

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. Liliom Károly, PhD, tudományos főmunkatárs,
Dr. Tátrai Péter, PhD, Senior kutató

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

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 enzimesalád tagjai: CYP1A2, 2B6, 2C8/9/19, 2D6, 2E1, 3A4/5/7) működéséhez köthető. 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. Az OATP-k membránfehérjék, amelyek működésük révén nagyméretű, szerves molekulák sejtekbe történő felvételét segítik elő. Az ismert tizenegy humán OATP közül az OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérje van jelen a májsejtekben. Az OATP1B1 és OATP1B3 máj-specifikus, az OATP2B1 kifejeződik a májban, a vékonybélben, a vér- vagy gát sejtjeiben, a méhlepényben, a szívben és a vázizomban is. 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) 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. A tumorokban megváltozott expressziót mutató OATP-k ígéretes rák-terápiás célpontok.

A mérgeanyagok sejtekből való eltávolítását nagyrészt az ABC családba tartozó multidrog transzporter (MDR-ABC) fehérjék végzik. 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.

2. Célkitűzés

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 egy 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 által.
3. A Cascade Blue hidrazid (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 életképesség vizsgálatokban. *In vivo* kísérletekhez alkalmas Ct-OATP1B3-V1-et termelő sejtvonal előállítása.

3. Módszerek

A431 és MDCKII sejtvonalak létrehozása és fenntartása

Transzpozon alapú génbevitel (A431-OATP2B1, MDCKII-ABCG2)

Az A431-OATP2B1, valamint MDCKII-ABCG2 sejtvonalak transzpozon alapú génbevitel révén készültek el, melyhez a Sleeping Beauty (SB) transzpozáz által felismert nukleotid repeatek között az OATP2B1/ABCG2 cDNS-t hordozó vektorokat a csoport korábbi munkái során hozta létre.

A pSB-OATP2B1, illetve pSB-CMV-ABCG2 vektorokról a célgénnel együtt egy-egy puromicin rezisztenciát kialakító gén is átíródik, melynek segítségével kiválogathatók azok a sejtek, amelyekbe az OATP2B1, vagy ABCG2 cDNS-e beépült. A sikeresen transzfektált A431-OATP2B1/MDCKII-ABCG2 sejteket a pSB-OATP2B1/pSB-CMV-ABCG2 vektorokról a célgénnel együtt átíródo, puromicin rezisztenciát kialakító gén működése által feldúsítottuk.

Lentivirális transzdukció

Az MDCKII-MRP2 sejtvonala már a csoport korábbi munkája során elkészült, és így rendelkezésünkre állt.

Az OATP1B1, OATP1B3 és OATP1A2 A431 sejtekben való overexpressziója lentivirális transzdukció segítségével történt. Az OATP1B1 MDCKII parentális, MDCKII-MRP2, illetve MDCKII-ABCG2 sejtekben történő expresszióját szintén rekombináns lentivírusok által értük el. 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 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 μ l LDG/2-4*10⁶ sejt) tovább dúsítottuk, így létrehozva magas OATP funkcióval rendelkező sejtvonalatokat.

Western blot

A431/MDCKII sejtekben, vagy mélyfagyasztott xenograft mintákban a célfehérjék expresszióját Western blot technika segítségével ellenőriztük.

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

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

Az MRP2, ABCG2, illetve kontroll fehérjék cDNS-ét hordozó transzfer vektorokat és a rekombináns bakulovírusokat a kutatócsoport készítette a korábbi munkák során, így az én feladatom 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, amelyeket a fertőzést követően 72 órával gyűjtöttük össze, majd a sejtekből membránt preparáltunk. Az ABCG2 IOV-eket a maximális ABCG2 aktivitás elérése érdekében koleszterinnel töltöttük.

Transzport kísérletek Sf9 IOV membránokon

A transzport kísérletekben 150 µl végtérfogatban 50 µg membrán vezikulát és 4 mM MgATP/MgAMP-t inkubáltam transzport pufferben (6 mM MgCl₂, 40 mM 4-morfolinpropánszulfonsav-Tris (pH 7,0), 35 mM KCl). Gátlószeres kísérletek során 2 mM nátrium-ortovanadátot (Vi), 10 mM EDTA-t vagy 1 µM végkoncentrációban Ko143-at adtam a vezikulákhoz. A reakció kezdeteként 10-10 µl, transzport pufferben hígított fluoreszcens szubsztrátot adagoltam a fentiekhez az alábbi végkoncentrációkban: 1 µM szulforodamin 101 (SR101)/fluoreszcein-metotrexát (FMTX), 5 µM piranin/CB, 10 µM Lucifer Yellow (LY), vagy 0,2 µl/cső Zombie Violet (ZV)/Live/Dead Violet (LDV)/Live/Dead Green (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. A reakció leállítását követően a minták fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk.

Transzport kísérletek A431 és MDCKII sejtekben áramlási citometriával

$5 \cdot 10^5$ A431/MDCKII sejtet 100 μ l végtérfogatban megfelelő pH értékű transzport pufferben hígított fluoreszcens szubsztrát jelenlétében inkubáltam rázatott 37°C vízfürdőben. 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.

Piranin, CB és SR101 toxikusságának vizsgálata áramlási citometriával

Az MDCKII sejteket CB, piranin vagy SR101 jelenlétében 30 percig inkubáltuk 37°C rázatott vízfürdőben. A reakciót jég hideg 1 x PBS-ben oldott propídiium-jodid (PI, CB és piranin esetén) vagy 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.

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, Alexa Fluor 405 (AF405), piranin, SR101, FMTX) idő-, koncentrációfüggő, vagy gátlószerek jelenlétében történő felvételét 96 lyukú lemezekon teszteltem. A kísérleteket megelőző napon a sejteket komplettált DMEM-ben osztottam ki a lemezekre. 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 (különböző koncentrációjú) gátlószer jelenlétében előinkubáltam. Ezután a sejtekhez hozzáadtam 50 μ l pH 5,5/7,4 transzport pufferben oldott fluoreszcens OATP szubsztrátot, amellyel 10-60 percig inkubáltam a sejteket 37°C-on. A sejtek fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk.

Transzcelluláris transzport kísérletek

A transzcelluláris transzport vizsgálatokhoz transwell inzerteken polarizáltatott, MDCKII Kontroll, MDCKII-OATP1B1, MDCKII-MRP2, MDCKII-ABCG2, MDCKII-

OATP1B1-MRP2 vagy MDCKII-OATP1B1-ABCG2 sejtet alkalmaztunk. A vizsgálatokhoz a szubsztrátokat a bazolaterális/apikális oldalon adagoltuk, gátlószeres kísérletek esetén Ciklosporin A vagy Benzbromaron bazolaterális vagy apikális oldali egyidejű hozzáadásával. A 37°C-on 30 percig folytatott reakciókat az inzertek körüli transzport puffer eltávolításával és 1 ml pH 5,5 transzport pufferben (a magasabb OATP1B1 funkció érdekében) oldott fluoreszcens szubsztrát hozzáadásával indítottuk. A transzcelluláris transzport során az apikális kompartmentből 5 percenként 30 µl mintát vettünk. A minták fluoreszcencia intenzitását Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban detektáltuk.

A transzcelluláris transzport ellentétes irányból való vizsgálatához a reakciót a bazolaterális helyett az apikális oldalról indítottuk a szubsztrátok hozzáadásával.

A piranin intracelluláris akkumulációjának meghatározásához egy 30 perces bazolaterális-apikális irányú transzcelluláris transzport kísérletet követően feltártuk a sejteket, majd a felszabaduló fluoreszcencia intenzitását fluoreszcens lemezolvasó segítségével detektáltuk.

Sejt életképességi vizsgálatok

A Ct-OATP1B3-V1 variáns A431 sejtek kemoterápiás szerekre való érzékenyítő képességét sejt viabilitási kísérletekben teszteltem. 96 lyukú lemezre kiosztott sejteket kezeltem terápiás szerekkel az alábbi maximális koncentrációkban: 0,1 µM MTX, 1000 µM kapecitabin, 10 µM irinotekán/5-FU, 40 µM oxaliplatin. 144 órán keresztül steril, 37°C, 5% CO₂ körülmények között tartó inkubációt követően a sejtek életképességét PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) módszer segítségével ellenőriztük Perkin Elmer fluoreszcens lemezolvasóban.

In vivo kísérletek

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

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 10^6 sejtet 200 μ l-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 tumorméreték változásának bemutatásához az adatok átlagát \pm SEM ábrázoltuk.

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 állapították meg (n=7). Az A431 tumor sejtek beinjektálása anesztetizált állatokba történt. A kísérlet végén az állatokat izoflurános altatásban nyaki diszlokációval eutanáziában részesítették, és a tumorokat eltávolították.

Adatok kiértékelése és statisztika

Kísérleteink során a transzport, illetve 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 vizsgálatakor 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

1. Meghatároztam a szükséges beállítási paramétereket egy új, fluoreszcencia alapú mérés fejlesztéséhez, amely az OATP-k működésének vizsgálatára alkalmas (Patik et al., 2018).
2. Igazoltuk, hogy az új fluoreszcens módszer alkalmazása esetén a CB és AF405 festékek optimálisak az OATP1B1 és OATP2B1, illetve OATP1B3 transzporterek funkcionális vizsgálatára. Valamint, a módszer validálásával bizonyítottam, hogy az alkalmas a hepatikus OATP-k gyógyszer kölcsönhatásainak tesztelésére (Patik et al., 2018).
3. Az új fluoreszcens módszer segítségével további OATP-gyógyszer kölcsönhatásokat mutattam ki a maraviroc, valamint ritonavir antivirális vegyületekre (Tupova et al., 2020).
4. Megállapítottam, hogy a piranin a hepatikus OATP-k új fluoreszcens szubsztrátja (Szekely et al., 2020).
5. Létrehoztam OATP1B1 és MRP2/ABCG2 transzportereket együttesen overexpresszáló sejtvonalakat (Szekely et al., 2020).
6. Új, fluoreszcens, az OATP és ABC transzporterekre közös szubsztrátokat azonosítottam, amelyek alkalmasak lehetnek az ABCG2 fehérje gyógyszer kölcsönhatásainak vizsgálatára fordított orientációjú vezikuláris (IOV) rendszerben (Szekely et al., 2020).
7. Az új, közös fluoreszcens OATP-ABC transzporter szubsztrátokra (piranin, CB, SR101) alapozva beállítottam egy új fluoreszcens transzcelluláris transzport mérési módszert, amely alkalmas az OATP1B1 és MRP2 transzporterek gyógyszer kölcsönhatásokban való egyidejű vizsgálatára (Szekely et al., 2020).
8. Az új, közös fluoreszcens OATP-ABC transzporter szubsztrátokról megállapítottam, hogy nem toxikusak a sejtekre az alkalmazott kísérleti körülmények között (Szekely et al., 2020).

9. A tumor-specifikus Ct-OATP1B3-V1 izoformáról igazoltam, hogy a hosszú típusú OATP1B3 fehérjéhez hasonló transzport funkcióra képes FMTX és LDG fluoreszcens szubsztrátok esetén.
10. Bizonyítottam, hogy a Ct-OATP1B3-V1 *in vitro* körülmények között érzékenyíti a sejteket 5-fluorouracillal, metotrexáttal, oxaliplatinnal és kapecitabinnal szemben.
11. Létrehoztunk olyan, Ct-OATP1B3-V1 fehérjét erősen kifejező A431 sejtvonalat, amely NOD-SCID nőtény egerekben xenograftok létrehozására alkalmas.
12. Igazoltuk, hogy az A431 xenograftok az egerekből való eltávolítást követően is detektálható Ct-OATP1B3-V1 expressziót mutattak, így a későbbiekben alkalmasak lehetnek az *in vitro* vizsgált terápiás szerek tesztelésére *in vivo*.

5. Következtetések

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

Új gyógyszer forgalomba hozatala előtt feltétlenül szükséges tisztában lenni annak farmakokinetikai tulajdonságaival, amelyet a transzporterek (megváltozott) működése vagy gyógyszer kölcsönhatások létrejötte jelentősen befolyásolhat. Ezért nemzetközi szervezetek (FDA, EMA, PMDA, ITC) javasolják gyógyszer transzporterek vizsgálatát a gyógyszer fejlesztés korai szakaszában.

A transzporterek gyógyszer kölcsönhatásokban való tesztelésére már több direkt vagy indirekt módszer létezik. Ilyenek lehetnek a 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 calcein AM felvételén alapuló módszert MDR1 és MRP-k esetében, vagy a Hoechst 33342, DyeCycle Violet, illetve PhenGreen festéket már rutinszerűen alkalmazzák az ABC multidrogt transzporterek vizsgálatában.

Az utóbbi évtizedben több fluoreszcens vegyületet is azonosítottak OATP1B szubsztrátként (pl. nátrium-fluoreszcein, vagy FMTX), azonban ezek az anyagok a kismértékű stabilitásuk, és a rájuk alapozott módszerek kisebb érzékenysége miatt kevésbé alkalmasak nagy mennyiségű vegyület tesztelésére. Doktori munkám során részt vettem a kutatócsoport az irányú munkájában, amelynek célja egy olyan új fluoreszcens

módszer megalkotása volt, mely alkalmas az OATP-k és velük potenciálisan kölcsönható vegyületek, például gyógyszer kölcsönhatások vizsgálatára. Sejt impermeábilis fluoreszcens OATP szubsztrát festékeket sikerült azonosítani, amelyek ráadásul használhatóak OATP-ket nagy mennyiségben termelő sejtek kiválogatására. További feladatunk volt a módszer szakirodalomból ismert OATP interakciós molekulák segítségével történő validálása.

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. Így az OATP-kre kidolgozott fluoreszcens módszerünk megfelelő alternatívája lehet a radioligand alapú teszteknek.

Az új fluoreszcens módszer(ek) és a létrehozott sejtvonalak jelentőségét mutatja, hogy kutatócsoportunk az elmúlt években számos megkeresést kapott, amelynek következtében OATP-kkel potenciálisan kölcsönható vegyületek tesztelését végeztük el. Egy 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, de az általunk tesztelt anyagok OATP-k általi transzportjáról még kevés adat állt rendelkezésre. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a maraviroc és ritonavir az OATP1A2 FMTX, valamint OATP2B1 CB felvételét koncentrációfüggő módon gátolta, ami az OATP1B3 esetén is elmondható a ritonavirról. Érdekes módon az OATP1B3 CB felvételét a maraviroc fokozta, a külföldi kutatócsoport pedig radioaktív 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. Emellett korábbi adatok alapján az OATP1B3 funkcióját a ritonavir antivirális vegyület is gátolja, és az OATP1A2 ennek a szernek a vér-agy gáton való átjutását is befolyásolhatja. 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. Korábban például az OATP1B1 rutin általi fokozott DHEAS transzportját, vagy az OATP1B3 klotrimazol általi megnövekedett EG transzportját, továbbá az OATP2B1 DHEAS, illetve E1S

transzportjának prosztaglandin A1, valamint A2 általi, vagy progeszteron általi stimulációját is leírták, mely jelenségeket a különböző kötőhelyek meglétével magyaráztak.

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. 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. 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 a hepatikus OATP-kkel 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. További IOV kísérletek során bizonyítottuk, hogy az ABCG2 általi ATP-függő LDV, illetve CB transzport az ismert ABCG2 inhibitor, Ko143 által felfüggeszthető. A fluoreszcens jel 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 kedvezőbb jel/zaj arányt mutatott.

Az MRP2 működésének vizsgálatára IOV-ben fluoreszcens vegyületek közül eddig a kolil-l-lizil-fluoreszceint (CLF) és az 5-(6)-karboxi-2',7'-diklorofluoreszceint (CDF) 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, így alkalmas gyógyszer kölcsönhatások vizsgálatára.

A szakirodalomban már találhatunk közös OATP1B és MRP2 fluoreszcens szubsztrátokat, például a FMTX, CLF, vagy CDF származékok. Viszont ezeket a vegyületeket nem vizsgálták dupla transzfektáns sejtvonalakban. Egyetlen olyan fluoreszcens szubsztrát, a Fluo-3 ismert, amelynek az egyik hepatikus OATP, az OATP1B3, valamint MRP2 általi transzcelluláris transzportját kimutatták. Azonban a hepatocitákban legnagyobb mennyiségben jelenlevő OATP1B1 nem transzportálja a Fluo-3 festéket, ráadásul a Fluo-3 fluoreszcens jelének detektálásához Ca^{2+} indikátor lévén többlet Ca^{2+} adagolása szükséges. 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. Az egyik hepatikus OATP egy variánsa, a Ct-OATP1B3-V1 bizonyítottan megjelenik több daganattípusban (például kolorektális, hasnyálmirigy, tüdőrák). Az ott betöltött szerepe azonban egyelőre tisztázatlan, és az is vitatott, hogy egyáltalán működőképes fehérjévé válik-e. 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. A V1 esetében azonban a citosztatikumok közvetlen hatását még nem vizsgálták. A Ct-OATP1B3-V1 rákspecifikus izoforma bizonyítottan megjelenik kolorektális rákban. A vastagbél tumorok kezelésére több daganatellenes szert

(kapecitabin, oxaliplatin, 5-fluorouracil, irinotekán) alkalmaznak. Ezek leginkább az úgynevezett FOLFIRI (fólsav, 5-fluorouracil, irinotekán), FOLFOX (fólsav, 5-fluorouracil, 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, sejt életképességi 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. 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. Emellett a fehérje magasabb expresszióját a hosszabb betegségmentes-, illetve teljes túléléssel is összefüggésbe hozták. Sun és munkatársai 97 CRC-vel (colorectal cancer, kolorektális rák) diagnosztizált beteg rákos OATP1B3 mRNA expressziós jellemzőit vizsgálva megállapították, hogy a rákos OATP1B3 mRNA magas expressziója jobb túléléssel függ össze. Lockhart és munkatársai a korai stádiumú kolorektális tumorokban magas OATP1B3 expressziót figyeltek meg, mely a tumor stádium növekedésével csökkent. Emellett megfigyeléseik szerint a magasabb OATP1B3 expresszió az 5-éves túléléssel is korrelált.

Fentiekkel ellentétben, az OATP1B3 egyik allél variánsáról (SLCO1B3 334GG/699AA) bizonyították, hogy csökkent tesztoszteron transzportot okoz, és jobb túléléssel korrelál a prosztatatarákos megbetegedések esetén. Ez alapján feltételezik, hogy az OATP1B3 általi fokozott tesztoszteron felvétel segíti a tumor proliferációt. A tumor sejtekben azonban a transzport funkción kívül más szerepe is lehet a rák specifikus OATP1B3-nak. A Pgp (MDR1) például több daganatos sejtben intracellulárisan előfordulva képes megakadályozni az apoptózist, még ATP-függő efflux hiányában is, ami azt jelenti, hogy antiapoptotikus funkciója a transzporter aktivitásától független. Korábban megfigyelték, hogy vastagbél-tumor-eredetű sejtekben az OATP1B3 a p53 jelátviteli útvonal gátlásán keresztül túlélési előnyhöz juttatta a sejteket. Azt is kimutatták, hogy a p53 gátló hatás

transzport aktivitás függő. 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 sejtvonal (A431) kiválasztása, valamint a LDG segítségével történő, magas OATP-expressziójú sejtvonal létrehozása. A V1 működőképességének igazolása és az *in vitro* kísérletek során tapasztalt érzékenyítés bizonyos kemoterápiás szerekkel szemben (kapecitabin, oxaliplatin és metotrexát) felveti annak lehetőségét, hogy a fehérjét megcélozva, az azt magasan expresszáló daganatos sejtek hatékonyan elpusztíthatók legyenek.

6. Saját publikációk jegyzéke

Patik, I., **Szekely, V.**, Nemet, O., Szepesi, A., Kucsma, N., Varady, G., . . . 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(1), 2630.
doi:10.1038/s41598-018-20815-1

Szekely, V., Patik, I., Ungvari, O., Telbisz, A., Szakacs, G., Bakos, E., & Ozvegy-Laczka, C. (2020). Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *Eur J Pharm Sci*, 151, 105395.
doi:10.1016/j.ejps.2020.105395

Tupova, L., Hirschmugl, B., Sucha, S., Pilarova, V., **Szekely, V.**, Bakos, E., . . . Ceckova, M. (2020). Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta. *Biomed Pharmacother*, 129, 110506.
doi:10.1016/j.biopha.2020.110506