alapján pedig azt tapasztaltuk, hogy a pH függés szubsztrátonként és OATP-nként eltérő lehet.

1.3.5. Az OATP-k szubsztrátjai

Az OATP-k viszonylag nagyméretű (>300 Da), hidrofób, amfipatikus vagy negatív töltésű szerves molekulákat ismernek fel, de a pozitív töltésű vegyületek OATP-k általi transzportját is megfigyelték már [85].

Az OATP család tagjai szubsztrát felismerésük alapján két nagy csoportba oszthatók. A család mintegy kétharmadát a kevés szubsztrátot felismerő OATP-k teszik ki, amelyek az OATP1C1, OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1, OATP5A1 és OATP6A1. A multispecifikus OATP-k közé az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék tartoznak, melyek számos, nem rokon vegyületet is képesek transzportálni (lásd 2. táblázat). Az OATP1 család tagjai közül az OATP1C1 tiroid hormon transzportjáról ismert, az OATP2A1 és OATP3A1 prosztaglandinokat, az OATP2B1 sztatinokat, szteroidokat és epesókat szállít. Az OATP4A1, OATP4C1 nemi és tiroid hormonokat transzportálnak, és az OATP5A1 és OATP6A1 fehérjékről is azt feltételezik, hogy hormonok transzportjában vesznek részt [86, 87]. Megjegyzendő, hogy utóbbi fehérjékre vonatkozólag még kevés adat áll rendelkezésre, így szubsztrát spektrumuk sincs kellőképpen feltérképezve.

Az OATP-k szubsztrátjai lehetnek endogén vagy exogén eredetű vegyületek [88]. Az endogén szubsztrátjaik általánosságban az epesók (glükokolát, TC), bilirubin és konjugátumai, szteroid konjugátumok (E1S, ösztradiol 17 β -D-glükuronid (EG)), prosztaglandinok, tiroid hormonok [6, 63]. Ezek alapján felételezik, hogy az OATP-k a hormonok, illetve a máj normál homeosztázisának fenntartásában, valamint gyulladásozó folyamatokban fontosak [6, 63]. Eddig azonban néhány kivétellel, nem tudunk konkrét összefüggésről az SLCO gén mutációi és betegségek között. Kivételként ismert a Rotor szindróma (OATP1B1 és OATP1B3 egyidejű mutációja [89]), és a juvenilis neurodegeneráció (OATP1C1 mutáció) [90]. Ezekről bővebben az 1.3.8. fejezetben írok.

Az OATP-k másik jelentősége az exogén szubsztrátok (például toxinok, antivirális és kemoterápiás szerek, koleszterin csökkentők, immunszuppresszánsok) transzportjában van [63]. A multispecifikus OATP-k gyógyszer szubsztrátjaik farmakokinetikájának fontos szereplői. Az OATP családtagok szubsztrátjait részletesen a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat OATP szubsztrátok a www.guidetopharmacology.org adatbázisa, valamint Roth (2012) [6] és Gui (2008) [37] alapján

Fehérje	Endogén szubsztrátok	Exogén szubsztrátok	Inhibitorok
OATP1A2	PGE ₂ , bilirubin, szteroid konjugátumok, epesók, tiroid hormonok	deltorphin II, sztatinok, bromoszulfoftalein (BSP), talinolol, mikrocsisztin, fexofenadin, ouabain, antibiotikumok, metotrexát (MTX), β -blokkolók, HIV proteáz inhibitorok	naringin, rifampicin, rifamicin SV
OATP1B1	bilirubin, szteroid konjugátumok, tiroid hormonok, epesók, leukotriének	rifampicin, BSP, ACE (angiotenzin-konvertáló enzim) inhibitorok, MTX, benzilpenicillin, HIV proteáz inhibitorok, sztatinok	gemfibrozil, rifamicin SV, glicirrhizin, ciklosporin-A (CsA), rifampicin, indocianin zöld, E1S
OATP1B3	leukotrién C ₄ (LTC ₄), kolecisztokinin 8 (CCK-8), bilirubin, szteroid konjugátumok, epesók, tiroid hormonok	eritromicin, rifampicin, BSP, amanitin, digoxin, saquinavir, fexofenadin, ouabain, MTX, benzilpenicillin, sztatinok	gemfibrozil, rifamicin SV, glicirrhizin, CsA, sildenafil, rifampicin
OATP1C1	szteroid konjugátumok, tiroid hormonok, BSP	docetaxel	bisz-penicillamin- enkefalin, probenecid (DPDPE), TC
OATP2A1	prostaglandinok	prostaglandin analógok, kvercetin	bromokrezol zöld, BSP

OATP2B1	tiroxin (T4), dehidroepiandroszteron- szulfát (DHEAS), E1S	glibenklamid, bosentan, BSP, talinolol, aliskiren, fexofenadin, sztatinok	glibenklamid, gemfibrozil, rifamicin SV, sildenafil, erlotinib, verlukast
OATP3A1	vazopresszin, prostaglandinok, tiroid hormonok, arachidon sav, E1S	BQ123, benzilpenicillin	Nincs szakirodalmi adat
OATP4A1	PGE2, TC, szteroid konjugátumok, trijód- tironin (T3), reverz trijód-tironin (rT3), T4	benzilpenicillin	Nincs szakirodalmi adat
OATP4C1	cAMP, E1S, T3, T4	sitagliptin, digoxin, ouabain, MTX	Nincs szakirodalmi adat
OATP5A1	Nincs szakirodalmi adat	kvercetin, satraplatin	Nincs szakirodalmi adat
OATP6A1	Nincs szakirodalmi adat	Nincs szakirodalmi adat	Nincs szakirodalmi adat

1.3.6. Az OATP-k modulátorai: szubsztrátok vagy inhibitorok?

Az OATP-kkel kölcsönható vegyületek lehetnek transzportálódó szubsztrátok, vagy nem transzportálódó inhibitorok (2. táblázat). A legtöbb vizsgálati módszer ezek között nem tesz különbséget. Tovább bonyolítja a képet, hogy az OATP-kkel két, egyidejűleg kölcsönható vegyület gátolhatja, vagy fokozhatja is egymás transzportját, ami a transzport mechanizmusának pontos leírását is tovább nehezíti. Ráadásul ugyanazon vegyület a különböző szubsztrátok transzportjára lehet stimuláló, gátló, vagy éppen semleges hatással is [37, 85, 91].

Például a klotrimazol, ami széles spektrumú antifungális szer, az OATP1B3 EG felvételét serkentette, míg az OATP1B1 által a hormon konjugátum felvétele csökkent a gombaölő szer hatására [37, 92]. Emellett az OATP2B1 DHEAS transzportját a prosztaglandin A1

és A2 stimulálta [93], hasonló hatással volt a progeszteron is az OATP2B1 DHEAS és E1S transzportjára [11]. Ellenben a transzport aktivitást a tesztoszteron és a mifepriston gátolta [11]. Flavonoid vagy zöld tea komponensek is képesek növelni a hormon konjugátumok OATP1B1, illetve OATP1B3 általi felvételét [37, 94]. Ezekre lehetséges magyarázat, hogy az OATP-k több kötőhellyel is rendelkezhetnek, így egyszerre több anyagot is szállíthatnak, amelyek egymás transzportját fokozhatják, vagy elnyomhatják [63]. Az OATP1B1 fehérje esetén az E1S-ra bifázisos telítési kinetikát határoztak meg, ami alapján bizonyították, hogy a fehérje nagy affinitású, kis kapacitású és kis affinitású, nagy kapacitású kötőhelyet is tartalmaz [38, 95, 96]. Az OATP4C1 fehérjéről is feltételezik, hogy több szubsztrát kötő helyet tartalmaz, így a transzporter eltérő régiói lépnek kölcsönhatásba például az E1S-tal vagy a digoxinnal [97].

Általánosságban elmondható, hogy OATP kölcsönhatás szempontjából vizsgált ismeretlen anyag tesztelésekor többféle teszt vegyület alkalmazása is szükséges lehet [95].

1.3.7. Az OATP-k klinikai jelentősége

Mivel az OATP-k számos, a szervezet homeosztázisa fenntartásához szükséges endogén molekulát, valamint exogén anyagokat, például gyógyszereket is szállítanak, normál funkciójuk megváltozása súlyos következményekkel járhat.

Szubsztrátjaik együttes alkalmazása, gyógyszer-gyógyszer/élelmiszer kölcsönhatások, illetve genetikai variánsaik, SNP-k megjelenése komoly mellékhatásokat, akár toxicitást is eredményezhet [98-100]. Klinikai szempontból fontos lehet továbbá, amennyiben expressziós szintjük megváltozik. Például a kolesztázist a májban csökkent OATP1A2, OATP1B1 és OATP1B3 mRNS szintekkel hozták összefüggésbe [101-103], illetve gyulladásoz bélbetegség esetén az OATP2B1 és OATP4A1 expressziója a vékony-, és vastagbélben megnőtt [104]. Mindemellett ismeretes, hogy tumorokban az egészséges szövetektől eltérő expressziós szinten fordulhatnak elő [88]. Az egészséges szövetek közül csak a májszövetben kifejeződő OATP1B3 megjelenik gyomor, vastagbél, hasnyálmirigy rákban is [105, 106], továbbá tüdőrákban [107], illetve emlő-, [108] vagy prosztata daganatban [109], a hepatocelluláris karcinómában viszont alig számottevő mennyiségben van jelen [110-112]. Hasonlóképpen a többi OATP is mutathat

tumorokban az egészséges állapottól eltérő expressziót [88]. Mivel ismert, hogy képesek hormonok és azok konjugátumainak transzportjára [88], ezeket a proliferációhoz szükséges anyagokat a tumor sejtekbe juttatva, elősegíthetik a daganatsejtek túlélését [6], ahogy ezt például az OATP2B1 esetén is megerősítették emlőtumorban [113]. A daganatos megbetegedésekben az OATP-k további jelentősége lehet, hogy a betegség korai detektálásában válhatnak hasznossá. A tumor gyakran olyan extracelluláris vezikulákat szekretál különböző testfolyadékokba (vizelet, vérplazma, nyál), amelyekbe lipidek, fehérjék, DNS, RNS (mRNS, miRNS, lncRNS) csomagolódhatnak [114]. Ezek vizsgálata egyszerű, nem invazív módja a daganat diagnózisában és a tumor jellemzőinek megállapításában. Az OATP1B3 fehérjének létezik rákos típusú izoformája (lásd 1.3.10.1. fejezet), ami például kolorektális rákban nagy mennyiségben megtalálható. Kimutatták továbbá, hogy a daganatos betegek vérérumában a rákos típusú OATP1B3 fehérjét kódoló mRNS detektálható [115]. Ezáltal az OATP-k a daganatterápiában a korai diagnózis felállításához biomarkerként szolgálhatnak, illetve potenciális terápiás célpontok [115-117].

1.3.8. Az OATP-k egy pontos nukleotid-polimorfizmusai (SNP-i) és mutációi

A hepatikus OATP-eket (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1) érintő polimorfizmusok kiemelt fontossággal bírnak, hiszen megváltozott farmakokinetikát eredményezhetnek.

Tömegspektrometriás adatok alapján ismert, hogy az OATP1B1 a legnagyobb mennyiségben előforduló OATP fehérje a hepatocitákban [118-120]. Emellett az OATP1B1 a hepatikus OATP-k közül a legtöbb eddig azonosított SNP-vel rendelkezik. Az OATP1B1*15 (388A>G + 521T>C) haplotípusról tudjuk a legtöbbet, mely két aminosav szubsztitúciót hordoz (Asn130Asp (rs2306283) + Val174Ala (rs4149056)). A vad típusú OATP1B1 (OATP1B1*1a)-hez képest az OATP1B1*15 számos szubsztrátra (EG, E1S, atorvasztatin, citarabin, daunorubicin, docetaxel, gliklazid, glimepirid, MTX, mitoxantron, pravasztatin, SN-38) csökkent transzport aktivitást mutat *in vitro* [121-127]. Emellett az OATP1B1 Val174Ala variáns a bilirubin és tiroxin-szulfát szérumszintjeinek emelkedéséért is felel [128].

Az európai, kaukázusi, és ázsiai populációkban az OATP1B3 fehérje két legnagyobb allél gyakorisággal rendelkező variánsa a Met233Ile (rs7311358) és Ser112Ala (rs4149117)

[129]. Ez a két polimorfizmus egyes tanulmányok alapján kapcsolatosan fordul elő [25, 129]. Önmagában a Met233Ile variáns csökkent aktivitással transzportálja a CCK-8 emésztőrendszeri peptidhormont [129], a docetaxel [124] és paclitaxel [127, 130] citosztatikumokat, illetve a roszuvasztatin koleszterinszint-csökkentőt [129]. Bizonyos vizsgálatok alapján ez a polimorfizmus a vad típushoz képest a tesztoszteront is kisebb hatékonysággal transzportálja, míg más eredmények ezt megcáfolták [109, 131]. Vele ellentétben önmagában a Ser112Ala variáns több tanulmány szerint sem okoz funkciócsökkenést [109, 129, 132]. A Met233Ile és Ser112Ala kettős variáns esetében a CCK-8, roszuvasztatin, docetaxel és tesztoszteron transzport csökkenését is megfigyelték [109, 124, 129]. Az SLCO1B3 variánsait GWAS (genome-wide association study) vizsgálatok alapján a konjugátlan hiperbilirubinémiával és a szérum össz-bilirubin megnövekedett szintjével is összefüggésbe hozták [133].

A három hepaticus OATP közül az OATP2B1 genetikai polimorfizmusait tekintve eddig viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre. A két legnagyobb allél gyakoriságú polimorfizmusa (Arg312Gln (rs12422149), valamint Ser486Phe (rs2306168)) megnövekedett DHEAS [134], illetve csökkent E1S [135] transzportot okoz.

Az SLCO1A2 leggyakoribb, Ile13Thr gén variánsa (rs10841795) [130, 136] a vad típushoz képest magasabb E1S, valamint MTX transzport kapacitást okozott, így a disztális tubulusokból nagyobb mennyiségű MTX reabszorbeálódhat, ami *in vivo* szisztémás toxicitáshoz vezethet [136, 137]. Vele szemben a Glu172Asp (rs11568563) gén variáns HeLa sejtekben a vad típusú fehérjéhez képest csökkent E1S transzportot eredményezett [51, 138].

A gyógyszerek ADME folyamataiban részt vevő transzporterek egy pontos nukleotid-polimorfizmusainak ismerete a különböző genotípusú páciensekben a megváltozott farmakokinetika [139], illetve a gyógyszer kölcsönhatások megértése céljából is fontos. A legtöbb OATP esetén számos ilyen polimorfizmus és annak *in vitro/in vivo* funkcióra kifejtett hatása ismert, melyek közül a leggyakoribbakat a 3. táblázatban foglaltam össze. Bővebb információk a megjelölt forrásokban találhatóak [140].

3. táblázat Az OATP-ket kódoló *SLCO* gének európai, valamint afroamerikai populációban mutatott legnagyobb allél gyakoriságú variánsai Niemi [140] alapján. A változatlan/emelkedett/csökkent transzporter funkciót a ↔/↑/↓ szimbólumok jelölik.

Gén	Nukleotid csere	Aminosav csere	<i>In vitro</i> funkció	<i>In vivo</i> funkció	Referencia
SLCO1A2	38T>C	Ile13Thr	↔/↑	Ismeretlen	[51, 136]
	516A>C	Glu172Asp	↓	Ismeretlen	[51]
	2003C>G	Thr668Ser	↔/↓	Ismeretlen	[51]
SLCO1B1	388A>G	Asn130Asp	↔/↓	↔/↑	[135, 141-143]
	463C>A	Pro155Thr	↔	↔	[141-143]
	521T>C	Val174Ala	↓	↓	[135, 141-143]
	1463G>C	Gly488Ala	↓	Ismeretlen	[141]
	1929A>C	Leu643Phe	Ismeretlen	↔	[142, 143]
	2000A>G	Glu667Gly	↔	Ismeretlen	[141]
SLCO1B3	334T>G	Ser112Ala	↔	↔	[132, 144]
	699G>A	Met233Ile	↔/↓	↔	[132, 144]
SLCO2A1	1186G>A	Ala396Thr	Ismeretlen	Ismeretlen	
SLCO2B1	935G>A	Arg312Gln	Ismeretlen	Ismeretlen	
	1457C>T	Ser486Phe	↓/↑	Ismeretlen	[135, 142]
SLCO3A1	882G>C	Glu294Asp	Ismeretlen	Ismeretlen	
SLCO4A1	209G>A	Arg70Gln	Ismeretlen	Ismeretlen	

	232G>A	Val78Ile	Ismeretlen	Ismeretlen	
SLCO5A1	97C>T	Leu33Phe	Ismeretlen	Ismeretlen	
SLCO6A1	1142A>G	Lys381Arg	Ismeretlen	Ismeretlen	
	1961C>G	Thr654Arg	Ismeretlen	Ismeretlen	

Egyelőre kevés olyan mutáció ismert az OATP-ket kódoló SLCO génekben, amely betegséget okoz. Az eddig ismert konkrét SLCO gén mutáció – betegség összefüggéseket az alábbiakban foglaltam össze.

Az SLCO1B1 és SLCO1B3 gének együttes mutációja révén a bilirubin májbeli felvétele csökken, ami megnövekedett szérumbilirubin-glükuronid szintekhez (hiperbilirubinémia) vezet, mely a sárgasággal járó enyhe tünetegyüttes, az úgynevezett Rotor szindróma okozója [89]. A két fehérje valószínűleg képes átvenni egymás szerepét, tehát csak amennyiben mindkét fehérje hibás/hiányzik, alakul ki ez az enyhe fenotípus. Arról nincs irodalmi adat, hogy valaha végeztek volna a Rotor szindrómával érintett egyéneknél farmakokinetikai vizsgálatokat.

Az SLCO1A2 korábban említett, csökkent E1S transzportot okozó [51] variánsát (rs11568563) a progresszív szupranukleáris parézis (PSP) betegséggel is összefüggésbe hozták. A PSP neurodegeneratív tauopátiás kórkép, melyben az agy olyan, motoros funkcióit ellátó területek érintettek, mint az agytörzs, bazális ganglionok, vagy a középagy [145].

Az SLCO6A1 variánsait több betegséggel is összefüggésbe hozták, például skizofrénia, bipoláris betegség, illetve Crohn betegség [146-148], de ezek multigénesek betegségek, így nem csak a kieső OATP6A1 működésének lehet ezek kialakulásában szerepe.

Egy friss esettanulmány alapján az SLCO1C1 mutációja (Asp252Asn), ami csökkent T4 transzportot eredményez, súlyos neurodegeneratív elváltozásokhoz vezet [90]. Tehát az OATP1C1 általi tiroid hormon transzportnak a normál agyi fejlődésben és működésben van szerepe.

1.3.9. OATP-mediált gyógyszer kölcsönhatások

Mivel az OATP-k multispecifikus transzporterekként sokféle szubsztrátot felismernek, a szubsztrátok egyidejű előfordulása transzportjukat befolyásolhatja. Ilyen esetekben súlyos mellékhatások, akár toxicitás is bekövetkezhet.

Például olyan OATP1B1/OATP1B3-kölcsönható vegyületek, mint a gemfibrozil, CsA, rifampicin vagy ritonavir, OATP szubsztrát sztatinokkal való szimultán alkalmazása sztatin indukált miopátiát okozhat [12, 16]. Ezzel kapcsolatosan történt, hogy a Bayer gyógyszergyár visszahívta egyik koleszterin csökkentő sztatinját, a cerivasztatint (US: Baycol, UK: Lipobay), mivel az Amerikai Egyesült Államokban 31 olyan beteg hunyt el súlyos rhabdmiolízisben, akik közül 12-en a cerivasztatint gemfibrozillal együtt szedték [149]. Később kiderült, hogy a megnövekedett plazma cerivasztatint szint hatására bekövetkező toxicitás hátterében az OATP1B1 transzporter és a CYP2C8 enzim gemfibrozil általi gátlása állt [25, 150, 151].

Fentiek következményeképpen nemzetközi szervezetek, mint az amerikai Food and Drug Administration (FDA) [152], European Medicines Agency (EMA), továbbá az International Transporter Consortium (ITC) [153] is ajánlja bármilyen új gyógyszer fejlesztése során, amennyiben az a májban detoxifikálódik, hogy annak OATP1B1 és OATP1B3 fehérjékkel való kölcsönhatását megvizsgálják.

1.3.10. OATP-k ektopikus megjelenése tumorokban

Számos más fehérjéhez hasonlóan az OATP-k egészséges szövetekben mutatott expressziója megváltozhat patológiás körülmények között. Az egészséges májszövetben magas szinten expresszálódó OATP1B1 fehérje hepatocelluláris karcinómában (HCC) alacsony mennyiségben termelődik [107, 110, 154, 155]. Ezzel szemben vastagbél rákban [156] és petefészek rákban [15], ahol egészséges állapotban az OATP1B1 nem megtalálható, a fehérje megjelenik.

Az OATP2B1 esetében, amely több egészséges szövetben is kifejeződik, a tumorokban mind expressziós szint-növekedést, mind pedig -csökkenést leírtak. Emlődaganatokban egyelőre vitatott, hogy magasabb [157], vagy alacsonyabb [158] mennyiségben termelődik. Csont cisztákban az OATP2B1 magasabb expressziót mutatott, mint a csont

rákos szövetekben [159]. Hasonlóan több OATP2B1-et találtak agydaganatos szövetben [10] és vastagbél rákban [9] is. Pressler és munkatársai pedig kimutatták, hogy az OATP2B1 mRNS szinten máj-, illetve hasnyálmirigy rákban alacsonyabb volt, mint azok egészséges szövetpárjaiban [117]. Az OATP2B1 esetén három, csökkent transzporter működést eredményező SLCO2B1 variáns (rs12422149, rs1077858, rs1789693) hozható összefüggésbe a prosztatarákos betegek hosszabb túlélési idejével [127, 134, 160].

Az OATP1B3 normál esetben a májban expresszálódik, viszont, hasonlóan az OATP1B1-hez, HCC-ben lecsökken a mennyisége. Ez a jelenség az OATP1B1-gyel együtt a sérült fehérje éréssel, illetve alacsony differenciációs státusszal függhet össze, mely gyakran jellemző a rosszindulatú szövetekre. Az OATP1B3 ugyanakkor számos más daganatos szövetben is előfordul, melynek bővebb tárgyalása a következő fejezetben történik.

Az OATP1A2, OATP1C1, OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1, OATP5A1, OATP6A1 esetében is detektáltak megnövekedett expressziót tumorokban [87]. Ezek a fehérjék, valamint az OATP1B1 és OATP2B1 is képesek E1S-ot transzportálni, ami előnyös lehet a hormonfüggő daganatok túlélése szempontjából.

Az OATP1A2 emellett a kasztrációrezisztens prosztata rák sejtek DHEAS felvételét és ezzel a rezisztens daganatsejtek túlélését segítheti [161, 162]. Az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 széles szubsztrát-felismerésük, farmakokinetikában betöltött szerepük és tumorokban való előfordulásuk miatt potenciális terápiás célpontok lehetnek [23].

1.3.10.1. Az OATP1B3 megjelenése tumorokban

Immunhisztokémiai, illetve RT-PCR vizsgálatok alapján az OATP1B3 több daganatos szövetben is megjelenik, például emlő-, prosztata-, tüdő-, vastagbél [163], hasnyálmirigy-, illetve petefészek [87] rákban. Ezen szövetek egészséges formájában az OATP1B3 nincs jelen, vagy legfeljebb csak nagyon alacsony mRNS szinten a vastagbél [106], illetve hasnyálmirigy [116] sejtjeiben.

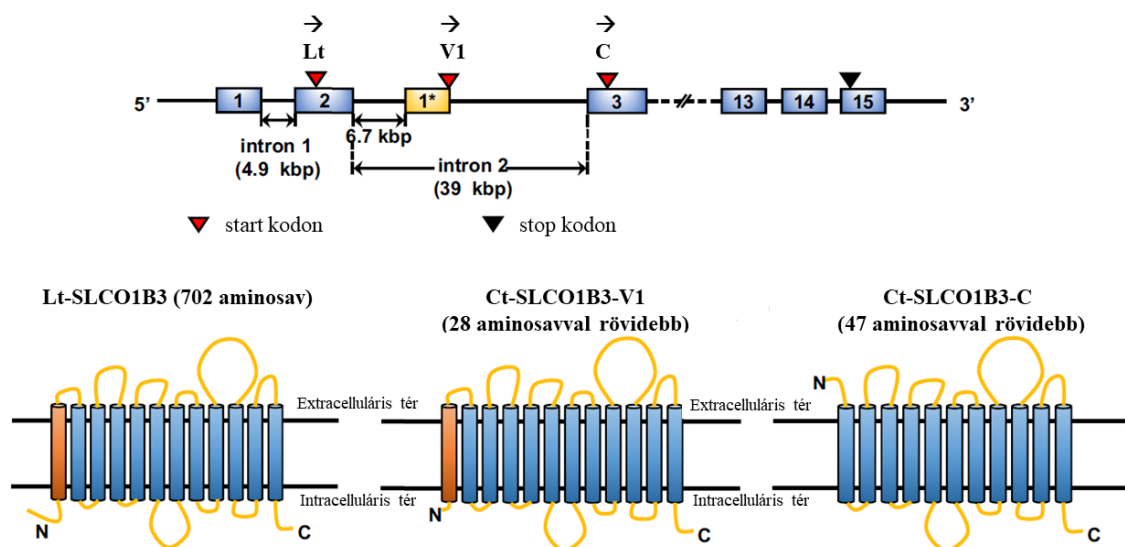
Korábban azt gondolták, hogy a tumoros szövetekben az OATP1B3 hosszú (Lt-OATP1B3, 702 aminosav hosszúságú) típusa szerepel, csakúgy, mint az egészséges máj lobulusok centrális vénája körüli hepatocitákban [15, 18, 105-109]. Azonban Thakkar és munkatársai 2013-ban RT-PCR kísérletek segítségével tisztázták, hogy az Lt-OATP1B3

sem daganatos vastagbél-, valamint hasnyálmirigy szövetekben, sem ezen szervek egészséges szöveteiben nem fordul elő, kizárólag az egészséges májban. A tumoros szövetekben viszont rövidebb mRNS jelenik meg, amit Ct-SLCO1B3-nak neveztek el (ct=cancer-type, rákos típus) [18]. A Ct-SLCO1B3 tumorspecifikus megjelenését Thakkar és munkatársaival egyidőben többen is igazolták [17, 164].

Az OATP1B3 rákspecifikus izoformáját Nagai és munkatársai 5' RACE módszer segítségével azonosították [164]. Vastagbél-, és tüdőrákos szövet mintákból állapították meg, hogy ennek a fehérjének az mRNS-e az SLCO1B3 második intronján belül lévő alternatív transzkripció start hely (TSS)-ről képződik, amelyről 2 potenciálisan képződő ORF lehetséges. Ezek közül a 655 aminosav hosszúságú ORF a Lt-OATP1B3 N-terminálisától 47 aminosavval rövidebb fehérjét eredményezett, melyet Ct-OATP1B3-nak neveztek el.

Ha az alternatív TSS után a másik ATG-ről indul az átírás, akkor a Lt-OATP1B3 N-terminálisától 28 aminosavval rövidebb OATP1B3-V1 fehérjét kódoló mRNS képződik (2. ábra), melyet két kutatócsoport is felfedezett egymástól függetlenül [17, 18]. Imai a V1-et 5' RACE segítségével azonosította több daganatos sejtvonalban (PK-8, PK-45P, DLD-1, TFK-1, HepG2, és Caco-2), ahol a Lt-OATP1B3 viszont nem volt detektálható. Thakkar és munkatársai [18] vastagbél-, és hasnyálmirigy rákos szövetekben szintén 5' RACE segítségével számos (16) variánst azonosítottak. A leggyakoribb ORF-ben átíródó fehérjét OATP1B3-V1-nek nevezték el.

Kezdetben eltérően nevezték a rákos típusú OATP1B3 fehérjét. Végül Furihata alapján a 47 aminosavval rövidebb verziót Ct-OATP1B3-C-nek, a 28 aminosavval rövidebb fehérjét pedig Ct-OATP1B3-V1-nek nevezzük. Ezeket egyszerűsítve „C” és „V1” jelölésekkel használom a dolgozatomban a fehérjék megkülönböztetése céljából.



2. ábra Az *SLCO1B3* gén szerkezete, és a képződő *OATP1B3* variánsok prediktált membrántopológiája Sun (2020) [165] alapján

Teft és munkatársai azt találták, hogy vastagbél rákban a magasabb *OATP1B3* expresszió rosszabb prognózist eredményez [166]. Emellett Hamada és munkatársai [109] kimutatták, hogy a Ser112Ala és Met233Ile aminosav cserét és csökkent tesztoszteron transzportot eredményező polimorf allél jelenléte prosztatara káros betegekben jobb túléléssel társul [109].

Membrántopológia becslések alapján a C típus 11 transzmembrán hélixszel rendelkezik. Amennyiben az *OATP*-k működéséhez 12 transzmembrán hélix szükséges, a C variáns működőképessége megkérdőjelezhető. Sun és munkatársai [167] azt találták, hogy a 47 aminosavval rövidebb izoforma nem aktív. A V1 variáns ezzel szemben képes lehet 12 transzmembrán hélixet kialakítani, ami megfelel az *OATP* transzporterek általános prediktált topológiájának [18]. Ennek ellenére Thakkar és Chun a V1 esetén nagy mértékben csökkent plazma membrán lokalizációt, illetve transzporter funkciót mutatott ki [18, 75]. Thakkar szerint emiatt az első 28 aminosav a fehérje lokalizációját és transzporter aktivitását is meghatározza [18, 75]. Később azonban Chun megállapította, hogy a fehérje N-terminálisán elhelyezkedő 12-28. aminosav fontos a membránba való lokalizációhoz (míg az első 11 aminosav hiánya nem csorbítja a lokalizációt) [75]. Ezzel szemben Imai és munkatársainak eredményei alapján a V1 a plazmamembránba lokalizálódik és képes a fluvasztatin, EG és rifampicin transzportjára is [17].

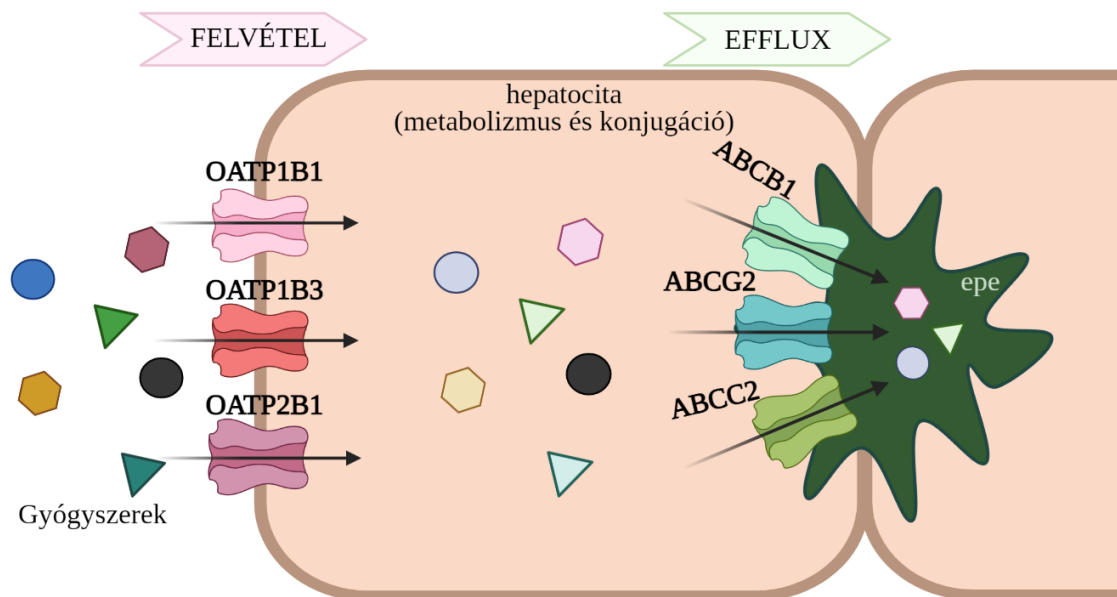
Ismeretes, hogy a poszttranszlációs módosítások, mint a glikoziláció és foszforiláció a membránfehérjék lokalizációját és aktivitását is befolyásolják [62]. A rákos típusú OATP1B3 a Lt-OATP1B3-hoz képest eltérő mértékben megy keresztül poszttranszlációs módosításokon és proteaszómális degradáción [18]. A V1 a hosszú izoformához képest sokkal kevésbé glikozilálódik [18]. Thakkar és munkatársai V1-et expresszáló HCT 116 kolorektális rák sejteket epoxomicin (proteáz inhibitor), illetve ammónium-klorid (lizoszómális inhibitor) kezelésnek vetették alá. Eredményeik alapján megállapították, hogy a Ct-OATP1B3-V1 a hosszú izoformánál érzékenyebb a proteaszómális lebomlásra [18].

A kolorektális rák (CRC) a harmadik leggyakoribb daganat típus a világon és általában már második vagy harmadik stádiumú, amikor a betegnél diagnosztizálják [168]. A mortalitás csökkentése céljából fontos a CRC korai diagnózisa és személyre szabott terápiás kezelése. Azonban a már elérhető CRC diagnosztikai markerek nem elég érzékenyek a korai stádium jelzésére [169-173]. A rákos sejtekből származó szérumbeli exoszómák a daganatsejtek molekuláit hordozhatják [174] (pl. glioblasztómás betegek szérumbeli exoszómáiban tumor specifikus mRNS splicing variánsokat találtak) [175]. Ha CRC-eredetű extracelluláris vezikulákban is megjelenik a rákos típusú SLCO1B3 mRNS, akkor CRC diagnosztikai biomarker válhat belőle [115]. Ennek vizsgálatára Morio és munkatársai CRC sejtvonalakból egér xenograftokat készítettek, és az egerek szérumának extracelluláris vezikuláit vizsgálták, melyekben megtalálható volt a Ct-SLCO1B3 mRNS-e [115]. Ez alapján a Ct-SLCO1B3 mRNS megfelelő CRC biomarker lehet. Ezt támasztja alá egy másik tanulmány is [173], amelyben azt vizsgálták, hogy a tumorspecifikus OATP1B3 mennyire alkalmas a kolorektális rák korai kimutatására. Vizsgálataik alapján a rákos SLCO1B3 mRNS a már rutinszerűen alkalmazott CEA markerhez képest vastagbél tumorokból jóval érzékenyebben és specifikusabban kimutatható markernek bizonyult [173].

1.4. ABC transzporterek

Az ADME folyamatoknak az SLC-knél sokkal régebb óta és behatóbban tanulmányozott szereplői az ABC (ATP Binding Cassette) transzporterek. A humán ABC transzporter családba 48 fehérje tartozik. Az OATP-khez hasonlóan a szekvencia azonosság mértéke alapján sorolják őket hét, ABCA-G alcsaládba. Legtöbbjük aktív transzporter,

szubsztrátjaik transzportját ATP hidrolízise kíséri. Az ABC fehérjék között azonban előfordul ioncsatorna, mint az egyik leggyakoribb egygénis öröklődő betegségért felelős CFTR (cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, ABCC7) [176], valamint ioncsatorna regulátorként (szulfonil urea receptor (SUR)) [177] működő fehérje is. Az ABC fehérjék kiemelt fontosságúak gyógyszertranszportáló képességük miatt is. Ilyen multispecifikus ABC transzporterek a P-glikoprotein (ABCB1, P-gp, MDR1), az ABCC fehérjecsalád több tagja ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), és az ABCG2 fehérje (BCRP) [178]. Ezek a szervezet mérgező anyagokkal szembeni védelmét látják el, amit az immunrendszer analógiaként, kemoimmunitásnak neveztek el [179]. Ugyanakkor ezek a multispecifikus ABC transzporterek a tumoros sejteket is megvédik azáltal, hogy a tumor elpusztítására szánt gyógyszereket kipumpálják a rákos sejtéből. Ráadásul, mivel sokféle gyógyszert felismernek, a kezelés során használt kemoterápiás szereken kívül számos más citosztatikum ellen is védelmet biztosítanak a ráksejteknek. Emiatt nevezik őket multidrog rezisztencia fehérjéknek (MDR) is. Az ABC transzporter család tagjai számos szövetben együttesen is előfordulnak és kiegészíthetik egymás működését azáltal, hogy szubsztrát felismerésük nagymértékben átfed [180, 181].



3. ábra Hepatikus OATP és multispecifikus ABC transzporterek együttes működése a hepaticus detoxifikációban

A májban zajló méregtelenítés során a korábban említett SLC transzporterek, köztük például az OATP-k szükségesek a molekulák hepatocitákba való felvételéhez. A májsejtekben metabolikus enzimek általi átalakítások sorát követően a metabolitok, vagy akár az átalakítatlan szubsztrát epébe vagy vérbe való kipumpálásért (efflux), vagy a portális vénába való visszajuttatásáért a multispecifikus ABC transzporterek felelnek. (3. ábra).

A fő hepatikus ABC transzporterek az ABCB1, ABCB11, MRP2 (ABCC2), ABCC3, ABCC4, ABCC6 és ABCG2 [158, 182, 183]. A hepatociták kanalikuláris membránjában helyet foglaló ABC transzporterek (ABCB1, MRP2, ABCG2) egyfelől endogén szubsztrátként epesókat szállítanak az epébe, de emellett gyógyszerek (exogén szubsztrátok) kanalikuláris ürülésében is részt vesznek [3]. Az ABCC3, ABCC4 és az ABCC6 az ABCB1, MRP2 és ABCG2 fehérjékhez hasonlóan MDR transzporter, együtt a hepatociták bazolaterális/szinuszoidális membránjában gyógyszerek vérbe való szekrécióját katalizálják [158, 184, 185].

Az FDA és EMA nemzetközi szervezetek a hepatikus OATP-khez hasonlóan több hepatikus ABC fehérje vizsgálatát (ABCB1, MRP2, ABCG2) is előírják új gyógyszer hatóanyagok fejlesztésekor [19].

Munkám során az ABC transzporter családból az MRP2 és ABCG2 fehérjékkel foglalkoztam, így a továbbiakban ezekről fogok részletesen írni.

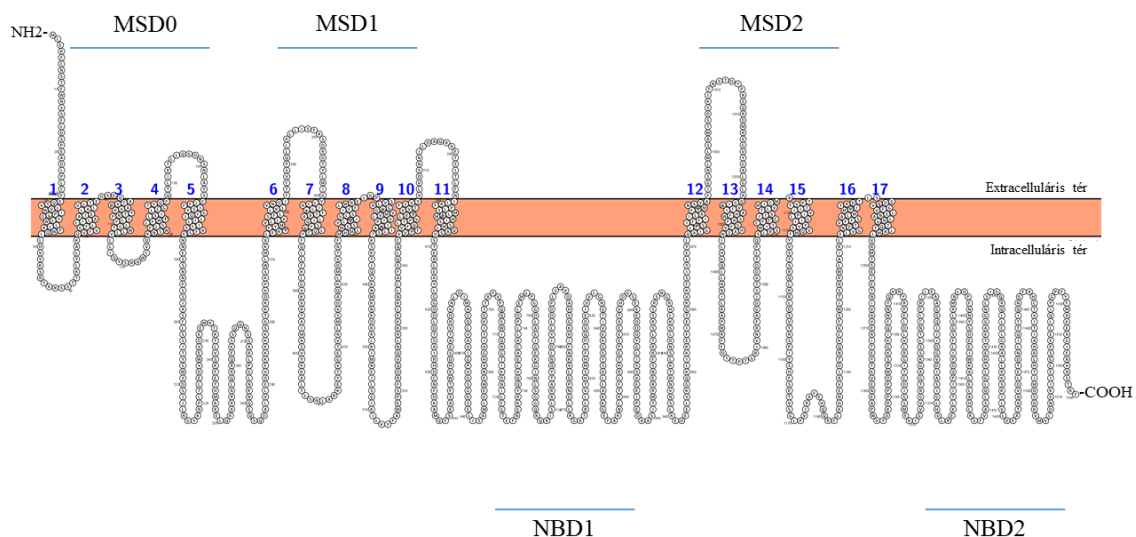
1.4.1. MRP2

1.4.1.1. Az MRP2 expressziója, szerkezete

Az MRP2 fehérje fiziológiásan főleg a hepatociták kanalikuláris membránjában található [186], ahol az epe felé olyan poláris vegyületeket pumpál, mint gyógyszer metabolitok, illetve epesó-, vagy hormon konjugátumok. Az MRP2-t kimutatták továbbá a vese proximális tubulusaiban, enterocitákban és az epehólyag epitél sejtjeinek apikális membránjában is [187-190]. Humán placentában is detektálták [191], valamint patkányban alacsony mennyiségű Mrp2 mRNS-t a tüdőben és gyomorban [192], illetve perifériás vérsejtekben, kifejezetten CD4+ limfocitákban [193] is találtak. Az MRP2 vér-agy gátban levő expressziójára nézve ellentétes eredmények születtek [74, 194, 195].

Az MRP2 térszerkezetét tekintve három MSD (membrane spanning domain) doménből, azokon belül pedig összesen 17 transzmembrán hélixből áll [196]. A 190 kDa méretű fehérje [197] MSD0 és MSD1 doménjei az L0 intracelluláris hurkon keresztül kapcsolódnak. Az MSD1-2 domének 6-6, az MSD0 domén pedig 5 membránon átnyúló régióból áll. A fehérje N terminálisa az MSD0 doménhez kapcsolódik [198, 199]. Ez az extra domén csak az ABCC alcsalád egyes tagjaira jellemző [200]. Az MRP2 két ATP-kötő hellyel, NBD1 és NBD2 (nucleotide binding domain) rendelkezik [196]. Az MRP2 „core” régiója, amely a transzport funkcióhoz szükséges, az NBD1-2 és MSD1-2 doménekből áll [197]. A szubsztrát kötésben fontos aminosavak irányított mutagenézis vizsgálatok alapján a 6., 9., 16. és 17. transzmembrán hélixekben található [201].

Az MSD0 és L0 domének az MRP2 apikális membránokba való irányításában nélkülözhetetlenek, amit azzal bizonyítottak, hogy ezen domének hiányában a fehérje intracellulárisan reked [202]. Emellett a C-terminálisnak, különösen a PDZ-interakciós motívumnak is szerepe van a fehérje plazmamembránbeli lokalizációjában [203-205]. Egy 2017-es tanulmányban az ABCC2 gén hét különböző mutációjáról bizonyították, hogy a fehérje expresszióját, funkcióját, vagy membránban történő lokalizációját is befolyásolhatja [206]. Az MRP2 fehérje prediktált membrántopológiája a 4. ábrán látható.



4. ábra Az MRP2 membrán topológiája az UniProt adatbázisa alapján. Az ábra a Protter szoftver [207] segítségével készült.

1.4.1.2. Az MRP2 fehérjével kölcsönható vegyületek

Az MRP2 multispecifikus transzporter lévén többféle szubsztrátot felismer. Ezek antibiotikumok, rákellenes szerek, antivirális vegyületek, egyéb gyógyszerek, endogén szubsztrátok és fluoreszcens molekulák. Főleg anionos vegyületeket transzportál, többek között másodlagos metabolitokat, pl. glutation konjugátumokat, glükuronidokat, szulfátokat. Emellett több inhibitora is ismert.

Fiziológiás szubsztrátjai leginkább hormonok és epesók konjugátumai: E1S [208], EG [196, 209], szulfatált epesók [210, 211], tetrahidroxi epesók, továbbá bilirubin glükuronid konjugátuma [212, 213], leukotriének (C4, D4, E4) [214], glutation (redukált vagy oxidált formában is) [215, 216], T3 [217].

Gyógyszer szubsztrátjai lehetnek például citosztatikumok (MTX [218], irinotekán, ciszplatin [196], doxorubicin [187, 219-221], paclitaxel [222]), HIV proteáz inhibitorok (ritonavir, saquinavir [196], lopinavir, atazanavir, indinavir [223]), antibiotikumok (ampicillin, azitromicin [196]), illetve sztatinok, pl. pravasztatin [196]. A 4. táblázatban endogén és exogén MRP2, valamint ABCG2 és OATP1B1 szubsztrátok összefoglaló felsorolása megtalálható.

Az MRP2 szubsztrátok fontos csoportját alkotják a fluoreszcens vegyületek, amelyek a fehérje működésének vizsgálatához egyszerű és költséghatékony módszereket biztosítanak. Ilyen például az 5-(6)-karboxi-2',7'-diklorofluoreszcein (CDF) [197], a Ca^{2+} indikátor Fluo-3, [224], vagy a nem fluoreszcens 5-karboxifluoreszcein-diacetát (5-CFDA) intracellulárisan fluoreszcens 5-carboxifluoreszceinné (CF) alakuló formája [224]. Az MRP2-nek további fluoreszcens szubsztrátjai a Texas Red [225], fluoreszcein-metotrexát (FMTX) [226-228], a kolil-L-lizil-fluoreszcein (CLF), SR101 (szulforodamin 101) [194, 229], és a (CMFDA (5-klorometilfluoreszcein-diacetát)-ból intracellulárisan kialakuló) GSMF is [230].

Az MRP2 működését bizonyítottan gátolják: MK571 [231], benzobromaron (Benz) [232], probenecid [233], Na^+ -fuzidát [234], indometacin [235], CsA [231], rifampicin [226].

1.4.1.3. Az MRP2 (pato)fiziológiai jelentősége

Az MRP2 klinikai jelentősége sokrétű. Fiziológias körülmények között a hepatikus detoxifikáció során az átalakított anyagok eltávolításában játszik szerepet. A májban a méregtelenítés folyamán a vegyületek különböző, oxidációért (citokróm P450) és/vagy konjugációért (UDP-glükoronozil-transzferázok és szulfotranszferázok) felelős metabolizáló enzimek által hidrofilebb metabolitokká alakulnak, majd az ABC transzporterek működése révén az epébe jutnak. Az MRP2 számos metabolitot és konjugátumot felismer, és azokat az epébe pumpálja [197].

Génjében történő mutációk által funkciója megváltozhat, mely hatására szubsztráinjainak plazmabeli koncentrációja a várttól eltérő lehet, és így nem várt kockázatokat okozhat. Az MRP2 több mutációja is az örökletes Dubin-Johnson szindrómát okozza [226, 236]. Ezek a fehérje funkciójának elvesztését eredményezik, amely által a vérben megnő a bilirubin szint. A hiperbilirubinémiához és sárgasághoz vezető tünetegyüttes azonban májkárosodást, illetve betegséget nem okoz [226].

Az MRP2 defektív működéséből fakadóan a gyógyszerek csökkent biliáris ürülése szintén emelkedett szérumbeli gyógyszer szinteket okozhat, és azok eliminációját negatívan befolyásolhatja [196], ezáltal toxicitáshoz vezetve. Ezt MRP2-hiányos patkányokban többen bizonyították [196, 237-239]. Ugyan az MRP2 transzportert tumorterápiákkal kapcsolatban nem gyakran említik tipikus gyógyszer rezisztenciát okozó efflux transzporterként, mégis több humán tumorban megjelenik, például kolorektális daganatban (kamptotecin efflux), emlőrákban, illetve leukémiában (antraciklinek kipumpálása) és petefészek rákban (ciszplatin efflux) [240-242]. Mindemellett ciszplatin-rezisztens sejtvonalban az MRP2 overexpresszióját figyelték meg [241, 243], továbbá overexpresszióját összefüggésbe hozták MTX, vinkrisztin, doxorubicin és epidofilotoxinokra kialakult keresztrezisztenciával is [196, 209, 218, 244].

1.4.2. ABCG2

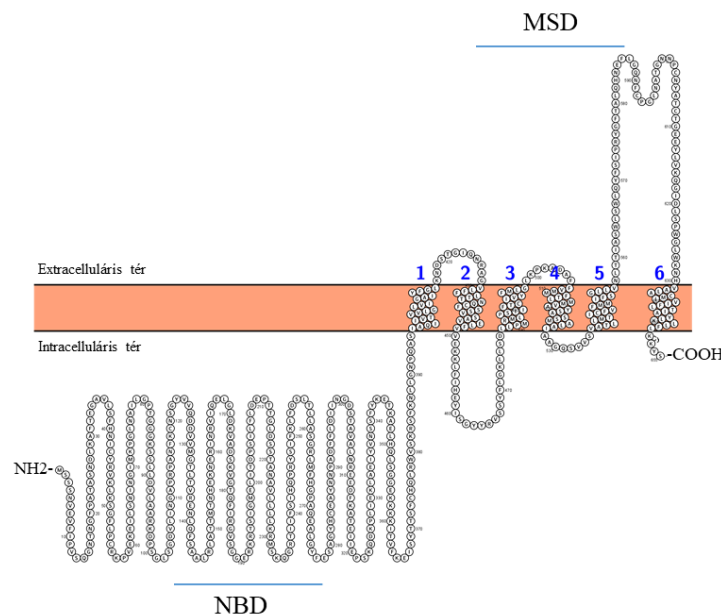
1.4.2.1. Az ABCG2 expressziója, szerkezete

A humán ABCG2 fehérjét az ezredfordulón egymástól függetlenül három kutatócsoport szinte egyidejűleg klónozte. Felfedezésük alapján eltérően is nevezték el ezt a fehérjét. Elsőként 1998-ban Allikmets, valamint Doyle fedezték fel a placentában, illetve emlődaganatban. Allikmets és munkatársai az ABCG2 megnövekedett expresszióját tapasztalták a méhlepényben, ezért placenta-specifikus ABC fehérjének (placenta-specific ABC protein, ABCP) nevezték el [245]. Doyle és munkatársai a drogrezisztens emlőtumorban megnövekedett expressziójú fehérjét pedig mellrák rezisztencia fehérjének (BCRP: breast cancer resistance protein) nevezték [246]. Továbbá még egy kutatócsoport (Miyake és munkatársai) egy évvel később mitoxantronnal szelektált vastagbél daganatban azonosították az ABCG2-t, így mitoxantron rezisztencia fehérje (MXR) névre keresztelték [247]. Ezek az elnevezések viszont nem helytállóak, hiszen az ABCG2 határozottan nem csak a placentában megfigyelhető, illetve az említett daganatokban sem kizárólag az ABCG2 hozható összefüggésbe a kedvezőtlen klinikai kimenetekkel [248]. A HUGO alapján ezt a fehérjét ABCG2-nek nevezem a dolgozatomban.

Az ABCG2 fehérje az ABC család többi tagjához hasonlóan számos endogén és exogén vegyületet transzportál, illetve az emberi test rendkívül sok szövetében előfordul. A vékonybél enterocitáiban, a vér-agy gát endotél és a placenta szinciciotrofoblaszt sejteiben, a hepatociták kanalikuláris membránjában, a vese proximális tubulusaiban, az emlőmirigyekben, de még a szőrzeti tüszőmirigyekben is megtalálható [248]. Az ABCG2 számos fiziológiás szubsztrátot felismer, mint az E1S, 17 β -ösztradiol, EG vagy húgysav [249]. Az ABCG2 fontos gyógyszer transzporter is [248]. Például a vér-placenta barrieren gyógyszerek és xenobiotikumok ürülését segíti a magzatiból az anyai vérkeringésbe. Bcrp1^{-/-} egerekben a vad típushoz képest a magzati keringésben többszörös nitrofurantoin és glibenklamid volt található [178].

Az ABCG2 gén a 4q22 kromoszómán helyezkedik el, és 655 aminosavból álló transzmembrán fehérjét kódol [178]. Különlegessége, hogy úgynevezett fél-transzporter, mivel egyetlen MSD és egy NBD doménből áll, és ezek a többi ABC család tagjaihoz

képest fordított sorrendben követik egymást [178]. Az MSD a C-terminális közelében helyezkedik el, 6 membránt átszelő hélixből áll, amelyeket intra-, és extracelluláris hurkok kötnék össze [248] (5. ábra). Működőképes formáját oligo-, vagy dimerizáció révén éri el [249-252]. Potenciális két N-glikozilációs aminosava közül csak a C-terminálishoz közelebb elhelyezkedő, 596. aszparagin glikozilálódik [253]. Az ABCG2 működését befolyásolhatja a glikoziláció, bár rovar sejtekben termeltetett formája, amely csak úgynevezett „core” glikoziláción esik át, is működik [250]. Leginkább a dimerizáció fontos a fehérje membránba ágyazódásához és transzporter funkciójának betöltéséhez [254].



5. ábra Az ABCG2 membrán topológiája az UniProt adatbázisa alapján. Az ábra a Protter szoftver [207] segítségével készült.

1.4.2.2. Az ABCG2 fehérjével kölcsönható vegyületek

Az ABCG2 fiziológias szerepe a szervezet xenobiotikumokkal szembeni és a hemopoetikus őssejtek hem-indukált toxicitás elleni védelme, a tápanyagok anyatejbe való átkerülésének elősegítése, a húgysav veséből való kiürítése [249]. Endogén szubsztrátjai szulfatált vagy glükuronidált organikus anion konjugátumok, mint az E1S, DHEAS, és az EG. Általában a szulfatált konjugátumokat nagyobb affinitással képes szállítani az ABCG2 [178].

Az ABCG2 gyógyszer szubsztrátjai közé tartozik a mitoxantron [255, 256], topotekán [256], SN-38 [257], irinotekán [258, 259], MTX [260, 261] nukleozid analógok (AZT és AZT 5-monofoszfát [262, 263]), flavopiridol [264], szulfaszalazin [265], roszuvasztatin [266]. További rákellenes szereket is szállít, például antraciklineket, tirozin kináz inhibitorokat [267], daunomicint [249], vagy anti-folsavakat [249]. Ide tartozik még több fotokémiai érzékenyítő, mint a feoforbid-A [268], protoporfirin IX. Ez utóbbi kipumpálása révén az ABCG2 a fotodinamikus terápia elleni celluláris rezisztencia egyik lehetséges okozója [178].

Az ABCG2 az ABC transzporterek korábban tárgyalt családtagjához, az MRP2-höz hasonlóan fluoreszcens szubsztrátokat is felismer, ezáltal a transzporter funkciója és celluláris expressziója ezek segítségével nyomon követhető. Ilyen gyakori ABCG2 szubsztrátként alkalmazott fluoreszcens molekulák a BODIPY-prazosin [255], Hoechst 33342 [269-271], feoforbid-A [268], DyeCycle Violet (DCV) [272], hematoporfirin [273] és a PhenGreen [274]. Érdekes módon a rodamin 123, és a LysoTracker Green az ABCG2 vad típusának nem, csak az Arg482Gly, illetve Arg482Thr mutánsainak szubsztrátjai [178, 264].

Az ABCG2 inhibitorai HIV proteáz inhibitorok (lopinavir [275], saquinavir, ritonavir [276]), immunszuppresszánsok (CsA, sirolimus [277]). Ezeken túl az ABCB1 harmadik generációs inhibitorai közül az elacridar *in vitro* körülmények között már szub-mikromoláris koncentrációban gátolta az ABCG2-t [278]. Továbbá, ABCG2 specifikus inhibitor az *Aspergillus fumigatus* gombából származó fumitremorgin-C (FTC), ami rendkívül toxikus, így *in vivo* nem alkalmazható [178]. Az FTC-nek azonban több analógja ismeretes, mint a Ko132, Ko134 és Ko143, amelyek szelektív gátlószerei az ABCG2-nek ($IC_{50}=100-200$ nM) [279] és mindemellett alacsony *in vivo* neurotoxicitás jellemző rájuk. Az FTC analógok feltehetőleg az ABCG2 ATP-áz aktivitását blokkolják, így gátolva a transzporter általános működését [178].

1.4.2.3. Az ABCG2 (pato)fiziológiai jelentősége

Az említett szövetekben az ABCG2 a gyógyszerek és endogén vegyületek abszorpciójának, disztribúciójának és eliminációjának szabályozásában, illetve a sejtek xenobiotikumokkal szembeni védelmében játszik szerepet. Ugyanakkor az ABCG2

jelenlétét kimutatták tumorokban is, ahol szerepet játszik a rákgyógyításban problémát okozó multidrog-rezisztencia kialakításában [280-284]. Az ABCG2 megnövekedett expresszióját bizonyították mellrákos szövetekben, amelyekben egy ABCG2 szubsztrátra, az 5-fluorouracil (5-FU)-ra való rezisztenciát állapítottak meg [178, 285]. Krónikus myeloid leukémia terápia esetén pedig a perifériás keringésben levő leukocitákban emelkedett ABCG2 mRNS szintet és ezzel összefüggésben imatinib rezisztenciát fedeztek fel [178, 286]. Mindezekon túl az ABCG2-t rákos őssejt markernek vélik, a daganatok őssejt populációiban nagy mennyiségben fordul elő [178, 287].

Bár az ABCG2 hiánya jól tolerálható, így nem okoz betegséget, a sejtekre toxikus anyagok kipumpálása révén viszont része a kemoimmun rendszernek. Az ABCG2 fehérje hiányát eredményező mutáció a Junior (Jr(a-)) vércsoportot eredményezi [288]. Feoforbid A-val dúsított takarmányt fogyasztó *Bcrp1/Abcg2-KO* egerek füle fény hatására súlyos fototoxikus sérülést szenvedett. Ennek magyarázata, hogy míg a vad típusú egerek nem sérültek, addig a KO állatokban az *Abcg2* kiesett funkciójának hatására a toxikus bomlástermék (feoforbid A) a sejtekben felhalmozódott, mely a fénynek kitett egerek füleinek nekrozisát, vagy súlyos esetben az állatok elpusztulását okozta [178, 268].

Az ABCG2 transzporter génjében rendkívül sok (>80) egyponos nukleotid-polimorfizmust azonosítottak, melyek közül a kelet-ázsiai populációban a két leggyakoribb a 34G>A SNP-ből eredő Val12Met (rs2231137) és a 421C>A nukleotid cseréből fakadó Gln141Lys (rs2231142) variánsok. A kaukázusi és afroamerikai populációkban ezek jóval kisebb gyakoriságúak [178]. A Gln141Lys variáns a vad típusú fehérjéhez képest bizonyítottan csökkent sejtfelszíni kifejeződést, így pedig alacsonyabb efflux működést eredményez [289]. Ezzel szemben a Val12Met variáns (és több egyéb ABCG2 SNP, például Ile206Leu, Phe208Ser, Asn590Tyr, Asp620Asn) a vad típushoz hasonló expressziós szintet és gyógyszer transzport funkciót mutat [289, 290]. Toyoda és munkatársai 2019-ben további ABCG2 variánsokat azonosítottak a cseh populációban, amelyek bár ritkán fordulnak elő, befolyásolhatják a köszvény kialakulását.

Az ABCG2 Gln141Lys variánsa patológiás szempontból rendkívül fontos, hiszen megváltozott aktivitása révén a húgysav transzport 54%-kal csökken, mely által a szérumbeli megnövekedett húgysav kristályok formájában kicsapódik, és az ízületekben köszvényt okoz, a vese tubulusaiban pedig vesekövek képződéséhez vezet [249, 291].

Egy GWAS tanulmány szerint ráadásul a Gln141Lys variáns esetén az allopurinol, köszvény elleni gyógyszer terápia kevésbé sikeres [248]. Mindezekon túl ezt a variánst a prosztata rák rosszabb prognózisával is összefüggésbe hozták, feltehetőleg a folsav prosztata rákból való csökkent effluxa miatt [292]. Ennek hatására a tumorban a folsav szint megnövekszik, ami a daganatos sejtek gyorsabb proliferációját teszi lehetővé [248].

Mindezek miatt az FDA és EMA ajánlás értelmében az ABCG2 vizsgálata új hatóanyagok esetén javasolt [178].

4. táblázat Az OATP1B1, MRP2 és ABCG2 szubsztrátjai Kis és mtsai (2010) [223], Halilbasic és mtsai (2013) [222], Szakács és mtsai (2008) [293] és az FDA hivatalos adatbázisa alapján

<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.html>

Transzporter	Endogén szubsztrátok	Gyógyszer szubsztrátok
OATP1B1	konjugált epesók, bilirubin, bilirubin glükoronid, EG, E1S, repaglinid, angiotenzin II receptor antagonisták, szteroid konjugátumok, tiroid hormonok, leukotriének	rifampicin, BSP, fexofenadin, ACE, kemoterápiás szerek, β -laktám antibiotikumok, endotelin receptor antagonisták, HIV proteáz inhibitorok, opioidok, szartanok, sztatinok, lopinavir, saquinavir, darunavir
ABCC2 (MRP2)	szulfatált epesók, tetrahydroxi-epesók, bilirubin glükoronid, glutation, LTC ₄ , EG, E1S, CCK-8, CLF	MTX, doxorubicin, morfin-3-glükoronid, paclitaxel, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, indinavir, pitavasztatin, roszuvasztatin, pravasztatin
ABCG2	ösztron és ösztradiol szulfatált és glükoronilált konjugátumai, húgysav	MTX, imatinib, sztatinok, mitoxantron, topotekán, irinotekán porfirinek, lamivudin, mitoxantron, ciprofloxacín, kvercetin, CsA

1.5. Vizsgálati módszerek az ADME folyamatokban jelentős OATP és ABC transzporterek gyógyszer kölcsönhatásainak jellemzésére

Új gyógyszer hatóanyag fejlesztésekor a gyógyszerek farmakokinetikai paramétereivel a humán tesztek előtt tisztában kell lenni az esetleges mellékhatások elkerülése érdekében. Emiatt nagy szükség van gyors, költséghatékony és validált módszerekre, hogy például a gyógyszer transzporterekkel való interakciók minél korábban, a gyógyszerfejlesztés korai stádiumában felderíthetők legyenek.

1.5.1. Az OATP-k vizsgálatában alkalmazott in vitro módszerek

Az OATP-k vizsgálata jelenlegi tudásunk szerint kétféle módon történhet. Vizsgálhatjuk potenciális szubsztrát direkt transzportját, vagy pedig teszt vegyület transzportjának változását ún. indirekt módszerrel.

A direkt módszer esetén ép sejtes rendszerben a radioaktívan jelölt molekula sejten belüli akkumulációját mérik. Alternatívaként tömegspektrometriával határozható meg a vizsgált vegyület sejten belüli mennyisége.

Az OATP és a vizsgálandó molekula közötti kölcsönhatást indirekt módon is vizsgálhatjuk, amelynek során a jelölt, vagy nyomon követhető teszt vegyület transzportjának módosulását mérjük a vizsgálandó vegyület jelenlétében. A leggyakrabban alkalmazott teszt vegyületek a radioaktívan jelölt BSP, E1S, vagy EG [83, 294, 295]. Az izotópos jelölés viszont rendkívül költséges és nem veszélytelen, ráadásul ökológiai lábnyoma is jelentős. Alternatívaként tömegspektrometriás módszerrel is nyomon követhetjük a teszt vegyület mennyiségének a vizsgálandó anyag hatására történő változását. Ez azonban viszonylag időigényes, jelentős szakértelmet kíván és nem alkalmas nagy áteresztőképességű vizsgálatra.

A fluoreszcens teszt szubsztrátok alkalmazása egyre nagyobb teret hódít [37, 295, 296]. A fluoreszcencia mérés a radioaktív jelölésnél lényegesen egyszerűbb, költséghatékonyabb, és kevésbé veszélyes mind a környezetre, mind pedig a mérést kivitelezőkre. Fluoreszcens teszt szubsztrát a közelmúltig csak az OATP1B1 és OATP1B3 esetén volt elérhető. Kutatócsoportunk nemrégiben bemutatta, hogy a nátrium-fluoresceinnel az összes humán OATP funkciója vizsgálható [86]. Viszont a

nátrium-fluoreszcein pH érzékenysége miatt kevésbé ideális, mivel az OATP-k sok esetben savas extracelluláris pH-n vizsgálandók, így további módszerek fejlesztése volt szükséges.

Vezikuláris (nem ép sejtes) módszert egy kivétellel [297] még nem írtak le az OATP-k esetében. Ennek egyik oka lehet, hogy az OATP-k működési mechanizmusa még nem tisztázott, így a megfelelő grádiens, egyéb, a transzportot lehetővé tevő körülmény kialakítása vezikuláris rendszerben még nem járt sikerrel.

1.5.2. Az ABC transzporterek vizsgálatában alkalmazott in vitro módszerek

Az ABC fehérjék funkcióját ép sejtes vagy vezikuláris rendszerekben vizsgálhatjuk.

1.5.2.1. ATP-áz aktivitás mérés

Az ABC transzporter család tagjai működésükhöz ATP-t igényelnek, a nukleotid hidrolíziséből felszabaduló energiát hasznosítva képesek szubsztrátjaikat a plazma membránon átszállítani. Ebből következőleg az ABC fehérjék működését ATP hidrolitikus aktivitásuk (ATP-áz aktivitás) mérése révén vizsgálhatjuk, mely feltételezetten transzport folyamathoz társul [298]. Az ATP-áz módszer olyan indirekt mérési mód, amely megmutatja, hogy a vizsgált molekula az ABC transzporterrel kölcsönhatásba lép-e. Amennyiben igen, a vegyület fokozza, vagy csökkenti az aktivitást. Az ATP-áz aktivitás fokozása azt jelzi, hogy a vizsgált vegyület a transzporter szubsztrátja [197]. ATP-áz aktivitás mérésére a leggyakoribb módszer a felszabadult szervetlen foszfát kolorimetriás detektálása [299]. Ez a vizsgálat nem igényel jelzett szubsztrátot, és nagy áteresztőképességű tesztelésre is alkalmas lehet.

1.5.2.2. Vezikuláris transzport mérés

A fordított orientációjú membrán preparátumokon a vegyületek ATP-függő és inhibitor szenzitív akkumulációját vizsgálhatjuk. Alkalmas direkt vagy indirekt vizsgálatokra is. Előbbi esetben a jelölt vegyület vezikulákba való akkumulációját, indirekt esetben pedig ismert vegyület transzportjának gátlhatóságát tesztelik a kérdéses, potenciálisan kölcsönható anyaggal [300, 301]. Ez a mérési módszer alkalmas kinetikai paraméterek meghatározására is, illetve a transzportált szubsztrát pontos mennyisége is

meghatározható [302]. A vezikulák mellett szól továbbá, hogy bármikor kiolvaszthatók, vagy lefagyaszthatók [19], illetve adaptálhatók mikrolemezen történő méréshez, és így akár nagy áteresztőképességű tesztelésre is alkalmasak. Mindemellett, amennyiben kereskedelmi forgalomban kapható membrán vezikulákon kísérletezünk, mivel azok egyszerre nagy mennyiségben kerülnek preparálásra, több kísérleten keresztül elkerülhető a különböző preparátumok közötti variabilitásból adódó eltérés [303].

1.5.2.3. Ép sejtes módszerek

Az ABC transzportereket ép sejtes modellekben is vizsgálhatjuk, amelyekben előzetesen overexpresszáltuk a számunkra érdekes transzportereket. Jellemzően sejtpermeábilis szubsztrátot alkalmazva, annak ABC transzporter általi kipumpálását, így a sejten belül mérhető szubsztrát mennyiség csökkenését detektálhatjuk. Ép sejteken ezen kívül indirekten is vizsgálhatjuk potenciális szubsztrát molekula transzportját azáltal, hogy ismert, fluoreszcensen vagy radioaktívan jelölt ABC szubsztrát transzportjára kifejtett hatást vizsgálunk [302, 304].

1.5.3. Az OATP és ABC transzporterek együttes vizsgálatára alkalmazott módszerek

1.5.3.1. Modell rendszerek

Az OATP és ABC transzportereket szimultán ép sejtes módszerekkel vizsgálhatjuk. Az OATP és ABC fehérjék közös vizsgálatához nagyon fontos, hogy a transzporterek funkciója elkülöníthető legyen. Ehhez polarizált sejtekre van szükség, melyek jellemzően kettős-, vagy többszörös transzfektánsok [305], vagy akár a fiziológias állapotot jobban tükröző, hepatocita vagy vér-agy gát modell sejt vonalat is alkalmazhatunk.

A szendvics kultúrában növesztett hepatocitákkal való kísérletek nagy kihívást jelentenek és igen költségesek, illetve néhány hétnél tovább nem fenntarthatók. A primer hepatocita kultúrák habár az izolálást követő közvetlen időszakban jól tükrözik a fiziológias CYP enzimek, valamint májspecifikus gének expresszióját és funkcióját, ezek expressziója a primer kultúrákban a tenyésztés során hamar lecsökken [306]. Ráadásul mivel nem immortalizáltak, csak korlátozott számú mérést tesznek lehetővé. Az immortalizált hepatocita eredetű sejt vonalak, mint a HepG2, C3A, HepaRG [307-310], Fa2N-4 [311-314] korlátlanul szaporíthatóak, de nem expresszálnak minden metabolikus máj enzimet

illetve transzportert, és amit igen, azt sem fiziológias szinten, így gyógyszer metabolizmus vagy toxicitás predikciós vizsgálatokra kevésbé alkalmasak [306, 310].

Az OATP-eket, ABC transzportereket és CYP-eket túltermelő sejtvonalak olcsóbb és reprodukálható alternatívát jelentenek. A nagyobb áteresztő képességű mérésekhez leginkább 96 vagy 384 lyukú lemez formátumú módszerre van szükség [19], amihez a kettős/sokszoros transzfektáns sejtvonalak előnyösebbek. Hátrányuk, hogy az expressziós szintek és mintázatok nem feltétlenül tükrözik az emberi szervezetben előforduló állapotot. Emiatt ezekben a kísérletekben feltétlenül szükséges a megfelelő kontroll sejtvonalak vizsgálata is [315]. A gyógyszerek transzport vizsgálataihoz már nem csak egyszeres vagy kétszeres, de három-, négyszeres transzfektáns sejtvonalak is rendelkezésre állnak. Ezeket leginkább HeLa (Henrietta Lacks méhnyakrákból izolált sejtvonal), HEK293 (humán embrióvese sejtvonal), MDCKII (kutyavesese sejtvonal) és LLC-PK1 (sertés vese sejtvonal) emlős sejtvonalak segítségével hozzák létre [305, 316]. Ezekben a májban zajló méregtelenítő folyamatok jobb modellezése céljából metabolikus enzimeket is expresszáltathatnak (pl. UGT1A1, CYP3A4, CYP2C9) [317].

MDCKII sejtvonalban az OATP1B, MRP2 és ABCG2 transzporterek kombinációival létrehoztak például kettős transzfektáns sejtvonalakat: MDCKII-OATP1B1/MRP2, MDCKII-OATP1B3/MRP2, MDCKII-OATP1B3/MDR1, és MDCKII-OATP1B3/ABCG2 [316, 318-320]. Háromszorosan transzfektált MDCKII-OATP1B1-MRP2-MRP3, illetve MDCKII-OATP1B1-MRP2-MRP4 sejtvonalakban ösztradiol, gemfibrozil és azok konjugátumainak bazolaterális-apikális irányú vektorialis transzportját vizsgálták [321]. Négyszeresen transzfektált sejtvonalon pedig (MDCKII-OATP1B1-CYP3A4-UGT1A1-MRP2) a bozentán metabolizmus és a transzcelluláris transzport közötti kölcsönhatást tesztelték [317].

1.5.3.2. Teszt vegyületek

Az OATP uptake és az ABC transzporter efflux funkciójának együttes nyomon követéséhez olyan teszt vegyületekre van szükség, amelyek mind az OATP, mind pedig az ABC fehérje számára szubsztrátként viselkednek, vagy pedig az OATP által a sejtbe bejuttatott anyag a sejtben átalakulva válik az ABC transzporter által felismert szubsztráttá.

Jellemzően nem sejt-permeábilis szubsztrátok vizsgálata előnyös ilyen modellekben, hiszen így mind az uptake, mind pedig az efflux transzporter működése is tesztelhető. Mivel az MRP2 szubsztrátok fiziológias körülmények között negatív töltésűek, azok uptake transzporter nélkül nem tudnak átjutni a plazma membránon [316], így az MRP2 általi efflux sem követhető [322]. Polarizált, többszörös transzfektáns modellekben az apikális transzporterek aktivitását nagyobb érzékenységgel vizsgálhatjuk, mint membrán vezikulákban. Például a pravasztatin ATP-függő felvétele nagyon alacsony a humán kanalikuláris membrán vezikulákban, míg az OATP1B1/MRP2 dupla transzfektánsokban transzcelluláris transzportja elegendően magas ahhoz, hogy a telítési kinetika láthatóvá váljon [322].

Azokat a fluoreszcensen vagy radioaktívan jelölt vegyületeket, amelyekről már tudjuk, hogy külön-külön az OATP1B1, és MRP2, illetve ABCG2 transzporterek is felismerik, az 5. táblázatban foglaltam össze. Eddig kizárólag a Fluo-3 festéket alkalmazták az MRP2 és OATP1B3 együttes vizsgálatára.

5. táblázat OATP és ABC transzporterek közös teszt szubsztrátjai [305, 316, 322]

Fluoreszcens	Radioaktív
Rifampicin, Fluo-3 [316] FMTX [296, 323], kolil-L-lizil-fluoreszcein [226, 324], karboxi-dikloro-fluoreszcein származékok [325]	³ H-BSP, ³ H-LTC4, ³ H-EG, ³ H-DHEAS, ³ H-enalapril, ³ H-cerivasztatin, ³ H-pravasztatin [305, 316, 321, 322]

2. CÉLKITŰZÉSEK

A gyógyszer transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálata a gyógyszerfejlesztés során kötelező, ezért tesztelésükre alkalmas gyors, egyszerű és költséghatékony módszerekre nagy igény mutatkozik. Eddig nem létezett az OATP1B1 és ABC transzporterek együttes vizsgálatára alkalmas fluoreszcens módszer.

Doktori munkám során hepatikus transzporterek vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszerek fejlesztését, illetve azok segítségével új transzporter kölcsönhatások kimutatását tűztük ki célul. Emellett célunk volt egy hepatikus transzporter tumor specifikus izoformájának vizsgálata.

Dolgozatom főbb célkitűzései:

1. A kutatócsoportban azonosított hepatikus OATP szubsztrátokra alapozva új, fluoreszcens mérési módszer beállításához szükséges paraméterek vizsgálata. A módszer validálása a szakirodalomból már ismert, hepatikus OATP-kkel kölcsönható vegyületek segítségével.
2. Hepatikus OATP-k új gyógyszer kölcsönhatásainak kimutatása az új fluoreszcens módszer segítségével.
3. A Cascade Blue (CB) festék molekula szerkezete alapján további, fluoreszcens OATP szubsztrát(ok) azonosítása és azok további vizsgálata ABC fehérje kölcsönhatás szempontjából. A közös OATP1B1-ABC transzporter szubsztrátként azonosított fluoreszcens vegyület(ek) alapján a transzporterek közös vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása.
4. A rák-specifikus Ct-OATP1B3-V1 izoforma transzporter funkciójának vizsgálata. A fehérje kemoterápiás szerekkel való kölcsönhatásának tesztelése sejt életképességi vizsgálatokban. *In vivo* kísérletekhez alkalmas Ct-OATP1B3-V1-et termelő sejtvonal előállítása.

3. MÓDSZEREK

3.1. *Anyagok*

A Zombie Violet (ZV) festéket a BioLegend® (San Diego, CA, US) nevű cégtől, a LIVE/DEAD® Violet (LDV) és Green (LDG) festékeket, továbbá a CB és Alexa Fluor 405 (AF405) festéket a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, US), illetve a FMTX-ot a Biotiumtól (Haywar, CA, US) szereztük be. A xenograft minták esetén alkalmazott K18 anti-OATP1B3 antitest (egér), valamint az OATP1B1 elleni antitest (nyúl) Prof. Dr. Bruno Stieger (Zürich Egyetemi Kórház Klinikai Farmakológiai és Toxikológiai Intézete, Svájc) jóvoltából állt rendelkezésünkre [56, 326]. A teljes sejt lizátumok esetén alkalmazott, OATP1B3 ellen nyúlban termeltetett antitest az Atlas Antibodies (Stockholm, Svédország) AMAb91231 kódú terméke. További antitestek: anti-MRP2 (M₂-I-4 / M₂-III-6) [200], anti-ABCG2 (BXP-21) [259]. Másodlagos antitestek: anti-nyúl (OATP-k), anti-egér (Ct-OATP1B3-V1, ABC fehérjék, β-aktin) (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Minden további vegyszerhez és anyaghoz a Sigma-Aldrich Kft. jóvoltából jutottunk hozzá, kivéve, ahol ezt külön jelöltem.

3.2. *A431 és MDCKII sejtvonalak létrehozása és fenntartása*

3.2.1. *Transzpozon alapú génbevitel (A431-OATP2B1, MDCKII-ABCG2)*

Az A431-OATP2B1 sejtvonal transzpozon alapú génbevitel révén készült el, melyhez a Sleeping Beauty (SB) transzpozáz [327] által felismert nukleotid repeatek között OATP2B1 cDNS-t hordozó vektort a csoport korábbi munkái során hozta létre [328]. A431 parentális sejtekbe Fugene HD reagens (Promega, Madison, WI, US) segítségével a gyártó útmutatása szerint 1 µg pSB-OATP2B1 vektort és 100 ng SB transzpozáz tartalmazó plazmidot transzfektáltunk.

Az MDCKII-ABCG2 sejteket szintén transzpozon alapú génbevitel útján, Lipofectamin 2000® reagens (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó útmutatásának megfelelően állítottuk elő. A csoport korábbi munkássága során létrehozta azt a vektort, amely a Sleeping Beauty transzpozáz [327] által felismert nukleotid repeatek között hordozza az ABCG2 cDNS-ét. Parentális MDCKII sejteket (Lipofectamin mellett) az ABCG2 cDNS transzpozon alapú genomi beépülésének céljából [329] 1 µg ABCG2

plazmid DNS-sel (pSB-CMV-ABCG2), és 100 ng SB transzpozáztt tartalmazó plazmiddal transzfektáltunk. A pSB-OATP2B1, illetve pSB-CMV-ABCG2 vektorokról a célgénekkel együtt egy-egy puromicin rezisztenciát kialakító gén is átíródik, melynek segítségével kiválogathatók azok a sejtek, amelyekbe az OATP2B1, vagy ABCG2 cDNS-e beépült. Ezt a szelekciós előnyt kihasználva 48 órával a transzfekciót követően 1 µg/ml puromicin segítségével körülbelül két hét leforgása alatt feldúsítottuk a sikeresen transzfektált A431-OATP2B1, valamint MDCKII-ABCG2 sejteket. Az 5D3 anti-ABCG2 monoklonális antitest segítségével az MDCKII-ABCG2 sejteket további kiválogatásnak vetettük alá. Az 5D3 sejtfelszíni epitópokhoz kötődik [269, 330], ami alapján az 5D3-, azaz ABCG2-pozitív MDCKII sejtek BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, US) segítségével kiválogathatók.

Negatív kontrollként a célgént nem hordozó, üres vektorral transzfektált A431, illetve parentális MDCKII sejt vonalakat használtam. Az OATP2B1 expresszióját nátrium-fluorescein felvételén alapuló funkcionális módszerrel ellenőriztük [86]. Az ABCG2 működéséről a fluoreszcens DCV kipumpálásán alapuló funkcionális módszerrel győződöttünk meg (21. ábra).

3.2.2. Lentivirális transzdukció

Az MDCKII-MRP2 sejt vonal már a csoport korábbi munkája során elkészült, és így rendelkezésünkre állt [200].

Az OATP1B1, OATP1B3 és OATP1A2 A431 sejtekben való overexpressziója lentivirális transzdukció segítségével történt [328]. Az OATP1B1 MDCKII parentális, MDCKII-MRP2, illetve MDCKII-ABCG2 sejtekben történő expresszióját szintén rekombináns lentivírusok által értük el [331]. HEK 293T humán embrionális vese sejteket ($1,8 \cdot 10^6$ sejt/6 cm átmérőjű Petri-csésze) 6 µg pRRL-CMV-MCS-IRES- Δ CD4/OATP1B1, OATP1B3, vagy OATP1A2, 2,2 µg pMDG és 4 µg psPax2 vektorokkal transzfektáltunk CaPO₄ vagy – MDCKII sejtek esetén – CaCl₂ kicsapással (CD4 – Cluster of Differentiation 4 (immunsejtek felszínén levő glikoprotein)). A transzport kísérletekhez kontrollként alkalmazott sejtek létrehozása céljából az A431 és MDCKII parentális, MDCKII-MRP2, és MDCKII-ABCG2 sejteket az „üres” pRRL-EF1- Δ CD4 vektorral transzfektáltuk a fent leírt módon. A transzfekciót 72 órával

követően a lentivirális partikulumokat tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, majd azokkal 6 lyukú lemezen transzdukáltuk a megfelelő A431, valamint MDCKII sejteket klorokin hozzáadása mellett. Olyan vírusrákos mennyiséget alkalmaztunk, hogy egy sejtet körülbelül 1 víruspartikulum fertőzzön meg. A sikeresen transzdukált sejteket CD4-pozitivitásuk alapján BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, US) segítségével különítettük el. Az OATP-vel transzfektált sejteket LDG transzport funkciójuk alapján ($0,8 \mu\text{l LDG}/2-4 \cdot 10^6$ sejt) tovább dúsítottuk [328], így létrehozva magas OATP funkcióval rendelkező sejtvonalakat.

A már transzfektált/transzdukált, és így a célfehérjéket tartalmazó sejteket sejtenyészítő flasksokon növesztettem 37°C hőmérsékletű CO_2 inkubátorban steril körülmények között. Az A431 és MDCKII sejteket DMEM médiumban tartottam kultúrában, komplettálva 10% FBS (fetal bovine serum, borjúszérum), 2mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin és 100 μg sztreptomycin antibiotikum hozzáadásával (Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)). Az OATP2B1-et termelő A431 sejteket folyamatosan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mennyiségű puromicint tartalmazó médiumban tenyésztettem.

Az MRP2 működését az intakt sejtekbe passzívan bejutó, és ott intracelluláris észterázok hasítása által calceinné alakuló calcein-AM (CaAM) transzportja révén ellenőriztük (20. ábra). Az OATP1B1, OATP1B3, vagy OATP1A2 funkcióját a CB/LDG/FMTX festék felvétele által erősítettük meg (20. ábra, 33. ábra). Az A431 sejtvonalakat a csoport korábbi munkái során készítette el, így én ezen sejtek fenntartásától vettem részt a munkában.

3.3. *Western blot*

A431, valamint MDCKII sejteket az összegyűjtést követően diszaggregációs pufferben tároltuk (50 mM Tris- PO_4 (pH 6,8), 2 % SDS, 2 % β -merkaptóetanol, 2 mM EDTA (pH 6,8), 20% glicerin, 1% brómfenolkék). A mélyfagyasztott xenograft mintákat szárazjég ágyon morzsoltuk, majd meghatározott pufferben lizáltuk (50 mM HEPES, pH 7,3, 150 mM NaCl, 10% glicerin, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 + Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (1 tabletta/10 ml, Roche, Bázél, Svájc). A teljes sejt lizátumok vagy a xenograftokból származó minták fehérje koncentrációját a Lowry módszerrel határoztam meg, BSA (borjú szérum albumin) standard alkalmazásával [250].

A különböző fehérje mennyiségeket 7,5% töménységű Laemmli SDS-PAGE géleken választottam szét elektroforetikus futtatás (60 perc, 110V) segítségével. Az immunoblot kísérletek során a fehérjéket a Bio-Rad mini Protean 3 készlet segítségével Tris pufferben (0,7 M glicin, 25 mM Tris, pH 7,7) 1,5 óra alatt 250 mA áramerősséggel polivinilidén-difluorid (PVDF) membránokra transzferáltam. A membránokat az aspecifikus kötődés elkerülése érdekében 1 órán keresztül 5% töménységű TBS-Tween-tej oldatban inkubáltam szobahőmérsékleten, majd 5%-os TBS-Tween-tejben oldott anti-OATP, anti-ABC, anti- β -aktin antitesttel inkubáltuk 1 éjszakán át 4°C-on. Másnap a membránokat 5%-os TBS-Tween-tejben 20000-szeresre hígított, HRP-konjugált másodlagos antitestekkel 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A minták lumineszcencia intenzitását a Luminor Enhancer Solution kit (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)) segítségével detektáltuk [298].

3.4. *MRP2 és ABCG2 expressziója Sf9 rovarsejtekben, inside-out vesicle (IOV) preparálás*

Az MRP2, ABCG2, illetve kontrollként nem releváns, magi fehérje egyik alegységét kódoló protein (*D. melanogaster* telomeráz) *Sf9* rovarsejtekben való tranziens expresszióját rekombináns bakulovírusok segítségével értük el. A rekombináns fehérjék előállítását a BD BaculoGold™ Bakulovírus Expressziós Vektor Rendszer (BD Biosciences) alkalmazásával történt.

Az MRP2 [200], ABCG2 [330], illetve kontroll [86] fehérjék cDNS-ét hordozó transzfer vektorokat és a rekombináns bakulovírusokat a kutatócsoport készítette a korábbi munkák során [86], így az én feladatomban ott kezdődött, hogy a rovarsejteket megfertőztem az adott vírusokkal.

Az MRP2, ABCG2 és kontroll *Sf9* membrán preparátumok elkészítéséhez előzetesen szükség volt a befogadó *Sf9* rovarsejtekre, melyeket 27°C-on állandó mágneses kevertetésű folyadékkultúrában (10% FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel, valamint 100 U/ml sztreptomocinnel kiegészített TNM-FH) tartottunk fenn. A bakulovírusokkal való fertőzést megelőzően $1,2 \cdot 10^7$ rovarsejtet helyeztünk sejtenyésző flasksokra, majd a megfelelő vírussal fertőztük.

A vírusokkal fertőzött *Sf9* sejteket a fertőzést követően 72 órával gyűjtöttük össze, majd a sejtekből membránt preparáltunk. A fertőzött *Sf9* sejteket Tris-mannitol pufferben (50 mM Tris, pH 7,0, 300 mM mannitol, 0,5 mM fenilmetilszulfonil-fluorid) mostuk, majd üveg potter csövekben TMEP oldatban (50 mM Tris, pH 7,0, 50 mM mannitol, 2 mM EGTA, 10 µg/ml leupeptin, 8 µg/ml aprotinin, 0,5 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 2 mM ditiotritol) lizáltuk és homogenizáltuk. A lizátlan sejteket és törmelékeket 10 perces 500 g fordulatszámú centrifugálással távolítottuk el. Végül, a membránokat tartalmazó felülúszót 1 órán keresztül 100000 g fordulatszámon centrifugáltuk, és a membránt TMEP oldatban vettük fel, majd -80°C-on tároltuk. [200, 298]. A membránok fehérje koncentrációját a módosított Lowry módszer szerint határoztuk meg [250]. Az ABCG2 IOV-eket a maximális ABCG2 aktivitás elérése érdekében koleszterinnel töltöttük [332]. Ennek céljából az utolsó centrifugálási lépés előtt az ABCG2 membránokat és annak kontroll membránjait 2 mM Cholesterol-RAMEB (Cyclolab, Magyarország) tartalmú TMEP oldattal inkubáltuk 30 percen keresztül jégen [332].

3.5. *Transzport kísérletek Sf9 IOV membránokon*

Az *Sf9* IOV membránokon a transzport kísérletek minden lépését 4°C-on végeztem, kivéve, ahol ezt eltérően jelöltem. A transzport kísérletekben 150 µl végtérfogóban 50 µg membrán vezikulát és 4 mM MgATP/MgAMP-t inkubáltam transzport pufferben (6 mM MgCl₂, 40 mM 4-morfolinpropánszulfonsav (MOPS)-Tris (pH 7,0), 35 mM KCl) [200]. ABCG2 transzport gátlási vizsgálatok esetén továbbá 1 µM végkoncentrációban Ko143-at adtam és a csöveket 37°C-on 5 perces előinkubálásnak vettem alá. A kontroll membrán vezikulák gátlószeres kísérletei során 2 mM nátrium-ortovanadát (Vi), vagy 10 mM EDTA hozzáadását követően kezdtem meg az előinkubálást. A reakció kezdeteként 10-10 µl, transzport pufferben oldott fluoreszcens szubsztrátot adagoltam a fentiekhez az alábbi végkoncentrációkban: 1 µM SR101/FMTX, 5 µM piranin/CB, 10 µM Lucifer Yellow (LY), vagy 0,2 µl/cső ZV/LDV/LDG. A fluoreszcens szubsztrátokkal ezt követően 10 (ZV/LDV/LDG/FMTX/SR101/LY), 20 (piranin), vagy 30 (CB) percig inkubáltam a 37°C-os vízfürdőben rázatás mellett. Ezeket a kísérleti körülményeket (inkubációs idő, festék koncentráció) előzetes idő-, és koncentrációfüggő IOV transzport vizsgálatok alapján határoztuk meg és a legnagyobb jel/zaj arányt adó kísérleti körülményeket választottuk ki. A reakciót 550 µl jég hideg transzport puffer

hozzáadásával és a minták jégre helyezésével állítottam le, majd 5 percig 22000 g fordulatszámra centrifugáltuk, és azonnal eltávolítottuk a felülúszót. A membránokat 200 µl 1 x PBS-ben szuszpendáltuk és 96 lyukú lemezre pipettáztuk. A minták fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk az alábbi hullámhosszokon: 405/423 nm (ZV), 416/451 nm (LDV), 495/520 nm (LDG), 403/517 nm (piranin), 400/419 nm (CB), 586/605 nm (SR101), 428/540 nm (LY), 497/516 nm (FMTX). Az ismert molekula képletű CB, piranin, LY, SR101 és FMTX esetén a festékek kalibrációs görbéje alapján meghatároztuk a fehérjék transzport aktivitását.

3.6. *Transzport kísérletek A431 és MDCKII sejtekben áramlási citometriával*

Az A431/MDCKII sejteket 0,2% töménységű tripszinnel kezelve választottam el a flaskáról, majd komplettált DMEM médiumban gyűjtöttem össze. A sejteket megmostam 1-1 ml transzport pufferrel (125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 12 mM MgSO₄, 25 mM MES, 5,6 mM glükóz, a pH 5,5/7,4 OATP/ABC fehérje vizsgálat szerint). Ezt követően $5 \cdot 10^5$ A431/MDCKII sejtet 100 µl végtérfogatban megfelelő pH értékű transzport pufferben oldott fluoreszcens szubsztrát jelenlétében inkubáltam rázatott 37°C vízfürdőben. A festékekre alkalmazott inkubációs idők és végkoncentrációk: 0,5 µM CaAM (10 perc), 1 µM CB/DCV/FMTX (30 perc), 0,1 µM LDG (30 perc). A CB/LDG/FMTX/CaAM/DCV festékek az OATP1B1/OATP1B3/MRP2/ABCG2 transzporterek működésének vizsgálatára szolgáltak. A reakciót 700 µl jég hideg 1 x PBS oldat hozzáadásával, és a minták jégre helyezésével állítottuk le. A sejtekben mérhető fluoreszcencia intenzitását mintánként legalább 20000 élő sejt fluoreszcens jele alapján állapítottuk meg az Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) készülék segítségével.

3.7. *Piranin, CB és SR101 toxikusságának vizsgálata áramlási citometriával*

Az MDCKII sejtekkel a transzport kísérletet az előző (3.6.) pontban ismertetetteknek megfelelően végeztük el, kivéve a festékekre alkalmazott inkubációs időket és végkoncentrációkat: 5 µM CB/piranin, illetve 1 µM SR101 jelenlétében egységesen 30 percig inkubáltunk 37°C rázatott vízfürdőben. A reakciót 700 µl jég hideg 1 x PBS-ben oldott 1 µg/ml propídiium-jodid (PI, CB és piranin esetén)/ 0,1 µl/ml ZV (SR101 esetén)

viabilitási marker hozzáadásával, és a minták jégre helyezésével állítottuk le. A sejtekben mérhető fluoreszcencia intenzitását mintánként legalább 20000 élő sejt fluoreszcens jele alapján állapítottuk meg az Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) készülék segítségével.

3.8. *OATP-k funkcionális vizsgálata A431 és MDCKII sejtekben 96 lyukú mikrolemezen*

Az A431/MDCKII sejtekbe az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, és OATP2B1 transzporterek különböző festék szubsztrátjainak (ZV, LDG, CB, AF405, piranin, SR101, FMTX) idő-, koncentrációfüggő, vagy gátlószerek jelenlétében történő felvételét 96 lyukú lemezeken teszteltem. A kísérleteket megelőző napon lyukanként 200 μ l komplettált DMEM-ben $8 \cdot 10^4$ sejtet osztottam ki a lemezekre. Ezt követően 16-24 órával a sejtekről eltávolítottam a médiumot és háromszor mostam 1 x PBS-sel. A reakció kezdete előtt a sejteket 37°C-on 50 μ l pH 5,5 (vagy OATP1A2 esetén pH 7,4) transzport puffer, vagy abban oldott (növekvő) koncentrációjú gátlószerek jelenlétében előinkubálási lépésnek vettem alá. Gátlószerek tesztelése esetén a következő maximális koncentrációkat alkalmaztuk: 20 μ M BSP, 200 μ M TC [328], 25/3/1,56 μ M ritonavir (OATP1A2/OATP1B3/OATP2B1), 400 μ M maraviroc [333]. Ezután hozzá adtam 50 μ l pH 5,5/7,4 transzport pufferben oldott fluoreszcens OATP szubsztrátot. A BSP és TC tesztelése esetén szubsztrátként 2/10 μ M CB (OATP1B1/OATP2B1), illetve 5 μ M AF405 (OATP1B3), a ritonavir és maraviroc vizsgálata során pedig 5/10 μ M CB (OATP2B1/OATP1B3) vagy 1 μ M FMTX (OATP1A2) szolgált fluoreszcens OATP szubsztrátként, melyekkel a sejteket 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Abban az esetben, amikor az OATP-k koncentrációfüggő piranin felvételét teszteltük, az előinkubálási lépést követően 50 μ l pH 5,5 transzport pufferben oldott, 500 μ M-ig növekvő koncentrációjú piranin fluoreszcens szubsztrátot adtunk a sejtekhez, mellyel 10 percig inkubáltunk 37°C-on. Amikor az MDCKII sejtekben a piranin, CB és SR101 időfüggő felvételét vizsgáltuk, az előinkubálást követően a sejteket 90 percig inkubáltuk pH 5,5 transzport pufferben oldott, 1 (SR101)/5 (CB, piranin) μ M végkoncentrációjú festékekkel 100-100 μ l végtérfogatban 37°C-on. A ZV, LDG, CB és AF405 fluoreszcens szubsztrátok időfüggő tesztelése esetén lyukanként $6 \cdot 10^4$ sejtet osztottunk ki a kísérletet megelőző napon, és szubsztrátként 0,1 μ l (ZV, LDG)/10 μ M (CB, AF405) végkoncentrációjú festékekkel inkubáltuk őket 100-100 μ l végtérfogatban 45-60 percig

37°C-on. Az alkalmazott inkubációs időket korábbi kísérletek során választottuk ki, a szubsztrátok időfüggő felvételeinek lineáris fázisából [328]. A reakció leállítása minden esetben ugyanúgy történt: a sejtekről a festéket eltávolítottam, és háromszor megmostam jég hideg 1 x PBS-sel. Végül 200-200 µl hideg 1 x PBS oldatban mértük a sejtek fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban 497/516 nm (FMTX), 403/517 nm (piranin), 400/419 nm (CB), 586/605 (SR101), 400/421 nm (AF405), 405/423 nm (ZV), vagy 495/520 nm (LDG) hullámhosszon. Az OATP-k általi transzport meghatározásához az A431-OATP sejtek fluoreszcencia értékeiből kivontuk a hozzájuk tartozó kontroll sejtek fluoreszcencia értékeit. A transzport aktivitást kalibrációs görbe alapján állapítottuk meg.

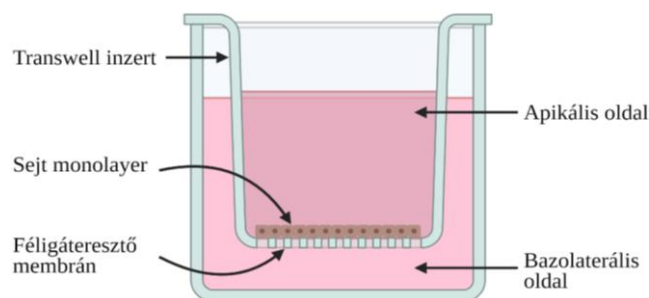
3.9. *Transzcelluláris transzport kísérletek*

A transzcelluláris transzport vizsgálatokhoz MDCKII sejtekben overexpresszáltattuk az OATP1B1 és/vagy MRP2/ABCG2 transzportereket. Az úgynevezett „transwell” rendszerben megvalósuló vektoriális transzport méréséhez szükséges az MDCKII kutya vese sejt vonal azon tulajdonsága, hogy az MDCKII sejtek polarizálódni képesek. A sejtek féligáteresztő filterre (transwell inzer: 6,5 mm átmérő, 0,4 µm pórusméret (VWR Kft., Magyarország)) kiültetve, a rendelkezésükre álló hely betöltését követően polarizálódni kezdenek, melynek során az OATP1B1 transzporter a bazolaterális, míg az MRP2/ABCG2 transzporterek az apikális oldalra lokalizálódnak (6. ábra). Transwell kísérleteink során inzerként $9 \cdot 10^4$ MDCKII Kontroll, MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-ABCG2, MDCKII-OATP1B1-MRP2 vagy MDCKII-OATP1B1-ABCG2 sejtet osztottunk 300 µl DMEM-ben transwellekre 24 lyukú lemezen. A lemez lyukaiba a transwellek köré 1 ml komplettált DMEM médiumot pipettáztunk, majd 4 napon keresztül növesztettük a sejteket steril 37°C 5% CO₂ inkubátorban. A transzcelluláris transzport kísérletek megkezdése előtt a sejtekről és az inzertek körül eltávolítottuk a médiumot, az inzerteket kétszer 300 µl pH 7,4 transzport pufferrel (ld. fentebb), az inzertek körül a lemez lyukait pedig háromszor 1 ml pH 5,5 transzport pufferrel (ld. fentebb) mostuk. Ezt követően 300 µl pH 7,4 transzport puffert, illetve 1 ml pH 5,5 transzport puffert pipettáztunk az inzertekbe, illetve azok köré, és a sejteket 10 perces 37°C előinkubációnak vetettük alá. A 37°C-on 30 percig folytatott reakciót az inzertek körüli transzport puffer eltávolításával és 1 ml pH 5,5 transzport pufferben (a

magasabb OATP1B1 funkció érdekében [328]) oldott fluoreszcens szubsztrát hozzáadásával indítottuk. A szubsztrátok alkalmazott koncentrációi: 5 μM piranin/CB, 1 μM SR101/FMTX. A transzport felfüggesztésére alkalmazott gátlók tesztelése esetén az előinkubálási szakasztól kezdve a bazolaterális kompartmentbe 10 μM CsA-t, vagy az apikális kompartmentbe 300 μl 40 μM Benz-t adagoltunk. A transzcelluláris transzport során az apikális kompartmentből 5 percenként 30 μl mintát vettünk. Az MDCKII-ABCG2-OATP1B1 sejtek esetében a CB transzport mérése során ezek a mintavételek a 0., 15., és 30. percen történtek. Az időfüggő transzport során gyűjtött minták fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk az alábbi hullámhosszokon: 403/517 nm (piranin), 400/419 nm (CB), 586/605 nm (SR101), 497/516 nm (FMTX).

A transzcelluláris transzport ellentétes irányból való vizsgálatához a reakciót a bazolaterális helyett az apikális oldalról indítottuk a szubsztrátok hozzáadásával. A mintavétel az alsó kompartmentből történt 25 percig, ahonnan 100-100 μl mintát vettünk, melyek fluoreszcencia intenzitását fluoreszcens lemezolvasóval állapítottuk meg.

A piranin intracelluláris akkumulációjának meghatározásához a fentiek során bemutatott 30 perces bazolaterális-apikális irányú transzcelluláris transzport kísérletet végeztünk el. A transzportnak az inzertek és lyukak jég hideg PBS-sel való háromszori mosása és a lemez jégre helyezése általi leállítását követően az inzerteket eltávolítottuk a transwellekből, és 200-200 μl 1% Triton-PBS oldatban inkubáltuk 75 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően az inzertekről kinyert sejt lízátumokat 96 lyukú lemezre pipettáztuk, a sejtekből felszabaduló fluoreszcencia intenzitását pedig fluoreszcens lemezolvasó segítségével detektáltuk 403/517 nm hullámhosszon. A mintákban levő pontos festék mennyiségét a piranin festék mixből készített kalibráció segítségével határoztuk meg.



6. ábra A Transwell rendszer felépítése [334]

3.10. Sejt életképességi vizsgálatok

A Ct-OATP1B3-V1 variáns A431 sejtek kemoterápiás szerekre való érzékenyítő képességét viabilitás vizsgálatokban teszteltem. 96 lyukú lemezre komplettált DMEM-ben lyukanként 100 µl térfogatban $5 \cdot 10^3$ A431-OATP1B3-V1, illetve kontroll sejtet osztottunk ki. 16-24 órás steril inkubátorban (37°C, 5% CO₂) való növesztést követően steril körülmények között megkezelttem a sejteket a terápiás szerekkel. A vegyületeket komplettált DMEM médiumban hígítottam és 100-100 µl végtérfogatban adagoltam a mikrolemes lyukaiba a következő maximális koncentrációkban: 0,1 µM MTX, 1000 µM kapecitabin, 10 µM irinotekán/5-FU, 40 µM oxaliplatin. A sejteket ezután tovább inkubáltam 144 órán keresztül steril, 37°C, 5% CO₂ körülmények között. Ez idő elteltével ellenőriztük a sejtek életképességét a PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) módszer segítségével. A sejtekről a médiumot eltávolítottuk és 100 µl 5% PrestoBlue-PBS oldatot adtunk hozzájuk, majd 1 órán keresztül inkubáltuk őket 37°C 5% CO₂ inkubátorban. Végül a fluoreszcenciát Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasó segítségével detektáltuk 585 nm hullámhosszon. Az életképességet a kezeltlen sejtekhez viszonyítva határoztuk meg. A háttér jeleként a mikrolemes sejteket nem tartalmazó, 5% PrestoBlue reagenssel feltöltött lyukai által adott fluoreszcencia szolgált.

3.11. *In vivo* kísérletek

Az *in vivo* kísérleteket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának állatházában végezték Cserepes Mihály és Léner Violetta.

3.11.1. Szubkután xenograft modell

Ketrecenként 6 darab NOD-SCID (NOD.Cg-Prkdcscid/J) nőstény egér fenntartása történt SPF (specifikus kórokozótól mentes) egér kolóniákban. Előzetesen a monolayer kultúrában növesztett A431 kontroll, illetve A431-OATP1B3-V1 sejteket tripszinnel kezeltük, összegyűjtöttük, kétszer mostuk szérumentes médiumban, majd az állatházban 10^6 sejtet 200 µl-ben szubkután injektáltak csoportonként 7 darab, 8-10 hetes egérbe. 10-11 nappal az injektálást követően mérhető tumorok fejlődtek. A szubkután növekvő tumorok méretét hetente 2 alkalommal a 27. napig követték nyomon, és

térfogatukat az alábbi képlet alapján határozták meg: $\text{térfogat} = \text{hosszúság} \times \text{szélesség}^2 \times \pi/6$. A tumorméretek változásának bemutatásához az adatok átlagát \pm SEM ábrázoltuk.

3.11.2. Állattartási körülmények

Minden állattartási és állattenyésztési folyamat (engedély szám: PEI/001/1738-3/2015), valamint állatkísérlet (engedély szám: PEI/001/2574–6/2015) az Országos Onkológiai Intézet állatjóléti bizottságának jóváhagyásával történt. Az állatház a FELASA irányelvei szerint működve biztosítja, hogy állatai kórokozó-, és egyéb betegségektől mentesek. A kísérleti csoportokba sorolt állatok súlya 22-26 gramm közé esett a kísérletek megkezdésekor, és a kísérletek során 10%-nál nagyobb mértékű súlycsökkenést egyik állat esetén sem tapasztaltak. A csoportok méretét az állatok felhasználásának minimalizálásával állapítottuk meg (n=7). Az A431 tumor sejtek beinjektálása anesztetizált állatokba történt [335]. A kísérlet végén az állatokat izoflurános altatásban nyaki diszlokációval eutanáziában részesítették, és a tumorokat eltávolították.

3.12. Adatok kiértékelése és statisztika

Kísérleteink során a transzport, illetve sejt életképességi kinetikai paramétereket az OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, US) szoftver Hill1, valamint DoseResp görbe illesztési funkciói segítségével határoztuk meg. Az ATP-függő jelek közötti statisztikai szignifikancia vizsgálatot a Student-féle t-teszttel végeztük el. A gátlószeres IOV kísérletek során delta értékeket képeztünk a MgATP/MgATP+Ko jelekből a megfelelő MgAMP/MgAMP+Ko jelek kivonásával. Ezen delta értékekre szintén Student-féle t-teszttel végeztünk szignifikancia vizsgálatot. A Student t-teszt esetén alkalmazott p értékek: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. A transwell kísérletek során a piranin intracelluláris akkumulációjának vizsgálatokor először egy szempontos varianciaanalízis (One-Way ANOVA) során elutasítottuk a nullhipotézist, mely alapján a minták között különbség felfedezhető. Ezt követően ($\alpha=0,05$) Tukey-Kramer HSD (Honest Significant Differences) post hoc többszörös összehasonlítás segítségével állapítottuk meg a minták közötti különbségek szignifikanciáját. Az azonos betűjellel ellátott minták („a” MRP2 és kontroll minták esetén) nem különböztek egymástól szignifikánsan, míg a különböző betűjelűek igen.

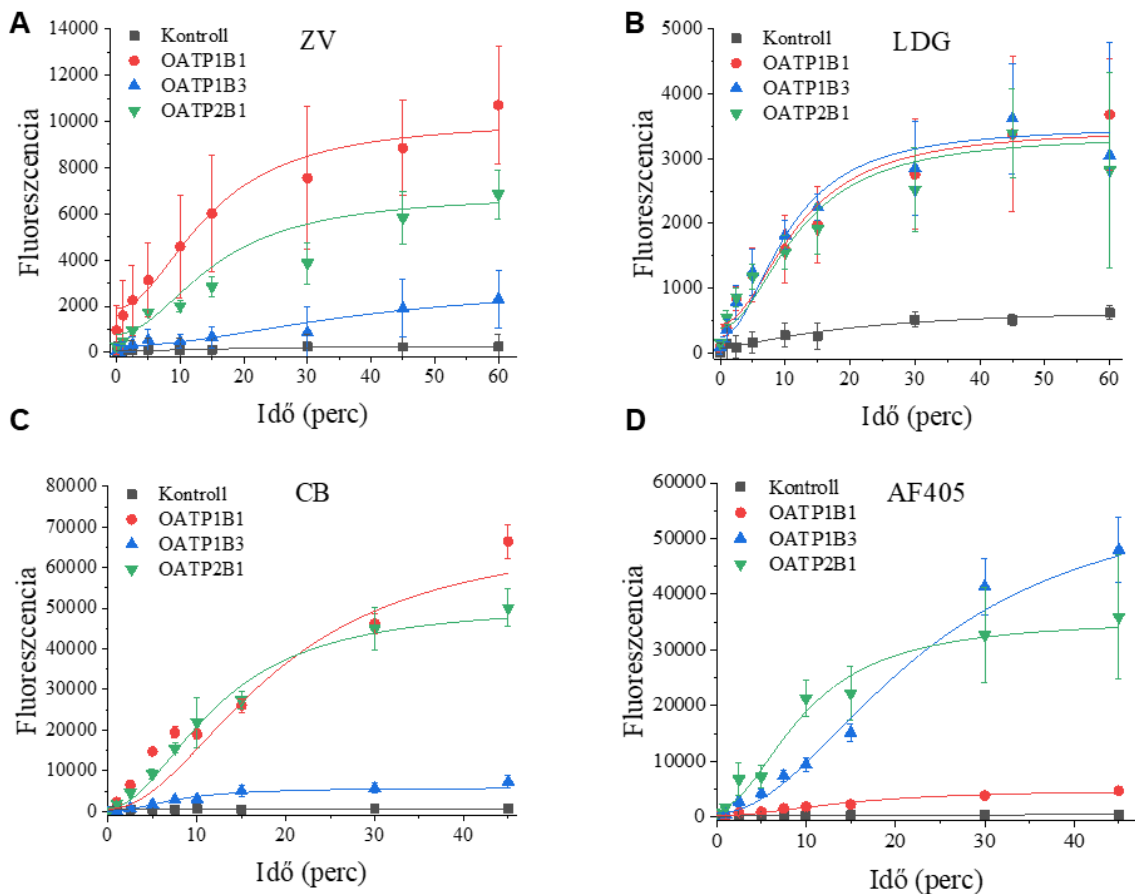
4. EREDMÉNYEK

4.1. *Hepatitis OATP-k funkcionális vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer beállítása és validálása*

Doktori kutatómunkám során részt vettem az OATP1B1/3 és OATP2B1 transzporterek vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer kidolgozásában [328]. Ebben a tanulmányban a kereskedelmi forgalomban kapható fluoreszcens vegyületek új alkalmazási területét fedtük fel. Ezeket a festékeket ugyanis a máj OATP fehérjéi, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 felismerik, és azok sejtbeli dúsulását okozzák. A festékfelvétel nyomán követésével pedig az OATP-k működése vizsgálható.

A munka megkezdésekor a célunk az volt, hogy alacsony sejt permeabilitású, az eddigieknél megbízhatóbb, olcsóbb és érzékenyebb OATP szubsztrátokat azonosítsunk. Elsőként a ZV festékre találtunk rá, amelyet a kereskedelmi forgalomban viabilitási festékként forgalmazznak. Előnyös tulajdonsága, hogy csekély sejt permeabilitással rendelkezik, illetve fluoreszcenciája pH-független, mely által potenciálisan OATP funkció vizsgálatára alkalmas festék. Az élő/holt sejtek elkülönítésére alkalmas vegyületek között olyan további, amin-reaktív fluoreszcens festékeket azonosítottunk OATP szubsztrátként, mint a LDG és LDV. Ezek a festékek alkalmasak a hepatitis OATP-k funkcionális vizsgálatára [328]. Ráadásul a ZV és LDG festékek hatására toxicitás vizsgálatunkban a sejtek alig 20%-a pusztult el, így a fluoreszcens festékekkel lehetővé válik magas OATP-expressziójú sejtpopulációk létrehozása [328]. Ellenben a ZV, LDV és LDG hátránya, hogy molekula képletük ismeretlen, így a transzport kinetikai paraméterei (K_m , V_{max}) nem meghatározhatók. Emiatt a nem sejt permeabilis fluoreszcens viabilitási festékek között további potenciális OATP szubsztrátok után kutattunk. Még két olyan fluoreszcens vegyületet azonosítottunk OATP szubsztrátként, amelyeket a kereskedelmi forgalomban sejt permeabilitási és fehérje jelölési vizsgálatokban alkalmaznak: CB és AF405. Összegezve az alábbi fluoreszcens OATP szubsztrátokat fedeztük fel: ZV, LDV, LDG, CB és AF405. Ezt követően célkitűzésünk az volt, hogy ezekre a szubsztrátokra alapozva létrehozzunk egy olyan új fluoreszcens módszert, amely a hepatitis OATP-k funkcionális vizsgálatára alkalmas és akár közepes-, vagy nagy áteresztőképességű tesztelésre is adaptálható.

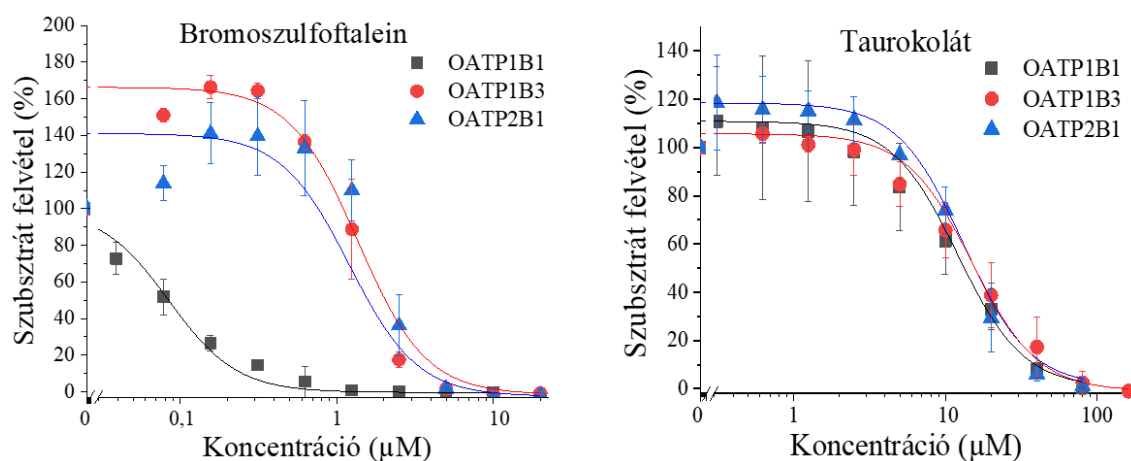
Ennek érdekében először meghatároztuk az OATP szubsztrátok vizsgálatához szükséges kísérleti körülményeket. Az én feladatom az volt, hogy meghatározzam a felfedezett új fluoreszcens vegyületek OATP-k általi transzportjának időfüggését. Ezzel egyrészt a folyamat kinetikáját szándékoztuk jellemezni, másrészt a festékvételre alapuló szubsztrát-inhibitor vizsgálatokhoz szükség volt az optimális körülmények (idő, festék koncentráció) meghatározására. A 7. ábrán a ZV, LDG, CB és AF405 időfüggő felvétele látható hepatikus OATP-eket termelő A431 sejtvonalakon. A festékvétel transzporterekre jellemző telítési kinetikát mutat.



7. ábra ZV, LDG, CB és AF405 időfüggő felvétele A431 sejtekben. 96 lyukú lemezen $1,2 \times 10^5$ A431 sejtet $100 \mu\text{l}$ térfogatú pH 5,5 transzport pufferben oldott, $1 \mu\text{l}$ ZV/LDG vagy $20 \mu\text{M}$ koncentrációjú CB/AF405 festékekkel inkubáltunk 45-60 percig 37°C -on. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens lemezolvasóval határoztuk meg (ZV: 405/423 nm, LDG: 495/520 nm, CB: 400/419 nm, AF405: 401/421 nm). Az ábrán legalább két párhuzamos mérés átlaga \pm szórás látható

Megállapítottuk, hogy mindegyik vizsgált festék, a gyártói leírásnak megfelelően, csekély passzív felvételt mutat (kontroll sejtekben elenyésző fluoreszcencia növekedés észlelhető). Az idő- és azt itt nem bemutatott koncentráció függések, illetve a módszer megbízhatóságának (z-faktor) jellemzése [328] alapján a ZV és a CB a legmegfelelőbb szubsztrát az OATP1B1 és OATP2B1 esetében. Az LDG hasonlóan alkalmas mindhárom fehérje vizsgálatára, az OATP1B3 esetében pedig az AF405 az optimális szubsztrát. Az azonosított festék szubsztrátok tehát OATP-k gyógyszerekkel való kölcsönhatásának gyors és egyszerű nyomon követésére alkalmasak lehetnek. Annak érdekében, hogy erről meggyőződjünk, különböző, az irodalomban már leírt OATP1B és 2B1 interakciós partnerekkel vizsgáltuk a fehérjék kölcsönhatását. Mivel azonban a ZV és LDG képletét a gyártók nem hozzák nyilvánosságra, további vizsgálatainkban a CB és AF405 festékekkel foglalkoztunk.

Az én feladatomban a BSP és TC tesztelése volt dózis-hatás vizsgálatokban. Ezt a két anyagot az egyes fehérjék számára legmegfelelőbb szubsztrát (OATP1B1 és OATP2B1: CB, OATP1B3: AF405) mellett emelkedő koncentrációban adva, koncentrációfüggő gátlást mértem. A növekvő BSP és TC koncentráció függvényében a sejtekben a szubsztrátok fluoreszcencia intenzitásának csökkenését figyeltem meg. A kapott kísérleti görbéket a 8. ábrán mutatom be.



8. ábra Hepatikus OATP-k dózis-hatás vizsgálata BSP, és TC vegyületekkel A431 sejtekben. 96 lyukú lemezen $1,6 \times 10^5$ A431 sejtet 50 µl pH 5.5 transzport pufferben oldott, 40 (BSP) vagy 400 (TC) µM-ig emelkedő koncentrációjú oldatban inkubáltuk 5 percig 37°C-on. Ezután a sejteket 50 µl pH 5.5 transzport pufferben oldott, 4 (OATP1B1) vagy 20 (OATP2B1) µM koncentrációjú CB, vagy 10 µM koncentrációjú AF405 festék (OATP1B3) hozzáadása után inkubáltuk 37°C-on 30 percig. 100%-nak a gátlószerszellel nem kezelt sejtek fluoreszcenciája felel meg. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens

lemezolvasóval detektáltuk (CB: 400/419 nm, AF405: 401/421 nm). Az ábrán legalább három párhuzamos mérés átlaga \pm szórás látható.

A kinetikai görbék alapján IC_{50} értékeket határoztam meg, ezeket pedig összehasonlítottam az irodalomban fellelhető fél-maximális gátlószer koncentrációkkal. Az IC_{50} értékeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat A 8. ábra alapján általunk meghatározott IC_{50} értékek összehasonlítása szakirodalmi adatokkal.

	OATP1B1		OATP1B3		OATP2B1	
	Jelen tanulmány	Szakirodalom	Jelen tanulmány	Szakirodalom	Jelen tanulmány	Szakirodalom
BSP	0,08 \pm 0,10	0,1 [336-338]	0,9 \pm 0,31	0,4 [326]; 0,5 [337]	1,26 \pm 0,56	1,2 [339]
TC	11,2 \pm 0,22	9 [336, 338]	14,3 \pm 0,32	18 [340]	12,3 \pm 0,15	9 [339]

Elmondható, hogy az általunk fluoreszcens módon meghatározott gátlási értékek jól korrelálnak az irodalmi, radioligand-alapú technikákkal mért eredményekkel. Ezáltal a módszer jó alternatívája a radioligand alapú teszteknek, és az első, emlős sejtvonalon működő fluoreszcencia alapú technika az OATP2B1 transzporter esetében.

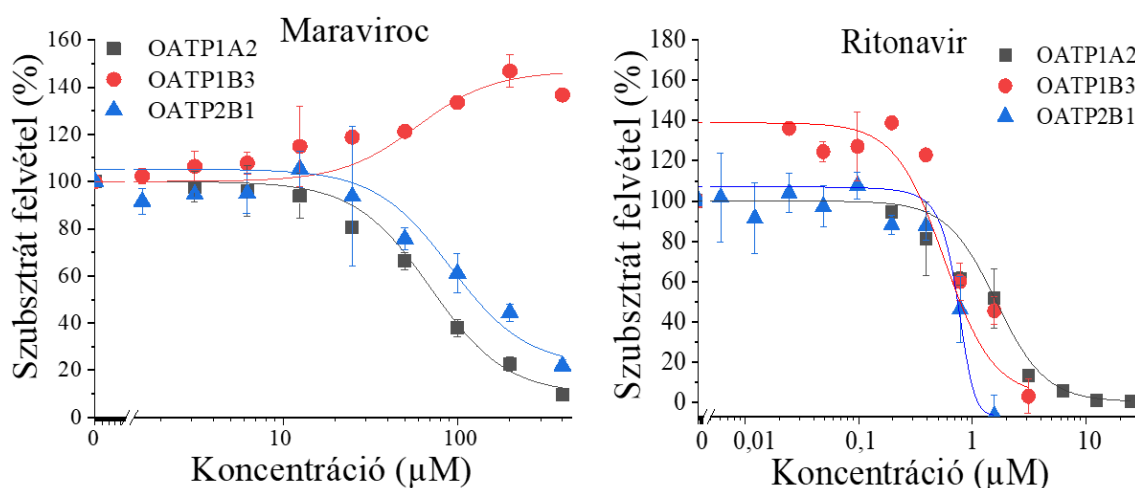
4.2. Az OATP-k vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer segítségével új OATP szubsztrát/inhibitor kölcsönhatások kimutatása

A maraviroc HIV fertőzés esetén alkalmazott antivirális szer, amely alacsony toxicitási profillal rendelkezik. A maraviroc HIV fertőzött gyermekek kezelésére már engedélyezett, de egyelőre várandós nők számára nem alkalmazható [341]. A placentában az MDR1 transzporter jelentős szerepet tölt be a fejlődő magzat védelmében, például a maraviroc kipumpálásával megakadályozza annak placentán való átjutását [342, 343]. A cseh kutatócsoport, akivel együttműködtünk (Martina Ceckova, Hradec Kralove, Csehország) korábbi tanulmányában bizonyította, hogy a maraviroc MDR1 szubsztrát [342]. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy egy másik antivirális szer, a ritonavir az

MDR1 inhibitora [344]. A kutatócsoport további munkája során, placenta mintákon perfúziós kísérletekben vizsgálta a maraviroc mennyiségének alakulását a magzati és anyai kompartmentumban. Várható volt, hogy a magzati kompartmentból kikerülő maraviroc az anyai cirkulációban jelenjen meg, ám abban meglepő módon nem nőtt, hanem csökkent a maraviroc mennyisége és a placentában halmozódott fel. Ez felvetette, hogy a placentában a maraviroc transzportját az MDR1 fehérjén kívül más transzporterek is befolyásolhatják.

Korábbi tanulmányok és Tupova mRNS szint vizsgálatai alapján az OATP2B1 és OATP1A2 nagyobb mennyiségben, míg az OATP1B3 jóval kisebb mennyiségben, de szintén megjelenik a placentában [52, 333, 345-348].

Kutatócsoportunk és az én feladatomban az volt, hogy tisztázzuk, az OATP-k részt vesznek-e a maraviroc placentán való átjutásában. A maravirocon kívül a másik antivirális MDR1 inhibitor, ritonavir és OATP1A2, OATP1B3, valamint OATP2B1 fehérjékkel való kölcsönhatásának tesztelésében vettem részt. A vegyületeket dózis-hatás vizsgálatokban jellemeztük a csoportunk által kidolgozott új fluoreszcens módszer segítségével. Az OATP1A2 esetén a FMTX (1 μM), míg az OATP1B3 és OATP2B1 esetében a CB (10, valamint 5 μM) [86] fluoreszcens szubsztrátokat alkalmaztuk teszt vegyületként. Az OATP1A2, OATP1B3 és OATP2B1 fehérjéken kapott eredményeket a 9. ábrán mutatom be.



9. ábra Az OATP1A2, OATP1B3 és OATP2B1 transzporterek kölcsönhatásának vizsgálata ritonavir és maraviroc vegyületekkel A431 sejtekben. 96 lyukű lemezen $1,6 \times 10^5$ sejtet $50 \mu\text{l}$ pH 5,5 (OATP1B3 és OATP2B1) vagy 7,4 (OATP1A2) transzport pufferben oldott, 25 (ritonavir)/ 400 (maraviroc) μM -ig emelkedő koncentrációjú

oldatban inkubáltuk 5 percig 37°C-on. Ezután a sejteket 50 µl pH 5,5 (OATP1B3 és OATP2B1) vagy 7,4 (OATP1A2) transzport pufferben oldott, 10 (OATP1B3) vagy 5 (OATP2B1) µM koncentrációjú CB, vagy 1 µM koncentrációjú FMTX (OATP1A2) hozzáadása után inkubáltuk 37°C-on 30 percig. 100%-nak a gátlószerral nem kezelt sejtek fluoreszcenciája felel meg. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens lemezolvasóval detektáltuk (CB: 400/419 nm, FMTX: 497/516 nm). Az ábrán legalább három párhuzamos mérés átlaga ± szórás látható.

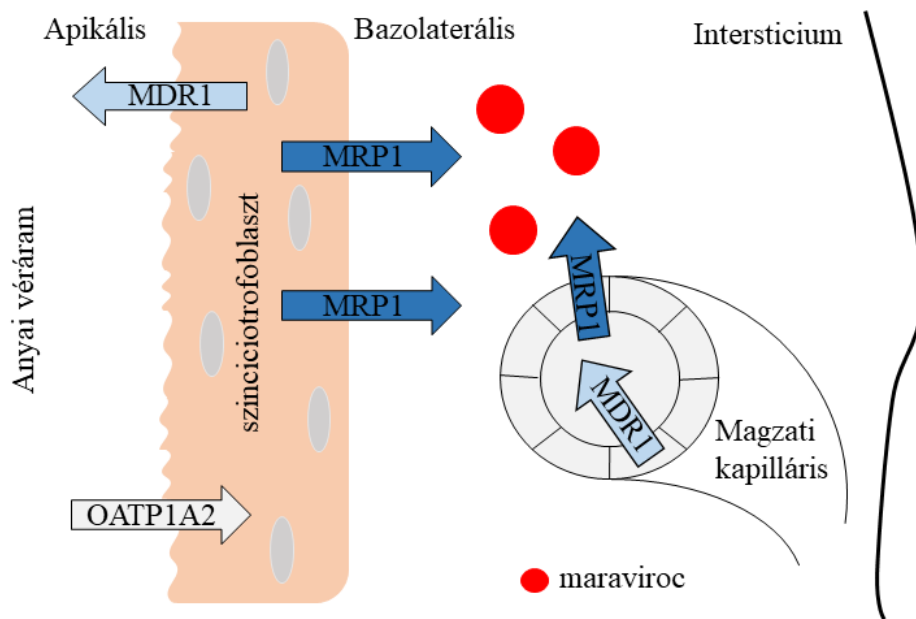
Az OATP1A2 transzporter általi FMTX akkumulációt mindhárom tesztelt vegyület csökkentette. Az OATP1B3 fehérjéket overexpresszáló A431 sejtekben a CB fluoreszcens szubsztrát felvételét a ritonavir gátolta, míg a maraviroc a legmagasabb koncentrációkban alkalmazva a CB akkumulációját kismértékben, 37%-kal aktiválta. Az OATP2B1 fehérjén mért kinetikai görbéket a publikáción túli eredményként mutatom be a 9. ábrán, melyen látható, hogy mindhárom vegyület gátolta a CB A431-OATP2B1 sejtekbe történő akkumulációját. Az A431-OATP1A2, OATP1B3, és OATP2B1 sejtekben a három vegyületre IC₅₀ értékeket határoztam meg, melyeket a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat Maraviroc és ritonavir vegyületekre meghatározott IC₅₀ értékek A431 sejtekben a 9. ábra alapján.

IC ₅₀ értékek (µM)		
	Maraviroc	Ritonavir
OATP1A2	72,97 ± 5,74	1,36 ± 0,28
OATP1B3	nincs gátlás	0,82 ± 0,27
OATP2B1	135,7 ± 59,34	0,97 ± 0,34

Eredményeink alapján a tesztelt vegyületek képesek kölcsönhatásba lépni az OATP1A2, OATP1B3, vagy OATP2B1 transzporterekkel, ezért Tupova és munkatársai célzottan e három OATP-t vizsgálta maraviroc-felvétel szempontjából. Megállapították, hogy a maraviroc szubsztrátja az OATP1A2 és OATP1B3 fehérjéknek. Az OATP2B1 esetében maraviroc transzportot nem tudtak kimutatni. Ez utóbbira magyarázat lehet, hogy az indirekt módszer nem tesz különbséget a transzportálódó szubsztrát és a nem transzportálódó inhibitor között. Tehát a maraviroc valószínűleg nem transzportálódó inhibitora az OATP2B1-nek.

A részletes transzporter vizsgálatok alapján az anyai véráramból a szinciciotrofoblaszt apikális membránjában levő OATP1A2 révén történhet a maraviroc felvétele, ami majd a bazolaterális membránban levő MRP1 efflux transzporter révén a placentális intersticiumba kerül. Az OATP1B3 jóval kisebb mRNS mennyiségéből következően ez a transzporter feltehetőleg kevésbé befolyásolja a maraviroc transzportját. A maraviroc ellentétes irányú áthaladását a magzati kapillárisokból az MRP1, a szinciciotrofoblasztból pedig az MDR1 végzi (10. ábra) [333].



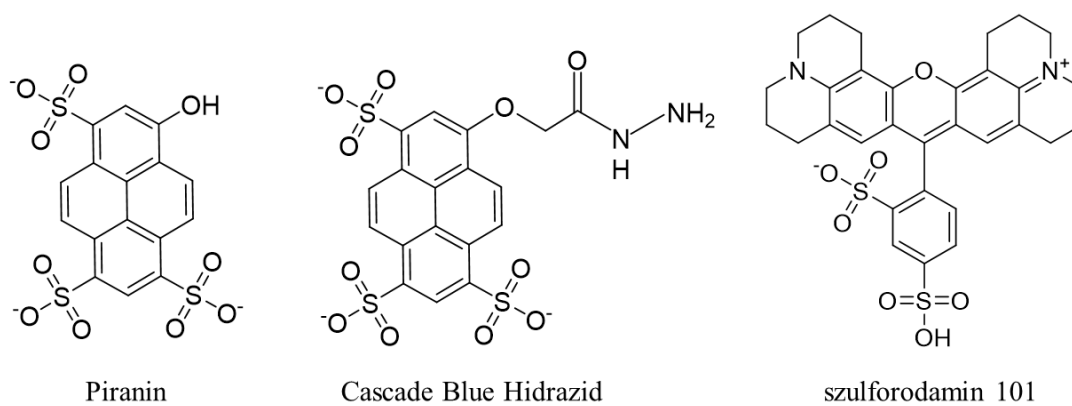
10. ábra A maraviroc feltételezett áthaladása a placentán Tupova és mtsai (2020) [333] alapján

4.3. Hepatikus detoxifikációban fontos membrán transzporterek vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer kidolgozása

Kutatómunkám jelentős részében a májsejtek méregtelenítő folyamataiban részt vevő OATP1B1 és MRP2, illetve ABCG2 fehérjék együttes vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszer fejlesztésén dolgoztam. Ebből a munkából született elsőszerzős közleményem [331], valamint egy szabadalmi bejelentés is (P1900448 sz. magyar szabadalmi bejelentés, ebből származó PCT/HU2020/050014 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés elbírálás alatt). A vizsgálataink alapja az volt, hogy az általunk azonosított fluoreszcens OATP szubsztrátokat az MRP2 és ABCG2 fehérjék is felismerhetik, hiszen számos közös, nem fluoreszcens szubsztrátjuk ismert.

4.3.1. Piranin: a hepatikus OATP1B1 új fluoreszcens szubsztrátja

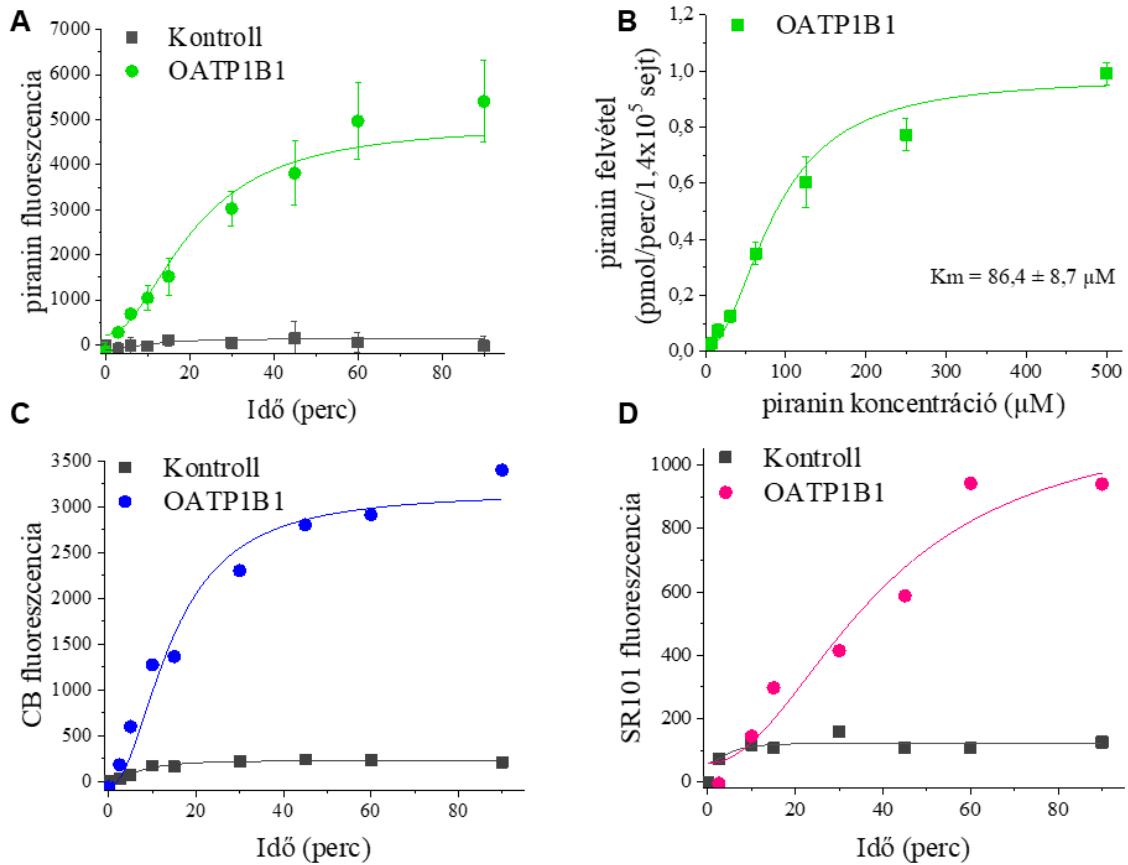
Csoportunk célul tűzte ki a fluoreszcens OATP szubsztrátok körének kiterjesztését, ezért a korábbi tanulmányunkban [328] bemutatott CB molekula képletéből kiindulva, ahhoz hasonló, ám olcsóbb fluoreszcens vegyületeket kerestünk, melyek potenciálisan OATP szubsztrátok lehetnek. Így találtunk rá a piranin festékre (11. ábra). A piranin (HPTS, Solvent Green 7, trisodium 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate) olyan fluoreszcens pH indikátor, mely a kutatócsoportunk által korábban OATP szubsztrátként azonosított CB festékhez hasonló molekula szerkezettel rendelkezik (11. ábra) [349-351].



11. ábra A piranin, CB és SR101 fluoreszcens vegyületek molekuláris képlete

Annak feltárására, hogy a piranin az OATP1B1 szubsztrátjaként viselkedik-e, MDCKII-OATP1B1 sejtvonalon teszteltük a festék felvételét. A piranin időfüggő akkumulációját megvizsgálva (12A ábra) megállapítottuk, hogy az OATP1B1 esetében a festék akkumuláció a 10. percben a lineáris felvételi fázist mutatja, így a koncentráció függő piranin felvételt (12B ábra) ezen inkubációs időtartamban végeztük el. A felvétel kinetikai görbéit a sejteken belül detektált fluoreszcens piranin jel alapján vettük fel, melyek a 12A-B ábrákon láthatók. A sejtek telítődési kinetika szerint akkumulálták a piranint, míg a kontroll sejtekben nem növekedett a festék mennyisége, ezek alapján megállapítottuk, hogy a piranin az OATP1B1 új fluoreszcens szubsztrátja (12. ábra). A piranin telítési görbéje alapján K_m értéket határoztunk meg (12B ábra). A CB és SR101 festékekről (12C-D ábra) a csoport korábbi munkái során [328, 352] bizonyította A431-OATP1B1 sejtekben, hogy az OATP1B1 szubsztrátjai. A 12. ábrán látható eredmények megerősítik, hogy az OATP1B1 ezeket a festékeket MDCKII sejtekben overexpresszáva

is az OATP-kre jellemző telítési kinetika szerint képes akkumulálni a sejtekben. A 4.3. fejezet további részében e három fluoreszcens festék (11-12. ábra) OATP1B1 és ABC fehérjékkel való kölcsönhatásainak vizsgálatát mutatom be.



12. ábra Piranin, CB és SR101 akkumulációja MDCKII-OATP1B1 és MDCKII kontroll sejtekben. A, C, D: 96 lyukű lemezen $1,6 \times 10^5$ sejtet $100 \mu\text{l}$ végtérfogatú pH 5,5 transzport pufferben oldott, 5 (piranin, CB) / 1 (SR101) μM koncentrációjú festékekkel inkubáltuk 37°C -on 0-90 percig. B: 96 lyukű lemezen $1,6 \times 10^5$ sejtet $100 \mu\text{l}$ végtérfogatú pH 5,5 transzport pufferben oldott, $500 \mu\text{M}$ -ig növekvő koncentrációjú piranin festékekkel inkubáltuk 37°C -on 10 percig, a festék felvétel lineáris fázisában. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens lemezolvasóval határoztuk meg (piranin: 403/517 nm, CB: 400/419 nm, SR101: 586/605 nm). Az A és B ábrán három párhuzamos mérés átlaga \pm szórás, a C és D ábrákon 1-1 reprezentatív mérés eredménye látható.

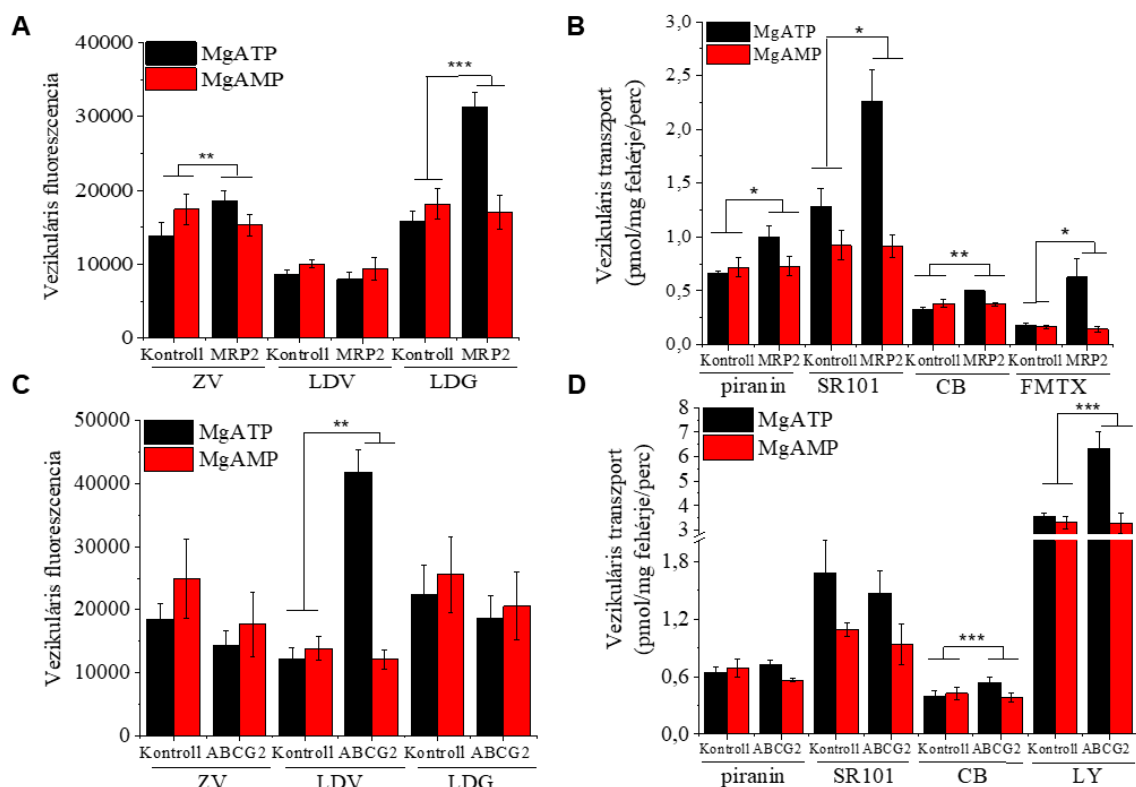
4.3.2. Az OATP1B1 és MRP2, valamint ABCG2 transzporterek új, közös fluoreszcens szubsztrátjainak azonosítása

Az OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék és MRP2, illetve ABCG2 transzporterek szubsztrát felismerése nagyban átfed egymással [24]. Mivel a mi kutatócsoportunk több, új fluoreszcens OATP szubsztrátot azonosított, felmerült, hogy ezeket a vegyületeket az ABC fehérjék (MRP2, ABCG2) is felismerhetik. Azonban, az általunk azonosított OATP szubsztrátok egyik nagy előnye OATP vizsgálat szempontjából, hogy gyakorlatilag sejt impermeábilisak, OATP-k nélkül nem jutnak át a sejtmembránon. Viszont emiatt ép sejt rendszerben nem feltétlenül alkalmasak ABC efflux transzporterek vizsgálatára, hiszen ott olyan molekulák az előnyösek, amelyek passzívan bejutnak a sejtbe, amit aztán az ABC fehérjék működése megakadályoz. Ezért a nem sejtpermeábilis festékek ABC transzporterek általi transzportját kifordított vezikulákon vizsgáltuk, ahol a fordított orientáció következtében a szubsztrátok vezikulákban való akkumulációjának vizsgálata válik lehetővé.

Kísérleteinkhez MRP2, valamint ABCG2 transzportereket overexpresszáló *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) rovar sejtekből preparált IOV-eket használtunk (13. ábra). Negatív kontrollként egy magi fehérje egyik alegységét (*D. melanogaster* telomeráz) tartalmazó *Sf9* IOV szolgált [86]. Az ABC transzporterek ATP hidrolízise mellett működnek, tehát kísérleteink során a megfelelő MRP2-, illetve ABCG2 funkcióhoz MgATP, negatív kontrollként pedig MgAMP jelenlétében vizsgáltuk a szubsztrátokkal való kölcsönhatásokat. Pozitív kontrollként az MRP2 esetében a FMTX-ot, az ABCG2 transzporternél pedig a LY festéket használtuk, melyek a szakirodalomból már ismert MRP2, valamint ABCG2 fluoreszcens szubsztrátok [228, 323, 353, 354].

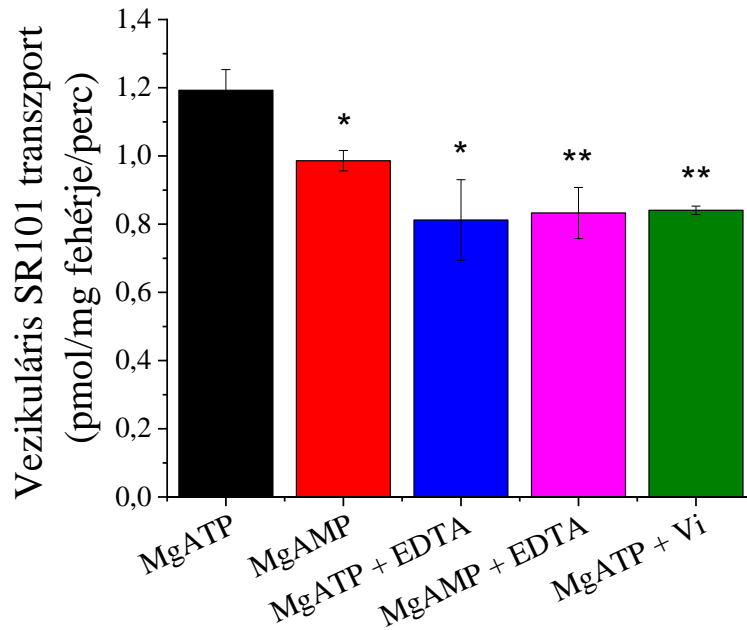
Megállapítottuk, hogy a FMTX, ZV, LDG, CB, SR101 és piranin festékeket az MRP2 ATP-függő módon transzportálja, míg a LDV festékre nem volt megfigyelhető ATP-függő transzport (13A-B ábra).

Az ABCG2 transzporter a LY transzport alapján működőképesnek bizonyult, és szignifikáns, ATP-függő transzportot figyeltünk meg a LDV, valamint a CB festékekre. Ellenben ABCG2 IOV-kben ATP-függő ZV, LDG, piranin vagy SR101 transzport nem volt felfedezhető (13C-D ábra).



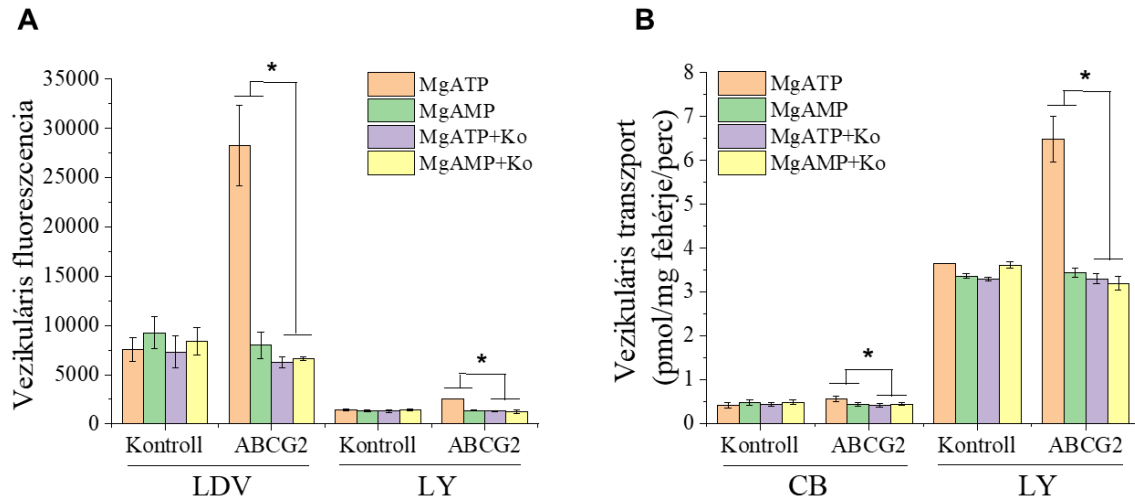
13. ábra ATP-függő vezikuláris transzport MRP2 és ABCG2 Sf9 IOV-kben a ZV, LDV, LDG, piranin, SR101, CB, LY és FMTX festékekre. MRP2/ABCG2 tartalmú/kontroll Sf9 IOV-t 4 mM MgATP/MgAMP jelenlétében 30 (CB)/ 20 (piranin)/ 10 (ZV, LDV, LDG, SR101, FMTX, LY) percig inkubáltunk 1 (SR101, FMTX) / 5 (CB, piranin) / 10 (LY) μM vagy mintánként 0,2 μl ZV/LDV/LDG fluoreszcens festék jelenlétében 37°C-on. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens lemezolvasóban határoztuk meg (CB: 400/419 nm, ZV: 405/423 nm, LDV: 416/451 nm, LDG: 495/520 nm, piranin: 403/517 nm, SR101: 586/605 nm, FMTX: 497/516 nm, LY: 428/540 nm). Az ábrákon legalább 3 párhuzamos mérés eredménye \pm szórás látható. A statisztikai szignifikanciát az ATP-függő jelek között számoltuk ki. A MgATP jelenlétében kapott fluoreszcencia intenzitásokat a MgAMP-vel kezelt minták jelével csökkentettük, így létrehozva delta értékeket, amelyek statisztikai analízisét a Student-féle t-teszt segítségével végeztük szignifikancia szempontjából. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Érdekes, hogy a kontroll vezikulákban kismértékű ATP-függő SR101 transzportot figyeltünk meg (13B, D ábra). Ezen jelenség hátterének feltárására a kontroll membrán vezikuláris SR101 transzportját EDTA (Mg^{2+} kelátor), illetve nátrium-ortovanadát (Vi, általános ATP-áz inhibitor) jelenlétében is elvégeztük (14. ábra). Ez alapján a kontroll membrán SR101 transzportja Mg^{2+} -függő, valamint nátrium-ortovanadáttal gátolható, ami egyelőre egy nem azonosított, SR101 transzportot katalizáló, endogén rovar transzporter jelenlétét feltételezi a kontroll membránban.



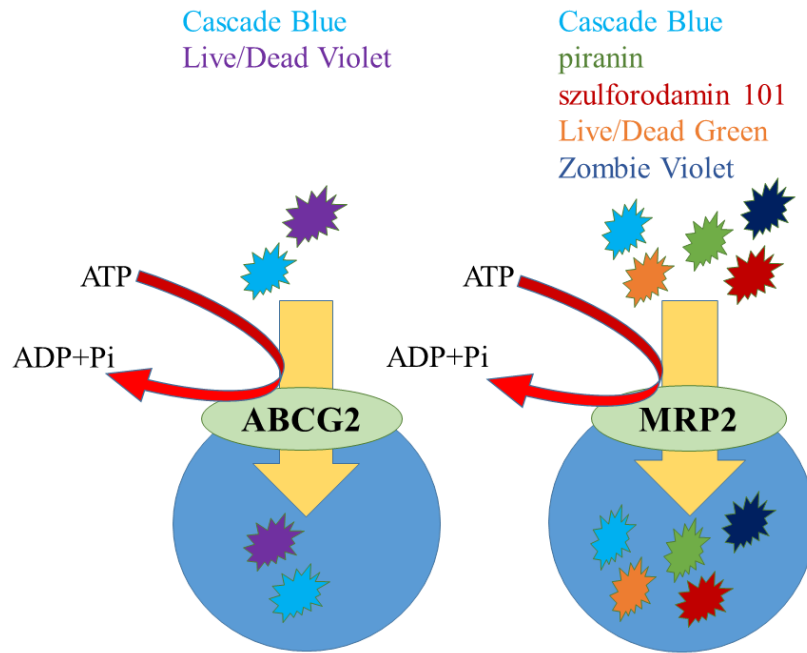
14. ábra Az SR101 ATP-függő transzportja EDTA és vanadát (Vi) jelenlétében kontroll IOV membránban. Kontroll IOV-t inkubáltunk 4 mM MgAMP/MgATP és 2 mM nátrium-ortovanadát (Vi) vagy 10 mM EDTA jelenlétében 5 percig 37°C-on. A transzport reakciót 1 μ M SR101 fluoreszcens festék hozzáadásával indítottuk, amellyel 10 percig inkubáltuk a mintákat 37°C-on. A fluoreszcencia intenzitást Enspire fluoreszcens lemezolvasóval detektáltuk. Az ábrán 3 párhuzamos kísérlet átlaga \pm szórás látható. A statisztikai szignifikanciát a Student-féle t-teszt segítségével számoltuk ki. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

A felfedezett új ABC szubsztrátok potenciálisan alkalmasak IOV mérésekben inhibitorok vizsgálatára. A legígéretesebb új ABC szubsztrátnak a 13. ábrán látható eredmények alapján a LDV tűnt az ABCG2 IOV-ken, ezért az ABCG2 és potenciális új fluoreszcens szubsztrátjainak kölcsönhatását inhibitor jelenlétében is teszteltük. Az ABCG2 IOV-ken az ismert LY szubsztrát mellett a CB és LDV festékek transzportját Ko143, ABCG2 inhibitor jelenlétében vizsgáltuk (15. ábra).



15. ábra LDV, CB és LY ATP-függő transzportjának gátlása Ko143 inhibitorral ABCG2-t kifejező Sf9 IOV-kben. ABCG2/kontroll IOV-t 4 mM MgATP/MgAMP \pm 1 μ M Ko143 jelenlétében 5 percig inkubáltunk 37°C-on. A membránokat ezután 30 (CB)/ 10 (LDV/LY) percig inkubáltuk 5/10 μ M CB/LY vagy mintánként 0,2 μ l LDV fluoreszcens festék jelenlétében 37°C-on. A fluoreszcenciát Enspire fluoreszcens lemezolvasóval detektáltuk (CB: 400/419 nm, LDV: 416/451 nm, LY: 428/540 nm). Az ábrákon legalább 2 párhuzamos mérés eredménye \pm szórás látható. A statisztikai szignifikanciát az ATP-függő jelek között számoltuk ki a Student-féle t-teszt segítségével. *: $p < 0,05$.

Mindkét festék (LDV, CB) esetében felfüggeszthető volt az ATP-függő transzport az inhibitor hatására, így ezek a festékek alkalmasak lehetnek ABCG2 indirekt kölcsönhatások tesztelésére vezikuláris rendszerekben. Ráadásul a LDV festékre nagyon kedvező jel/zaj arány mellett mintegy 3,5x-es transzport rátát tudtunk kimutatni a kontroll vezikulákhoz képest, ami az ismert LY esetén megfigyelhető 1,8x arányhoz viszonyítva jobbnak bizonyult. Az IOV rendszerben kapott kísérleti eredményeinket összefoglalóan a 16. ábrán mutatom be.



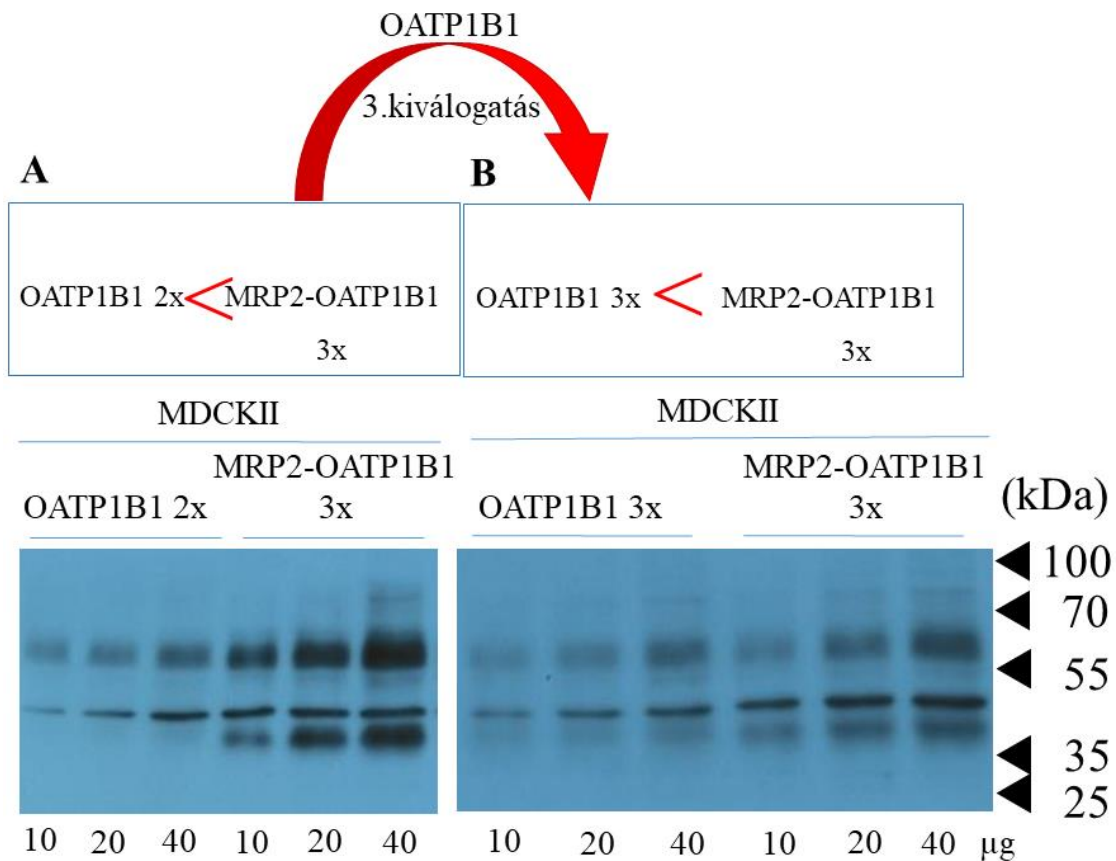
16. ábra Az ABCG2, valamint MRP2 transzportereket tartalmazó Sf9 IOV-kben megállapított MRP2, és ABCG2 transzporterekkel közös fluoreszcens OATP szubsztrátok. A festékek ATP felhasználása révén az IOV-kben akkumulálódnak.

4.3.3. Az OATP1B1 és MRP2, vagy ABCG2 transzportereket együttesen expresszáló MDCKII sejtvonalak létrehozása, OATP1B1 expresszió beállítása MDCKII-OATP1B1 és MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtekben

A 4.3.1. és 4.3.2. fejezetekben ismertetettek alapján hat olyan új fluoreszcens OATP szubsztrátot találtunk, melyeket az ABCG2 és/vagy MRP2 fehérjék is képesek ATP-függő módon transzportálni. Mivel az általunk OATP1B1 és ABC transzporterek közös vizsgálatára potenciálisan alkalmasnak vélt három fluoreszcens festék (CB, piranin, SR101) nem sejt-permeabilis, ezért azok sejtes rendszerben csakis kettős transzfektánsokon (OATP + ABC transzporter) vizsgálhatók.

A transzcelluláris transzport kísérletek során elengedhetetlen, hogy az egymáshoz viszonyítandó sejtvonalakban az overexpresszált transzporterek expressziója összemérhető legyen. A transzcelluláris transzport kísérletekhez szükséges, azonos OATP1B1 expressziójú sejtvonalak előállítása többszörösen nehézségekbe ütközött a sejtvonalak funkció alapú kiválogatása során. Először CD4-pozitivitásuk („1x”, lásd 3.2.2. fejezet), majd LDG transzport funkciójuk („2x”, illetve „3x”) alapján válogattuk ki

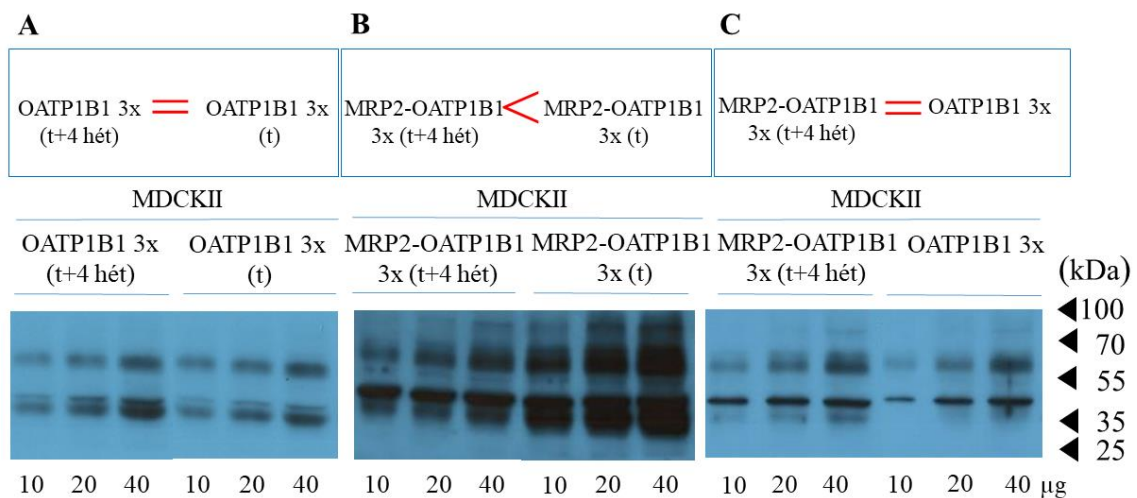
a sejteket. A CD4-pozitív (1x kiválogatott) MDCKII-OATP1B1, illetve MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtvonalak LDG funkciójuk alapján történő kiválogatásának („2x” kiválogatott sejtek) eredményeként az MDCKII-OATP1B1 sejtekben az OATP1B1 expressziója erősebbé vált az MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtvonal OATP1B1 expressziójánál. Ennek orvoslására az MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtvonalat újra kiválogattuk („3x”) LDG transzport funkciója alapján, melynek eredményeképpen viszont erősebb OATP1B1 expressziójú sejtvonalat kaptunk az MDCKII-OATP1B1 sejtvonalhoz képest (17A ábra). Ezután az MDCKII-OATP1B1 sejtvonalat is ismét kiválogattunk LDG funkció alapján, de a dupla transzfektáns még így is erősebb OATP1B1 expresszióval bírt (17B ábra).



17. ábra Az *OATP1B1* fehérje expressziójának követése MDCKII sejtvonalakban Western blot technika segítségével. 10/20/40 µg sejt lizátum *OATP1B1* fehérje expressziós szintjét anti-*SLCO1B1* antitest segítségével detektáltuk. A kísérleteket legalább 3 alkalommal végeztük el. Az ábrán 1-1 reprezentatív kísérlet eredménye látható.

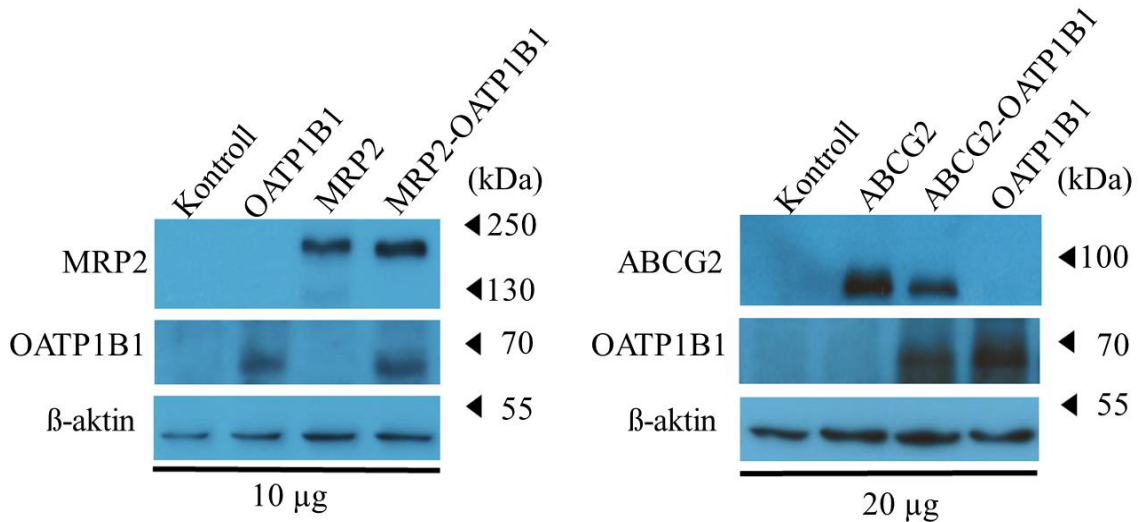
Sajnos e vizsgálatokkal párhuzamosan derült ki, hogy az LDG az MRP2-nek is szubsztrátja, így nem volt meglepő, hogy a dupla transzfektánsokban magasabb OATP1B1 szint tud csak azonos LDG jelet biztosítani, hiszen a felvett festéket az MRP2 folyamatosan kipumpálhatta. Ekkor másik stratégiát választottunk. A sejtvonalak többszöri szortolási folyamatai során elvégzett számos Western blot kísérlet alatt megfigyeltük, hogy a 3-4 hete tenyésztett MDCKII-OATP1B1 sejtek OATP1B1 expressziója stabil maradt (18A ábra). Ezzel szemben a dupla transzfektáns OATP1B1 expressziója ennyi idő alatt látványosan lecsökken (18B ábra), de megfigyeléseink szerint már körülbelül két hét elteltével is jelentősen változik OATP1B1 expressziója, az MDCKII-OATP1B1 sejtekhez hasonló szintre.

Így felmerült annak a lehetősége, hogy 2-4 hétig heti 2-3 passzálassal kultúrában tartva a dupla transzfektáns sejteket, azok OATP1B1 expresszióját a fehérjét stabilan expresszáló MDCKII-OATP1B1 sejtek OATP1B1 expressziójához összemérhető szintűre csökkentjük. Ez az elgondolásunk sikeresen működött, melyet a 18C ábrán illusztrálok.



18. ábra Az OATP1B1 expresszió beállítása MDCKII sejtekben. 10/20/40 µg sejt lizátum OATP1B1 fehérje expressziós szintjét anti-SLCO1B1 antitest segítségével detektáltuk. A kísérleteket legalább 3 alkalommal végeztük el. Az ábrán 1-1 reprezentatív kísérlet eredménye látható.

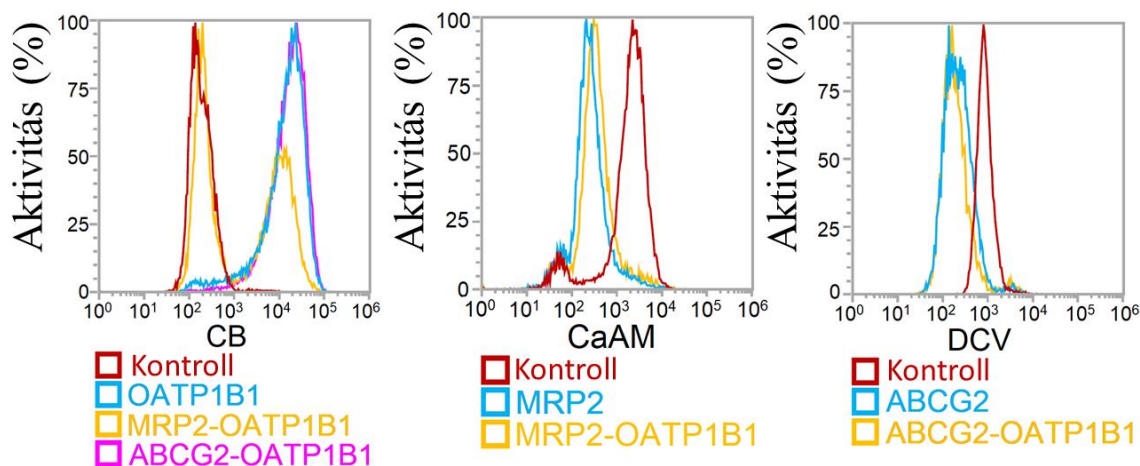
A transzcelluláris transzport kísérletekhez tehát a dupla transzfektáns sejteket néhány hétig kultúrában tartva és az OATP1B1 expressziót rendszeresen ellenőrizve a sejtvonalakat összemérhető OATP1B1 expressziójú szintre állítottuk be. A publikációban bemutatott kísérleti eredmények is ezeken a sejtvonalakon készültek (19. ábra). Az ABCG2 esetében nem volt szükség ilyen hosszadalmas expresszió beállításra, ami utólag megmagyarázható azzal, hogy az LDG nem szubsztrátja az ABCG2-nek.



19. ábra OATP1B1, MRP2 és ABCG2 fehérjék expressziójának ellenőrzése MDCKII sejtvonalakban. 10/20 µg sejt lizátum OATP1B1/MRP2/ABCG2 fehérje expressziós szintjét vizsgáltuk Western blot technika segítségével. A fehérjéket az ellenük termeltetett antitestek segítségével detektáltuk. A kísérleteket legalább 3 alkalommal végeztük el. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

4.3.4. MDCKII-MRP2-OATP1B1 és MDCKII-ABCG2-OATP1B1 kotranszfektáns sejtvonalak transzporter funkciójának ellenőrzése áramlási citometriával

Miután megbizonyosodtunk, hogy a transzporterek expressziója fehérje szinten megfelelő, ellenőriztük azok funkcióját is. Áramlási citometriás kísérletekben ismert OATP1B1, MRP2, valamint ABCG2 fluoreszcens szubsztrátok (CB, CaAM, LY) transzportját vizsgáltuk (20. ábra).



20. ábra OATP1B1, MRP2, valamint ABCG2 transzporter funkciók vizsgálata áramlási citometriával MDCKII sejtekben. Az OATP1B1/MRP2/ABCG2 transzporterek működésének vizsgálata CB/CaAM/DCV fluoreszcens festékekkel történt. $5 \cdot 10^5$ MDCKII sejtet 10 (CaAM)/ 30 (CB, DCV) percig inkubáltunk 37°C -on pH 5,5/7,4 (OATP/ABC funkcióhoz) transzport pufferben oldott 100 μl végtérfogatú, 0,5 (CaAM)/ 1 (CB, DCV) μM koncentrációjú fluoreszcens szubsztráttal. A minták fluoreszcencia intenzitását minimum 20000 sejt alapján határoztuk meg Attune Akusztikus Fókuszáló Citométer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével. A transzport kísérleteket legalább háromszor ismételtük, az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

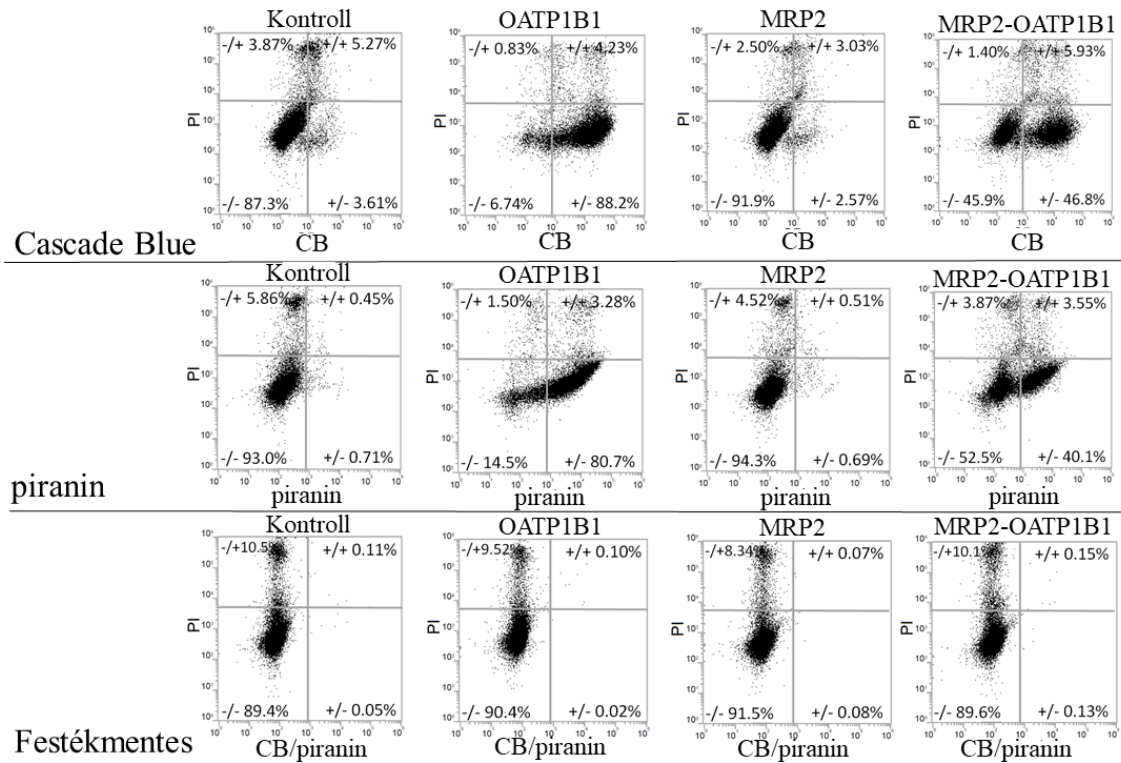
A dupla transzfektánsokban az MDCKII-OATP1B1 sejtekhez hasonló CB transzportot figyeltünk meg, így megállapítható, hogy az MDCKII-MRP2-OATP1B1 uptake funkciója megfelelő. Érdekes, hogy az MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtekben két populáció különült el a CB fluoreszcens jelét vizsgálva: egy a kontrollal, egy pedig az OATP1B1 jelével esik egybe. Ez a továbbiakban (4.3.8. fejezet) ismertetett eredményeim alapján nem meglepő, hiszen ezekben a sejtekben az MRP2 részben kipumpálja a festéket, így detektálható alacsonyabb fluoreszcencia intenzitású csúcs is. Ezzel ellentétben az ABCG2-OATP1B1 sejtek hisztogramja egyetlen hisztogramból áll, az OATP1B1 sejtekhez hasonló transzporter funkciót jelezve.

A CaAM sejtpemeabilis festék, ismert ABCB1 és MRP szubsztrát, mely akkor válik fluoreszcenssé, amennyiben az intracelluláris észterázok acetoximetil-észter hidrolízise által calceinné alakul. Az MRP2 a calceint felismeri, ezáltal kipumpálja a sejtől, és így az intracellulárisan mérhető calcein fluoreszcens jele lecsökken. Az MRP2-OATP1B1 sejtekben az MDCKII-MRP2 sejtekhez hasonló MRP2 funkció volt megfigyelhető.

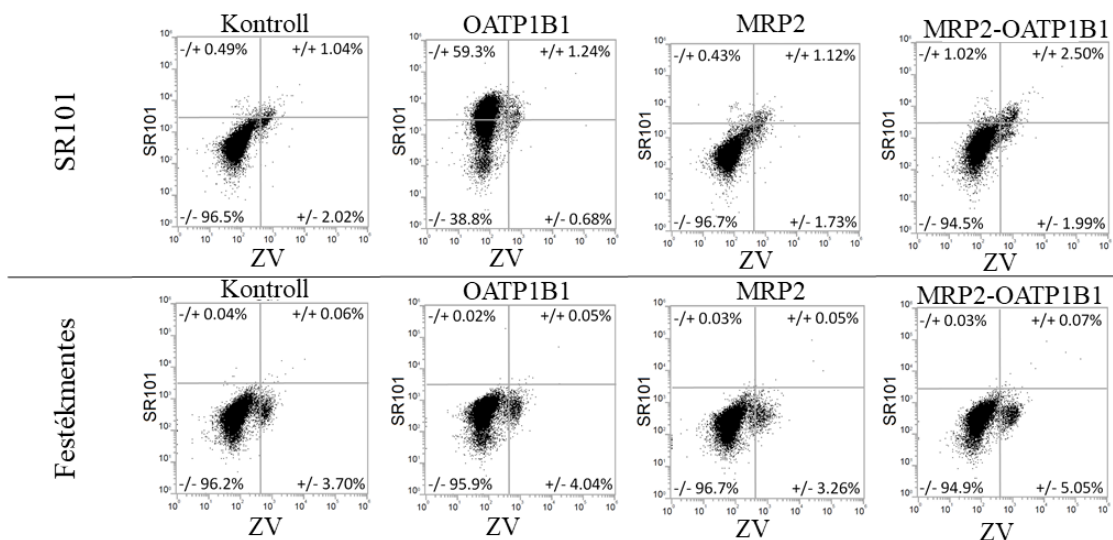
Az ABCG2 transzporter funkció vizsgálatára a DCV festéket alkalmaztuk, mely szintén membrán permeábilis, és a sejtbe bejutva a kettősszálú DNS-hez kötődik. Az ABCG2 a DCV festéket kipumpálja a sejtéből, így a DCV intracelluláris mennyisége lecsökken. Ezzel arányosan a detektálható fluoreszcens jel az ABCG2 funkciót mutató sejtekben kisebb a kontroll sejtekhez képest, mely összevethető mértékben egyaránt megfigyelhető volt az MDCKII-ABCG2 és a dupla transzfektáns sejtekben is.

4.3.5. *A felfedezett új, közös fluoreszcens OATP-ABC szubsztrátok nem toxikusak*

Új, élő sejtes módszer beállításakor fontos ellenőriznünk, hogy a kísérlet során az alkalmazott anyagok (szubsztrátok) jelenlétében, az adott inkubációs idő alatt a sejtek életképessége nem változik számottevően, így a sejtpusztulás nem befolyásolhatja a vizsgált paramétereket. Ez azért is volt fontos esetünkben, mert a festékfelvételt pH 5,5 körülmények között végeztük, hiszen csak ezen a pH értéken transzportálja az OATP1B1 ezeket a festékeket [328]. Ezért mindhárom általunk felfedezett közös új OATP-ABC szubsztrát (piranin, CB és SR101) esetleges sejtekre való toxicitását megvizsgáltuk. Az élő sejtek százalékban kifejezett mennyiségét 30 perces inkubációt (37°C) követően áramlási citométerben viabilitási festékek segítségével határoztuk meg (21-22. ábra). Kísérleteink során a festékek gerjesztési és emissziós hullámhosszait figyelembe véve, a CB és piranin szubsztrátok alkalmazása esetén a viabilitási markerként gyakran alkalmazott propídiium-jodidot (PI) használtuk. Az SR101 festék vizsgálatakor pedig a ZV festék szolgált az élő/holt populáció elkülönítésére. Megállapítottuk, hogy egyik festék hatására sem csökken az élő sejtek száma 80% alá, így sem a piranin, CB, vagy SR101 nem tekinthető toxikus festéknek a vizsgált időtartam alatt.



21. ábra A piranin és CB festékek toxikusságának vizsgálata áramlási citométerben. $5 \cdot 10^5$ MDCKII sejtet 30 percig inkubáltunk 37°C -on pH 5,5 transzport pufferben oldott $100 \mu\text{l}$ végtérfogatú, $5 \mu\text{M}$ koncentrációjú CB/piranin fluoreszcens szubsztráttal. A reakciót $700 \mu\text{l}$ jéghideg $1 \times \text{PBS}$ -ben oldott $1 \mu\text{g/ml}$ PI (propidium-jodid) viabilitási marker hozzáadásával állítottuk le. A minták fluoreszcencia intenzitását minimum 20000 sejt alapján határoztuk meg Attune Akusztikus Fókuszáló Citométer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.



22. ábra Az SR101 toxikusságának vizsgálata áramlási citométerben. $5 \cdot 10^5$ MDCKII sejtet 30 percig inkubáltunk 37°C -on pH 5,5 transzport pufferben oldott $100 \mu\text{l}$ végtérfogatú, $1 \mu\text{M}$ koncentrációjú SR101 fluoreszcens szubsztráttal. A reakciót $700 \mu\text{l}$ jéghideg $1 \times \text{PBS}$ -ben oldott $0,1 \mu\text{l/ml}$ ZV viabilitási marker hozzáadásával állítottuk le. A minták fluoreszcencia intenzitását minimum 20000 sejt alapján határoztuk meg Attune Akusztikus Fókuszáló Citométer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

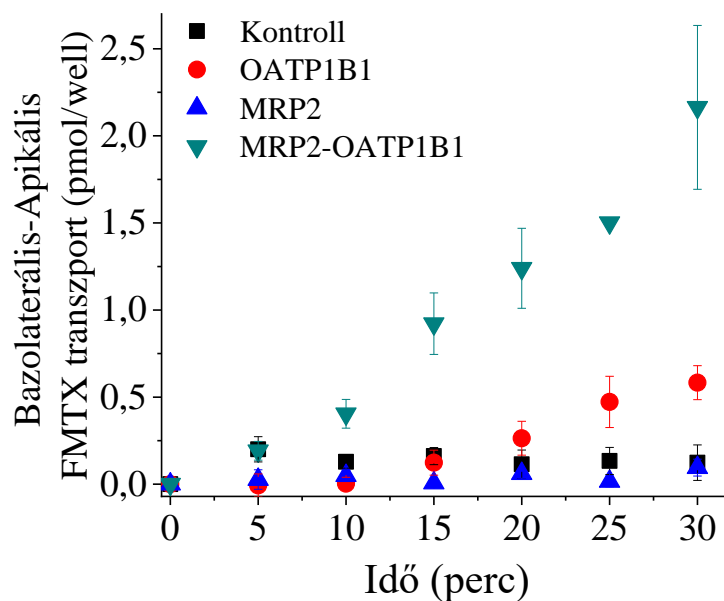
4.3.6. A fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása

Az MDCKII sejtvonalról ismert, hogy abban a polarizáció során a termeltetett OATP1B1/3 transzporterek a bazolaterális (B), míg az MRP2 és ABCG2 az apikális (A) oldalra lokalizálódnak [316, 322]. Tehát annak megállapítására, hogy az új fluoreszcens, közös OATP-ABC szubsztrátok valóban alkalmazhatóak-e az OATP1B1 és MRP2, valamint az OATP1B1 és ABCG2 funkciójának együttes tanulmányozására, a CB, SR101 és piranin transzcelluláris transzportját polarizált, kettős transzsfektáns MDCKII sejtvonalakban vizsgáltuk.

A dupla transzsfektáns sejtekben a bazolaterális oldalon alkalmazott közös szubsztrát vektorialis transzportja várható a bazolaterálistól az apikális kompartment felé. Amennyiben számukra közös fluoreszcens szubsztrátot adagolunk a B oldalon, azt az OATP1B1 a sejtbe pumpálja, így a fluoreszcens festék intracellulárisan már elérhető az efflux transzporter számára, amely képes azt kipumpálni az A oldalra. E transzcelluláris transzport során a B oldalon adagolt fluoreszcens szubsztrát mennyisége időfüggő módon

az apikális oldalon dúsul. Amennyiben a sejtben csak uptake (OATP1B1) vagy csak efflux transzporter (ABCG2/MRP2) overexpresszálódik, abban az esetben a fluoreszcens szubsztrát intracellulárisan megreked, így nem detektálható az apikális oldalon, vagy pedig egyáltalán nem jut be a sejtbe.

Az MRP2-OATP1B1 kettős transzfektáns sejtvonalakon a mérési és sejttenyésztési körülmények alkalmasságát egy ismert közös szubsztrát, a FMTX segítségével ellenőriztük (23. ábra) [228, 296, 323]. A dupla transzfektánsokban az idő függvényében növekvő fluoreszcencia intenzitást figyeltünk meg, míg kontroll sejtvonalaikban (MDCKII Kontroll, MDCKII-MRP2) nem volt számottevő fluoreszcens jel-növekedés. Az MDCKII-OATP1B1 esetében enyhe jel növekedést észleltünk, ami azzal magyarázható, hogy az OATP1B1 révén a sejtben feldúsuló FMTX kismértékben átjut a membránon (valószínűleg passzív, vagy apikálisan endogén efflux transzport, például endogén kutya MDR1, vagy MRP2 által [209, 355-357]).

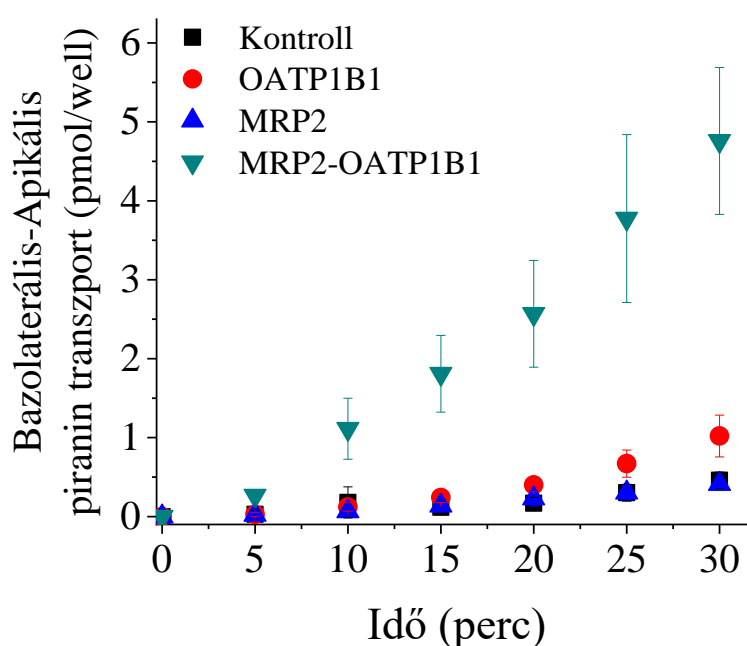


23. ábra A FMTX vektoriális transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligátersztő transwell inzerben 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a FMTX transzcéluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $1 \mu\text{M}$ FMTX fluoreszcens festékkel kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. Az apikális (A) oldalon időfüggő módon mintát vettünk, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (FMTX: 497/516 nm). Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

4.3.7. Fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása a piranin festékre OATP1B1 és MRP2 dupla transzfektánsokon

4.3.7.1. A piranin B-A irányú transzcelluláris transzportja

Az MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtekben a FMTX-hoz hasonlóan B-A irányban időfüggő módon növekvő transzcelluláris transzportot figyeltünk meg a piranin festékre is. Ezzel szemben a kontroll sejtvonalakban nem volt számottevő fluoreszcencia növekedés (24. ábra).

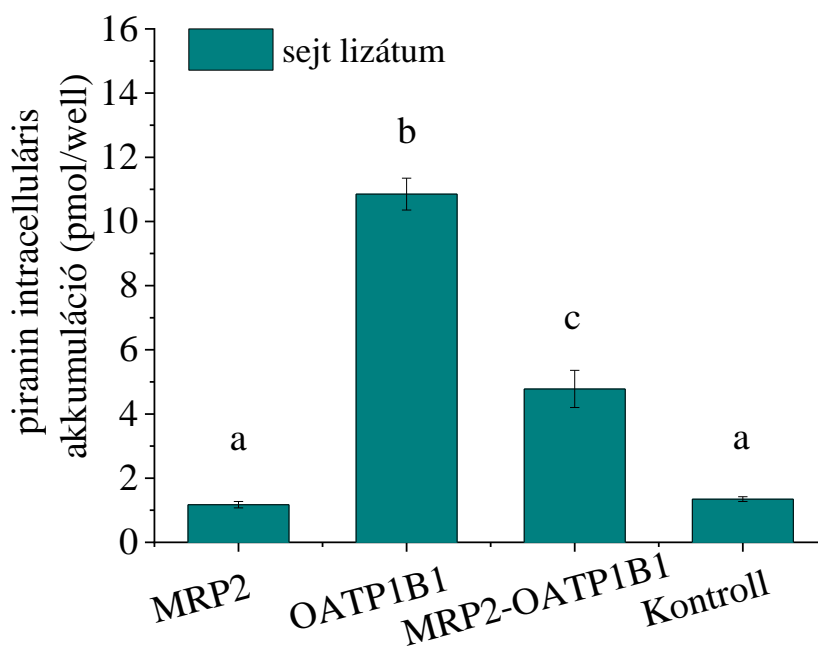


24. ábra A piranin vektoriális transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligáteresztő transwell inzerten 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a piranin transzcelluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $5 \mu\text{M}$ piranin fluoreszcens festékkel kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. Az apikális (A) oldalon időfüggő módon mintát vettünk, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (piranin: 403/517 nm). Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

4.3.7.2. A piranin intracelluláris akkumulációja

A piranin B-A transzcelluláris transzportjának alátámasztására megvizsgáltuk a 24. ábrán látható kísérletet követően a sejtek intracelluláris piranin tartalmát. A 24. ábrán látható transzcelluláris transzport leállítását követően a sejteket feltártuk, és fluoreszcens lemezolvasó segítségével mértük a sejtekbe bejutott piranin festék mennyiségét (25.

ábra). Megfigyeltük, hogy csak olyan sejtekbe jutott be nagyobb mennyiségű piranin, amelyekben OATP1B1 fehérjét overexpresszáltunk, míg uptake transzporter hiányában (MDCKII Kontroll és MDCKII-MRP2) nem detektáltunk számottevő mennyiségű piranint intracellulárisan. A kizárólag OATP1B1-et overexpresszáló sejtekhez képest a dupla transzfektánsban alacsonyabb mennyiségű piranin akkumulálódik az MRP2 efflux működése miatt.

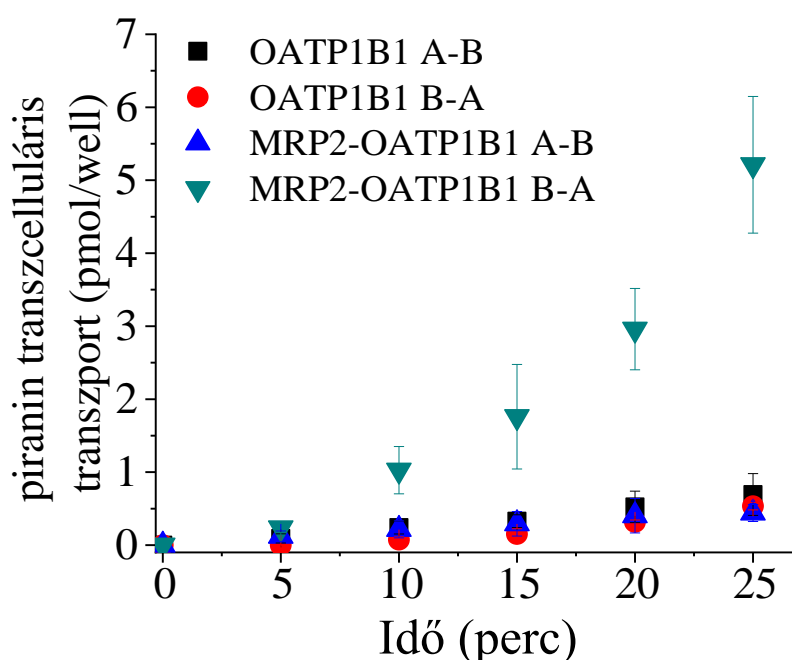


25. ábra A piranin intracelluláris akkumulációja MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligátersztő transwell inzerten 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a piranin transzcelluláris transzportját követően a sejtekben intracellulárisan akkumulálódott piranin mennyiségét. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $5 \mu\text{M}$ piranin fluoreszcens festékekkel kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. A transzportot követően a sejtekből felszabaduló piranin festék fluoreszcenciáját Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (piranin: 403/517 nm). Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható. A szignifikancia vizsgálatot Tukey-Kramer HSD (Honest Significant Differences) teszt segítségével végeztük el, miután elutasítottuk a nullhipotézist ($\alpha=0,05$). Az azonos betűjellel ellátott minták („a” Kontroll és MRP2 esetén) nem különböznek egymástól, velük ellentétben a különböző betűjelűek („b”, „c”) ($p < 0,05$, Tukey-Kramer HSD teszt) szignifikánsan eltérőek.

4.3.7.3. A piranin ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportja

Annak bizonyítására, hogy a 24. ábrán látható eredmény nem csak a sejt monolayer átjárhatóságából adódik, a piranin transzcelluláris transzportját az MRP2-OATP1B1 dupla, valamint szimpla OATP1B1 transzfektáns sejteken A-B irányban is megvizsgáltuk

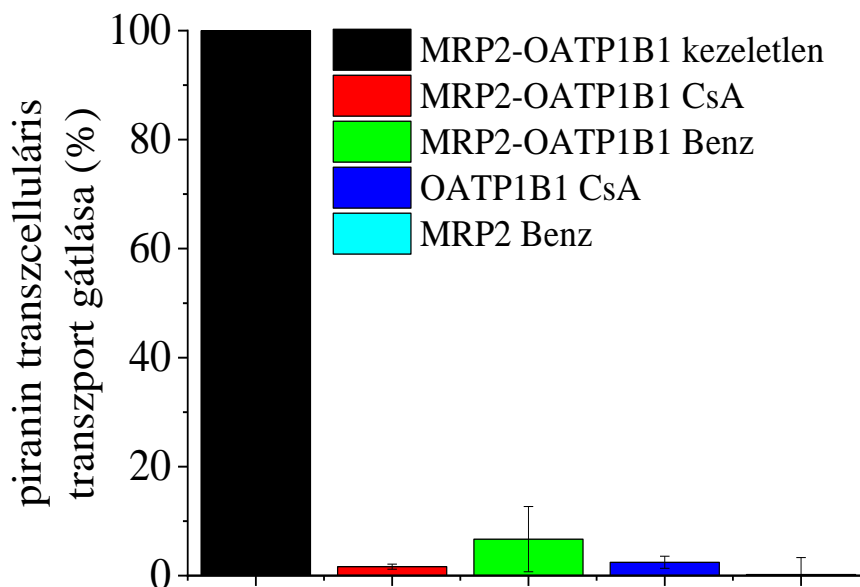
(26. ábra). A 24. ábrán már bemutatott dupla transzfektáns, valamint OATP1B1 sejtek transzcelluláris transzportja mellett tehát ugyanezen sejtekben megmértük a transzcelluláris transzportot az apikális, A oldalról is indítva. Kizárólag a dupla transzfektánsban, és csak B-A irányban detektálható transzcelluláris piranin transzport, a kontrollokban ez nem megfigyelhető, így a sejtréteg passzív átjárhatósága kizárható.



26. ábra A piranin ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ sejtet féligáteresztő transwell inzeren 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken végeztük a kísérletet. A sejteket a bazolaterális (B)/ apikális (A) oldalon $5 \mu\text{M}$ piranin fluoreszcens festékkel kezeltük (OATP1B1 B-A/A-B vagy MRP2-OATP1B1 B-A/A-B) és 37°C -on 25 percig inkubáltuk. Időfüggő módon mintát vettünk az apikális (A)/ bazolaterális (B) oldalon, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (piranin: 403/517 nm). Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

4.3.7.4. A piranin B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása

Szerettünk volna arról megbizonyosodni, hogy a dupla transzfektánsokban az apikális oldali növekvő piranin fluoreszcencia intenzitás az OATP1B1 és MRP2 összehangolt működéséből adódik. Ezért a piranin B-A transzcelluláris transzportjának harmadik validálási módjaként a vektoriális transzportot megvizsgáltuk gátlószerek jelenlétében is (27. ábra). A bazolaterális oldalon piranin szubsztrát mellett az OATP1B1 uptake funkciójának gátlása céljából CsA-t, vagy az apikális oldalon az MRP2 efflux gátlására Benz-t adagoltunk.



27. ábra A piranin B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása CsA vagy Benz vegyületekkel MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ sejtet féligátersztő transwell inzerten 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a piranin transzcelluláris transzportját. A szubsztrát adagolása előtt 5 perces előinkubáció során a B oldalon $10 \mu\text{M}$ CsA-t/apikális oldalon $40 \mu\text{M}$ Benz-t adagoltunk. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $5 \mu\text{M}$ piranin fluoreszcens szubsztráttal kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. Időfüggő módon mintát vettünk az apikális (A) oldalon, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (piranin: $403/517 \text{ nm}$). A kezeletlen MRP2-OATP1B1 sejt fluoreszcens jeléhez viszonyítottuk a többi sejt fluoreszcenciáját. Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

A dupla transzfektáns sejtek piranin transzportja akár a B oldalon CsA-val, akár az A oldalon Benz-nal felfüggeszthető volt. A kísérlet kontrolljaként a kizárólag OATP1B1, vagy MRP2 transzportert overexpresszáló sejteket is kezeltük a piranin mellett a bazolaterális oldalon CsA-val, vagy az apikális oldalon Benz-zel. Ezen sejtekben így sem volt detektálható transzcelluláris transzport.

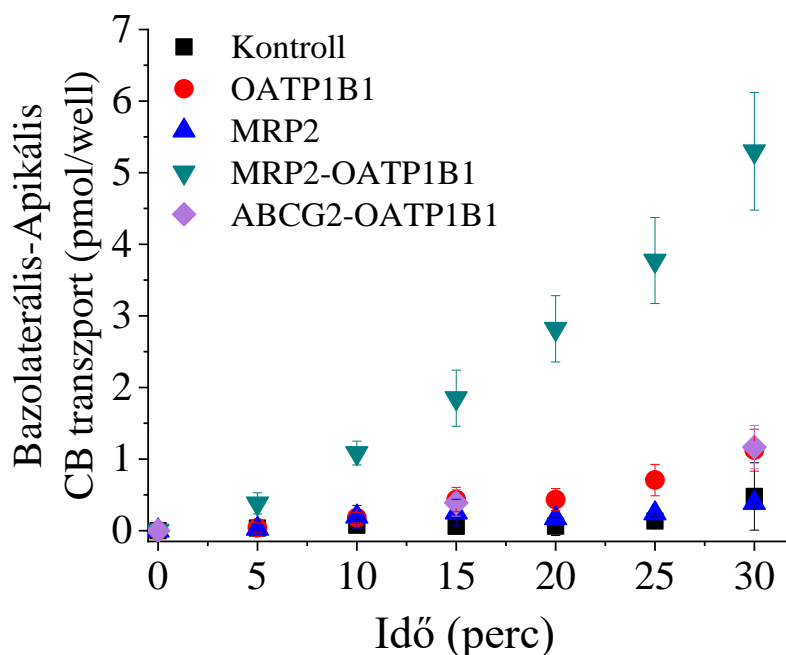
Mindezek alapján bebizonyítottuk, hogy az MDCKII-MRP2-OATP1B1 sejtekben a transzporterek piranin festékekkel való kölcsönhatásaként megnyilvánuló OATP1B1 általi uptake, majd MRP2-mediált effluxnak köszönhető a piranin B-A irányú transzcelluláris transzportja.

4.3.8. Fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszer beállítása a CB és SR101 festékekre OATP1B1-MRP2 dupla transzfektánsokon

Az *Sf9* IOV transzport kísérletekben kapott eredmények alapján a SR101 szintén potenciális közös OATP1B1 és MRP2 szubsztrát (13B ábra), valamint a CB festék gyenge akumulációját is megfigyeltük MRP2, illetve ABCG2 IOV-kben (13B, D ábra). Ezért annak megválaszolására, hogy e festékek vektoriális transzport kísérletekben fluoreszcens szubsztrátként alkalmazhatóak-e, megvizsgáltuk transzcelluláris transzportjukat (28-29. ábra).

4.3.8.1. A CB B-A irányú transzcelluláris transzportja OATP1B1 és MRP2, valamint ABCG2 dupla transzfektánsokon

Az MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánsban a CB-ra –hasonlóan a piraninhoz– időfüggő transzcelluláris transzportot figyeltünk meg, míg a kontroll sejtekben ez nem volt megállapítható (28. ábra). Az MRP2-OATP1B1 sejtekkel ellentétben érdekes módon –ahogyan azt az *Sf9* ABCG2 IOV-kben detektált kismértékű, de szignifikáns CB transzport alapján vártuk volna – az ABCG2-OATP1B1 sejtekben transzcelluláris CB transzport nem volt megfigyelhető (28. ábra).

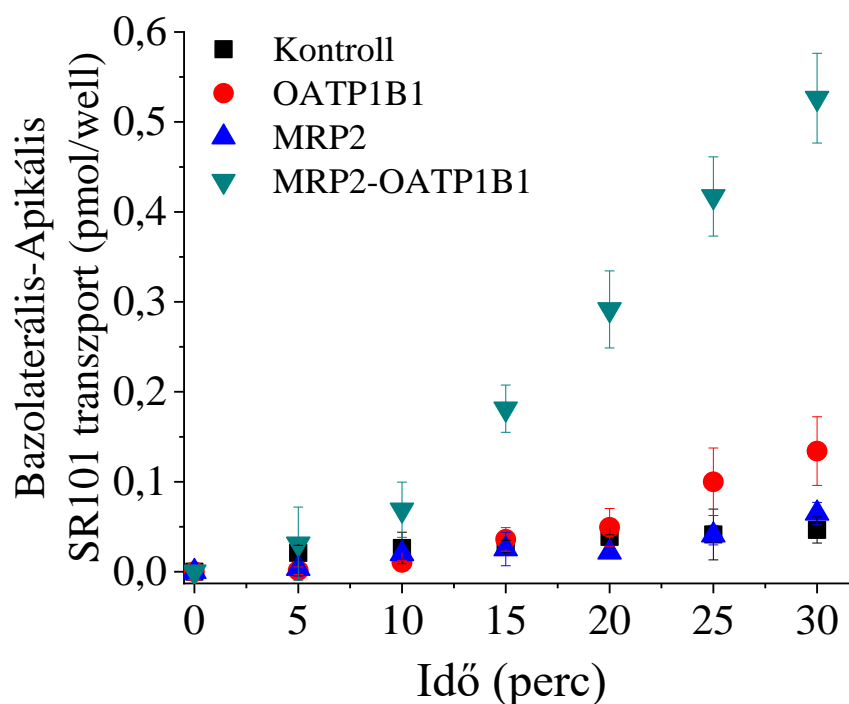


28. ábra A CB transzcelluláris transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligáteresztő transwell inzerter 4 napig növesztve, polarizált állapotú

sejteken vizsgáltuk a CB transzcelluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $5 \mu\text{M}$ CB fluoreszcens festékkel kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. Időfüggő módon mintát vettünk az apikális (A) oldalon, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (CB: 400/419 nm). Az ABCG2-OATP1B1 sejtvonalon esetén három, a többi sejtvonalon 4 független mérés eredménye \pm szórás látható.

4.3.8.2. Az SR101 B-A irányú transzcelluláris transzportja MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánszon

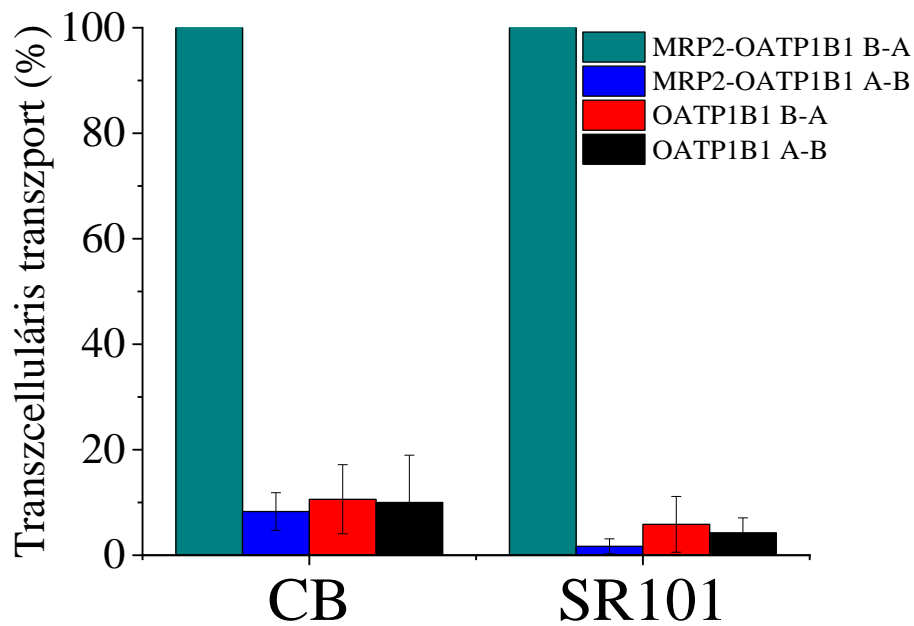
Az MRP2-OATP1B1 sejtekben a SR101 transzcelluláris transzportját is megvizsgáltuk, melyet szintén az időben apikális oldalon növekvő SR101 fluoreszcencia intenzitása bizonyít, hasonlóan az előző két festékhez. A kontroll sejtekben nem történt számottevő festék átjutás az apikális oldalra (29. ábra).



29. ábra A SR101 transzcelluláris transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligátersztő transwell inzerben 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a SR101 transzcelluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $1 \mu\text{M}$ SR101 fluoreszcens festékkel kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. Időfüggő módon mintát vettünk az apikális (A) oldalon, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (SR101: 586/605 nm). Az ábrán 3 független mérés eredménye \pm szórás látható.

4.3.8.3. A CB és SR101 ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportja MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektánson

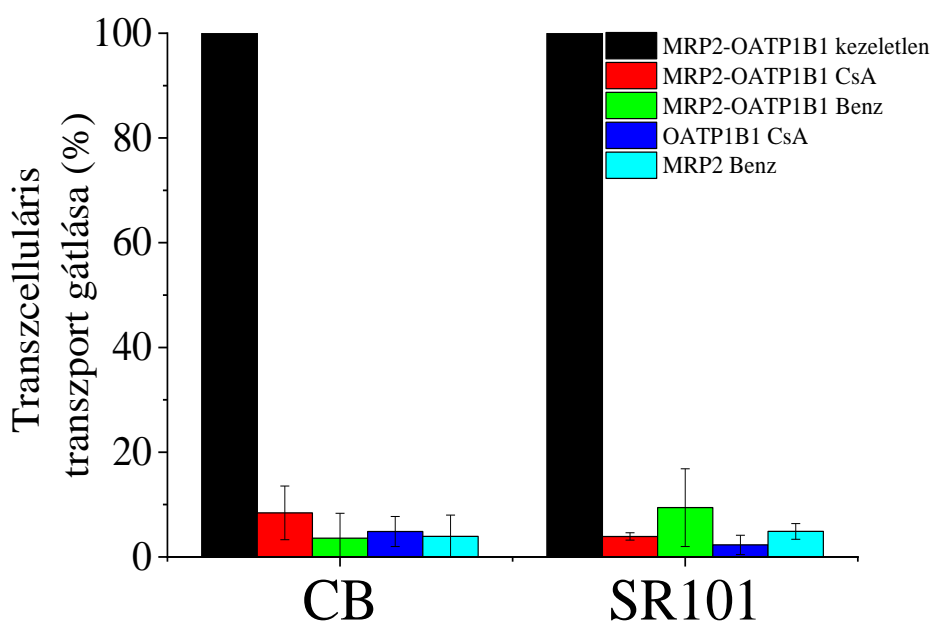
A piraninhoz hasonlóan a CB és SR101 esetén is megvizsgáltuk MRP2-OATP1B1 sejtekben az ellentétes, A-B irányú transzcelluláris transzportot. Hasonlóan e két esetben is azt állapítottuk meg, hogy a festékek számottevően nem képesek átjutni a sejteken (<20%), kizárólag a dupla transzfektánsban a bazolaterálistól az apikális oldal felé (100%) (30. ábra).



30. ábra A CB és SR101 festékek A-B irányú transzcelluláris transzportjának vizsgálata MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligáteresztő transwell inzerten 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a CB és SR101 transzcelluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B)/apikális (A) oldalon $5 \mu\text{M}$ CB/ $1 \mu\text{M}$ SR101 fluoreszcens festékekkel kezeltük (OATP1B1 B- A/ A-B vagy MRP2-OATP1B1 B-A/ A-B) és 37°C -on 25 percig inkubáltuk. Az ábrán a 25. perces minták jele látható, amelyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (CB: 400/419 nm, SR101: 586/605 nm). Az MRP2-OATP1B1 sejtek B-A fluoreszcens jeléhez viszonyítva állapítottuk meg a minták fluoreszcencia intenzitását. Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

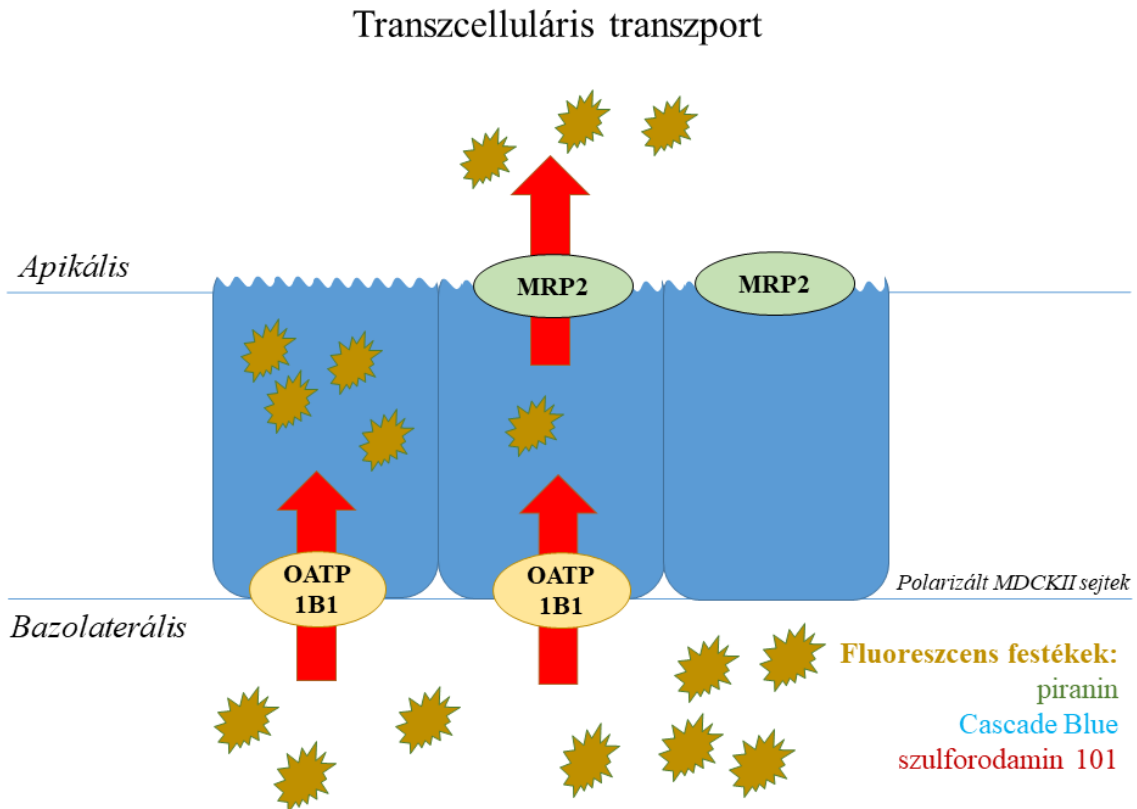
4.3.8.4. A CB és SR101 B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása MDCKII-MRP2-OATP1B1 dupla transzfektáns

A CB és SR101 festékekre beállítandó módszer validálásának végső lépéseként a festékek transzcelluláris transzportját megvizsgáltuk a már említett (4.3.7.4. fejezet) interakciós partnerek jelenlétében is. Sem CsA-val, sem Benz jelenlétében nem detektáltunk jelentős CB/SR101 átjutást a dupla transzfektánsokban a bazolaterális oldalról az apikális oldalra. Hasonlóképpen a kontroll sejtvonalakban sem történt CB vagy SR101 transzcelluláris transzport (31. ábra).



31. ábra A CB és SR101 B-A irányú transzcelluláris transzportjának gátlása MDCKII sejtekben. $9 \cdot 10^4$ MDCKII sejtet féligáteresztő transwell inzerben 4 napig növesztve, polarizált állapotú sejteken vizsgáltuk a CB/SR101 transzcelluláris transzportját. A sejteket a bazolaterális (B) oldalon $5 \mu\text{M}$ CB/ $1 \mu\text{M}$ SR101 fluoreszcens szubsztráttal kezeltük és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. A szubsztrát adagolása előtt 5 perces előinkubáció során a B oldalon $10 \mu\text{M}$ CsA-t/ apikális oldalon $40 \mu\text{M}$ Benz-t adagoltunk. Időfüggő módon mintákat vettünk az apikális (A) oldalon, melyek fluoreszcencia intenzitását Enspire fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk (CB: 400/419 nm, SR101: 586/605 nm). A kezeletlen MRP2-OATP1B1 sejtek fluoreszcens jeléhez viszonyítva állapítottuk meg a minták fluoreszcencia intenzitását. Az ábrán három független mérés eredménye \pm szórás látható.

Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az MRP2-OATP1B1 sejtekben a CB, valamint SR101 festékek bazolaterálisból az apikális kompartmentumba történő transzcelluláris transzportja az OATP1B1, illetve MRP2 transzporterek összehangolt működése révén történik meg. A 4.3.7 és 4.3.8. fejezetek eredményeit a 32. ábrán foglalom össze.



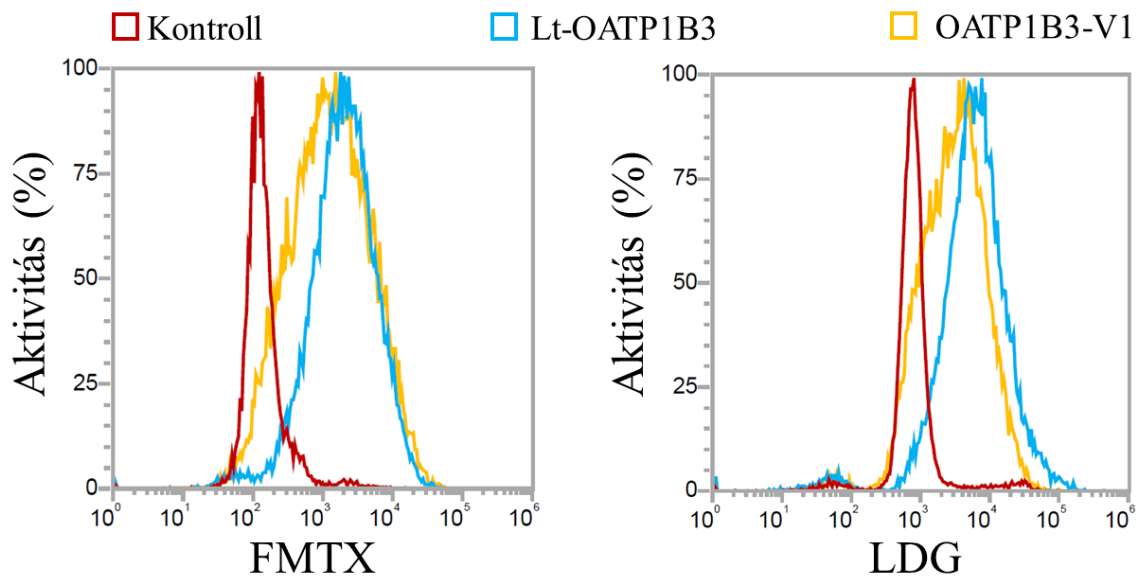
32. ábra Az OATP és ABC transzporterek közös vizsgálatára alkalmas transzcelluláris transzport mérési módszer vázlatja. OATP1B1-et overexpresszáló sejtek: a festékek bejutnak a sejtbe, de ott rekednek. OATP1B1 és MRP2-t együttesen overexpresszáló sejtek: vektorialis átjutás B → A irányban. MRP2-t overexpresszáló sejtek: a festékek a sejtbe sem jutnak be.

4.4. A tumor-specifikus Ct-OATP1B3-V1 jellemzése

Az emberi szervezetben kizárólag a májban előforduló multispecifikus gyógyszer transzporter Lt-OATP1B3 fehérjének létezik csak tumorokban kifejeződő változata, amit Ct-OATP1B3-V1-nek neveztek el [163]. Annak ellenére, hogy a tumor-specifikus Ct-OATP1B3-V1 ígéretes rákterápiás célpont, működőképessége vitatott. Kutatócsoportunk célja az volt, hogy a szakirodalmi ellentmondásokat feloldjuk a tumor-specifikus OATP1B3 variánsok lokalizációjának és funkciójának tekintetében. Ennek érdekében kutatócsoportunk korábban létrehozta az Lt-OATP1B3, Ct-OATP1B3-V1 és Ct-OATP1B3-C-t kifejező A431 és HCT-8 sejt vonalakat. Ezek segítségével azt találták, hogy míg a Ct-OATP1B3-C intracellulárisan reked, addig a V1 a plazma membránban helyezkedik el. Feladatom az volt, hogy az A431 sejtekben overexpresszált V1 fehérje funkcionális vizsgálatát elvégezzem.

4.4.1. A Ct-OATP1B3-V1 variáns működőképességének jellemzése A431 sejtvonalonban

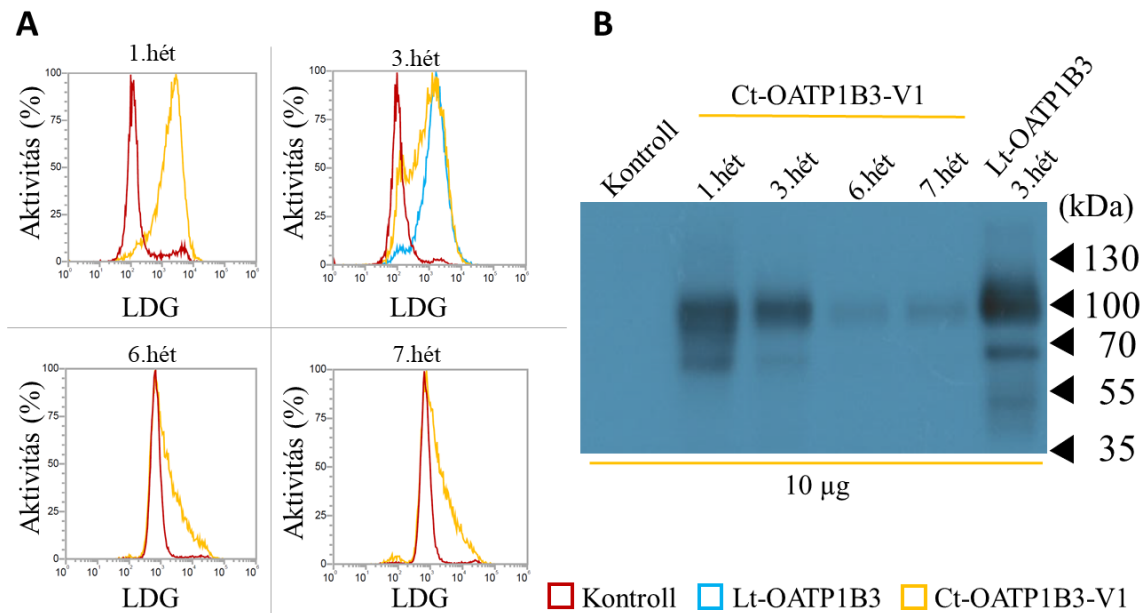
Az A431-OATP1B3-V1 és kontroll sejtvonalonban áramlási citometria segítségével megvizsgáltam a fehérje működőképességét. Ehhez FMTX-ot, valamint LDG-t, két, korábban igazolt OATP1B3 fluoreszcens szubsztrátot alkalmaztam (33. ábra). Az Lt-OATP1B3-hoz hasonló funkciót sikerült kimutatni mindkét tesztelt szubsztrát esetében, így megállapíthatjuk, hogy a V1 működőképes transzporter fehérje.



33. ábra A Lt-OATP1B3 és Ct-OATP1B3-V1 fehérjék transzporter funkciójának ellenőrzése áramlási citometriával. $5 \cdot 10^5$ A431 sejtet 30 percig inkubáltunk 37°C-on pH 5,5 transzport pufferben oldott 100 μ l végtérfogatú, 1 μ M (FMTX) koncentrációjú/mintánként 0,1 μ l (LDG) jelenlétében. A minták fluoreszcencia intenzitását minimum 20000 sejt alapján határoztuk meg Attune Akusztikus Fókuszáló Citométer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével. A transzport kísérleteket legalább háromszor ismételtük, az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

4.4.2. A Ct-OATP1B3-V1 expressziójának és funkciójának időbeli nyomon követése

Kísérleteink során többször felmerült, hogy a Ct-OATP1B3-V1 idővel csökkent funkcióval bír, ami a kísérletek reprodukálhatóságát csorbítja. Ezért a sejtvonalak elindításától számítva 7 héten keresztül követtük a Ct-OATP1B3-V1 expresszióját és funkcióját (34. ábra).



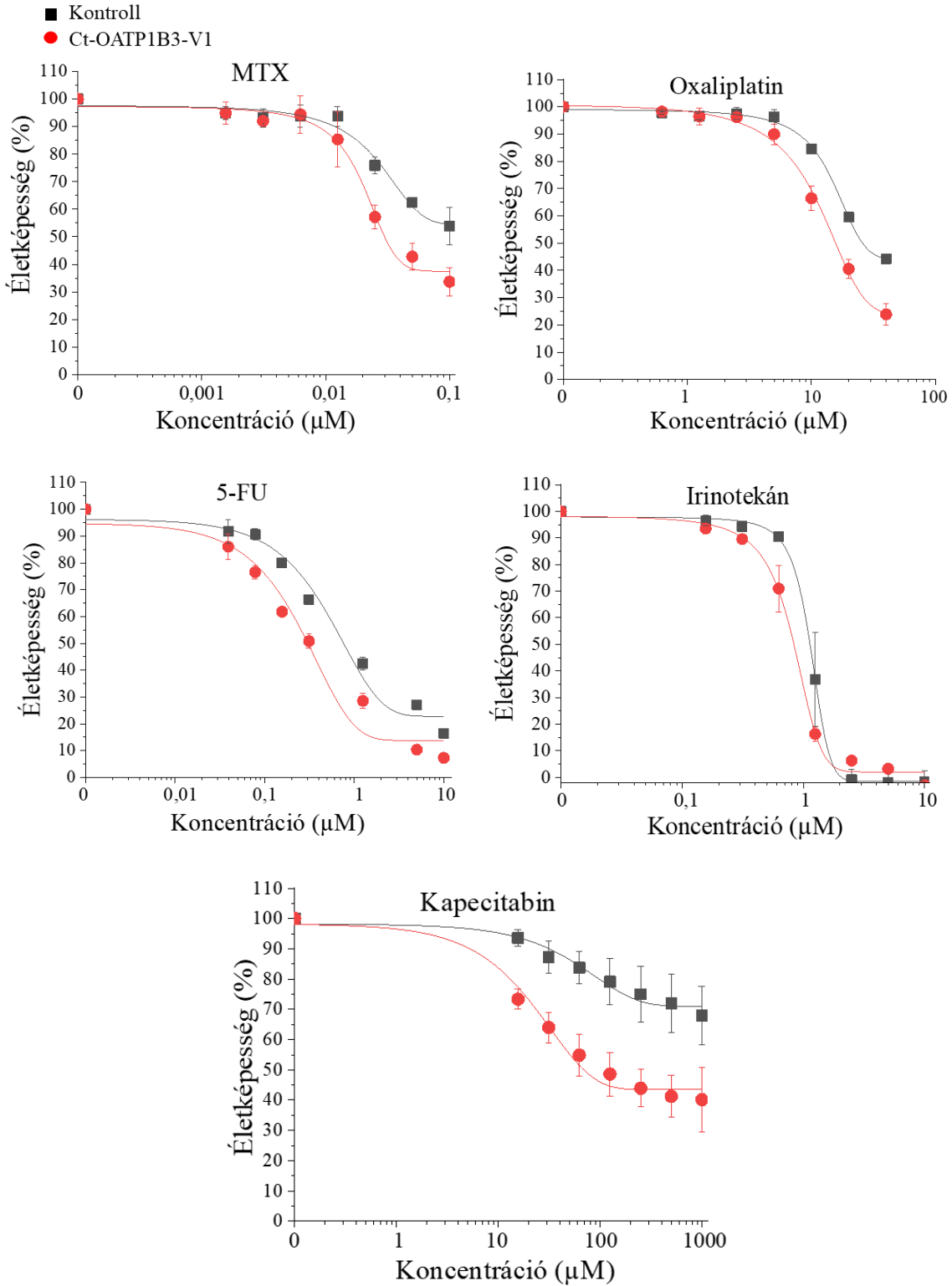
34. ábra A *Lt-OATP1B3* és *Ct-OATP1B3-V1* fehérjék transzport funkciójának és expressziójának vizsgálata áramlási citométer (A), valamint Western blot (B) technikák segítségével. A: $5 \cdot 10^5$ A431 sejtet 30 percig inkubáltunk 37°C -on pH 5,5 transzport pufferben oldott $100 \mu\text{l}$ végtérfogatú, mintánként $0,1 \mu\text{l}$ (LDG) fluoreszcens szubsztráttal. A minták fluoreszcencia intenzitását minimum 20000 sejt alapján határoztuk meg Attune Akusztikus Fókuszáló Citométer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható. B: $10 \mu\text{g}$ sejt lizátum OATP1B3 fehérje expressziós szintjét anti-SLCO1B3 antitest által detektáltuk. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el, az ábrán egy-egy reprezentatív vizsgálat eredménye látható.

Megfigyeltük, hogy a Ct-OATP1B3-V1 expressziója a hetek múlásával folyamatosan csökkent, a 6-7. hétre szinte teljesen eltűnt. Mindezt az áramlási citométerrel kapott eredmények alátámasztották, tehát a fehérje expresszióval együtt a V1 LDG transzport funkciója is lecsökkent. Mivel az expressziós szint csökkenését többször is megfigyeltük, a kiindulási sejtvonal alacsony passzázsszámú változatát felszaporítva, majd lefagyasztva tároltuk, és a 4.4. fejezetben bemutatott további eredmények mindegyike az alacsony passzázsszámú, optimális V1 fehérje expressziót és funkciót mutató sejteken készült.

4.4.3. A *Ct-OATP1B3-V1* vizsgálata tumor terápiás szerekekkel viabilitás tesztekben

Ismert, hogy a Ct-OATP1B3-V1 legnagyobb mennyiségben kolorektális tumorokban fejeződik ki, amelyek kezelésére a klinikumban a legelterjedtebb gyógyszerek az irinotekán, kapecitabin, 5-FU és oxaliplatin, illetve ezek kombinációi [105, 358, 359]. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk igazoltan transzporterként működő V1 képes-

e a sejteket érzékenyíteni citosztatikumokkal szemben, ami ezeknek a szereknek a megnövekedett sejtbeli felvételével lenne magyarázható. Ezekon kívül a MTX, Lt-OATP1B3 szubsztrát daganatterápiás szer [360] hatását is teszteltük sejt életképességi vizsgálatokban.



35. ábra A Ct-OATP1B3-V1 sejtek érzékenyítő képessége terápiás szerekre a kontroll sejtvonalhoz képest. $5 \cdot 10^3$ A431-OATP1B3-V1/A431 kontroll sejtet 96 lyukú lemezekre ültettünk 100 μ l DMEM médiumban. Másnap a sejteket növekvő, a következő maximális koncentrációkban kezeltük: 1000 μ M (kapecitabin), 40 μ M (oxaliplatin), 10 μ M (irinotekán, 5-FU), 0,1 μ M (MTX). A sejteket ezután 144 órán keresztül tartottuk 37°C 5% CO₂ inkubátorban. A sejtek életképességét (fluoreszcencia) 100 μ l 5% PrestoBlue-PBS oldatban detektáltuk 1 óra 37°C 5% CO₂ inkubálást követően Enspire fluoreszcens lemezolvasóban (585 nm). Kontrollnak a kezeletlen sejteket tekintettük. A kísérleteket legalább háromszor végeztük el. Az ábrán a kapecitabin esetében 4, a többi vegyületre pedig három független mérés eredménye \pm szórás látható. A dózis-hatás görbéket az OriginPro 8.6 szoftver segítségével készítettük el.

A Ct-OATP1B3-V1 sejteken elvégzett életképesség vizsgálatok eredményeit a 35. ábrán mutatom be. A MTX, oxaliplatin és 5-FU esetén a V1-et overexpresszáló sejtek kismértékű érzékenyítést mutattak a kontroll sejtekhez képest. Az irinotekán esetében nem mértünk lényeges különbséget a két sejtvonal között. A legnagyobb érzékenyítő hatás-különbséget a két sejtvonal között a kapecitabin esetén tapasztaltuk. A vizsgált terápiás szerekre a kapott dózis-hatás görbék alapján IC₅₀ értékeket határoztunk meg, melyeket a 8. táblázatban foglaltam össze.

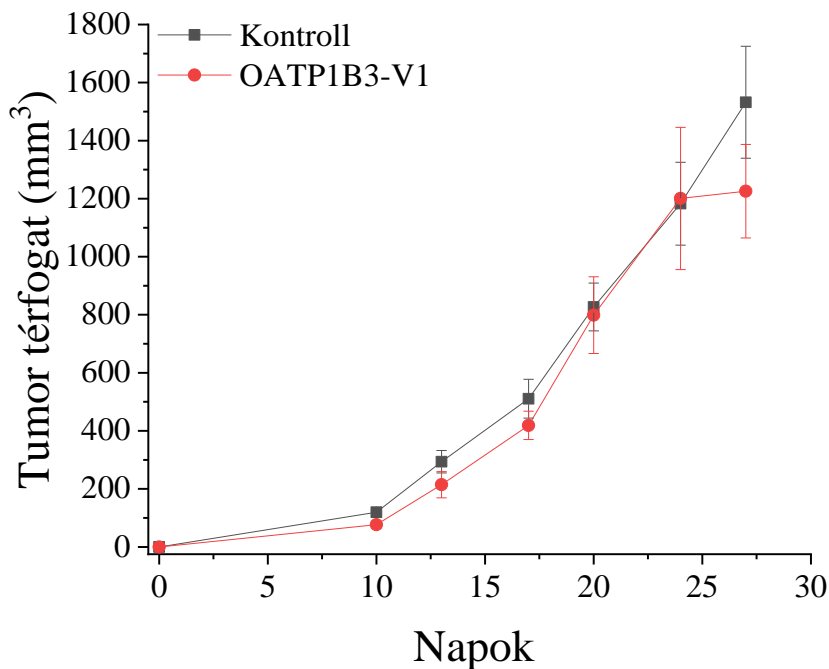
8. táblázat A Ct-OATP1B3-V1 és kontroll sejtvonalakon terápiás szerekkel való kezelések hatására megállapított IC₅₀ értékek, amelyeket dózis-hatás görbék (35. ábra) alapján állapítottunk meg.

<u>Terápiás szer</u>	IC ₅₀ (μ M)	
	<u>A431 kontroll</u>	<u>A431-OATP1B3-V1</u>
5-FU	0.83	0.33
kapecitabin	> 1000	103
irinotekán	1.16	0.81
MTX	0.125	0.03
oxaliplatin	27.8	15.1

4.4.4. *In vivo* kísérletek előkészítése

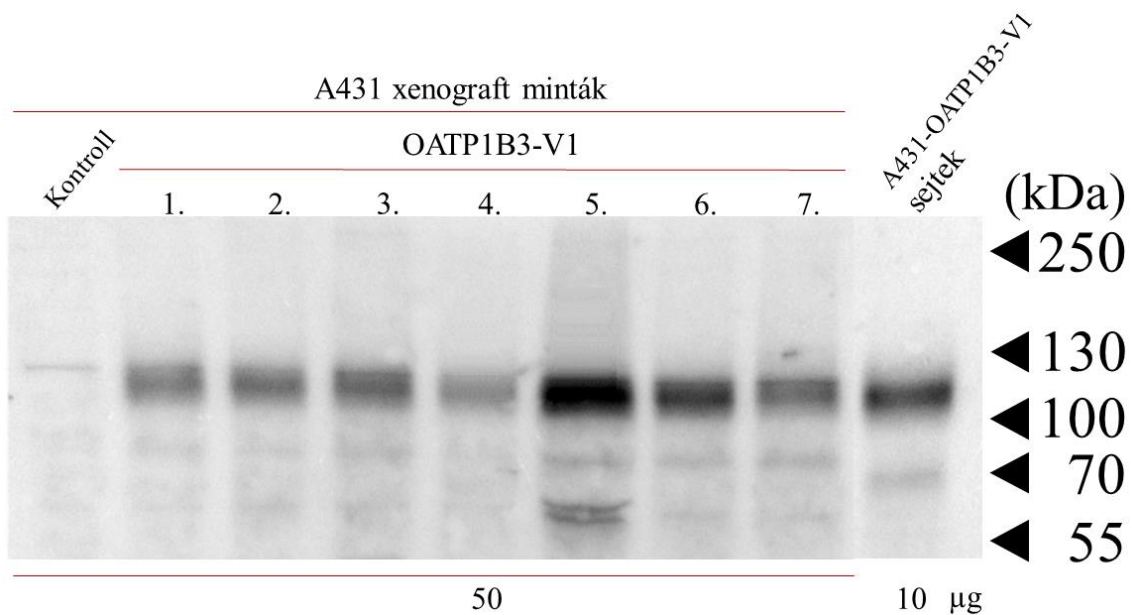
Az *in vitro* eredmények alapján a Ct-OATP1B3-V1 kiaknázható a tumorok növekedésének gátlására, esetleges célzott elpusztítására. Annak érdekében, hogy ezt tovább vizsgáljuk, a szerek hatását *in vivo* is tervezzük tesztelni. Az *in vivo* kísérleteket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának állatházában végezték Cserepes Mihály és Léner Violetta. Modell állatként NOD-SCID nőstény egereket választottunk, mivel irodalmi adatok alapján [361] ezek alkalmasak A431 xenograft vizsgálatára, illetve ilyen típusú egerek álltak rendelkezésre.

Viszont az *in vitro* eredmények alapján megállapítottuk, hogy a Ct-OATP1B3-V1 magas expressziójának érdekében fontos, hogy a sejtvonalak frissek, rövid ideje kultúrában levők legyenek. Ezért a NOD-SCID egerekbe alacsony passzázsszámú sejtek beoltása történt. Az egerekben a beoltást követően 10 nappal mérhető tumorok keletkeztek, melyek növekedését folyamatosan, heti 2 alkalommal monitoroztuk 27 napig (36. ábra).



36. ábra A431 tumor xenograftok növekedése NOD-SCID egerekben. A431 kontroll, vagy A431-OATP1B3-V1 sejtek (10^6 sejt/200 μ l) szubkután injekciója NOD-SCID egerekbe történt. A fejlődő tumorok méretét hetente 2 alkalommal a 27. napig követtük nyomon, és térfogatukat az alábbi képlet alapján határoztuk meg: $\text{térfogat} = \text{hosszúság} \times \text{szélesség}^2 \times \pi/6$. A tumorméretnek változásának bemutatásához az adatok átlagát \pm SEM ábrázoltuk.

A fenti kísérlet alapján megállapítottuk, hogy az injektált A431 kontroll és A431-OATP1B3-V1 sejtvonalak alkalmasak xenograft létrehozására. 4 hét elteltével az állatokat eutanáziában részesítették, és belőlük a tumorokat eltávolították. A tumorokat feldolgoztuk és megvizsgáltuk a Ct-OATP1B3-V1 expressziójukat (37. ábra). Megállapítható, hogy a V1 expressziója 4 hét elteltével, a kifejlődött tumorokból kimutatható, ezért ez a modell alkalmas lehet a citosztatikumok hatásának *in vivo* vizsgálatára.



37. ábra Ct-OATP1B3-V1 expressziójának ellenőrzése A431 xenograft tumormintákban és sejtvonalban. 10/50 µg sejt lizátum OATP1B3 fehérje expressziós szintjét anti-SLCO1B3 antitest segítségével Western blot technika által detektáltuk. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

5. MEGBESZÉLÉS

A gyógyszer metabolizmus fő színtere a máj. Az emberi szervezetben ez a szerv 70%-ban felel a gyógyszerek eliminációjáért [362, 363]. Ezért a hepatociták transzporterei, így az OATP és ABC transzporterek kiemelten fontos szerepet játszanak a gyógyszerek farmakokinetikai paramétereinek befolyásolásában [2, 25].

Új gyógyszer forgalomba hozatala előtt feltétlenül szükséges tisztában lenni annak farmakokinetikai tulajdonságaival, amelyet a transzporterek (megváltozott) működése vagy gyógyszer kölcsönhatások létrejötte jelentősen befolyásolhat. Ráadásul a transzporterek expressziós mintázata egyének között, illetve betegség esetén is nagyon eltérő lehet. Proteomikai vizsgálatok alapján két egészséges egyénben ugyanazon transzporterek expressziós szintje között akár 10-, vagy többszörös különbség is adódhat, májbetegség esetén pedig a normálhoz képest eltérő hepatikus transzporter expressziós szintek fordulhatnak elő [364, 365]. Például nem alkoholos eredetű szteatohepatitiszes betegek hepatikus OATP-i (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1) szignifikánsan alacsonyabb mértékben glikoziláltak, így kevésbé válhatnak működőképes plazmamembrán transzporterekké [366].

Ezért nemzetközi szervezetek (FDA, EMA, PMDA, ITC [153, 367]) javasolják gyógyszer transzporterek vizsgálatát a gyógyszer fejlesztés korai szakaszában. Ezek a dokumentumok a kimutatandó kölcsönhatástól függően irányelveket rögzítenek, például kísérleti rendszereket, vagy alkalmazandó szubsztrátokat javasolnak. A pontos metodikát, illetve a szubsztrátok detektálásához szükséges jelölést (fluoreszcens/radioaktív) azonban nem rögzítik.

A transzporterek gyógyszer kölcsönhatásokban való tesztelésére már több direkt vagy indirekt módszer létezik. Ezek lehetnek radioaktívan jelölt szubsztrátok vizsgálatán alapuló módszerek, tömegspektrometriás technikák, illetve egyéb, a szubsztrát felvételt nyomonkövető (például fluoreszcens mikroszkópos, PET, MRI) metodikák. Azonban ezek nem minden esetben veszélytelen, költséghatékony, vagy nagy áteresztőképességű és automatizálásra alkalmas vizsgálati lehetőségek.

A transzporterek fluoreszcens szubsztrátokkal való funkcionális vizsgálata ezekhez képest több előnyt hordoz magában. A radioaktívan jelölt szubsztrátokkal szemben a

fluoreszcens vegyületek veszélytelenek (legalábbis nem okoznak sugárterhelést) és kevésbé költségesek, továbbá a tömegspektrometriás vagy mikroszkópos eljárásokhoz képest nagyobb áteresztőképességgel, illetve akár automatizáltan is alkalmazhatók. Fluoreszcencia alapú módszereket, például a CaAM felvételén alapuló módszert MDR1 és MRP-k esetében, vagy a Hoechst 33342, DCV, illetve PhenGreen festéket már rutinszerűen alkalmazzák az ABC multidrog transzporterek vizsgálatában [272, 274, 330, 368].

Az utóbbi évtizedben több fluoreszcens vegyületet is azonosítottak OATP1B szubsztrátként (pl. nátrium-fluoreszcein, vagy FMTX) [19, 296], azonban ezek az anyagok a kismértékű stabilitásuk, és a rájuk alapozott módszerek kisebb érzékenysége miatt kevésbé alkalmasak nagy mennyiségű vegyület tesztelésére [336]. Doktori munkám során részt vettem a kutatócsoport az irányú munkájában, amelynek célja olyan új fluoreszcens módszer megalkotása volt, mely alkalmas az OATP-k és velük potenciálisan kölcsönható vegyületek, például gyógyszerek kölcsönhatásának vizsgálatára [328]. Sejt impermeábilis fluoreszcens OATP szubsztrát festékeket sikerült azonosítani (7. ábra), amelyek ráadásul alkalmasak az OATP-eket nagy mennyiségben termelő sejtek kiválogatására. A feladatom a módszer szakirodalomból ismert OATP interakciós molekulák segítségével történő validálása volt.

A nemzetközi irányelvek szerint egy gyógyszer hatóanyag farmakokinetikai tesztjei során meghatározandó paraméter lehet a félmaximális gátlást eredményező inhibitor koncentráció [367]. Ezzel kapcsolatban megjegyzendő, hogy adott vegyületre kapott IC_{50} érték nagyban függhet a vizsgálati módszer beállításaitól és az alkalmazott szubsztráttól. Egy tanulmányban például az ABCB1 transzporter esetén 23 különböző laboratóriumban vizsgálták ugyanazon vegyületek IC_{50} értékeit, melyek közül az egyik anyagra két eltérő laborban mért értékek között mintegy 796-szoros különbség adódott [369]. Ez is mutatja, hogy nagyon fontos a kinetikai paraméterek szempontjából figyelembe venni a módszer beállításait, az egyes mérési körülményeket. Ráadásul az OATP-kről úgy gondolják, több kötőhellyel is rendelkeznek [63, 296], tehát eltérő teszt szubsztrátok alkalmazásával eltérő IC_{50} értéket adhat ugyanaz a vizsgált vegyület [338]. Ezzel kapcsolatos megfigyelések a mi laborunkban is történtek. Csoportunkban az OATP3A1 esetén Bakos és munkatársai azt tapasztalták, hogy az E1S hatása eltérő attól függően, hogy milyen teszt szubsztrátot alkalmazunk [85].

A méréseim alapján a laborunkban felfedezett új fluoreszcens OATP szubsztrátok a már rutinszerűen alkalmazott, radioaktív szubsztrátokat kiválthatják, amit alátámaszt, hogy az általunk fluoreszcens szubsztrátokkal meghatározott IC₅₀ értékek az irodalmi adatokkal jól összevethetőek (8. ábra, 6. táblázat). Így az OATP-kre kidolgozott fluoreszcens módszerünk megfelelő alternatívája lehet a radioligand alapú teszteknek. Fontos azonban azt hangsúlyozni, hogy ismeretlen vegyület tesztelésekor célszerű annak több teszt szubsztrátra gyakorolt hatását is megvizsgálni. Indokolt lehet továbbá a festékfelvétel gátolhatóságát nagyobb számú vegyülettel, akár molekula könyvtárak segítségével tesztelni. Azonban mivel a csoport elsősorban alapkutatót végez, erre nem volt lehetőség.

Az új fluoreszcens módszer(ek) és a létrehozott sejtvonalak jelentőségét mutatja, hogy kutatócsoportunk az elmúlt években számos megkeresést kapott, amelynek során OATP-kkel potenciálisan kölcsönható vegyületek tesztelését végeztük el. Az egyik ilyen együttműködésben én is részt vettem, amelynek során a maraviroc antivirális szer OATP kölcsönhatását vizsgáltam. Az OATP1A2, OATP1B3, OATP2B1, OATP3A1 fehérjék bizonyítottan megjelennek a placentában [52, 345, 346, 348], illetve előfordulnak a máj, vagy vér-agy gát sejtjeiben is, ezért ezeken a szöveteken a gyógyszerek, így antivirális szerek áthaladását is befolyásolhatják. Külföldi együttműködés során az OATP1A2, OATP1B3, OATP2B1, valamint a maraviroc és ritonavir, a klinikumban antivirális szerként alkalmazott vegyületek kölcsönhatását vizsgáltuk meg. Az OATP-kről ismert, hogy képesek antivirális vegyületeket transzportálni [6], de az általunk vizsgált anyagok OATP-k általi transzportjáról még kevés adat állt rendelkezésre. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a maraviroc és ritonavir az OATP1A2 FMTX, valamint OATP2B1 CB felvételét koncentrációfüggő módon gátolta, ami az OATP1B3 esetén is elmondható a ritonavirról (9. ábra). Érdekes módon az OATP1B3 CB felvételét a maraviroc fokozta, a külföldi kutatócsoport pedig radioaktívan jelölt maraviroc szubsztrát tesztelése során megállapította, hogy ez a vegyület OATP1B3 szubsztrát. Ezzel szemben korábban a májban az OATP1B3-mal nem mutattak ki maraviroc-kölcsönhatást, míg az OATP1B1-gyel igen [370]. Emellett korábbi adatok alapján az OATP1B3 funkcióját a ritonavir antivirális vegyület is gátolja [371, 372], és az OATP1A2 ennek a szernek a vér-agy gáton való átjutását is befolyásolhatja [373]. Ezzel összhangban áll a mi megfigyelésünk, miszerint az OATP1A2 és OATP1B3 kölcsönhatnak a ritonavirral. A maraviroc OATP1B3 általi, CB felvételre gyakorolt fokozó hatása erősíti azt a feltevést, hogy az

OATP-k több szubsztrátkötő hellyel rendelkezhetnek [37, 374]. Korábban például az OATP1B1 rutin általi fokozott DHEAS transzportját [94], vagy az OATP1B3 klotrimazol általi megnövekedett EG transzportját [37, 92], továbbá az OATP2B1 DHEAS, illetve E1S transzportjának prosztoglandin A1, valamint A2 általi [93], vagy progeszteron általi [11] stimulációját is leírták, mely jelenségeket a különböző kötőhelyek meglétével magyaráztak.

Az OATP-k indirekt módszerrel való vizsgálatának 3 kimenetele lehetséges: 1., nincs hatás, 2., gátlás, 3., fokozás. Az első esetben célszerű egyéb teszt vegyületet is alkalmazni annak érdekében, hogy kizárhassuk a kölcsönhatás meglétét. Gátlás esetében egyértelmű a kölcsönhatás megléte, de az további vizsgálatot, például K_m és V_{max} paraméterekre kifejtett hatás vizsgálatát igényelheti, hogy eldönthessük, kompetitív (amit szubsztrát okozhat) vagy nem kompetitív gátlásról van-e szó. Az OATP2B1 esetében például a kölcsönhatás meglétének (gátlás) ellenére direkt transzportot nem tudtak kimutatni. Fokozást/aktiválást pedig allosztérikus modulátor vagy szubsztrát hatására tapasztalhatunk. Fontos továbbá, hogy inhibitor tesztelésekor az inhibitor kizárólagos jelenlétében végzett előinkubálás hatással lehet a kinetikai paraméterekre. Ezt támasztja alá, hogy Shitara és munkatársai tanulmánya szerint a CsA gátló hatása az OATP1B1 általi E1S felvételre 0-60 perces előinkubálási időtartamban nagyságrendekkel változik [375]. Az FDA 30 perces előinkubálást javasol.

A gyógyszer kölcsönhatások vizsgálatában a hepatikus OATP-k és ABC transzporterek együttes vizsgálatára is szükség lehet, mivel előfordulhat, hogy a tesztelt vegyület nem sejt permeábilis, tehát önmagában csak MRP2-t vagy más ABC fehérjét kifejező sejtben nem detektálható a kölcsönhatás, illetőleg az MRP2 vagy más ABC szubsztrátja nem maga a tesztelt vegyület, hanem annak valamely metabolitja, amely csak a sejtben képes kialakulni [317]. A közös OATP-ABC szubsztrátok vektoriális transzportjának mérése olyan módszert biztosít, amelyben a két transzporter egy alkalmazásban vizsgálható. Ehhez tipikusan az OATP, valamint ABC transzporterekkel, vagy akár többszörös ABC fehérje tartalmú, esetleg CYP enzim(ek)et is kifejező kettős-, vagy többszörösen transzfektált és polarizált sejteket használnak [305, 316, 317, 322]. Azonban ezekben a kísérletekben eddig kizárólag radioaktívan jelölt OATP-ABC szubsztrátok segítségével, vagy tömegspektrometriával követték nyomon a transzporterek együttes működését, illetve annak gátlását.

Felmerült, hogy a kutatócsoportunk által felfedezett új fluoreszcens szubsztrátokat akár az MRP2 vagy ABCG2 transzporterek is felismerhetik, hiszen szubsztrát felismerésük nagyban átfed. Ezeket a vegyületeket először IOV-ben vizsgáltuk, mivel ezek egyszerűbb, gyorsabb, és költséghatékonyabb tesztelést biztosítanak a transzcelluláris méréseknél. Kimutattuk, hogy az MRP2-nek szubsztrátja a ZV, LDG, piranin, CB, és SR101 festékek, az ABCG2-nek pedig a LDV és CB (13. ábra). További IOV kísérletek során bizonyítottuk, hogy az ABCG2 általi ATP-függő LDV, illetve CB transzport az ismert ABCG2 inhibitor, Ko143 [376] által felfüggeszthető (15. ábra). A fluoreszcens szignál alapján azonban leginkább az LDV lehet alkalmas az ABCG2 kölcsönhatások vizsgálatára IOV rendszerekben, amely az eddig ismert, IOV-n alkalmazott ABCG2 szubsztrát LY-hoz képest is kedvezőbb jel/zaj arányt mutatott.

Az MRP2 működésének vizsgálatára IOV-ben fluoreszcens vegyületek közül eddig a CLF-et [324] és a CDF-et [325] alkalmazták. A mi rendszerünkben az MRP2 vizsgálatára legalkalmasabb fluoreszcens vegyületnek a FMTX bizonyult kedvező jel/zaj aránya miatt.

A korábban OATP szubsztráként azonosított fluoreszcens vegyületek közül az IOV kísérleteink alapján közös OATP-ABC szubsztrátokat fedeztünk fel. A piranin, CB és SR101 festékekre beállítottunk egy új fluoreszcens módszert, amellyel polarizált MDCKII sejtekben az OATP1B1 és MRP2 általi vektoriális transzport nyomon követhető (24., 28., 29. ábra), így alkalmas gyógyszer kölcsönhatások vizsgálatára (27., 31. ábra). Az IOV kísérletek során ABCG2 szubsztrátnak bizonyuló CB festék vektoriális transzportját megvizsgáltuk MDCKII-ABCG2-OATP1B1 sejtvonalban, ám nem sikerült transzcelluláris transzportot detektáltunk. Ennek lehetséges magyarázata, hogy ép sejten belül a CB átalakul olyan terméké, amit az ABCG2 már nem ismer fel, nem úgy, mint IOV-ben. Ezért intakt sejten CB festékekkel az OATP1B1 és ABCG2 működése együttesen nem vizsgálható. A CB esetleges sejten belüli átalakulása például tömegspektrometriai vizsgálatokkal lenne tisztázható, a kutatómunkám során azonban erre nem volt lehetőség.

Kimutattam, hogy mindhárom festék (piranin, CB és SR101) alkalmas arra, hogy az OATP1B1 és MRP2 transzporterek gyógyszer kölcsönhatásait transwell rendszerben vizsgáljuk. Ebben a rendszerben primer hepatocitákhoz képest költséghatékony és

hosszútávon fenntartható körülmények között vizsgálhatók *in vitro* a máj méregtelenítési folyamatai, azaz a hepatobiliáris vektorialis transzport folyamatok. A technika korlátját jelentheti, ha ezek a festékek toxikussá válnak a sejtekre. További limitációt okozhat, hogy a transzporter expresszió nem feltétlenül tükrözi a fiziológias állapotokat, valamint az endogén módon expresszálandó transzporterek befolyásolhatják a transzport folyamatokat. A hepatikus gyógyszer metabolikus folyamatokat jobban tükröző modellekben, például primér hepatocita sejtvonalon pedig más, hepatikus uptake és efflux transzporterek befolyásolhatják a piranin, CB vagy SR101 hepatikus akkumulációját. A humán ABCB1 transzporterrel végzett saját vizsgálataink alapján például nem várható, hogy az ABCB1 befolyásolja a transzportot. Ettől függetlenül nem zárhatjuk ki, hogy a szinuszoidális membránban más ABC transzporterek, mint az MRP3 vagy MRP4 ezeket a vegyületeket felismerve, csökkentik azok sejtbeli dúsulását. Doktori munkám során sajnos nem volt szerencsénk primer hepatocitákhoz hozzájutnunk, így azt nem sikerült megvizsgálni, vajon az azonosított festék szubsztrátok endogén OATP és MRP2 szintek mellett használhatók-e, illetve hogy más transzporterek befolyásolják-e transzportjukat.

A szakirodalomban már találhatunk közös OATP1B és MRP2 fluoreszcens szubsztrátokat, például a FMTX [296, 323], CLF [226, 324], vagy CDF származékok [325]. Azonban ezeket a vegyületeket nem vizsgálták dupla transzsfektáns sejtvonalakban. Egyetlen olyan fluoreszcens szubsztrát, a Fluo-3 ismert, amelynek az egyik hepatikus OATP, az OATP1B3 és MRP2 általi transzcelluláris transzportját kimutatták [316]. Azonban a hepatocitákban legnagyobb mennyiségben jelenlevő OATP1B1 [118-120] nem transzportálja a Fluo-3 festéket [336], ráadásul a Fluo-3 fluoreszcens jelének detektálásához Ca^{2+} indikátor [377] lévén többlet Ca^{2+} adagolása szükséges [316, 378]. Ezért a mi fluoreszcens festékeink egyszerűbben alkalmazhatóak az OATP és ABC transzporterek közös tesztelésére, ráadásul az OATP1B1 és MRP2 közös vizsgálatára ez az első dokumentált módszer. Ez alapján adtuk be a nemzetközi szabadalmi bejelentésünket.

Az OATP-k patológiás fontossága tumorokban való ektopikus megjelenésük miatt is egyre nagyobb figyelmet kap [127, 379]. Az egyik hepatikus OATP egy variánsa, a Ct-OATP1B3-V1 bizonyítottan megjelenik több daganattípusban (például kolorektális, hasnyálmirigy, tüdőrák) [87, 163]. Az ott betöltött szerepe azonban egyelőre tisztázatlan, és az is vitatott, hogy egyáltalán működőképes fehérjévé válik-e [17, 18, 75]. A mi célunk

az volt, hogy állást foglaljunk ebben a kérdésben. Létrehoztunk olyan sejtvonala(ka)t, amely(ek)ben a Ct-OATP1B3-V1 transzport funkcióját igazoltam FMTX és LDG szubsztrátokkal. Ezek azonban mesterséges szubsztrátok, ezért egyéb, fiziológias vegyületek pl. EG transzportjának igazolása szükséges lehet.

A tumorokban megjelenő, kemoterápiás szerek transzportjára képes OATP-k a daganatok elpusztításának céljából potenciálisan kiaknázhatóak lehetnek. A Lt-OATP1B3 igazoltan multispecifikus transzporter, és érzékenyítheti a sejteket kemoterápiás szerekkel szemben [105, 358, 359]. A V1 esetében azonban a citosztatikumok közvetlen hatását még nem vizsgálták. A Ct-OATP1B3-V1 rákspecifikus izoforma bizonyítottan megjelenik kolorektális rákban [18, 115, 173]. A vastagbél tumorok kezelésére több daganatellenes szert (kapecitabin, oxaliplatin, 5-FU, irinotekán) alkalmaznak [380-382]. Ezek leginkább az úgynevezett FOLFIRI (fólsav, 5-FU, irinotekán), FOLFOX (fólsav, 5-FU, oxaliplatin), vagy XELOX/CAPOX (oxaliplatin, kapecitabin) fluoropirimidin alapú kombinációs terápiák. Annak vizsgálatára, hogy az immár bizonyítottan működőképes Ct-OATP1B3-V1 képes-e érzékenyíteni a sejteket az említett terápiás szerekre, citotoxicitási vizsgálatokban teszteltük őket. Munkám során ezeket a gyógyszereket egyesével vizsgáltam, viszont a kombinációs terápiák elterjedtsége miatt további vizsgálatok lehetnek szükségesek, hogy az Ct-OATP1B3-V1 szerepét megismerjük kombinált terápia esetén.

Habár az OATP-k tumorokban betöltött szerepe egyelőre tisztázatlan, feltételezik, hogy a daganatsejtek túlélését segítik elő tápanyagok és hormonok tumorsejtekbe való felvétele révén [109, 113]. A tumorokban megjelenő OATP1B3 és a betegség prognózisa közötti összefüggés azonban egyelőre ellentmondásos. A fehérje expressziója a betegség kedvező kimenetelét okozhatja, amennyiben általa a tumorokba fokozottabban bejutnak a kemoterápiás szerek, így a rezisztencia kialakulását megfékezheti [165, 383, 384]. Emellett a fehérje magasabb expresszióját a hosszabb betegségmentes-, illetve teljes túléléssel is összefüggésbe hozták [385]. Sun és munkatársai 97 CRC-vel (colorectal cancer, kolorektális rák) diagnosztizált beteg rákos OATP1B3 mRNS expressziós jellemzőit vizsgálva megállapították, hogy a rákos OATP1B3 mRNS magas expressziója jobb túléléssel függ össze [173]. Lockhart és munkatársai a korai stádiumú kolorektális tumorokban magas OATP1B3 expressziót figyeltek meg, mely a tumor stádium

növekedésével csökkent [386]. Emellett megfigyeléseik szerint a magasabb OATP1B3 expresszió az 5-éves túléléssel is korrelált [386].

Fentiekkel ellentétben, az OATP1B3 egyik allél variánsáról (SLCO1B3 334GG/699AA) bizonyították, hogy csökkent tesztoszteron transzportot okoz, és jobb túléléssel korrelál a prosztatarákos megbetegedések esetén [109]. Ez alapján feltételezik, hogy az OATP1B3 általi fokozott tesztoszteron felvétel segíti a tumor proliferációt. A tumor sejtekben azonban a transzport funkcion kívül más szerepe is lehet a rák specifikus OATP1B3-nak. A Pgp (MDR1) például több daganatos sejtben intracellulárisan előfordulva [387-390] képes megakadályozni az apoptózist [391-396], még ATP-függő efflux hiányában is, ami azt jelenti, hogy antiapoptotikus funkciója a transzporter aktivitásától független [18, 394]. Korábban megfigyelték, hogy vastagbél-tumor-eredetű sejtekben az OATP1B3 a p53 jelátviteli útvonal gátlásán keresztül túlélési előnyhöz juttatta a sejteket [106]. Azt is kimutatták, hogy a p53 gátló hatás transzport aktivitás függő [106]. Azonban ebben a tanulmányban az Lt-OATP1B3-mal foglalkoztak, így az ismeretlen, hogy a V1 vajon befolyásolja-e a p53 útvonalat.

A szakirodalomban a rákos típusú Ct-OATP1B3-V1 funkcionalitását érintő ellentmondások miatt nem teljesen érthető, hogyan függ össze a fehérje expressziója a tumorok túlélésével. Kutatócsoportunk tanulmánya során azonban bizonyította a Ct-OATP1B3-V1 működőképességét. Erre magyarázatot adhat a megfelelő modell sejt vonal (A431) kiválasztása, valamint a LDG segítségével történő, magas OATP-expressziójú sejt vonal létrehozása. A V1 működőképességének igazolása és az *in vitro* kísérletek során tapasztalt érzékenyítés bizonyos kemoterápiás szerekkel szemben (kapecitabin, oxaliplatin és MTX) felveti annak lehetőségét, hogy a fehérjét megcélozva, az azt magasan expresszáló daganatos sejtek hatékonyan elpusztíthatók legyenek.

A V1 több szempontból is lehet rák-terápiás célpont. Amennyiben jelenléte fokozott tumor proliferációt/túlélést eredményez, a cél az lehet, hogy gátoljuk a működését, így a daganatok hormon felvételét csökkentve [15, 88, 109, 397]. Ellenben, ha képes a tumorsejteket a citosztatikumokra érzékenyíteni, akkor tumor terápiás, specifikus Ct-OATP1B3-V1 szubsztrát vegyületekkel a daganatok célzottan elpusztíthatók lehetnének. Az Lt-OATP1B3 több gyógyszert is képes transzportálni (MTX, paclitaxel, docetaxel, BSP, pitavasztatin) [37, 358], ezért már többen felvetették, hogy általa a kemoterápiás

szerek fokozott felvétele [15, 88, 397] hatékony rákterápiás stratégia lehetne. Ehhez azonban specifikus V1 szubsztrát tervezésére lenne szükség, amelyhez a fehérje szubsztrát felismerésében szerepet játszó elemek pontos ismerete szükséges. Eddig nincs arra vonatkozó adat, hogy az N terminálisról a hosszú izoformához képest hiányzó 27 aminosav megváltoztatná a szubsztrát felismerést. Az OATP1B3 TM1-ben viszont a G45A mutáció jelentősen befolyásolja az atorvasztatin, illetve számára specifikus CCK-8 szubsztrátok felvételét [36]. Más OATP-k, például az OATP2B1 esetén többen is úgy gondolják, hogy az N-terminálison belül a TM1 több aminosava is fontos lehet a fehérje szubsztrát felismerésének szempontjából [34, 398]. A Ct-OATP1B3-V1 fehérje terápiás potenciáljának igazolása emiatt további vizsgálatokat igényel. Ennek egyik lépése lesz az általunk létrehozott sejtvonalak segítségével a V1 kemoterápiában betöltött szerepének vizsgálata egér xenograft modellen.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az OATP-k működésének vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia alapú mérés validálásával igazoltam, hogy a CB és AF405 festékek alkalmasak az OATP1B1 és OATP2B1, illetve OATP1B3 gyógyszer kölcsönhatásainak tesztelésére.
2. Új OATP gyógyszer kölcsönhatásokat mutattam ki a maraviroc és ritonavir antivirális vegyületekkel.
3. Közös OATP és ABC fluoreszcens szubsztrátokat azonosítottam, amelyek segítségével transzcelluláris transzport mérést állítottam be
4. A tumor-specifikus Ct-OATP1B3-V1 izoformáról igazoltam, hogy transzport funkcióra képes, illetve *in vitro* körülmények között érzékenyíti a sejteket 5-FU-val, MTX-tal, oxaliplatinnal és kapecitabinnal szemben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógyszerek ADME folyamataiban szerepet játszó transzporterek klinikai tesztek megelőző vizsgálataira szükség van. A gyógyszerfejlesztés során az OATP család hepatikus tagjai (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1) is vizsgálandó transzporterek. A fluoreszcens szubsztrátok felvételén alapuló módszerek megfelelő eszközei lehetnek az OATP-k vizsgálatának. Fluoreszcencia alapú megbízható módszer a kutatásom kezdetekor az OATP1B3 és OATP2B1 esetében nem volt elérhető. Kutatómunkám során olyan, kereskedelmi forgalomban kapható nem sejtp permeábilis fluoreszcens vegyületeket azonosítottunk OATP szubsztrátként, amelyeket a hepatikus OATP-k felismernek, és sejtbeli dúsulását okozzák. Az így detektált fluoreszcens jel segítségével az OATP-k működése és gyógyszerekkel való kölcsönhatása gyors és egyszerű módon követhető. Az általunk kidolgozott módszer jó alternatívája a radioligand alapú teszteknek, és az első fluoreszcencia alapú, közepes áteresztő képességű technika az OATP2B1 transzporter esetében [328]. Az új fluoreszcens módszerek segítségével az OATP1A2, OATP1B3, valamint OATP2B1 transzporterekre új gyógyszer kölcsönhatásokat mutattam ki. Igazoltuk, hogy a maraviroc antivirális szer placentán való áthaladásában az OATP-knek szerepe van [333]. Az általunk azonosított fluoreszcens OATP szubsztrátokat teszteltem májsejtek méregtelenítő folyamataiban jelentős, az ABC fehérje családba tartozó MRP2 és ABCG2 transzporterekkel való kölcsönhatás szempontjából. Igazoltam, hogy IOV-ken a LDV festék használható ABCG2 funkció tesztelésére. OATP1B1 és MRP2 transzportereket együttesen kifejező polarizált MDCKII sejtvonalon pedig megmutattam, hogy a CB, piranin és SR101 alkalmas transzcelluláris transzport mérésére, amely során a két transzporter együttes működése nyomon követhető [331] (P1900448 sz. magyar szabadalmi bejelentés, ebből származó PCT/HU2020/050014 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés elbírálás alatt).

Az OATP-k tumorokban való megjelenésük miatt is egyre nagyobb figyelmet kapnak. A kizárólag tumorokban előforduló Ct-OATP1B3-V1 izoforma ígéretes rákterápiás célpont. Azonban a V1 izoforma lokalizációját és funkcióját tekintve ellentmondásos a szakirodalom. Munkám során igazoltam, hogy a Ct-OATP1B3-V1 működőképes transzporter fehérje, valamint több daganatterápiás szerrel szemben érzékenyíti a sejteket *in vitro* (Bakos, Székely és munkatársai, kézirat előkészületben).

8. SUMMARY

Investigation of transporters involved in ADME processes is required prior to clinical trials. During drug development screening of interaction with hepatic members of the OATP transporter family, OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1 is crucial. Methods based on the accumulation of fluorescent OATP substrates is a promising tool in these tests. However, at the beginning of my research such reliable fluorescence-based assays have not been available for OATP1B3 and OATP2B1. During my PhD I identified commercially available cell impermeable fluorescent compounds as substrates of the hepatic OATPs and thus accumulating in the cells by the function of these proteins. These dyes allow a simple and cost-effective way of investigating OATP drug interactions. The fluorescence-based method developed in our group serves as a good alternative to radioligand-based assays, and represents the first fluorescent semi-high throughput assay for the investigation of OATP2B1 [328]. By applying this new fluorescence-based method I have identified yet undiscovered OATP1A2, OATP1B3 and OATP2B1 interactions. Our experiments revealed the involvement of OATPs in the passage of maraviroc through the placenta [333].

ABC (ATP Binding Cassette) transporters, ABCC2 (MRP2) and ABCG2 cooperate with hepatic OATPs in hepatic detoxification. As a further development of the aforementioned assay, we tested the interaction of the new fluorescent OATP substrates with ABC transporters. Using IOVs we identified LDV as a new substrate applicable for testing ABCG2 interactions. Based on the common OATP-ABC substrates pyranine, CB and SR101, we developed a new fluorescence-based transcellular transport method which enables the investigation of the drug interactions of both OATP1B1 and MRP2 [331] (No. P1900448 Hungarian patent, and No. PCT/HU2020/050014 international patent under review).

Emerging role of OATPs is also recognized by their expression in tumors. Of special interest is the cancer-specific isoform, Ct-OATP1B3-V1. However, literature data are controversial in regard of its localization and function. In my work, I proved the transport function of Ct-OATP1B3-V1 and showed that it can sensitize the cells toward several chemotherapeutics *in vitro* (Bakos, Székely et al., manuscript in preparation).

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Pedersen, J.M., et al., *Prediction and identification of drug interactions with the human ATP-binding cassette transporter multidrug-resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2)*. J Med Chem, 2008. **51**(11): p. 3275-87.
2. Jetter, A. and G.A. Kullak-Ublick, *Drugs and hepatic transporters: A review*. Pharmacol Res, 2020. **154**: p. 104234.
3. Dawson, P.A., T. Lan, and A. Rao, *Bile acid transporters*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2340-57.
4. Hagenbuch, B. and B. Stieger, *The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 396-412.
5. Kock, K. and K.L. Brouwer, *A perspective on efflux transport proteins in the liver*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(5): p. 599-612.
6. Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch, *OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(5): p. 1260-87.
7. Abe, T., et al., *Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17159-63.
8. Konig, J., et al., *Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23161-8.
9. Tamai, I., et al., *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(1): p. 251-60.
10. Bronger, H., et al., *ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11419-28.
11. Grube, M., et al., *Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1735-41.
12. Knauer, M.J., et al., *Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins*. Circ Res, 2010. **106**(2): p. 297-306.
13. Kobayashi, D., et al., *Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **306**(2): p. 703-8.

14. Oswald, S., *Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine*. *Pharmacol Ther*, 2019. **195**: p. 39-53.
15. Svoboda, M., et al., *Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function*. *Curr Drug Metab*, 2011. **12**(2): p. 139-53.
16. Group, S.C., et al., *SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(8): p. 789-99.
17. Imai, S., et al., *Epigenetic regulation of organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer cell lines*. *Pharm Res*, 2013. **30**(11): p. 2880-90.
18. Thakkar, N., et al., *A cancer-specific variant of the SLCO1B3 gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells*. *Mol Pharm*, 2013. **10**(1): p. 406-16.
19. Tang, H., et al., *Development of novel, 384-well high-throughput assay panels for human drug transporters: drug interaction and safety assessment in support of discovery research*. *J Biomol Screen*, 2013. **18**(9): p. 1072-83.
20. Cooper, G.M. and R.J.T.C.n.e.S. Hausman, MA: Sinauer Associates, *A molecular approach*. 2000.
21. Lodish, H., et al., *Molecular cell biology 4th edition*. 2000. **9**.
22. Alam, K., et al., *Characterization of Liver- and Cancer-type-Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B3 Messenger RNA Expression in Normal and Cancerous Human Tissues*. *Drug Metab Lett*, 2018. **12**(1): p. 24-32.
23. Lin, L., et al., *SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities*. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(8): p. 543-60.
24. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(3): p. 215-36.
25. Kovacsics, D., I. Patik, and C. Ozvegy-Laczka, *The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017. **13**(4): p. 409-424.
26. Li, Q. and Y. Shu, *Role of solute carriers in response to anticancer drugs*. *Mol Cell Ther*, 2014. **2**: p. 15.

27. Cesar-Razquin, A., et al., *A Call for Systematic Research on Solute Carriers*. Cell, 2015. **162**(3): p. 478-87.
28. Huang, S.M., L. Zhang, and K.M. Giacomini, *The International Transporter Consortium: a collaborative group of scientists from academia, industry, and the FDA*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(1): p. 32-6.
29. Yu, J., et al., *Drug disposition and drug-drug interaction data in 2013 FDA new drug applications: a systematic review*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(12): p. 1991-2001.
30. Keppler, D., *Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy*. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): p. 299-323.
31. Funk, C., *The role of hepatic transporters in drug elimination*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 363-79.
32. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 653-65.
33. Taylor-Wells, J. and D. Meredith, *The Signature Sequence Region of the Human Drug Transporter Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Is Important for Protein Surface Expression*. J Drug Deliv, 2014. **2014**: p. 129849.
34. Meier-Abt, F., Y. Mokrab, and K. Mizuguchi, *Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode*. J Membr Biol, 2005. **208**(3): p. 213-27.
35. Hanggi, E., et al., *Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(3): p. 806-17.
36. DeGorter, M.K., et al., *Interaction of three regiospecific amino acid residues is required for OATP1B1 gain of OATP1B3 substrate specificity*. Mol Pharm, 2012. **9**(4): p. 986-95.

37. Gui, C. and B. Hagenbuch, *Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport*. *Biochemistry*, 2008. **47**(35): p. 9090-7.
38. Gui, C. and B. Hagenbuch, *Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1*. *Protein Sci*, 2009. **18**(11): p. 2298-306.
39. Miyagawa, M., et al., *The eighth and ninth transmembrane domains in organic anion transporting polypeptide 1B1 affect the transport kinetics of estrone-3-sulfate and estradiol-17beta-D-glucuronide*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **329**(2): p. 551-7.
40. Ferreira, C., et al., *The scaffold protein PDZK1 modulates expression and function of the organic anion transporting polypeptide 2B1*. *Eur J Pharm Sci*, 2018. **120**: p. 181-190.
41. Kato, Y., et al., *Screening of the interaction between xenobiotic transporters and PDZ proteins*. *Pharm Res*, 2004. **21**(10): p. 1886-94.
42. Lee, W., J.M. Ha, and Y. Sugiyama, *Post-translational regulation of the major drug transporters in the families of organic anion transporters and organic anion-transporting polypeptides*. *J Biol Chem*, 2020. **295**(50): p. 17349-17364.
43. Zheng, J., et al., *PDZK1 and NHERF1 regulate the function of human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATPIA2) by modulating its subcellular trafficking and stability*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94712.
44. Kennedy, M.B., *Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(9): p. 350.
45. Hung, A.Y. and M. Sheng, *PDZ domains: structural modules for protein complex assembly*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5699-702.
46. Hong, M., *Critical domains within the sequence of human organic anion transporting polypeptides*. *Curr Drug Metab*, 2014. **15**(3): p. 265-70.
47. Wang, P., et al., *Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1A1 on the hepatocyte surface*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(34): p. 30143-9.

48. Shimada, H., et al., *OATP2A1/SLCO2A1-mediated prostaglandin E2 loading into intracellular acidic compartments of macrophages contributes to exocytotic secretion*. *Biochem Pharmacol*, 2015. **98**(4): p. 629-38.
49. Mikkaichi, T., et al., *Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(10): p. 3569-74.
50. Chan, T., et al., *Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(9): p. 2343-53.
51. Lee, W., et al., *Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(10): p. 9610-7.
52. Wang, H., et al., *Alteration in placental expression of bile acids transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 in intrahepatic cholestasis of pregnancy*. *Arch Gynecol Obstet*, 2012. **285**(6): p. 1535-40.
53. Fujiwara, K., et al., *Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner*. *Endocrinology*, 2001. **142**(5): p. 2005-12.
54. Gao, B., et al., *Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium*. *Exp Eye Res*, 2005. **80**(1): p. 61-72.
55. Sato, K., et al., *Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta*. *Placenta*, 2003. **24**(2-3): p. 144-8.
56. Huber, R.D., et al., *Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(2): p. C795-806.
57. Kullak-Ublick, G.A. and P.J. Meier, *Mechanisms of cholestasis*. *Clin Liver Dis*, 2000. **4**(2): p. 357-85.
58. Tamai, I., *Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(6): p. 508-14.
59. Glaeser, H., et al., *Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans*. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **81**(3): p. 362-70.

60. Keiser, M., et al., *The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers*. J Pharm Sci, 2017. **106**(9): p. 2657-2663.
61. Knauer, M.J., et al., *Transport function and transcriptional regulation of a liver-enriched human organic anion transporting polypeptide 2B1 transcriptional start site variant*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(6): p. 1218-28.
62. Kock, K., et al., *Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLCO2B1) function by protein kinase C-mediated internalization*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11336-47.
63. Stieger, B. and B. Hagenbuch, *Organic anion-transporting polypeptides*. Curr Top Membr, 2014. **73**: p. 205-32.
64. Sun, A.Q., et al., *Membrane trafficking of the human organic anion-transporting polypeptide C (hOATPC)*. Pharm Res, 2008. **25**(2): p. 463-74.
65. Yao, J., et al., *N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52563.
66. Zhou, F., et al., *Protein kinase C regulates the internalization and function of the human organic anion transporting polypeptide 1A2*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(6): p. 1380-8.
67. Chan, T., et al., *Casein Kinase 2 Is a Novel Regulator of the Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2) Trafficking*. Mol Pharm, 2016. **13**(1): p. 144-54.
68. Hong, M., et al., *Protein kinase C affects the internalization and recycling of organic anion transporting polypeptide 1B1*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(10 Pt A): p. 2022-30.
69. Hong, M., et al., *Human organic anion transporter hOAT1 forms homooligomers*. J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32285-90.
70. Murray, M. and F. Zhou, *Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(13): p. 1908-1924.

71. Race, J.E., et al., *Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **255**(2): p. 508-14.
72. Ni, C., et al., *Oligomerization Study of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*. *Mol Pharm*, 2017. **14**(2): p. 359-367.
73. Zhang, Y., K.H. Boxberger, and B. Hagenbuch, *Organic anion transporting polypeptide 1B3 can form homo- and hetero-oligomers*. *PLoS One*, 2017. **12**(6): p. e0180257.
74. Zhang, Y., et al., *Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells*. *Brain Res*, 2000. **876**(1-2): p. 148-53.
75. Chun, S.E., et al., *The N-terminal region of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) plays an essential role in regulating its plasma membrane trafficking*. *Biochem Pharmacol*, 2017. **131**: p. 98-105.
76. Mahagita, C., et al., *Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G271-8.
77. Satlin, L.M., V. Amin, and A.W. Wolkoff, *Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(42): p. 26340-5.
78. Leuthold, S., et al., *Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(3): p. C570-82.
79. Franco, R. and J.A. Cidlowski, *SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(40): p. 29542-57.
80. Li, L., et al., *Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(26): p. 16184-91.

81. Li, L., P.J. Meier, and N. Ballatori, *Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(2): p. 335-40.
82. Schafer, A.M., T. Bock, and H.E. Meyer Zu Schwabedissen, *Establishment and Validation of Competitive Counterflow as a Method To Detect Substrates of the Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1*. Mol Pharm, 2018. **15**(12): p. 5501-5513.
83. Nozawa, T., et al., *Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(2): p. 438-45.
84. Varma, M.V., et al., *pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1*. Mol Pharm, 2011. **8**(4): p. 1303-13.
85. Bakos, E., et al., *Synergistic transport of a fluorescent coumarin probe marks coumarins as pharmacological modulators of Organic anion-transporting polypeptide, OATP3A1*. Biochem Pharmacol, 2020. **182**: p. 114250.
86. Patik, I., et al., *Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate*. Biochem Pharmacol, 2015. **98**(4): p. 649-58.
87. Thakkar, N., A.C. Lockhart, and W. Lee, *Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) in Cancer Therapy*. AAPS J, 2015. **17**(3): p. 535-45.
88. Obaidat, A., M. Roth, and B. Hagenbuch, *The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 135-51.
89. van de Steeg, E., et al., *Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 519-28.
90. Stromme, P., et al., *Mutated Thyroid Hormone Transporter OATP1C1 Associates with Severe Brain Hypometabolism and Juvenile Neurodegeneration*. Thyroid, 2018. **28**(11): p. 1406-1415.

91. Roth, M., B.N. Timmermann, and B. Hagenbuch, *Interactions of green tea catechins with organic anion-transporting polypeptides*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(5): p. 920-6.
92. Gui, C., et al., *Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3*. Eur J Pharmacol, 2008. **584**(1): p. 57-65.
93. Pizzagalli, F., et al., *Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(8): p. 3902-12.
94. Wang, X., A.W. Wolkoff, and M.E. Morris, *Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(11): p. 1666-72.
95. Noe, J., et al., *Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(8): p. 1308-14.
96. Tamai, I., et al., *Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C*. Pharm Res, 2001. **18**(9): p. 1262-9.
97. Yamaguchi, H., et al., *Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1*. Drug Metab Pharmacokinet, 2010. **25**(3): p. 314-7.
98. Chu, X., K. Bleasby, and R. Evers, *Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013. **9**(3): p. 237-52.
99. Generaux, G.T., et al., *Impact of SLCO1B1 (OATP1B1) and ABCG2 (BCRP) genetic polymorphisms and inhibition on LDL-C lowering and myopathy of statins*. Xenobiotica, 2011. **41**(8): p. 639-51.
100. Keogh, J.P., *Membrane transporters in drug development*. Adv Pharmacol, 2012. **63**: p. 1-42.
101. Chen, H.L., et al., *Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia*. Pediatr Res, 2008. **63**(6): p. 667-73.

102. Congiu, M., et al., *Coordinate regulation of metabolic enzymes and transporters by nuclear transcription factors in human liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(6): p. 1038-44.
103. Keitel, V., et al., *Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1160-72.
104. Wojtal, K.A., et al., *Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(9): p. 1871-7.
105. Abe, T., et al., *LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1689-99.
106. Lee, W., et al., *Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10315-23.
107. Monks, N.R., et al., *Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 587-98.
108. Muto, M., et al., *Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma*. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1570-6.
109. Hamada, A., et al., *Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3312-8.
110. Cui, Y., et al., *Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma*. Lab Invest, 2003. **83**(4): p. 527-38.
111. Kinoshita, M. and M. Miyata, *Underexpression of mRNA in human hepatocellular carcinoma focusing on eight loci*. Hepatology, 2002. **36**(2): p. 433-8.
112. Vavricka, S.R., et al., *The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **40**(2): p. 212-8.

113. Matsumoto, J., et al., *Organic anion transporting polypeptide 2B1 expression correlates with uptake of estrone-3-sulfate and cell proliferation in estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Drug Metab Pharmacokinet, 2015. **30**(2): p. 133-41.
114. Vafaei, S., et al., *Common molecular markers between circulating tumor cells and blood exosomes in colorectal cancer: a systematic and analytical review*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 8669-8698.
115. Morio, H., et al., *Cancer-Type OATP1B3 mRNA in Extracellular Vesicles as a Promising Candidate for a Serum-Based Colorectal Cancer Biomarker*. Biol Pharm Bull, 2018. **41**(3): p. 445-449.
116. Hays, A., U. Apte, and B. Hagenbuch, *Organic anion transporting polypeptides expressed in pancreatic cancer may serve as potential diagnostic markers and therapeutic targets for early stage adenocarcinomas*. Pharm Res, 2013. **30**(9): p. 2260-9.
117. Pressler, H., et al., *Expression of OATP family members in hormone-related cancers: potential markers of progression*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20372.
118. Badee, J., et al., *Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(4): p. 424-32.
119. Kimoto, E., et al., *Characterization of organic anion transporting polypeptide (OATP) expression and its functional contribution to the uptake of substrates in human hepatocytes*. Mol Pharm, 2012. **9**(12): p. 3535-42.
120. Prasad, B., et al., *Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass spectroscopy and influence of genotype, age, and sex*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(1): p. 78-88.
121. de Graan, A.J., et al., *Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(16): p. 4433-40.
122. Drenberg, C.D., et al., *Inherited variation in OATP1B1 is associated with treatment outcome in acute myeloid leukemia*. Clin Pharmacol Ther, 2016. **99**(6): p. 651-60.

123. Kameyama, Y., et al., *Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(7): p. 513-22.
124. Lee, H.H., et al., *Contribution of hepatic organic anion-transporting polypeptides to docetaxel uptake and clearance*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(4): p. 994-1003.
125. Nozawa, T., et al., *Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(3): p. 434-9.
126. Ramsey, L.B., et al., *Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition*. Genome Res, 2012. **22**(1): p. 1-8.
127. Schulte, R.R. and R.H. Ho, *Organic Anion Transporting Polypeptides: Emerging Roles in Cancer Pharmacology*. Mol Pharmacol, 2019. **95**(5): p. 490-506.
128. van der Deure, W.M., et al., *Organic anion transporter 1B1: an important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism*. Endocrinology, 2008. **149**(9): p. 4695-701.
129. Schwarz, U.I., et al., *Identification of novel functional organic anion-transporting polypeptide 1B3 polymorphisms and assessment of substrate specificity*. Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(3): p. 103-14.
130. Gong, I.Y. and R.B. Kim, *Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response*. Drug Metab Pharmacokinet, 2013. **28**(1): p. 4-18.
131. Chae, Y.J., et al., *Functional consequences of genetic variations in the human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) in the Korean population*. J Pharm Sci, 2012. **101**(3): p. 1302-13.
132. Letschert, K., D. Keppler, and J. König, *Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8)*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(7): p. 441-52.
133. Keppler, D., *The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(4): p. 561-5.

134. Yang, M., et al., *SLCO2B1 and SLCO1B3 may determine time to progression for patients receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. 2565-73.
135. Nozawa, T., et al., *Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 804-13.
136. Badagnani, I., et al., *Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(2): p. 521-9.
137. Urquhart, B.L. and R.B. Kim, *Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(11): p. 1063-70.
138. Cho, E., R.B. Montgomery, and E.A. Mostaghel, *Minireview: SLCO and ABC transporters: a role for steroid transport in prostate cancer progression*. Endocrinology, 2014. **155**(11): p. 4124-32.
139. Kalliokoski, A. and M. Niemi, *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(3): p. 693-705.
140. Niemi, M., *Role of OATP transporters in the disposition of drugs*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(7): p. 787-802.
141. Tirona, R.G., et al., *Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35669-75.
142. Niemi, M., et al., *High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1)*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(7): p. 429-40.
143. Pasanen, M.K., et al., *Frequencies of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide 1B1 SLCO1B1 gene in a Finnish population*. Eur J Clin Pharmacol, 2006. **62**(6): p. 409-15.
144. Smith, N.F., et al., *Variants in the SLCO1B3 gene: interethnic distribution and association with paclitaxel pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(1): p. 76-82.

145. Sanchez-Contreras, M.Y., et al., *Replication of progressive supranuclear palsy genome-wide association study identifies SLC01A2 and DUSP10 as new susceptibility loci*. Mol Neurodegener, 2018. **13**(1): p. 37.
146. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002559.
147. Khan, R.A., et al., *Analysis of association between common variants in the SLC06A1 gene with schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder in the Han Chinese population*. World J Biol Psychiatry, 2016. **17**(2): p. 140-6.
148. Ripke, S., et al., *Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1150-9.
149. Charatan, F., *Bayer decides to withdraw cholesterol lowering drug*. BMJ, 2001. **323**(7309): p. 359.
150. Canestaro, W.J., M.A. Austin, and K.E. Thummel, *Genetic factors affecting statin concentrations and subsequent myopathy: a HuGENet systematic review*. Genet Med, 2014. **16**(11): p. 810-9.
151. Shitara, Y., et al., *Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(1): p. 228-36.
152. Yu, J., et al., *Mechanisms and Clinical Significance of Pharmacokinetic-Based Drug-Drug Interactions with Drugs Approved by the U.S. Food and Drug Administration in 2017*. Drug Metab Dispos, 2019. **47**(2): p. 135-144.
153. Yee, S.W., et al., *Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective From the International Transporter Consortium*. Clin Pharmacol Ther, 2018. **104**(5): p. 803-817.
154. Libra, A., et al., *Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **319**(2): p. 809-17.
155. Zollner, G., et al., *Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2005. **25**(2): p. 367-79.

156. Ballesteros, M.R., et al., *Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(6): p. 729-38.
157. Al Sarakbi, W., et al., *The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(6C): p. 4985-90.
158. Wlcek, K. and B. Stieger, *ATP-binding cassette transporters in liver*. *Biofactors*, 2014. **40**(2): p. 188-98.
159. Liedauer, R., et al., *Different expression patterns of organic anion transporting polypeptides in osteosarcomas, bone metastases and aneurysmal bone cysts*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(6): p. 1485-92.
160. Fujimoto, N., et al., *Polymorphisms of the androgen transporting gene *SLCO2B1* may influence the castration resistance of prostate cancer and the racial differences in response to androgen deprivation*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013. **16**(4): p. 336-40.
161. Arakawa, H., et al., *Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of *OATP1A2* in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **84**(8): p. 1070-7.
162. Nakanishi, T. and I. Tamai, *Putative roles of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cell survival and progression of human cancers*. *Biopharm Drug Dispos*, 2014. **35**(8): p. 463-84.
163. Furihata, T., Y. Sun, and K. Chiba, *Cancer-type Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3: Current Knowledge of the Gene Structure, Expression Profile, Functional Implications and Future Perspectives*. *Curr Drug Metab*, 2015. **16**(6): p. 474-85.
164. Nagai, M., et al., *Identification of a new organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA isoform primarily expressed in human cancerous tissues and cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **418**(4): p. 818-23.
165. Sun, R., et al., *The Emerging Role of the *SLCO1B3* Protein in Cancer Resistance*. *Protein Pept Lett*, 2020. **27**(1): p. 17-29.

166. Teft, W.A., et al., *OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy*. Br J Cancer, 2015. **112**(5): p. 857-65.
167. Sun, Y., et al., *Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers*. Clin Transl Med, 2014. **3**: p. 37.
168. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
169. Hundt, S., U. Haug, and H. Brenner, *Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(10): p. 1935-53.
170. Nakama, H., et al., *Immunochemical fecal occult blood test is not suitable for diagnosis of hemorrhoids*. Am J Med, 1997. **102**(6): p. 551-4.
171. Sasaki, K., M. Kunimoto, and K. Hirata, *Relationship between the fecal occult blood test and benign anal disorders*. Hepatogastroenterology, 2001. **48**(38): p. 445-7.
172. Sohn, D.K., et al., *Single immunochemical fecal occult blood test for detection of colorectal neoplasia*. Cancer Res Treat, 2005. **37**(1): p. 20-3.
173. Sun, Y., et al., *Cancer-type OATP1B3 mRNA has the potential to become a detection and prognostic biomarker for human colorectal cancer*. Biomark Med, 2017. **11**(8): p. 629-639.
174. Properzi, F., M. Logozzi, and S. Fais, *Exosomes: the future of biomarkers in medicine*. Biomark Med, 2013. **7**(5): p. 769-78.
175. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
176. Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanady, *The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 477-83.
177. Burke, M.A., R.K. Mutharasan, and H. Ardehali, *The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel*. Circ Res, 2008. **102**(2): p. 164-76.

178. Mao, Q. and J.D. Unadkat, *Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update*. AAPS J, 2015. **17**(1): p. 65-82.
179. Sarkadi, B., et al., *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1179-236.
180. MacLean, C., et al., *Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(7): p. 1249-54.
181. Zimmermann, C., et al., *Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(2): p. 219-24.
182. Borst, P. and R.O. Elferink, *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 537-92.
183. Rius, M., et al., *Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 374-84.
184. Sodani, K., et al., *Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance*. Chin J Cancer, 2012. **31**(2): p. 58-72.
185. Szakacs, G., et al., *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 219-34.
186. Keppler, D. and J. Konig, *Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver*. FASEB J, 1997. **11**(7): p. 509-16.
187. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(16): p. 1295-302.
188. Kidron, H., et al., *Impact of probe compound in MRP2 vesicular transport assays*. Eur J Pharm Sci, 2012. **46**(1-2): p. 100-5.
189. Mottino, A.D., et al., *Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1261-73.

190. Rost, D., et al., *Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(5): p. 1203-8.
191. St-Pierre, M.V., et al., *Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000. **279**(4): p. R1495-503.
192. Cherrington, N.J., et al., *Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**(1): p. 97-104.
193. Oselin, K., et al., *Quantitative determination of the human MRP1 and MRP2 mRNA expression in FACS-sorted peripheral blood CD4+, CD8+, CD19+, and CD56+ cells*. *Eur J Haematol*, 2003. **71**(2): p. 119-23.
194. Miller, D.S., et al., *Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy*. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(6): p. 1357-67.
195. Nies, A.T., et al., *Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain*. *Neuroscience*, 2004. **129**(2): p. 349-60.
196. Fardel, O., et al., *Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2*. *Biomed Pharmacother*, 2005. **59**(3): p. 104-14.
197. Lechner, C., et al., *Development of a fluorescence-based assay for drug interactions with human Multidrug Resistance Related Protein (MRP2; ABCC2) in MDCKII-MRP2 membrane vesicles*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010. **75**(2): p. 284-90.
198. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(1): p. 3-29.
199. You, G., *Membrane transporters in drug disposition*. *Pharm Res*, 2008. **25**(2): p. 441-3.
200. Bakos, E., et al., *Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1)*. *J Cell Sci*, 2000. **113 Pt 24**: p. 4451-61.

201. Ryu, S., et al., *Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39617-24.
202. Fernandez, S.B., et al., *Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31048-55.
203. Hegedus, T., et al., *C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 454-61.
204. Kocher, O., et al., *PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein*. Lab Invest, 1999. **79**(9): p. 1161-70.
205. Nies, A.T., et al., *Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2)*. Eur J Biochem, 2002. **269**(7): p. 1866-76.
206. Wen, X., M.S. Joy, and L.M. Aleksunes, *In Vitro Transport Activity and Trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic Variants*. Pharm Res, 2017. **34**(8): p. 1637-1647.
207. Omasits, U., et al., *Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data*. Bioinformatics, 2014. **30**(6): p. 884-6.
208. Chu, X.Y., et al., *Transport of ethinylestradiol glucuronide and ethinylestradiol sulfate by the multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, and MRP3*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **309**(1): p. 156-64.
209. Cui, Y., et al., *Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(5): p. 929-37.
210. Akita, H., et al., *Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1511**(1): p. 7-16.
211. Trauner, M. and J.L. Boyer, *Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 633-71.

212. Jedlitschky, G., et al., *ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2*. *Biochem J*, 1997. **327** (Pt 1): p. 305-10.
213. Kamisako, T., et al., *Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2*. *Hepatology*, 1999. **30**(2): p. 485-90.
214. Jedlitschky, G. and D. Keppler, *Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates*. *Vitam Horm*, 2002. **64**: p. 153-84.
215. Ballatori, N. and J.F. Rebeor, *Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione*. *Semin Liver Dis*, 1998. **18**(4): p. 377-87.
216. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2*. *Semin Liver Dis*, 1998. **18**(4): p. 359-76.
217. Xiong, H., et al., *Altered hepatobiliary disposition of acetaminophen glucuronide in isolated perfused livers from multidrug resistance-associated protein 2-deficient TR(-) rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **295**(2): p. 512-8.
218. Hooijberg, J.H., et al., *Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2*. *Cancer Res*, 1999. **59**(11): p. 2532-5.
219. Chen, Z., et al., *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade*. *Cancer Lett*, 2016. **370**(1): p. 153-64.
220. Jedlitschky, G., U. Hoffmann, and H.K. Kroemer, *Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006. **2**(3): p. 351-66.
221. Zhou, S.F., et al., *Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(20): p. 1981-2039.
222. Halilbasic, E., T. Claudel, and M. Trauner, *Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond*. *J Hepatol*, 2013. **58**(1): p. 155-68.
223. Kis, O., et al., *The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters*. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. **31**(1): p. 22-35.

224. Cantz, T., et al., *MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **278**(4): p. G522-31.
225. Leader, J.P. and M.J. O'Donnell, *Transepithelial transport of fluorescent p-glycoprotein and MRP2 substrates by insect Malpighian tubules: confocal microscopic analysis of secreted fluid droplets*. *J Exp Biol*, 2005. **208**(Pt 23): p. 4363-76.
226. Barber, J.A., et al., *Quantification of Drug-Induced Inhibition of Canalicular Cholyl-L-Lysyl-Fluorescein Excretion From Hepatocytes by High Content Cell Imaging*. *Toxicol Sci*, 2015. **148**(1): p. 48-59.
227. Masereeuw, R., F.G. Russel, and D.S. Miller, *Multiple pathways of organic anion secretion in renal proximal tubule revealed by confocal microscopy*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(6 Pt 2): p. F1173-82.
228. Prevo, B., et al., *Rapid, nongenomic stimulation of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) activity by glucocorticoids in renal proximal tubule*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **338**(1): p. 362-71.
229. Miller, D.S., et al., *Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. **282**(1): p. R191-8.
230. Kruger, P., et al., *Permeation of Boswellia extract in the Caco-2 model and possible interactions of its constituents KBA and AKBA with OATP1B3 and MRP2*. *Eur J Pharm Sci*, 2009. **36**(2-3): p. 275-84.
231. Chen, Z.S., et al., *Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter*. *Mol Pharmacol*, 1999. **56**(6): p. 1219-28.
232. Ilias, A., et al., *Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6)*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(19): p. 16860-7.
233. Evers, R., et al., *Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(7): p. 1310-9.
234. Bode, K.A., et al., *Inhibition of transport across the hepatocyte canalicular membrane by the antibiotic fusidate*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **64**(1): p. 151-8.

235. Kouzuki, H., H. Suzuki, and Y. Sugiyama, *Pharmacokinetic study of the hepatobiliary transport of indomethacin*. *Pharm Res*, 2000. **17**(4): p. 432-8.
236. Kartenbeck, J., et al., *Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome*. *Hepatology*, 1996. **23**(5): p. 1061-6.
237. Chen, C., et al., *Impact of Mrp2 on the biliary excretion and intestinal absorption of furosemide, probenecid, and methotrexate using Eisai hyperbilirubinemic rats*. *Pharm Res*, 2003. **20**(1): p. 31-7.
238. Kawabata, Y., et al., *Mechanism of hepatobiliary transport of a novel thromboxane A₂ receptor antagonist, [2-(4-chlorophenylsulfonylaminoethyl)indan-5-yl]acetate (Z-335), and its xenobiotic taurine conjugate (Z-335-Tau) in rats*. *J Pharm Sci*, 2003. **92**(1): p. 67-76.
239. Kobayashi, N., et al., *Hepatobiliary transport of a nonpeptidic endothelin antagonist, (+)-(5S,6R,7R)-2-butyl-7-[2((2S)-2-carboxypropyl)-4-methoxyphenyl]-5-(3,4-methylenedioxyphenyl) cyclopentenol[1,2-b]pyridine-6-carboxylic acid: uptake by isolated rat hepatocytes and canalicular membrane vesicles*. *Pharm Res*, 2003. **20**(1): p. 89-95.
240. Hinoshita, E., et al., *Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(6): p. 2401-7.
241. Kruh, G.D. and M.G. Belinsky, *The MRP family of drug efflux pumps*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7537-52.
242. Nies, A.T., et al., *Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(4): p. 492-9.
243. Taniguchi, K., et al., *A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation*. *Cancer Res*, 1996. **56**(18): p. 4124-9.
244. Itoh, Y., et al., *Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 in in vivo cisplatin resistance of rat hepatoma AH66 cells*. *Anticancer Res*, 2002. **22**(3): p. 1649-53.

245. Allikmets, R., et al., *A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance*. *Cancer Res*, 1998. **58**(23): p. 5337-9.
246. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
247. de Bruin, M., et al., *Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR*. *Cancer Lett*, 1999. **146**(2): p. 117-26.
248. Heyes, N., P. Kapoor, and I.D. Kerr, *Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics*. *Drug Metab Dispos*, 2018. **46**(12): p. 1886-1899.
249. Woodward, O.M., *ABCG2: the molecular mechanisms of urate secretion and gout*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015. **309**(6): p. F485-8.
250. Ozvegy, C., et al., *Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **285**(1): p. 111-7.
251. Mo, W. and J.T. Zhang, *Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance*. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012. **3**(1): p. 1-27.
252. Horsey, A.J., et al., *The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(3): p. 824-30.
253. Diop, N.K. and C.A. Hrycyna, *N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane*. *Biochemistry*, 2005. **44**(14): p. 5420-9.
254. Sarkadi, B., et al., *ABCG2 -- a transporter for all seasons*. *FEBS Lett*, 2004. **567**(1): p. 116-20.
255. Robey, R.W., et al., *Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(10): p. 1971-8.
256. Litman, T., et al., *The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2)*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 11)**: p. 2011-21.

257. Nakatomi, K., et al., *Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(4): p. 827-32.
258. Rabindran, S.K., et al., *Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C*. *Cancer Res*, 1998. **58**(24): p. 5850-8.
259. Maliepaard, M., et al., *Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues*. *Cancer Res*, 2001. **61**(8): p. 3458-64.
260. Volk, E.L., et al., *Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 5035-40.
261. Chen, Z.S., et al., *Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 4048-54.
262. Wang, X., et al., *Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(7): p. 1363-70.
263. Wang, X., et al., *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(1): p. 65-72.
264. Robey, R.W., et al., *Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(1): p. 145-52.
265. van der Heijden, J., et al., *Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNFalpha*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(2): p. 138-43.
266. Kitamura, S., et al., *Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin*. *Drug Metab Dispos*, 2008. **36**(10): p. 2014-23.

267. Telbisz, A., et al., *Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(4): p. 575-85.
268. Jonker, J.W., et al., *The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15649-54.
269. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
270. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. Blood, 2002. **99**(2): p. 507-12.
271. Kim, M., et al., *The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 22-8.
272. Mathew, G., et al., *ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate*. Cell Cycle, 2009. **8**(7): p. 1053-61.
273. Tamura, A., et al., *Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 287-96.
274. Szabo, E., et al., *A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190629.
275. Weiss, J., et al., *Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(2): p. 238-45.
276. Gupta, A., et al., *HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 334-41.
277. Gupta, A., et al., *Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **58**(3): p. 374-83.

278. Kuppens, I.E., et al., *A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(11): p. 3276-85.
279. van Loevezijn, A., et al., *Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(1): p. 29-32.
280. Westover, D. and F. Li, *New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 159.
281. Vesel, M., et al., *ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling*. Respir Res, 2017. **18**(1): p. 52.
282. Sarkadi, B., L. Homolya, and T. Hegedus, *The ABCG2/BCRP transporter and its variants - from structure to pathology*. FEBS Lett, 2020.
283. Natarajan, K., et al., *Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(8): p. 1084-103.
284. Moitra, K., H. Lou, and M. Dean, *Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(4): p. 491-502.
285. Yuan, J.H., et al., *Breast cancer resistance protein expression and 5-fluorouracil resistance*. Biomed Environ Sci, 2008. **21**(4): p. 290-5.
286. de Lima, L.T., et al., *Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia*. Med Oncol, 2014. **31**(3): p. 851.
287. Stacy, A.E., P.J. Jansson, and D.R. Richardson, *Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance*. Mol Pharmacol, 2013. **84**(5): p. 655-69.
288. Saison, C., et al., *Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior*. Nat Genet, 2012. **44**(2): p. 174-7.
289. Imai, Y., et al., *C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(8): p. 611-6.

290. Vethanayagam, R.R., et al., *Functional analysis of the human variants of breast cancer resistance protein: I206L, N590Y, and D620N*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(6): p. 697-705.
291. Woodward, O.M., et al., *Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(13): p. 5223-8.
292. Sobek, K.M., et al., *Contrasting roles of the ABCG2 Q141K variant in prostate cancer*. Exp Cell Res, 2017. **354**(1): p. 40-47.
293. Szakacs, G., et al., *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discov Today, 2008. **13**(9-10): p. 379-93.
294. Hirano, M., et al., *Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(7): p. 1229-36.
295. De Bruyn, T., et al., *Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3*. J Pharm Sci, 2011. **100**(11): p. 5018-30.
296. Gui, C., et al., *Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3*. Curr Chem Genomics, 2010. **4**: p. 1-8.
297. Sai, Y., et al., *Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(8): p. 1423-31.
298. Sarkadi, B., et al., *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4854-8.
299. Williamson, G., et al., *Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2)*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(8): p. 1262-8.
300. Zelcer, N., et al., *Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2)*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23538-44.

301. Stieger, B., et al., *Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver*. Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 422-30.
302. Liu, X. and G. Pan, *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*. 2019: Springer.
303. Brouwer, K.L., et al., *In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 95-112.
304. Gameiro, M., et al., *Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP*. Molecules, 2017. **22**(4).
305. Liu, L., et al., *Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(1): p. 395-402.
306. LeCluyse, E.L., et al., *Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing*. Crit Rev Toxicol, 2012. **42**(6): p. 501-48.
307. Vermeir, M., et al., *Cell-based models to study hepatic drug metabolism and enzyme induction in humans*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(1): p. 75-90.
308. Kanebratt, K.P. and T.B. Andersson, *Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(7): p. 1444-52.
309. Kanebratt, K.P. and T.B. Andersson, *HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(1): p. 137-45.
310. Castell, J.V., et al., *Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006. **2**(2): p. 183-212.
311. Youdim, K.A., et al., *Induction of cytochrome P450: assessment in an immortalized human hepatocyte cell line (Fa2N4) using a novel higher throughput cocktail assay*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(2): p. 275-82.
312. Ripp, S.L., et al., *Use of immortalized human hepatocytes to predict the magnitude of clinical drug-drug interactions caused by CYP3A4 induction*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(10): p. 1742-8.

313. Mills, J.B., et al., *Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **309**(1): p. 303-9.
314. Hariparsad, N., et al., *Comparison of immortalized Fa2N-4 cells and human hepatocytes as in vitro models for cytochrome P450 induction*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(6): p. 1046-55.
315. Gartzke, D. and G. Fricker, *Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies*. J Pharm Sci, 2014. **103**(4): p. 1298-304.
316. Cui, Y., J. Konig, and D. Keppler, *Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(5): p. 934-43.
317. Fahrmayr, C., et al., *Identification of drugs and drug metabolites as substrates of multidrug resistance protein 2 (MRP2) using triple-transfected MDCK-OATP1B1-UGT1A1-MRP2 cells*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(6): p. 1836-1847.
318. Sasaki, M., et al., *Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2)*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6497-503.
319. Sasaki, M., et al., *Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(3): p. 450-9.
320. Letschert, K., et al., *Vectorial transport of the peptide CCK-8 by double-transfected MDCKII cells stably expressing the organic anion transporter OATP1B3 (OATP8) and the export pump ABCC2*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(2): p. 549-56.
321. Hirouchi, M., et al., *Construction of triple-transfected cells [organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1/multidrug resistance-associated protein (MRP) 2/MRP3 and OATP1B1/MRP2/MRP4] for analysis of the sinusoidal function of MRP3 and MRP4*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(10): p. 2103-11.

322. Matsushima, S., et al., *Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(3): p. 1059-67.
323. Notenboom, S., et al., *Short-term exposure of renal proximal tubules to gentamicin increases long-term multidrug resistance protein 2 (Abcc2) transport function and reduces nephrotoxicant sensitivity*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **315**(2): p. 912-20.
324. de Waart, D.R., et al., *Hepatic transport mechanisms of cholyl-L-lysyl-fluorescein*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. **334**(1): p. 78-86.
325. Heredi-Szabo, K., et al., *Characterization of 5(6)-carboxy-2,'7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4*. *J Biomol Screen*, 2008. **13**(4): p. 295-301.
326. Kullak-Ublick, G.A., et al., *Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(2): p. 525-33.
327. Ivics, Z., et al., *Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 501-10.
328. Patik, I., et al., *Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 2630.
329. Saranko, H., et al., *Effects of the gout-causing Q141K polymorphism and a CFTR DeltaF508 mimicking mutation on the processing and stability of the ABCG2 protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **437**(1): p. 140-5.
330. Ozvegy, C., A. Varadi, and B. Sarkadi, *Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 47980-90.

331. Szekely, V., et al., *Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions*. Eur J Pharm Sci, 2020. **151**: p. 105395.
332. Telbisz, A., et al., *Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(11): p. 2698-713.
333. Tupova, L., et al., *Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta*. Biomed Pharmacother, 2020. **129**: p. 110506.
334. Ye, D., K.A. Dawson, and I. Lynch, *A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers*. Analyst, 2015. **140**(1): p. 83-97.
335. Jacobson, C., *A novel anaesthetic regimen for surgical procedures in guineapigs*. Lab Anim, 2001. **35**(3): p. 271-6.
336. Izumi, S., et al., *Investigation of Fluorescein Derivatives as Substrates of Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 To Develop Sensitive Fluorescence-Based OATP1B1 Inhibition Assays*. Mol Pharm, 2016. **13**(2): p. 438-48.
337. Bednarczyk, D., *Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3*. Anal Biochem, 2010. **405**(1): p. 50-8.
338. Izumi, S., et al., *Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17beta-glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein*. Drug Metab Dispos, 2013. **41**(10): p. 1859-66.
339. Shirasaka, Y., et al., *Functional pleiotropy of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 due to multiple binding sites*. Drug Metab Pharmacokinet, 2012. **27**(3): p. 360-4.
340. De Bruyn, T., et al., *Confocal imaging with a fluorescent bile acid analogue closely mimicking hepatic taurocholate disposition*. J Pharm Sci, 2014. **103**(6): p. 1872-81.
341. Colbers, A., et al., *Maraviroc Pharmacokinetics in HIV-1-Infected Pregnant Women*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(10): p. 1582-9.

342. Tupova, L., et al., *Interactions between Maraviroc and the ABCB1, ABCG2, and ABCC2 Transporters: An Important Role in Transplacental Pharmacokinetics*. Drug Metab Dispos, 2019. **47**(9): p. 954-960.
343. Cervený, L., et al., *Interactions of protease inhibitors atazanavir and ritonavir with ABCB1, ABCG2, and ABCC2 transporters: Effect on transplacental disposition in rats*. Reprod Toxicol, 2018. **79**: p. 57-65.
344. Dash, R.P., R. Jayachandra Babu, and N.R. Srinivas, *Therapeutic Potential and Utility of Elacridar with Respect to P-glycoprotein Inhibition: An Insight from the Published In Vitro, Preclinical and Clinical Studies*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2017. **42**(6): p. 915-933.
345. Prouillac, C. and S. Lecoœur, *The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(10): p. 1623-35.
346. Walker, N., et al., *Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences*. Biol Reprod, 2017. **96**(4): p. 733-742.
347. Briz, O., et al., *Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 897-905.
348. Grube, M., et al., *Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(1): p. 30-5.
349. Gan, B.S., et al., *Loading pyranine via purinergic receptors or hypotonic stress for measurement of cytosolic pH by imaging*. Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. C1158-66.
350. Clement, N.R. and J.M. Gould, *Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles*. Biochemistry, 1981. **20**(6): p. 1534-8.
351. Avnir, Y. and Y. Barenholz, *pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction*. Anal Biochem, 2005. **347**(1): p. 34-41.

352. Bakos, E., et al., *A novel fluorescence-based functional assay for human OATPIA2 and OATPIC1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATPIA2*. FEBS J, 2020. **287**(12): p. 2468-2485.
353. Deng, F., N. Sjostedt, and H. Kidron, *The Effect of Albumin on MRP2 and BCRP in the Vesicular Transport Assay*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0163886.
354. Sjostedt, N., et al., *Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2*. Pharm Res, 2017. **34**(8): p. 1626-1636.
355. Goh, L.B., et al., *Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(11): p. 1569-78.
356. Nies, A.T., et al., *Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1)*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **376**(6): p. 449-61.
357. Kuteykin-Teplyakov, K., et al., *Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(6): p. 1453-63.
358. Smith, N.F., et al., *Identification of OATPIB3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(8): p. 815-8.
359. Hu, S., et al., *Interaction of imatinib with human organic ion carriers*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(10): p. 3141-8.
360. Sprowl, J.A. and A. Sparreboom, *Uptake carriers and oncology drug safety*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(4): p. 611-22.
361. Kubach, J., et al., *IgG1 anti-epidermal growth factor receptor antibodies induce CD8-dependent antitumor activity*. Int J Cancer, 2015. **136**(4): p. 821-30.
362. Stieger, B. and B. Hagenbuch, *Recent advances in understanding hepatic drug transport*. F1000Res, 2016. **5**: p. 2465.
363. Patel, M., K.S. Taskar, and M.J. Zamek-Gliszczynski, *Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites*. J Clin Pharmacol, 2016. **56 Suppl 7**: p. S23-39.

364. Pollheimer, M.J., P. Fickert, and B. Stieger, *Chronic cholestatic liver diseases: clues from histopathology for pathogenesis*. Mol Aspects Med, 2014. **37**: p. 35-56.
365. Atilano-Roque, A., et al., *Effect of Disease Pathologies on Transporter Expression and Function*. J Clin Pharmacol, 2016. **56 Suppl 7**: p. S205-21.
366. Clarke, J.D., et al., *Impaired N-linked glycosylation of uptake and efflux transporters in human non-alcoholic fatty liver disease*. Liver Int, 2017. **37**(7): p. 1074-1081.
367. Arya, V. and J.J. Kiser, *Role of Transporters in Drug Development*. J Clin Pharmacol, 2016. **56 Suppl 7**: p. S7-S10.
368. Hollo, Z., et al., *Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1191**(2): p. 384-8.
369. Bentz, J., et al., *Variability in P-glycoprotein inhibitory potency (IC₅₀) using various in vitro experimental systems: implications for universal digoxin drug-drug interaction risk assessment decision criteria*. Drug Metab Dispos, 2013. **41**(7): p. 1347-66.
370. Kimoto, E., et al., *Mechanistic Evaluation of the Complex Drug-Drug Interactions of Maraviroc: Contribution of Cytochrome P450 3A, P-Glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*. Drug Metab Dispos, 2019. **47**(5): p. 493-503.
371. Vermeer, L.M., et al., *Evaluation of Ketoconazole and Its Alternative Clinical CYP3A4/5 Inhibitors as Inhibitors of Drug Transporters: The In Vitro Effects of Ketoconazole, Ritonavir, Clarithromycin, and Itraconazole on 13 Clinically-Relevant Drug Transporters*. Drug Metab Dispos, 2016. **44**(3): p. 453-9.
372. Annaert, P., et al., *Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1*. Xenobiotica, 2010. **40**(3): p. 163-76.
373. Calcagno, A., et al., *Determinants of darunavir cerebrospinal fluid concentrations: impact of once-daily dosing and pharmacogenetics*. AIDS, 2012. **26**(12): p. 1529-33.
374. Sugiyama, D., et al., *Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(2): p. 220-3.

375. Shitara, Y. and Y. Sugiyama, *Preincubation-dependent and long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) and its impact on drug-drug interactions*. *Pharmacol Ther*, 2017. **177**: p. 67-80.
376. Allen, J.D., et al., *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*, 2002. **1**(6): p. 417-25.
377. Minta, A., J.P. Kao, and R.Y. Tsien, *Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(14): p. 8171-8.
378. Nies, A.T., et al., *Expression of the apical conjugate export pump, Mrp2, in the polarized hepatoma cell line, WIF-B*. *Hepatology*, 1998. **28**(5): p. 1332-40.
379. Liu, T. and Q. Li, *Organic anion-transporting polypeptides: a novel approach for cancer therapy*. *J Drug Target*, 2014. **22**(1): p. 14-22.
380. Malka, D., F. Rotolo, and V. Boige, *First-line treatment in metastatic colorectal cancer: Important or crucial?* *Eur J Cancer*, 2017. **84**: p. 363-366.
381. Van Cutsem, E., et al., *Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(6): p. 1190-7.
382. Walko, C.M. and C. Lindley, *Capecitabine: a review*. *Clin Ther*, 2005. **27**(1): p. 23-44.
383. de Morree, E.S., et al., *Loss of SLCO1B3 drives taxane resistance in prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2016. **115**(6): p. 674-81.
384. Takano, M., et al., *Paclitaxel-resistance conferred by altered expression of efflux and influx transporters for paclitaxel in the human hepatoma cell line, HepG2*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009. **24**(5): p. 418-27.
385. Ogane, N., et al., *Prognostic value of organic anion transporting polypeptide 1B3 and copper transporter 1 expression in endometrial cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin*. *Biomed Res*, 2013. **34**(3): p. 143-51.
386. Lockhart, A.C., et al., *Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome*. *Clin Exp Gastroenterol*, 2008. **1**: p. 1-7.

387. Ling, X., et al., *Increased P-glycoprotein expression in mitochondria is related to acquired multidrug resistance in human hepatoma cells depleted of mitochondrial DNA*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(1): p. 109-18.
388. Munteanu, E., et al., *Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **71**(8): p. 1162-74.
389. Shen, Y., et al., *Mitochondrial localization of P-glycoprotein in the human breast cancer cell line MCF-7/ADM and its functional characterization*. *Oncol Rep*, 2012. **27**(5): p. 1535-40.
390. Solazzo, M., et al., *P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(20): p. 4070-8.
391. Guenova, M.L., et al., *An anti-apoptotic pattern correlates with multidrug resistance in acute myeloid leukemia patients: a comparative study of active caspase-3, cleaved PARPs, Bcl-2, Survivin and MDR1 gene*. *Hematology*, 2010. **15**(3): p. 135-43.
392. Johnstone, R.W., E. Cretney, and M.J. Smyth, *P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 1075-85.
393. Rocco, A., et al., *MDR1-P-glycoprotein behaves as an oncofetal protein that promotes cell survival in gastric cancer cells*. *Lab Invest*, 2012. **92**(10): p. 1407-18.
394. Tainton, K.M., et al., *Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(9): p. 1028-37.
395. Takanishi, K., et al., *Inverse relationship between P-glycoprotein expression and its proliferative activity in hepatocellular carcinoma*. *Oncology*, 1997. **54**(3): p. 231-7.
396. Van Brussel, J.P., et al., *Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer*. *J Urol*, 2001. **165**(1): p. 130-5.

397. Maeda, T., et al., *Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **122**(4): p. 180-5.
398. Fang, Z., et al., *Transmembrane Domain 1 of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1 Is Essential for Transporter Function and Stability*. *Mol Pharmacol*, 2018. **94**(2): p. 842-849.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Virág Székely**, Izabel Patik, Orsolya Ungvári, Ágnes Telbisz, Gergely Szakács, Éva Bakos, Csilla Özvegy-Laczka „*Dual probes for the fluorescence-based investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions*”. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020. 151: 105395

IF: 3,616 (adat: 2019)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105395>

2. Izabel Patik, **Virág Székely**, Orsolya Német, Áron Szepesi, Nóra Kucsma, György Várady, Gergely Szakács, Éva Bakos, Csilla Ozvegy-Laczka “*Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1*”. Scientific Reports 2018. 8(1): 2630.

IF: 4,122 (adat: 2018)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20815-1>

3. Tupova Lenka; Hirschmugl Birgit, Pilarova Veronika, **Szekely Virag**, Bakos Eva, Sucha Simona, Staud Frantisek, Novakova Lucie, Laczka Csilla, Wadsack Christian, Ceckova Martina „*Interplay of drug transporters in maraviroc transport across human placenta barrier*”. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. 129: 110506.

IF: 4,545 (adat: 2019)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110506>

Kézirat előkészületben

*: egyenrangú szerzők

1. Éva Bakos*, **Virág Székely***, Izabel Patik*, Nóra Kucsma, György Várady, Mihály Cserepes, József Tóvári, Csilla Özvegy-Laczka „*Cancer-type OATP1B3-V1 is a functional plasma membrane transporter providing selective advantage against capecitabine treatment in vivo tumors*”

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetem szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Laczka Csillának**, aki lehetővé tette a kísérletek elvégzését és a doktori disszertációm elkészítését. Csilla nagyfokú szakértelmével, precizitásával, türelmével és a nehezebb pillanatokban bátorításával jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy ez a disszertáció megszülethessen. Példaértékű volt Csillától, ahogyan a járvány kitörésekor különösen segített kitartani, hogy az elsőszerzős közleményemhez szükséges utolsó kísérletek kivitelezésre kerülhessenek.

Végtelenül hálás vagyok **Dr. Bakos Évának**, aki nem csak a szakmai, hanem személyes céljaimat is kiemelkedően támogatta. Hasonló mérnöki szemléletünk mentén mindig öröm volt együtt elmélkedni, hatalmas szakmai tudása pedig rendkívül ösztönzőleg hatott a tudományos gondolkodásom kialakulására. Szavakkal kifejezhetetlen, hogy mennyire nagyon köszönök Neked, Éva, mindent!

Csilla, Éva, megtiszteltetés volt Tőletek tanulnom. Példamutató helytállásotok tudósként és egyben családanyaként rendkívül motiváló az önmegvalósítási céljaimra.

Nagyon köszönöm **Dr. Szakács Gergelynek**, hogy mindig segítőkész volt felém és lehetővé tette a kísérleteim elvégzését az általa vezetett laboratóriumban.

Köszönet illeti **Dr. Váradi Andrást** és **Dr. Sarkadi Balázst**, akik az általuk megteremtett közeggel, a szemináriumokon hasznos hozzászólásaikkal, vagy akár pályázataimhoz ajánló referenciáikkal segítették szakmai előmenetelem. Büszke vagyok, hogy az általatok létrehozott tudományos közösségben nevelkedhettem.

Külön hálás vagyok **Kucsma Nórának** a hasznos szakmai tanácsaiért, az általa létrehozott sejtvonalakért, amelyekkel dolgozhattam, és minden további segítségéért, amik a kísérleteim megvalósítását előre mozdították.

Hatalmas köszönettel tartozom **Dr. Patik Izabelnek**, aki meglátta a BSc-s hallgatói énemben a potenciált és diákjának fogadott, így a Membránfehérje kutatócsoportban elkezdhettem szárnyaim bontogatását. A közös maratoni kísérletezések és az együtt töltött lazítások rengeteget formáltak rajtam szakmailag és emberileg is. Nagyon hálás vagyok minden segítségéért, Zizi!

Az É3.05B iroda „lakói” szintén külön köszönetet érdemelnek, hiszen minden hullámhegyen-, és völgyben is velem tartottak. Köszönöm, **Réka, Orsi és Flóra** a végtelen támogatásokat!

Hálával tartozom a Laczka és Szakács csoport minden további tagjának, amiért bármikor segítségemre voltak, valamint **Mohos Krisztinek**, hogy mindig segítőkész és támogató volt.

Köszönöm **Dr. Telbisz Ágnesnek**, hogy mindig önzetlenül és korlátlanul járult hozzá az Sf9 sejtjeivel és a reagenseivel az IOV kísérleteimhez, valamint **Dr. Várady Györgynek** a rengeteg szortolást és FACS-os segítséget.

Köszönettel tartozom **Dr. Tóvári Józsefnek**, aki lehetővé tette az állatkísérletek elvégzését, valamint **Cserepes Mihálynak** és **Léner Violettnak** e kísérletekben nyújtott teljeskörű segítségükért.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Ceckova Martinának**, akinek a csoportunk felé irányuló felkérése adta meg a lehetőséget második társszerzős közleményem megszületésére.

Köszönöm az Enzimológiai Intézet minden további csoporttagjának a barátságos közeget, a sorsfordító beszélgetéseket és a szokásos pénteki esti „szakköröket”.

Köszönettel tartozom a **Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskolájának** a rendkívüli kurzusokért és kapcsolatokért. Továbbá nagyon hálás vagyok a **Doktori Hivatal dolgozóinak**, hogy mindig segítőkészek voltak felém.

A disszertációm nem születhetett volna meg a feszültségvezető tevékenységek nélkül, amiket a barátaimmal töltöttem, közülük külön köszönöm a **Műegyetemi Néptáncgyűttes** tagjainak a családi és összetartó légkört.

Minden hála és tisztelet megilleti a **Székely és Bujdosó családot** a végtelen szeretetükért, támogatásukért, áldozataikért. Köszönöm, hogy tanulhattam, és hogy mindig hisztek bennem! Végül, de cseppet sem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a szerelmemnek, férjemnek, aki számomra mindent jelent: **Bujdosó Leventének**. Te vagy a legjobb „motivátor”. Köszönöm, hogy mellettem állsz, akkor is, ha ünnepelhetünk, de akkor is, ha a legmélyebb gödrökből kell felhúznod. Nagyon szeretlek!

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1

Izabel Patik¹, Virág Székely¹, Orsolya Német¹, Áron Szepesi², Nóra Kucsma¹, György Várady², Gergely Szakács^{1,3}, Éva Bakos¹ & Csilla Özvegy-Laczka¹

Organic Anion-Transporting Polypeptides are multispecific membrane proteins that regulate the passage of crucial endobiotics and drugs across pharmacological barriers. OATP1B1 and OATP1B3 have been described to play a major role in the hepatic uptake of statins, antivirals and various chemotherapeutics; whereas the pharmacological role of the ubiquitously expressed OATP2B1 is less well characterized. According to current industry standards, *in vitro* testing for susceptibility to OATP1B1 and 1B3 mediated transport is recommended for drug candidates that are eliminated in part via the liver. Here we show that human OATP1B1, 1B3 and 2B1 transport a series of commercially available viability dyes that are generally believed to be impermeable to intact cells. We demonstrate that the intracellular accumulation of Zombie Violet, Live/Dead Green, Cascade Blue and Alexa Fluor 405 is specifically increased by OATPs. Inhibition of Cascade Blue or Alexa Fluor 405 uptake by known OATP substrates/inhibitors yielded IC₅₀ values in agreement with gold-standard radioligand assays. The fluorescence-based assays described in this study provide a new tool for testing OATP1B/2B1 drug interactions.

Human Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) encoded by the SLCO genes mediate the cellular uptake of large organic, amphipathic molecules^{1,2}. At least four members of the family, OATP1A2, 1B1, 1B3 and 2B1 are multispecific transporters that, besides the transport of endogenous substrates (bilirubin, bile acids and hormones), also promote the cellular uptake of pharmacologically relevant molecules. OATP1B1 and 1B3 are almost exclusively expressed in the sinusoidal membranes of hepatocytes where they regulate the hepatic uptake of bile acids and bilirubin. Simultaneous mutations in the SLCO1B1 and 1B3 genes result in Rotor syndrome, characterized by increased serum bilirubin levels³. Additionally, OATP1B1 and 1B3 are key determinants of the hepatic clearance of widely prescribed medications (e.g. statins, antivirals) and also of chemotherapeutics including docetaxel, irinotecan and cisplatin^{4,5}. Altered function of OATP1B1 and 1B3 due to single nucleotide polymorphisms (SNPs), drug-drug or drug-food interactions or disease conditions influences the *in vivo* efficacy of drugs^{6,7}. Co-administration of OATP1B substrate drugs may cause unexpected toxicity with fatal consequences. For example, statin-induced myopathy was shown to be linked to the inhibition of transporter-mediated hepatic uptake of statins by the co-administered gemfibrozil or Cyclosporin A^{8,9}. Inhibition of OATP1B function

¹Membrane protein research group, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok krt. 2, Budapest, H-1117, Hungary. ²Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok krt. 2, Budapest, H-1117, Hungary. ³Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8A, Vienna, 1090, Austria. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.Ö.-L. (email: laczka.csilla@ttk.mta.hu)

may also result in elevated bilirubin levels^{10,11}. OATP1B expression is often reduced in liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease, hepatocellular carcinoma, inflammatory cholestasis, primary biliary cirrhosis or chronic hepatitis¹². OATP2B1 is also expressed in the liver¹³, though its contribution to the hepatic clearance of exogenous compounds is unclear. OATP2B1 was shown to influence the intestinal absorption of orally administered drugs such as celiprolol, fexofenadine and montelukast^{5,14}. Additionally, OATP2B1 is expressed in skeletal muscle and in the heart, mediating the muscular uptake and myotoxicity of statins¹⁵. OATP1A2, the fourth multispecific member of the OATP family, has a largely overlapping expression pattern with OATP2B1, e.g. in the intestine and the blood-brain-barrier^{5,16}. Additionally, OATP1A2 is present in the liver, however in contrast to OATP1Bs and 2B1, 1A2 is found in cholangiocytes¹⁷. Therefore, although OATP1A2 transports a plethora of clinically applied drugs, it is not directly involved in hepatic drug uptake, but rather in the reabsorption of drugs from the bile. Based on pre-clinical and clinical data, OATP2B1 and 1A2 are key determinants of the intestinal uptake of numerous drugs, including various statins, fexofenadine, sulfasalazine and telmisartan¹⁸.

Recent guidelines issued by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) require testing the interaction of new molecular entities with OATP1B1 and 1B3^{19,20}, and OATP2B1 and OATP1A2 are emerging candidates according to the International Transporter Consortium²⁰. Recommended functional assays typically measure the effect of the investigated compounds on the OATP-mediated uptake of radioactively labelled compounds⁷. Typical test substrates of OATP1B and 2B1 include radioactively labelled estrone-3-sulphate, estradiol-glucuronide, bromosulphophthalein, a statin or cholecystokinin-8 (1B3)⁷. Recently, several clinically applied drug substrates of OATP1B1 (various statins, fexofenadine, or bosentan) measured by HPLC-MS (high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry) have been shown to be applicable as test substrates to predict DDI²¹. Whereas these indirect assays provide a reliable and sensitive measurement of OATP function, radioactive compounds and MS are usually not compatible with large scale screening efforts. Lately, ³H-Rosuvastatin and DHEAS have been demonstrated as *in vivo* substrates of OATP1Bs in cynomolgus monkey^{22,23}, and erlotinib as a potential probe substrate for OATP2B1 applicable in humans²⁴.

Fluorescence-based detection technologies are frequently applied in biological testing, due to their unique advantages in setting up homogeneous, sensitive assays in miniaturized formats²⁵. A common feature of drug transporters is their wide substrate specificity that also encompasses fluorescent molecules. Indeed, fluorescent molecules have been successfully used in *in vitro* and *in vivo* transporter assays²⁶. Calcein-AM, originally developed as a viability dye, was discovered to be a high affinity substrate of several pharmacologically relevant ABC transporters^{27–29}. Similarly, Hoechst 33342 and DyeCycle Violet, two nucleotide/DNA binding dyes, are ABCG2 and ABCB1 substrates that can be used to characterize transporter function^{30,31}. Screening assays based on the OATP1B1/3-mediated uptake of fluorescein, fluorescein-methotrexate or various fluorescein derivatives have also been developed^{32–34}. The applicability of fluorophores in transporter-based assays depends on several sources of potential artefacts, including non-specific protein binding, sequestration within the cell, or quenching by pH or intracellular ions. Unlike fluorescein or fluorescein-methotrexate, an ideal OATP test substrate should be membrane impermeable, and its fluorescence should be independent of the intracellular milieu.

Our aim in this study was to expand the scope of currently available fluorescent indicators of hepatic OATPs, 1B1, 1B3 and 2B1. In particular, we wanted to identify a pH-independent fluorophore with low cell permeability, to ensure a high signal to noise ratio and to allow transport measurements at acidic pH levels needed for the optimal activity of OATPs³⁵. Using cell lines engineered to overexpress human OATP1B1, 1B3, or 2B1, we identify a series of commercially available cell impermeable dyes as high affinity OATP substrates. We show that a transport assay based on the uptake of the best-performing fluorophores is amenable to semi high-throughput screening for OATP drug interactions.

Results

Zombie Violet is a novel substrate of human OATPs, 1B1, 1B3 and 2B1. In an effort to identify new fluorescent substrate candidates of hepatic OATPs, we searched the literature for dyes showing low membrane permeability and pH independent fluorescence. Based on these characteristics we focused on commercially available viability dyes, because these fluorescent molecules do not stain living cells, and therefore are expected to show low passive permeability. Recently, we have shown that the OATP-mediated transport of fluorescent compounds can be quantitatively monitored in insect cells³⁶. Therefore, first we used this expression system to test the contribution of OATP1B1 to the cellular uptake of Zombie Violet™ (ZV, BioLegend), an amine-reactive fluorescent dye used for the labelling of dead cells. To discern staining due to cell death, we counterstained the cells with propidium iodide (PI). Whereas in control cells staining with ZV was always accompanied by PI-positivity (indicating a loss of membrane integrity), cells expressing the human OATP1B1 transporter were distinctly ZV-positive and PI-negative, indicating that ZV cannot penetrate living cells unless OATP1B1 is present in the plasma membrane (Fig. 1a). Detailed transport measurements confirmed that the accumulation of ZV is due to OATP1B1-mediated uptake, showing saturable (Fig. 1b) and inhibitor-sensitive uptake (Supplementary Figure 1a).

Next, we screened ZV against the other, multispecific human OATPs of the liver, 1B3 and 2B1 (Fig. 1c). We found that, albeit to a lesser extent, ZV is also transported by OATP1B3 and 2B1. ZV transport was sensitive to pH (Fig. 1d), with highest uptake at pH 5.5; and also to inhibitors (Supplementary Figure 1b), indicating that ZV is a bona fide OATP1B and 2B1 substrate. Additionally, we found that Live/Dead Green (LDG, Life Technologies), also designed to label dead cells, is another substrate of these three OATPs, while in the case of Zombie Green (a viability dye from the Zombie™ family), there was no OATP-mediated transport (Fig. 1c).

Establishment of A431 cells with robust OATP1B1, 1B3 or 2B1 expression using viability dye-based cell sorting. While the Sf9 system has several advantages, the transient nature of OATP expression is not compatible with high-throughput screening (HTS). In order to build a stable model system and to test

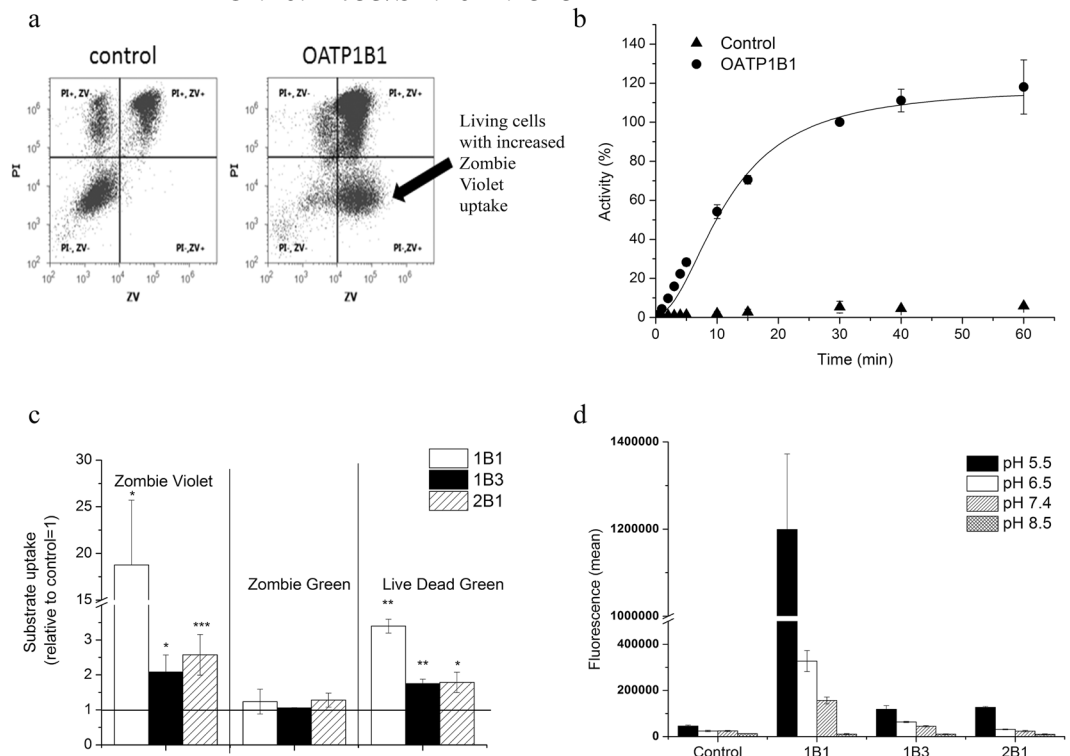


Figure 1. Uptake of viability dyes in Sf9 cells measured by flow cytometry. **(a)** Uptake of ZV (0.2 μ l in 100 μ l) was measured at 37 $^{\circ}$ C in pH 5.5 uptake buffer for 15 minutes. Dead cells were identified based on PI staining. Experiments were repeated at least three times, the result of one representative experiment is shown. **(b)** Kinetics of OATP1B1-mediated ZV uptake. Uptake rates were normalized to the fluorescence values measured for OATP1B1 incubated with 2 μ l ZV for 30 minutes. **(c)** ZV and LDG uptake in Sf9 cells. Dye (0.2 μ l in 100 μ l) uptake was measured after 30 minutes of incubation. Statistical analysis was performed by Student's t-test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **(d)** pH dependent uptake of ZV in Sf9 cells. Uptake of 0.2 μ l ZV in 100 μ l at 37 $^{\circ}$ C was measured in buffers with different pH for 10 minutes. **(b,c and d)** data represent the average of three independent experiments \pm SD values.

whether OATP1B and 2B1-mediated viability dye uptake can also be observed in human cells, we generated A431 (human epidermoid carcinoma) cell lines overexpressing OATP1B1, 1B3 or 2B1. The A431 cell line was chosen based on its good adherence necessary for transport measurements in 96 well plates. OATP2B1 was readily overexpressed in A431 cells, whereas expression levels of OATP1B1 and 1B3 remained very low despite repeated rounds of puromycin selection or lentiviral transduction (Fig. 2a shows OATP protein levels in A431 cells in comparison to the levels achieved in insect cells). Consequently, transport of a common OATP1B and 2B1 substrate, fluorescein-methotrexate showed weak OATP1B activity compared to OATP2B1 (Fig. 2b). Similarly, convincing ZV and LDG uptake could only be observed in A431-OATP2B1 cells (Fig. 2b).

Substrate uptake is proportional to OATP expression/function, and we sought to determine whether subpopulations with increased OATP expression could be identified based on substrate accumulation. Since LDG is well tolerated (see Supplementary Figure 2), we sorted highly fluorescent LDG-positive A431-OATP1B1, 1B3 and 2B1 cells, which were further propagated in cell culture. Stunningly, the sorted cells showed significant OATP expression and function (Fig. 2c,d), indicating that preferential uptake of LDG allowed the function-based sorting of cells with high OATP expression. High expression levels were maintained for at least 2 months (cca. 20 passages) without the need of further sorting or selection.

A set of commercially available fluorophores as OATP1B and 2B1 substrates. In addition to ZV and LDG, a large panel of spectrally diverse dyes aimed for the detection of dead cells is available commercially (Table 1). In order to find out whether these fluorescent dyes are also recognized by OATP1B1, 1B3 and 2B1, we monitored their uptake in 96 well plates using the sorted A431 cells. In addition to the viability dyes, we tested the transport of two other cell-impermeant fluorescent compounds, Cascade Blue hydrazide (CB) and Alexa Fluor 405 succinimidyl ester (AF405), intended for use in cell permeability assays and the fluorescent labelling of proteins, respectively. As shown in Fig. 3, we found a robust fluorescent signal in OATP-expressing cells with several dyes. Moreover, in the case of ZV, LDG, CB and AF405 the signal intensity highly exceeded that of Fl-MTX, indicating that the newly identified dyes may be better suited for fluorescence-based studies assaying OATP function. On the other hand, Zombie Green, Live/Dead Red, Live/Dead Aqua, Live/Dead Yellow, Live/Dead Far-red and Live/Dead near-IR were not transported by the investigated OATPs (Table 1).

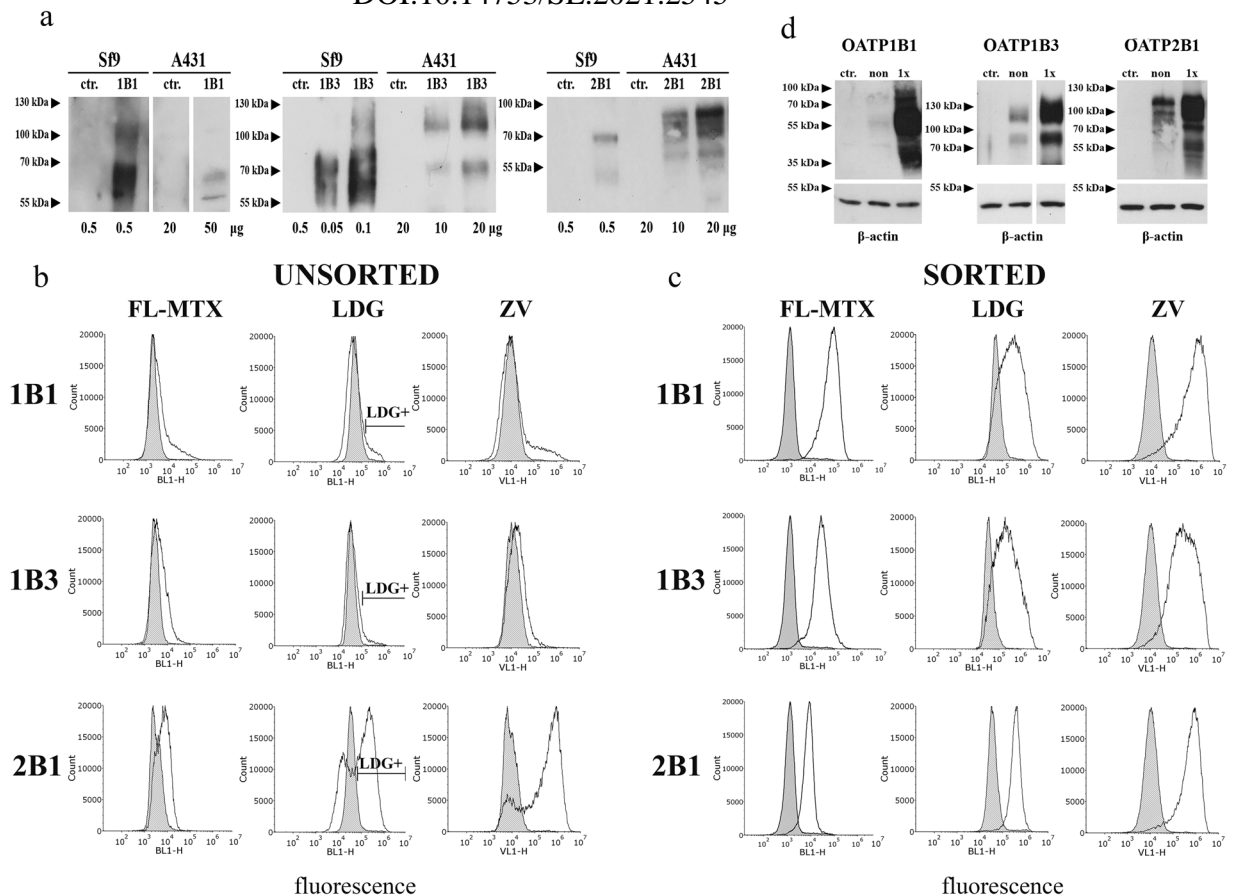


Figure 2. Low level of OATP1B expression in A431 cells. **(a)** Western blot detection of human OATPs expressed in insect and A431 cells. Total cell lysates were analysed by Western blot. Control (ctr.) represents Sf9 cells expressing an unrelated protein or mock transfected A431 cells. Multiple migratory bands most probably represent differently glycosylated forms of OATPs. Figure for OATP1B1 was sliced from the same blot, same exposure time. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 7. **(b)** FL-MTX, LDG and ZV uptake in A431 cells. Representative histograms show the uptake of 1 μM FL-MTX or 0.4 μM LDG or ZV into A431 cells before and after sorting. Cells with the highest LDG fluorescence were sorted, and after recovery, the cells were again measured for LDG uptake (panel c). Mock transfected control cells are indicated by filled histograms. Cells were incubated with the substrates for 15 minutes (FL-MTX) or 30 minutes (ZV, LDG) at 37 °C in uptake buffer (pH 5.5) in final volume of 100 μl. Living (PI-negative) cells are shown. **(d)** LDG sorting results in increased expression of OATP1B1, 1B3 and 2B1. OATP expression was determined using whole cell lysates (20 μg each) by Western blot. A431 mock transfected cell lysates were used as control. β-actin served as an internal control. Experiments were repeated at least twice. One representative blot is shown. Ctr.: mock-transfected, non: non-sorted, sort: sorted. Multiple migratory bands most probably represent differentially glycosylated forms of OATPs. Full-length blots with different exposition times are presented in Supplementary Figure 7.

Functional assay adapted to microplates. In order to find optimal conditions for measuring the uptake of the newly identified OATP1B and 2B1 substrates and to choose the best dye that could be applied in a semi high-throughput set up, we characterized the kinetics of uptake by A431-OATP1B1, 1B3 and 2B1 cells seeded in 96-well plates. We found rapid ($t_{1/2}$ values around 10–15 minutes, Supplementary Figure 3b) uptake of the newly identified fluorescent dye substrates, and most importantly we also observed that incubation/reaction time could be prolonged up to 60 minutes without significant “leakage” of the dyes into control cells. The optimum condition for OATP1B and 2B1-mediated uptake for all the tested dyes was found to be at pH 5.5 (Fig. 1d, and Supplementary Figure 4).

Structural information was available for AF405 (Tris(N,N-diethylethanaminium) 8-[2-(4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)piperidin-1-yl)-2-oxoethoxy]pyrene-1,3,6-trisulfonate) and CB (([3,6,8-trisulfo-1-pyrenyl]oxy)-1-hydrazide), which were further characterized to determine the kinetic parameters of transport (see Supplementary Figure 3 for detailed characterization of ZV, LDV and LDG transport). In comparison to FL-MTX, AF405 and CB proved to be lower affinity substrates, whereas the V_{max} of 1B1/2B1-mediated CB transport was 2–4 fold higher. 1B3 showed weak CB transport, but AF405 proved to be an excellent substrate with cca. 3-fold higher V_{max} value as compared to FL-MTX (Fig. 4). In experiments performed at ideal conditions for each dye, we found that the maximum signal (OATP vs. vector control) can be achieved

Distributor	Dye	Ex/Em optimum (nm)	Transported by OATPs in A431 cells
BioLegend	Zombie Green	488/515	—
	Zombie Violet	405/423	1B1, 1B3, 2B1
Thermo Fisher (Life Technologies)	Live/Dead Blue	350/450	very weak 1B1, 1B3, 2B1
	Live/Dead Aqua	367/526	—
	Live/Dead Violet	416/451	1B1, 1B3, 2B1
	Live/Dead Yellow	400/575	—
	Live/Dead Green	495/520	1B1, 1B3, 2B1
	Live/Dead Red	595/615	—
	Live/Dead Far-red	650/665	—
	Live/Dead near-IR	750/775	—
	Alexa Fluor 405 NHS Ester	401/421	1B1, 1B3, 2B1
	Cascade Blue Hydrazide	400/419	1B1, 1B3, 2B1

Table 1. List of the fluorescent dyes tested in the current study. All dyes were tested for transport by OATP1B1, 1B3 and 2B1 expressed in A431 cells in 96-well plates using an Enspire fluorescent plate reader. Transport was tested in at least two independent experiments using triplicates. “—” indicates lack of OATP-mediated uptake.

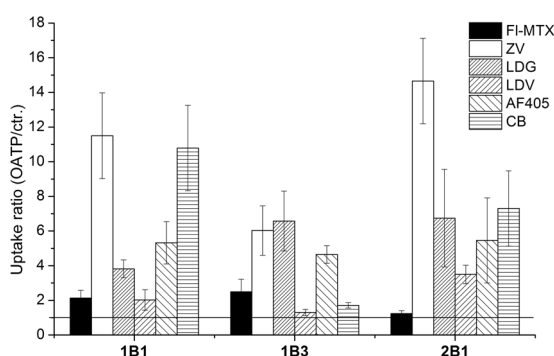


Figure 3. Screening identifies additional fluorescent OATP substrates. Transport was determined in A431 cells expressing OATP1B1, 1B3 or 2B1 seeded in 96-well plates. The cells were incubated with 1 μ l ZV, LDV, LDG, 1 μ M (or 4 μ M for OATP2B1) FI-MTX or 20 μ M CB and AF405 for 30 minutes at 37°C in buffer with pH 5.5, in final reaction volume of 100 μ l. Fluorescence was determined using an Enspire fluorescent plate reader. Activity was calculated by dividing fluorescence measured in A431-OATP cells with that measured in A431 mock transfected cells. Average of at least three independent measurements with triplicates \pm SD values are shown.

with ZV for all three OATPs. CB is as good a substrate for OATP1B1 and 2B1 as ZV. In the case of OATP1B3 the highest signal was achieved with ZV, LDG and AF405 (activity ratios are summarized in Table 2). Importantly, the transport of all novel fluorescent dyes could be inhibited by known inhibitors.

Inhibition assay using Cascade Blue or Alexa Fluor 405 to probe substrates. Next, we tested the applicability of the best performing substrates, CB for OATP1B1 and 2B1, and AF405 for OATP1B3 to detect OATP drug interactions. We measured the inhibitory effect of four well-known OATP1B and 2B1 interacting compounds (Cyclosporin A (CsA), bromosulphophthalein (BSP), taurocholate (TC) and estrone-3-sulphate (ES)). All four compounds inhibited CB or AF405 uptake in a concentration dependent manner (Fig. 5). Moreover, the IC_{50} values obtained in the fluorescence-based assays (Table 3) showed perfect agreement with results obtained using radioactive substrates, and pilot screens yielded a z-factor above 0.5, suggesting that the new, fluorescence-based assays are amenable to HTS detecting OATP1B/2B1 drug interactions (Table 2)³⁷.

Discussion

Testing the interaction between a new molecular entity and OATP1Bs is required at early stages of drug development. Several fluorescent OATP1B substrates have already been identified. These substrates are either molecules with intrinsic fluorescence, mainly fluorescein and its derivatives^{33,34}, or OATP substrates tagged with a fluorophore, such as Oregon green/Flutax-2 (1B3³²), chenodeoxycholy-(N ϵ -1 nitrobenz-2-oxa-1,3-2 diazole)-lysine (CDCA-NBD)³⁸, cholyl-glycylamido-fluorescein (CGamF)³⁹, cholyl-L-lysyl fluorescein (CLF)⁴⁰, fluorescein-methotrexate (FI-MTX)³² and 8-fluorescein-cAMP (8-FcA)⁴¹. Whereas methods based on the uptake of fluorescein and fluorescein-methotrexate have been adapted to semi high-throughput (HT) format^{32,33}, due to reliability, sensitivity and availability issues, most of these probes are not ideal for large scale OATP drug interaction screens³⁴. For example, Gui *et al.* found that due to its lower transport capacity by OATP1B1, FI-MTX is not suitable for HT OATP1B1 drug interaction screening³². Moreover, in the case of OATP2B1, an

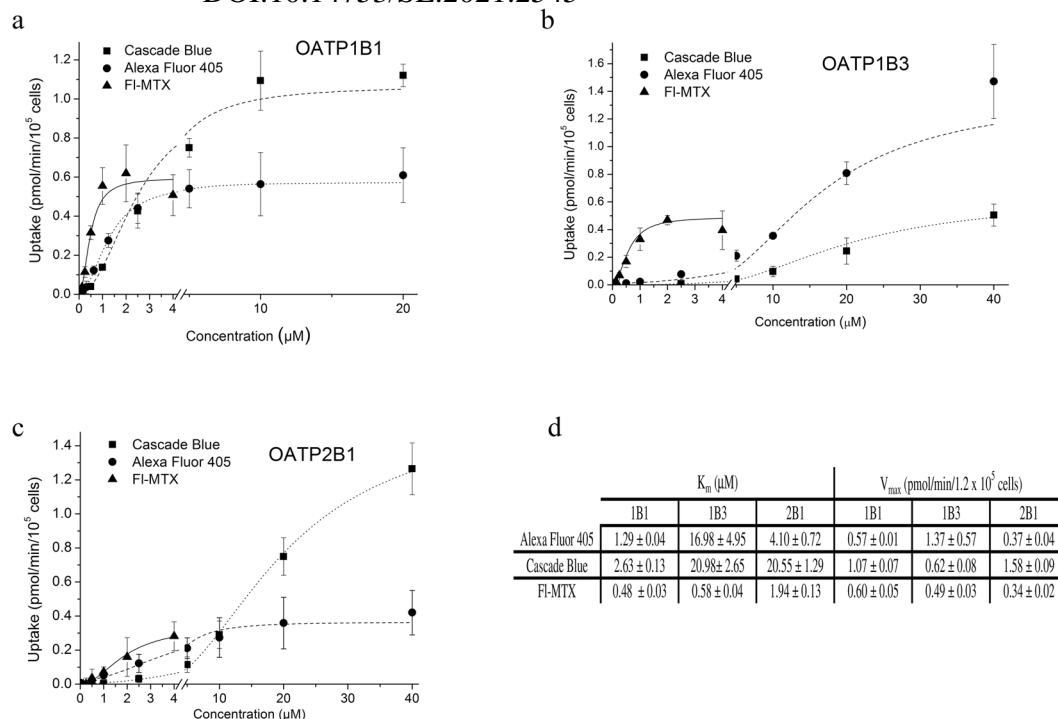


Figure 4. Kinetics of uptake of CB, AF405 and FI-MTX in A431 cells overexpressing OATP1B1, 1B3 or 2B1. Transport was measured in 96-well plates. Cells were incubated with increasing concentrations of FI-MTX, CB or AF405 in the linear phase of uptake (2.5 minutes for FI-MTX, 10 minutes (1B1, 2B1) or 15 minutes (1B3) for CB, and 15 minutes for AF405). Transport capacity was calculated based on calibration with known amounts of the dye. Uptake in A431-OATP cells without background signal (fluorescence in A431-mock cells) is shown. Data points indicate average \pm SD values obtained in three independent experiments.

	Transport ratio compared to control			z-factor		
	1B1	1B3	2B1	1B1	1B3	2B1
FI-MTX	2.14 ± 0.44	2.49 ± 0.72	1.24 ± 0.16	0.59	0.77	-1.80
Zombie Violet	11.05 ± 2.47	6.03 ± 1.43	14.65 ± 2.47	0.61	0.61	0.71
Live/Dead Violet	2.03 ± 0.59	1.33 ± 0.21	3.50 ± 0.53	0.55	-0.42	0.79
Live/Dead Green	3.82 ± 0.51	6.58 ± 1.73	6.74 ± 2.82	0.84	0.76	0.62
Cascade Blue	10.79 ± 2.46	1.71 ± 0.16	7.31 ± 2.17	0.73	0.26	0.66
Alexa Fluor 405	5.32 ± 1.22	4.65 ± 0.51	5.46 ± 2.46	0.59	0.64	0.57

Table 2. Transport ratio and z-factor determined in A431-OATP cells. A431 cells (seeded in 96-well plates) were incubated with the dyes at pH 5.5 for 30 minutes in order to reach maximum fluorescence signal. Data were calculated from at least 3 independent measurements. Dyes were applied in the following concentrations/amounts: FI-MTX 1 μM (1B1 and 1B3) and 4 μM (2B1); ZV, LDV and LDG 1-1 μl ; CB and AF405 10 μM (1B1 and 2B1) and 20 μM (1B3). A z-factor above 0.5 is defined as an excellent assay³⁷. Dyes defined as best candidates for HTS are indicated in bold.

emerging candidate in pharmacokinetic studies, no such fluorescence-based large scale screening method has been reported.

Here our aim was to identify novel fluorescent OATP1B1, 1B3 and 2B1 substrates. We tested commercially available fluorescent molecules showing low passive cellular uptake, high fluorescence quantum yield and pH insensitivity. These characteristics are required to achieve high signal to noise ratio, and maximal OATP activity, since OATP2B1 functions (almost) exclusively at acidic extracellular pH^{36,42}. Based on these criteria, we chose two sets of compounds. First, we tested fluorescent viability dyes (Zombie dyes and the Live/Dead viability dye panel) developed to enter only dead cells. Secondly, we selected CB, a commercially available fluorescent dye used to investigate membrane permeability.

We found that in OATP1B or 2B1 expressing live insect cells a typical transporter mediated uptake of ZV can be observed (Fig. 1). Moreover, a robust OATP-mediated ZV uptake was also confirmed in A431 cells engineered to overexpress the OATP transporters (Figs 2 and 3). ZV was designed to label cells with compromised membranes. Indeed, in control Sf9 and A431 cells ZV fluorescence correlated with propidium iodide staining (Fig. 1a

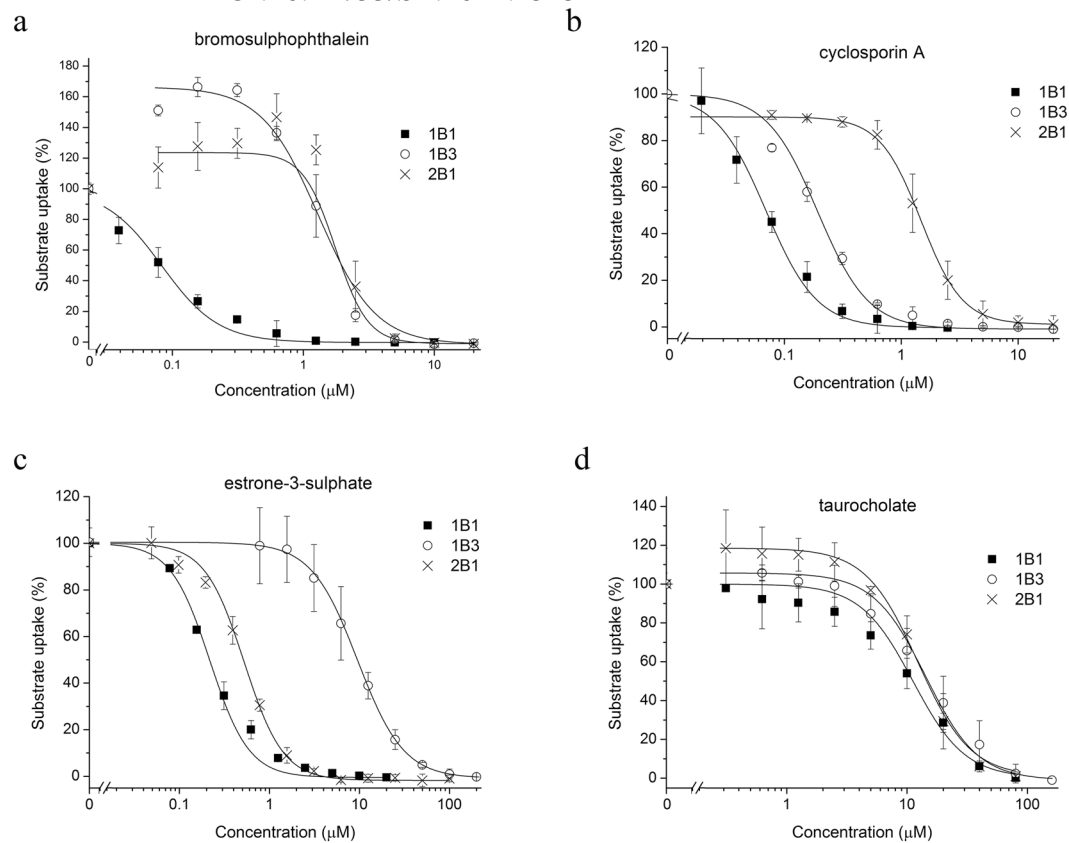


Figure 5. Inhibition of CB and AF405 uptake in A431-OATP cells. Transport of CB (2 μM for OATP1B1 and 10 μM for OATP2B1) and AF405 (5 μM , OATP1B3) was measured for 30 minutes in the absence or presence of the investigated compounds. Transport was determined by subtracting fluorescence in A431-mock cells. Transport measured in cells with the dye alone was set to 100% and the effect of the compounds was compared to this value. Experiments were performed in triplicates with three parallels in each biological replicate. Average \pm SD values are shown.

	OATP1B1		OATP1B3		OATP2B1	
	This study	Literature data	This study	Literature data	This study	Literature data
BSP	0.08 \pm 0.10	0.1 ^{34,41,45}	0.9 \pm 0.31	0.4 ⁵⁵ , 0.5 ⁴¹	1.26 \pm 0.56	1.2 ⁴⁶
CsA	0.07 \pm 0.04	0.1 ^{34,45} 0.2 ⁴¹ , 1.3 ⁴⁴	0.18 \pm 0.05	0.2 ⁴¹ , 1.2 ⁴⁴	1.45 \pm 0.11	36 ⁴⁴
EIS	0.22 \pm 0.004	0.05 ^{34,41}	9.5 \pm 0.13	20 ⁴¹	0.56 \pm 0.05	
TC	11.2 \pm 0.22	9 ³⁴ , 19 ⁴⁵	14.3 \pm 0.32	18 ^{*56}	12.3 \pm 0.15	9 ⁴⁶

Table 3. Comparison of IC_{50} values with literature data. IC_{50} (μM) values were determined using 2 or 10 μM CB (OATP1B1 or 2B1) or 5 μM AF405 (OATP1B3). For detailed description see Fig. 5. Literature data show IC_{50} values obtained in assays using EG, ES, 8-FcA or DCF as probe substrates. When transport inhibition data were not available, K_m values obtained in direct transport experiments are shown, indicated by *.

and Supplementary Figure 5). However, our results demonstrate that the expression of OATPs results in the staining of living (propidium iodide negative) cells, warranting caution in the interpretation of results obtained with ZV as a viability dye.

Using the Sf9 expression system we identified another viability dye, Live/Dead Green as an OATP1B and 2B1 substrate (Fig. 1c). However, further large scale screens required a well-adherent cell line with stable OATP expression. Therefore we generated A431 cells with OATP1B1, 1B3 or 2B1 overexpression. Although A431 is not routinely used in pharmacological applications, due to its well-adherence it is well suited to microplate based assays⁴³. Unexpectedly, only very low levels of OATP1B1 and 1B3 expression could be achieved in this cell line (Fig. 2a) and also in HEK293 or MDCKII cells. Enrichment of OATP1B expressing living cells based on antibody labelling is not feasible due to the lack of an anti-OATP antibody recognizing an extracellular epitope. Therefore we sorted cells based on increased fluorescence associated with OATP1B/2B1 mediated LDG uptake, which led to the enrichment of OATP1B and 2B1 positive cells characterized by elevated OATP expression and function

(Fig. 2c,d). The application of a fluorescent dye to enrich OATP-expressing cells is a unique (and to our knowledge the first) tool that allows the generation of cells with high OATP levels.

To validate the reliability of the A431 model, we also tested the uptake of the newly identified fluorescent substrates in HEK293 and MDCKII cells that are routinely used in transporter interaction studies. Results obtained in HEK and MDCKII cells overexpressing OATP1B1, 1B3 or 2B1 (Supplementary Figure 6) were fully consistent with those obtained in A431 cells, supporting the conclusion that the novel fluorescent dye substrates can be applied to characterize OATP1B/2B1 function.

Consistently with studies showing that an acidic extracellular milieu can significantly stimulate OATP-mediated transport^{35,42}, we observed transport of the new fluorescent substrates almost exclusively at pH 6.5–5.5. Whether this is due to chemical changes in the fluorescent molecules at lower pH or an indication of proton counter transport, needs further investigation. Importantly, inhibition constants obtained with the novel assays at acidic pH are in full harmony with data obtained at neutral pH^{34,41,44}, indicating that the established assay conditions are suited for OATP drug interaction screens.

Although the exact transport kinetics (K_m and V_{max} values) for ZV, LDV and LDG could not be defined (the molecular formula of these dyes could not be obtained from the suppliers due to proprietary concerns), we were able to determine and compare transport kinetics of CB and AF405 with that of Fl-MTX. Fl-MTX is a well-established substrate of OATP1B1 and 1B3³², and we have demonstrated previously that Fl-MTX is also transported by OATP2B1 when an acidic extracellular environment is generated³⁶. In A431 cells we could confirm the OATP2B1-mediated uptake of Fl-MTX, however compared to OATP1Bs, Fl-MTX was found to be a poor substrate of OATP2B1 (Figs 2 and 3). In the case of the novel dye substrates, we found that CB is preferentially transported by OATP1B1 and 2B1 as compared to Fl-MTX, while OATP1B3 shows preferential transport of AF405 as compared to CB and Fl-MTX (Figs 3 and 4 and Table 2).

Besides the hepatic OATP1Bs and 2B1, OATP1A2 is also an important drug transporter. However, in our pilot experiments, we found no detectable transport of Zombie Violet, Cascade Blue or Alexa Fluor 405 by this transporter.

Highly fluorescent dyes with low cell permeability and elevated transport by OATPs are ideal candidates for the development of a sensitive functional assay. Our results demonstrate that the novel OATP1B and 2B1 substrates and the established A431 model cells can be used to measure OATP function in a low to medium throughput format. The z-factor for the novel substrates also suggests that ZV, LDV (1B1, 2B1), LDG, CB (1B1, 2B1) and AF405 may be applied in large scale drug screening studies (Table 2). Experiments using CB or AF405 as probe substrates demonstrate that these dyes are suitable to detect OATP substrate/inhibitor interactions (Fig. 5). The IC_{50} values obtained in our assay are in good agreement with those measured with widely accepted test substrates (estrone-3-sulphate or estradiol-glucuronide) (Table 3). It is well known that OATP1Bs and 2B1 have more than one substrate binding site. The IC_{50} values measured for OATP1B1-mediated CB uptake are in harmony with those obtained with dichlorofluorescein and tritiated estradiol-glucuronide^{34,44,45}. Therefore the CB assay may be a good alternative to test OATP1B1 drug interactions as a substitute to estradiol-glucuronide. Similarly, the AF405 and CB assay for OATP1B3 and 2B1, respectively resulted in IC_{50} values similar to that obtained in assays using tritiated estradiol-glucuronide (1B3)⁴⁴, or estrone-3-sulphate (2B1)^{44,46} as probe substrates. These results again clearly argue that CB and AF405 are good alternatives to these radioactive assays. Interestingly, BSP at low concentrations activated CB or AF405 uptake by OATP2B1 or 1B3, respectively. Such an activation by BSP has not yet been documented, however the stimulatory effect of one compound to the transport of another is a well-known phenomenon (summarized in⁴⁷). In the case of OATP1B3, progesterone was shown to stimulate Fl-MTX³² and epigallocatechin gallate estrone-3-sulphate uptake⁴⁸. Progesterone has also an activating effect on OATP2B1-mediated estrone-3-sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate uptake⁴⁹, and prostaglandin A1, testosterone and fendilin on estrone-3-sulphate uptake^{44,50}. One possible explanation may be a co-transport of the two molecules, however reciprocal transport has not yet been confirmed in any of these cases, and also needs further investigation for the fluorescent dyes and BSP.

In conclusion, we show here that several fluorescent viability dyes and two sulfonylpyrenes (CB and AF405) are high capacity substrates of the multispecific OATP1B and 2B1 transporters. The fluorescence-based transport assay measuring the uptake of the best-performing substrates, CB and AF405 open the way to the development of sensitive high-throughput assays for the detection of OATP1B/2B1 drug interactions.

Materials and Methods

Materials. Zombie dyes (Violet, Green) were purchased from BioLegend® (San Diego, CA, US). LIVE/DEAD® Fixable Cell Stain Dye panel, Cascade Blue hydrazide, Alexa Fluor 405 succinimidyl ester were bought from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, US), and fluorescein-methotrexate triammonium salt from Biotium (Hayward, CA, US). Restriction endonucleases were from New England Biolabs Ltd. (Ipswich, MA, US). All other materials, if not indicated otherwise, were purchased from Sigma Aldrich, Merck (Budapest, HU).

Generation of plasmid constructs. Generation of baculovirus vectors (pAcUW21-L/OATP and pAcUW21-control) was described earlier³⁶. OATP2B1 expressing cells were generated by transposase mediated genomic insertion of the OATP2B1 cDNA (BC041095.1, HsCD00378878). Briefly, OATP2B1 cDNA was amplified (Phusion1 High-Fidelity PCR Kit, NEB, Ipswich, MA, US) from the vector obtained from Harvard PlasmID Repository (Harvard Medical School, Boston, MA, US) by using the following primers: forward 5': GTAAT GCGGCCGC AA GAATTC GCCACCATGGG ACCCAGGATAGG and reverse 5' GTACAT GCGGCCGC T AAGCTT TCACACTCGGGAATCCTC. The PCR fragment was cloned between the NotI-HindIII sites of the pSB-CMV vector⁵¹.

OATP1B1 and 1B3 overexpressing cells were generated by lentivirus transduction. The lentivirus based pPRL-CMV-MCS-IRES- Δ CD4 vector was generated by replacing the sequence of GFP with a multicloning

site of the pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Addgene #12252) plasmid (Didier Trono, Lausanne, Switzerland). An IRES was cloned between the PmlI and XbaI sites of the MCS (forward: 5'-ACACGTGTCCGGACTAGTCCACCTTGCC TTACACATGAAGAG, reverse: 5'-ATCTAGAATGATCAGCCATATTATCATCGTGTGTTTTTCAAAG). The plasmid also contains a truncated CD4 receptor enabling monitoring of the virus transfection. Truncated CD4 cDNA was PCR amplified by the following primers (based on⁵²: 5'-GATTCTAGAGCCACCATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGC and 5'-GTAGTCGACTTAGCGCCTTCGGTGCCGGCAC from the pCMV-SPORT6-CD4 (Harvard Plasmid Repository). After digestion with XbaI-SalI enzymes, the PCR fragment was cloned to the corresponding sites of the pRRL-CMV-MCS-IRES vector.

The open reading frames OATP1B1 (Gene ID: AB026257) and OATP1B3 (BC141525, HsCD00348132) were amplified by HF PCR (Phusion1 High-Fidelity PCR Kit, NEB, Ipswich, MA, US) from the pAcUW-21-L/OATP1B1-wt vector and from the plasmid obtained from Harvard PlasmID, respectively, using the following primers:

OATP1B1: forward 5' TATTATTTCGAAGCCACCATGGACCAAAATCAACAT, reverse 5' CATGTAAC TAGTTTAAACAATGTGTTTCACTATCT.

OATP1B3: forward 5' ACTAGTTTAAACGCCACCATGGACCAACATCAACAT and reverse 5' GTACATGCG GCCGCACTGCAGTTAGTTGGCAGCAGCATTTGTC. After digestion with BstBI and SpeI (OATP1B1) or PmeI-PstI (OATP1B3) enzymes the PCR fragments were cloned to the corresponding sites of the pRRL-CMV-MCS-IRES- Δ CD4 vector.

The base order of the cDNAs in the final vector constructs was verified by sequencing. Empty vectors without the OATP cDNAs, pSB-CMV and pRRLdCD4 were used as negative controls (indicated on the Figures as mock).

Expression in insect cells. Transient expression of human OATP1B1, 1B3 and 2B1 in Sf9 (Spodoptera frugiperda) cells was achieved as described earlier³⁶. For transport measurements, Sf9 cells after 36–40 hours post infection were used.

Generation of cell lines. A431 cells (ATCC) were transfected with 1 μ g plasmid DNA (OATP2B1) + 100 ng plasmid containing the transposase^{51,53} using Fugene HD reagent (Promega, Madison, WI, US) according to the protocol of the supplier. Puromycin (1 μ g/ml) selection was started 48 h later. After 2 weeks of puromycin selection the cells were grown in DMEM (Gibco, Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, US)) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity, without puromycin.

OATP1B1 and 1B3 overexpression in A431 cells was achieved by recombinant lentiviruses as described in⁵⁴. HEK 293 T human embryonic kidney cells (1.8 \times 10⁶ cells on a Petri dish (6 cm in diameter)) were transfected with (6 μ g) pRRL-CMV-MCS-IRES- Δ CD4/OATP1B1 or OATP1B3, 2.2 μ g pMDG and 4 μ g psPax2 vectors⁵⁴ using CaPO₄ precipitation. The supernatant, containing lentiviral particles was collected 72 h after the transfection. Transduction of target A431 cells was carried out on 6 well plates. The multiplicity of infection was approximately 1.

Determination of dye uptake. *Flow cytometry.* In order to determine the uptake of the fluorescent molecules in Sf9 cells, recombinant baculovirus infected cells were collected 36–40 hours post infection. After washing in the appropriate buffer (usually uptake buffer pH 5.5, see below) 5 \times 10⁵ cells were incubated at 37 °C with the appropriate amount of dyes (the exact concentrations/amounts are indicated in the Figure legends) in a final volume of 100 μ l. Transport experiments were carried out in the uptake buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 12 mM MgSO₄, 25 mM MES, and 5.6 mM glucose, with the pH adjusted to 8.5, 7.4, 6.5 or 5.5 using 10 N NaOH or 1 M HEPES). Incubation time was between 1–60 minutes. The reaction was stopped by the addition of 1 ml ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). The cells were kept on ice until flow cytometry analysis. The cellular fluorescence of min. 20,000 live cells was determined using an Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US). Dead cells labelled with propidium iodide (PI, 1 μ g/ml) were excluded. Functional data for each OATP represent the mean of at least 3 independent experiments performed on different days. In the case of A431 cells, cells were collected after trypsinization (0.1% trypsin) and the uptake experiments were performed in the same way as described for insect cells (see above). Data presented on Figures were generated by the FCS Express software.

Microplate-based assay. For the microplate-based assay, OATP-expressing A431 cells were seeded (6 \times 10⁴ cells in 200 μ l final volume/well) onto 96-well plates and cultured for 16–24 h at 37 °C, 5% CO₂. Next day, the supernatant was removed and the cells were washed 3-times with 200 μ l of PBS. When inhibitors were tested, the cells were pre-incubated in the presence of inhibitors (solved in DMSO) for 5 min at 37 °C (usually in 50 μ l volume). The amount of DMSO was kept below 0.5% throughout the study. This amount of the solvent did not influence the fluorescence of the dyes. The reaction was started with the addition of 50 μ l fluorescent dye (1–40 μ M final concentration or 0.05 μ l–1.2 μ l in final volume of 100 μ l) and the plate was incubated at 37 °C for 2–30 minutes. The reaction was stopped by the addition of 200 μ l ice-cold PBS. The supernatant was rapidly removed, and the cells were washed 3-times with 200 μ l ice-cold PBS. Finally, 200 μ l PBS was added to the cells and fluorescence was measured at room temperature using an Enspire fluorescent plate reader (Perkin Elmer) at wavelengths indicated in Table 1.

Cell sorting. Function-based sorting was carried out based on the Live/Dead Green uptake of A431 cells expressing OATP1B1, 1B3 or 2B1. 2–4 \times 10⁶ cells were incubated with 0.8–1.2 μ l Live/Dead Green in 100 μ l of transport buffer (sterile filtered), pH 5.5 at 37 °C for 30 minutes. The reaction was stopped by the addition of 1 ml

DMEM and the cells were centrifuged at 300 g for 4 minutes. The cell pellet was suspended in 500 μ l DMEM. Cellular fluorescence was analysed using a BD FACSAria III Cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, US). Cells with the highest fluorescence (see the applied gate (“LDG+”) on Fig. 2) were collected and cultured for further analysis. Cells kept in culture for maximum 20 passages were used for the experiments.

Western blot. Whole cell lysates of Sf9 or A431 cells (10–50 μ g) were separated on 7.5% Laemmli SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. Immunoblotting was performed as described in³⁶. Membranes were incubated overnight with OATP-specific antibodies or anti- β -actin antibody (A1978, Sigma). The antibodies used for the detection of OATP1B1 and 2B1 were kind gifts from Dr. Bruno Stieger (Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital, 8091 Zurich, Switzerland)⁵⁵. The antibody raised against OATP1B3 (AMAb91231) was purchased from Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden). Secondary antibodies used were 10,000–20,000x diluted, HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Luminescence was detected using the Luminor Enhancer Solution kit by Thermo Scientific (Waltham, MA, US).

Toxicity measurements. 5×10^3 A431 cells were seeded onto 96-well plates in a final volume of 100 μ l DMEM. The next day a transport assay was performed at sterile conditions using 0.4 or 1.6 μ l Live/Dead Green or Zombie Violet, respectively/ 5×10^5 cells in a 100 μ l final volume. After 30 minutes, the cells were washed twice with PBS. Finally, 200 μ l DMEM was added and the cells were cultured for 144 hours. Viability of the cells was determined using the PrestoBlue (Thermo Fischer Scientific) assay. Briefly, the medium was removed, and 100 μ l 5% PrestoBlue in PBS was added to the cells. After incubation for 60 minutes at 37 $^{\circ}$ C, absorbance was detected at 583 nm with an Enspire fluorimeter (Perkin Elmer). Cells incubated with the buffer alone served as control. Background signal was calculated by absorbance measured in empty wells filled with 5% PrestoBlue.

Data analysis and statistics. Z-factor was calculated as follows: $1 - ((3 \times SD_{\text{negative control}} + 3 \times SD_{\text{positive control}}) / (\text{Mean}_{\text{positive}} - \text{Mean}_{\text{negative}}))$ based on³⁷. Kinetic parameters of dye uptake or inhibition were analysed by Hill fit using the Origin 8.6 software. Statistical significance was calculated by Student's t-test. The p value for statistical significance was set at 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***)

Data availability. The datasets generated during the current study are available from the corresponding author.

References

- Roth, M., Obaidat, A. & Hagenbuch, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British journal of pharmacology* **165**, 1260–1287, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x> (2012).
- Hagenbuch, B. & Stieger, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Molecular aspects of medicine* **34**, 396–412, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.009> (2013).
- van de Steeg, E. *et al.* Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *The Journal of clinical investigation* **122**, 519–528, <https://doi.org/10.1172/JCI59526> (2012).
- Durmuss, S., van Hoppe, S. & Schinkel, A. H. The impact of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) on disposition and toxicity of antitumor drugs: Insights from knockout and humanized mice. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **27**, 72–88, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.06.005> (2016).
- Shitara, Y. *et al.* Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharmaceutics & drug disposition* **34**, 45–78, <https://doi.org/10.1002/bdd.1823> (2013).
- Maeda, K. Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin* **38**, 155–168, <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00767> (2015).
- Giacomini, K. M. *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 215–236, <https://doi.org/10.1038/nrd3028> (2010).
- Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A. P. & Sugiyama, Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 610–616, <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041921> (2003).
- Elsby, R., Hilgendorf, C. & Fenner, K. Understanding the critical disposition pathways of statins to assess drug-drug interaction risk during drug development: it's not just about OATP1B1. *Clin Pharmacol Ther* **92**, 584–598, <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.163> (2012).
- Campbell, S. D., de Morais, S. M. & Xu, J. J. Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chemico-biological interactions* **150**, 179–187, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.08.008> (2004).
- Keppler, D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metab Dispos* **42**, 561–565, <https://doi.org/10.1124/dmd.113.055772> (2014).
- Zollner, G. *et al.* Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**, 633–646, <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22646> (2001).
- Tamai, I. *et al.* Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 251–260, <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2922> (2000).
- Gong, I. Y. & Kim, R. B. Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response. *Drug Metab Pharmacokinet* **28**, 4–18, doi:DN/JST.JSTAGE/dmpk/DMPK-12-RV-099 (2013).
- Knauer, M. J. *et al.* Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins. *Circulation research* **106**, 297–306, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203596> (2010).
- Gao, B., Vavricka, S. R., Meier, P. J. & Stieger, B. Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* **467**, 1481–1493, <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1596-x> (2015).
- Lee, W. *et al.* Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* **280**, 9610–9617, <https://doi.org/10.1074/jbc.M411092200> (2005).

18. Yu, J., Zhou, Z., Tay-Sontheimer, J., Levy, R. H. & Ragueneau-Majlessi, I. Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. *Journal of pharmaceutical sciences* **106**, 2312–2325, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.004> (2017).
19. U.S. Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#major> (2017).
20. Huang, S. M., Zhang, L. & Giacomini, K. M. The International Transporter Consortium: a collaborative group of scientists from academia, industry, and the FDA. *Clin Pharmacol Ther* **87**, 32–36, <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.236> (2010).
21. Izumi, S. *et al.* Investigation of the impact of substrate selection on *in vitro* organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **43**, 235–247, <https://doi.org/10.1124/dmd.114.059105> (2015).
22. Shen, H. *et al.* Evaluation of rosuvastatin as an organic anion transporting polypeptide (OATP) probe substrate: *in vitro* transport and *in vivo* disposition in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **353**, 380–391, <https://doi.org/10.1124/jpet.114.221804> (2015).
23. Watanabe, T., Kusuhara, H., Maeda, K., Shitara, Y. & Sugiyama, Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **328**, 652–662, <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146647> (2009).
24. Bauer, M. *et al.* Influence of OATPs on Hepatic Disposition of Erlotinib Measured With Positron Emission Tomography. *Clin Pharmacol Ther*, <https://doi.org/10.1002/cpt.888> (2017).
25. Gribbon, P. & Sewing, A. Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain? *Drug discovery today* **8**, 1035–1043 (2003).
26. He, X., Gao, J., Gambhir, S. S. & Cheng, Z. Near-infrared fluorescent nanoprobe for cancer molecular imaging: status and challenges. *Trends in molecular medicine* **16**, 574–583, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.08.006> (2010).
27. Evers, R. *et al.* Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *British journal of cancer* **83**, 366–374, <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1260> (2000).
28. Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T. & Sarkadi, B. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS letters* **383**, 99–104 (1996).
29. Homolya, L. *et al.* Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **268**, 21493–21496 (1993).
30. Scharenberg, C. W., Harkey, M. A. & Torok-Storb, B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**, 507–512 (2002).
31. Nerada, Z. *et al.* Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* **89**, 826–834, <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22931> (2016).
32. Gui, C., Obaidat, A., Chaguturu, R. & Hagenbuch, B. Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3. *Current chemical genomics* **4**, 1–8, <https://doi.org/10.2174/1875397301004010001> (2010).
33. De Bruyn, T., Fattah, S., Stieger, B., Augustijns, P. & Annaert, P. Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Journal of pharmaceutical sciences* **100**, 5018–5030, <https://doi.org/10.1002/jps.22694> (2011).
34. Izumi, S. *et al.* Investigation of Fluorescein Derivatives as Substrates of Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 To Develop Sensitive Fluorescence-Based OATP1B1 Inhibition Assays. *Molecular pharmaceutics* **13**, 438–448, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00664> (2016).
35. Leuthold, S. *et al.* Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C570–582, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00436.2008> (2009).
36. Patik, I. *et al.* Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate. *Biochem Pharmacol* **98**, 649–658, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.09.015> (2015).
37. Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **4**, 67–73, <https://doi.org/10.1177/108705719900400206> (1999).
38. Yamaguchi, H. *et al.* Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Journal of lipid research* **47**, 1196–1202, <https://doi.org/10.1194/jlr.M500532-JLR200> (2006).
39. Annaert, P., Ye, Z. W., Stieger, B. & Augustijns, P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **40**, 163–176, <https://doi.org/10.3109/00498250903509375> (2010).
40. de Waart, D. R. *et al.* Hepatic transport mechanisms of cholesteryl-L-lysyl-fluorescein. *J Pharmacol Exp Ther* **334**, 78–86, <https://doi.org/10.1124/jpet.110.166991> (2010).
41. Bednarczyk, D. Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Analytical biochemistry* **405**, 50–58, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.06.012> (2010).
42. Kobayashi, D. *et al.* Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 703–708, <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051300> (2003).
43. Usuda, J. *et al.* Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. *Lung cancer* **67**, 198–204, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.04.002> (2010).
44. Karlgren, M. *et al.* Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 4740–4763, <https://doi.org/10.1021/jm300212s> (2012).
45. Izumi, S. *et al.* Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17 β -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein. *Drug Metab Dispos* **41**, 1859–1866, <https://doi.org/10.1124/dmd.113.052290> (2013).
46. Shirasaka, Y., Mori, T., Shichiri, M., Nakanishi, T. & Tamai, I. Functional pleiotropy of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 due to multiple binding sites. *Drug Metab Pharmacokinetics* **27**, 360–364 (2012).
47. Stieger, B. & Hagenbuch, B. Organic anion-transporting polypeptides. *Current topics in membranes* **73**, 205–232, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800223-0.00005-0> (2014).
48. Roth, M., Timmermann, B. N. & Hagenbuch, B. Interactions of green tea catechins with organic anion-transporting polypeptides. *Drug Metab Dispos* **39**, 920–926, <https://doi.org/10.1124/dmd.110.036640> (2011).
49. Grube, M. *et al.* Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol Pharmacol* **70**, 1735–1741, <https://doi.org/10.1124/mol.106.026450> (2006).
50. Pizzagalli, F. *et al.* Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 3902–3912, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030174> (2003).
51. Gal, Z. *et al.* Mutations of the central tyrosines of putative cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequences modify folding, activity, and sterol-sensing of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 477–487, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2014.11.006> (2015).
52. Liu, X. *et al.* Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. *Analytical biochemistry* **280**, 20–28, <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4478> (2000).
53. Kolacsek, O. *et al.* Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mobile DNA* **2**, 5, <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-5> (2011).

DOI:10.14753/SE.2021.2545

54. Tatrai, P. *et al.* Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **422**, 28–35, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.088> (2012).
55. Kullak-Ublick, G. A. *et al.* Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**, 525–533 (2001).
56. De Bruyn, T. *et al.* Confocal imaging with a fluorescent bile acid analogue closely mimicking hepatic taurocholate disposition. *Journal of pharmaceutical sciences* **103**, 1872–1881, <https://doi.org/10.1002/jps.23933> (2014).

Acknowledgements

We greatly appreciate the help of Dr. Bruno Stieger (Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital, 8091 Zurich, Switzerland) for providing the antibodies against OATPs. This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office (OTKA, grant number K 109423) and the Austrian Research Fund (FWF, grant number P 29712). É. B. and C. Ö-L. are recipients of the János Bolyai Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences. C. Ö-L was funded by the MedInProt program, G.S. was supported by the Momentum program of the Hungarian Academy of Sciences.

Author Contributions

Participated in research design: Szakács, Bakos, Özvegy-Laczka. Conducted experiments: Patik, Székely, Német, Bakos. Contributed new reagents or analytic tools: Szepesi, Várady, Kucsma. Performed data analysis: Patik, Özvegy-Laczka. Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Szakács, Özvegy-Laczka.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20815-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions

Virág Székely^{a,b}, Izabel Patik^a, Orsolya Ungvári^a, Ágnes Telbisz^c, Gergely Szakács^{a,d}, Éva Bakos^a, Csilla Özvegy-Laczka^{a,*}^a Membrane protein research group, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, H-1117 Budapest, Hungary^b Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, H-1085 Budapest, Hungary^c Biomembrane research group, Institute of Enzymology, RCNS, H-1117 Budapest, Hungary^d Institute of Cancer Research, Medical University Vienna, Borschkegasse 8a, 1090 Wien, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

OATP
MRP2
ABCG2
Fluorescent dye
Transcellular assay
Drug interaction

ABSTRACT

Detoxification in hepatocytes is a strictly controlled process, in which the governed action of membrane transporters involved in the uptake and efflux of potentially dangerous molecules has a crucial role. Major transporters of hepatic clearance belong to the ABC (ATP Binding Cassette) and Solute Carrier (SLC) protein families. Organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (encoded by the SLCO1B1 gene) is exclusively expressed in the sinusoidal membrane of hepatocytes, where it mediates the cellular uptake of bile acids, bilirubin, and also that of various drugs. The removal of toxic molecules from hepatocytes to the bile is accomplished by several ABC transporters, including P-glycoprotein (ABCB1), MRP2 (ABCC2) and BCRP (ABCG2). Owing to their pharmacological relevance, monitoring drug interaction with OATP1B1/3 and ABC proteins is recommended. Our aim was to assess the interaction of recently identified fluorescent OATP substrates (various dyes used in cell viability assays, pyranine, Cascade Blue hydrazide (CB) and sulforhodamine 101 (SR101)) (Bakos et al., 2019; Patik et al., 2018) with MRP2 and ABCG2 in order to find fluorescent probes for the simultaneous characterization of both uptake and efflux processes. Transport by MRP2 and ABCG2 was investigated in inside-out membrane vesicles (IOVs) allowing a fast screen of the transport of membrane impermeable substrates by efflux transporters. Next, transcellular transport of shared OATP and ABC transporter substrate dyes was evaluated in MDCKII cells co-expressing OATP1B1 and MRP2 or ABCG2. Our results indicate that pyranine is a general substrate of OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1, and we find that the dye Live/Dead Violet and CB are good tools to investigate ABCG2 function in IOVs. Besides their suitability for MRP2 functional tests in the IOV setup, pyranine, CB and SR101 are the first dual probes that can be used to simultaneously measure OATP1B1 and MRP2 function in polarized cells by a fluorescent method.

1. Introduction

The liver has a central role in the defense of the body against harmful compounds. Membrane transporters expressed in hepatocytes are key players in the elimination of potentially toxic compounds of endogenous or exogenous origin (Jetter and Kullak-Ublick, 2019). Na⁺- and ATP-independent uptake of bile acids, bilirubin, steroid hormones and several drugs from the blood into the liver is mediated by members of the Organic anion-transporting polypeptides family, OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1 (Dawson et al., 2009; Hagenbuch and Stieger, 2013). Conversely, following metabolism by hepatic enzymes,

modified compounds are effluxed from hepatocytes into the bile or back to the blood stream by the action of ABC (ATP Binding Cassette) transporters including P-glycoprotein (ABCB1), MRPs (ABCC family) and BCRP (ABCG2) (Kock and Brouwer, 2012). Coordinated action of hepatic OATPs and ABCs ensures efficient hepatobiliary elimination of their shared substrates.

OATP1B1, encoded by the SLCO1B1 gene is exclusively expressed in the sinusoidal membrane of hepatocytes (Konig et al., 2000), and is the most abundant OATP of the human liver (Badee et al., 2015; Kimoto et al., 2012; Prasad et al., 2014). OATP1B1 is an organic anion exchanger that mediates the cellular uptake of bile acids, bilirubin,

Abbreviations: CaAM, calcein acetoxy-methyl ester; CB, Cascade Blue hydrazide; DDI, drug-drug interaction; FMTX, fluorescein-methotrexate; IOV, inside-out membrane vesicles; LDV, Live/Dead Violet; LDG, Live/Dead Green; LY, Lucifer Yellow; SR101, sulforhodamine 101

* Corresponding author.

E-mail address: laczka.csilla@ttk.mta.hu (C. Özvegy-Laczka).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105395>

Received 6 December 2019; Received in revised form 27 April 2020; Accepted 25 May 2020

Available online 29 May 2020

0928-0987/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

thyroid and sex hormones, and also that of numerous clinically applied drugs (Roth et al., 2012). OATP1B1 is a site of drug-drug interactions (DDIs), inhibition of its function results e.g. in statin-induced myopathy (Link et al., 2008; Shitara, 2011; Shitara et al., 2003).

MRP2 (ABCC2) is expressed in the canalicular membrane of hepatocytes (Jedlitschky et al., 2006) where it mediates the active efflux of conjugated and unconjugated organic anions (e.g. bilirubin and steroid conjugates), and also the co-transport of uncharged molecules with glutathione into the bile (Konig et al., 1999). Mutations in OATP1B (SLCO1B) or MRP2 (ABCC2) genes both lead to increased serum bilirubin levels respectively termed as Rotor or Dubin Johnson syndrome, indicating that bilirubin elimination through the liver requires the function of OATP1B1/3 and MRP2 (van de Steeg et al., 2012) (Konig et al., 1999). Besides its endogenous substrates, MRP2 also recognizes various drugs (Jedlitschky et al., 2006). Hence, by mediating the extrusion of metabolites from hepatocytes into the bile, MRP2 plays a key role in the terminal phase of detoxification (Zhou et al., 2008).

Similarly to MRP2, BCRP (ABCG2) is also expressed in the canalicular membrane of hepatocytes (Horsey et al., 2016; Maliepaard et al., 2001) and is involved in the hepatobiliary excretion of various organic compounds (Hirano et al., 2005; Lee et al., 2015; Patel et al., 2016). ABCG2 is a genuine multidrug transporter, recognizing a plethora of chemically diverse molecules that includes chemotherapeutics, statins, anti-HIV drugs and antibiotics (Doyle et al., 1998; Horsey et al., 2016). Given its wide substrate recognition pattern, ABCG2 is also a site of DDI (Lee et al., 2015; Mao and Unadkat, 2015). ABCG2 transports several endogenous substrates such as urate, haem and estrogen conjugates (estradiol-glucuronide and estrone sulfate) (Heyes et al., 2018). The most common ABCG2 polymorphism c.421C>A (p.141Q>K, rs2231142) is associated with gout, due to the mislocalization of the protein (Matsuo et al., 2009; Woodward et al., 2009). Significantly, SNPs in ABCG2 have been correlated with the altered pharmacokinetics of statins and sulfasalazin (Giacomini and Huang, 2013; Heyes et al., 2018). Thus, MRP2, ABCG2 and OATP1B1 have overlapping substrate specificities. They are important determinants of hepatobiliary excretion of various drugs, including chemotherapeutics, statins and anti-HIV agents (Giacomini et al., 2010; Hooijberg et al., 1999; Kitamura et al., 2008; Liu et al., 2010; Roth et al., 2012). Therefore co-administration of their substrates can lead to serious side effects, underlying the relevance of these transporters as sites of DDIs. Hence, according to the recommendations of the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA), interactions with OATP1B1/3 and ABCG2 (and also potentially with MRP2) should be assayed during drug development. FDA and EMA regulations require the use of sensitive and reliable functional assays for the evaluation of transporter drug interactions (Giacomini et al., 2013).

Radioactively labeled substrates, such as bromosulphophtalein, leukotriene C₄, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), estrone-3-sulfate (E1S) or estradiol-17 β -D-glucuronide (E217G) have been repeatedly used for the characterization of OATP and ABC transporter function and for the study of DDIs (Cui et al., 2001; Hirouchi et al., 2009; Liu et al., 2006; Matsushima et al., 2005). In general, a limitation of the radioligand transport assays is the cost associated with the radiolabeling of the substrates. Fluorescence assays offer a cost effective alternative, and it was shown that fluorescent probe substrates provide an effective and sensitive means to investigate transporter function and drug-transporter interactions (Szakacs et al., 2008). Since the discovery of Calcein-AM to probe P-glycoprotein and MRP function more than two decades ago (Hollo et al., 1994), the list of fluorescent MRP2 substrates has expanded (Cantz et al., 2000; Notenboom et al., 2005; Prevoo et al., 2011; Siissalo et al., 2009). Similarly, fluorescent dye substrates of ABCG2 (Hoechst, DyeCycle Violet) have long been used to investigate its function or drug interactions (Mathew et al., 2009; Ozvegy et al., 2002). Whereas the study of the efflux function of ABC transporters requires the use of dyes that can accumulate in the cells (high passive uptake) (Szakacs et al., 2008), ideal test substrates

measuring OATP function are cell impermeable (Bednarczyk, 2010; Gui et al., 2010; Kovacsics et al., 2017; Patik et al., 2018; Yamaguchi et al., 2006).

To date, fluorescent probes allowing the simultaneous investigation of OATP1B1 and the hepatic ABC transporters have not been identified. The goal of the current work was to analyze the interaction of fluorescent OATP1B1 substrates with MRP2 and ABCG2 in order to find dual OATP ABC transporter probes. Our earlier work has identified Zombie Violet (ZV), Live/Dead Violet (LDV), Live/Dead Green (LDG), Cascade Blue hydrazide (CB), Alexa Fluor 405 (AF405) (Patik et al., 2018), and recently SR101 (sulforhodamine 101) (Bakos et al., 2019) as novel fluorescent substrates of OATP1Bs. We have also shown that CB and AF405 can be applied as probes in OATP1B1/3 or OATP2B1 drug interaction tests (Patik et al., 2018). Since these OATP probes are cell-impermeant, their transport by ABCG2 or MRP2 cannot be directly investigated in cellular assays. However, transporter-mediated accumulation of the same dyes can be measured in inside-out vesicles (IOVs). Because of the reverse orientation of the membrane lipid bilayer and the efflux transporters, ATP-dependent uptake of a substrate into IOVs corresponds to cellular efflux, allowing the measurement of the transport of cell impermeable dyes by ABC efflux transporters. Using this experimental setup, we show that several cell-impermeable fluorescent substrates are indeed transported by MRP2 and ABCG2. Theoretically, cellular efflux may be measured if the accumulation of the cell impermeable dyes was facilitated by uptake transporters. Using double-transfected, polarized MDCKII cells overexpressing OATP1B1 and MRP2 or ABCG2, we identify dual OATP1B1 and MRP2 fluorescent probes, setting the stage for a fluorescence-based assay development measuring vectorial transport mediated by these transporters.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Zombie Violet was purchased from BioLegend® (San Diego, CA, US). LIVE/DEAD® Fixable Cell Stain Dyes (Violet and Green), fluorescein-methotrexate and Cascade Blue hydrazide were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US). All other materials, if not indicated otherwise, were from Sigma Aldrich, Merck (Budapest, HU).

2.2. Generation of cell lines and cell culturing

A431 cells expressing OATPs 1B1, 1B3 or 2B1 and their mock transfected counterparts were generated previously as described in Patik et al. (2018). The MDCKII-MRP2 cell line was generated previously (Bakos et al., 2000). In order to generate MDCKII cells expressing ABCG2, MDCKII parental cells were transfected with 1 μ g plasmid DNA (pSB-CMV-ABCG2, allowing transposon mediated genomic insertion of ABCG2 cDNA (Saranko et al., 2013)) and 100 ng plasmid containing the 100x Sleeping Beauty transposase using Lipofectamine 2000® reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the recommendation of the manufacturer. After 48 hours the transfection medium was removed and the cells were selected in puromycin (1 μ g/ml) for two weeks. Transfected cells were sorted based on labeling by the anti-ABCG2 monoclonal antibody 5D3 (Bioscience), which binds to a surface epitope (Ozvegy et al., 2002). Cells showing 5D3 positivity were sorted using a BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, US).

OATP1B1 expression in MDCKII, MDCKII-MRP2 or MDCKII-ABCG2 cells was achieved by recombinant lentiviruses as described earlier (Patik et al., 2018). Briefly, MDCKII parental, MDCKII-MRP2 and MDCKII-ABCG2 cells were transfected with the pRRL-CMV-OATP1B1-MCS-IRES- Δ CD4 vector. In order to generate mock transfected control cells for transport experiments, MDCKII cells were transfected with the pRRL-EF1- Δ CD4 vector. Transduced cells were sorted based on their CD4 positivity using a BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, San

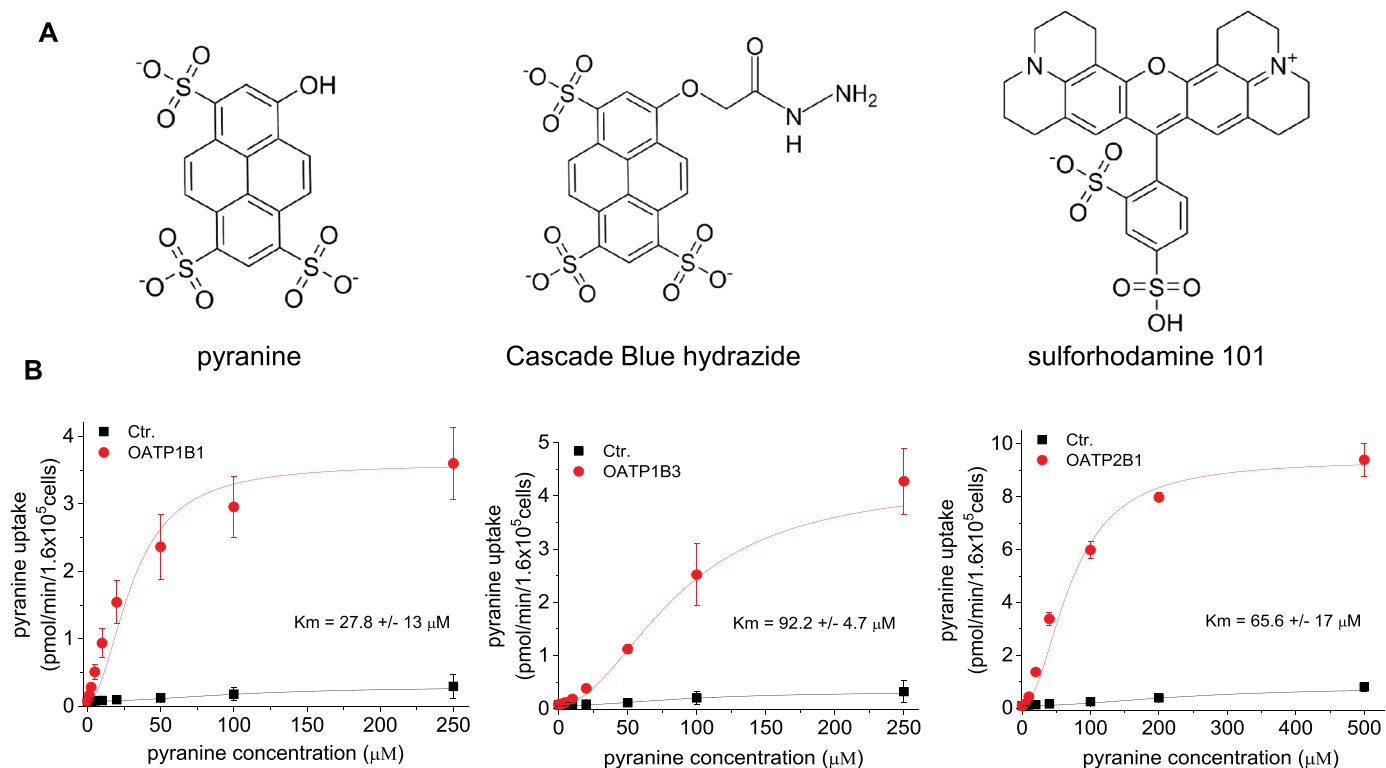


Fig. 1. A) Structure of the dyes tested in the current study. B) Pyranine is a novel substrate of OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1. Concentration dependent uptake of pyranine was measured in A431 cells overexpressing OATP1B1, OATP1B3 or OATP2B1, or mock transfected controls (Ctr.) seeded onto 96-well plates at 37°C in the linear phase of transport, at 10 (OATP1B1) or 15 (OATP1B3 and OATP2B1) minutes at pH 5.5. Fluorescence was determined using an Enspire plate reader (Ex/Em: 403/517 nm). Transport kinetics was determined by subtracting fluorescence measured in mock transfected cells. Average \pm SD values of at least 3 independent measurements are shown.

Jose, CA, US). OATP1B1 overexpressing cells were sorted based on their increased Live/Dead Green uptake, as described earlier (Patik et al., 2018).

A431 and MDCKII cells were grown in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)) completed with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂, under sterile conditions.

2.3. Western blot

MDCKII cell lysates were separated on 7.5% Laemmli SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. Immunoblotting was performed as described (Sarkadi et al., 1992). Membranes were incubated overnight with anti-OATP1B1, anti-MRP2 (M₂-I-4 / M₂-III-6 monoclonal antibody) (Bakos et al., 2000) or anti-ABCG2 (BXP-21, Maliepaard et al., 2001) antibodies or anti-β-actin antibody (A1978, Sigma). The antibody used for the detection of OATP1B1 was a kind gift from Dr. Bruno Stieger (Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital, 8091 Zurich, Switzerland) (Kullak-Ublick et al., 2001). Secondary antibodies were HRP-conjugated anti-rabbit (OATP1B1) or anti-mouse (MRP2, ABCG2, β-actin) antibodies (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) in a dilution of 20,000x. Luminescence was detected using the Luminor Enhancer Solution kit by Thermo Scientific (Waltham, MA, US).

2.4. MRP2 and ABCG2 expression in insect cells and inside-out membrane vesicle preparation

Recombinant baculovirus containing the ABCG2/MRP2 cDNA (Bakos et al., 2000), ABCG2 cDNA (Ozvegy et al., 2002) or the cDNA of an unrelated protein (Patik et al., 2015) were used to achieve transient expression in *Sf9* insect cells. Culturing and infection of *Sf9* cells was

performed as described earlier (Sarkadi et al., 1992). Virus-infected *Sf9* cells were harvested after 72 hours. Following washing with Tris-mannitol buffer (50 mM Tris, pH 7.0, with HCl, 300 mM mannitol and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), cells were lysed and homogenized in TMEP (50 mM Tris, pH 7.0, with HCl, 50 mM mannitol, 2 mM EGTA, 10 μg/ml leupeptin, 8 μg/ml aprotinin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 2 mM dithiothreitol) using glass tissue grinder tubes. Undisrupted cells were removed by centrifugation for 10 min at 500 g. Finally, the supernatant containing the membranes was centrifuged for 1 h at 100 000 g, and the pellet was resuspended in TMEP (with freshly appended 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) at concentration of 5-10 mg/ml. Membranes were stored at -80°C in aliquots. (Bakos et al., 2000; Sarkadi et al., 1992). In the case of ABCG2 cholesterol enriched membranes IOVs were prepared in order to achieve maximal ABCG2 activity (Telbisz et al., 2007). Cholesterol loading was performed by incubation of the membranes (containing ABCG2 or their controls) with TMEP containing 2 mM Cholesterol-RAMEB (Cyclolab, Hungary) on ice for 30 minutes, prior to the final centrifugation step (Telbisz et al., 2007).

2.5. Transport measurements in inside-out vesicles

Membrane vesicles (50 μg/tube) were incubated in transport buffer (Bakos et al., 2000) with 4 mM MgATP or 4 mM MgAMP and with the fluorescent dyes 1 μM sulforhodamine 101 (SR101)/fluorescein-methotrexate (FMTX), 5 μM pyranine/Cascade Blue (CB), 10 μM Lucifer Yellow (LY) or 0.2 μl/tube ZV/LDV/LDG for 10 (ZV/LDV/LDG/FMTX/SR101/LY) / 20 (pyranine) / 30 (CB) minutes in 150 μl final volume at 37°C. These experimental conditions were evaluated by measuring time- and concentration dependent transport of the fluorescent dyes in preliminary experiments. For each compound, time and concentration values yielding the highest signal/noise ratio measured were chosen.

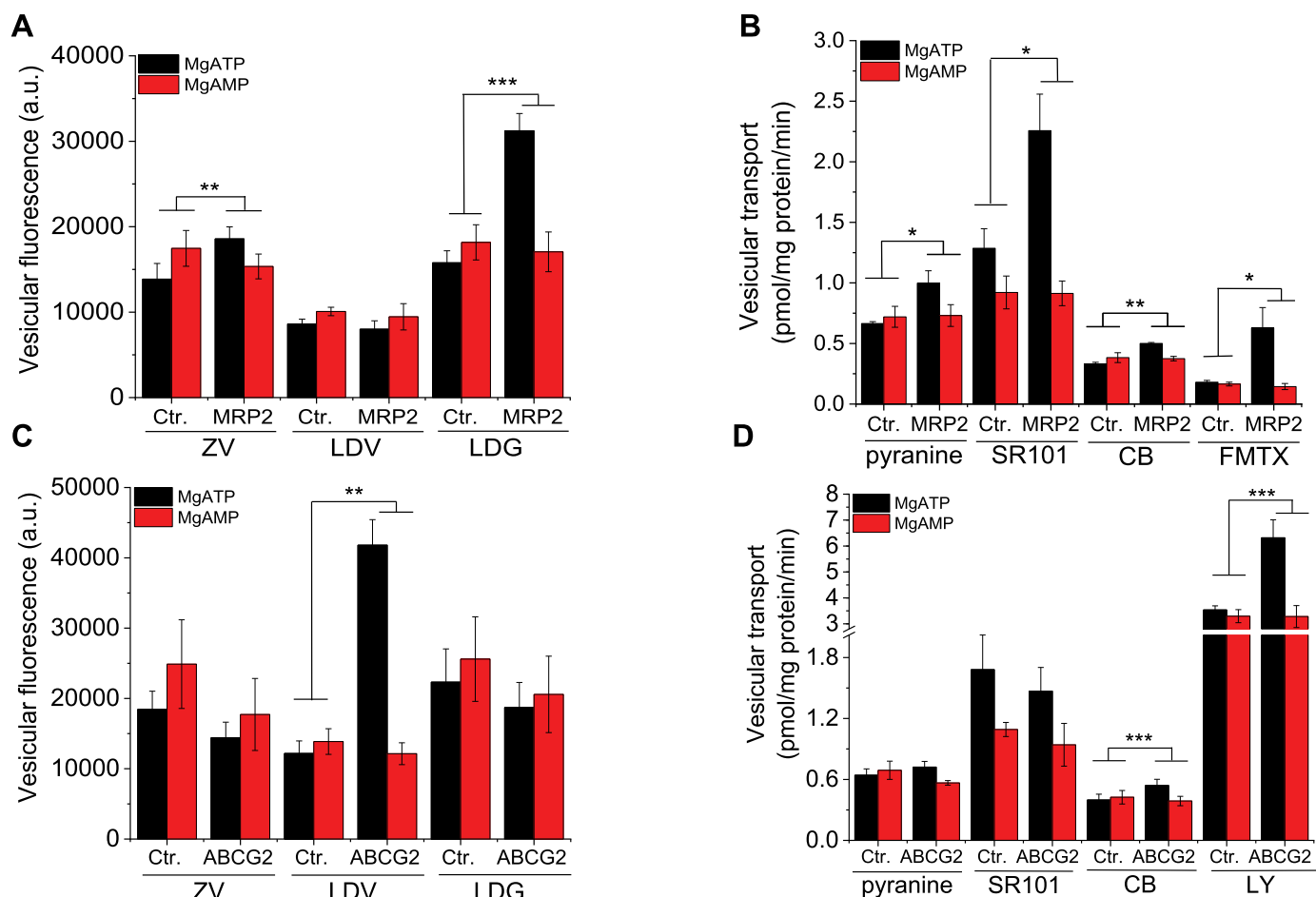


Fig. 2. Fluorescent dye transport measurements in inside-out membrane vesicles. Uptake of the fluorescent dyes, ZV, LDV and LDG (0.2 μ l/sample), 5 μ M CB, 5 μ M pyranine, 1 μ M SR101, 1 μ M FMTX or 10 μ M LY in MRP2- (panels A, B) or ABCG2- (panels C, D) containing or control membrane vesicles (50 μ g) was measured for 30 minutes (CB), 20 minutes (pyranine) or 10 minutes (ZV, LDV, LDG, SR101, FMTX, LY) in the presence of 4 mM MgATP or 4 mM MgAMP at 37°C. Experiments were repeated 3-times. Average of at least 3 independent replicates \pm SD are shown. Statistical significance was calculated between ATP-dependent signals. Delta values generated by subtracting signals with MgAMP from that measured with MgATP were compared for statistical significance by Student's t-test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

When inhibition was investigated, the vesicles were pre-incubated with 1 μ M Ko143, a known ABCG2 inhibitor (Allen et al., 2002) prior to the addition of the fluorescent dyes. Reaction was stopped by the addition of 550 μ l ice cold transport buffer and by placing the samples on ice. Eppendorf tubes were centrifuged for 5 min at 22000 g. Supernatant was eliminated and the pellet was suspended in 200 μ l RT (room temperature) 1 x Phosphate Buffered Saline (PBS). The suspensions were pipetted onto 96 well plates and fluorescence intensity was measured in an Enspire Fluorescent plate reader (Perkin Elmer) at the following wavelengths: 405/423 nm (ZV), 416/451 nm (LDV), 495/520 nm (LDG), 403/517 nm (pyranine), 400/419 nm (CB), 586/605 nm (SR101), 428/540 nm (LY), 497/516 nm (FMTX). Transport activity in the case of CB, pyranine, LY, SR101 and FMTX was determined based on a calibration curve.

2.6. Transport measurements in MDCKII cells by flow cytometry

MDCKII cells were collected following trypsinization (0.2% trypsin) in complete DMEM. After washing in 1 ml uptake buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 12 mM MgSO_4 , 25 mM MES, and 5.6 mM glucose, with the pH adjusted to 5.5/7.4 using 1 M HEPES and 10 N NaOH for OATP/ABC function, respectively), 5×10^5 cells were incubated at 37°C for 10 min (calcein-AM (CaAM)) / 30 min (CB, DCV (DyeCycle Violet)) in 100 μ l fluorescent dye (final concentrations: 0.5 μ M CaAM, 1-1 μ M CB or DCV) diluted in the

appropriate buffer. CB/CaAM/DCV were used as substrates of OATP1B1/MRP2/ABCG2 for validating functionality. The reaction was stopped by the addition of 700 μ l ice-cold 1 x PBS, and the samples were kept on ice until the flow cytometry analysis. Cellular fluorescence was determined of at least 20,000 living cells from each sample using an Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US).

2.7. OATP-mediated transport of pyranine using a microplate-based transport assay

Uptake of pyranine in A431 cells overexpressing OATPs 1B1, 1B3 or 2B1 was measured as described previously (Patik et al., 2018). Briefly, A431 cells (8×10^4 /well) were seeded on 96-well plates in 200 μ l DMEM one day prior to the transport measurement. Next day the medium was removed, and the cells were washed three times at room temperature with 1 x Phosphate Buffered Saline (PBS). The cells were pre-incubated with 50 μ l uptake buffer (see above) at 37°C. The reaction was started by the addition of 50 μ l uptake buffer containing increasing concentrations of pyranine. Cells were then incubated at 37°C for 10 minutes (OATP1B1) or 15 minutes (OATP1B3 and OATP2B1). The applied incubation time was evaluated during previous unpublished data. The reaction was stopped by removing the supernatant and washing the cells three times with ice-cold 1 x PBS. Wells were loaded with 200 μ l ice-cold 1 x PBS and fluorescence was determined

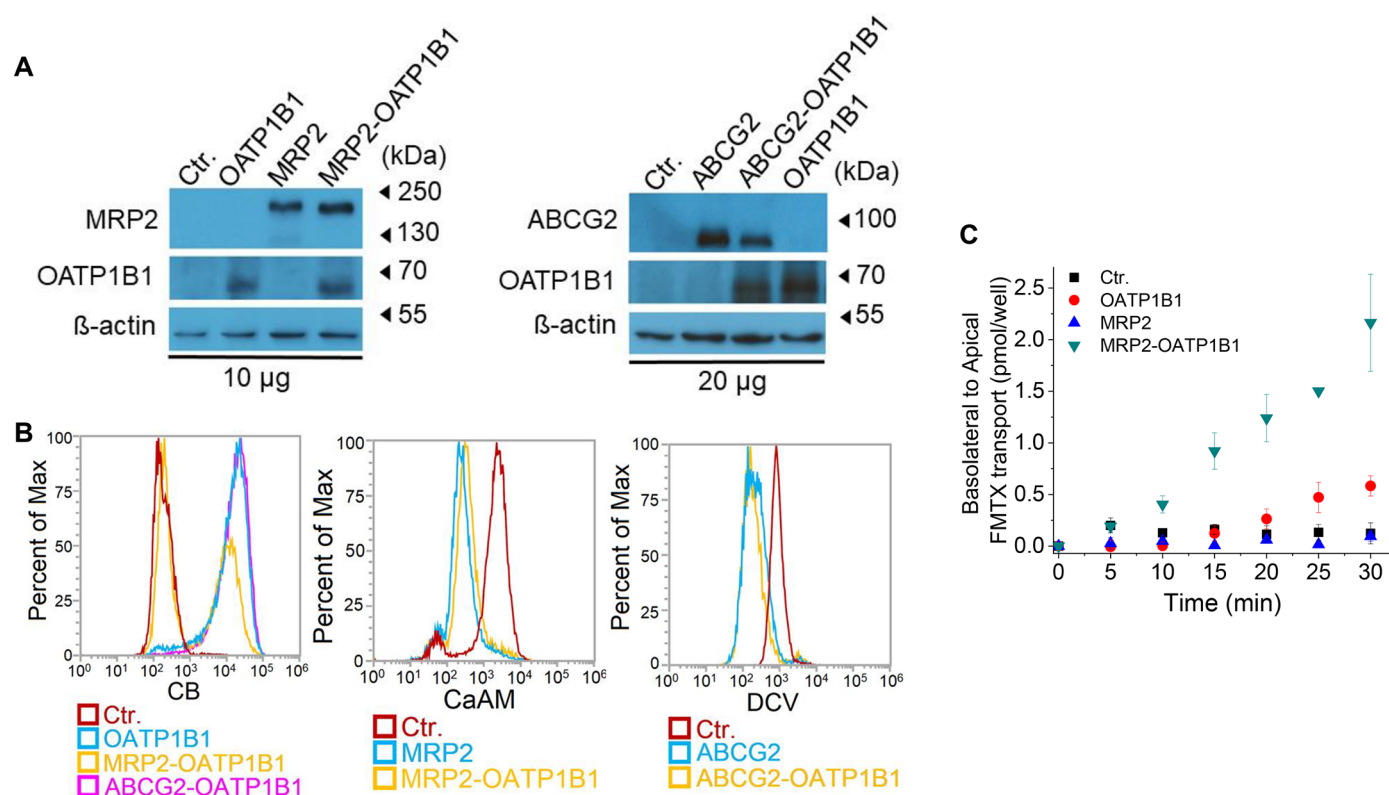


Fig. 3. Expression and function of OATP1B1, MRP2 or ABCG2 in the MDCKII cell lines. 3A: 10 or 20 µg of total cell lysates were analyzed for transporter expression by Western blot. Signals of OATP1B1/MRP2/ABCG2/β-actin were visualized by the antibodies raised against these proteins. Transporter expression is equally present for OATP1B1/MRP2/ABCG2 among the appropriate cell lines. β-actin signals verified the equal amount of proteins in the samples tested. Experiments were repeated at least 3-times. The result of one representative experiment is shown. 3B: Transporter function of OATP1B1, MRP2 or ABCG2 in MDCKII cell lines. Functionality of the transporters OATP1B1, MRP2 or ABCG2 was determined based on the transport of CB, CaAM or DCV substrates, respectively. 5×10^5 MDCKII cells were incubated at 37°C for 10 min (CaAM)/30 min (CB, DCV) in 100 µl fluorescent dye (final concentrations: 0.5 µM CaAM, 1-1 µM CB or DCV) diluted in the appropriate buffer (pH 5.5/7.4 for OATP/ABC function). Cellular fluorescence was determined of at least 20,000 living cells from each sample using an Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US). Transport measurements were repeated at least 3-times. One representative experiment is shown. 3C: Transcellular transport of fluorescein-methotrexate: Basolateral to apical transcellular transport of FMTX (1 µM) in MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-MRP2-OATP1B1 or control (Ctr., mock transfected) cells grown on transwell inserts for 4 days prior to the experiment was followed for 30 minutes at 37°C. Average of 3 independent measurements \pm SD are shown.

using an Enspire plate reader Ex/Em: 403/517 nm. OATP-dependent transport was determined by extracting fluorescence measured in mock transfected cells. Transport activity was calculated based on a calibration curve. Experiments were repeated in 3 biological replicates.

2.8. Transcellular transport measurements

For transcellular transport experiments, OATP1B1 and/or MRP2 or ABCG2 overexpressing MDCKII cells (9×10^4 cells/insert) were grown on Tissue culture plate inserts (6.5 mm diameter, 0.4 µm pore size, VWR Ltd., Hungary) for four days. The cells were seeded in 300 µl complete DMEM onto the insert membranes and 1 ml media was added to the wells around the inserts in 24 well plates. The transport measurement was started by the removal of the medium from the transwell inserts and by washing the cells two times with 300 µl pH 7.4 uptake buffer (see above). The wells were washed three times with 1 ml pH 5.5 uptake buffer (see above). After washing, 300 µl pH 7.4 buffer was pipetted into the inserts containing the cells and 1 ml pH 5.5 buffer into the wells and a 10 min pre-incubation period at 37°C was applied. The reaction was started by the addition of 1 ml uptake buffer pH 5.5 (ensuring higher OATP1B1 transport (Patik et al., 2018)) containing pyranine, CB, SR101, or FMTX (final concentrations 5-5 µM and 1-1 µM respectively) to the wells, and the tissue culture plates were further incubated at 37°C. When inhibitors were tested, 10 µM cyclosporin A (CsA) or 40 µM benzbramarone was added to the lower or upper

compartment, respectively. To determine transport, 30 µl samples from the upper compartment were collected every 5 minutes and pipetted into 70 µl 1 x PBS for fluorescence measurements. In the case of MDCKII-ABCG2-OATP1B1 cells, CB transport was determined at the following time points: 0, 15 and 30 minutes. The fluorescence intensity of the samples was determined using an Enspire plate reader (Perkin Elmer) at the following wavelengths: 403/517 nm (pyranine), 400/419 nm (CB), 586/605 nm (SR101), or 497/516 nm (FMTX).

In order to evaluate the transport in the opposite direction (A-B), transport reaction was started from the apical side by adding the substrates at the same concentration as applied before but in 300 µl pH 7.4 buffer. Samples were collected from the wells (B side) to a 96 well plate, 100 µl at each time points until 25 minutes and fluorescence intensity was determined as described before.

For evaluating intracellular accumulation of pyranine, transport reaction in B-A direction was stopped after 30 minutes by removing the solutions from the wells and inserts and washing the cells three times with cold 1 x PBS on ice. Transwell inserts were then cut out and placed into 200 µl 1% Triton-PBS in Eppendorf tubes. Inserts were incubated at RT for 75 minutes, and then cell lysates were pipetted onto 96 well plates. Fluorescence intensity was determined using an Enspire plate reader as described above, Ex/Em: 403/517. In order to define the amount of the dyes in the samples, a calibration curve was generated by determining the fluorescence of increasing amounts of the given dye dissolved in 200 µl 1 x PBS. We found that fluorescence of the dyes

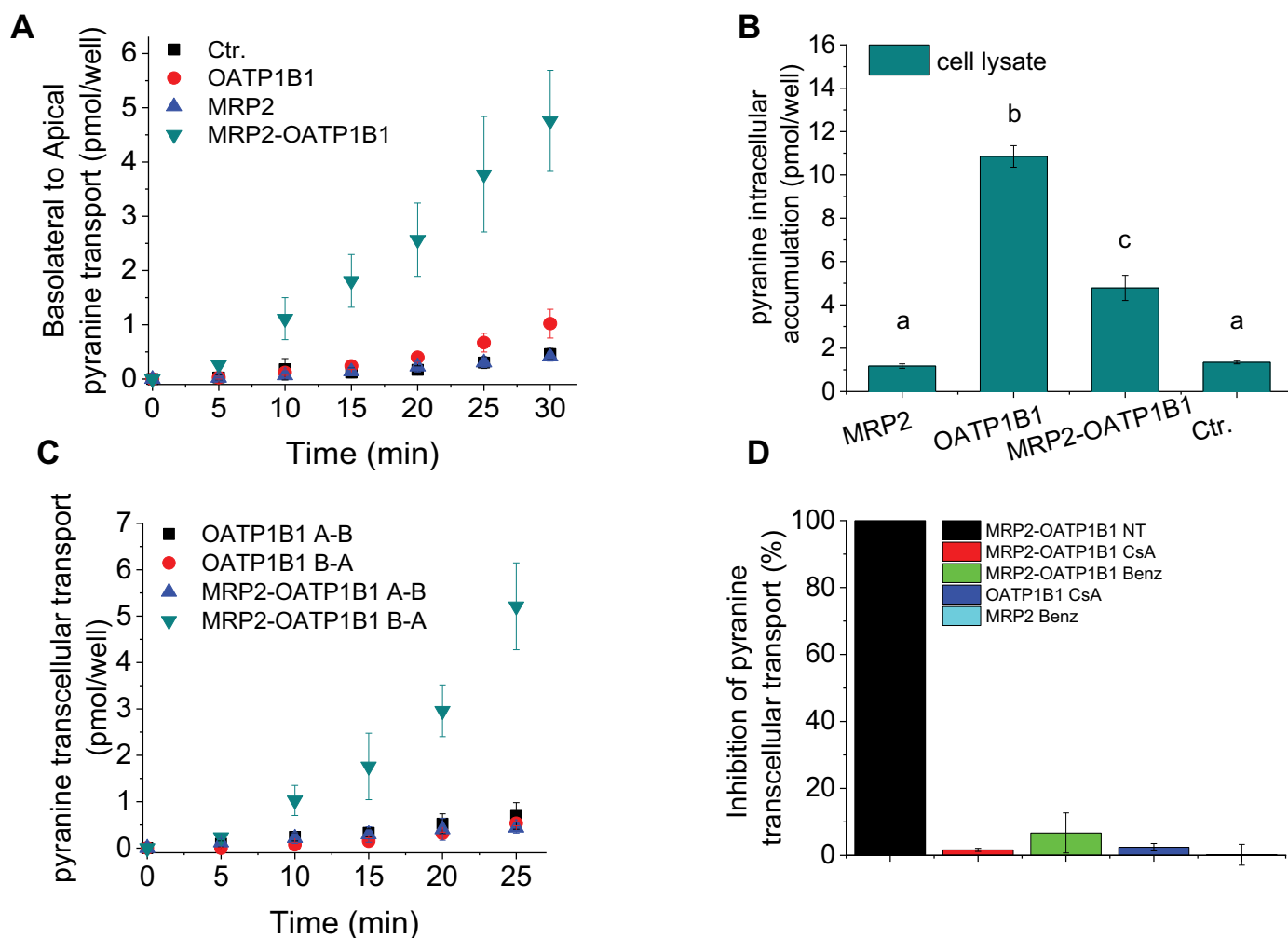


Fig. 4. Transcellular transport of pyranine. 4A: Basolateral to apical transport of pyranine (5 μM) in MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-MRP2-OATP1B1 or control (Ctr., mock transfected) cells grown on transwell inserts for 4 days prior to the experiment was followed for 30 minutes at 37°C. Average of 5 independent measurements \pm SD are shown. 4B: Intracellular levels of pyranine were determined in MDCKII cells after 30 minutes of incubation with 5 μM pyranine administered from the basolateral side of the transwells. Average of 3 independent measurements \pm SD are shown. Statistical analysis for multi comparison was evaluated by Tukey-Kramer HSD (Honest Significant Differences) procedure, as a post-hoc test, after rejecting H_0 in One-Way ANOVA ($\alpha=0.05$). Means \pm SD marked with the same letter ("a" for Ctr. and MRP2) were not significantly different ($p > 0.05$, Tukey-Kramer HSD test) from each other unlike "b" and "c" which mean significant difference. 4C: Lack of apical to basolateral transport of pyranine. Experiments were performed with pyranine (5 μM) added either to the apical or the basolateral compartment and samples were taken from the basolateral (A-B) or the apical compartment (B-A), respectively until 25 minutes. Average of 3 independent measurements \pm SD are shown. 4D: Inhibition of pyranine transcellular transport by cyclosporin A (CsA) or benzbromarone (Benz). Transcellular (B-A) transport of 5 μM pyranine can be inhibited by known OATP1B1 and MRP2 inhibitors, CsA and Benz. Vectorial transport was measured as described at Fig. 4A, except that 10 μM CsA or 40 μM benzbromarone was added to the basolateral or apical compartment, respectively prior to the addition of pyranine (5 μM). Fluorescence of pyranine was measured using an Enspire plate reader at Ex/Em 403/517 nm. Data obtained from 3 independent experiments \pm SD values are presented as a percent of transport measured in MDCKII-MRP2-OATP1B1 cells without any inhibitor (NT).

(pyranine, CB and SR101) diluted in PBS or accumulated in cells remained stable even after 90 minutes of incubation at room temperature (data not shown).

2.9. Data analysis and statistics

Kinetic parameters shown in Fig. 1B of dye uptake were analyzed by Hill1 fit using the OriginPro 8 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was calculated by Student's t-test between ATP-dependent signals. Delta values were generated by subtraction of MgAMP or MgAMP + Ko signals from MgATP or MgATP + Ko signals, respectively. These delta values were compared for statistical significance by Student's t-test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (Figs. 2, 6).

Statistical analysis of the samples shown in Fig. 4B for multi comparison was evaluated by Tukey-Kramer HSD (Honest Significant

Differences) procedure, as a post-hoc test, after rejecting H_0 in One-Way ANOVA ($\alpha=0.05$). Samples marked with the same letter ("a" for MRP2 and Ctr.) were not significantly different from each other.

3. Results

3.1. Pyranine is a novel substrate of hepatic OATPs, 1B1, 1B3 and 2B1

To expand the scope of fluorescent OATP substrates, we evaluated the interaction of pyranine (HPTS, Solvent Green 7, trisodium 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate), a pH indicator closely related to Cascade Blue hydrazide (CB) (Avnir and Barenholz, 2005; Clement and Gould, 1981; Gan et al., 1998) (Fig. 1) with OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1. Measurements were carried out using A431 cells over-expressing OATP1B1, OATP1B3 or OATP2B1. Whereas pyranine does not accumulate in control, mock transfected A431 cells (Fig. 1B), we

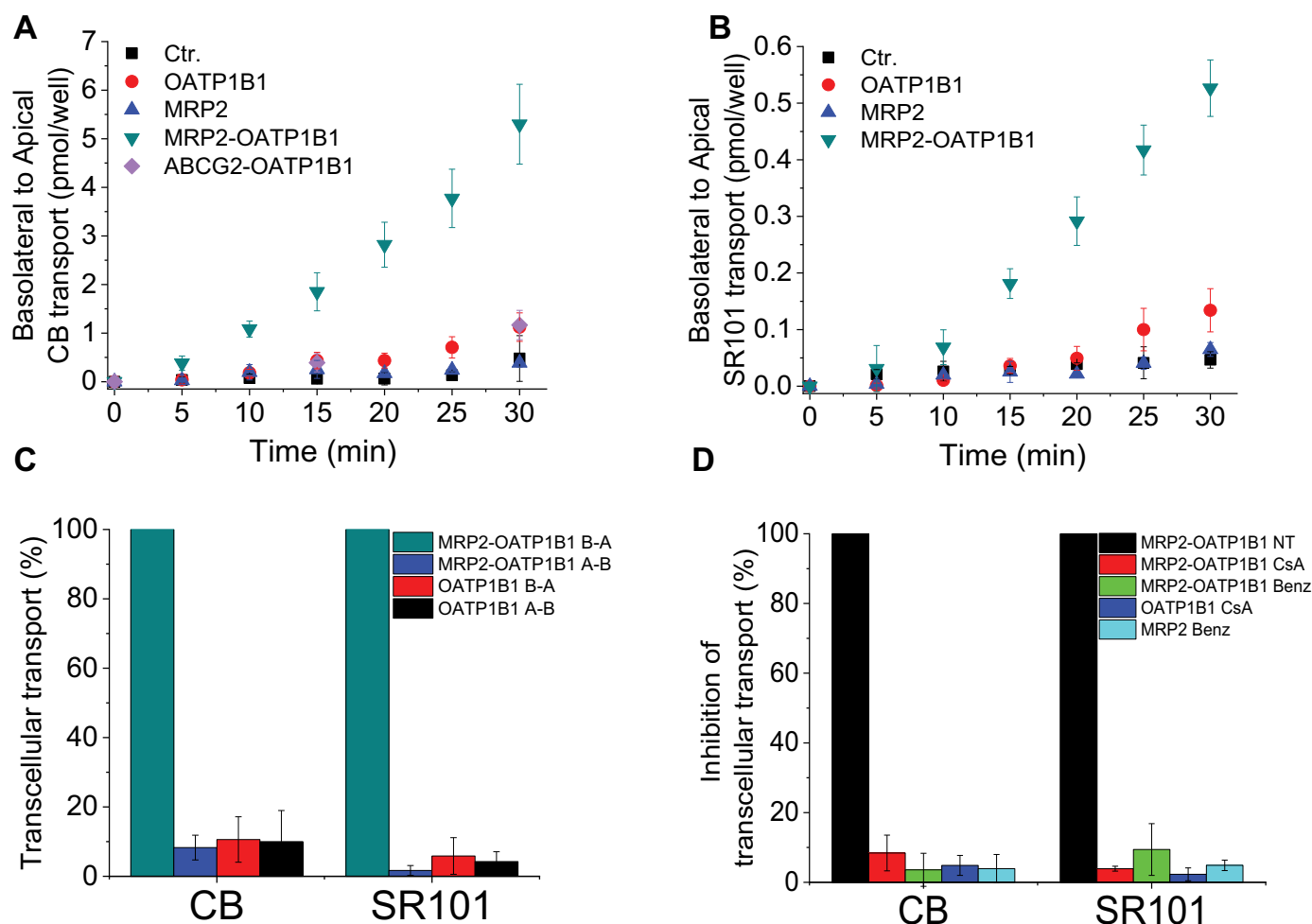


Fig. 5. Transcellular transport of Cascade Blue hydrazide or sulforhodamine 101. Basolateral to apical transport of CB (5 μ M, panel A) or SR101 (1 μ M, panel B) in MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-MRP2-OATP1B1, MDCKII-ABCG2-OATP1B1 (panel A) or control (Ctr., mock transfected) cells grown on transwell inserts for 4 days prior to the measurement was followed for 30 minutes at 37°C. Average of 4 independent measurements \pm SD are shown for MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-MRP2-OATP1B1 and Ctr. cells on panel A, and average of 3 independent measurements \pm SD are shown for MDCKII-ABCG2-OATP1B1 cells (panel A) and on panel B. 5C: Lack of apical to basolateral (A-B) transport of the fluorescent dyes. Experiment was performed on MDCKII cells grown on transwell inserts for 4 days prior to the measurement. CB (5 μ M) or SR101 (1 μ M) were added to the apical (A-B transport) or basolateral (B-A transport) compartment and after 25 minutes of incubation at 37°C samples were taken from the basolateral (A-B transport) or apical (B-A transport) compartment, and fluorescence was determined. Data are shown as a percent of B-A transport measured in MDCKII-MRP2-OATP1B1 cells. Average of 3 independent measurements \pm SD are shown. 5D: Inhibition of CB or SR101 transcellular transport. Transcellular (B-A) transport of 5 μ M CB or 1 μ M SR101 can be inhibited by known OATP1B1 and MRP2 inhibitors, cyclosporin A (CsA) and benzbromarone (Benz). Vectorial transport was measured as described at Fig. 4A, except that 10 μ M CsA or 40 μ M benzbromarone was added to the basolateral or apical compartment, respectively prior to the addition of the dyes 5 μ M CB or 1 μ M SR101. Data represent average \pm SD values of 3 independent experiments and are presented as a percent compared to the B-A transport measured in MDCKII-MRP2-OATP1B1 cells (NT).

found a typical OATP-mediated uptake in A431 cells expressing a hepatic OATP (Fig. 1B) revealing that pyranine is a common substrate of these uptake transporters.

3.2. Identification of novel common fluorescent substrates of OATP1B1, MRP2 and ABCG2

Hepatic OATPs and MRP2 or ABCG2 have an overlapping substrate recognition profile (Giacomini et al., 2010). To characterize the susceptibility of fluorescent OATP probes to MRP2 or ABCG2 mediated transport, we used inside-out membrane vesicles prepared from *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) cells overexpressing either MRP2 or ABCG2 (Fig. 2). IOVs allow the investigation of the transport of membrane impermeable substrates by efflux transporters that otherwise, in the lack of passive uptake, could not be investigated in cell-based assays with single transfectants. IOVs prepared from mock transfected *Sf9* cells, as well as transport in the presence of MgAMP served as negative controls for transport experiments. On the other hand, Lucifer Yellow

(LY) and fluorescein-methotrexate (FMTX), documented substrates of ABCG2 or MRP2 (Deng et al., 2016; Notenboom et al., 2005; Prevoe et al., 2011; Sjostedt et al., 2017), respectively, were used as positive controls. As shown in Fig. 2A and B, ATP-dependent transport by MRP2 was observed for FMTX, ZV, LDG, CB, SR101 and pyranine, while LDV was not transported. Although uptake of the known substrate LY indicated functionality of ABCG2, transport of ZV, LDG, pyranine or SR101 by ABCG2 was not detected. On the other hand, we observed significant transport of LDV and a weak transport of CB by ABCG2. A weak ATP-dependent transport of SR101 was also present in control vesicles (Fig. 2B and D). To reveal the nature of the SR101 uptake observed in control vesicles, transport was measured using EDTA as a Mg²⁺ chelator or Na-orthovanadate as a general ATP-ase inhibitor. These experiments showed a Mg²⁺-dependent and Na-orthovanadate sensitive transport of SR101, confirming the involvement of a yet undefined insect transporter in SR101 transport (Supplementary Figure S1).

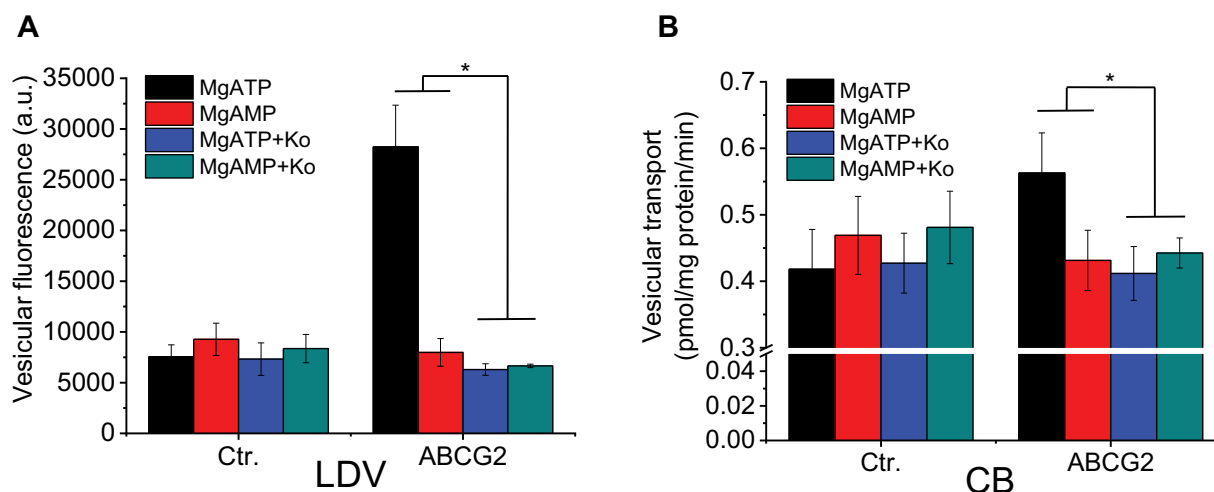


Fig. 6. Inhibition of LDV (panel A) or CB (panel B) uptake in IOVs containing ABCG2. Membrane vesicles (50 μ g) were incubated in the presence or absence of 1 μ M Ko143 for 5 minutes at 37°C. Transport reaction was started by the addition of 0.2 μ l LDV/tube or 5 μ M CB. Fluorescence after 10 minutes (LDV) or 30 minutes (CB) of incubation was determined using an Enspire plate reader. Experiments were repeated 3-times. Average \pm SD values are shown. Statistical significance was calculated between ATP-dependent signals. Delta values generated by subtracting MgAMP or MgAMP + Ko signal from the signal of MgATP or MgATP + Ko, respectively were compared for statistical significance by Student's t-test, *: $p < 0.05$.

3.3. Transcellular transport of pyranine, a novel common substrate of OATP1B1 and MRP2

In order to test whether the newly identified dual fluorescent substrates can indeed be applied for the simultaneous investigation of OATP1B1 and MRP2 function, we examined their transport in double transfected polarized MDCKII cells. Since the structure of ZV, LDG and LDV is unknown, these dyes were excluded from further experiments. First, stable MDCKII cell lines co-expressing these transporters, termed as MDCKII-MRP2-OATP1B1 or MDCKII-ABCG2-OATP1B1 were engineered (see 2.2.). Cell lines containing solely OATP1B1, MRP2, ABCG2 or mock transfected cells (MDCKII-1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-ABCG2 or MDCKII-Ctr.) served as controls. Expression was confirmed by Western blot analysis (Fig. 3A), and functionality of the transporters was verified by transport assays using known OATP1B1, MRP2 or ABCG2 substrates, CB, CaAM and DCV, respectively (Fig. 3B).

For transcellular transport measurements, MDCKII cells were grown on transwell inserts for 4 days to reach a polarized state, when OATP1B1 is localized to the basolateral membrane, and MRP2 or ABCG2 are found apically (Cui et al., 2001; Matsushima et al., 2005). First, FMTX, a previously identified substrate of OATP1B1 (Gui et al., 2010) and MRP2 (Notenboom et al., 2005; Prevoe et al., 2011) was used for the setup of the transcellular transport measurement. As shown on Fig. 3C, a time-dependent transcellular basolateral to apical (B-A) transport of FMTX could be observed in MRP2-OATP1B1 double transfectants that was not present in the control, single transfected MDCKII-1B1, MDCKII-MRP2 or MDCKII-Ctr. (mock) cells. Next, transcellular transport of pyranine was determined. As shown on Fig. 4A, a time-dependent B-A transport of pyranine could be observed in MRP2-OATP1B1 double transfectants, and there was no B-A transport in single or mock transfected cells. When intracellular accumulation of pyranine was measured, we found that pyranine cannot enter the cells without the function of OATP1B1, hence it cannot be detected in control or MRP2 single transfected cells (Fig. 4B). To exclude leakage of the cell monolayer, concurrent pyranine transport in the apical to basolateral (A-B) direction was investigated. Transport of pyranine in both directions was measured on the MRP2-OATP1B1 double and OATP1B1 single transfectant cells (Fig. 4C). We found negligible transcellular transport from the apical to the basal compartment in both cell lines. These results indicate that the B to A directed transport is indeed derived from the interaction of the dye with the OATP1B1 and MRP2

transporters. Finally, in order to verify that the increasing fluorescent pyranine signal at the A side of double transfected cells is a result of the concerted action of OATP1B1 and MRP2, the experiments were repeated in the presence of transporter inhibitors (Fig. 4D). Double transfected cells treated with either cyclosporin A at the basal side or benzbromarone at the apical side showed no detectable transcellular transport. To control these experiments, OATP1B1 and MRP2 single transfected cells were also treated with cyclosporin A or benzbromarone, at the basal or apical side, respectively. Taken together, the results were consistent with the transcellular transport of pyranine in double transfectants as a result of OATP1B1-mediated uptake and MRP2-mediated efflux.

3.4. Identification of Cascade Blue hydrazide and sulforhodamine 101 as dual OATP1B1 and MRP2 probes in transwell measurements

Based on the experiments evaluated in the Sf9 IOV assay, SR101 is another potential common substrate of OATP1B1 and MRP2, and a weak accumulation of CB in IOVs with MRP2 or ABCG2 was also detected. Therefore, in order to test their applicability as fluorescent probes in vectorial transport measurements, their transcellular transport was investigated in transwell transport assays (Fig. 5). When following time dependent accumulation of CB or SR101 in the apical compartment of the transwells, vectorial transport in MRP2-OATP1B1 double transfected cells was detected for both substrates (Fig. 5A-B). Interestingly, although we detected ABCG2-mediated transport of CB in IOVs, transcellular transport activity in ABCG2-OATP1B1 cells could not be observed (Fig. 5A). Transcellular transport of CB and SR101 in the A-B direction was negligible (Fig. 5C), and inhibitory measurements performed with these dyes also confirmed OATP1B1- and MRP2-mediated transport of CB and SR101 (Fig. 5D).

4. Discussion

Concerted action of hepatic uptake (OATP) and efflux transporters (ABCC2 and ABCG2) is crucial in pharmacokinetics and in the disposition of therapeutic drugs and endogenous substances. Consequently, simultaneous administration of transporter substrates can lead to altered pharmacokinetics and undesired side effects. Therefore, international regulations require the evaluation of OATP1B1/3 and ABCG2 (and also potentially MRP2) during early

phases of drug development.

Polarized cell lines engineered to overexpress both uptake and efflux transporters are an accepted *in vitro* model of transepithelial transport measurements. MDCKII cells co-expressing OATP1B and MRP2 or OATP1B and ABCG2 have been used in numerous studies for the measurement of vectorial transport of common OATP and ABC transporter substrates (Cui et al., 2001; Fahrmayr et al., 2012; Matsushima et al., 2005). Double-transfected cell lines allow the identification of dual substrates (especially when the test compound cannot enter the cells without the contribution of an uptake transporter) and also the determination of the involvement of transporters in the transcellular transport (Matsushima, 2005; Sasaki, 2002). MDCKII cells co-expressing OATP and ABC transporters are also used to investigate DDIs mediated by these transporters (Cui et al., 2001; Fahrmayr et al., 2012; Liu et al., 2006; Matsushima et al., 2005).

Considering their overlapping substrate specificities, OATP1Bs, MRP2 and ABCG2 may also share common fluorescent substrates. Indeed, several mutual fluorescent probes were reported (e.g. FMTX Gui et al., 2010; Notenboom et al., 2005), cholyl-lysyl-fluorescein (Barber et al., 2015; de Waart et al., 2010) or carboxy-dichloro-fluorescein derivatives (Heredi-Szabo et al., 2008)). Although separate studies have identified common fluorescent substrates of MRP2 and OATP1Bs, these were not tested in double transfectants for vectorial transport. The only exception is Fluo-3 that has been used in transcellular transport experiments to investigate MRP2 and OATP1B3 function (Cui et al., 2001). However, Fluo-3 is not transported by the major hepatic OATP, OATP1B1 (Izumi et al., 2016), and application of fluorescent probes for dual investigation of ABCG2 and OATP1B function have not yet been documented. One crucial difference between an ideal probe substrate of uptake or efflux transporters is membrane permeability. Uptake transporters require substrates with low membrane permeability, while optimal efflux transporter substrates have high levels of passive uptake (at least in measurements performed on intact cells) (Bednarczyk, 2010; Gui et al., 2010; Kovacsics et al., 2017; Patik et al., 2018; Szakacs et al., 2008; Yamaguchi et al., 2006). However, shared substrates of uptake and efflux transporters can be identified using double transfected polarized cells, or in transport experiments using IOVs. IOVs allow the measurement of intravesicular accumulation of cell impermeable dyes by inversely oriented efflux transporters, and represent a faster and cheaper screening method compared to the transcellular transport assay. Hence, in our current work, the initial transport screens of the previously identified cell impermeable fluorescent OATP probes, and the novel dye substrate pyranine (Fig. 1B), were performed on IOVs containing MRP2 or ABCG2. First, in order to find an alternative for CB, we tested pyranine for transport by hepatic OATPs (Fig. 1B). We found that although pyranine is a lower affinity substrate compared to CB (pyranine K_m values for OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1 were 27.8, 92.2 and 65.6 μM , respectively, vs. CB K_m values were 2.6, 21 and 21 μM (Patik, 2018)), its transport by all three OATPs is about 3-times higher than that of CB. Therefore, we conclude that pyranine can be an excellent tool to investigate hepatic OATP function.

The IOV-based transport screen identified the hitherto undescribed transport of ZV, LDG, pyranine, SR101 and CB by MRP2, and LDV and CB transport by ABCG2 (Fig. 2). Interestingly, SR101 has been previously identified as a transported substrate of an MRP-like fish and rat transporter (Miller et al., 2002, 2000). However, direct interaction of this dye with human MRP2 has not yet been documented. After the IOV screen, the novel substrates were tested in OATP1B1-MRP2 double transfected MDCKII cells for basolateral to apical transport, which confirmed pyranine, CB and SR101 as dual probes of OATP1B1 and MRP2 (Figs. 4 and 5). In these experiments fluorescein-methotrexate, a previously identified substrate of both OATP1B1 and MRP2 served as positive control (Gui et al., 2010; Notenboom et al., 2005). Vectorial transport could be inhibited by known OATP MRP2 inhibitors, indicating that these fluorescent probes can be used for assessing drug

interactions with OATP1B or MRP2.

Although CB transport was very low in MRP2 and ABCG2 containing IOVs, we still detected significant transport of this dye in double transfected MDCKII-MRP2-OATP1B1 cells. However, although expression and function of both OATP1B1 and ABCG2 was confirmed in the double transfected MDCKII cell line (Fig. 3A-B), we could not detect any transcellular transport of CB (Fig. 5A). These discrepancies can be explained by the conversion of CB in the cells (but not in IOVs) into a metabolite that is a higher affinity substrate of MRP2 than CB, but not recognized anymore by ABCG2. Mass spectrometry studies analyzing CB extruded from MDCKII-MRP2-OATP1B1 cells may clarify this issue. These results underline the relevance of cell-based assays, which are influenced by the intracellular metabolism of compounds that are also relevant in physiological drug transporter and drug-drug interactions.

Finally, since dual probes of OATP1B1 and ABCG2 suitable for transcellular transport measurements have not been identified, we also tested the transport of LDV, identified here as a substrate for ABCG2 (Fig. 2C). However, these experiments also failed to detect any vectorial transport in MDCKII-ABCG2-OATP1B1 cells (not shown). In addition, as LY has been described as a substrate of zebrafish drOatp1d1 (Faltermann et al., 2016), and our IOV experiments (Fig. 2D) showed high level of uptake of this compound by ABCG2, we tested LY transport in MDCKII-OATP1B1 cells. However, we found no detectable OATP1B1-mediated uptake of this compound (not shown), therefore LY was also excluded as a dual OATP1B1/ABCG2 probe. Although our efforts failed to set up an assay for vectorial transport of potential dual OATP1B1 and ABCG2 probes, LDV and CB can still be used to detect ABCG2 drug interactions in vesicular transport studies. As demonstrated in Fig. 6, uptake of these dyes in IOVs is inhibited in the presence of Ko143, a specific ABCG2 inhibitor (Fig. 6).

Although cell lines engineered to overexpress pairs of uptake and efflux transporter or even metabolic enzymes are an accepted model of *in vitro* drug interaction screens, to recapitulate *in vivo* conditions more complex models, e.g. human derived hepatocytes are needed. The dual OATP MRP2 substrates identified in our study are good candidates to monitor the function and drug interactions of these transporters in hepatocytes. Due to their low passive permeability, practically no uptake of pyranine, CB or SR101 is observed in mock transfected cells (Fig. 1B, and see also in Bakos et al., 2019; Patik et al., 2018), predicting low unspecific labeling in cellular assays/experiments. On the other hand, a plethora of transporters is present in hepatocytes, some of which may be involved in the uptake or efflux of these dyes. Based on our experiments, ABCG2 will not influence elimination of these dyes from the cells. In addition, based on our preliminary experiments performed with IOVs containing human ABCB1 (P-gp), no interaction with pyranine, CB or SR101 can be expected (not shown). However, it cannot be excluded that other ABC transporters, e.g. MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), expressed in the sinusoidal membranes of hepatocytes, recognize these dyes and will limit their cellular accumulation. Similarly, the interaction of the fluorescent dyes with other solute carriers (SLCs) cannot be excluded. Future work will address the applicability of the fluorescence assays in more complex models. For example, toxicity of the test substrates may limit the applicability of these dyes in hepatocytes. However, when we investigated this issue in MDCKII cells we found no significant toxicity (Supplementary Fig. S2).

In conclusion we identify dual OATP1B1 MRP2 fluorescent probes, and also novel fluorescent substrates of ABCG2. To our best knowledge, pyranine, CB and SR101 are the first dual probes that can be applied for determining in a single, fluorescence-based assay the activity of OATP1B1 and MRP2 and for evaluating the DDI potential of drug candidates.

Authors' contribution

Virág Székely: performed the experiments, analyzed the data, helped in original draft preparation Izabel Patik: performed the

experiments, contributed to the design of the experiments, **Orsolya Ungvári**: performed the experiments, analyzed data **Ágnes Telbisz**: performed the experiments, helped in reviewing and editing the manuscript **Gergely Szakács**: helped in reviewing and editing the manuscript, **Éva Bakos**: Supervision, writing, original draft preparation **Csilla Özvegy-Laczka**: conceptualization, writing.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This work has been supported by a research grant from the National Research, Development and Innovation Office [OTKA FK 128751]. Cs. Ö-L. is a recipient of the János Bolyai fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejps.2020.105395.

References

- Allen, J.D., van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J.H., 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.
- Avnir, Y., Barenholz, Y., 2005. pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction. *Anal. Biochem.* 347, 34–41.
- Badee, J., Achour, B., Rostami-Hodjegan, A., Galetin, A., 2015. Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 43, 424–432.
- Bakos, E., Evers, R., Sinko, E., Varadi, A., Borst, P., Sarkadi, B., 2000. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol. Pharmacol.* 57, 760–768.
- Bakos, E., Nemet, O., Patik, I., Kucsma, N., Varady, G., Szakacs, G., Ozvegy-Laczka, C., 2019. A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third generation P-gp inhibitors and OATP1A2. *FEBS J.*
- Barber, J.A., Stahl, S.H., Summers, C., Barrett, G., Park, B.K., Foster, J.R., Kenna, J.G., 2015. Quantification of drug-induced inhibition of canalicular Chylol-L-lysyl-fluorescein excretion from hepatocytes by high content cell imaging. *Toxicol. Sci.* 148, 48–59.
- Bednarczyk, D., 2010. Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Anal. Biochem.* 405, 50–58.
- Cantz, T., Nies, A.T., Brom, M., Hofmann, A.F., Keppler, D., 2000. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G522–G531.
- Clement, N.R., Gould, J.M., 1981. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 20, 1534–1538.
- Cui, Y., Konig, J., Keppler, D., 2001. Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCG2. *Mol. Pharmacol.* 60, 934–943.
- Dawson, P.A., Lan, T., Rao, A., 2009. Bile acid transporters. *J. Lipid Res.* 50, 2340–2357.
- de Waart, D.R., Hausler, S., Vlaming, M.L., Kunne, C., Hanggi, E., Gruss, H.J., Oude Elferink, R.P., Stieger, B., 2010. Hepatic transport mechanisms of chylol-L-lysyl-fluorescein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 78–86.
- Deng, F., Sjostedt, N., Kidron, H., 2016. The effect of albumin on MRP2 and BCRP in the vesicular transport assay. *PLoS One* 11, e0163886.
- 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. *PNAS* 95, 15665–15670.
- Fahrmayr, C., Konig, J., Auge, D., Mieth, M., Fromm, M.F., 2012. Identification of drugs and drug metabolites as substrates of multidrug resistance protein 2 (MRP2) using triple-transfected MDCK-OATP1B1-UGT1A1-MRP2 cells. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1836–1847.
- Faltermann, S., Pretot, R., Pernthaler, J., Fent, K., 2016. Comparative effects of nodularin and microcystin-LR in zebrafish: 1. Uptake by organic anion transporting polypeptide Oatp1d1 (Slco1d1). *Aquat. Toxicol.* 171, 69–76.
- Gan, B.S., Krump, E., Shrode, L.D., Grinstein, S., 1998. Loading pyranine via purinergic receptors or hypotonic stress for measurement of cytosolic pH by imaging. *Am. J. Physiol.* 275, C1158–C1166.
- Giacomini, K.M., Balimane, P.V., Cho, S.K., Eadon, M., Edeki, T., Hillgren, K.M., Huang, S.M., Sugiyama, Y., Weitz, D., Wen, Y., Xia, C.Q., Yee, S.W., Zimdahl, H., Niemi, M., International Transporter, C., 2013. International transporter consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 94, 23–26.
- Giacomini, K.M., Huang, S.M., 2013. Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin. Pharmacol. Ther.* 94, 3–9.
- Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, L., 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236.
- Gui, C., Obaidat, A., Chaguturu, R., Hagenbuch, B., 2010. Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3. *Curr. Chem. Genomics* 4, 1–8.
- Hagenbuch, B., Stieger, B., 2013. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 396–412.
- Heredi-Szabo, K., Kis, E., Molnar, E., Gyorfi, A., Krajcsi, P., 2008. Characterization of 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4. *J. Biomol. Screen* 13, 295–301.
- Heyes, N., Kapoor, P., Kerr, I.D., 2018. Polymorphisms of the multidrug Pump ABCG2: a systematic review of their effect on protein expression, function, and drug pharmacokinetics. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 46, 1886–1899.
- Hirano, M., Maeda, K., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., 2005. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol. Pharmacol.* 68, 800–807.
- Hirouchi, M., Kusuhara, H., Onuki, R., Ogilvie, B.W., Parkinson, A., Sugiyama, Y., 2009. Construction of triple-transfected cells [organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1/multidrug resistance-associated protein (MRP) 2/MRP3 and OATP1B1/MRP2/MRP4] for analysis of the sinusoidal function of MRP3 and MRP4. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 37, 2103–2111.
- Hollo, Z., Homolya, L., Davis, C.W., Sarkadi, B., 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 384–388.
- 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.
- Horsey, A.J., Cox, M.H., Sarwat, S., Kerr, I.D., 2016. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 824–830.
- Izumi, S., Nozaki, Y., Komori, T., Takenaka, O., Maeda, K., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., 2016. Investigation of fluorescein derivatives as substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 to develop sensitive fluorescence-based OATP1B1 inhibition assays. *Mol. Pharm.* 13, 438–448.
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U., Kroemer, H.K., 2006. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 351–366.
- Jetter, A., Kullak-Ublick, G.A., 2019. Drugs and hepatic transporters: a review. *Pharmacol. Res.* 104234.
- Kimoto, E., Yoshida, K., Balogh, L.M., Bi, Y.A., Maeda, K., El-Kattan, A., Sugiyama, Y., Lai, Y., 2012. Characterization of organic anion transporting polypeptide (OATP) expression and its functional contribution to the uptake of substrates in human hepatocytes. *Mol. Pharm.* 9, 3535–3542.
- Kitamura, S., Maeda, K., Wang, Y., Sugiyama, Y., 2008. Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 36, 2014–2023.
- Kock, K., Brouwer, K.L., 2012. A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 599–612.
- Konig, J., Cui, Y., Nies, A.T., Keppler, D., 2000. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G156–G164.
- Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D., 1999. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 377–394.
- Kovacsics, D., Patik, I., Ozvegy-Laczka, C., 2017. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 409–424.
- Kullak-Ublick, G.A., Ismail, M.G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P.J., Hagenbuch, B., 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120, 525–533.
- Lee, C.A., O'Connor, M.A., Ritchie, T.K., Galetin, A., Cook, J.A., Ragueneau-Majlessi, I., Ellens, H., Feng, B., Taub, M.E., Paine, M.F., Polli, J.W., Ware, J.A., Zamek-Gliszczynski, M.J., 2015. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 43, 490–509.
- Link, E., Parish, S., Armitage, J., Bowman, L., Heath, S., Matsuda, F., Gut, I., Lathrop, M., Collins, R., 2008. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genome-wide study. *N. Engl. J. Med.* 359, 789–799.
- Liu, L., Cui, Y., Chung, A.Y., Shitara, Y., Sugiyama, Y., Keppler, D., Pang, K.S., 2006. Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 395–402.
- Liu, Y.H., Di, Y.M., Zhou, Z.W., Mo, S.L., Zhou, S.F., 2010. Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 115–120.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnburg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H., 2001. Subcellular

- localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61, 3458–3464.
- Mao, Q., Unadkat, J.D., 2015. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *AAPS J.* 17, 65–82.
- Mathew, G., Timm Jr., E.A., Sotomayor, P., Godoy, A., Montecinos, V.P., Smith, G.J., Huss, W.J., 2009. ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle* 8, 1053–1061.
- Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., Takada, Y., Oikawa, Y., Inoue, H., Suzuki, K., Okada, R., Nishiyama, J., Domoto, H., Watanabe, S., Fujita, M., Morimoto, Y., Naito, M., Nishio, K., Hishida, A., Wakai, K., Asai, Y., Niwa, K., Kamakura, K., Nonoyama, S., Sakurai, Y., Hosoya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., Hamajima, N., Shinomiya, N., 2009. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci. Transl. Med.* 1, 5ra11.
- Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H., Sugiyama, Y., 2005. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1059–1067.
- Miller, D.S., Graeff, C., Droule, L., Fricker, S., Fricker, G., 2002. Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R191–R198.
- Miller, D.S., Nobmann, S.N., Gutmann, H., Toeroek, M., Drewe, J., Fricker, G., 2000. Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol. Pharmacol.* 58, 1357–1367.
- Notenboom, S., Miller, D.S., Kuik, L.H., Smits, P., Russel, F.G., Masereeuw, R., 2005. Short-term exposure of renal proximal tubules to gentamicin increases long-term multidrug resistance protein 2 (Abcc2) transport function and reduces nephrotoxicant sensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 912–920.
- Ozvegy, C., Varadi, A., Sarkadi, B., 2002. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* 277, 47980–47990.
- Patel, M., Taskar, K.S., Zamek-Gliszczynski, M.J., 2016. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* 56 (Suppl 7), S23–S39.
- Patik, I., Kovacsics, D., Nemet, O., Gera, M., Varady, G., Stieger, B., Hagenbuch, B., Szakacs, G., Ozvegy-Laczka, C., 2015. Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate. *Biochem. Pharmacol.* 98, 649–658.
- Patik, I., Székely, V., Nemet, O., Szepesi, A., Kucsma, N., Varady, G., Szakacs, G., Bakos, E., Ozvegy-Laczka, C., 2018. Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Sci. Rep.* 8, 2630.
- Prasad, B., Evers, R., Gupta, A., Hop, C.E., Salphati, L., Shukla, S., Ambudkar, S.V., Unadkat, J.D., 2014. Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass spectroscopy and influence of genotype, age, and sex. *Drug Metab. Disposition Biol. Fate Chem.* 42, 78–88.
- Prevoo, B., Miller, D.S., van de Water, F.M., Wever, K.E., Russel, F.G., Flik, G., Masereeuw, R., 2011. Rapid, nongenomic stimulation of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) activity by glucocorticoids in renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 362–371.
- Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B., 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLC0 and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1260–1287.
- Saranko, H., Tordai, H., Telbisz, A., Ozvegy-Laczka, C., Erdos, G., Sarkadi, B., Hegedus, T., 2013. Effects of the gout-causing Q141K polymorphism and a CFTR DeltaF508 mimicking mutation on the processing and stability of the ABCG2 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 140–145.
- Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A., Scarborough, G.A., 1992. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 4854–4858.
- Shitara, Y., 2011. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 26, 220–227.
- Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P., Sugiyama, Y., 2003. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 610–616.
- Siissalo, S., Hannukainen, J., Kolehmainen, J., Hirvonen, J., Kaukonen, A.M., 2009. A Caco-2 cell based screening method for compounds interacting with MRP2 efflux protein. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 332–338.
- Sjostedt, N., van den Heuvel, J., Koenderink, J.B., Kidron, H., 2017. Transmembrane domain single-nucleotide polymorphisms impair expression and transport activity of ABC transporter ABCG2. *Pharm. Res.* 34, 1626–1636.
- Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13, 379–393.
- Telbisz, A., Muller, M., Ozvegy-Laczka, C., Homolya, L., Szente, L., Varadi, A., Sarkadi, B., 2007. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2698–2713.
- van de Steeg, E., Stranecky, V., Hartmannova, H., Noskova, L., Hrebicek, M., Wagenaar, E., van Esch, A., de Waart, D.R., Oude Elferink, R.P., Kenworthy, K.E., Sticova, E., al-Edreesi, M., Knisely, A.S., Kmoch, S., Jirsa, M., Schinkel, A.H., 2012. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J. Clin. Invest.* 122, 519–528.
- Woodward, O.M., Kottgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W.B., Kottgen, M., 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *PNAS* 106, 10338–10342.
- Yamaguchi, H., Okada, M., Akitaya, S., Ohara, H., Mikkaichi, T., Ishikawa, H., Sato, M., Matsuura, M., Saga, T., Unno, M., Abe, T., Mano, N., Hishinuma, T., Goto, J., 2006. Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. *J. Lipid Res.* 47, 1196–1202.
- Zhou, S.F., Wang, L.L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W., Li, C.G., Li, Y., 2008. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* 15, 1981–2039.



Original article

Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta

Lenka Tupova^a, Birgit Hirschmugl^b, Simona Sucha^a, Veronika Pilarova^c, Virág Székely^d,
Éva Bakos^d, Lucie Novakova^c, Csilla Özvegy-Laczka^d, Christian Wadsack^b, Martina Ceckova^{a,*}^a Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of Pharmacology and Toxicology, Akademika Heyrovského 1203, Hradec Kralove, Czech Republic^b Medical University of Graz, Department of Obstetrics and Gynecology, 8036, Graz, Austria^c Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of Analytical Chemistry, Akademika Heyrovského 1203, Hradec Kralove, Czech Republic^d Membrane Protein Research Group, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Magyar tudósok krt. 2., H-1117, Budapest, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Maraviroc
Drug transporters
MRP1
OATP
Placenta
Drug–drug interactions

ABSTRACT

Special attention is required when pharmacological treatment is indicated for a pregnant woman. P-glycoprotein (MDR1) is a well-known transporter localized in the maternal blood-facing apical membrane of placental syncytiotrophoblast and is considered to play an important role in protecting the developing fetus. Maraviroc, a MDR1 substrate that is registered for treatment of HIV infection, shows a low toxicity profile, suggesting favorable tolerability also if administered to pregnant women. Nevertheless, there is only poor understanding to date regarding the extent to which it permeates across the placental barrier and what are the transport mechanisms involved. Endeavoring to clarify the passage of maraviroc across placenta, we used in this study the method of closed-circuit perfusion of maraviroc across human placental cotyledon. The data obtained confirmed slight involvement of MDR1, but they also suggest possible interaction with other transport system(s) working in the opposite direction from that of MDR1. Complementary *in vitro* studies, including cellular experiments on choriocarcinoma BeWo cells as well as transporter-overexpressing MDCKII and A431 cell lines and accumulation in placental fresh villous fragments, revealed maraviroc transport by MRP1, OATP1A2, and OATP1B3 transporters. Based on mRNA expression data in the placental tissue, isolated trophoblasts, and fetal endothelial cells, especially MRP1 and OATP1A2 seem to play a crucial role in cooperatively driving maraviroc into placental tissue. By the example of maraviroc, we show here the important interplay of transporters in placental drug handling and its possibility to overcome the MDR1-mediated efflux.

1. Introduction

Research over the past few decades has made it clear that placenta should no longer be viewed as a mechanistic barrier between mother and fetus. Considerable progress has been made in understanding the transport role of this essential organ for maintaining pregnancy. In parallel with ensuring that nutrition is supplied to the developing tissues, the placenta needs to handle waste products and protect the fetus against potentially toxic xenobiotics, including drugs, which might be

present in maternal blood. Several transport proteins and carriers have been described in the placenta that mediate active and facilitated transfer of nutrients and other essential compounds in the maternal-to-fetal direction [1–3]. On the other hand, most of the xenobiotics are lipophilic in their structures and to some extent able to permeate the placenta by passive diffusion [4]. ATP-dependent transporters P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) present in the maternal blood-facing apical microvillous membrane of the trophoblast layer have the capability to efflux

Abbreviations: [³H]-MVC, radiolabeled maraviroc; A-B, apical-to-basolateral direction; B-A, basolateral-to-apical direction; BCRP or ABCG2, breast cancer resistant protein; CCR5, chemokine receptor type 5; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ER, efflux ratio; FDA, Food and Drug Administration; GF or GF120918, elacridar; LY or LY335979, zosuquidar; MDCKII, Madin-Darby Canine Kidney II cells; MDR1 or ABCB1, P-glycoprotein; MRPs, multidrug resistant proteins; OATPs, organic anion transporter proteins; OCTNs, organic carnitine transporters; Papp, permeable coefficient; PBS, phosphate buffered saline; Rr, relative ratio; SDS, sodium dodecyl sulphate; SLC, solute carriers

* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic.

E-mail address: martina.ceckova@faf.cuni.cz (M. Ceckova).

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110506>

Received 2 June 2020; Received in revised form 27 June 2020; Accepted 2 July 2020

Available online 12 July 2020

0753-3322/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

potentially harmful compounds to the maternal blood and thereby protect the fetus [5–7]. These membrane transporters also constitute possible sites for drug–drug interactions. Therefore, the ability of any therapeutic compound to be transported by membrane proteins or to cause their inhibition needs to be assessed and drug–drug interactions considered, as emphasized by the International Transporter Consortium [8,9] and such global drug regulatory authorities as the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency [10,11]. In the placenta, MDR1 and BCRP have been indicated to protect the fetus against various lipophilic drugs, including, for example, glyburide, digoxin, and vinca alkaloids [12–14]. In general, most of the drugs that are identified as MDR1 or BCRP substrates *in vitro* are assumed to be compromised in their transfer to fetus. Compared to MDR1 or BCRP, less is known about the placental multidrug resistant proteins (MRPs) transporters, among which MRP2 (ABCC2) and MRP1 (ABCC1) seem to be the most-expressed members of this subfamily. While MRP2 shows the same localization as do MDR1 and BCRP, and, similarly to these two transporters, it is believed to ensure efflux in the fetal-to-maternal direction [15], MRP1 has been detected mainly on the basal membrane of trophoblast and fetal endothelial cells [16–19].

In addition to the ABC drug efflux transporter family, the solute carriers (SLC) also are able to interact with drugs and their inhibition may lead to clinically relevant drug–drug interactions [20–22]. Several members of the organic anion-transporting polypeptide (OATP) and organic carnitine (OCTNs) uptake transporters are recognized for their roles in placental handling of various endogenous compounds, including L-carnitine [23,24]. Among these, mainly OATP2A1, OATP4A1 [25,26], and OCTN2 [27] have been described in the apical microvillous membrane of human placenta, while OATP2B1 seems to ensure influx through the opposite, basal membrane of trophoblast cells [28]. In addition to these carriers, lower expression of several other OATP members, e.g., OATP1A2, OATP1B3, and OATP3A1 [29–31], and OCTN1 [32] also has been reported in human placenta.

Many antiretroviral compounds have recently been identified as substrates of MDR1 and/or BCRP *in vitro* [33–36], thus demonstrating that placental ABC transporters-mediated drug–drug interactions might affect drug levels in fetal circulation [37]. In particular, administration of antiretroviral therapy to ideally all HIV-positive pregnant women is a much-discussed topic, because it decreases the risk of mother-to-child viral transfer from 45 % down to 1–2% or less [38,39]. Although the approach to the treatment is itself becoming more modern and effective, the introduction of newer drugs for use during pregnancy is scarcely advancing, and traditional therapeutics with well-known toxicity and safety profiles are preferred in order to avoid potential harmful effects to the fetus. Interestingly, however, a recent study comparing a recommended combination of three common antiretroviral drugs with an alternative variant showed no significant difference in incidence of adverse birth outcomes [40].

The chemokine receptor 5 (CCR5) inhibitor maraviroc blocks HIV from binding to the host cells and, due to its low toxicity, it has been approved not only for use in adults infected by the R5-tropic virus but also for the treatment of children [41]. Because sufficiently conclusive results are still lacking, however, maraviroc is not yet recommended in antiretroviral pharmacotherapy schedules for pregnant women [39]. Nevertheless, several case reports seem to be optimistic as they describe births of healthy, uninfected neonates of women exposed to maraviroc during pregnancy [42]. Importantly, the chemokine system plays a key role in the control of inflammatory and immune processes. Therefore, in addition to controlling HIV, maraviroc seems to bring therapeutic benefit also in non-AIDS related comorbidities – e.g. atherosclerosis [43] – and is considered as well in several off-label indications, including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and some cancer indications [44–46].

In a very recent study, we identified maraviroc as a substrate of human MDR1 *in vitro*. Employing *in situ* dually perfused rat term placenta, significant rat Mdr1-mediated efflux of the drug to the maternal

compartment was observed, although this was subsequently abolished in the presence of MDR1/Mdr1 inhibitors [47]. The primary aim of this study was to address the protective role of MDR1 in the transfer of maraviroc across human placenta using the well-established model of closed-circuit perfusion of maraviroc across a single intact placental cotyledon. Based on the results indicating possible interplay of several other transport systems in the placenta that compromise the fetal-to-maternal efflux mediated by MDR1, we subsequently employed several *ex vivo* and *in vitro* studies in human placental tissue and relevant cell lines in order to identify the contributing transport mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Human placentas

Placentas from normal pregnancies were collected at the Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Graz and used immediately after delivery or caesarean section. All women were medication-free and negative for HIV and hepatitis B or C. The study was approved by the institutional ethical committee (no. 24-529 ex 11/12) and informed consent was provided by all participants involved in the study. The placentas for experiments in villous fragments were collected at the Faculty Hospital Hradec Kralove after delivery following uncomplicated pregnancies. Written informed consent was obtained as approved by the local research Ethics Committee (approval no. 201006S15 P).

2.2. Cell lines and generation of cell-based carrier systems

The human choriocarcinoma BeWo cell line, clone b30 was kindly provided by Prof. Christiane Albrecht (University of Bern, Switzerland) with kind permission from Dr. Alan Schwartz (Washington University, USA). Madin-Darby Canine Kidney II (MDCKII) cell lines, both parental and overexpressing human MRP1 transporter, were obtained from Dr. A. Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands). Human epidermal cell lines A431, both control and overexpressing human OATP1A2, -1B3, -2A1, -2B1, or -3A1 transporters, were generated in the laboratories of the Institute of Enzymology (RCNS, Hungary) according to well-established protocols. Plasmid constructs of *SLCO2B1* and *-1B3* were prepared and introduced in order to create the A431-OATP2B1 and -1B3 cell lines as described previously [48]. OATP1A2 overexpression was achieved as described by Bakos et al. [49]. A431 cell lines overexpressing OATP2A1, OATP3A1, or OATP4A1 were constructed as part of the current study. Briefly, the cDNA of human *SLCO2A1* (BC041140, plasmid ID:HsCD00338568, Harvard Plasmid Repository) was PCR-amplified using Phusion® High-Fidelity PCR Kit (NEB, Ipswich, MA, US) and the following primers: forward 5' GTAA ATGCGGCCGCAAGAATTCGCCACCATGGGACCCAGGATAGG and reverse 5' GTACATGCGGCCGCTAAGCTTTCACACTCGGGAATCCTC. The PCR fragment was cloned between the NotI HindIII sites of the pSB vector [48]. The cDNAs of *SLCO3A1* and *SLCO4A1* were amplified from the pAcUW-21-L/OATP3A1 and pAcUW-21-L/OATP4A1 vectors [50] with the following primers: 3A1 forward 5' TAAAGGATCCGCGGCCG CGCCACCATGCAGGGGAAGAAGCCG, 3A1 reverse 5' CATGTCTCGAG ACTAGTAAGCTTCTATAAAACGGACTCCATG, 4A1 forward 5' TAAAG GATCCGCCACCATGAAGAGCGCCAAAGGT, and 4A1 reverse 5' CATG TAACTAGTTCACCTTCTTTTACTATTTTG. PCR fragments were digested with BamHI and SpeI enzymes (NEB) and were cloned into the corresponding sites of the pRRL-CMV-MCS-IRES-ΔCD4 vector [48]. The base order of the cDNAs in all constructs was verified by sequencing. Empty pRRLΔCD4 or pSB vectors were used as negative controls. In the case of OATP2A1, A431 cells (ATCC) were transfected using a Fugene HD reagent (Promega, Madison, WI, USA.) according to the supplier's protocol and as described by [48]. *SLCO3A1* or *SLCO4A1* overexpression in A431 cells was achieved by lentiviral transduction [48]. Protein expression of all cloned OATPs in the particular cell lines was

confirmed by western blotting analysis (data not shown).

All cell lines were cultivated in antibiotic-free, complete high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with L-glutamine, supplemented with 10 % fetal bovine serum at 37 °C with 5% CO₂ and regularly tested for *Mycoplasma* contamination. Cells from passages 5–20 for the MDCKII and A431 cell lines and passages from 5 to 15 for the BeWo cells were used in the experiments. Dimethyl sulfoxide concentrations in all the assays did not exceed 0.5 %.

2.3. Chemicals and reagents

Radiolabeled maraviroc ([³H]-MVC) was purchased from Moravек Biochemicals (Brea, CA, USA). DMEM, fetal bovine serum, sodium dodecyl sulfate (SDS), calcein-AM, dextran from *Leuconostoc* spp. ($M_r \approx 40,000$), phosphate buffered saline (PBS), and scintillation cocktail were bought from Sigma–Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Opti-MEM®, reduced serum medium, Cascade Blue hydrazide, and the bincinchonic acid (BCA) assay were obtained from Thermo Fisher Scientific. Maraviroc and ritonavir were provided by the NIH AIDS Reagent Program or purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA), which was also the source of control inhibitors elacridar (GF120918), zosuquidar (LY335979), verapamil, sulfasalazine, L-carnitine, and MK-571. All the salts necessary for preparation of perfusion and Thyrode's buffers were purchased from Merck (MerckGroup, Germany), and fluorescein-methotrexate triammonium salt was from Biotium (Hayward, CA, USA).

2.4. Ex vivo perfusion of human placenta

The *ex vivo* placental perfusion setup used herein has been described previously [51–53] and was adapted for the current study. Briefly, within 30 min after delivery, a single unimpaired cotyledon was selected and the supplying chorionic artery and vein pair was cannulated and immediately rinsed with perfusion medium (DMEM:Earls buffer 3:1; containing 15 g/L dextran, 2 g/L glucose, and 250 mg/mL amoxicillin; Sigma–Aldrich). Prepared cotyledon was placed in the middle of a perfusion chamber and the fetal arterial cannula was connected to a perfusion medium reservoir (37 °C). The maternal circulation was established by insertion of three rounded needles into the intervillous space of the cotyledon. Constant fetal (3 mL/min) and maternal (9 mL/min) artery inflows were generated using a magnetic pump (Codan, Salzburg, Austria). Flow recovery of the fetal circulation was ≥ 95 % in all experiments. In order to approximate *in utero* oxygen levels, fetal perfusion medium was pretreated with a gas mixture (95 % N₂, 5% CO₂) through a gas-exchange device (Living Systems, St. Albans, VT, USA) during the experiment. The back-flow pressure in the fetal vascular system was recorded in line during the experiment by a micro catheter pressure sensor (Millar, Houston, TX, USA) inserted into the fetal arterial cannula.

2.4.1. Settings of perfusion experiments

The experimental time slots were set based on the findings from other, similar experiments evaluating the contribution of ABC transporters to placental drug transfer [13]. A single perfusion experiment setup was initiated with a 90 min fetal and maternal closed-circuit period when maraviroc (600 ng/mL) was added to both circulations (minutes 0–90). This was followed by 30 min washout with maraviroc-free media (minutes 90–120), 30 min of inhibitor pre-incubation (minutes 120–150), and 90 min of maraviroc with MDR1 inhibitors elacridar (2 μ M) or ritonavir (10 μ M) (minutes 150–240), all applied to both compartments. Samples were taken every 30 min from fetal vein and maternal artery in volume of 1.5 mL. Samples were centrifuged to separate perfusate from the remaining blood elements or residual tissue and stable isotopically labelled internal standard (SIL-IS) of maraviroc (100 ng/mL, maraviroc D6, TRC, Canada) was added into 1 mL of clear supernatant. Completed samples were stored at –80 °C in a freezer

until analysis. After the experiment period, tissue integrity was tested by a 30 min open-circuit antipyrine period. Antipyrine concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) in accordance with the protocol by [54] in maternal and fetal perfusates. Only perfusion experiments reaching fetal-to-maternal antipyrine ratios ≥ 0.3 within 30 min in a fetal open circuit were considered as successful experiments and were further processed.

2.4.2. Analysis of maraviroc in perfusates

The determination of maraviroc in placental perfusion medium was carried out using the Acquity Ultra Performance LC (UPLC) system (Waters, Milford, MA, USA) coupled with a Micromass Quattro micro API benchtop triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Samples of 2 μ L were injected onto an Acquity BEH C18 analytical column (50 \times 2.1 mm i.d.; particle size 1.7 μ m). The analytes were separated using gradient elution with 0.1 % aqueous formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) at a flow rate of 0.35 mL/min. The gradient started with 5% of eluent B in A, and it was increased to 95 % B in 3 min. The percentage of eluent B was reduced to the original conditions of 5% at 3.1 min. The total time of chromatographic separation, including column equilibration, was 5 min. Quantification of analyte was achieved via selected reaction monitoring using the precursor ion $[M+H]^+$ with $m/z = 514.1$ and two selected fragment ions including quantifier $m/z = 388.9$ and qualifier ion $m/z = 280.0$ to increase method selectivity. Ion source parameters were set up as follows: capillary voltage – 1.0 kV, extractor – 3.0 V, RF lens – 0.1 V, ion source temperature – 130 °C, cone voltage – 35 V. The desolvation gas (nitrogen) flow was 1,000 L/h and temperature 450 °C. Nitrogen was also used as a cone gas with a flow rate of 100 L/h. Collision energy was set individually for each selected reaction monitoring transition at 20 eV (514.1 \rightarrow 388.9) and at 30 eV (514.1 \rightarrow 280.0). The data was acquired using MassLynx 4.1 software and processed by QuanLynx. The sample concentrations of maraviroc reported in ng/mL were converted into percentages of the respective initial stock solution concentration (100 %).

The pretreatment of 200 μ L perfusion samples involved liquid–liquid extraction using dichloromethane in a 1:2 (v/v) ratio as an extraction agent. The sample was agitated (1400 rpm, 30 °C, 10 min) and centrifuged (14,000 rpm, 4 °C, 5 min). Subsequently, 400 μ L of extract was taken, evaporated to dryness using nitrogen, and reconstituted in 20 % acetonitrile. The samples containing maraviroc were quantified using a matrix calibration curve and SIL-IS.

2.4.3. Detection of maraviroc metabolites

To determine whether maraviroc may be metabolized by human placenta tissue during perfusion experiments, detailed screening for maraviroc metabolites was performed. Presence of metabolites was screened using a UHPLC-HRMS (high-resolution mass spectrometry) method. The Acquity UPLC I-class (Waters, USA) UHPLC system was coupled to a Synapt G2Si (Waters, UK) of q-TOF type. Chromatography was carried out using an Acquity UPLC BEH C18 (50 \times 2.1 mm, 1.7 μ m) column and gradient elution with acetonitrile and 0.1 % formic acid in water. Maraviroc is believed predominantly to be metabolized to various hydroxy metabolites by oxidation on phenyl or difluorocyclohexyl rings and to a few decomposition products [55,56]. The m/z value 530.3301 of protonated molecule and its possible adducts were searched using reconstructed ion chromatograms (mass tolerance 10 ppm) in electrospray ionization-positive mode corresponding to the summary formula of C₂₉H₄₁F₂N₅O₂. For the decomposition products, the chemical formulae C₁₃H₂₂N₄O and C₁₃H₂₂N₄ were expected [55] and the m/z of 251.1866 and 235.1917 for protonated molecules were searched together with possible adducts. The column temperature was kept at 40 °C and autosampler temperature at 10 °C. High-resolution, fullscan measurements were carried out in electrospray positive ion mode in the range of 50 to 1,200 m/z . The ion source conditions were set up as follows: capillary voltage – 0.8 kV, sampling cone voltage – 40 V, source

offset – 80 V, source temperature – 120 °C, desolvation temperature – 600 °C, desolvation gas flow – 500 L/h, cone gas flow – 50 L/h, and nebulizer gas flow – 6 bar. Leucine enkephalin was used as a lock mass reference for internal calibration and sodium formate for external calibration. MassLynx 4.1 software was used for data acquisition.

2.5. Isolation of trophoblast and fetoplacental endothelial cells from human term placenta

Endothelial cells were isolated from arterial vessels dissected from the apical surface of the chorionic plate of human healthy-term placenta following the protocol published by [57]. Arterial endothelial cells were cultivated in a 75 cm² cultivation flask until confluence (4–5 days), then harvested for RNA isolation.

The primary trophoblast cells were isolated from four human term placentas after uncomplicated pregnancy and delivery. Rinsed villous placental tissue was digested by a mixture of trypsin and DNase I and the released cells were captured at the top of the percoll gradient. After the centrifuging step, cells were purified using immunomagnetic beads conjugated with MCA-81 antibody against HLA-A, B, and C (Serotec, Puchheim, Germany) [58]. Trophoblast cells were seeded into 75 cm² flasks (23 × 10⁶), cultivated for 48 h, then isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

2.6. RNA isolation, reverse transcription, and quantitative PCR analysis

A piece of tissue was sampled from each perfused placenta and processed for subsequent use in detecting gene expression of selected placental transporters. In order to evaluate the contribution of trophoblast cells and fetal endothelial cells to the expression, these cells were isolated from placental tissue as described above and subjected to the RT-qPCR analysis. Thereby, we verified the mRNA expression of relevant transporters in BeWo cells. TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) and Gb Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) were used for RNA isolation and reverse transcription following the manufacturer's instructions. The cDNA samples thusly obtained were evaluated by PCR using TaqMan® Universal Master Mix II without uracil-N-glycosylase (Thermo Fisher Scientific) and predesigned TaqMan® Real Time Expression PCR assays for human *ABCB1* (Hs00184500_m1), *ABCC1* (Hs01561483_m1), *SLCO1A2* (Hs00366488_m1), *SLCO1B3* (Hs00251986_m1), *SLCO2A1* (Hs01114926_m1), *SLCO2B1* (Hs01030343_m1), *SLCO3A1* (Hs00203184_m1), and *SLCO4A1* (Hs00249583_m1) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific USA) and then analyzed using the QuantStudio™ 6 system (Thermo Fisher Scientific). Each sample was amplified in triplicate using the following PCR cycling profile: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. Expression levels are reported as number of gene copies per µg of transcribed RNA based on a five-point concentration calibration curve of a randomly chosen comparator placental sample. This sample was also analyzed for the number of gene copies using droplet digital PCR assay as described previously [59]. Briefly, the ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the predesigned TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific) stated above were used. The analysis was performed using the QX200 Droplet Generator, T100™ Thermal Cycler, and QX200™ Droplet Reader, all from BioRad. According to the number of positive droplets compared to negative, the concentration of each of the target genes was calculated using the QuantaSoft™ Software. Only wells in which the number of droplets exceeded 13,000 were used. Knowing the number of copies of each target gene (expressed as number of transcripts/µL RNA) in our comparator placental sample, the numbers of gene transcripts in all the other cDNA samples were deduced by performing a qPCR analysis in which the five-point concentration curve of the calibrator cDNA was present.

2.7. Bidirectional transport assays across monolayers of MDCKII-MRP1, MDCKII-parental, and BeWo cell lines

Transport assays across monolayers of MDCKII-MRP1 and parental cells were carried out as described previously [60,61]. MRP1 cells were seeded at density 0.6 × 10⁶ cells on 12-well, 3 µM microporous polycarbonate membrane filters (Transwell 3402; Costar Corning, New York, NY, USA) and cultured for 72 h to confluence.

Transport assays employing monolayers of BeWo cells were performed based on a modified protocol originated from Crowe et al. [62] using microporous polycarbonate membrane filters (0.4 µm pore size, 12 mm diameter; Transwell 3401; Costar Corning) coated previously with human placental collagen (Sigma-Aldrich). BeWo cells were seeded at density 0.1 × 10⁶ per insert and cultured for 6 days (37 °C /5% CO₂) with daily replacement of cell culture medium. The transepithelial electrical resistance (TEER) was measured using a Millicell® ERS Voltohmmeter (Millipore, Merck) prior to each experiment.

On the day of an experiment, cell monolayers were rinsed with PBS (37 °C), then pre-incubated for 15 min in Opti-MEM with/without the control inhibitors elacridar (2 µM), ritonavir (10 µM), or MK-571 (50 µM). Due to transport of maraviroc by endogenous canine Mdr1 [47], a certain part of the experiments in MDCKII cells were run in the presence of the Mdr1 inhibitor zosuquidar (2 µM), which does not interact with human MRP1 [63]. The assay was started by the addition of [³H]-MVC 0.2 µCi/mL (65 nM) into the apical or basal compartment with regular sampling from the opposite compartment.

Transport of [³H]-MVC was detected by liquid scintillation counting and expressed as percentages calculated from measured values relative to the stock solution. The efflux ratio (ER = Papp_{B-A}/Papp_{A-B}) was calculated within a linear period from values of permeable coefficients (Papp) reached after 2 h of incubation.

Semipermeable membranes were cut out from each well, and cell monolayer was lysed in 0.02 % SDS after the experiment. The accumulation of [³H]-MVC in cells was measured and standardized to total protein.

2.8. Accumulation assay in BeWo and A431 cell lines

BeWo and A431 cells overexpressed -OATP1A2, -1B3, -2A1, -2B1, -3A1, or -4A1 and their appropriate controls were seeded onto a 24-well plate (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) at density 0.3 × 10⁶ cells per well and cultured for 24 h (A431) or 48 h (BeWo) at 37 °C in 5% CO₂. On the day of an experiment, the culture medium was removed and cells were rinsed with PBS (37 °C). The BeWo cells were then incubated for 15 min with Opti-MEM with and without the inhibitors elacridar (2 µM), ritonavir (10 µM), verapamil (100 µM), L-carnitine (1 mM), MK-571 (50 µM), and cold maraviroc at a high concentration (100 µM). In the case of A431 cells, an uptake buffer consisting of 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 12 mM MgSO₄, 5.6 mM D-glucose, and 1 M HEPES (pH 7.4) was prepared and sulfasalazine (100 µM) was used as a control inhibitor. Accumulation was initiated by the addition of [³H]-MVC 0.2 µCi/mL (65 nM) and stopped after 30 min (A431) or 60 min (BeWo) by removing the supernatant. The cells were immediately washed two times with ice-cold PBS (4 °C) and subsequently lysed in 0.2 % SDS. Maraviroc accumulation was measured by liquid scintillation counting of the lysates and normalized to protein levels. None of the applied inhibitory drugs affected viability of the cells, as confirmed by monitoring the cellular confluency and protein content in each well at the end of experiment.

2.9. Inhibitory assays on MRP1-mediated efflux and OATP1B3 and OATP1A2 influx

In order to determine whether maraviroc, elacridar, or ritonavir inhibit MRP1, OATP1B3, or OATP1A2 transporters, the following

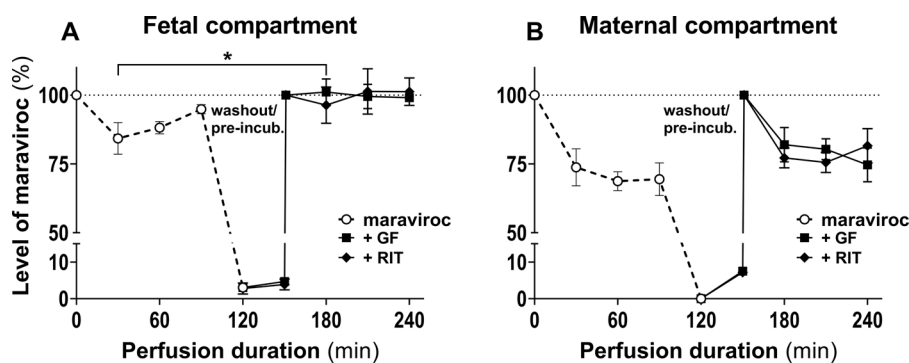


Fig. 1. Transport of maraviroc across human placental cotyledon. **A, B:** Maraviroc (600 ng/mL), shown here as 100 %, was perfused in a closed-circuit setup with the same initial concentration in both fetal (**A**) and maternal (**B**) compartments. Drop of maraviroc levels was observed in both compartments within the first 90 min of the perfusion experiment. Addition of MDR1 inhibitors elacridar (GF, 2 μ M) and ritonavir (RIT, 10 μ M) prevented decrease in maraviroc levels on the fetal but not maternal side (150–240 min) compared to the non-inhibited phase. Time periods 90–120 min and 120–150 min depict the washout and pre-incubation phases, respectively. Data are presented as means \pm SD ($n \geq 3$) and analyzed by Mann–Whitney test (* $p \leq 0.05$).

inhibitory assays were performed:

Inhibitory assay in MDCKII-MRP1 was run as described previously [47]. Cells were seeded on 96-well plates at density 5×10^4 and incubated to full confluence. A preincubation period (15 min) either in pure Opti-MEM or in the presence of a range of maraviroc, ritonavir, and elacridar concentrations (1–50 μ M) or control MRP1 inhibitor MK-571 (50 μ M) preceded an experimental period. The assay was initiated by addition of the fluorescent MRP1 substrate calcein-AM (10 μ M). Relative fluorescent units were measured in 1 min intervals for 30 min, at constant temperature 37 $^{\circ}$ C, using a Genios Plus microplate reader (Tecan, Salzburg, Austria). Efflux response was expressed as the percentage of the concentration at which full inhibition was reached or as a percentage inhibitory effect of model inhibitor. IC_{50} values were determined by nonlinear regression analysis using data fitted onto data points by the GraphPad Prism 8.2.0 program (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Similarly, inhibitory assays were performed on OATP-over-expressing A431 cells as described previously [48]. Briefly, cells grown on 96-well plates were pre-incubated with increasing amounts of inhibitors for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. The assay was started by the addition of fluorescein-methotrexate (1 μ M) for 15 min in the case of OATP1A2 or of Cascade Blue (10 μ M) for 30 min in that of OATP1B3. After several washings with PBS, fluorescence was measured using an EnSpire[®] fluorescent plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Uptake rates were expressed as percentages of uptakes measured in the absence of any inhibitor. IC_{50} values were determined by nonlinear regression analysis using data fitted on data points by the GraphPad Prism 8.2.0 program.

2.10. Maraviroc accumulation assay in fresh villous fragments of human placenta

The study was conducted based on the method developed by SL Greenwood (University of Manchester, UK) and as described previously [35,64,65]. Briefly, 4–5 cubes (1 cm^3) of fresh placental villous tissue were dissected from placenta and rinsed two times in a mixture (1:1) of DMEM and Tyrode's buffer (pH 7.4). Small, fresh villous fragments were cut out and fixed with thread on metal hooks, immersed into DMEM/Tyrode's solution to equilibrate (37 $^{\circ}$ C), and then transferred into pre-incubating solutions of elacridar (2 μ M), ritonavir (10 μ M), MK-571 (50 μ M), and sulfasalazine (100 μ M) for 10 min. Accumulation assay was initiated by transfer of fragments into Tyrode's buffer containing [³H]-MVC 0.2 μ Ci/mL (65 nM) with and without inhibitors. The assay was stopped after 10, 30, 90, 120, or 180 min by twice-washing fragments in non-radioactive solutions of Tyrode's buffer. The fragments were then soaked in distilled water for at least 15 h to lyse the surface trophoblast layer and release accumulated radioactivity. Finally, the placental tissue fragments were cut from the hooks and lysed in 0.3 M NaOH for 10 h at 37 $^{\circ}$ C. The released radioactive maraviroc was quantified by liquid scintillation counting and normalized to total protein levels using the BCA assay. Additional experiments addressing

the possible formation of maraviroc metabolites in the villous tissue were performed by exposing fragments to maraviroc (600 ng/mL), corresponding to the concentration used in placental perfusion study. UHPLC-HRMS analysis for maraviroc metabolites was then performed in the lysates comprising the water solution after 15 h lysis of fragments and in the lysates of the remaining fragmental tissue.

2.11. Statistical analysis

The data obtained are presented as means \pm standard deviations (SD) of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 8.2.0 (GraphPad Software). The p -values were calculated by one-way ANOVA or non-parametric Mann–Whitney test and considered as statistically significant if $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Dual perfusion of human placenta cotyledon

Dual perfusion of human placenta cotyledon in the closed-circuit setup was first performed to verify the contribution of MDR1-mediated efflux to transplacental permeability of maraviroc as the transporter's substrate. After the initial 30 min of perfusion, levels of maraviroc dropped to 86.7 % in the fetal compartment and 73.7 % on the maternal side. The maraviroc levels remained then rather stable on both placental sides, showing, however, slight tendency to increase in the fetal compartment up to 94.9 % at 90 min (Fig. 1A) while slowly decreasing to 69.4 % at 90 min on the maternal side (Fig. 1B). Both added MDR1 inhibitors, elacridar and ritonavir, prevented a drop of maraviroc levels in the fetal compartment (Fig. 1A) but did so only slightly in the maternal compartment (Fig. 1B).

Low concentrations of maraviroc were also found in perfusates at the end of washout (minutes 90–120) and during pre-incubation (minutes 120–150), with slightly higher levels in the maternal compartment. Therefore, faster washout of maraviroc retained in the placental tissue to the maternal circuit is suggested.

No maraviroc metabolites were detected in either the perfusion samples with/without inhibitors or the lysates from fresh villous fragments exposed to maraviroc solutions, thus indicating that the drug was not metabolized during experiments and therefore biotransformation is not responsible for observed changes in maraviroc concentrations in perfusion assays.

3.2. Bidirectional transport and accumulation of maraviroc in BeWo cells

Following the perfusion studies, transport of maraviroc across polarized monolayer of BeWo choriocarcinoma cell line lacking MDR1 expression (Table 1) was employed. Both MDR1 inhibitors, elacridar (2 μ M) and ritonavir (10 μ M), were added with the intent to evaluate possible contributions of placental transport systems other than MDR1

Table 1
mRNA gene expression of studied transporters.

Transporter gene	Placentas	Endothelial cells	Trophoblast cells	BeWo cells
<i>ABCB1</i>	8.5×10^3 (0.08– 1.7×10^4)	0.7×10^2 (0.3– 1.4×10^2)	2.3×10^3 (0.16– 6.4×10^3)	n.d.
<i>ABCC1</i>	4.1×10^3 (0.05– 1.1×10^4)	4.9×10^3 (4.2– 6.3×10^3)	5.3×10^3 (0.16– 1.1×10^4)	2.3×10^3 (1.8– 3.1×10^3)
<i>SLCO1A2</i>	6.3×10^2 (0.4– 6.9×10^3)	2.9×10^2 (2.4– 7.7×10^2)	1.2×10^3 (0.03– 3.4×10^3)	3.6×10^3 (1.5– 4.9×10^3)
<i>SLCO1B1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>SLCO1B3</i>	0.4×10^2 (0.1– 0.8×10^2)	0.1×10^2 (0.02– 1.2×10^2)	1.2×10^2 (0.91– 1.4×10^2)	n.d.
<i>SLCO2A1</i>	9.0×10^3 (0.2– 2.4×10^4)	3.6×10^3 (1.6– 6.7×10^3)	7.6×10^3 (0.21– 2.6×10^4)	5.4×10^2 (3.5– 8.1×10^2)
<i>SLCO2B1</i>	1.1×10^4 (0.12– 2.8×10^4)	0.6×10^2 (0.4– 0.9×10^2)	1.5×10^3 (0.12– 1.7×10^4)	9.7×10^2 (8.3– 16.0×10^2)
<i>SLCO3A1</i>	1.0×10^3 (0.44– 2.1×10^3)	6.7×10^2 (1.1– 2.5×10^2)	3.3×10^3 (0.06– 3.5×10^3)	4.1×10^2 (2.5– 4.7×10^2)
<i>SLCO4A1</i>	3.1×10^3 (0.14– 1.2×10^4)	9.2×10^3 (0.32– 1.4×10^4)	1.6×10^3 (0.65– 4.2×10^3)	1.8×10^4 (1.7– 1.9×10^4)

Data is presented as median (inter-quartile range) of number of gene copies/ μ g of transcribed mRNA; n.d. = not detected.

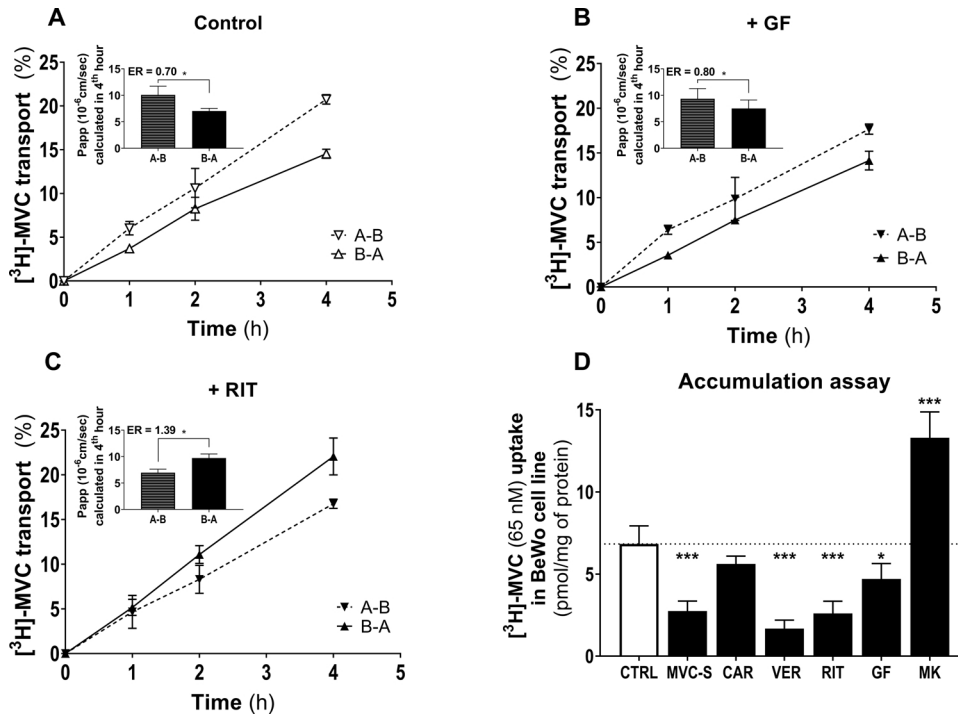


Fig. 2. Bidirectional transport and uptake studies of [3 H]-MVC (65 nM) in BeWo chorioepithelioma cell line. **A:** Uninhibited transport of [3 H]-MVC showing acceleration in apical-to-basolateral (∇ ;A-B) direction. **B:** Effect of elacridar (GF, 2 μ M) on [3 H]-MVC transport showing significant decrease in A-B transport without affecting the (\blacktriangle ; B-A) transport. **C:** Transport of [3 H]-MVC in the presence of ritonavir (RIT, 10 μ M) showing decrease in A-B direction while increasing the B-A transport. **D:** Effect of high (saturable) concentration of maraviroc (MVC-S, 100 μ M), verapamil (VER, 100 μ M), ritonavir (RIT, 10 μ M), elacridar (GF, 2 μ M), and MK-571 (MK, 50 μ M) on accumulation of [3 H]-MVC in BeWo cells. Data are presented as means \pm SD ($n \geq 3$). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA or Mann-Whitney test (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$).

in uptake and/or efflux of maraviroc. The data shows accelerated maraviroc transport in apical-to-basolateral (A-B) relative to basolateral-to-apical (B-A) direction and with ER value of 0.70 (Fig. 2A). Addition of elacridar significantly decreased A-B transport from 20.8%–17.7% ($p < 0.05$) while not affecting the B-A direction, thus resulting in ER value of 0.80 (Fig. 2B). Very interesting activity was observed in the case of ritonavir, which also reduced A-B transport to 16.7% ($p < 0.05$) but increased also B-A transport from 14.5%–22.1%, resulting in ER = 1.39. The primarily preferred direction of maraviroc transfer across BeWo monolayer was thus reversed (Fig. 2C). These results strongly supported the theory of one or more other transporters being involved in maraviroc transport across placental barrier.

Following transport assay, the simple accumulation study in BeWo cells was carried out with the aim of helping to identify the mechanisms contributing to maraviroc permeability (Fig. 2D). Decrease in maraviroc accumulation (2.5-fold) was observed when a high concentration of unlabeled maraviroc (100 μ M) was applied, thus indicating saturation of a transporter-mediated uptake of maraviroc to the cells rather than its efflux. The accumulation of maraviroc in the cells also significantly decreased in the presence of 100 μ M verapamil (4.07-fold), 10 μ M ritonavir (2.63-fold), and 2 μ M elacridar (1.45-fold), suggesting inhibition of an uptake transporter. On the contrary, enhanced (1.95-fold) accumulation was detected in the presence of the ABCCs inhibitor

MK-571 (50 μ M), indicating inhibition of MRPs transporter-mediated maraviroc efflux. The fact that no effect of L-carnitine (1 mM) was observed on maraviroc accumulation excludes a contribution of OCTN1/2 transporters.

3.3. Gene expression of evaluated transporters

A detailed quantitative analysis of mRNA transporter expression for all perfused placentas and BeWo cells along with independent samples from isolated trophoblasts and fetal endothelial cells is summarized in Table 1. As expected, *ABCB1* was detected in all perfused placentas but not in BeWo cells, while *ABCC1* was markedly expressed in placentas and also in BeWo. *SLCO2A1*, *SLCO2B1*, *SLCO3A1*, and *SLCO4A1* were substantially expressed in all the perfused placentas, although a rather lower number of transcripts was detected for *SLCO1A2* and this was only negligible for *SLCO1B3*. BeWo cells showed high levels of *SLCO4A1* and *SLCO1A2* transcripts. Expression analysis of independently isolated trophoblast and fetal endothelial cells showed presence of all evaluated transporters with the exception of *SLCO1B1*, with transcript levels being about one order of magnitude higher for *ABCB1*, *SLCO1A2*, *SLCO1B3*, and *SLCO2B1* in trophoblast than in fetal endothelial cells. Similar substantial levels of *ABCC1*, *SLCO4A1*, and *SLCO2A1* mRNA transcripts were found in trophoblast and fetal endothelial cells.

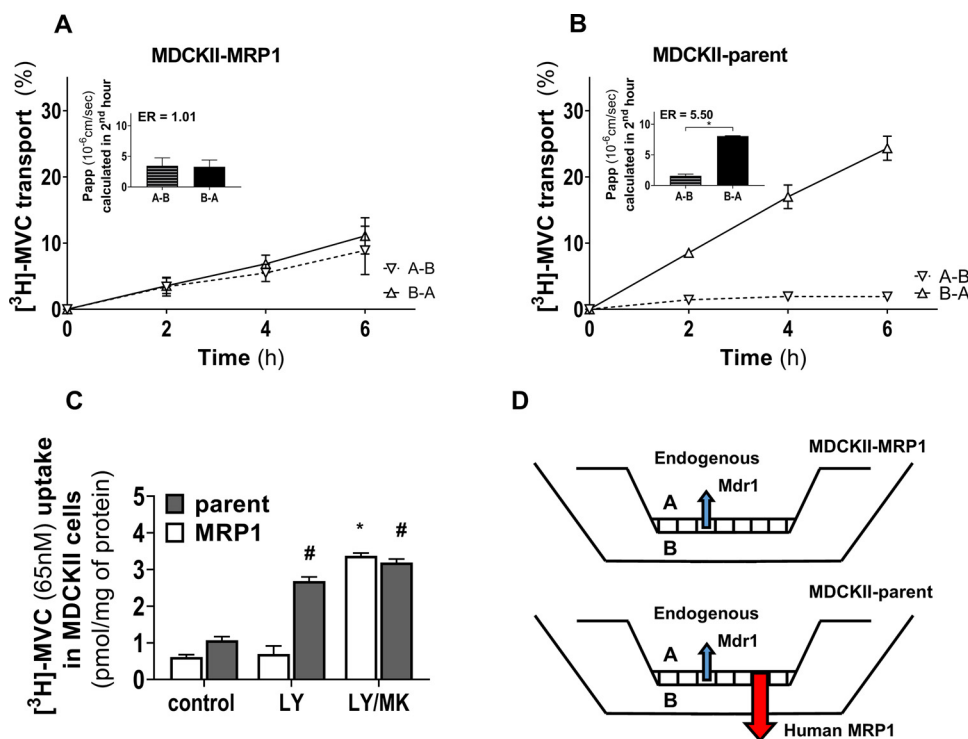


Fig. 3. Transport of [3 H]-MVC (65 nM) across monolayer of MDCKII-MRP1 and -parent cells. **A, B:** Basolateral-to-apical (\blacktriangle ; B-A) transport and apical-to-basolateral (\blacktriangledown ; A-B) transport of [3 H]-MVC across MDCKII-MRP1 (**A**) and MDCKII-parental (**B**) cells was determined. Efflux ratio (ER) was calculated based on permeable coefficient (Papp) values reached after 2 h of the transport. **C:** Effect of Mdr1 inhibitor zosuquidar (LY, 2 μ M) and control MRP1 inhibitor MK-571 (MK, 50 μ M) on maraviroc accumulation in MDCKII-parental and MDCKII-MRP1 cells. **D:** Depiction of endogenous Mdr1 and human MRP1, both interacting with maraviroc in MDCKII and MDCKII-MRP1 cellular models.

3.4. Maraviroc is a substrate of human MRP1

Following through on the evidence from data obtained in previous experiments, interaction of [3 H]-MVC (65 nM, 0.2 μ Ci/mL) with human MRP1 was studied in MDCKII cells. These cells show overexpression of human MRP1 transporter in the basolateral membrane [61], which accelerates the transfer of its substrates from the apical to the basolateral compartment. As shown in Fig. 3B, maraviroc is readily transported through MDCKII parental cells from the basolateral to the apical side (ER = 5.50) by the function of the endogenous Mdr1 transporter [47]. On the other hand, there is no significant basolateral-to-apical transport of maraviroc in MDCKII-MRP1 cells (ER = 1.01), as shown in Fig. 3A. This data results in the high relative ratio ($R_r = ER_{\text{parental}}/ER_{\text{MRP1}}$) of 5.44 when comparing transport in the two tested cell lines and reveals maraviroc to be a substrate of human MRP1. Addition of zosuquidar (2 μ M) showed significant increase in accumulation of maraviroc within monolayers of MDCKII-parental cells, thus reflecting inhibition of endogenous Mdr1. This effect could not be observed in MDCKII-MRP1 due to the retained efflux activity of non-inhibited MRP1 pumping maraviroc out of the cells. Dual addition of zosuquidar and the MRP1 inhibitor MK-571 (50 μ M) resulted in significant increase in maraviroc accumulation within both cell lines (Fig. 3C).

3.5. Maraviroc is a substrate of human OATP1A2 and OATP1B3 but not of OATP2A1, 2B1, 3A1, or 4A1

In vitro uptake of [3 H]-MVC (65 nM, 0.2 μ Ci/mL) was measured in A431 cells overexpressing human placental OATP transporters OATP1A2, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, or OATP4A1 and compared to the respective mock control cells (Fig. 4A). Significantly increased levels of maraviroc were detected in A431-OATP1A2 (1.68-fold) and A431-OATP1B3 (2.21-fold) cells, thereby indicating that maraviroc is a substrate of these transporters. No difference in accumulation of maraviroc was observed in the OATP2A1-, OATP2B1-, OATP3A1-, or OATP4A1-expressing cells. Decrease of maraviroc accumulation in the presence of the OATP inhibitor sulfasalazine (SLF, 100 μ M) in A431-OATP1B3 (Fig. 4B) or -OATP1A2 (Fig. 4C) cells further confirms that maraviroc is a transported substrate

of these two OATPs.

3.6. Accumulation inhibitory assay

Because earlier experiments had revealed maraviroc to be a substrate of MRP1, OATP1A2, and OATP1B3, we further aimed to verify whether the inhibitors elacridar and ritonavir that were used during placental perfusions (Fig. 1) and in BeWo transport and accumulation assays (Fig. 2) could (in addition to MDR1) also affect these transporters.

We found that ritonavir increases accumulation of calcein-AM in MDCKII-MRP1 cells with maximal inhibitory potency at 50 μ M and $IC_{50} = 13.9 \mu$ M (Fig. 5A). No changes were observed in the calcein-AM accumulation when elacridar or maraviroc were present (tested concentration range was 1–50 μ M).

Inhibitory effects of ritonavir, elacridar, and maraviroc toward OATP1A2 or OATP1B3 transporters appear as a decrease of fluorescein-methotrexate or Cascade-Blue hydrazide accumulation in A431-OATP1A2 and A431-OATP1B3 cells, respectively. Ritonavir and elacridar revealed inhibitory activity toward OATP1A2 (IC_{50} of 3.70 μ M and 1.21 μ M, respectively), while only weak OATP1A2 inhibition ($IC_{50} = 72.9 \mu$ M) was calculated for maraviroc (Fig. 5B). Ritonavir revealed also potent inhibition of OATP1B3 ($IC_{50} = 0.82 \mu$ M) in A431-OATP1B3 cells. The same effect was observed with elacridar ($IC_{50} = 3.17 \mu$ M). Maraviroc exhibited no inhibition of OATP1B3 transport, but a low level of activation (37 %) could be observed at high maraviroc concentrations (Fig. 5C).

The inhibition of OATP1A2- and OATP1B3-mediated uptake and MRP1-mediated efflux of maraviroc by ritonavir and elacridar was subsequently confirmed in accumulation assays using inhibitory concentrations corresponding to those from the dually perfused human placenta experiments (Fig. 5D).

3.7. Uptake of maraviroc into fresh villous fragments of human term placenta

Fresh fragments prepared from human placental villous tissue reflect primarily the situation in the maternal-facing syncytiotrophoblast

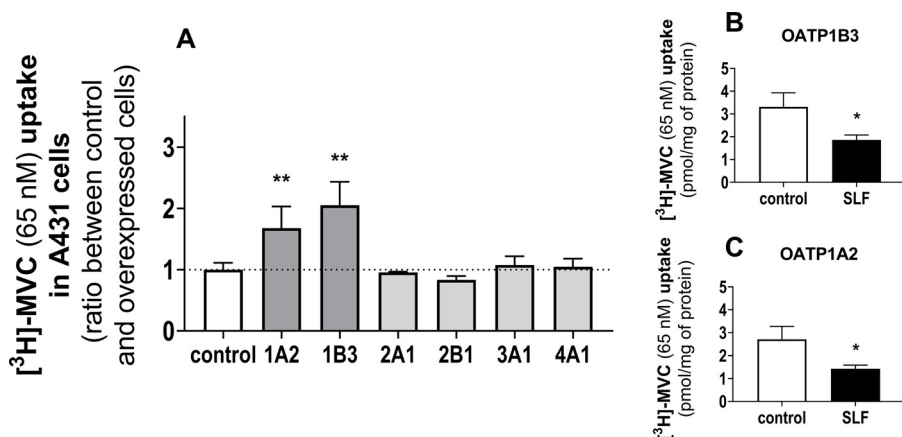


Fig. 4. [^3H]-MVC (65 nM) uptake in A431 cells over-expressing human OATP transporters -1A2, -1B3, -2A1, -2B1, -3A1, and -4A1. **A:** Tested cell lines were incubated in the presence of [^3H]-MVC for 30 min and maraviroc accumulation values reached were compared with results in control cell lines. **B, C:** Effect of OATP inhibitor sulfasalazine (SLF, 100 μM) on maraviroc transport mediated by OATP1A2 or -1B3. Data are presented as means \pm SD ($n \geq 4$). Statistical significance was evaluated by Mann-Whitney test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

layer (Fig. 6D). Accumulation of maraviroc measured in placental fragments bathed in [^3H]-MVC (65 nM) solution showed increase over time (up to 120 min; Fig. 6A). Elacridar (2 μM) and ritonavir (10 μM) were added for 30 min (Fig. 6B) and 90 min (Fig. 6C). Neither of these showed significant effect on accumulation of maraviroc. When more specific OATPs and MRP1 inhibitors, sulfasalazine (100 μM) and MK-571 (50 μM), respectively, were added, significant changes in maraviroc accumulation were observed (Fig. 6B, C)

4. Discussion

More than 10 years have passed since maraviroc was registered by FDA as the first selective blocker of CCR5 receptor for the treatment of R5-tropic HIV-infected adults. During this period, further study of maraviroc's safety and efficiency has produced favorable results and enabled expansion of the drug's usage also to HIV-infected children [41,66]. Due to the unique mechanism of action targeting CCR5, the intense placental expression of which is closely linked to the higher risk of mother-to-child transmission of HIV, and owing to its expected therapeutic benefit also in other non-HIV related indications, it seems probable that maraviroc will more frequently be administered to pregnant women [43–45,67]. Detailed knowledge is therefore needed regarding transplacental transfer of maraviroc and the mechanisms involved. Maraviroc is a quite lipophilic compound ($\log P = 5.80$) [68] and is presumed to cross biological membranes easily *via* passive diffusion. We have recently described this antiretroviral as a substrate of human MDR1 and, using a rat placental model, demonstrated the role for rat Mdr1 in preventing maraviroc's penetration from mother to fetus [47]. A possible contribution of ABC transporters in placental handling of maraviroc in humans has already been suggested by a study showing accelerated fetal-to-maternal clearance of maraviroc in an open-circuit perfusion setup, albeit without providing any direct proof, such as by pharmacological inhibition [69]. Here, we employed dual *ex vivo* perfusion of a human placental cotyledon in a closed-circuit setup, which limits transfer of drug *via* passive diffusion and emphasizes transporters activity. The contribution of placental MDR1 was demonstrated through rapid drop of maraviroc concentration on the fetal side after 30 min of perfusion (Fig. 1A), which was prevented by the MDR1 inhibitors ritonavir (10 μM) and elacridar (2 μM). To the best of our knowledge, this is the first time that functional involvement of human MDR1 has been shown in maraviroc distribution across placental barrier. Based on the known active efflux capability of the microvillous membrane, the amount of maraviroc transferred from the fetal compartment would be expected to appear on the maternal side. On the contrary, even more-pronounced decline in maraviroc levels was observed in the maternal circulation, and no significant increase was observed with the presence of inhibitor (Fig. 1B). The decline in maraviroc concentration on both sides of perfused placenta raised the

question as to where does the escaping maraviroc appear? Having excluded possible adherence of maraviroc to the perfusion tubes and other plastic lab ware, we checked also for the occurrence of known maraviroc metabolites in perfusates and homogenized placental tissue. Although maraviroc has been described as a subject of biotransformation through CYP3A4 and CYP3A5 isoenzymes in the liver [70,71], no maraviroc metabolites were detected in our perfusates or tissue lysates, reflecting probably the too-low biotransformation activity of placental tissue [72] and a too-short perfusion time of the tissue to enable significant formation of metabolites.

The unexpected behavior of maraviroc during the human placental perfusions and partly hidden effect of MDR1-mediated efflux differ considerably from observation in rat placenta, where we had described robust contribution of rat Mdr1 in transplacental transfer of maraviroc, correlating also with only low levels of maraviroc (less than 2%) retained in rat placental tissue [47]. Unlike the findings in rat, maraviroc seems to be retained within the human placenta, as up to 10 % of the maraviroc was released from the tissue to the perfusates (in particular in maternal compartment) after pre-incubation periods, when placenta was perfused by maraviroc-free buffer with inhibitors. These observations from human placenta perfusions thereby indicate the involvement of some other storage and/or transport mechanism(s) in placental handling of maraviroc.

In order to identify those membrane transporters possibly contributing to the placental handling of maraviroc and diminishing the impact of MDR1-mediated maraviroc efflux as shown in the *ex vivo* placenta perfusion study, several cell-based models were employed. Because the human choriocarcinoma BeWo cell line mimics placental trophoblast layer *in vitro* but shows no expression of *ABCB1* [5,17 and Table 1], it served as an ideal model for fast, initial screening (Fig. 2). Among the applied inhibitors, MK-571, inhibiting efflux provided by MRP transporters, significantly increased maraviroc accumulation in BeWo cells. Based on the accelerated transport of maraviroc in the apical-to-basolateral direction across polarized monolayers of BeWo cells, the basolaterally located MRP1 was suggested as the MRP transporter most probably involved. Indeed, subsequent transport assays across the monolayers of MDCKII-MRP1 cells revealed maraviroc to be a MRP1 substrate (Fig. 3).

Complementary accumulation studies in MDCKII-MRP1 cells (Fig. 3C) further revealed high preference of maraviroc for MRP1- rather than endogenous canine Mdr1-mediated efflux, which drives the transport in the opposite direction. This observation leads to a very interesting conclusion in the context of our recent study, wherein we describe a much stronger tendency for maraviroc to interact with the canine endogenous Mdr1 variant than with human MDR1 transporter in MDCKII-MDR1 cells [47]. Considering these two findings and the fact that transport experiments in MDCKII-MDR1 cells in our previous study and in MDCKII-MRP1 here were carried out under the identical

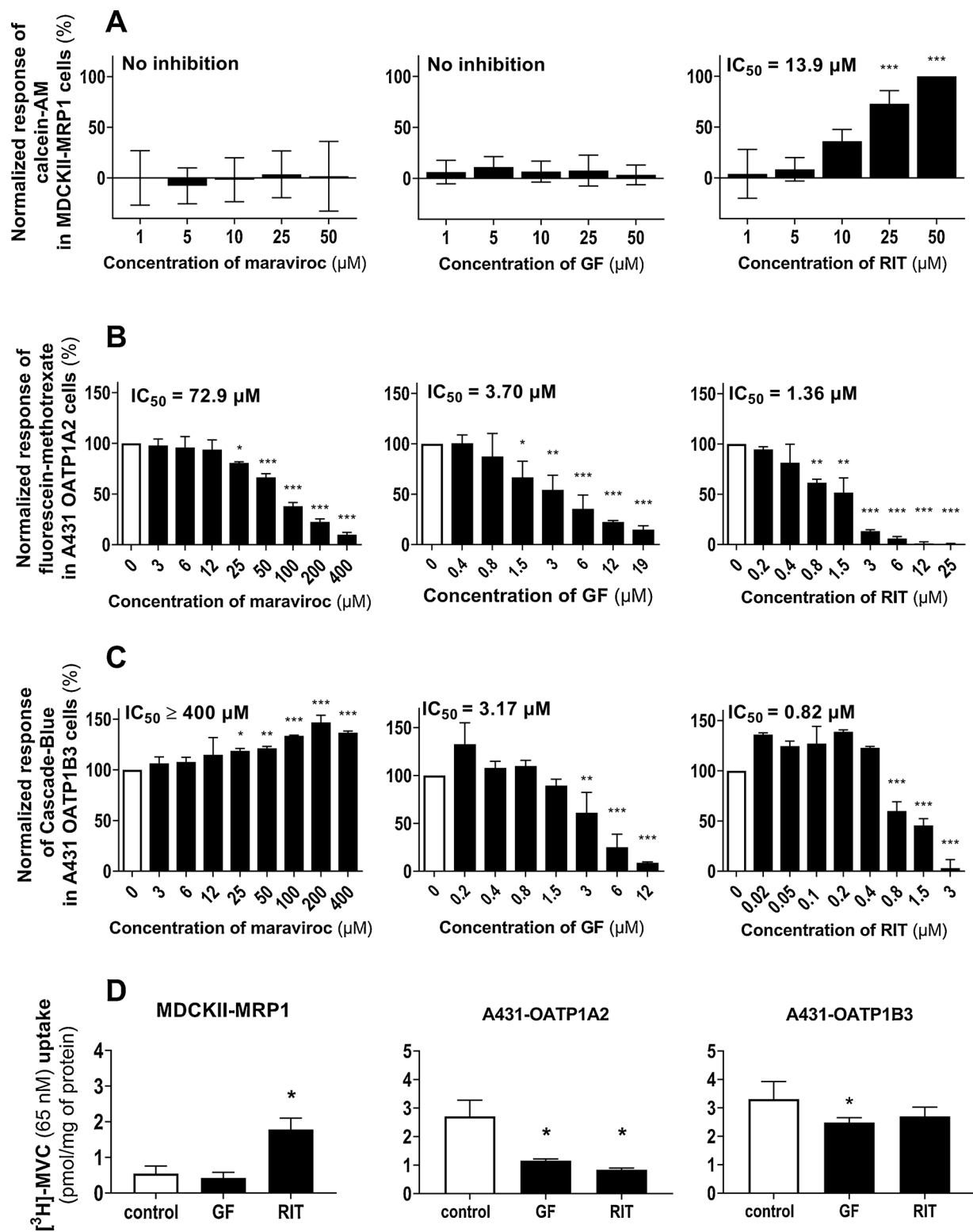


Fig. 5. Inhibitory assay in MDCKII-MRP1, A431-OATP1A2, and -1B3 cells. **A:** Changes in accumulation of fluorescent MRP1 substrate calcein-AM in MDCKII-MRP1 cells in the presence of tested inhibitors maraviroc, ritonavir, and elacridar. **B:** Effect of maraviroc, elacridar, and ritonavir on fluorescein-methotrexate uptake in A431-OATP1A2 cells. **C:** Uptake of Cascade Blue hydrazide in A431-OATP1B3 in presence of maraviroc, ritonavir, and elacridar. **D:** Effect of elacridar (GF, 2 μM) and ritonavir (RIT, 10 μM) on accumulation of [³H]-MVC (65 nM) in MDCKII-MRP1, A431-OATP1A2 and -1B3 cells. Data are presented as means \pm SD ($n \geq 3$). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA and Mann-Whitney test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

protocol, we can suggest rather higher affinity of maraviroc to human MRP1 than to human MDR1.

Interestingly, when a high concentration of maraviroc (100 μM) was applied in BeWo cells, it led to significant decrease in maraviroc

accumulation, thus indicating saturation of uptake rather than an efflux transport mechanism. Similar decrease of maraviroc uptake was observed also with the application of nonspecific inhibitors ritonavir and verapamil. Published data showing maraviroc affinity to human

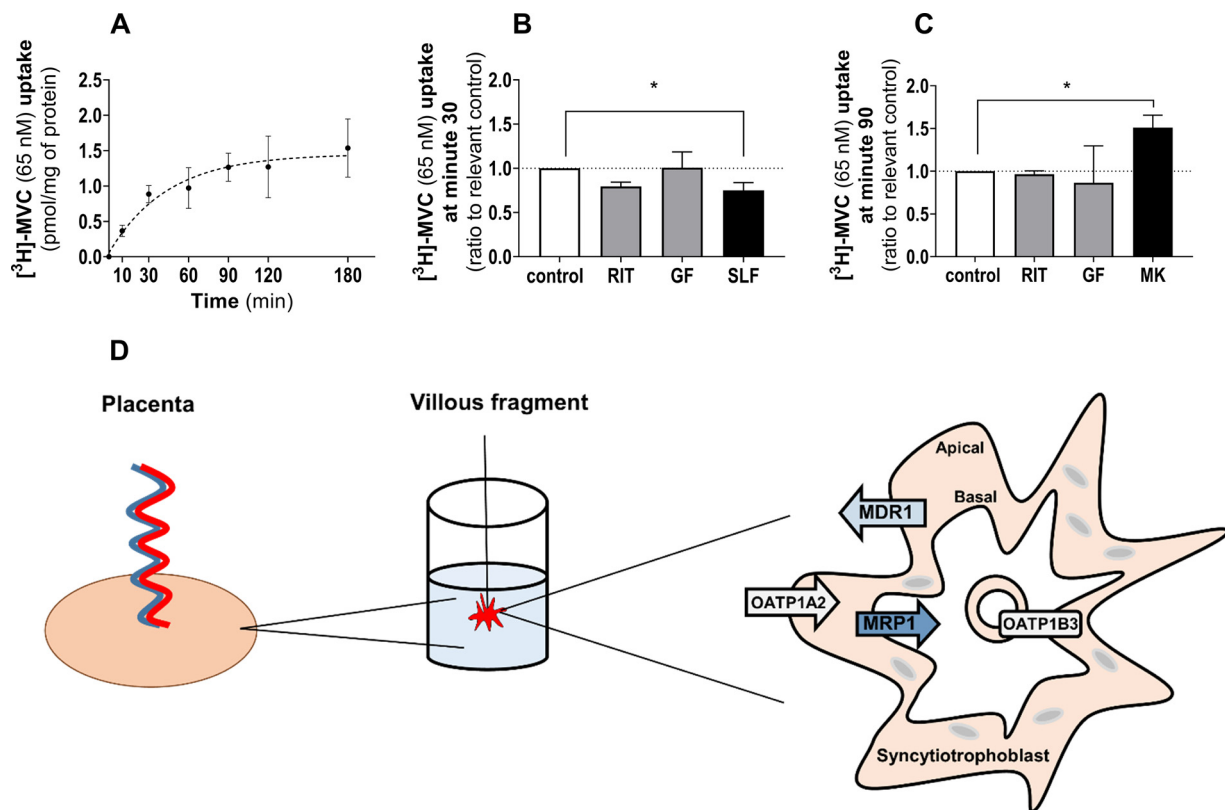


Fig. 6. Uptake of [³H]-MVC (65 nM) into fresh villous fragments of human term placenta.

A: Time-dependent accumulation of maraviroc in fresh villous placental fragments. **B, C:** Accumulation of maraviroc in presence of elacridar (GF, 2 μ M), ritonavir (RIT, 10 μ M), and sulfasalazine (SLF, 100 μ M) is shown at minute 30 (**B**) and at minute 90 (**C**) in presence of MK-571 (MK, 50 μ M). **D:** Illustration of the experimental setup showing transporters involved in transfer of maraviroc in syncytiotrophoblast. Data are presented as means \pm SD ($n \geq 4$). Statistical significance was evaluated by Mann-Whitney test ($*p \leq 0.05$).

OATP1B1 [73] and maraviroc-induced inhibition of uptake of the nonspecific OATPs fluorescent substrate 8-(2-[fluoresceinyl]aminoethylthio)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-FcAMP) into BeWo cells [74] suggest the possible involvement of a member of the OATP transporter family.

Based upon the mRNA expression profile of OATP transporters in all perfused placentas (Table 1), *in vitro* studies were carried out in several A431 cell lines overexpressing OATP transporters to evaluate the interaction of maraviroc and the inhibitors used with these uptake transporters.

The accumulation assays revealed uptake of maraviroc by OATP1A2 and OATP1B3 when applied at low (65 nM) concentration. This effect obviously remained hidden in the experimental setup of a recent study that evaluated maraviroc in micromolar concentrations only using OATP1B3-transfected HEK 293 cells [75]. The number of OATP1A2 encoding mRNA transcripts (*SLCO1A2*) found in trophoblast cells was comparable to the expression of MDR1 (*ABCB1*) and MRP1 (*ABCC1*), while the expression of OATP1B3 encoding gene *SLCO1B3* was one order of magnitude lower. Expression of *SLCO1B3* more than one order of magnitude lower compared to that of *SLCO1A2* was found also in the perfused placental tissue and in isolated fetal trophoblast cells, indicating that OATP1B3 can play a less important role in placental transfer of maraviroc than does OATP1A2. Significant expression of *SLCO1A2* was revealed also in BeWo cells, thus indicating OATP1A2 to be the OATP member most probably responsible for the observed uptake of maraviroc to the BeWo cells (Fig. 2D). Decreased uptake was then observed in the presence of elacridar, ritonavir, and higher concentration of maraviroc, the inhibitors of OATP1A2 as demonstrated in inhibitory assays using OATPs overexpressing A431 cells (Fig. 5B). Since verapamil is also a potent inhibitor of OATP1A2 [76], significant

decrease in maraviroc accumulation in BeWo cells in the presence of verapamil can be also attributed to inhibited OATP1A2-mediated uptake. These findings help to explain not only maraviroc's behavior during accumulation in BeWo cells, but also the drop of maraviroc levels in maternal perfusates and their consequent increase after the washout and pre-incubation period during placental perfusions, in which inhibition of the OATP-mediated uptake obviously enables releases of accumulated maraviroc from the tissue.

Identification of maraviroc as a substrate of other placental transporters helps to explain its accelerated transport in the apical-to-basolateral direction observed in BeWo cell monolayers. These indicate vectorial transport of maraviroc provided by OATP1A2-mediated influx in the apical membrane followed by MRP1-mediated efflux across the basolateral membrane (Fig. 2A). Elacridar (GF) blocked only the apically expressed OATP1A2 transporter, thereby decreasing the apical-to-basolateral transport of maraviroc while having no effect on basolateral-to-apical transport (Fig. 2B). In contrast, ritonavir, inhibiting both OATP1A2 and MRP1, as shown in Fig. 5A,B, enabled higher permeability of maraviroc in the basolateral-to-apical direction (Fig. 2C).

Time-dependent accumulation of maraviroc was then shown in fresh villous placental fragments representing primarily the situation in syncytiotrophoblast as depicted in Fig. 6D. The absence of significant effect of ritonavir or elacridar may be caused by inhibition not only of OATP1A2 and MRP1, but also of MDR1 expressed in the apical membrane (Fig. 6D). The contribution of OATP1B3 to this transport is probably only marginal, because, in spite of the protein staining described in the vasculosyncytial membrane [31], only very low expression was found in the placental tissue, as well as in isolated trophoblasts and endothelial cells.

In summary, here we identified for the first time maraviroc as a

substrate of three different transporters – MRP1, OATP1A2, and OATP1B3 – while excluding its interaction with OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, and indirectly also with OCTN transporters. Viewed in the context of MRP1 and OATP expression in human placental tissue, isolated trophoblasts, and fetal endothelial cells, our data can contribute to a better understanding of maraviroc transplacental pharmacokinetics and the drug's safety during pregnancy. In addition to the novel findings presented here, we question the generally accepted concept that considers MDR1 substrates always as compounds with diminished maternal-to-fetal transfer. By the example of maraviroc, we describe a situation wherein MDR1 activity was likely surpassed by the interplay of other placental transporters, the greatest contribution to which we attribute to MRP1 and OATP1A2. In contrast to the localization of MDR1 in the apical membrane, MRP1 was found in basal membrane of polarized cells with the oppositely oriented transport direction [77]. Basolateral localization of MRP1 has been confirmed in trophoblast cells [17,18,78] and reported also in fetal endothelial cells [18]. Therefore, we assume bidirectional flow of maraviroc toward placental interstitium provided by the MRP1-mediated efflux and further encouraged by OATP1A2- and, to a lower extent, also by OATP1B3-mediated uptake. This theory actually corresponds with our perfusion data and, consequently, it is not in conflict with the low umbilical-cord-to-maternalblood ratio of maraviroc (0.33) reported by Colbers et al. [42]. Obviously, the impact of transporters interplay on transplacental drug transfer depends on the preferential affinity of the drug to the particular transport proteins and on the transporter expression profile across the pregnancy. Interestingly and in line with our hypothesis, the well-known MRP1 substrate saquinavir showed low penetration to fetus and retention within the placental tissue up to only 1.6 % in a study using an open-circuit placenta perfusion experiment in the maternal-to-fetal direction [79]. Subsequently, it was found to be a high affinity substrate of MDR1 and MRP2 [61], the transporters providing efflux on the apical microvillous membrane back to maternal circulation and thereby overwhelming potential MRP1-mediated transport of saquinavir in the opposite direction. Interestingly, reduction of saquinavir transport in the fetal-to-maternal direction by as much as 43 % observed in other study, when MK-571 was added to the perfusion buffer [80], could be explained as inhibition of MRP1 efflux activity in fetal endothelial capillaries. Since MRP1 expression is significantly increased by the end of gestation compared to at mid-gestation [81,82] while MDR1 is known to follow the opposite pattern [83], the contribution of MRP1 might be increased by the end of gestation. Indeed, Coles et al. have suggested that gestational-induced changes in the transporters lead to greater uptake of saquinavir into mice placenta at term [81]. Taking all these findings together, it seems that the MRP1-mediated flux of maraviroc to the placenta is ensured in particular by the end of pregnancy and that similar behavior might obviously be expected in many other MRP1 substrates. Even though MRP1 is known to transport several endogenous compounds, it is not yet clear what role it fulfils when leading to the retention of its substrates within the placental tissue. We could speculate that by the end of pregnancy the inner placental tissue might serve as space for disposal storage and additional protection of the fetus and its mother shortly before delivery, during which the organ is released. This hypothesis might be further supported by findings of high levels of methylmercury in placentas of women exposed to this toxin during pregnancy, as it, too, recently was identified as an MRP1 substrate [84,85]. Detailed studies would be needed to consider the possibility that additional drugs described as MRP1 substrates could be retained in human placental tissue when possessing lower affinity to efflux transporters localized in the trophoblast microvillous membrane. Importantly, when evaluating the maternal-to-fetal transfer of drugs and other xenobiotics, the involvement of additional placental transporters and their interplay affecting the permeability of an investigated compound must be borne in mind and considered critically.

Funding

This study was supported by the Charles University (PRIMUS/20/MED/010 and SVV 260 549), the Grant Agency of the Charles University GAUK (616216/C/2016), and by EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF. Lenka Tupova is the holder of Martina Roeselova Memorial Fellowships 2019 and Csilla Özvegy-Laczka received grant support from the National Research, Development and Innovation Office (OTKA, grant number FK 128751) and the János Bolyai fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

CRediT authorship contribution statement

Lenka Tupova: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Birgit Hirschmugl:** Investigation, Writing - review & editing. **Simona Sucha:** Investigation, Formal analysis. **Veronika Pilarova:** Investigation. **Virág Székely:** Investigation. **Éva Bakos:** Methodology. **Lucie Novakova:** Resources, Formal analysis, Supervision. **Csilla Özvegy-Laczka:** Resources, Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing. **Christian Wadsack:** Resources, Methodology, Supervision, Writing - review & editing. **Martina Ceckova:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Marian Kacerovsky and Martina Hudeckova (both from the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital in Hradec Kralove, Czech Republic) and Bettina Amtmann and Petra Winkler (Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Graz) for providing us with human placentas and for help with human placenta collection. We are also thankful to Dana Souckova for her skillful technical assistance in isolating fresh placental villous fragments.

References

- [1] C. Cao, M.D. Fleming, The placenta: the forgotten essential organ of iron transport, *Nutr. Rev.* 74 (7) (2016) 421–431.
- [2] S. Lager, T.L. Powell, Regulation of nutrient transport across the placenta, *J. Pregnancy* 2012 (2012) 179827.
- [3] K. Vahakangas, P. Myllynen, Drug transporters in the human blood-placental barrier, *Br. J. Pharmacol.* 158 (3) (2009) 665–678.
- [4] N. Tetro, et al., The placental barrier: the gate and the fate in drug distribution, *Pharm. Res.* 35 (4) (2018) 71.
- [5] M. Ceckova, et al., Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (1-2) (2006) 58–65.
- [6] L. Hahnova-Cygalova, M. Ceckova, F. Staud, Fetoprotective activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2): expression and function throughout pregnancy, *Drug Metab. Rev.* 43 (1) (2011) 53–68.
- [7] F. Staud, M. Ceckova, Regulation of drug transporter expression and function in the placenta, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 11 (4) (2015) 533–555.
- [8] K.M. Giacomini, et al., Membrane transporters in drug development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (3) (2010) 215–236.
- [9] M.J. Zamek-Gliszczynski, et al., Transporters in drug development: 2018 ITC recommendations for transporters of emerging clinical importance, *Clin. Pharmacol. Ther.* 104 (5) (2018) 890–899.
- [10] EMA, Guideline on the Investigation of Drug Interactions, Available at <https://www.ema.europa.eu/en/investigation-drug-interactions> . Accessed (2019/10/16) (2012).
- [11] FDA, Guidance for Industry, Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-drug-interaction-studies-study-design-data-analysis-and-clinical-implications-guidance> . Accessed (2019/10/16) (2017).
- [12] L.H. Cygalova, et al., Transplacental pharmacokinetics of glyburide, rhodamine 123, and BODIPY FL prazosin: effect of drug efflux transporters and lipid solubility,

- J. Pharmacol. Exp. Ther. 331 (3) (2009) 1118–1125.
- [13] E. Pollex, A. Lubetsky, G. Koren, The role of placental breast cancer resistance protein in the efflux of glyburide across the human placenta, *Placenta* 29 (8) (2008) 743–747.
- [14] F. Ushigome, et al., Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein, *Eur. J. Pharmacol.* 408 (1) (2000) 1–10.
- [15] Meyer zu, H.E. Schwabedissen, et al., Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation, *Drug Metab. Dispos.* 33 (7) (2005) 896–904.
- [16] J. Behravan, M. Piquette-Miller, Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3 (6) (2007) 819–830.
- [17] D.E. Atkinson, et al., Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 285 (3) (2003) C584–91.
- [18] M. Nagashige, et al., Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast, *Placenta* 24 (10) (2003) 951–958.
- [19] S. Al-Enazy, et al., Placental control of drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 116 (2017) 63–72.
- [20] X. Huo, K. Liu, Renal organic anion transporters in drug-drug interactions and diseases, *Eur. J. Pharm. Sci.* 112 (2018) 8–19.
- [21] H. Koepsell, Role of organic cation transporters in drug-drug interaction, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 11 (10) (2015) 1619–1633.
- [22] A. Turkova, B. Zdravil, Current advances in studying clinically relevant transporters of the solute carrier (SLC) family by connecting computational modeling and data science, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17 (2019) 390–405.
- [23] D. Kovacsics, I. Patik, C. Ozvegy-Laczka, The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13 (4) (2017) 409–424.
- [24] M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch, OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLC0 and SLC22A gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.* 165 (5) (2012) 1260–1287.
- [25] E.M. Lofthouse, et al., Glutamate cycling may drive organic anion transport on the basal membrane of human placental syncytiotrophoblast, *J. Physiol.* 593 (20) (2015) 4549–4559.
- [26] K. Sato, et al., Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta, *Placenta* 24 (2-3) (2003) 144–148.
- [27] K. Lahjouji, et al., L-Carnitine transport in human placental brush-border membranes is mediated by the sodium-dependent organic cation transporter OCTN2, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287 (2) (2004) C263–9.
- [28] M. Grube, et al., Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the trans epithelial transport of steroid sulfates in human placenta, *Drug Metab. Dispos.* 35 (1) (2007) 30–35.
- [29] C. Prouillac, S. Lecoeur, The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies, *Drug Metab. Dispos.* 38 (10) (2010) 1623–1635.
- [30] N. Walker, et al., Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences, *Biol. Reprod.* 96 (4) (2017) 733–742.
- [31] H. Wang, et al., Alteration in placental expression of bile acids transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 in intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Arch. Gynecol. Obstet.* 285 (6) (2012) 1535–1540.
- [32] X. Wu, et al., Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta, *Biochim. Biophys. Acta* 1466 (1-2) (2000) 315–327.
- [33] Z. Neumanova, et al., Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCG2; role in transport across the placenta, *AIDS* 28 (1) (2014) 9–17.
- [34] Z. Neumanova, et al., Role of ABCB1, ABCG2, ABCG2 and ABCG5 transporters in placental passage of zidovudine, *Biopharm. Drug Dispos.* 37 (1) (2016) 28–38.
- [35] Z. Neumanova, et al., Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir, *Reprod. Toxicol.* 57 (2015) 176–182.
- [36] L. Cervený, et al., Interactions of protease inhibitors atazanavir and ritonavir with ABCB1, ABCG2, and ABCG2 transporters: effect on transplacental disposition in rats, *Reprod. Toxicol.* 79 (2018) 57–65.
- [37] J. Reznicek, et al., Etravirine inhibits ABCG2 drug transporter and affects transplacental passage of tenofovir disoproxil fumarate, *Placenta* 47 (2016) 124–129.
- [38] J. Volmink, B. Marais, *HIV: mother-to-child transmission*, *BMJ Clin. Evid.* 2008 (2008).
- [39] AIDSinfo, Panel on Treatment of Pregnant Women With HIV Infection and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Transmission in the United States. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf>. Accessed (2019/08/14) (2019).
- [40] K. Rough, et al., Birth outcomes for pregnant women with HIV using tenofovir-emtricitabine, *N. Engl. J. Med.* 378 (17) (2018) 1593–1603.
- [41] AIDSinfo, Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of Children Living With HIV. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection, Available at <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>. Accessed (2019/08/14) (2019).
- [42] A. Colbers, et al., Maraviroc pharmacokinetics in HIV-1-infected pregnant women, *Clin. Infect. Dis.* 61 (10) (2015) 1582–1589.
- [43] S. Piconi, et al., Impact of prolonged maraviroc treatment on non-AIDS-related comorbidities in HIV-positive patients: a retrospective cohort study, *J. Antimicrob. Chemother.* 74 (9) (2019) 2723–2731.
- [44] J.R. Blanco, L. Ochoa-Callejero, Off-label use of maraviroc in clinical practice, *Expert Rev. Anti. Ther.* 14 (1) (2016) 5–8.
- [45] L. Fantuzzi, et al., Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders, *Cell. Mol. Life Sci.* 14 (1) (2019) 5–8.
- [46] S.M. Woollard, G.D. Kamoghe, Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 5447–5468.
- [47] L. Tupova, et al., Interactions between maraviroc and the Abcb1, Abcg2 and Abcc2 transporters: an important role in transplacental pharmacokinetics, *Drug Metab. Dispos.* 47 (9) (2019) 954–960.
- [48] I. Patik, et al., Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 2630.
- [49] E. Bakos, et al., A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2, *FEBS J.* 287 (12) (2019) 2468–2485.
- [50] I. Patik, et al., Functional expression of the 11 human organic anion transporting polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate, *Biochem. Pharmacol.* 98 (4) (2015) 649–658.
- [51] L. Mathiesen, et al., Quality assessment of a placental perfusion protocol, *Reprod. Toxicol.* 30 (1) (2010) 138–146.
- [52] S. Perazzolo, et al., The influence of placental metabolism on fatty acid transfer to the fetus, *J. Lipid Res.* 58 (2) (2017) 443–454.
- [53] H. Schneider, M. Panigel, J. Dancis, Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114 (6) (1972) 822–828.
- [54] K. Annola, et al., Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta, *Toxicol. Lett.* 182 (1-3) (2008) 50–56.
- [55] S. Abel, et al., Effects of CYP3A4 inhibitors on the pharmacokinetics of maraviroc in healthy volunteers, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65 (Suppl. 1) (2008) 27–37.
- [56] E. Tseng, et al., Biosynthesis and identification of metabolites of maraviroc and their use in experiments to delineate the relative contributions of cytochrome P4503A4 versus 3A5, *Drug Metab. Dispos.* 46 (5) (2018) 493–502.
- [57] I. Lang, et al., Human fetal placental endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential, *Differentiation* 76 (10) (2008) 1031–1043.
- [58] J. Loegl, et al., GDM alters paracrine regulation of fetoplacental angiogenesis via the trophoblast, *Lab. Invest.* 97 (4) (2017) 409–418.
- [59] R. Karahoda, M. Ceckova, F. Staud, The inhibitory effect of antiretroviral drugs on the L-carnitine uptake in human placenta, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 368 (2019) 18–25.
- [60] D. Cihalova, et al., Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCG1 in vitro, *Biochem. Pharmacol.* 98 (3) (2015) 465–472.
- [61] G.C. Williams, et al., Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2), *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (11) (2002) 3456–3462.
- [62] A. Crowe, J.A. Keelan, Development of a model for functional studies of ABCG2 (breast cancer resistance protein) efflux employing a standard BeWo clone (B24), *Assay Drug Dev. Technol.* 10 (5) (2012) 476–484.
- [63] S. Modok, H.R. Mellor, R. Callaghan, Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (4) (2006) 350–354.
- [64] D.E. Atkinson, et al., MDR1 P-gp expression and activity in intact human placental tissue; upregulation by retroviral transduction, *Placenta* 27 (6-7) (2006) 707–714.
- [65] S.L. Greenwood, C.P. Sibley, In vitro methods for studying human placental amino acid transport placental villous fragments, *Methods Mol. Med.* 122 (2006) 253–264.
- [66] J.M. Weehuizen, et al., Efficacy and safety of long-term maraviroc use in a heterogeneous group of HIV-infected patients: a retrospective cohort study, *Int. J. Antimicrob. Agents* 54 (2) (2019) 215–222.
- [67] H. Behbahani, et al., Up-regulation of CCR5 expression in the placenta is associated with human immunodeficiency virus-1 vertical transmission, *Am. J. Pathol.* 157 (6) (2000) 1811–1818.
- [68] PubChem. National Institutes of Health (NIH), Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maraviroc#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient> Accessed (2019/08/13). 2019; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maraviroc#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>.
- [69] C. Vinot, et al., Placental transfer of maraviroc in an ex vivo human cotyledon perfusion model and influence of ABC transporter expression, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (3) (2013) 1415–1420.
- [70] R. Hyland, et al., Maraviroc: in vitro assessment of drug-drug interaction potential, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66 (4) (2008) 498–507.
- [71] Y. Lu, et al., CYP3A5 genotype impacts maraviroc concentrations in healthy volunteers, *Drug Metab. Dispos.* 42 (11) (2014) 1796–1802.
- [72] M. Pasanen, The expression and regulation of drug metabolism in human placenta, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (1) (1999) 81–97.
- [73] M. Siccardi, et al., Maraviroc is a substrate for OATP1B1 in vitro and maraviroc plasma concentrations are influenced by SLC01B1 521 T > C polymorphism, *Pharmacogenet. Genomics* 20 (12) (2010) 759–765.
- [74] T. Nabekura, et al., Effects of antiviral drugs on organic anion transport in human placental BeWo cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (12) (2015) 7666–7670.
- [75] E. Kimoto, et al., Mechanistic evaluation of the complex drug-drug interactions of maraviroc: contribution of cytochrome P450 3A, P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide 1B1, *Drug Metab. Dispos.* 47 (5) (2019) 493–503.
- [76] S. Rebello, et al., Intestinal OATP1A2 inhibition as a potential mechanism for the effect of grapefruit juice on aliskiren pharmacokinetics in healthy subjects, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68 (5) (2012) 697–708.
- [77] E.M. Leslie, R.G. Deeley, S.P. Cole, Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204 (3) (2005) 216–237.

- [78] E. Bakos, L. Homolya, Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1), *Pflügers Arch.* 453 (5) (2007) 621–641.
- [79] F. Forestier, et al., Maternal-fetal transfer of saquinavir studied in the ex vivo placental perfusion model, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185 (1) (2001) 178–181.
- [80] M.M. Rahi, et al., The effect of probenecid and MK-571 on the fetomaternal transfer of saquinavir in dually perfused human term placenta, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (5) (2009) 588–592.
- [81] L.D. Coles, et al., Distribution of saquinavir, methadone, and buprenorphine in maternal brain, placenta, and fetus during two different gestational stages of pregnancy in mice, *J. Pharm. Sci.* 98 (8) (2009) 2832–2846.
- [82] L. Pascolo, et al., Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (1) (2003) 259–265.
- [83] M. Ceckova-Novotna, P. Pavek, F. Staud, P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function, *Reprod. Toxicol.* 22 (3) (2006) 400–410.
- [84] K. Ask, et al., Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women, *Environ. Health Perspect.* 110 (5) (2002) 523–526.
- [85] E. Straka, et al., Mercury toxicokinetics of the healthy human term placenta involve amino acid transporters and ABC transporters, *Toxicology* 340 (2016) 34–42.