

**SEMMELWEIS EGYETEM**

**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2596.**

**WINDT TÍMEA**

**Patobiokémia**  
című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

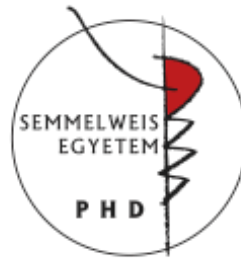
Témavezető: Dr. Szakács Gergely, tudományos főmunkatárs

# Uptake és efflux transzporterekkel kölcsönható vegyületek azonosítása robotizált platformon

Doktori értekezés

**Windt Tímea**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, MD PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Krajcsi Péter, DSc, tudományos munkatárs  
Dr. Jemnitz Katalin, PhD, vezető kutató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi János, PhD, egyetemi igazgató  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Laki András, PhD, egyetemi adjunktus  
Dr. Papp Gergő, PhD, tudományos munkatárs

Budapest  
2021

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Bevezetés .....	7
2.1. Transzporterek és szerepük a gyógyszerfejlesztés során .....	7
2.2. Daganatos megbetegedések és kezelésük .....	11
2.3. Kemoterápiás kezelés során kialakult multidrog rezisztencia (MDR) .....	13
2.4. ABC transzporter szupercsalád .....	15
2.4.1. ABCB1 és szerepe a multidrog rezisztenciában .....	19
2.4.2. ABCG2 és szerepe a multidrog rezisztenciában .....	21
2.5. Az SLC szupercsalád .....	22
2.5.1. OATP2B1 transzporter fehérje .....	23
2.6. MDR leküzdésére irányuló stratégiák .....	25
2.7. HTS a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában .....	28
3. Célkitűzések .....	30
4. Anyagok és módszerek .....	31
4.1. Felhasznált vegyületek .....	31
4.2. Sejtvonalak és tenyésztésük .....	31
4.3. Fluoreszcens fehérje expresszióján alapú és reagens alapú citotoxicitási esszé .....	32
4.4. HTS-kompatibilis <i>in vitro</i> szűrési platform .....	33
4.5. Statisztikai analízis .....	33
4.6. NCI DTP <i>in silico</i> screening .....	33
4.7. <i>In vitro</i> vegyületkölcsonhatás vizsgálata .....	34
4.8. Kombinációs kölcsönhatás analízise Chou Talalay CI-módszer segítségével .....	35
4.9. Mikrolemmez-alapú uptake esszé .....	36
4.10. Cascade Blue uptake meghatározása áramlási citométer segítségével .....	37
5. Eredmények .....	38
5.1. Kokultúrán alapuló fluoreszcens esszé kialakítása efflux és uptake transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálatára .....	38
5.1.1. Fluoreszcens transzportert expresszáló és parentális sejtpárok kialakítása HTS toxicitási kísérletekhez .....	38
5.1.2. Az ABCB1 és ABCG2 transzportert expresszáló A431 és Mes-Sa/Dx5 sejteket tartalmazó kokultúra-modell Prestoblue reagenssel történő validációja .....	

.....	44
5.1.3. A kialakított szűrési rendszer NCI DTP Onkológiai készleten történő validációja .....	45
5.1.4. OATP2B1 uptake transzporterrel való kölcsönhatás azonosítására alkalmas HTS rendszer létrehozása.....	53
5.2. Vegyületkombináció vizsgálata: COX-2 gátlószer vizsgálata a rezisztencia kialakulásának megakadályozására .....	57
6. Megbeszélés.....	61
6.1. HTS-kompatibilis kokultúrán alapuló <i>in vitro</i> szűrési platform ABCB1 és ABCG2 efflux és OATP2B1 uptake transzporterrel való kölcsönhatás vizsgálatára.....	62
6.2. Kombinált kezelésben használt vegyületek kölcsönhatásának automatizált vizsgálata.....	68
7. Következtetések.....	71
8. Összefoglalás .....	72
Summary .....	73
9. Irodalomjegyzék .....	74
10. Saját publikációk jegyzéke.....	105
11. Köszönetnyilvánítás.....	106

## 1. Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP-kötő kazetta
ADME-Tox	abszorpció-disztribúció-metabolizmus-exkréció-toxicitás
AML	Akut myeloid leukémia
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozin-trifoszfát
BBB	vér-agy gát
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CB	Cascade Blue festék
CHO	kínai hörcsög ovárium sejtvonal
CI	kombinációs index
COX-2	ciklooxygenáz-2
CS	járolékos érzékenység
DDI	gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatás
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-féle medium
DMSO	dimetil-szulfoxid
eGFP	fokozott zöld fluoreszcens fehérje
FACS	Fluoreszcencia aktivált sejt szortírozás
FDA	Amerikai Élelmezési és Gyógyszerügynökség
HTS	Nagy-áteresztőképességű szűrés

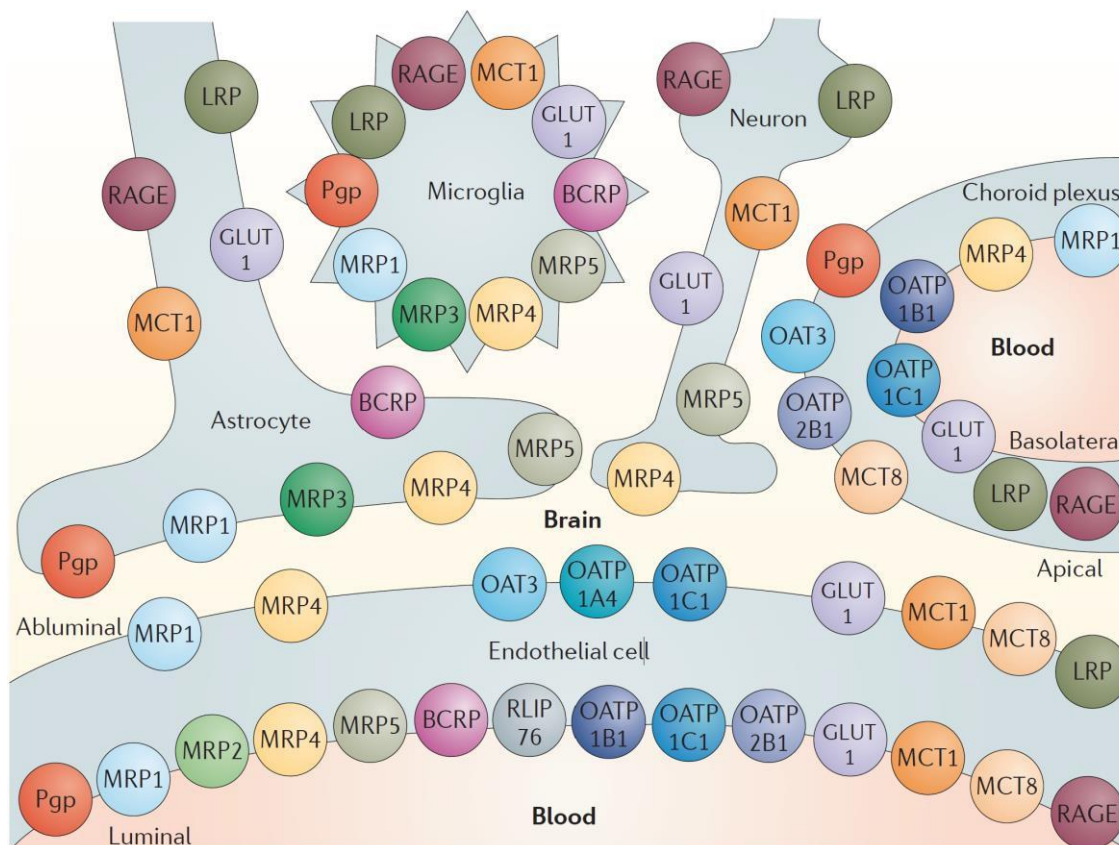
IC <sub>50</sub>	Félmaximális gátló koncentráció
MAF	Multidrog rezisztencia Aktivitási Faktor
mCh	mCherry fluoreszcens fehérje
MDR	multidrog rezisztencia
mOr	mOrange fluoreszcens fehérje
NBD	nukleotid-kötő domén
NCI DTP	Nemzeti Rákkutató Intézet Fejlesztési Terápiás Programja
NCI-60	National Cancer Institute 60 sejtvonal panel
OATP	Organikus Anion Transzporter Polipeptid
PCC	Pearson korrelációs koefficiens
Pgp	P-glikoprotein
RR	rezisztencia hányados
SLC	Solute Carriers (oldott anyag transzporter)
SR	szelektivitási hányados
TMD	transzmembrán domén
TQ	tariquidar

## 2. Bevezetés

### 2.1. Transzporterek és szerepük a gyógyszerfejlesztés során

A sejtek intracelluláris, sejtszintű és szöveti szintű felosztása alapvető fontosságú az élő szervezetek működésének szempontjából. Komplex fizikai akadályrendszerük szabályozza a xenobiotikumok és az endogén molekulák szöveti és sejtes expozícióját. A szervezeten belüli barrierek elválasztó és egyben összekötő funkciójának biztosításáról számos membrán transzporter gondoskodik, amelyek különböző transzportfolyamatok révén biztosítják a szükséges anyagok felvételét és eltávolítását. Ugyanezek a rendszerek módosíthatják a xenobiotikumok abszorpcióját, disztribúcióját, metabolizmusát, exkrécióját és toxicitását (ADME-Tox). A barrierek jellemzően szoros sejtközi összeköttetésekkel rendelkeznek az epitheliális és/vagy vaszkuláris endoteliális rétegekben, amelyek korlátozzák a molekulák paracelluláris transzportját, védelmi vonalat képezve a test vagy szövet potenciálisan mérgező anyagoknak való kitettségétől. Egy gyógyszermolekulának általában több sejtmembránon is át kell jutnia ahhoz, hogy elérje célpontját. A kicsi, nettó töltés nélküli lipofil molekulák nagyobb valószínűséggel hatnak át a gátakon, mint azok, amelyek töltéssel rendelkeznek és hidrofilek. Funkciójuktól függően a membrántranszporterek fokozhatják, vagy korlátozhatják a gyógyszerek barriereken történő átjutását (1). Az aktív transzport jelentős szerepet tölt be a központi idegrendszer védelmében (BBB, vér-agy gát) is. Az endotélsejtek közötti, „tight junction” -nak nevezett összeköttetések korlátozzák a vízben oldódó vegyületek szabad mozgását a szomszédos sejtek közt. Ezen a paracelluláris gáton, vagyis a sejtek közötti anyagáramlás megakadályozásán túl az endotélsejtekben az endocitózis és a transzcitózis is igen alacsony szintű (transzcelluláris gát), ami gátolja a vegyületek citoplazmán keresztüli transzportját. Az agyi endotélsejtekben acetilkolin észterázok, monoamin oxidázok, alkalikus foszfatázok,  $\gamma$ -glutamil transzpeptidázok is találhatóak, amelyek a metabolikus gát kialakításában vesznek részt, a membránban helyet foglaló transzporter fehérjék táplálék- és energiaellátást biztosítják, illetve az idegi működés számára káros anyagokat távolítják el a központi idegrendszerből (2) (1. ábra). A BBB paracelluláris, transzcelluláris, és metabolikus gátja, illetve az efflux pumpák által alkotott négyeszeres védvonalak az idegsejtek szinapszisainak működéséhez

elengedhetetlen ionos homeosztázis megteremtése mellett részt vesz az agy tápanyagokkal való ellátásában, az aktív pumparendszere révén a xenobiotikumok és metabolitok eltávolításában (3).



**1. ábra:** Proteinszinten kimutatott transzporter fehérjék lokalizációja a vér-agy gát különféle sejtjeiben. BCRP = breast cancer resistance protein, ABCG2; GLUT1 = glucose transporter-1; LRP = low-density lipoprotein receptor-related protein; MCT = monocarboxylic acid transporter; Mrp = multi-drug resistance protein; Oat = organic anion transporter; Oatp = organic anion transporting polypeptide; P-gp = P-glycoprotein; RAGE = receptor for advanced glycation end products; RLIP76 = Ral-binding protein-1, (4, 5) nyomán

A gyógyszerek sejtekbe való bejutásának módját a vegyület lipidekben való oldhatósága, mérete, polarizáltságuk mértéke és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságok határozzák meg. A gyógyszer sejtekbe történő jutásának első gátját a plazmamembrán jelenti. Sok kemoterápiás szer gyenge bázis, hidrofób, 7.4 és 8.2 közötti pK értékkel, ezért is merült fel a sejtmembránon keresztüli passzív diffúzió lehetősége (6). A passzív transzport koncentrációgradiensnek megfelelő irányú diffúzióval, de „flip-flop”



mechanizmus révén is történhet. A membránok olyan dinamikus lipidstruktúrák, ahol a specifikus foszfolipid fajták aszimmetrikusan oszlanak meg (7). A plazmamembrán lipidprofilja adott sejttípusra jellemző tulajdonság, szövetenként eltér, és a sejt fiziológiai funkciójától függ (8). Lipidfrakciójukban foszfatidinsav származékok, glikolipidek, szfingolipidek és koleszterin található. A koleszterin a sejtmembrán merevségéért, a telítetlen foszfolipidek pedig a sejtmembrán fluiditásáért felelnek (9, 10). A gliko- és szfingolipidek, valamint a koleszterin egymás iránti erős affinitása következtében a sejtmembránban olyan membránrégiók, ún. „lipid-tutajok” alakulnak ki (11), amelyek szervezett lipidösszetételűek, és az integrált membránproteinek stabilizálásának specifikus platformjaiként működnek (12). A szerkezeti szerepen kívül a lipidek megfelelő mikrokörnyezetet is biztosítanak a membránproteinek kapcsolódásához (13). A membránfehérjék felelősek a membrán fizikai stabilizálásáért, a membrán-csatornákon és transzportereken keresztüli szállításért, egyesek részt vesznek szignál transzdukcióban, enzimatisz szerepet is játszhatnak (14-16). A rákos sejtek lipidösszetételénél sajnos nincs olyan specifikus lipidprofil, amely megkülönböztetné őket a nem rosszindulatú sejtektől (17-19). Ugyanakkor lipidösszetételük ingadozik a sejt fiziológiai állapotától függően, például a metasztázisra készülő sejtek csökkentik a membránuk koleszterin tartalmát, hogy növeljék membránfluiditásukat és plaszticitásukat, ami elengedhetetlen az angiogenezishez (20). A lipidek ilyesfajta dezorganizációja a membránban jelentősen megzavarhatja a sejtek szignalizációját, érintik bizonyos enzimek modulációját, energetikai anyagok felhalmozódását eredményezik, amelyet a tumoros sejt fokozott proliferációjára fordíthat (21). A normál sejtek tumorsejteké történő metabolikus átalakulásuk során történő anyagcsere-változások (pl. a megnövekedett anaerob glikolízis) szintén csökkentik az extracelluláris pH-t. Az alacsony pH hatással van a gyógyszerek ionizációs állapotára, ezáltal a lipid kettős rétegben történő transzportjára (22). Míg a mérsékelt polaritású kismolekulák passzívan képesek diffundálni a sejtmembránon, a legtöbb metabolit, illetve peptid speciális membránszállítókat igényelnek a sejtmembránon való átjutáshoz. A transzmembrán diffúziót szabályozó legfontosabb paraméterek a polaritás és a méret (23). Számos gyógyszer hidrofílnak nagyon lassan diffundál a lipidmembránokon keresztül, emiatt a hatékonyságuk nagymértékben függ a normál illetve rákos szövetekben is található transzporterek relatív aktivitásától (24). Míg az 500 Da-nál kisebb molekulatömegű, lipofílnak vegyületek

( $\log P > 2$ ) passzív transzporttal könnyedén átjutnak a vér-agy gáton, a poláros vagy nagy molekulatömegű vegyületeknek először is be kell jutni a sejtbe, amit efflux transzporterek esetleg gátolnak (25). Emiatt a szelektív szabályozás miatt a gyógyszerkutatásban egyre nagyobb szerepet kap az olyan gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése, amelyek hatékony gyógyszerbejuttatást tesznek lehetővé (26).

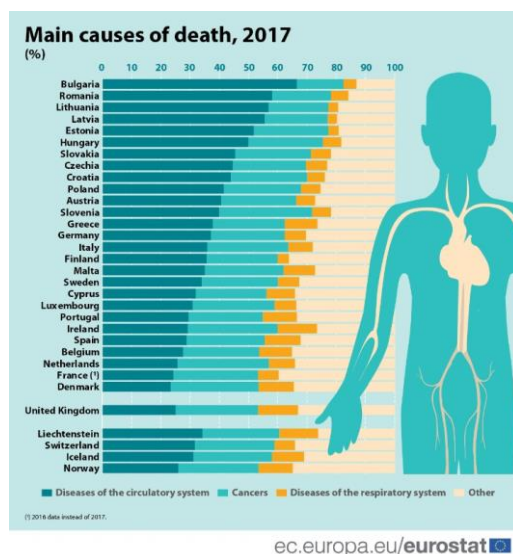
Farmakokinetikailag fontos lépés a szervezetbe került gyógyszerek és xenobiotikumok eliminációjában a metabolizmus folyamata, amely leírja azokat a kémiai reakciókat, amely eredményeként vízdékonnyabb metabolitok keletkeznek. Az enzimek által katalizált biotranszformációs folyamatok során inaktív, aktív vagy toxikus metabolitok keletkezhetnek (27). A metabolizmus elsődleges színtere a máj, de sok esetben más szervek is (vese, tüdő, bélnyálkahártya, bőr, placenta) részt vesznek a folyamatban. A gyógyszerek metabolizmusának fázisait korábban két részre osztották: Fázis I-re, amely legtöbbször a molekula oxidációját vagy redukcióját jelenti minimalizálva a vegyület interakcióját az intracelluláris tarrgettel, és Fázis II-re, amelyben a vízdékonyságot eredményező konjugáción túl (pl glukoronidáció, glutamiláció) a vegyület detoxifikációja történik. A későbbiekben a membrántranszporterek celluláris be- illetve kilépésnek a modulálásában való aktív szerepeinek feltárásával ezt további két, transzportfolyamatokat reprezentáló fázissal egészítették ki: Fázis 0-ban a vegyület intracelluláris térbe való bejutása vagy kipumpálása történik membrántranszporterek segítségével, a Fázis III-ban pedig a detoxifikált drog eliminációja (28) a sejtől. Mivel a transzporterek befolyásolják a vegyület véráramba jutását és szöveti eloszlását, és így egyre inkább a gyógyszerfejlesztés előterébe kerültek (29). Számos tanulmány a transzporterek *in vivo* szerepének fontosságát hangsúlyozza (30-33) a gyógyszer diszpozíciójában, a terápiás hatékonyságban, illetve a kezelés során felmerülő mellékhatásokban. A vegyület-vegyület kölcsönhatások (DDI) előrejelzése a gyógyszerfejlesztés során a farmakokinetikán (PK) és a farmakodinamikán (PD) alapulnak. DDI esetén két gyógyszer együttes adagolásakor megváltozhat a kombinációk egyes tagjainak vagy minden komponensének a farmakológiai hatása (34). Ezek a kölcsönhatások lehetnek előnyösek, de járhatnak súlyos mellékhatásokkal is (35). Pontos előrejelzése a gyógyszerfejlesztés során rengeteg időt, költséget és energiát takaríthat a gyógyszerjelöltek megfelelő rangsorolásával. A gyógyszerfejlesztés egyik legkritikusabb fázisát az ADME-Tox vizsgálatok jelentik (36). Becslések szerint a

gyógyszerjelöltek közel 50%-a bukik el nem megfelelő hatékonyság, gyenge biohasznosulás, nem hatékony felszívódás vagy nem kívánatos metabolikus instabilitás következtében (37), míg a gyógyszerjelöltek akár 40% -a toxicitás miatt (38).

A gyógyszerfejlesztés során ma már alapvető követelmény a gyógyszertranszporterekkel való kölcsönhatás, az ADME-Tox tulajdonság, hatékonyság és biztonságosság feltérképezése, DDI-ben betöltött jelentőségének vizsgálata. A transzporter-drog interakció preklinikai értéklése során a transzporter szubsztrátjainak és gátlószereinek vizsgálata központi helyet foglal el. Többféle *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálatot használnak transzporterekkel való interakció jellemzésére (39, 40), ahol olyan körülmények kialakítása a cél, amelyben a kapott eredmény minél jobban korrelál az *in vivo* hatással (41). Aktív transzportfolyamat membránban lévő transzportfehérjék segítségével koncentráció-gradiens ellenében valósulhat meg. Funkció szempontból bemenő (efflux) és kimenő (influx) transzportereket különböztetünk meg. A transzporterek farmakológiai jelentőségük révén egyes esetekben terápiás célpontok is lehetnek (42-45).

## 2.2. Daganatos megbetegedések és kezelésük

A fejlett országokban a kardiovaszkuláris megbetegedések után a daganatos megbetegedések szerepelnek a vezető halálozási okok közt, együttesen a halálesetek több, mint felét tették ki 2017-ben az EU-tagállamokban. Dániában, Írországban, Franciaországban (2016-os adatok) és Hollandiában a halálozási statisztika első helyére a daganatos megbetegedések kerültek (2. ábra). A tumoros megbetegedések miatt bekövetkezett halálozások aránya Szlovéniában volt a legmagasabb (32%), míg Bulgáriában volt a legalacsonyabb (16%) az EU-27-ben. A százezer főre jutó standard halálozási arány mindkét nemet számításba véve Magyarországon, Horvátországban, Szlovákiában és Szlovéniában volt a legmagasabb. Férfiak esetében a legmagasabb standardizált daganatos halálozási arányt Lettországban, Magyarországon, Horvátországban, Észtországban és Szlovákiában jelentették, amelyek mindegyike 100 000 férfi lakosra megközelíti vagy meghaladja a 450-et, míg nők esetében Magyarországon és Dániában regisztrálták a legmagasabb értékeket, mindkettőnél több mint 240 esetet 100 000 női lakosra nézve (46).



**2. ábra:** Európai halálozási statisztika, 2017. Vezető halálokok az Európai Unión belül (46)

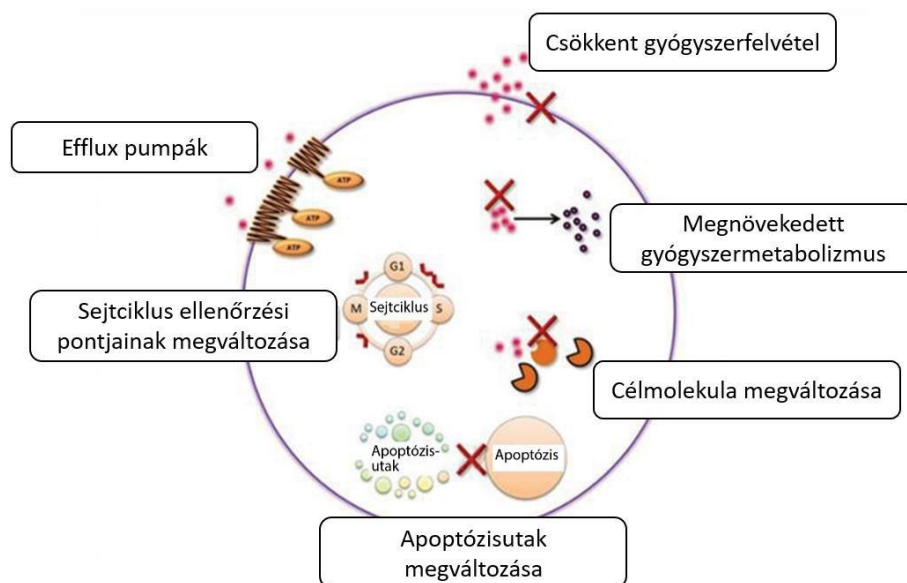
Az elmúlt két évtized során a rák kezelésének paradigmája a nem specifikus citotoxikus szerekből szelektív, hatásmechanizmuson alapuló terápiává alakult. A kemoterápiában használt hatóanyagokat kezdetben a gyorsan osztódó sejteket pusztító képességük alapján választották. A szűk terápiás index, a jelentős toxicitás és a kezelés során használt vegyülettel szemben szerzett gyakori rezisztencia miatt ugyanakkor szükségessé vált újabb módszerek kifejlesztése (47). Sajnálatos módon a tumor kezelése után, ha a tumoros betegség kiújul a gyógyulás esélye kisebb, magasabb a halálozási ráta. A nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) szenvedő betegek 30–55%–a remissziót követő relapszus során veszti életét (47), a petefészek adenokarcinómák 50–70%–a a műtét és a kapcsolódó kemoterápiát követően egy éven belül kiújul (48), és legtöbb esetben kemorezisztens fenotípust nyer (49), míg akut limfoblasztos leukémiás gyermekek kb. 20%–ánál jelentkezik relapszus (50).

A klasszikus kemoterápiás kezelések a mai napig fontosak a tumorsejtek proliferációs képességeinek célzásához. Számos citotoxikus terápia bizonyította hatékonyságát első vonalbeli terápiaként áttétes emlőrákok esetén: antraciklinek (pl. doxorubicin), alkilezőszerek (pl. ciklofoszfamid), antimetabolitok (pl. fluorouracil), mikrotubulus-gátlók (pl. taxánok, vinorelbin) (51). A vegyületek kombinációban történő kezelését 1960 óta alkalmazzák, amikor Greenspan (52) publikálta első összehasonlító vizsgálatának eredményeit az emlőrákos megbetegedések túlélésének javítására, az

1970-es évek végére a CMF (ciklofoszfamid, metotrexát, 5-fluorouracil) kombináció vált általánosan elfogadottá vált az emlőrák előrehaladott eseteinek kezeléséhez. Metotrexát, vincristin, 6-mercaptopurin és prednison (POMP) egyidejű alkalmazása hosszútávú remissziót eredményezett ALL-ben szenvedő gyermekeknél (53). Az 1960-as évek végére a Hodgkin és non Hodgkin lymphomás betegek kezelése MOPP kombináció (mustárnitrogén, vincristin, procarbazin, prednison) használatával történt (54). Leukémia esetén például a monoterápia csekély gyógyulást eredményezett a kombinációban használt hatóanyagoknál elért 80%-os gyógyulási arányhoz képest (55, 56).

### **2.3. Kemoterápiás kezelés során kialakult multidrog rezisztencia (MDR)**

A rákos betegségek hatékony kemoterápiás kezelésének egyik legfőbb akadálya a sejtek számos, különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú vegyület toxicitásával szemben kialakuló ellenállóképessége (MDR). A kemoterápiás kezelésnek ellenálló tumorsejtek többféle mechanizmus segítségével biztosíthatják túlélésüket: a tumorsejtek módosíthatják az apoptózist szabályzó gének működését (57, 58), fokozhatják a toxikus vegyületeket lebontó enzimfehérjék mennyiségét (59), kvantitatívan, illetve kvalitatívan változtathatják a gyógyszerhatás célmolekuláját (60, 61), vagy növelhetik a DNS- hibajavítás mértékét (62, 63) (3. ábra). Ha a kezelés hatására a tumorsejtben ezen mechanizmusok közül egyidejűleg több is jelen van, akkor kölcsönösen erősíthetik egymást, ami keresztrezisztenciát eredményezhet (64). A rezisztencia mechanizmusok megismerésére irányuló kutatások eredményeként számos sejtszintű rezisztencia mechanizmust sikerült azonosítani, melyek közül az egyik legismertebb az intracelluláris gyógyszerkoncentráció csökkentése különböző efflux pumpák fokozott expressziója által, ami a koncentráció toxikus szint alatt tartásával biztosítja a sejt túlélését.



**3. ábra:** MDR kialakulásának lehetséges mechanizmusai, Stella Chai (2010) nyomán (65)

Az MDR kialakulásának fontos szerepe van a rákos relapszusok esetén. A folyamat klinikai jelentőségét felismerve az 1970-es évektől kezdődtek a próbálkozások rezisztens sejtvonal előállítására: a parentális sejteket egy adott terápiás szer koncentrációjának fokozatos emelése mellett tenyésztve az adott szerrel szemben rezisztens alvonalakat sikerült kinyerni (66). 1970-ben Biedler és Riehm-nek sikerült bizonyítani a keresztrezisztencia jelenségét: aktinomicin D-vel szelektált CHO sejteken mutattak ki az egyidejű rezisztenciát szerkezetileg és funkcióban is eltérő citosztatikumokra (mitramicin, vinblasztin, vinkrisztin, puromicin, daunomicin, demekolcin, mitomicin C). Továbbá azt is sikerült bizonyítani, hogy a vinblasztin és daunomicin-nel szemben kialakult rezisztencia mértéke korrelál egymással (67). 1973-ban Dano daunomycinnel történő kezelés során rezisztenssé vált aszcitesz eger tumor sejteken igazolta a rezisztens sejtek keresztrezisztenciáját, illetve csökkent daunomycin felvételét, amit metabolizmus gátló szerek (2-deoxiglükóz iodoacetát) segítségével vissza is tudott fordítani. Már akkor felmerült a gondolata egy energia-függő pumpa működésének, amely a csökkent drog akkumulációért felel és amelyért a vegyületek közt kompetíció lép fel (68). A jelenség magyarázatára egyéb hipotézisek is születtek – csökkent affinitás intracelluláris kötőhelyekhez és a csökkent drog-influx lehetősége (69), csökkent energiafüggő intracelluláris drog-kötődés (70), csökkent membránpermeabilitás (71) - a plazmamembrán szerepének fontossága közös kapocsként szerepelt. Így született meg

az aktív permeabilitási modell, ami a rezisztencia létrejöttét a membrán lipid fluiditásának változásához rendelte (72). 1976-ban Juliano és Ling kolhicin-rezisztens CHO sejtvonalon egy kb. 170 kDa méretű glikoprotein megnövekedett expresszióját írta le melynek mennyisége korrelációt mutatott a rezisztencia mértékével (73). Mivel ez a fehérje befolyásolta a citoszztatikumok membrán permeabilitását, P (permeabilitási) glikoproteinek nevezték el. 10 év elteltével sikerült bizonyítani, hogy a Pgp-t az *mdr1* gén kódolja (74), ennek jelenlétét normál humán szövetekben (75) illetve, hogy retrovirális transzfekciója multidrog rezisztens fenotípussal ruházza fel a transzfektált sejteket (76).

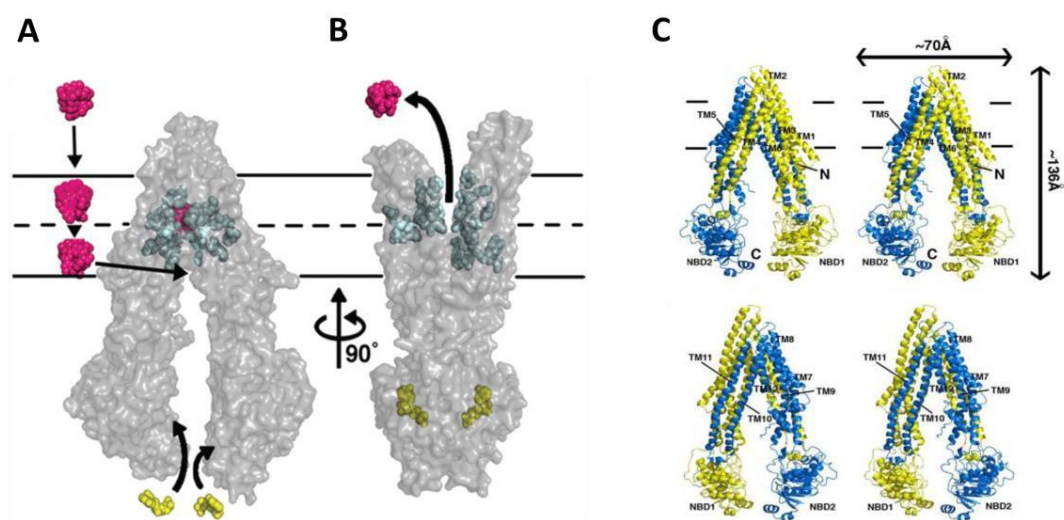
Az MDR sejtvonalak további vizsgálata során felmerültek nem Pgp-hez kapcsolódó, de szintén a plazmamembránban kifejeződő, MDR fenotípust okozó fehérjék: 1992-ben Cole és mtsai az ún. MDR-kapcsolt fehérjének, az MRP1-nek a kifejeződését írták le (77), 1998-ban Doyle és mtsai a BCRP-t azonosították, amelyek szintén multidrog rezisztenciát eredményeztek Pgp-negatív MDR sejtvonalakon (78). Ezek a fehérjék az ABC transzporterek családjába tartoznak.

#### **2.4. ABC transzporter szupercsalád**

Az ABC transzporterek családjába számos a gyógyszerek és metabolitok transzportjában fontos efflux transzportert tartalmaz. Az ABC transzporter család a nevét az ezekben a fehérjékben megtalálható, egész élővilágban konzervált ATP-kötő doménről (“ATP Binding Cassette”) kapta, melyek működésük során az ATP hidrolízise által nyert energiát használják fel endo- és xenobiotikumok, inorganikus anionok, fém ionok, aminosavak, cukrok, különféle hidrofób vegyületek, metabolitok transzportjában (79, 80). Funkciójukat tekintve az emberben túlnyomórészt exporterek, prokariótákban viszont több importer típusú transzporter is található (pl ModBC, MetNI) (81). A humán genomban 48 ABC transzporter fehérjét kódoló gént azonosítottak, melyet doménjeik szerveződése és az ABC transzporterek filogenetikai analízise alapján 7 alcsaládba sorolnak ABCA-tól ABCG-ig (82).

Általában az ABC transzporterek közös szerkezeti jellemzője a transzmembrán domén (TMD), amelyek 12, egyenként 20-25 aminosavból álló transzmembrán szegmensből épülnek fel (83), a megközelítőleg 200 aminosavból álló nukleotid-kötő domén

(NBD), és a kettő közti kommunikációt biztosító, TMD részét képező úgynevezett intracelluláris domén (ICD) (84). A funkcionálisan működő ABC transzporterek legtöbbjét két nukleotidkötő domén és két transzmembrán domén jellemzi, amelyet sokszor 1 polipeptid tartalmaz de némelyik ABC transzporter csak egy ATP kötő doménből és egy TMD-ből épül fel, ezek az ún. “féltranszporterek” (pl. ABCG2), melyek homo-, vagy heterodimerizáció révén válnak működőképes fehérjékké (85). Egyes ABC fehérjék (pl. MRP1 vagy az MRP2) pedig rendelkeznek egy további, kiegészítő doménnel, amely 5 transzmembrán szegmensből áll, ami összesen 17 transzmembrán hélixet jelent (86). A NBD-ek olyan katalitikus egységek, melyek az ATP kötéséért és hidrolizisáért felelősek, így az általuk felszabadított és közvetített energia által valósul meg a szubsztrátok transzportja (87), a TMD-ek a szubsztrátok megkötéséhez egy funkcionális egységet képeznek. 2002-ben sikerült először az ABC transzporterek közül az *E. coli* B12 vitamin importert (BtuCD) kristályosítani (88), ezt követte 2006-ban az első exporter (*Staphylococcus aureus* Sav1866 fehérje) (89), míg az első emlős ABC transzportert Aller és munkatársai határozták meg, az egér Pgp kristályszerkezetét ATP-mentes, a citoplazma felé nyitott állapotban amelyet az ATP kötődési modelljével 2009-ben publikáltak (90) (4. ábra). Az ABCB1 struktúráját tekintve egyetlen polipeptidlánc kódolja, 2 homológ nukleotid-kötő és 2 homológ transzmembrán doménnel (91). A homológ transzmembrán doméneket körülbelül egy 60 aminosavból álló régió kapcsolja össze (76).



4. ábra: ABCB1 szubsztrát transzport mechanizmusa és térszerkezetének

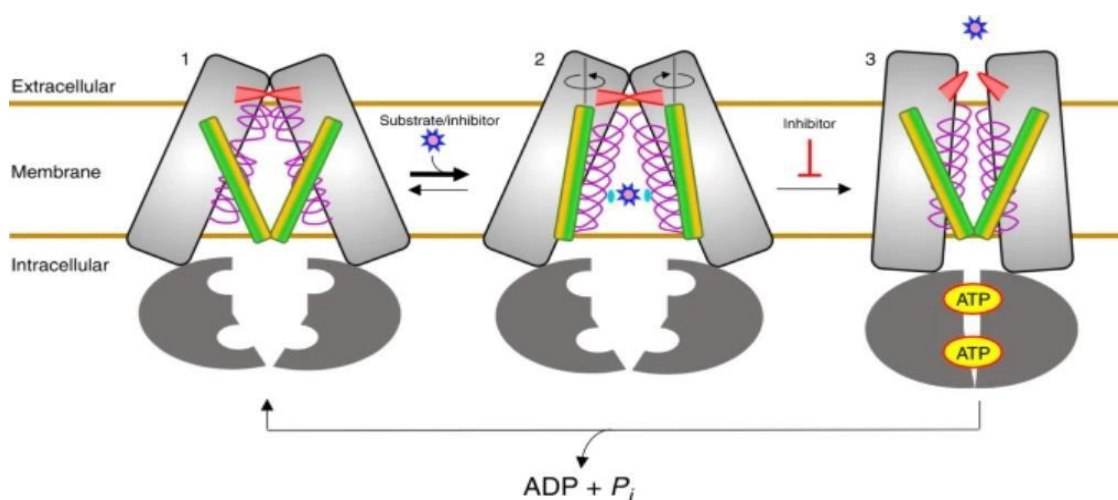


meghatározása (90). A) A lila színnel jelölt szubsztrát belép a membránba és bejut a transzporter TMD régiójának belsejébe. B) Miután megtörtént a kötődés a kék színnel jelölt kötőzsebbe, és az ATP (sárga színnel jelölve) is hozzákötődött az NBD-hez, konformációs változást okoz, az extracelluláris tér felé fordítva a kötőzsebet. C) Az ABCB1 fehérje elülső (A) és hátulsó (B) nézetből a röntgenkristallográfiás analízis szerint szalagmodellel ábrázolva: 12 transzmembrán domén (TM1-2), 2 nukleotid kötőhely (NBD1-2), valamint a fehérje N- (sárga) és C-terminális (kék) része szerepel az ábrán.

Az ABC fehérje által közvetített transzport ATP hidrolízis útján valósul meg, de a mai napig nem tisztázott a részletes katalitikus mechanizmus, melynek során a transzporter az ATP hidrolíziséből felszabaduló energiát a szubsztrátok transzportjára tudja fordítani. Néhány ABC transzporter szubsztrátjai távollétében is mutat gyengébb ATPáz aktivitást, melyet az irodalomban nyugalmi (bazális) ATPáz aktivitásnak is neveznek. Akadnak tanulmányok, melyek a bazális ATPáz aktivitást endogén szubsztrátok (pl koleszterin, rövid szénláncú lipidek) transzportjával magyarázzák (92, 93), de van olyan modell is, amely szerint ez a transzporter, pl. Pgp katalitikus mechanizmusából eredően egy szétkapcsolt aktivitás és elveti egy esetleges endogén szubsztrát transzportjának hipotézisét (92). *Al Shawi* és munkatársai szerint a bazális és szubsztrát-stimulált ATPáz ciklusának létezik közös pontja, melyből a transzporternek lehetősége van a körülményeknek megfelelően akár a szubsztrát nélküli bazális aktivitású, akár szubsztrát indukálta katalitikus ciklus elindítására (94).

Az ABCG2 féltranszporter egy NBD és egy TMD domént tartalmaz, melyeknek sorrendje fordított a Pgp-nél tapasztaltakhoz képest, NBD helyezkedik el N-terminálisan, és C-terminális a TMD. A transzmembrán domént 6 db hélix és az azokat összekötő hurkok alkotják. Az NBD-n belül a Pgp-hez hasonlóan számos konzervált motívum található: Walker A motívum (P-hurok), Q-hurok, egy Walker B alkotóeleme motívum, hisztidin kapcsoló (H-hurok), D-hurok és az ún. C-signature motívum (95). Működéséhez dimerizációra van szükség, ez nagy valószínűséggel homodimerizációt, esetleg homooligomerizációt jelent (96). *Orlando* és munkatársai által bemutatott modellben cryo-EM tanulmányok és a korábbi statikus állapotot jelentő röntgenkristallográfiás szerkezet alapján kezdetben az ABCG2 apo-zárt állapotú, a

NBD-k nyitott pozícióban vannak (5. ábra, 1. állapot). Szubsztrátok vagy inhibitorok kötődése a fehérjét a befelé néző konformáció felé tolja el, ahol a kis molekulák elsősorban hidrofób kölcsönhatás révén csapdába esnek (5. ábra, 2. állapot). Az ezt követő ATP- kötés elősegíti a szubsztrát kiáramlását az extracelluláris térbe (5. ábra, 3. állapot), amelyet ATP-hidrolízis követ, majd a transzporter az apo-zárt konformációba áll vissza. Inhibitorok kötődése megakadályozza az ATP-hidrolízist és a további konformációs változásokat a fehérje kifelé néző állapotába (4. ábra) (97). Mind az ABCB1 mind az ABCG2 esetén a szubsztrátmolekula kiválasztása szorosan kapcsolódik a transzporterek konformációs változásaihoz (98). A részletes szerkezeti információk különösképpen a TMD vonatkozásában elengedhetetlenek a potenciális új gyógyszerek szubsztrátként történő azonosításához, az ABCG2-n keresztüli transzportfolyamat megismeréséhez, és specifikus ABCG2 inhibitorok tervezéséhez.



**5. ábra:** ABCG2 ATP-függő transzportmechanizmusának modellje. Ligand hiányában az ABCG2 apo-zárt konformációt vesz fel (1). Ilyenkor a NBD-k eltávolodnak egymástól, a TM5 (zöld/sárga jelzéssel) a szimmetriatengely felé tolódik, és a TM2 (lila rugóval jelezve) a spirál közepénél tekeredik. A ligand kötődése az ABCG2-t a befelé néző konformáció felé tolja, TM5 elmozdul oldalirányba, és fordul a dimer tengelye körül (2). Az ATP kötődése a TM hélix kötegeit egymás felé tolja, és a megkötött vegyület a leucin dugón (vörös flipper) keresztül az extracelluláris térbe kerül (3)(97).

### 2.4.1. ABCB1 és szerepe a multidrog rezisztenciában

1976-ban a P-glikoprotein (Pgp/ABCB1/MDR1) volt az elsőnek azonosított MDR-ABC transzporter (73). A Pgp szokatlanul széles szubsztrátspecificitással rendelkezik, több száz vegyületet is képes felismerni, 330 daltontól akár 4000 daltonig (94). A legtöbb szubsztrátmolekula hidrofób, megoszlik a kettős lipid rétegben (99), a transzporter pedig egyfajta molekuláris „hidrofób porszívóként” összegyűjti és kipumpálja a membránból a szubsztrátjait, mielőtt azok a citoplazmához érnének (99, 100). Pgp hatásának védő funkciója gyakran szelektív előnyhöz juttathatja a sejteket a kemoterápiás kezelés során, így gyakran fokozott mennyiségben található meg a rákos sejtek felszínén. Egészséges szöveti környezetben ugyanakkor jelenlétük támogatja a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védekezését (101), magas expressziós szintjét vesében, vastagbélben, májban, tüdőben illetve BBB-ben is azonosították (1. táblázat).

**1. táblázat:** ABCB1 (P-glycoprotein/Pgp) és ABCG2 (BCRP) transzporterek fő jellemzői. BBB: blood-brain barrier; P-gp: P-glycoprotein; BCRP: breast cancer resistance protein, Jaramillo és mtsai (2018) nyomán (102).

ABC transzporter	Lokalizáció	Expressziós Szint	Szubsztrátok
<b>ABCB1/Pgp</b>	apikális	Vese, mellékvese, máj, hasnyálmirigy, vastagbél, tüdő, BBB, placenta	hidrofób vegyületek, akár pozitív töltéssel
<b>ABCG2/BCRP</b>	apikális	Placenta, emlő, BBB, máj, vastagbél	Pozitív vagy negatív töltésű hidrofób/hidrofil konjugált/nem-konjugált

A transzporterek expressziós szintjeinek változása farmakokinetikai és farmakodinamikai szempontból is jelentős, akár csökkent, vagy magasabb aktivitás jellemzi a tumoros sejteket az átlagosnál. Elsőként 1991-ben nyert bizonyítást, hogy az emelkedett Pgp szint és az MDR közötti összefüggés emlődaganatok esetében fennáll (103). Oszteoszarkóma

esetén a megnövekedett Pgp szint több, mint háromszorosára növelte a mellékhatások kockázatát és rövidítette az eseménymentes túlélést (104). A Pgp emelkedett RNS szintjét írták le inoperábilis tüdőszarkóma doxorubicin kezelése esetén is (105). Gregorczyk és munkatársai pedig Pgp-pozitív emlőrákos betegeknél mutattak ki szignifikánsan nagyobb relapszus kockázatot (106). Hematológiai daganatok esetén a kemoterápiás kezelés után a Pgp mRNA expresszió és a fehérje funkció is fokozódik. Ennek mértéke mieloid blastokban korrelál a kezelés kudarcával és rövidebb túléléssel felnőttkori akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő betegeknél (107, 108). Ezen klinikai eredmények vezettek az ötlethez, miszerint a transzporter funkciójának inhibitor molekulákkal való gátlása hatékony módja lehetne a drogrezisztencia megszüntetésének (109, 110). Az első (verapamil, kinidin, amiodaron, cikloposorin A) és második generációs (valsopodar, dexverapamil) inhibitorok vagy nem voltak túl hatásosak, vagy már önmagukban túl toxikusak voltak, és az ABCB1 gátlására való képességüket sem sikerült igazolni betegeknél (64). Ezenkívül előfordult, hogy az inhibitorokkal végzett farmakokinetikai interakciók (pl a citokróm P450 valsopodar általi gátlása) a kemoterápiás vegyület dózisának csökkentését tette szükségessé ami a betegek aluladagolásával járhatott (111). Az inhibitorok harmadik generációja (dofequidar, zosuquidar, tariquidar, biricodar) a transzporterrel való kölcsönhatás specifikusságának növelését célozta. Ugyan az *in vitro* vizsgálatok több olyan vegyületet azonosítottak, melyek hatékonyan gátolták a Pgp transzporter funkcióját, még a harmadik generációs inhibitorokkal végzett kísérletek többsége is elbukott a klinikai próbákon (110). A gátlószerek használatának bukásához egyfelől a helytelenül tervezett klinikai kísérletek is hozzájárulhattak. Több kísérlet is irányult az ABCB1 kifejeződésének tesztelésére akut myeloid leukémia (AML) esetén. Wilson és munkatársai 170 AML páciens génexpressziós profilja alapján megállapították, hogy a minták csupán 13%-a rendelkezett ABCB1 vagy ABCG2 expresszióval (112). A Pgp expressziója független prognosztikai faktor AML-nél (113), expressziója AML-ben és akut nem-limfoblasztikus leukémiában negatív korrelációt mutat a kezelésre adott válasszal (114). A Pgp gátlószerek tumorterápiában való kudarcát nagyrészt a Pgp fiziológiai funkciójának járulékos gátlása, például a barrier feladatot ellátó szövetek működésének megzavarása okozhatta. A kemoterapeutikumok és inhibitorok között fellépő drog-drog interakciók szintén súlyos toxikus mellékhatásai több esetben a klinikai vizsgálatok leállításához vezettek, ill. az

alkalmazott terápiás dózisok csökkentését tették szükségessé (115).

#### **2.4.2. ABCG2 és szerepe a multidrog rezisztenciában**

Felfedezését követő évtizedben, miután az ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) fehérjét fiziológiai szempontból is fontos urát-transzporterként azonosították, pozitív kapcsolatot találtak a transzporter diszfunkciója és különböző betegségek (pl. köszvény, hiperurémia) kialakulásának kockázata közt (116-118). Szubsztrátjai közt endogén szteroidok szulfátkonjugátumokat (119) mellett porfirineket (120), fitoösztrogén szulfát-konjugátumokat (121) azonosították. Az ABCG2 mitoxantrone rezisztens protein (MXR) néven is ismert, mivel humán vastagbél karcinóma sejtekből izolálták mitoxantronnal végzett *in vitro* szelekciót követően (122). A mitoxantronnal végzett szelekciót követően a BCRP túlzott expresszióját egyéb tumoros sejtvonalakban, emlőkarcinómában, gyomorrákban, fibroszarkómában, nem kissejtes tüdőrákban, glioblasztómában és mielómában is kimutatták (123-125). A szelekcióval előállított modellsejtvonalakon végzett vizsgálatok többször is rámutattak az ABCG2 fokozott kifejeződésére is. Normál szövetekben az apikális membránban lokalizálódik (126), különösen az intesztinális epitél sejtekben, a placentában, a vér-agy-gátban és a májban, ahol széles szubsztrát-specifitást mutató effluxpumpaként endogén és exogén vegyületeket transzportál, beleértve a hagyományos kemoterápiás szereket vagy a célzott kezelés során használatos kis méretű terápiás molekulákat (1. táblázat), például a klinikumi gyakorlatban fontos mitoxantront és számos tirozin-kináz inhibitorot.

Számos tumoros klinikai vizsgálatban figyeltek meg a korrelációt a magas ABCG2 aktivitás és a csökkentett túlélés között (127-129). Az ABCG2 expressziója rossz prognózissal társult az akut mieloid leukémia (121) és a diffúz nagy B-sejtes limfóma kezelésében (130) is. *In vitro* kísérletek igazolták a BCRP expressziója és a kialakult MDR közti korrelációt myeloma eredetű (131), emlő- (78), vastagbél- (122), kissejtes tüdő- (132), petefészek (133) daganat eredetű sejteken. Akut limfoid leukémia vizsgálatokban felnőtt betegeknél az AML sejtek magas BCRP szintje korrelált a betegség prognózisával és az általános túléléssel (127, 134). Ezt az összefüggést azonban nem sikerült bizonyítani a gyermekkori AML esetén (135). Bár még nem tisztázott, de a tanulmányok közötti ellentmondás oka lehet a felnőttkori vagy a gyermekkori AML különbségei is. Furcsa mód azonban az ABCG2 expressziójának egyéb tumoros

megbetegedések klinikai eredményeire gyakorolt hatása ellentmondásos, pedig a kezelések során használt vegyületek több esetben is ABCG2 szubsztrátjai (83).

Logikusnak tűnhet, hogy a kemoterápia során az ABCB1 mellett az ABCG2 funkció megfelelő modulációja is növelheti a rákellenes szerek hatékonyságát az MDR fenotípus leküzdésével. Ennek a lehetőségnek a megerősítésére szintén jelentős erőfeszítéseket tettek az ABCG2-gátlók fejlesztésére. Bár az ABCG2 patofiziológiai jelentőségének megértésével kapcsolatosan sok előrelépés történt és igazolt, hogy az ABCG2 is okozhat MDR-t, a klinikai vizsgálatokban nem sikerült bizonyítani, hogy az ABCG2 gátlása az általa okozott MDR csökkenéséhez vezetne (136-139).

## **2.5. Az SLC szupercsalád**

Az utóbbi években egyre fontosabb és egyre nyilvánvalóbb klinikai szerepet boncolgató tanulmány született az SLC uptake transzporterek fontosságáról (43, 44, 140, 141). Számos SLC transzportert azonosítottak gyógyszermolekula célpontként, glükóztranszportereket (pl. SLC5 család), neurotranszmitter transzportereket (pl. SLC6 család), epesav transzportereket (pl. SLC10 család), húgysav transzportereket (pl. SLC2 család) kation- Cl transzportereket (pl. SLC12 család) (141, 142). Vegyületkönyvtárak szűrése során több olyan vezérmolekulát is azonosítottak, amelyek gátolják a glükózfelvételt olyan sejtvonalakban, amelyek stabilan expresszálják a humán SGLT1 vagy SGLT2 transzportert. Amellett, hogy csökkentik a plazma glükózsintjét és fokozzák a vizelet glükóz kiválasztását, az SGLT2 gátlókat ozmotikus hatásaik miatt súlycsökkenéssel és vérnyomáscsökkentéssel is összefüggésbe hozták (143). Az SLC6 család számos transzporterének (SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4) fontos szerepe van a monoaminok felvételében, a noradrenalin, a dopamin és a szerotonin transzportjában. A neuropszichiátriai rendellenességek kezelésének másik terápiás célpontja a vezikuláris monoamin transzporter 2 (VMAT2; SLC18A2), amely monoaminokat szállít a sejt citoszolból a szinaptikus vezikulákba. Az SLC10A2 (ASBT, apical sodium-dependent bile acid transporter) közvetíti az epesavak reabszorpcióját a bél lumenéből. Gátlása az epesav csökkenését és a májban a koleszterin fokozott epesavvá történő átalakulását eredményezné, ezáltal csökkentve a koleszterinszintet, megakadályozva a szív- és érrendszeri megbetegedéseket.

Az *SLCO* gének által kódolt organikus anion transzporter polipeptidek központi szerepet játszanak a gyógyszerek és más xenobiotikumok diszpozíciójában. Az SLC szupercsalád közel 400 membrán-kötött fehérjéből áll, az emberi genomban 11 OATP kódoló gént (*SLCO*) azonosítottak (140). Szöveti expressziójuk meglehetősen heterogén (144, 145), az itt található barrierék döntő jelentőségűek a gyógyszerek felszívódása, metabolizmusa, eloszlása és kiválasztása szempontjából. Mutációjuk, gátlásuk akár toxicitáshoz is vezethet a megváltozott farmakokinetika révén, ilyen például az immunszuppresszív ciklosporinnal történő egyidejű kezelés, ami sztatin-indukálta myopathiát eredményezhet, mivel a sztatinek ismert OATP1B1 szubsztrátok és a ciklosporin pedig OATP1B1 gátlószer. Az OATP1B1 ciklosporin általi gátlása tehát megnöveli a különféle sztatinek plazmakoncentrációját (146). Ezek a nátrium- és ATP független transzporterek endogén szubsztrátok szállítását is közvetítik, elsősorban amfipatikus szerves molekulákét, amelyek molekulatömege meghaladja a 300 Da-t (145), de semleges vagy akár pozitív töltésű szubsztrátokat is képesek szállítani, azaz polispecifikus transzporterek. Az OATP transzporterekkel való kölcsönhatásoknak egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a gyógyszerfejlesztés során, ugyanis a szubsztrátjaik közt számos sztatin, angiotenzin- konvertáló enzim inhibitorok, angiotenzin receptor blokkolók, antibiotikumok, antihisztaminok, vérnyomáscsökkentők és rákellenes gyógyszerek is szerepelnek (147). Ezen felül egyre több eredmény születik arról, hogy expressziójuk mértéke megváltozhat a rák különböző típusaiban (148), biomarkerként szolgálva. OATP-k megnövekedett expresszióját figyelték meg például mell-, máj-, vastagbél-, tüdő-, hasnyálmirigy- és petefészekrákban (149-151), ugyanakkor pontos szerepüket a tumoros folyamatokban még nem sikerült tisztázni. A kevésbé jellemzett OATP-k szubsztrát felismerésének jellemzésére szükség van olyan *in vitro* vizsgálati módszerek kidolgozására, amelyek segítségével könnyebbé válik az OATP-k gyógyszerekkel való kölcsönhatásának kimutatására.

### **2.5.1. OATP2B1 transzporter fehérje**

Az OATP2B1 széles szöveti expressziót mutat, de nagyobb mennyiségben többek közt a májsejtek bazolaterális membránjain (152), szinciotrofoblaszt bazális felületén (153), az enterociták apikális membránján (154), az emlőmirigyben (155) és a szem ciliáris testjében (156) expresszálódik. Mivel a bélben és a májban is jelentős mennyiségben

expresszálódik, és sokféle gyógyszer molekulát felismer, részt vesz a gyógyszerek felszívódásában és diszpozíciójában, klinikailag jelentős gyógyszerkölsönhatásokat eredményezhet (157). Az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 multispecifikus transzporterek, melyek számos endogén szteroidhormont és hormonkonjugátumot szállítanak, többek közt az ösztradiolt, az ösztron-3-szulfátot (E3S) és a dehidroepiandroszteron-szulfátot (DHEAS) (158, 159). A szteroidhormonok és azok konjugátumai a tumorsejtek proliferációjában kiemelt fontossággal bírnak az ún. hormonfüggő daganatok esetén (160-162). Hormonfüggő rákos megbetegedéseket tanulmányozva az OATP expresszió mértékének vizsgálata során összefüggést fedeztek fel a tumor minták differenciáltságának szintjével (163). Az OATP1A2, az 1B3, a 3A1 és a 4A1 ösztron-3-szulfát felvétele összefüggésbe hozható a hormonfüggő emlőrák sejtek túlélésével (162, 164, 165). prosztatatarakos mintákban normál prosztatata- vagy jóindulatú prosztatata-hiperpláziákhoz képest fokozott OATP1B1 (149) és OATP1B3 (163) fehérje- és/vagy mRNS-expressziót mutattak ki. Ráadásul a megnövekedett OATP1B3 expresszió korrelált a tumor méretével is. Az OATP2B1 esetén szintén korrelációt véltek felfedezni a megnövekedett DHEAS transzport és a megnövekedett beteghalandóság közt (166). Tekintettel arra, hogy az OATP2B1 fokozott hormonfelvétele a hormonfüggő daganatok (például emlő vagy prosztatata) esetén fokozott sejtproliferációt eredményez (167), az OATP2B1 gátlása jó stratégia lehet a daganatok növekedésének gátlására. Az OATP2B1 emelkedett expresszióját több különböző ráktípusban is kimutatták. Gliómákban a vér-agy gát és a vérdaganat gát endothelsejtjeiben (168), emlőrákos mintákban (151), ahol expressziójuk egyenes arányban növekedett a tumor méretével (169), vastagbél adenokarcinómában (170), és csontcisztákban is, szerepet játszva ezzel a csont homeosztázisának fontos szabályzásában, befolyásolva a daganat növekedését és progresszióját (171). A tizenegy humán OATP expressziós mintázatát kvantitatív RT-PCR-rel elemezve nem malignus és a rosszindulatú csontdaganat mintákban szignifikánsan magasabb mRNS expressziós szintet mértek 8 humán OATP transzporter esetén is (OATP1A2, OATP1C1, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1, OATP5A1). A magas OATP expressziós szintek a vizsgált transzporterek szerepének fontosságát sugallják, szerepet játszva a csontsejtek hormonokkal, konjugátumaikkal, proszttaglandinokkal és gyógyszerekkel való ellátásában. Az OATP2B1 transzporter barrierekben való előfordulása révén a

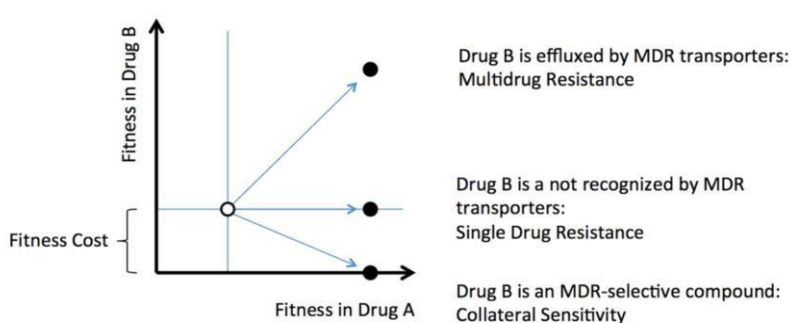


gyógyszerek farmakokinetikai paramétereinek kulcsfontosságú meghatározója (172).

## **2.6. MDR leküzdésére irányuló stratégiák**

Az MDR-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatok közt (110, 173) akadtak biztató eredmények is. A Pgp inhibitor ciklosporin (CsA) terápiába történő bevonása akut mieloid leukémia esetén jelentős javulást eredményezett a relapszusmentes és az általános túlélésben is (174). A CsA-val kiegészített kezelés meghosszabbította a medián túlélést azoknál az AML betegeknél, akiknél a Pgp-overexpresszió közti különbség háromszoros volt (12 hónap versus a kontrolnál mért 4 hónaphoz képest), míg a hiányos vagy minimális Pgp-expresszióval rendelkező betegeknél nem mutatkozott különbség a medián túlélésben. A becsült 2 éves relapszus-mentes túlélés jelentősen javult CsA-kezeléssel (34 százalék szemben a kontrol csoportban mért 9 százalékkal). Az MDR fenotípus reverzibilis változását vinkrisztin kezelés hatására rezisztenssé vált HL60 humán leukémia sejtek esetén kimutatták, ahol a Pgp expresszió növekedése visszafordítható volt (175). NSCLC sejtvonalak nagy dózisú EGFR-gátló kezelése során kimutatták, hogy a sejtpopuláció dinamikus túlélési stratégiát alkalmaz, amely során az egyes sejtek átmenetileg reverzibilisen gyógyszer-toleráns állapotot vesznek fel, hogy megvédjék a populációt a toxikus vegyületek letális következményétől. A rezisztens sejtek ugyanakkor KDM5a hiszton-demetiláz szelektív gátlásával újra szenzitívvé váltak az EGFR gátlókkal szemben, amiből arra lehet következtetni, hogy a vegyületek kombinált terápiában való használata előnyös lehet a rezisztencia kialakulásával szemben (176). Számos tirozin-kináz inhibitor (TKI) kemoterápiás szerekekkel kombinálva sikeresen alkalmaztak rezisztencia kialakulásának megelőzésére (177, 178). Emlőtumor (179), vastagbél-daganat (180) és gyomorrákos (181) sejtvonalon kimutatták a COX-2 overexpresszió általi Pgp expresszió növekedését. A ciklooxygenáz-2 enzim működése által képződött prosztaglandinoknak szerepe van a fájdalom és a gyulladás patomechanizmusában. Tumoros megbetegedéseknél a COX-2 fokozott expressziója kapcsolatba hozható a sejt proliferációval, az áttétképzéssel a mátrix-metalloproteinázok fokozásával, a tumorgenezissel, a vérér képződéssel a VEGF működésének serkentésével és az apoptózis rezisztenciával is (182, 183). A COX-2 inhibitorok terápiás alkalmazása sikeres stratégia lehet a rezisztencia leküzdésére a Pgp expresszió csökkentése révén (179).

A kemoterápiás gyógyszerek retenciója a membránban található efflux- és uptake transzporterek nettó funkciójának eredménye. Míg az efflux transzporterek elektrokémiai gradiensükkel szemben kifelé vagy az intracelluláris organelumokba mozgatják szubsztrátjaikat, addig az SLC transzporterek nemcsak közvetlenül a rákos sejtekbe juttatják a kemoterápiás vegyületeket, hanem a tumornövekedés és a túlélés szempontjából nélkülözhetetlen tápanyagfelvétel közvetítőiként is szolgálnak (184). Mivel a tumoros sejtek efflux transzportereik természetes védelmi mechanizmusának kihasználása révén biztosítják túlélésüket, overexpressziójuk sok esetben összefüggésben áll a kedvezőtlen prognózissal. Ugyanezek a biológiai változások ugyanakkor terápiásan kihasználható „gyengeségeket” is létrehozhatnak. *Szakács és mtsai* korábban sikeresen azonosítottak Pgp-t kifejező daganatos sejtek szelektív elpusztítására alkalmas vegyületeket (185). Az ún. MDR-szelektív molekulák a transzporter működésének eliminálása helyett a transzporter funkciójának kihasználása révén célozza az MDR sejteket, ugyanis a kezelés során a multidrogrezisztencia kifejlődése mellett paradox módon jelentős szenzitivitás (járulékos érzékenység, CS) lép fel egyéb hatóanyagokkal szemben (6. ábra). A járulékos érzékenység mértéke az egyes vegyületek parentális (MDR- negatív) ill. a rezisztens (MDR-pozitív) sejtekre kifejtett toxikusságának arányával ( $IC_{50}$ , a sejtek felét elpusztító koncentráció) jellemezhető. Az MDR kialakulásának megakadályozására felmerült másik stratégia a transzporter működésének gátlása helyett funkciójának kihasználásán alapszik („Achillesz-sarok”) ( 1 8 5 ) .



**6. ábra:** Járulékos érzékenység definíciója (185). Míg a rákos sejtekben fokozott mértékben kifejeződő efflux transzporterek „A” vegyület koncentrációját intracelluláris toxikus szint alatt tartják, hogy javítsák túlélési esélyeiket, előfordul, hogy az „A” vegyülettel szemben kialakult rezisztencia „B” vegyülettel szembeni érzékenységet von maga után (kollaterális szenzitivitás).

Az ABCG2 transzporterrel kölcsönható és az azokat overexpresszáló sejteket szelektíven elpusztító vegyületekről az irodalomban akad néhány példa alacsonyabb ABCG2-szelektivitási aránnyal (186), amely nagyságrendekkel kisebb, mint a Pgp esetében (187, 188). Az ABCG2 transzportert overexpresszáló MDR sejtekre szelektíven toxikus vegyületek felfedező kutatása jelenleg is zajlik.

Az MDR sejtekben okozott szelektív toxicitásra négy fő hipotézist állítottak fel - (1) a reaktív oxigén gyökök (ROS) növekedése az ABC transzporter ATP hidrolízisének indukciója révén; (2) fokozott érzékenység az energiaszint változásaival szemben; (3) a sejtek túléléséhez nélkülözhetetlen endogén szubsztrátok extrudálása (4) membrán perturbáció (189). Bár a pontos hatásmechanizmust még nem sikerült tisztázni, arra sikerült rávilágítani, hogy a szelektív toxicitású vegyületek fém-ion kölcsönhatása kulcsfontosságú az MDR-szelektív vegyületek citotoxicitásában. A szelektíven toxikus molekulák képesek fémion kelációra, ezáltal – a sejtekbe való fémion bejutást segítve – toxicitás léphet fel, vagy éppen ellenkezőleg fémion depléció előidézésére lehetnek képesek a sejtekben (190). Mivel számos létfontosságú enzim működése vasfüggő, mely a tumorsejtek általános vasérzékenységgel együtt arra utal, hogy az MDR-szelektív toxicitás folyamatában fontos tényező lehet a vas elvonása a sejt enzimeitől (191).

Mivel nemcsak az efflux transzporterek, hanem az OATP uptake transzporterek is többféle ráktípusban emelkedett expressziót mutatnak (192-194), fontos diagnosztikai markerek lehetnek. Ráadásul, mivel a kemoterápiás szerek sejtekbe történő felvételét segítik, kiaknázhatók lehetnek a tumorsejtek célzott elpusztítására. Laczka Csilla (Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Membrán Fehérje Kutatócsoport) csoportjában olyan gyógyszerek farmakokinetikájában fontos OATP importereket termelő sejtvonalak létrehozásával foglalkoznak, amely modellként szolgálhat az ADME-Tox mechanizmusok megértésében (158). Az általuk kialakított humán adenokarcinóma modellrendszer transzporter funkció mérésére alkalmas. A parentális és az OATP2B1 fehérjét overexpresszáló sejtek fluoreszcens fehérjét is expresszálnak. Ezeknek a modellsejteknek olyan változata is elkészült, amelyek az OATP-n kívül fluoreszcens fehérjét is expresszálnak. A fluoreszcencia-alapú detektálási technológiák homogenitásban és érzékenységben mutatott előnyei kihasználhatók a transzporteresszében mind efflux, mind uptake transzporterek esetén, miniatürizált

formában történő méréséhez is (195). A farmakokinetikai vizsgálatokban fontos OATP2B1 esetében még nem számoltak be fluoreszcencia-alapú HTS módszerről.

## 2.7. HTS a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában

Számos *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* rendszer áll rendelkezésre transzporter-drog közötti kölcsönhatás vizsgálatára. A korai gyógyszerfejlesztés során elsősorban az *in vitro* módszereket alkalmazzák, elsősorban költség- és időhatékonyság miatt. Számos FDA által engedélyezett kemoterápiás szer felfedezése HTS szűrési eredményekre vezethető vissza: Alectinib, Ixazomib citrát, Olaparib, Ceritinib, Ibrutinib, Trametinib, Vismodegib, Lapatinib, Dasatinib, Sorafenib, Erlotinib, Gefitinib (196). A szűrőrendszer egymásra épülő lépések sorozata, amiben az első lépés, az elsődleges teszt (primary assay) célja, hogy kiszűrje a többnyire aktív vegyületeket a nagyrészt inaktív vegyületek halmazából, kezelhető anyag- és erőforrás-felhasználás mellett. A találatok megerősítéséhez további tesztek szükségesek.

Ioncsatornák, membrántranszporterek, transzkripció faktorok vizsgálata esetén, a sejtek szaporodásának, toxicitásának, motilitásának, specifikus jelátviteli utak aktiválódásának vagy morfológiai változások mérésénél a sejtalapú vizsgálatok kerülnek előtérbe (197). Az 1980-as években az ABC transzporterek felfedezése, valamint az MDR hörcsög, egér és humán sejtvonalak létrehozásával (198-200) vette kezdetét a törekvés olyan inhibitorok kutatása után, amellyel a kialakult rezisztencia ellen kívántak fellépni. Akkoriban több csoport is nekilátott MDR sejtvonalak felhasználásával a nagy áteresztőképességű szűrési esszék (HTS) fejlesztésének, hogy elősegítsék a Pgp és más ABC transzporterek gátlószereinek felfedezését. A szűrések az egyszerű citotoxicitási vizsgálatokról a komplexebb felépítésű fluoreszcencia alapúig terjedtek, amelyeknél jelölt szubsztrátot (201) vagy fluoreszcens fehérjét expresszáló sejtvonalat (202) használtak. Az ATAD5-luciferáz-teszttel sikerült azonosítani két vegyületet, a resveratolt és a genisteint, amelyek szelektíven elpusztították a Pgp-t overexpresszáló humán epidermoid karcinóma KB sejtvonalat (203, 204). A transzporter alapú citotoxicitási HTS szűrés teljesítményének javítása érdekében *Brimacombe és munkatársai* bevezettek egy kettős kokultúra alapú fluoreszcencia méréssel dolgozó rendszert, amelyben a parentális OVCAR-8 sejtvonal és Pgp transzportert expresszáló NCI/ADR-RES izogénikus sejtvonalon mért toxikus hatás kokultúrában vizsgálható (202).

A tesztelendő aktív vegyületekre is kialakítottak nagy könyvtárakat. Az Amerikai Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Szervezetéhez tartozó intézet által létrehozott *NCI Developmental Therapeutics Program* (DTP) különböző preklinikai adatok és kutatási anyagok alapvető forrását szolgáltatja világszerte. 1955-ös megalakulása óta több mint 40 amerikai engedéllyel is rendelkező rákellenes szer kifejlesztéséhez járult hozzá (205). A DTP szintetikus és természetben is előforduló több, mint 200 ezer vegyületből álló könyvtárai feltételezett rákellenes hatással rendelkező molekulákat tartalmaznak, amelyek kutatási célokra megrendelhetők. 1990 óta a program *in vitro* citotoxicitási tesztek végzésére a vegyületek toxikus aktivitásának jellemzésére az ún. NCI-60 humán tumor sejtvonal panelen. Hamar felismerték, hogy ez a szűrési modell gazdag információforrás a növekedésgátlás tanulmányozására (206). Szakács és munkatársai *in silico* megközelítéssel DTP-ből elérhető NCI-60 sejtvonalpanelen mért drogérzékenységi adatokat és a sejtvonalak kvantitatív real-time PCR-rel meghatározott ABCB1 mRNS expressziós adatsorát használta fel MDR-szelektív tulajdonsággal rendelkező molekulajelöltek azonosítására (207). Némely vegyületek pozitív korrelációja felvetette, hogy ezek MDR szelektív vegyületekként működhetnek. A korrelációs elemzéssel kapott Pearson koefficiens pozitív korreláció ( $PCC \geq 0,4$ ) esetén a növekvő transzporter kifejeződés növekvő drogérzékenységnek felel meg, ami MDR-szelektív tulajdonságra utal. Az NSC73306 volt az első DTP-ből azonosított vegyület, melynek kollaterális érzékenységet kiváltó hatása bizonyítottan az ABCB1 működéséhez köthető, fokozott aktivitása pedig a transzporter specifikus inhibitoraival gátolható (190). Sajnos a hasonló módon végzett *in silico* screening az NCI-60 sejtpanelen ABCC1 vagy ABCG2 transzporter esetén gyakran nem azonosítja az ismert szubsztrát molekulákat, ugyanis a panelben levő sejteken mért transzporter expresszió mértéke nagyon alacsony (186).

### 3. Célkitűzések

Doktori munkám célja egy HTS kompatibilis, *in vitro* módszer kidolgozása volt, amely lehetőséget ad vegyületkönyvtárak és az ABCB1, ABCG2, OATP transzporterek kölcsönhatásának vizsgálatára. Az esszé segítségével onkológiai relevanciájú vegyületeket kívántunk vizsgálni egyedi, valamint kombinációs kölcsönhatási vizsgálatokkal.

A következő feladatokat tűztük ki:

1. HTS szűrés teljesítményének növelése érdekében kokultúrában alkalmazható, fluoreszcens fehérjék expresszióján alapuló HTS-kompatibilis esszé kialakítása efflux és uptake transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálatára
  - OATP2B1 uptake transzporterrel való kölcsönhatás vizsgálata parentális és OATP2B1 uptake transzportert expresszáló kokultúra modellel
  - ABCB1, ABCG2 efflux transzporterrel való kölcsönhatás vizsgálata parentális, ABCB1 és ABCG2 transzportereket expresszáló hármas kokultúra modellel
2. A kialakított szűrőrendszer segítségével az NCI DTP Onkológiai készlet IV tesztelése ABCB1, ABCG2 és OATP2B1 transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálatára
3. A kialakított esszével nyert eredmények validálása másodlagos tesztekkel
4. A rezisztencia kialakulásának megakadályozására irányuló stratégia vizsgálatára az ABCB1 expresszióját gátló celecoxib jellemzése kombinációs kölcsönhatás analízis segítségével

## **4. Anyagok és módszerek**

### **4.1. Felhasznált vegyületek**

Az NCI DTP által összeválogatott Onkológiai készlet IV, az FDA által jóváhagyott rákellenes hatással rendelkező 101 tagból álló könyvtárát 96 lyukú lemezen, 10 mM-os koncentrációban DMSO-ban oldva szereztük be (205). A szűrés során kijött potenciális “hit” vegyületeket a megerősítő tesztekhez más gyártótól rendeltük újra: metotrexátot (NSC-740), tenipozidot (NSC-122819) és tioplexet (NSC-6396) a Mercktől; irinotecant (NSC-616348), kapecitabint (NSC-712807), bleomicint (NSC-125066), docetaxelt (NSC-628503) és carfilzomibot (NSC-758252) a SelleckChemtől; karboplatin (NSC-241240) az Accord Healthcare-től; Etopozidot (NSC-141540) a TEVA-tól; míg az ösztron-3-szulfát és Cascade Blue a ThermoFisher Scientific cégtől származtak.

A szinergia kísérletekhez használt doxorubicint, celecoxibot és firocoxibot a Sigma-Aldrich-től; a trichosztatin-A-t és a SAHA vegyületet a Tocris Bioscience-től vásároltuk. A meloxicam-ot a Ceva Animal Health-től szereztük be.

### **4.2. Sejtvonalak és tenyésztésük**

A szűrés során rákos és immortalizált sejtek parentális és MDR fenotípusait használtuk. Az A431 humán epidermoid karcinoma sejtvonalat és Mes-Sa humán méhszarkóma sejtvonalat az ATCC-től vásároltuk. A szinergia vizsgálatokhoz használt P388 egér leukémia sejtvonalat az NCI DTP sejtgűjteményéből (National Institutes of Health), a CLBL-1 kutya diffúz nagy B-sejtes lymphomasejteket Dr. Rütgen Barbarától (University of Veterinary Medicine, Bécs) kaptuk (208).

A parentális Mes-Sa sejtvonalból Mes-Sa/Dx5 nagy mennyiségű ABCB1 fehérjét kifejező tumorsejtvonalat folytonos doxorubicin szelekcióval hozták létre (209), az ABCB1 illetve ABCG2 transzportereket overexpresszáló epidermoid karcinóma és uterin szarkóma sejtvonalakat retrovirális transzdukcióval (210), míg az OATP2B1-et overexpresszáló A431 sejtvonal transzpozon alapú génbeviteli rendszer segítségével (158) készültek. A transzdukció után a sejteket áramlási citométerrel (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) transzporter funkcióra, továbbá OATP2B1 esetén CD4

protein expresszióra szortoltuk. A parentális, OATP2B1, ABCG2 és ABCB1 overexpresszáló sejtvonalakba ezek után lentivirális transzdukcióval kerültek a fluoreszcens proteint kifejező pRRL-EF1-mCherry, -mOrange, illetve az -eGFP expressziós plazmidok (210). A szelekcióval létrehozott Mes-Sa/Dx5 sejteket a stabil és homogén ABCB1 overexpresszió biztosítására 500 nM doxorubicinben tenyésztettük, a kísérletek megkezdése előtt egy héttel a sejteket drogmentes médiumba helyeztük át.

A Mes-Sa, Mes-Sa/Dx5, Mes-Sa-B1, A431, A431-B1, A431-G2 sejteket DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SigmaAldrich, 52100047), P388, CLBL-1 sejteket RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiumban (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A tápoldatok 10% szérumot (FBS, fetal bovine serum), 5 mM L-glutamint és 50 unit/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies) antibiotikum keverékkel egészítettük ki.

A sejtvonalakat rendszeresen teszteltük mycoplasma fertőzésre, folyamatosan vizsgáltuk az ABCB1 és ABCG2 transzporter expressziót mitoxantronnal, tariquidar inhibitor hiányában és jelenlétében, illetve az OATP2B1 expressziót Cascade Blue felvétellel (158) öszton-3-szulfát inhibitor hiányában és jelenlétében.

#### **4.3. Fluoreszcens fehérje expresszióján alapú és reagens alapú citotoxicitási esszé**

A nagy áteresztőképességű fluoreszcens alapú citotoxicitási esszé kutatócsoportban korábban kifejlesztett módszeren alapul (211). A citotoxicitási tesztek automatizálása Hamilton STARlet automata folyadékkezelő robot (Hamilton Robotics STARlet) segítségével valósult meg. A sejtek kiültetése 384 lyukú lemezekon történt, monokultúrában 2500 sejt, kettes kokultúra esetén sejtvonalanként 1250 sejt, míg hármas kokultúra esetén sejtvonalanként 625 sejt került egy well-be. A tesztelni kívánt vegyületek 24 óra elteltével, 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett történő inkubációt követően kerültek rá a sejtekre. A szűrés során 6 koncentrációpontban, harmadoló hígításban kerültek a sejtekre a vegyületek, elérve a 60 µl/well végtérfogatot, a DMSO koncentráció a sejteken nem haladta meg az 1%–ot. 6 fluoreszcens vegyületet (valrubicin, doxorubicin, daunomycin, mitoxantrone, mithramycin, dactinomycin) kizártunk a vizsgálatból, belső saját (belső) fluoreszcenciájuk miatt. A citotoxikus hatást 96 és 144 óra elteltével is lemértük mikrolemez-olvasóval (GFP: 485<sub>ex</sub> /510<sub>em</sub>; mCherry: 585<sub>ex</sub>



/610<sub>em</sub>; mOrange: 545<sub>ex</sub> /567<sub>em</sub>), mivel az általunk létrehozott kvázi 'label free' fluoreszcens esszével többször is lemérhető ugyanaz a lemez, és így megvalósítható a toxicitás időbeli követése (211). A mérésekhez WAS (well area scan) protokolt használtunk, amely 4 meghatározott ponton pásztázza végig a well-eket, figyelembe véve a sejtek eloszlásának szabályosságait. A megerősítő tesztek során 9 koncentrációpont segítségével vettük fel a dózis-hatás görbét, a vegyület citotoxicitásához igazított hígítási lépcsővel.

#### 4.4. HTS-kompatibilis *in vitro* szűrési platform

A tesztek 384-es lemezekben történő automatizálása Hamilton STARlet automata folyadékkezelő robot segítségével valósul meg. Az automatizált folyadékkezelés programozása Venus2 szoftveren keresztül történt. A fluoreszcencia alapú kokultúrás esszé mérése a platformhoz integrált Perkin Elmer mikroplate readerrel, kiértékelése Sessler Judit által C# nyelven írt program segítségével történt. A vegyületeket mindhárom kokultúrás modellben legalább kétszer, egymástól függetlenül teszteltük.

#### 4.5. Statisztikai analízis

Az elsődleges szűrés során az IC<sub>50</sub> értéket a logaritmikus dózis-hatás görbékre fektetett lineáris regresszióval határoztuk meg. A megerősítő tesztek során a szigmoidális görbék illesztése GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) szoftver segítségével történt. A sejtvonalakon mért IC<sub>50</sub> értékek közti szignifikancia elemzést kétoldali Student-teszt segítségével végeztük. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük P érték <0,05 (\*) vagy 0,01 (\*\*) esetén. Az IC<sub>50</sub> (a sejtek 50%-át elpusztító koncentráció) értékekből számított átlagok 3–10 ismétlésből lettek kalkulálva. A szelektivitás mértékét a parentális és transzportert expresszázó sejtvonalakon mért citotoxicitási IC<sub>50</sub> értékek hányadosából határoztuk meg: a rezisztencia hányados (resistance ratio, RR) jelenti a rezisztens és parentális sejteken mért IC<sub>50</sub> értékek hányadosát, a szelektivitási hányados (selectivity ratio, SR) az RR inverze. Biológiai releváns különbségnek a RR > 3 vagy SR > 3 értékeket tekintettük.

#### 4.6. NCI DTP *in silico* screening

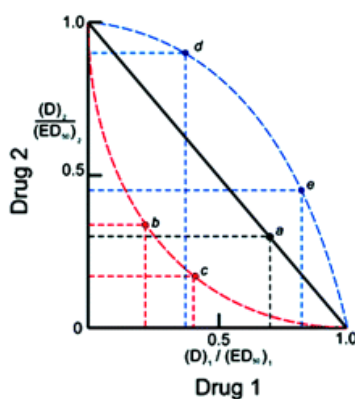
Az *in silico* szűrés során az NCI DTP Onkológiai készlet IV vegyületkönyvtárában



(kezeletlen, élő sejtek) és a pozitív (halott sejtek) kontrollokra. A kombinációk vizsgálatánál az „1. vegyület”  $IC_{50}$ -értékeinek változását vizsgáltuk a „2. vegyület” fix koncentrációja mellett (és fordítva). A kapott  $IC_{50}$  értékeket izobologramon ábrázoltuk, minden adatpontra kombinációs index értéket számítottunk (212). Ennek megfelelően a kapott hatást szinergistának ( $CI \leq 0.7$ ); mérsékelten szinergistának ( $0.7 < CI \leq 0.85$ ), additívnak ( $0.85 < CI \leq 1.2$ ), mérsékelten antagonistának ( $1.2 < CI \leq 1.45$ ) vagy antagonistának ( $CI > 1.45$ ) határoztuk meg. Az izobologramok kiértékelése Sessler Judit által írt programmal történt.

#### 4.8. Kombinációs kölcsönhatás analízise Chou Talalay CI-módszer segítségével

Az izobologram ábrázolása általánosan használt eljárás az ágensek közötti kölcsönhatások elemzésére, függetlenül a vegyületek hatásmechanizmusának, illetve dózis-hatás kapcsolataik jellegétől (213). Ha a két vegyület önmagában mért hatás ( $pl. IC_{50}$ ) értékét egy egyenessel összekötjük, az egyenesen olyan koncentrációpontok halmazát kapjuk, melyeknél a kombinációban mért hatás eléréséhez az anyagok egymással helyettesíthetők (214) (8. ábra).



**8. ábra:** Normalizált izobologram (212). A tengelyek metszéspontja jelöli a két vegyület önmagában mért  $ED_{50}$  értékre normalizált koncentrációit. Ha a kombinációban mért értékek a vonalra esnek (a pont), akkor a hatás additív. A vegyületek kombinációban tesztelve felerősíthetik egymás citotoxikus hatásait (b, c pont), illetve gyengíthetik azokat (d, e pont), szinergizmust vagy antagonizmust jelezve.

A kombinációs indexet két vegyület szinergizmusának vagy antagonizmusának meghatározására vezették be. Az egyenlet (212) magában foglalja a biokémiában és

biofizikában használatos Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch és Scatchard-egyenleteket:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}}$$

, ahol  $CI < 1$ ,  $CI = 1$ , illetve  $CI > 1$  jelzi a szinergista, additív, illetve antagonistá hatást. A nevezőben szereplő  $(D_x)_1$  és  $(D_x)_2$  jelenti „D<sub>1</sub>”, illetve „D<sub>2</sub>” vegyület önmagukban mért koncentrációját x% inhibíció mellett,  $D_m$  a medián hatású dózis (pl. IC<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub>, vagy LD<sub>50</sub>), ami 50%-os inhibícióval bír, míg  $m$  koefficiens a dózis-hatás görbe alakjáról ad információt (hiperbolikus, szigmoidális görbe). A kölcsönhatás további pontosítását a CI értékek intervallumokba sorolásával finomították (2. táblázat).

**2. táblázat:** Kombinációs index (CI) analízis során használt jelölések szinergista, additív hatás illetve antagonizmus esetén (212). A kombinációs index módszer Chou és Talalay (215), valamint Chou és Martin számítógépes szoftverén (216) alapul.

Range of Combination Index	Description
<0.1	Very strong synergism
0.1–0.3	Strong synergism
0.3–0.7	Synergism
0.7–0.85	Moderate synergism
0.85–0.90	Slight synergism
0.90–1.10	Nearly additive
1.10–1.20	Slight antagonism
1.20–1.45	Moderate antagonism
1.45–3.3	Antagonism
3.3–10	Strong antagonism
>10	Very strong antagonism

#### 4.9. Mikrolemez-alapú uptake esszé

$7 \times 10^4$  OATP2B1-et expresszáló A431 sejtet osztottunk ki 96 lyukú lemezekre 200  $\mu$ l végtérfogat/well-ben és inkubáltuk 16–24 órán át 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalom mellett. A konfluencia elérése után a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket háromszor mostuk 200  $\mu$ l/well foszfátpufferelt sóoldattal (PBS). Ezt követően a sejteket a vegyületek

jelenlétében 5 percig 37 °C-on előinkubáltuk. Az oldószer mennyiségét 0,5% alatt tartottuk a vizsgálat során, a fluoreszcens festékek interferenciájának elkerülése érdekében. 50 µl Cascade Blue fluoreszcens festék hozzáadása után (elérve a 10 µM végkoncentrációt 100 µl végtérfogatban) a lemezt 30 percig inkubáltuk 37 °C-on (158) . A reakciót 200 µl/well jéghideg PBS hozzáadásával állítottuk le, majd a felülúszó eltávolítása után a sejteket háromszor mostuk 200 µl/well jéghideg PBS-sel. Végül 200 µl/well PBS hozzáadása után a fluoreszcenciát Enspire lemezolvasóval (Perkin Elmer) szobahőmérsékleten mértük 401<sub>ex</sub>/419<sub>em</sub> hullámhosszon.

#### **4.10. Cascade Blue uptake meghatározása áramlási citométer segítségével**

Az A431 sejteket tripszinezés (0,1% tripszin) után összegyűjtöttük és kétszer mostuk uptake pufferrel (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM MES és 5.6 mM glükóz; a Ph-t 10 N NaOH / 1 M HEPES alkalmazásával 5.5-re állítottuk be). 5x10<sup>5</sup> sejtet ösztron-3-szulfát jelenlétében, illetve anélkül 37 °C-on előinkubáltuk, majd a 100 µl végtérfogathoz hozzáadtunk 5 µM Cascade Blue festéket 30 percig. A reakciót 1 ml jéghideg PBS hozzáadásával állítottuk le. A sejteket jégen tartottuk az áramlási citométerrel történő mérésig. A sejtek fluoreszcenciája minimum 20 000 élő sejt leszámolásával lett meghatározva, Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) segítségével.

## 5. Eredmények

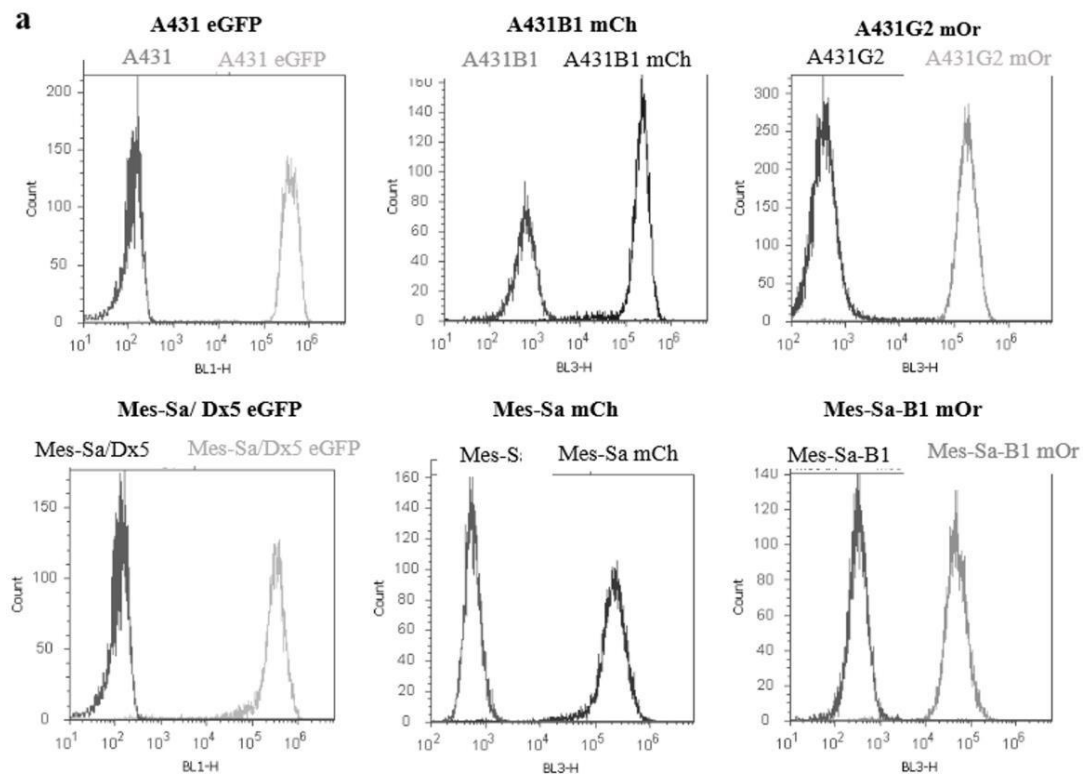
### 5.1. Kokultúrán alapuló fluoreszcens esszé kialakítása efflux és uptake transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálatára

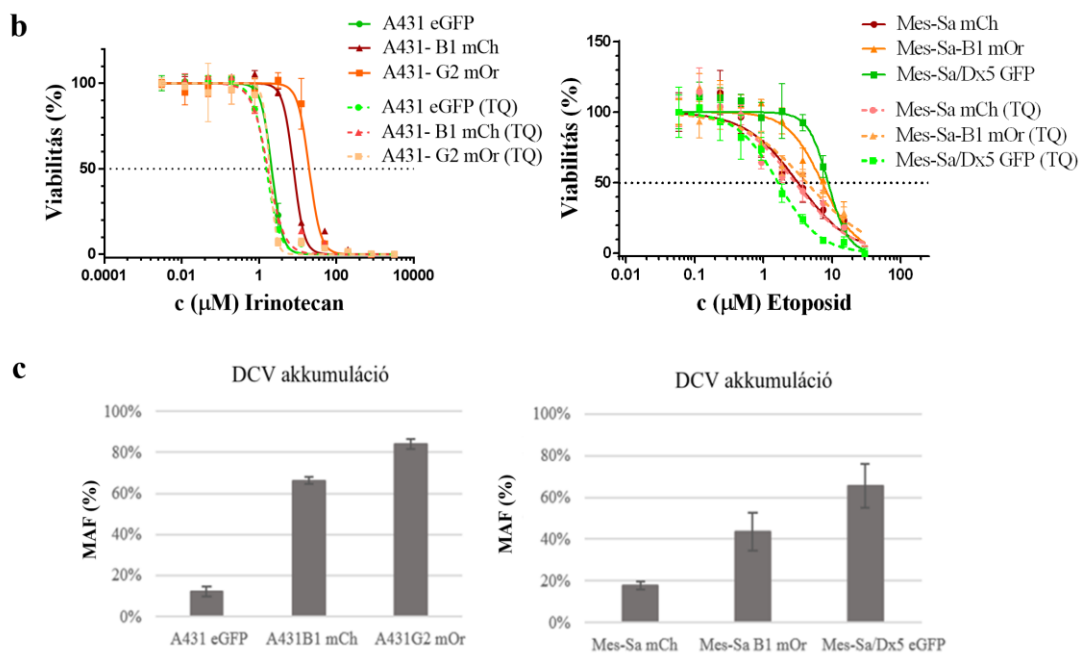
Kutatócsoporthozunk korábban létrehozott egy automatizált, hatékony és robusztus sejtproliferáció gátlást mérő HTS-kompatibilis szűrő platformot (211). Célunk a már kialakított módszer továbbfejlesztése volt, a tesztelt vegyületek efflux és uptake transzporterekkel való citotoxikus kölcsönhatásának vizsgálatára. Olyan gyógyszerjelölt molekulákat kívántunk azonosítani, amelyek alkalmasak lehetnek a hagyományos kemoterápiás szerekkel szemben ellenálló tumorok kezelésére.

#### 5.1.1. Fluoreszcens transzportert expresszáló és parentális sejt párok kialakítása HTS toxicitási kísérletekhez

A molekulakönyvtárak HTS szűréséhez először adaptáltunk egy, a csoportunkban korábban Tóth Szilárd által kidolgozott sejtproliferáció gátlást mérő *in vitro* esszét (211), fluoreszcens fehérjét és specifikus transzportereket is expresszáló sejtek mennyiségének közvetlen mérésével. A szűrés során A431 humán epidermoid karcinóma sejtvonal MDR efflux (ABCB1 és ABCG2), illetve uptake (OATP2B1) transzportert expresszáló variánsait, illetve humán Mes-Sa uterin szarkóma sejtvonal ABCB1 transzportert expresszáló Mes-Sa-B1, illetve doxorubicin rezisztens változatát (Mes-Sa/Dx5) jellemeztük. A fluoreszcens proteinek kódoló vektorok lentivirális transzfekcióval kerültek a sejtekbe. A fluoreszcens sejtek lentivirális transzfekcióját Szepesi Áron és Kucsma Nóra végezte. A kísérletek során használt fluoreszcens sejtek homogenitását és intenzitását a kísérletek időtartama alatt folyamatosan ellenőriztük áramlási citométer segítségével, míg a transzporter expressziót citotoxicitási esszével specifikus inhibitor hiányában, illetve jelenlétében vizsgáltuk. Specifikus inhibitor jelenlétében a transzporter funkciójának kiesése megszünteti az MDR sejtek ellenállóképességét a parentális sejtvonalon mért hatáshoz képest. A vártak megfelelően az ABCB1, illetve ABCG2 transzportert expresszáló sejtekre kevésbé toxikus vegyületek gátlószert használatakor nem mutattak szignifikáns eltérést toxicitásban a parentális sejtvonalakon mért értékekhez képest (9. ábra b). Ahhoz, hogy a fluoreszcencia alapú sejtproliferáció gátlást

mérő rendszerrel megbízhatóan tudjunk mérni, mind a fluoreszcens proteinek, mind a választott transzportereket stabilan expresszáló fluoreszcens sejtvonalakra van szükség. Ezeket a paramétereket a kísérletek előtt és alatt is folyamatosan vizsgáltuk efflux (9a, 9b, 9c ábra), és uptake (10a, 10b ábra) transzporter esetén. A fluoreszcens fehérje expresszióján alapú citotoxicitási esszék során eGFP, mCherry (mCh), mOrange (mOr) fluoreszcens fehérjét expresszáló A431, A431-B1, A431-G2, A431-OATP2B1, illetve Mes-Sa, Mes-Sa/Dx5 sejtvonalakot használtunk. A szűrés során használt OATP2B1 mCh transzportert expresszáló A431 sejtvonalt transzportaktivitását Cascade Blue esszével ellenőriztük (158), amely fluoreszcens festék impermeábilis OATP2B1 szubsztrát.

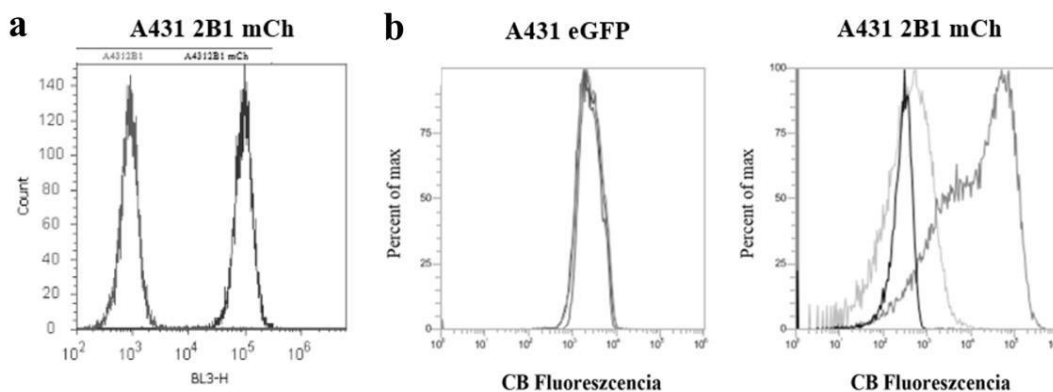




**9. ábra:** A kokultúrában használt A431 és Mes-Sa efflux-transzportereket expresszáló sejtvonalak karakterizációja. **a)** A kísérletek során használt fluoreszcens fehérjét expresszáló A431 és Mes-Sa sejtvonalak fluoreszcencia-intenzitása. A fluoreszcens sejtvonalak homogenitását és stabilitását Attune® akusztikus fókuszáló citométerrel (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ellenőriztük 488 nm excitációs hullámhosszon. Az eGFP-t expresszáló sejteket a BL1 csatornában (530/30 nm filter), mCh-sejteket a BL3 csatornában (695/40 nm filter), míg az mOr-sejteket a BL2-ben (574/26 nm filter) detektáltuk. **b)** ABCB1 és ABCG2 transzporter expresszió ellenőrzése citotoxicitási teszttel. Irinotecan és etopozid toxicitása parentális, ABCB1, illetve ABCG2 transzportert expresszáló sejteken. Tariquidar jelenlétében a transzportert expresszáló sejtek ellenállása megszüntethető. **c)** DyeCycle Violet (DCV) felhalmozódásának mérése A431 és Mes-Sa sejtvonalakban áramlási citométer segítségével. Az adatok elemzését Attune™ Nxt v2.6 szoftver (Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific) alkalmazásával végeztük. A DCV transzport kísérleteket uptake pufferben végeztük (125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM MES és 5,6 mM glükóz), a pH-t 7,4-en, 1 M HEPES felhasználásával. Az ABCB1 és az ABCG2 működését DCV felhasználásával vizsgáltuk, amely szubsztrátja mindkét transzporternek. Az 5 percig tartó, 1 μM tariquidar (ABCB1 és ABCG2 inhibitor) hiányában vagy jelenlétében történő előinkubálást követően 30 percig 1 μM DCV-vel inkubáltuk a sejteket. Az MDR aktivitási tényező (MAF%)

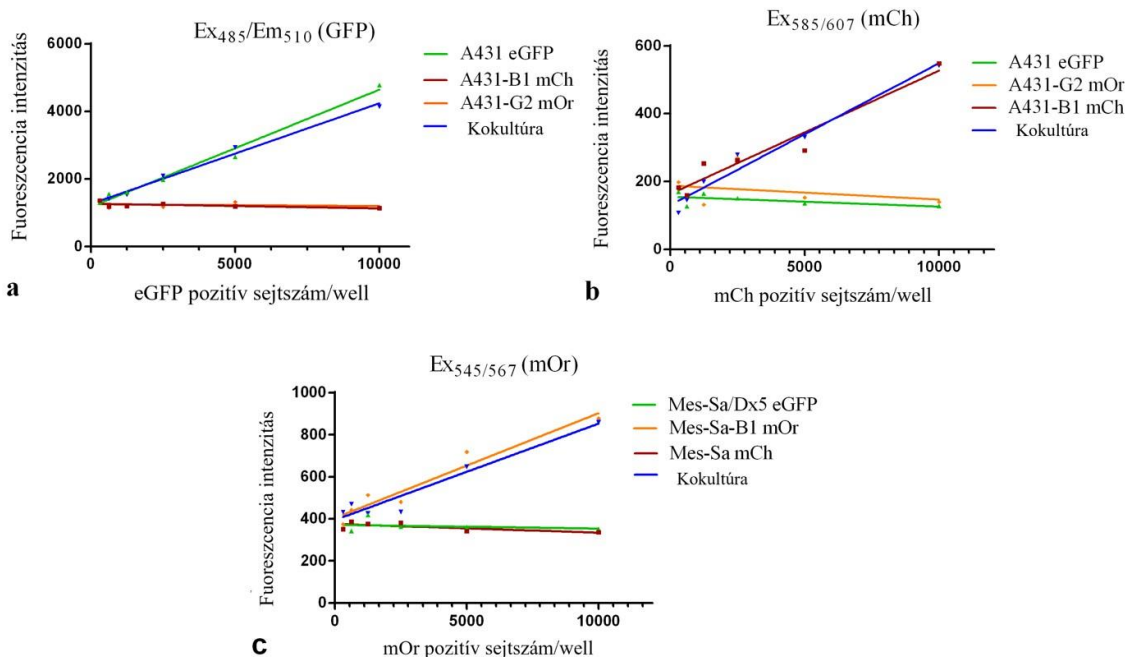


számítása a következőképpen történt:  $MAF\% = (((MFI_{inh} - MFI_0) / MFI_{inh}) \times 100)$ , ahol az  $MFI_{inh}$  és az  $MFI_0$  a medián fluoreszcens intenzitás (MFI) (inh) vagy anélkül (0) (217).



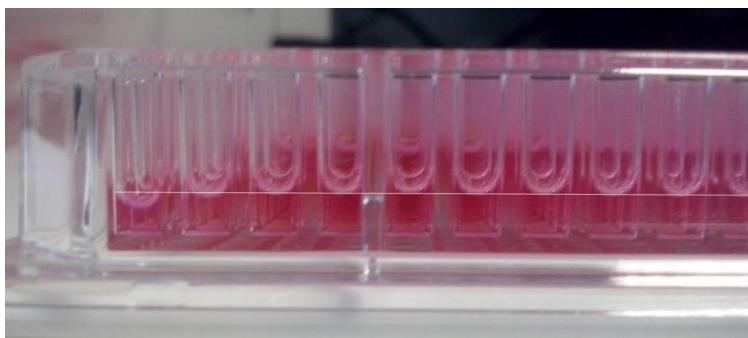
**10. ábra:** A kokultúrában használt A431 és 2B1 uptake-transzportert expresszáló sejtvonalak karakterizációja. a) A kísérletek során használt fluoreszcens fehérjét expresszáló A431 és 2B1 uptake-transzportert expresszáló variáns fluoreszcencia-intenzitása. A fluoreszcens sejtvonalak homogenitását és stabilitását Attune® akusztikus fókuszáló citométerrel (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ellenőriztük 488 nm excitációs hullámhosszon. Az eGFP-t expresszáló sejteket a BL1 csatornában (530/30 nm filter), mCh-sejteket a BL3 csatornában (695/40 nm filter) detektáltuk. b) Az A4312B1 sejtek Ösztron-3-szulfát-függő Cascade Blue (CB) felvételt mutatnak (Anyagok és módszerek 4.10). A CB felvételt a sejtek 5  $\mu$ M CB 30 percig tartó inkubálása után (sötétszürke) mértük. Kontroll kísérletekben a sejteket 5 percig előinkubáltuk Estrone-3-szulfáttal (világosszürke). A sejtek autofluoreszcenciáját fekete görbe jelzi.

A kokultúrában vizsgált hatás méréséhez olyan módszer kialakítására van szükség, amely képes a fluoreszcens fehérjéket expresszáló sejtek mennyiségének szelektív követésére. Mindemellett a monokultúrában detektált sejtszám fluoreszcens intenzitásának összehasonlíthatónak kell lennie a kokultúrában mért értékekkel. Ahogyan a 11. ábrán is szerepel, a különböző hullámhosszon emittáló (egymással nem interferáló) fluoreszcens proteinnel transzfektált variánsok kokultúrában, multiplexing technikával, direkt fluoreszcens méréssel vizsgálhatók. A transzportereket kifejező sejtvonalak különböző fluoreszcens proteinek is expresszálnak, melyek szelektíven detektálhatók.



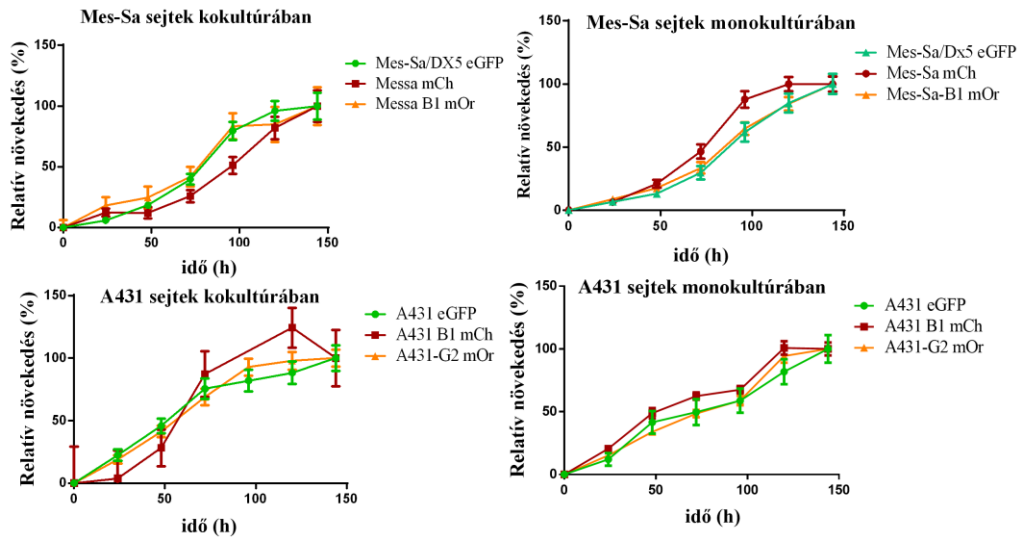
**11. ábra:** Egyenes arányosság a mono- illetve kokultúrában mért fluoreszcencia intenzitás és a 384-es lemezre kiosztott sejtszám közt. A kísérletek során használt intervallumban a fluoreszcencia intenzitás értéke arányos a sejtszámmal, az eGFP (a), mCh (b) vagy mOr (c) expresszáló sejtek száma megbízhatóan megbecsülhető mono- és kokultúrák körülmények közt.

A 384-es lemezen mért citotoxicitási esszék előzetes mérései során monokultúrában 2500 sejt/well kiindulási sejtszám esetén elegendőnek bizonyult 60  $\mu$ l végtérfogat/well esetén (218). A lemez szélén lévő well-ekben a 144 órás inkubáció végére szemmel láthatóan is csökkent a térfogat (12. ábra), az itt mért intenzitás alacsonyabb volt, mint a belső well-ek intenzitása, emiatt a sejtek kiosztásánál figyelembe kellett venni a szélhatás jelenségét is (211).



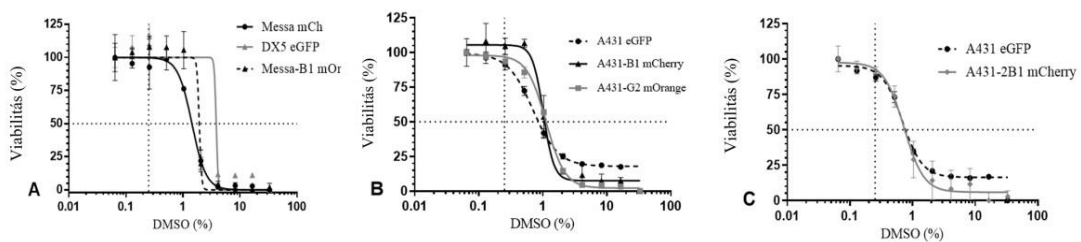
**12. ábra:** 384-es lemez szélén levő well-ekben 144 óra inkubációt követően jelentősen csökkent a médium térfogata (218)

A kettős és hármas kokultúrák esetében a monokultúrában meghatározott sejtszám alapján tettük ki a lemezekre a sejteket. A 60  $\mu$ l végtérfogóban a három sejtvonal növekedési rátája közt nincs jelentős különbség (13. ábra).



**13. ábra:** Fluoreszcens A431 és Mes-Sa sejtek növekedésének követése mono- és kokultúrában. A sejtnövekedés szelektíven nyomon követhető a különböző fluoreszcens proteint expresszáló sejtvonalak fluoreszcencia intenzitása alapján. A sejteket egy 384-lyukú lemezre szélesztjük, ahol a sejtsűrűség 1875 sejt / well volt a hármas kokultúrában (625 sejt Mes-Sa mCh / Mes-Sa/Dx5 eGFP / Mes-Sa-B1 mOr sejtvonalakból; 625 sejt A431 eGFP / A431-B1 mCh / A431-G2 mOr sejtvonalakból) és 2500 sejt/well monokultúrákban. A sejtek 144 órán át inkubáltuk 37°C and 5% CO<sub>2</sub> -tartalom mellett, az egyes sejtvonalak sűrűségének megfelelő fluoreszcencia intenzitást rendszeres időközönként rögzítettük mikrotálca lemezolvasó segítségével.

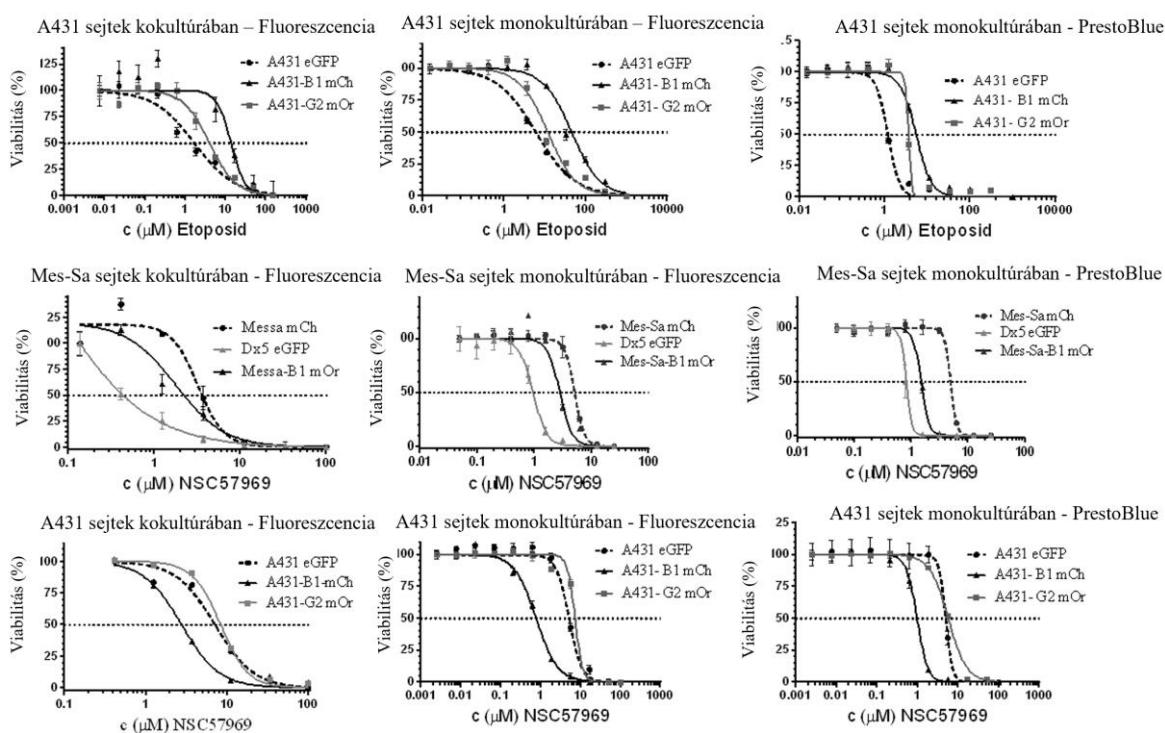
Mivel a kokultúra DMSO-tűrési határa 0.5%, (14. ábra), a szűrés során használt vegyületek legmagasabb tesztelt koncentrációját 50  $\mu$ M-ban határoztuk meg.



**14. ábra:** Mes-Sa (A) és A431 hármas- (B), illetve A431 kettős kokultúra (C) DMSO-tűrési tartománya

### 5.1.2. Az ABCB1 és ABCG2 transzportert expresszáló A431 és Mes-Sa/Dx5 sejteket tartalmazó kokultúra-modell Prestoblue reagenssel történő validációja

A kokultúra modelleket ezután ismert hatású vegyületekkel validáltuk. A kokultúrában és monokultúrában kitett sejteket mennyiségét kétféle módon mértük, fluoreszcencia alapú detektálási módszerrel és PrestoBlue® reagenssel. Az ABCB1 és ABCG2 transzportereket expresszáló sejtek etopozidra rezisztensek (balra), míg egy MDR-szelektív vegyület (NSC73306) szelektíven pusztítja az ABCB1 transzportert expresszáló sejtvonalat (középső sor Mes-Sa sejtvonalon, utolsó sor A431 sejteken mérve). A fluoreszcensen mért rezisztencia fokozódása PrestoBlue citotoxicitási esszével is igazolható (15. ábra, 3. táblázat). Az ellenőrző kísérleteket Tóth Szilárddal közösen végeztük.



**15. ábra:** A fluoreszcencia alapú hármaskultúrán mért citotoxicitási esszé validálása Prestoblue esszé segítségével. Mes-Sa, Mes-Sa-B1, Mes-Sa/Dx5 és A431, A431B1, A431G2 sejteken mono- illetve kokultúrában növekvő koncentrációjú etopozid (felső sor) és MDR-szelektív vegyület (középső és alsó sor) fluoreszcensen és Prestoblue reagenssel mért citotoxicitási görbéje összevethető eredményt ad. A pontos  $IC_{50}$  értékeket a 3. táblázat tartalmazza.

**3. táblázat:** Etopozid és az NSC57969 MDR-szelektív vegyület IC<sub>50</sub> értékei (μM) PrestoBlue viabilitási és fluoreszcencia alapú citotoxicitási esszével monokultúrában, illetve kokultúrában mérve.

		IC <sub>50</sub> (μM) <i>Fluoreszcens</i> <i>mérés (hármás</i> <i>kokultúra)</i>	IC <sub>50</sub> (μM) <i>Fluoreszcens</i> <i>mérés</i> <i>(monokultúra)</i>	IC <sub>50</sub> (μM) <i>PrestoBlue</i>
<i>Etopozid</i>	A431:	1.691	6.098	1.188
	A431B1:	13.77	46.27	5.489
	A431G2:	4.049	11.97	3.425
<i>NSC57969</i>	Mes-Sa:	3.208	5.076	4.891
	Mes-Sa/Dx5:	0.177	0.951	0.815
	Mes-Sa-B1:	1.799	2.809	1.482
	A431:	7.094	5.127	4.932
	A431B1:	2.783	0.774	0.974
	A431G2:	8.392	7.257	5.760

A kokultúrában fluoreszcencia alapján mért citotoxicitási esszé ABC efflux transzporterrel való toxikus kölcsönhatás kimutatására, ezáltal szubsztrátok, illetve MDR-szelektív vegyületek azonosítására is alkalmasnak bizonyult.

### **5.1.3. A kialakított szűrési rendszer NCI DTP Onkológiai készleten történő validációja**

A kialakított rendszer segítségével az NCI DTP által összeválogatott Onkológiai készlet 101 vegyületét teszteltük. A primary screening során 6 koncentrációpontban, 2 párhuzamos mintával, efflux és uptake transzportert expresszáló kokultúra modelleken vizsgáltuk a vegyületek citotoxikus hatását (4. táblázat).

**4. táblázat:** NCI DTP Onkológiai készlet IV-ben található vegyületek és szűrés során vizsgált koncentrációik.

	<i>Legmagasabb vizsgált koncentráció</i>		<i>Legalacsonyabb vizsgált koncentráció</i>
<i>Abiraterone</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Allopurinol</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Altretamine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Arimidex</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Arsenic trioxide</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Axitinib</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Azacitidine</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Bleomycin</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Bortezomib</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Busulfan</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Cabazitaxel</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Capecitabine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Carboplatin</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Carfilzomib</i>	25 µM	-	0,00041 µM
<i>Carmustine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Celecoxib</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Chlorambucil</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Cisplatin</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Cladribine</i>	25 µM	-	0,041 µM
<i>Clofarabine</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Crizotinib</i>	25 µM	-	0,041 µM
<i>Cyclophosphamide</i>	50 µM-	-	0,206 µM
<i>Cytarabine</i>	25 µM	-	0,103 µM

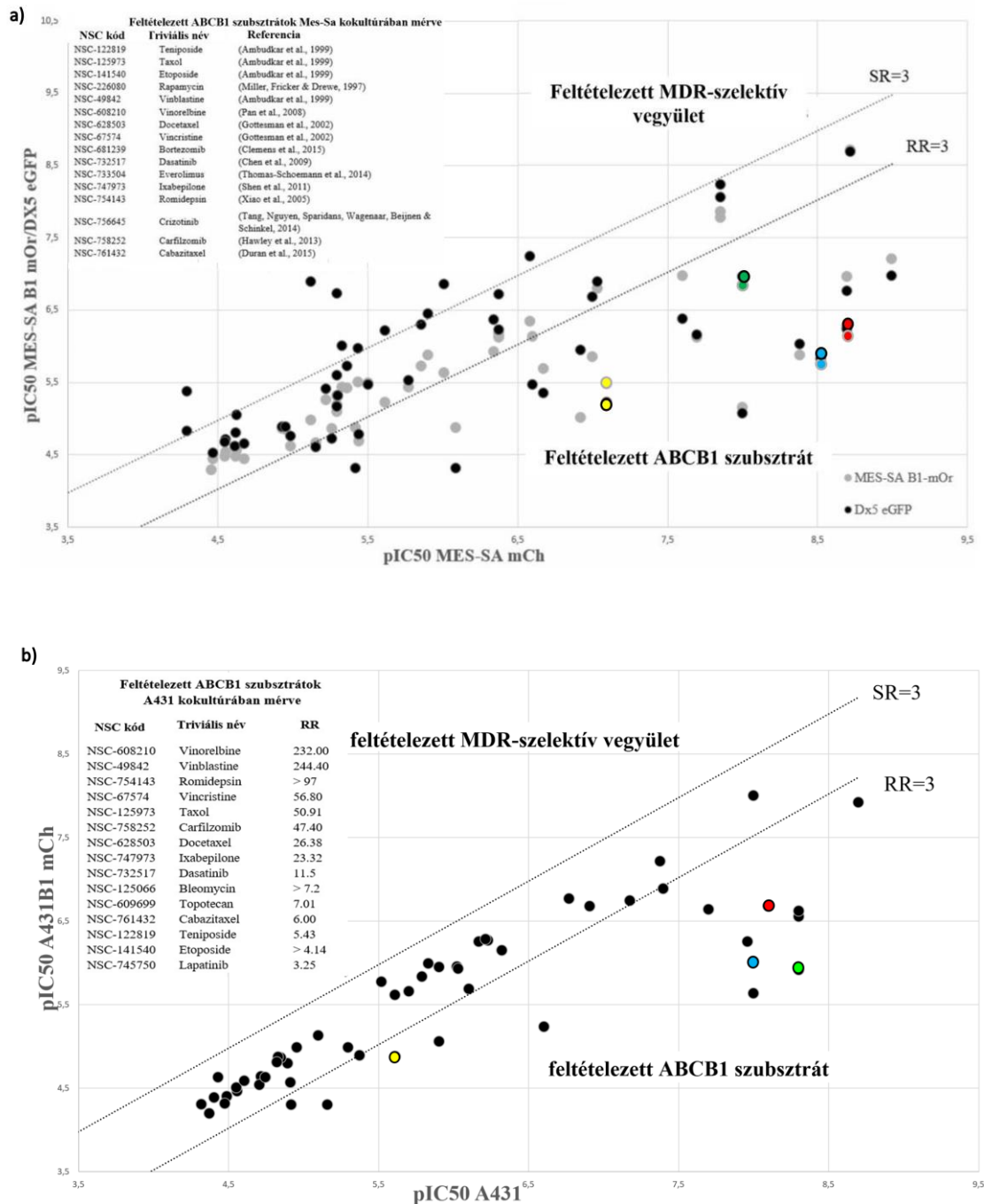
<i>Dacarbazine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Dasatinib</i>	25 µM	-	0,0041 µM
<i>Decitabine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Dexrazoxane</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Docetaxel</i>	25 µM	-	0,000041 µM
<i>Erlotinib</i>	25 µM	-	0,041 µM
<i>Estramustine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Ethyol</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Etoposide</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Everolimus</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Exemestane</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Floxuridine</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Fludarabine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Fluorouracil</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Fulvestrant</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Gefitinib</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Gemcitabine</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Hydroxyurea</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Ifosfamide</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Imatinib</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Imiquimod</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Irinotecan</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Ixabepilone</i>	25 µM	-	0,0206 µM
<i>Lapatinib</i>	25 µM	-	0,0206 µM
<i>Lenalidomide</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Letrozole</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Levulan</i>	25 µM	-	0,103 µM

<i>Lomustine</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Mechlorethamine</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Megestrol</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Melphalan</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Mercaptopurine</i>	25 µM	-	0,041 µM
<i>Methotrexate</i>	25 µM	-	0,0021 µM
<i>Methoxsalen</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Mitomycin</i>	25 µM	-	0,0206 µM
<i>Mitotane</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Nelarabine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Nilotinib</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Oxiplatin</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Pazopanib</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Pemetrexed</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Pentostatin</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Pipobroman</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Pralatrexate</i>	25 µM	-	0,000041 µM
<i>Procarbazine</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Quinacrine</i>	25 µM	-	0,041 µM
<i>Raloxifene</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Rapamycin</i>	50 µM	-	0,103 µM
<i>Ribomustin</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Romidepsin</i>	25 µM	-	0,0041 µM
<i>Sorafenib</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Streptozocin</i>	50 µM	-	0,206 µM
<i>Sunitinib</i>	25 µM	-	0,103 µM
<i>Tamoxifen</i>	25 µM	-	0,103 µM



<i>Taxol</i>	25 $\mu$ M	-	0,0021 $\mu$ M
<i>Temozolomide</i>	50 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M
<i>Teniposide</i>	25 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Thalidomide</i>	25 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Thioguanine</i>	50 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Thioplex</i>	50 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M
<i>Topotecan</i>	25 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M
<i>Tretinoin</i>	50 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M
<i>Triethylenemelamine</i>	25 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Uramustine</i>	50 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Vandetanib</i>	25 $\mu$ M	-	0,041 $\mu$ M
<i>Vemurafenib</i>	50 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Vinblastine</i>	25 $\mu$ M	-	0,0021 $\mu$ M
<i>Vincristine</i>	25 $\mu$ M	-	0,0021 $\mu$ M
<i>Vinorelbine</i>	25 $\mu$ M	-	0,00021 $\mu$ M
<i>Vismodegib</i>	50 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M
<i>Vorinostat</i>	25 $\mu$ M	-	0,103 $\mu$ M
<i>Zoledronate</i>	50 $\mu$ M	-	0,206 $\mu$ M

A citotoxikus hatást 144 óra elteltével mértük. A szenzitivitás mértékét az IC<sub>50</sub> értékekből számolt szelektivitási hányados (SR) mutatja meg, míg a szelektivitási hányados reciproka a rezisztencia hányados (RR) (4.5 *Anyagok és módszerek*). A szűrés során a kölcsönhatási „küszöbértéknek” a rezisztencia, illetve a szelektivitási hányados értékeket 3-nak határoztuk meg.



**16. ábra:** Az NCI DTP Onkológiai készleten mért elsődleges szűrés eredményei **a)** Mes-Sa mCh és Pgp-t expresszáló variánsain (Mes-Sa/Dx5 eGFP (szürke pontok) illetve Mes-Sa-B1 mOr (fekete pontok)); **b)** A431 és Pgp-t expresszáló sejtvonalpárján. Az adatpontok legalább két egymástól függetlenül végzett kísérlet  $pIC_{50}$  értékének átlagát reprezentálják. Az ábrákon a transzportert expresszáló sejtvonallal szemben mutatott csökkent toxicitású vegyületeket listáztam, például sárga: teniposide, kék: taxol, zöld: vinblastine, piros: docetaxel. A parentális és a transzportert expresszáló sejtek közötti

toxicitásban legalább háromszoros különbséget (szaggatott vonal) mutató vegyületeket feltételezett ABCB1 vagy ABCG2 szubsztrátnak ( $RR > 3$ ) tekintettük.

Ahogy sejteni lehetett, a vegyületek többsége nem érte el a küszöbhatást, ugyanakkor azonosítottunk 12 olyan vegyületet, amelyek legalább háromszoros különbséget mutatnak toxicitásban a kontroll és a transzportert expresszáló sejtek  $IC_{50}$  értéke között, mind az A431 mind a Mes-Sa ABCB1 transzportert expresszáló modellben, ilyen volt például a teniposide, taxol, vinblastine, docetaxel (16. ábra, 5. táblázat). Az irodalmi adatokkal összevetve ezeket a molekulákat korábban szubsztrátként azonosították.

**5. táblázat:** A szűrés során Mes-Sa/Dx5, Mes-Sa/B1 és A431B1 transzportert expresszáló kokultúra modellben ABCB1 szubsztrátként (rezisztencia hányados,  $RR > 3$ ) azonosított vegyületek listája. Az azonosított vegyületek korábban publikált Pgp-szubsztrát molekulák, ahogy azt a referenciák is jelzik.

<i>NSC kód</i>	<i>Triviális név</i>	<i>RR</i> <i>(Mes-Sa-B1)</i>	<i>RR</i> <i>(A431B1)</i>	<i>RR</i> <i>(Mes-Sa/Dx5)</i>	<i>Referencia</i>
<i>NSC-122819</i>	Teniposide	41.88	5.43	75.25	(219)
<i>NSC-125973</i>	Taxol	593.3	50.91	497.67	(219)
<i>NSC-141540</i>	Etoposide	16.97	> 4.14	> 61.73	(219)
<i>NSC-49842</i>	Vinblastine	15.00	244.4	11.00	(219)
<i>NSC-608210</i>	Vinorelbine	725.00	232.00	861.00	(220)
<i>NSC-628503</i>	Docetaxel	275.00	26.38	295.00	(64)
<i>NSC-67574</i>	Vincristine	38.00	56.8	36.00	(64)
<i>NSC-732517</i>	Dasatinib	3.147	11.5	> 3.60	(221)
<i>NSC-747973</i>	Ixabepilone	>208.3	23.32	9.66	(222)
<i>NSC-754143</i>	Romidepsin	331.70	> 97	> 234.15	(223)

NSC-758252	Carfilzomib	55.50	47.4	88.00	(224)
NSC-761432	Cabazitaxel	63.00	6.00	> 107.00	(225)

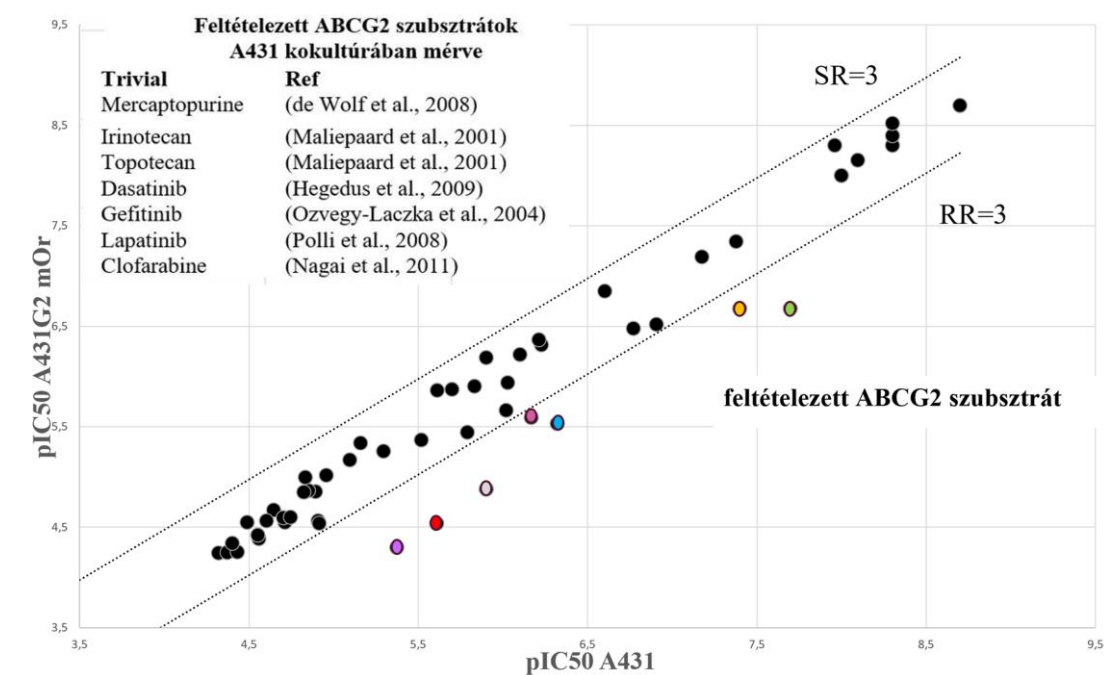
Érdekes módon a szűrés során pár vegyület, pl. az NSC-125066 (Bleomycin), NSC-9706 (Trietilén-metil-amin), NSC-6396 (Thioplex) és NSC-762 (mechlorethamine) toxikusabb volt a Mes-Sa/ Dx5 sejtekben, a parentális sejtvonalon mért értékekhez képest (6. táblázat).

**6. táblázat:** A szülői Mes-Sa sejtekhez viszonyítva Mes-Sa/Dx5 sejtvonalra szelektíven toxikus vegyületek listája (SR > 3).

NSC-kód	Triviális név	SR (Mes-Sa/Dx5)	SR(Mes-Sa-B1)
NSC-125066	Bleomycin	57.8	1.44
NSC-9706	Triethylenemelamine	26.62	1.3
NSC-6396	Thioplex	12.56	-
NSC-762	Mechlorethamine	> 11.58	-
NSC-752	Thioguanine	6.93	0.41
NSC-747599	Nilotinib	4.68	1.23
NSC-26980	Mitomycin	4.407	0.56
NSC-755	Mercaptopurine	3.87	0.39
NSC-606869	Clofarabine	3.44	0.91
NSC-755986	Vismodegib	> 3.31	-
NSC-698037	Pemetrexed	3.29	1.14

Hasonlóképpen a Pgp-hez az ABCG2 transzporter is számos vegyülettel szemben mutatott rezisztenciát, ismert ABCG2 szubsztrátokat azonosítottunk: piros színnel jelölt merkaptopurint (226), lilával jelölt irinotekánt (227), szürke színnel jelölt topotekánt (228), zöld színnel jelölt dasatinibot (178), kék színnel jelölt gefitinibet (229), narancssárgával jelölt lapatinibot (230) és a rózsaszínnel jelölt klofarabint (231) (17.

ábra).



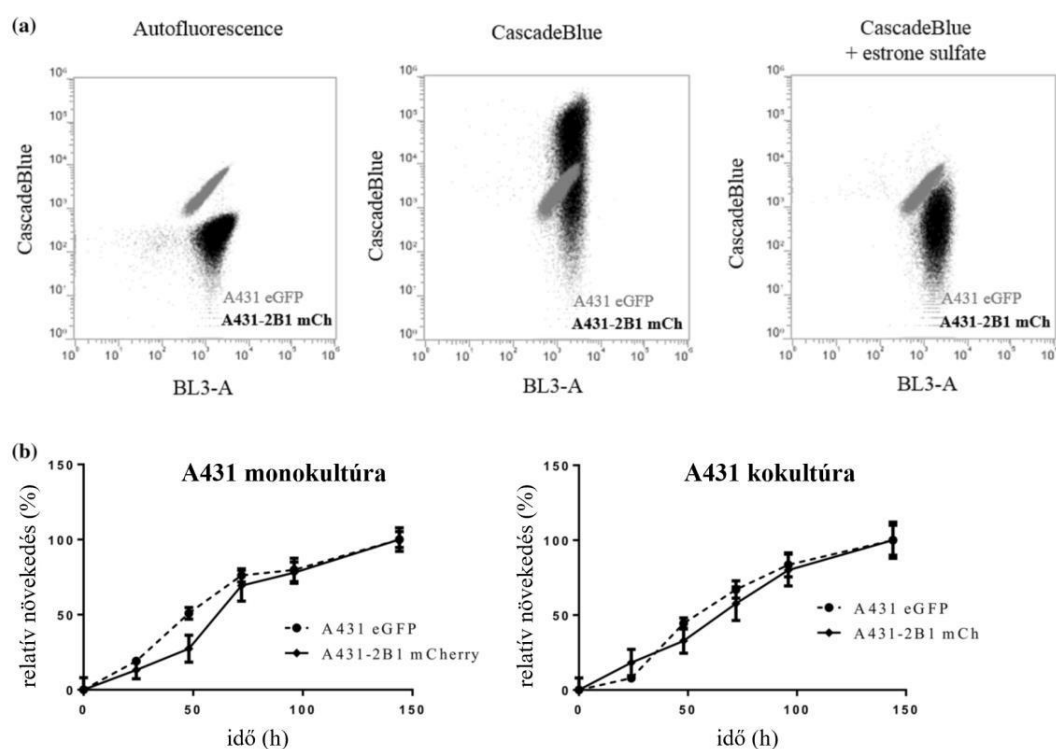
**17. ábra:** Az NCI DTP Onkológiai lemezen mért elsődleges szűrés eredményei A431 és ABCG2 transzportert expresszáló sejtvonalpáron. Az adatpontok legalább két egymástól függetlenül végzett kísérlet pIC<sub>50</sub> értékének átlagát reprezentálják. Az ábrákon a transzportert expresszáló sejtvonallal szemben mutatott csökkent toxicitású vegyületeket listáztam: piros: merkaptopurin, lila: irinotecan, szürke: topotecan, zöld: dasatinib, kék: gefitinib, narancssárga: lapatinib, rózsaszín: clofarabine.

Az Onkológiai készlet tesztelése során több ABCB1 és ABCG2 szubsztrátot (RR > 3) és Mes-Sa/Dx5 sejtvonalra szelektíven toxikus molekulát azonosítottunk (SR > 3) (16. és 17. ábra), összhangban az irodalmi adatokkal. Az esszé alkalmas olyan vegyületek azonosítására, melyek toxicitása csökken az ABCB1, illetve ABCG2 transzportert expresszáló sejtvonalakban.

#### 5.1.4. OATP2B1 uptake transzporterrel való kölcsönhatás azonosítására alkalmas HTS rendszer létrehozása

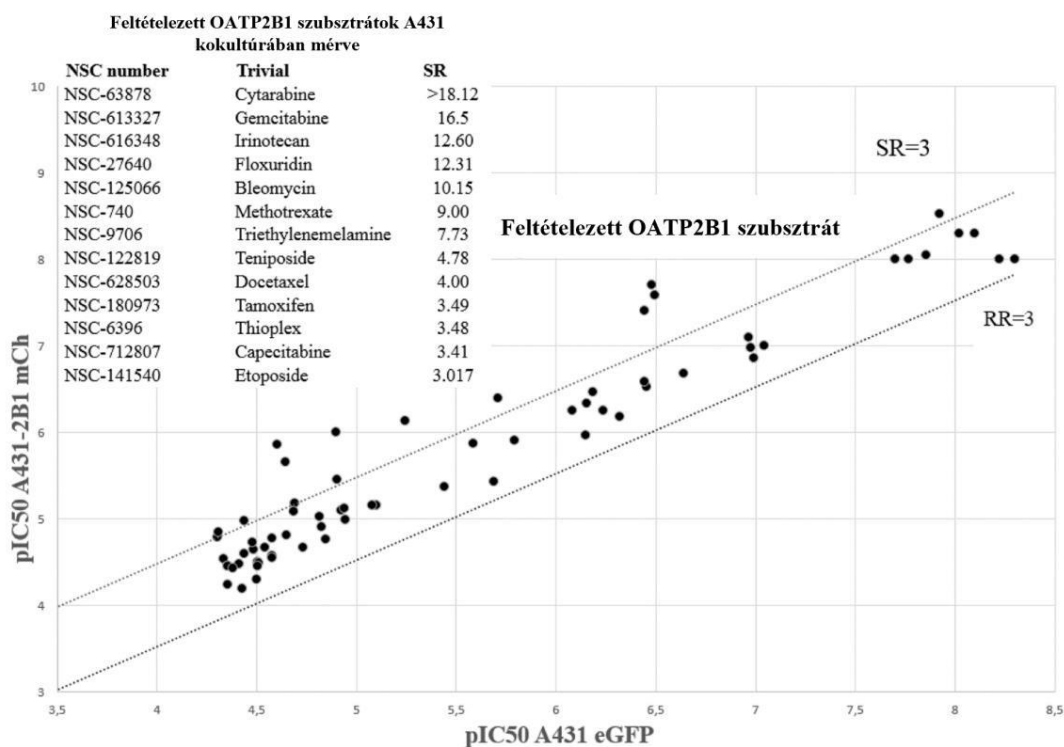
A kokultúra alapú kísérletek megmutatták, hogy a fluoreszcencia-alapú rendszerrel citotoxikus ABCB1 és ABCG2 transzporterrel való kölcsönhatás kimutatható. Korábban létrehozott OATP transzporter család tagjait (OATP1B1, 1B3 és 2B1) expresszáló A431

sejtvonalakról korábban igazolták, hogy OATP transzporter funkció mérésére alkalmasak (158). Annak kiderítésére, hogy az Onkológiai készletben található vegyületek toxicitását az OATP2B1 módosítja-e, létrehoztunk egy mCh-vel jelölt OATP2B1 transzportert expresszáló sejtvonalat tartalmazó kokultúrát. A transzporter aktivitást és a fluoreszcens fehérje expressziójának mértékét (18a ábra, 10. ábra) FACS mérésel ellenőriztük. Mivel a parentális és a transzportert expresszáló variánst tartalmazó kokultúrában a fluoreszcens sejtek száma megbízhatóan becsülhető (18b ábra), a rendszer alkalmas az OATP2B1 transzporterrel való kölcsönhatás *in vitro* vizsgálatára.



**18. ábra:** A fluoreszcencia-alapú OATP2B1 uptake transzportert expresszáló kokultúra modell jellemzése. **a)** Az OATP2B1 transzport aktivitása szelektíven mérhető a kokultúrában, Parentális A431 eGFP (szürke) és A431-2B1 mCh (fekete) transzportert expresszáló sejteket kokultúrában Cascade Blue-val festettük ösztro-3-szulfát (OATP2B1 inhibitor) hiányában (középső) vagy jelenlétében (jobbra). A CB-t az OATP2B1-et expresszáló sejtek szelektíven veszik fel. **b)** Az A431 eGFP és az A431-2B1 mCh sejtek növekedése fluoreszcens esszé alapján mért sejtmennyiség változása szelektíven követhető 384 lyukű lemezen mono- (2500 sejt / lyuk) és kokultúrában mérve (1250 A431 eGFP + 1250 A431-2B1 sejt/well), 144 órán keresztül, 60 µl végtérfogatban.

Az OATP2B1 esetében, amely nagy, szerves molekulák, beleértve kemoterápiás vegyületek felvételét közvetíti (232), a sejtekben történő megnövekedett expresszió miatt a transzporter szubsztrátjaitól fokozott toxicitást várhatunk. A vegyületek többsége hasonló mértékben volt toxikus mind a parentális, mind az OATP2B1 transzporterre nézve, ugyanakkor 13 vegyületet azonosítottunk szelektív toxicitással az OATP2B1 transzportert expresszáló sejtvonalon (19. ábra).



**19. ábra:** DTP Onkológiai készlet IV szűrési eredményei a szülői A431 és az OATP2B1 transzportert expresszáló sejtvonal (A431-2B1) kokultúra modelljén mérve. A kontroll és a transzportert expresszáló sejtek között toxicitásban legalább háromszoros különbséget mutató toxicitásban ( $SR > 3$ ) (szaggatott vonal) feltételezett szubsztrátnak tekintettük.

A 13 vegyület közül kettő nem adott szigmoidális dózis-hatás görbét, (NSC-63878, NSC-613327), egy nem volt elérhető (NSC-9706), egyet pedig intrinszik fluoreszcenciája miatt (NSC-757441) kellett kizárnunk a további vizsgálatokból. A fennmaradó vegyületeket újrendeltük más gyártóktól és további citotoxicitási vizsgálatoknak vetettük alá, amik során, egy kivétellel (Tamoxifen) igazoltuk OATP2B1 transzporterrel való kölcsönhatásukat (7. táblázat).

**7. Táblázat:** Az OATP2B1-t expresszáló A431-sejtekkel szemben fokozott toxicitást (SR > 3) mutató vegyületek citotoxicitása (IC<sub>50</sub>) (μM) a) kokultúrában és b) monokultúrában mérve. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük P < 0.05 (\*) vagy 0.01 (\*\*) esetén.

**a**

NSC-kód	Triviális név	IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)		SR
		<i>A431 eGFP</i>		<i>A431-2B1 mCh</i>		
<i>NSC-122819</i>	Teniposide	0.45	± 0.14	0.07	± 0.033	6.02*
<i>NSC-125066</i>	Bleomycin	7.47	± 1.69	0.83	± 0.16	9.01**
<i>NSC-141540</i>	Etoposide	7.45	± 2.28	0.82	± 0.048	9.06**
<i>NSC-180973</i>	Tamoxifen	9.76	± 0.50	8.82	± 0.38	1.18*
<i>NSC-616348</i>	Irinotecan	13.83	± 0.22	1.45	± 0.55	9.51**
<i>NSC-628503</i>	Docetaxel	0.08	± 0.016	0.002	± 0.013	4.98
<i>NSC-6396</i>	Thioplex	57.65	± 10.45	18.72	± 4.66	3.08*
<i>NSC-712807</i>	Capecitabine	205.40	± 12.56	44.49	± 3.29	4.62**
<i>NSC-740</i>	Methotrexate	0.38	± 0.11	0.03	± 0.009	11.78**

**b**

NSC-kód	Triviális név	IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)		SR
		<i>A431 eGFP</i>		<i>A431-2B1 mCh</i>		
<i>NSC-122819</i>	Teniposide	0.83	± 0.15	0.14	± 0.05	6.1**
<i>NSC-125066</i>	Bleomycin	16.3	± 4.65	1.05	± 0.24	10.9**
<i>NSC-141540</i>	Etoposide	6.42	± 1.67	1.99	± 0.81	3.2*
<i>NSC-180973</i>	Tamoxifen	11.35	± 0.50	12.21	± 0.36	0.9
<i>NSC-616348</i>	Irinotecan	11.11	± 2.61	2.03	± 0.34	5.47**



NSC-628503	Docetaxel	0.00097	±	0.00002	0.00022	±	0.00015	4.35*
NSC-6396	Thioplex	57.65	±	10.45	18.72	±	4.66	3.08*
NSC-712807	Capecitabine	390.55	±	50.47	128.58	±	18.88	3.04**
NSC-740	Methotrexate	0.43	±	0.09	0.12	±	0.034	3.59**

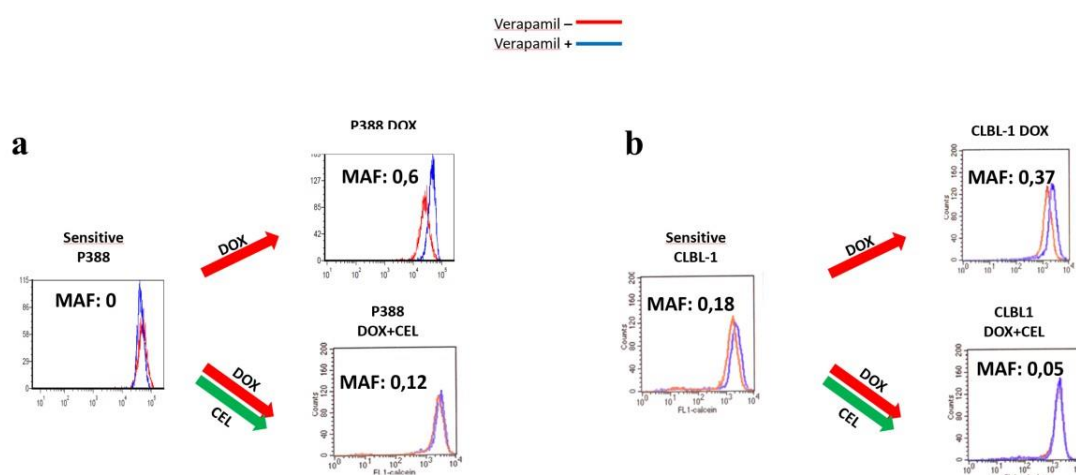
A megerősítő tesztek során 9 koncentrációpontra illesztett dózis-hatás görbe alapján számítottuk ki az IC<sub>50</sub> értékeket, minimum 3 ismétlés átlagából. Az IC<sub>50</sub>-értékek közötti különbségeket kétoldalas, páratlan Student t-teszttel elemeztük, az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük P <0,05 (\*) vagy 0,01 (\*\*) értéknél.

Az OATP2B1 transzporterrel való interakció bizonyítására a sejtek Cascade Blue felvételét vizsgáltuk a vegyületek jelenlétében (158). A vegyületek OATP2B1 transzporterrel való kölcsönhatását a Cascade Blue uptake-ben való változása mutatja, ami lehet gátlás vagy aktiválás egyaránt. A vizsgált vegyületek gátolták a CB felvételét, a szűrés során azonosított OATP2B1-szubsztrát jelölt vegyületek interakcióba léptek az OATP2B1 transzporterrel. A kölcsönhatás Cascade Blue uptake esszével történő megerősítése Patik Izabel munkája.

## **5.2. Vegyületkombináció vizsgálata: COX-2 gátlószer vizsgálata a rezisztencia kialakulásának megakadályozására**

Az MDR fenotípus kialakulásának megakadályozására irányuló egy lehetséges stratégia a Pgp fokozott expressziójának megelőzését célozza. Karai Edinával és munkatársaival kollaborációban a doxorubicin kezelés által indukált Pgp kifejeződésének megakadályozására a COX-2 gátlószer celecoxib hatását vizsgáltuk P388 egér és CLBL-1 kutya lymphoma sejtvonalon. A kezdetben érzékeny sejteknek 5 napos IC<sub>10</sub> koncentrációban történő doxorubicin kezelés során 90%–a elpusztult. A túlélő sejteken médiumcserével a vegyületet eltávolítva a kultúrából a túlélő sejtek képesek voltak újra létrehozni a populációt. Ezt P388 esetén háromszor, CLBL1 esetén kétszer ismételve alakítottuk ki a Pgp által mediált rezisztens P388 egér és CLBL-1 kutya limfóma sejteket. Kombinált kezelés esetén a doxorubicin és celecoxib vegyületek alkalmazása egyidőben

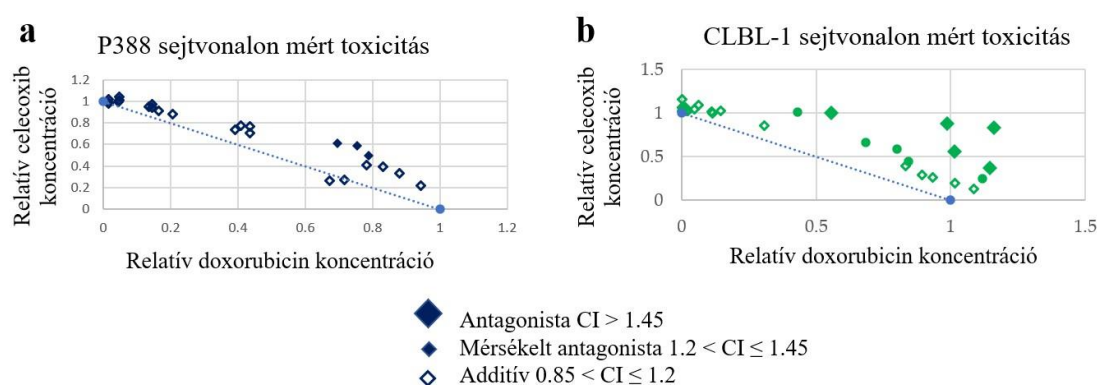
történt, monoterápiához hasonlóan 5 napig, majd a repopulációt követően ismételtük a kezelést. A rezisztencia indukciójának vizsgálata calcein esszével történt. Többszöri doxorubicin kezelés hatására a kezelt sejtekben kialakult a gyógyszer rezisztencia, a kezdetben érzékeny sejtek doxorubicinnel történő kezelést követően jelentősen megnövekedett Pgp expressziót mutattak (20a és 20b ábra, piros nyíl). Kimutattuk, hogy a doxorubicin kezelést a COX-2 gátló szer celecoxibbal kiegészítve a Pgp indukció megakadályozható (20a és 20b ábra, zöld nyíl).



**20. ábra:** Doxorubicin, illetve doxorubicin celecoxibbal kombinált kezelésének hatása (9 kezelés, közel 100 nap) a Pgp expresszió kifejeződésére P388 (a) és CLBL-1 (b) sejtekre. Doxorubicinnel történő kezelés hatására a Calcein-AM-mel mért MAF érték jelentősen megnövekedett, míg a celecoxibbal történő kombinált kezelés hatására a Pgp expressziójának fokozódása, így a MAF érték emelkedése elmaradt. Az áramlási citometriás hisztogramok a calcein fluoreszcenciájának mértékét mutatják a Pgp gátló szer verapamil jelenlétében (kék) és hiányában (piros). Karai Edina munkája.

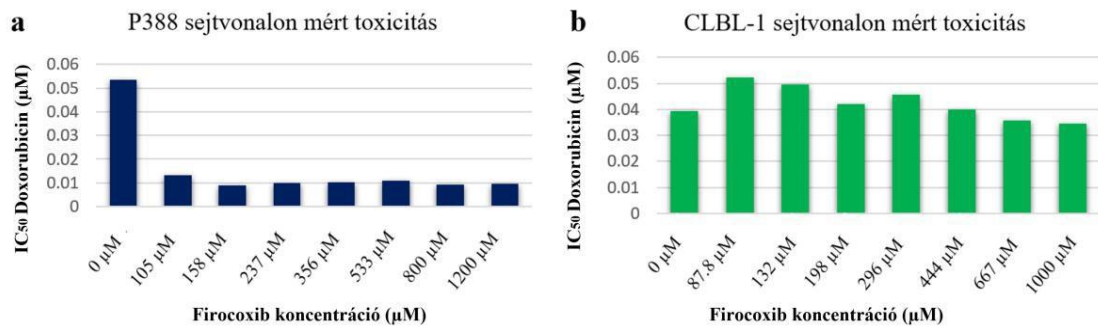
A doxorubicin topoizomeráz II gátló vegyület közvetett módon, enzimfehérjék működésén keresztül károsítja a DNS-t (233), a DNS molekulával komplexet képező topoizomeráz II enzimek gátlása dupla szálú DNS törések létrejöttéhez vezet a replikációs vagy transzkripció folyamatok során. A doxorubicin gyakran alkalmazott és kezdetben nagyon hatásos kemoterápiás szer, azonban sok esetben kialakul a Pgp-mediált kemoterápia rezisztencia, mely a kezelés sikertelenségéhez vezet (234). Az MDR kialakulásának megelőzésére kiegészítettük a doxorubicin kezelést COX-2 gátló szer celecoxibbal, mivel a COX-2 gátlók képesek a Pgp expresszió befolyásolására

(235). A két vegyület kombinációs hatását robotizált platformon vizsgáltuk. A tengelyek metszéspontjaiban az  $IC_{50}$  értékre normalizált koncentrációkat ábrázoltuk, ahol 1 az  $IC_{50}$  értékre utal. A kombinációk során a normalizált  $IC_{50}$  értékeket a kombinációs index függvényében ábrázoltuk (4.8 *Anyagok és módszerek*). A doxorubicin és celecoxib együttes kombinációjánál additív vagy enyhén antagonistá hatás figyelhető meg CLBL-1 és P388 sejtvonalon (21. ábra). Az eredményekből kiderül, hogy az együttes hatásvizsgálat során a doxorubicin toxicitását nem növelte a celecoxib.



**21. ábra:** Doxorubicin és celecoxib kombinációs kísérletben kezeltlen sejteken vizsgált citotoxicitási hatása P388 egér B-lymphoblast leukaemia sejteken és b) CLBL-1 kutya diffúz nagy B sejtes lymphoma sejteken. A tengelyek metszéspontjaiban az  $IC_{50}$  értékre normalizált koncentrációk láthatók, ahol 1 az  $IC_{50}$  értékre utal. Minden rombusz olyan gyógyszerkombinációt jelent, amely a sejtek 50% -át elpusztítja. A kombinációs index (CI) analízisben szereplő intervallumok alapján a pontok nagysága mutatja a kölcsönhatás erősségét: enyhén, mérsékeltén vagy erős antagonistá/szinergista hatást kifejezve.

Következő lépésként megvizsgáltuk a doxorubicin hatását egy másik COX-2-gátlószerral, a firocoxibbal kombinálva. Mivel a firocoxib a vizsgált legmagasabb koncentrációban sem volt toxikus a P388, illetve a CLBL-1 sejtekre sem, izobologram ábrázolási mód nem volt lehetséges. Míg a P388 sejtvonalon a doxorubicin toxicitása a firocoxib koncentráció növelésével emelkedett (szinergizmus), addig a CLBL-1 kutya diffúz nagy B sejtes lymphoma sejtvonalon additív/ enyhén antagonistá hatás érvényesült (22. ábra).



**22. ábra:** Doxorubicin és firocoxib kombinációs kísérletben vizsgált citotoxicitási hatása parentális, kezeletlen P388 egér B-lymphoblast leukaemia sejteken és CLBL-1 kutya diffúz nagy B sejtés lymphoma sejteken. Firocoxib nem volt toxikus hatással a sejtekre a legmagasabb vizsgált koncentrációban sem.

## 6. Megbeszélés

A kialakult MDR döntően felelős a kemoterápia sikertelenségéért, a hatóanyagok membrán transzporter fehérjéken keresztül eliminálódhatnak a tumoros sejtből, biztosítva ezáltal a vegyület terápiás koncentrációjánál alacsonyabb intracelluláris koncentrációját. A terápia rezisztencia kiküszöbölésének érdekében több farmakológiai kutatás irányult az ABCB1 inhibitorok keresésére. Miközben a klinikai vizsgálatok a nem várt toxicitás miatt az inhibitor vegyületek kudarcát jelezték (236, 237), számos vizsgálattervezési problémát azonosítottak, pl. a beválasztási kritériumok során nem vették figyelembe a ráksejtek ABCB1 expressziós szintjét, vagy több esetben is alacsony hatékonyságú dózisban kellett alkalmazni a gátlószereket a toxikus mellékhatások jelentkezése miatt. Egy terápiás stratégia lehet különböző rezisztenciamódosító vegyületek alkalmazása adjuvánsként, a daganatos sejtek MDR fenotípusának visszafordítására (238). Pgp aktivitását befolyásolja többek között a ciklooxygenáz-2 enzim (COX-2) expresszió is, melynek mértékét COX-2 gátlószerekkel csökkenthetjük (239). A COX-2 gátlószerek a daganat érhálózatának kialakításában, növekedésében játszanak fontos szerepet, emellett proapoptotikus és antiproliferatív hatásokkal is rendelkeznek. A COX-2 enzim emelkedett expresszióját, emlő-, prosztatata-, vastagbél- és nem kissejtes tüdőrákban is megfigyelték (240, 241). Számos tumortípus esetén kimutatták a COX-2 overexpresszió és a Pgp túlműködése közötti szignifikáns korrelációt (235, 242, 243). A klinikai gyakorlatban a COX-2 és a Pgp expresszió között fennálló kapcsolat új perspektívákat nyithat a daganatos megbetegedések kezelésében a COX-2 gátlók révén.

Egy másik újszerű megközelítés a transzporter működésének eliminálása helyett a funkciójának kihasználásán alapul. Magát a jelenséget az 1950-es években írták le először, amikor Bryson és Szybalski olyan hatóanyagokat azonosított, melyekkel hatékonyabban pusztítható a rezisztens fenotípussal rendelkező baktériumok (244). Úgy vélték, hogy a kollaterális szenzitivitás klinikailag is kihasználható. Ezt az ötletet alapul véve azóta több olyan vegyületet is sikerült azonosítani (185, 187, 191, 207, 245), amelyek segítségével az ABCB1 transzporter funkciója által kiváltott multidrog rezisztencia a fehérje funkciójának gátlása helyett kihasználással is támadható, az ABCB1 overexpresszió túlérzékenységen keresztül. Ugyanakkor egyéb efflux vagy akár uptake transzportert célzó túlérzékenységet okozó vegyületet még nem sikerült

azonosítani.

A gyógyszerek farmakokinetikai és farmakodinamikai profiljára való hatása miatt a klinikailag releváns, ADME folyamatokat befolyásoló transzportereket az FDA (Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhatósága) által jegyzett „white paper” dokumentumban határozták meg (43). Az uptake transzporterek közül az OATP1B transzporterek kölcsönhatásának tesztelésére is szükség van a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában. Számos fluoreszcens OATP1B szubsztrátot azonosítottak, többségük vagy saját fluoreszcenciával rendelkezik (246, 247) vagy fluorofórral jelölt OATP szubsztrátok, mint Oregon green (248), chenodeoxycholyll-(Nε-1 nitrobenz-2-oxa-1,3-2 diazole)-lizin (249), kolil-glicilamido-fluoreszcein (250) kolil-L-lizil-fluoreszcein (251), fluoreszcein-metotrexát (248) és 8-fluoreszcein-cAMP (252). Míg a fluoreszcein és a fluoreszcein-metotrexát felvételén alapuló módszereket HT formátumhoz részben sikerült adaptálni (248), a megbízhatóság, az érzékenység és az elérhetőség kérdése miatt többségük nem ideális széleskörű OATP transzporter kölcsönhatások nagyáteresztőképességű vizsgálatára (158, 247). Egy gyógyszermolekula fejlesztése elképzelhetetlen a hatásmechanizmusának ismerete nélkül. A gyógyszerek túlnyomó többsége közvetlenül kötődik elsődleges célpontjához, működésük közvetlen befolyásolásával a fejtí ki a hatását. A citotoxicitási teszt messze a legszélesebb körben alkalmazott sejtalapú tesztrendszer a vegyületek ABC transzporterekkel való kölcsönhatásának feltérképezéséhez. A transzportert expresszáló sejtekben kifejeződő fehérje csökkenti a szubsztrát akkumulációját, intracelluláris koncentrációját a toxikus szint alatt tartva. A transzporterre specifikus inhibitor jelenlétében ugyanakkor ez a kialakult rezisztencia felfüggeszthető (253-255). Ezek a sejtalapú citotoxicitási vizsgálatok lehetővé teszik a vegyületek nagy áteresztőképességű szűrését, lehetőség nyílik több körülmény, koncentráció vagy expozíciós idő tesztelésére egy lemezen (256), jelentős mértékű időt és költséget megtakarítva az *in vivo* vizsgálatokkal szemben, amelyek ráadásul számos etikai korlátokkal rendelkeznek.

### **6.1. HTS-kompatibilis kokultúrán alapuló *in vitro* szűrési platform ABCB1 és ABCG2 efflux és OATP2B1 uptake transzporterrel való kölcsönhatás vizsgálatára**

Míg a legtöbb transzporter interakciót vizsgáló farmakológiai modell a vér-agy gát – jellemzően MDCK vagy Caco-2 sejteken végzett transzportfolyamatainak

modellezésével foglalkozik (257), csoportunk olyan *in vitro* modellrendszer létrehozását tűzte ki célul, amellyel lehetővé válik a transzporterek tumoros sejtek kemoszenzitivitásra való hatásának vizsgálata. A431 humán epidermoid carcinoma sejtvonal MDR efflux (ABCB1 és ABCG2), illetve uptake (OATP2B1) transzportert expresszáló variánsait, illetve humán Mes-Sa uterin szarkóma sejtvonal ABCB1 transzportert expresszáló Mes-Sa-B1, illetve az ABCB1 transzportert szintén expresszáló doxorubicin rezisztens változatát (Mes-Sa/Dx5) jellemeztük kokultúra modellben. Korábbi kísérletek igazolták, hogy ezek a sejtvonalak jól használhatók citotoxikus MDR-szubsztrátok és MDR-szelektív vegyületek azonosítására (178, 187, 211, 258, 259). OATP2B1 transzporter hatásának vizsgálatánál is hasonló *in vitro* modellt szeretnénk volna használni, amelyre az A431 sejtvonal alkalmasnak is bizonyult (158).

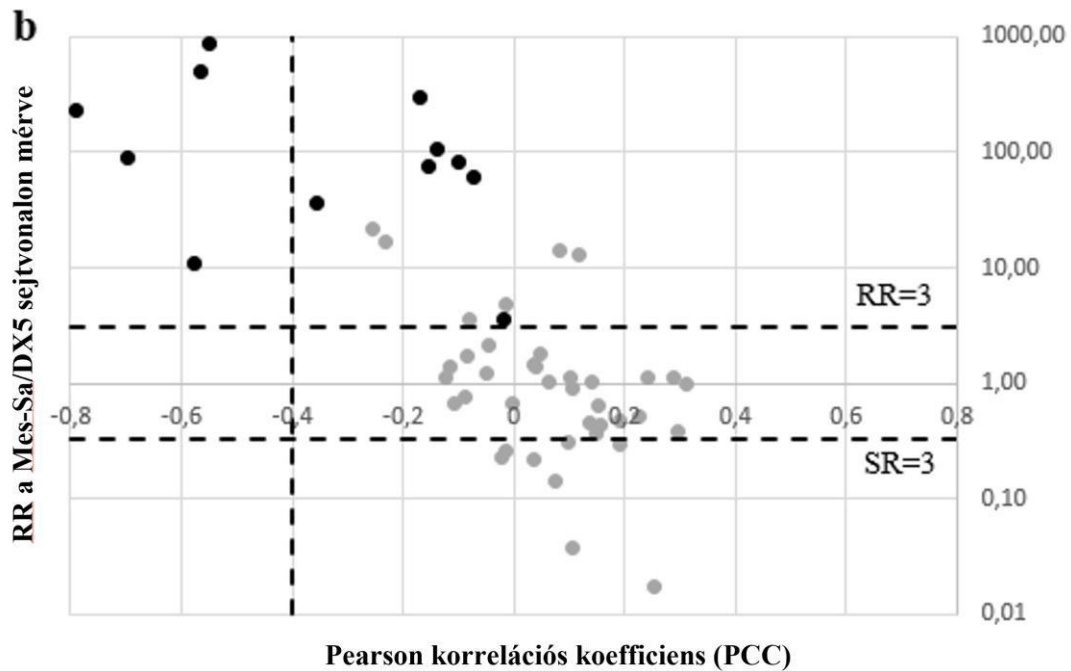
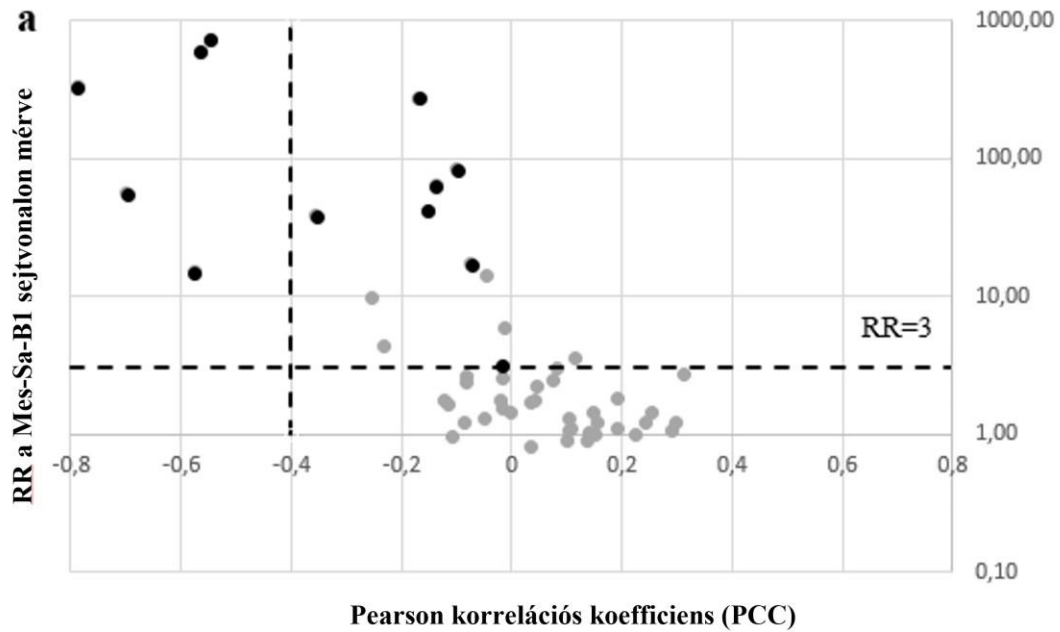
*Brimacombe és m társai* kettő fluoreszcens sejtvonalat tartalmazó kokultúra rendszer segítségével az NCI-60 tumoros sejtpanel OVCAR-8 (parentális) sejt érzékenységét hasonlította össze az NCI/ADR-RES származékkal, amely kifejezi az ABCB1/Pgp transzportert, lehetővé téve a különböző vegyületek hatásának vizsgálatát a parentális és transzportert expresszáló sejtekben hasonló körülmények közt (202). Ezt a gondolatot fejlesztettük tovább a parentális sejtvonal mellett egy uptake transzportert (OATP2B1), illetve két efflux transzportert (ABCB1 és ABCG2) expresszáló sejtvonalat tartalmazó kokultúra kialakításával, gondosan megválasztva azokat a fluoreszcens fehérjéket, amelyek lehetővé teszik a különböző sejtvonalakon mért citotoxikus hatás párhuzamos detektálását. Az általunk kidolgozott *in vitro* sejtproliferáció gátlást mérő rendszerben a különböző hullámhosszon emittáló (egymással nem interferáló) fluoreszcens proteinnel transzfektált variánsok kokultúrában, multiplexing technikával, direkt fluoreszcens méréssel vizsgálhatók. A fluoreszcencia intenzitás értéke arányos a sejtszámmal, így a kialakított sejtvonalak alkalmasak ABCB1, ABCG2, OATP2B1 transzporter szubsztrátok, illetve MDR sejteket szelektíven elpusztító vegyületek azonosítására. A kialakított rendszer segítségével az Amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet *Developmental Therapeutics Program* (NCI DTP) által összeválogatott Onkológiai készlet 101 vegyületét teszteltük. Az ABCB1 transzportert overexpresszáló sejten mért eredmények megerősítették, hogy a parentális mellett ABCB1 és ABCG2 transzportert expresszáló sejtvonalakat tartalmazó kokultúra modellel Pgp szubsztrátok azonosíthatók (5.

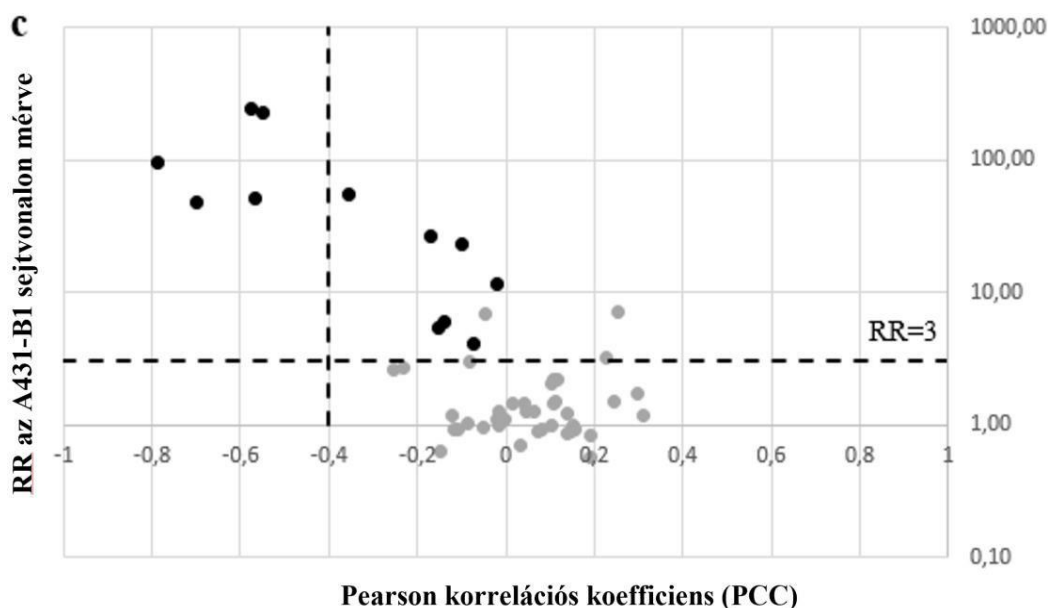
*Táblázat*). Az Onkológiai készletben található vegyületek az NCI60 sejtpanelen is le lettek mérve, így lehetőségünk volt az ABCB1 transzporterén mért adatok *in silico* értékelésére az NCI-60 tumorsejtpanel ABCB1 mRNS expressziójának és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analízisével. Az NCI-60 tumorsejtpanel 60 sejtvonalának ABCB1 mRNS expressziója és a 60 sejtvonalon mért egyes vegyületek sejtvonalakra gyakorolt citotoxikus hatásának ( $pGI_{50}$ ) értékével jellemzett drogérzékenysége közt korrelációs analízist végeztünk az Onkológiai készletben található 101 vegyület esetén. Pearson korrelációs koefficiens (PCC) számoltunk a letölthető adatbázisban szerepelt toxicitási adatokból. A pozitív korreláció ( $PCC \geq 0,4$ ) a növekvő transzporter kifejeződés esetében növekvő drogérzékenységnek felel meg, ami MDR-szelektív tulajdonságra utal, míg a negatív korreláció ( $PCC \leq -0,4$ ) szubsztrátjelölt molekulát feltételez (207, 260) ABCB1 mediált rezisztenciára utal.

Mind a Mes-Sa (Mes-Sa mCh, Mes-Sa/Dx5 eGFP, Mes-Sa-B1 mOr), mind az A431 hármaskokultúrán (A431 eGFP, A431-B1 mCh, A431-G2 mOr) mért tesztek során az összes azonosított Pgp szubsztrát negatív Pearson-korrelációs együtthatóval jellemezhető ( $PCC < -0,4$ ), ezzel is jelezve, hogy a fluoreszcencia-alapú kokultúra modellen történő citotoxicitási szűrés összehasonlítható az NCI-60 tumorsejtpanelen történő *in silico* szűréssel (23. ábra). Ráadásul az *in silico* predikció számos ismert Pgp-szubsztrátra fals eredményt adott, ilyen volt például a vinkrisztin, dasatinib, docetaxel, ixabepilon, kabazitaxel, tenipozid és etopozid, amelyeket mind a Mes-Sa, mind az A431 modellen sikeresen azonosítottunk (5. táblázat). Feltehető, hogy a toxicitás mértékét az ABCB1 transzporterén kívül számos egyéb sejtes faktor befolyásolhatja az egyes sejttípusokban eltérően (metabolizáló enzimek működése, eltérő plazmamembrán permeabilitás, egyéb transzporterek működése), ami nem teszi lehetővé egyes esetekben az ABCB1 transzporter kölcsönhatás mérését. Például a crizotinib (261) és bortezumibot (262) Pgp szubsztrátként írták le, amelyet csak a Mes-Sa panelen azonosítottunk ( $RR = 9,9$  és  $4,3$  Mes-Sa-B1 és  $RR = 21,3$ , illetve 17 Mes-Sa/Dx5 esetén), míg lényegesen alacsonyabb RR arányt mértünk az A431 hármaskokultúrában ( $RR = 2,6$  és  $3$ ) - ami az általunk definiált hatásküszöbérték alatt van. Az adatbázis tartalmaz olyan vegyületeket, amelyeknél a toxicitás pozitívan korrelál az ABCB1 expressziójával az NCI60 sejtpanelben, jelezve, hogy a Pgp nem csak rezisztenciát okozhat, de egyes vegyületek toxicitását fokozhatja a Pgp expresszió, (207). Ilyen például az NSC57969, amely



szelektív toxicitást mutat a Pgp-t expresszáló sejtekkel szemben, lehetőséget nyújtva a rezisztens sejtek szelektív elpusztítására a magas Pgp expressziójú tumorok esetén (263).





**23. ábra:** NCI-60 sejtpanel ABCB1 expressziós és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analízise során prediktálhatók a szűrés alatt is azonosított ABCB1 szubsztrátok. A  $PCC < -0,4$  feltételezett szubsztrátokat jelöl. A fekete pontok a szűrés során szubsztrátként azonosított vegyületeket jelölik, amelyeknek a toxicitását a parentális sejtekhez viszonyítva az ABCB1 csökkentette a) Mes-Sa-B1 ( $RR > 3$ , szaggatott vonal), b) Mes-Sa/Dx5 c) és A431B1 sejtvonalon mérve.

A transzporter-szubsztrát kölcsönhatáson kívül lehetőség nyílik „érzékenyítő” vegyületek vizsgálatára is az általunk használt modellekben. Az ún. MDR-szelektív molekulák az ABCB1 transzporter kifejeződése esetén szelektíven megnövekedett toxikus hatású vegyületek, ugyanakkor a szelektív hipertoxicitás a transzporter fehérje funkciójának gátlásával megszüntethető. Az Onkológiai készletben található molekulák közül MDR-szelektív vegyületet nem azonosítottunk (16. ábra), az ABCB1 transzporter által okozott szelektív toxicitás a Mes-Sa/Dx5 sejtekre korlátozódott, az A431 sejtvonalon nem sikerült reprodukálni. Ez mutatta, hogy a megnövekedett toxicitás nem Pgp-hez kapcsolatos volt jelen (185). Mivel több vegyület esetén a Mes-Sa/Dx5 sejteken mért paradox érzékenység a Mes-Sa-B1 sejteken nem volt reprodukálható, így a Mes-Sa/Dx5 sejteken mért toxikus hatás feltehetőleg szelektációs folyamat következménye, amely egyidejűleg szelektálhatott egyéb, a rezisztenciát biztosító mechanizmushoz asszociált tulajdonságot is. ABCG2 transzportert overexpresszáló sejtekre szelektíven toxikus

vegyületet sem tartalmazott a vizsgált vegyületkönyvtár (17. *Ábra*). A kialakított módszer segítségével a jövőben lehetőség nyílik az NCI DTP által összeválogatott további vegyületkönyvtárainak (Approved Oncology Drugs Set, Diversity Set, Natural Product Set, Mechanistic Set) tesztelésére.

Az OATP-k gyógyszerérzékenységben való szerepét a mai napig kevés tanulmány vizsgálta. Kimutatták, hogy az OATP1B1 érzékenyíti a sejteket flavopiridol felvétele esetén (264), az OATP1B3 és az OATP2B1 szintén növelte a metotrexát és az atorvasztatin toxicitását (265). Az ABCB1 és ABCG2 efflux transzportereket expresszázó fluoreszcencia alapú kokultúra rendszer hagyományos citotoxicitási kísérletekkel, ismert ABCB1 és ABCG2 szubsztrátokkal történő validálása után monokultúrában és kokultúrában (3. *táblázat*), a szűrést OATP2B1 transzportert expresszázó A431 kokultúra modellen is megismételtük. A további mérésekben az NCI DTP Onkológiai készlet IV-ben 13 kemoterápiás kezelésben használt vegyületet azonosítottunk, amelynek toxicitása az OATP2B1 transzportert overexpresszázó sejteket érzékenyítette a parentálissal szemben (19. *ábra*). A metotrexáton és etopozidon kívül a többi vegyület esetében az OATP2B1 transzporterrel való kölcsönhatásról eddig nem számoltak be. Etopozidot korábban már OATP2B1 szubsztrátként (266), közeli szerkezeti analógiát, tenipozidot OATP1B1 és OATP1B3 transzporter inhibitoraként (267) azonosították. Docetaxelt a szűrés során mindhárom vizsgált transzporter szubsztrátjaként azonosítottuk, további vizsgálatok OATP1B3 transzporterrel való kölcsönhatásra is utalnak (268). A taxolról korábban publikálták, hogy nem lép kölcsönhatásba OATP2B1 transzporterrel (269), amelyet szűrésünk is megerősített (19. *ábra*). A korábban OATP1B1 szubsztrátként azonosított tamoxifennél (270) az OATP2B1 transzporterrel való kölcsönhatást a Cascade Blue mérés során azonosítottuk, így valószínűsíthető, hogy inhibitor. A tamoxifent az ABCB1 és ABCG2 efflux transzporterek is felismerik. Abban az esetben, ha a vegyületet efflux és uptake transzporterek is felismerik, érdekes lehet megvizsgálni az uptake/efflux kölcsönhatás nettó hatását. A transzporterek által közvetített gyógyszerfelvétel mértéke nagyrészt patofiziológiai faktoroktól függ, ideértve az expresszió szintjét.

Az OATP transzporterek kemoterápiás kezelése során használt vegyületekkel való kölcsönhatásairól jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre. Nagyátersztőképességű

szűrés során igazoltuk, hogy az OATP2B1 transzporter jelenléte érzékenyíti a sejteket egyes kemoterápiás szerekkel szemben. Az általunk kialakított módszertan robosztus kísérleti eszközt nyújt az ABCB1 és ABCG2 efflux és OATP2B1 uptake transzporterekkel való kölcsönhatások feltérképezésére izogenikus sejtvonalak alkalmazása esetén. A szűrés során használt izogenikus sejtekben, szelekciós folyamattól mentes körülmények között végzett transzporter-vizsgálatokkal lehetőség nyílik egyetlen transzportert kifejező fehérje működéséhez köthető rezisztencia kifejeződésének vizsgálata. Ráadásul a vegyületek izogén sejtvonalakon történő tesztelése, amelyek csak az általuk expresszált transzporter fehérjében és a fluoreszcens protein színében különböznek multiplex technikának köszönhetően költséghatékonyak, időtakarékosak, illetve garantált a sejteket ért azonos tesztelési körülmény is.

Az OATP2B1 fehérjével elért eredményeimből kiindulva elkészültek egyéb OATP transzportert expresszáló (OATP1B1, OATP1B3) és fluoreszcens fehérjét is termelő sejtvonalak, amelyeken hasonló vizsgálatokat tervezünk. Az általam kidolgozott módszer alapján ezeken a sejtvonalakon is lehet és érdemes HT szűrést elvégezni, mert ennek segítségével toxikus szubsztrát molekulák azonosíthatók.

## **6.2. Kombinált kezelésben használt vegyületek kölcsönhatásának automatizált vizsgálata**

Az MDR megoldását számos kísérletben a Pgp gátlásán keresztül kívánták megvalósítani, azonban ez a megoldási stratégia a klinikai vizsgálatok során elbukott a nem várt toxicitás, a gyógyszer-kölcsönhatások és a klinikai vizsgálatok tervezési problémái miatt (271, 272). Ezt követően egy részletesebben kidolgozott, finomhangolt megközelítésre volt szükség, mely magában foglalja a transzporter-gátlók és a citotoxikus szerek együttes alkalmazását. A múlt évszázadtól egyre nagyobb szerepet kapott a hatóanyagok kombinációkban történő vizsgálata, sorra próbálták kvantitatívan meghatározni egyes gyógyszerek és kombinációik dózis-hatás összefüggését. Többféle megközelítéssel számtalan modell, hipotézis és teória született az analízis alapját szolgáltató matematikai háttérrel kapcsolatban (273-278). 2006-ban Ting-Chao Chou összegezte az addigi tapasztalatokat az ún. Chou-Talalay kombinációs index módszerben (212). A módszer segítségével olyan gyógyszer- kombinációkat azonosíthatunk, melyek szinergista hatásuk révén alacsony dózisban alkalmazhatóak, így alkalmazásuk kevesebb

mellékhatással járhatna együtt. A vegyületek kombinációban történő alkalmazása során tapasztalt hatás nem mindig egyenértékű önmagukban mért hatásuk összegével. Gyakran a gyógyszerhatások megegyeznek a vegyületek hatásának összegével (additív), de előfordul hogy növelik (szinergista) vagy csökkentik (antagonista) egymás hatását, illetve kölcsönhatásaik révén eltérő befolyással lehetnek a terápia során tapasztalt mellékhatásokra (279).

Doktori munkám második részében egy kollaboráció keretén belül vizsgáltuk, hogy *in vitro* modellezhető rezisztencia indukciót meg lehet-e előzni COX-2 gátlókkal történő kombinációs kezeléssel. Mindamelllett, hogy a COX-2 enzim gátlószeresek fontos szerepet játszanak a fájdalom és a gyulladás csökkentésének kialakulásában, emellett alkalmasak lehetnek malignus folyamatok kezelésére is. A COX-2 fokozott expresszióját számos daganattípus esetén leírták: többek közt vastagbél- (280), gyomor- (281), máj- (282), petefészek- (283), méhtest- (284), hasnyálmirigy- (285), emlő- (286), bőr- (287), és nem-kissejtes tüdőrákban (288). Ezen túlmenően számos daganattípusban kimutatták a COX-2 fokozott expressziója és az ABCB1 overexpresszió közti pozitív korrelációt (235, 289-291), miáltal a COX-2 magas szintjének gátlása negatív prognosztikai faktor révén klinikai előnyökkel járhat. A kísérletsorozat eredményeként COX-2 gátlószer celecoxib doxorubicinnel együttesen alkalmazva a terápia rezisztencia kialakulásáért felelős Pgp aktivitásának fokozódását képes volt megakadályozni (239).

A COX-2 és az ABCB1 mediált MDR közötti kapcsolat vizsgálatára klinikailag alkalmazott celecoxib (292) és firocoxib (293) COX-2 gátlószereseket teszteltük automatizált rendszer segítségével, citotoxikus szerként alkalmazott doxorubicinnel kombinálva. A kombinációs kísérletek során a celecoxibot doxorubicinnel kombinációban alkalmazva enyhén antagonista, illetve additív hatást mértünk, a vegyületek nem erősítették egymás citotoxikus hatását sem P388 sem CLBL-1 sejteken mérve. Az elvégzett szinergia vegyületkölcsönhatás vizsgálata során nyert eredmények tekintetében kijelenthető, hogy a rezisztencia kialakulásának megakadályozása nem a két vegyület szinerg hatása miatt következett be. Firocoxib esetén ugyanakkor szinergista hatást mértünk P388 sejtvonalon, míg enyhén antagonista, illetve additív hatást CLBL-1 sejteken. Mivel a celecoxib önmagában nem gátolja az ABCB1 funkcióját, és mivel a kombinációs kísérletben nem mutatott szinergista hatást a doxorubicin kezeléssel kialakított rezisztens

sejteken, arra következtettünk, hogy az MDR fenotípus megjelenését a celecoxib a Pgp expressziójának mértékébe beavatkozva akadályozza meg (239).

## 7. Következtetések

1. Létrehoztunk egy kokultúrában alkalmazható, fluoreszcencia alapú, efflux és uptake transzporterekkel való kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas HTS-kompatibilis esszét.
2. A kialakított szűrőrendszer segítségével elvégeztük az NCI DTP *Onkológiai készlet IV* vegyületkönyvtár jellemzését, és azonosítottuk azokat a molekulákat, amelyek eltérő toxicitást mutattak ABCB1, ABCG2 és OATP2B1 transzportert overexpresszáló sejtvonalakban.
3. Másodlagos tesztek során igazoltuk az azonosított molekulák transzporterekkel való kölcsönhatását.
4. A szűrési platform segítségével új, az OATP2B1 transzporterrel kölcsönható vegyületeket fedeztünk fel.
5. Kimutattuk, hogy a COX-2 gátlószer celecoxib doxorubicinnel kombinálva képes az MDR *in vitro* kialakulásának megelőzésére. Robotizált kombinációs esszé segítségével bebizonyítottuk, hogy a celecoxib Pgp indukció gátló hatása nem a két vegyület szinerg toxicitásán alapul.

## 8. Összefoglalás

A biológiai membránokon keresztüli áteresztőképességet a membránban található efflux (pl. ABCB1 és ABCG2) és uptake (pl. OATP2B1) funkciókat ellátó transzporterek határozzák meg. A transzporterek barrierekben való lokalizációjuk révén jelentős szerepet játszanak a drogok ADME-Tox paramétereinek kialakításában egyfajta kemoimmunitási hálózat részeként. A több, szerkezetileg és hatásmechanizmusában is diverz vegyületnek ellenálló multidrog rezisztens (MDR) tumoros sejteket legtöbbször az MDR ABC transzporterek védik, melyek emelkedett expressziója miatt a kemoterápiás kezelés gyakran hatástalan marad. Egyre több bizonyíték jelzi az OATP-k tumoros megbetegedésében való szerepét is, emelkedett expressziójuk egyes tumorokban újfajta terápiás lehetőségeket vet fel. A gyógyszerkutató és gyógyszerfejlesztés során gyógyszer–transzporter kölcsönhatások tesztelése a preklinikai fázis döntő lépése.

A doktori munkám során a gyógyszerek megoszlását befolyásoló transzporterek vizsgálatának céljából olyan nagy áteresztőképességű (HTS) *in vitro* módszer fejlesztését tűztük ki célul, amely lehetővé teszi az uptake és efflux transzporterekkel kölcsönható molekulák azonosítását. A kultúrában alkalmazható sejtvonal párokból HTS-kompatibilis esszé kialakítása után az NCI DTP Onkológiai készlet IV vegyületkönyvtár tesztelését végeztem, illetve a kapott eredményeket másodlagos tesztek során validáltam. Az eredmények tükrében a szűrési rendszer segítségével azonosított ABCB1 és ABCG2 szubsztrát molekulák, illetve OATP2B1 szubsztrátok hozzájárulnak az efflux és uptake transzporterek patológiás folyamatokban betöltött szerepének jobb megismeréséhez. A kemoterápiás kezelés során használt hatóanyagok gyógyszer- transzporter interakciós profiljainak azonosításával lehetőség nyílik az MDR mechanizmusok előrejelzésére, kiküszöbölésére vagy kihasználására.

Doktori munkám második felében egy kollaboráció keretében bizonyítottuk, hogy a COX-2 gátlószer celecoxib doxorubicinnel kombinálva képes az MDR *in vitro* kialakulásának megelőzésére. Robotizált kombinációs esszé segítségével megmutattuk, hogy a celecoxib Pgp indukció gátló hatása nem a két vegyület szinerg toxicitásán alapul.



## Summary

Permeability across biological membranes is determined by membrane transporters, which can be major determinants of pharmacokinetics, drug safety and efficacy. Transporters are membrane proteins that control the influx of essential nutrients and ions and the efflux of cellular waste, environmental toxins, drugs, and other xenobiotics. They play an important role in ADME-Tox processes as a critical element of the innate defense system termed the "chemoimmunity" network. Multidrug resistance (MDR) is a major obstacle in effective chemotherapy for cancer patients. It is defined by the development of cellular resistance to a large variety of structurally unrelated drugs with diverse mechanisms of action. Knowledge of transporters affecting the efflux and uptake mechanism of chemotherapeutic drugs in tumors allow us to predict, counteract or exploit resistance mechanisms. Identification of drug-transporter interaction profiles during the drug discovery process is crucial to explore ADME properties of therapeutic compounds.

My aim was to adapt a high-throughput, fluorescence-based *in vitro* screening method to allow the identification of compounds interacting with efflux and uptake transporters. The *in vitro* triple-fluorescence-based cytotoxicity screen is based on the co-culturing cells expressing different fluorescent proteins and transporters. We used the screening system to characterize the ability of the transporter proteins to modulate the cytotoxic activity of 114 clinically used chemotherapeutics compiled in the Developmental Therapeutics Program's (DTP) Oncology Set IV. In addition to identifying known substrates of ABCB1 and ABCG2, the fluorescence-based cytotoxicity assays identified 13 novel putative OATP2B1 substrates whose toxicity was increased in OATP2B1 expressing cells. Interaction of these compounds with OATP2B1 was verified in dedicated transport assays. Understanding drug-transporter interactions is needed to increase the efficacy of chemotherapeutic agents. The use of automated screening techniques allows for efficient examination of drug-drug interactions hence accelerating the identification of potential drug combinations. The results highlight the potential of the fluorescence-based HT screening system for identifying transporter substrates, opening the way for the design of therapeutic approaches based on the inhibition or even the exploitation of transporters in cancer cells.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Keogh, J. P. (2012) Membrane transporters in drug development. *Adv Pharmacol* **63**, 1-42
2. Wilhelm, I. F., C. Krizbai, IA. (2011) In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71(1)**, 113-128.
3. Zlokovic, B. V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201
4. Hartz, A. M., and Bauer, B. (2010) Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier: new targets for CNS therapy. *Mol Interv* **10**, 293-304
5. Hartz, A. M., and Bauer, B. (2011) ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 656-673
6. Peetla, C., Vijayaraghavalu, S., and Labhasetwar, V. (2013) Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1686-1698
7. Hankins, H. M., Baldrige, R. D., Xu, P., and Graham, T. R. (2015) Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* **16**, 35-47
8. Hoejholt, K. L., Muzic, T., Jensen, S. D., Dalgaard, L. T., Bilgin, M., Nylandsted, J., Heimburg, T., Frandsen, S. K., and Gehl, J. (2019) Calcium electroporation and electrochemotherapy for cancer treatment: Importance of cell membrane composition investigated by lipidomics, calorimetry and in vitro efficacy. *Sci Rep* **9**, 4758
9. Gracià, R. S., Bezlyepkina, N., Knorr, R. L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2010) Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* **6**
10. Kakorin, S., Brinkmann, U., and Neumann, E. (2005) Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles. *Biophys Chem* **117**, 155-171
11. Pike, L. J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281-292
12. Simons, K., and Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin*

*Invest* **110**, 597-603

13. Buschiazzo, J., Ialy-Radio, C., Auer, J., Wolf, J. P., Serres, C., Lefevre, B., and Ziyayat, A. (2013) Cholesterol depletion disorganizes oocyte membrane rafts altering mouse fertilization. *PLoS One* **8**, e62919
14. Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**, 655-667
15. Podo, F., Paris, L., Cecchetti, S., Spadaro, F., Abalsamo, L., Ramoni, C., Ricci, A., Pisanu, M. E., Sardanelli, F., Canese, R., and Iorio, E. (2016) Activation of Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C in Breast and Ovarian Cancer: Impact on MRS-Detected Choline Metabolic Profile and Perspectives for Targeted Therapy. *Front Oncol* **6**, 171
16. Lane, D. J., Bae, D. H., Merlot, A. M., Sahni, S., and Richardson, D. R. (2015) Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* **7**, 2274-2296
17. Casares, D., Escriba, P. V., and Rossello, C. A. (2019) Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* **20**
18. Pakiet, A., Kobiela, J., Stepnowski, P., Sledzinski, T., and Mika, A. (2019) Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis* **18**, 29
19. Bernardes, N., and Fialho, A. M. (2018) Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *Int J Mol Sci* **19**
20. Zalba, S., and Ten Hagen, T. L. (2017) Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **52**, 48-57
21. Llado, V., Lopez, D. J., Ibarguren, M., Alonso, M., Soriano, J. B., Escriba, P. V., and Busquets, X. (2014) Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaCHolate: effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1619-1627
22. Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C., and Reis, S. (2016) Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 2231-2244
23. Yang, N. J., and Hinner, M. J. (2015) Getting across the cell membrane: an

- overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol* **1266**, 29-53
24. Muley, H., Fado, R., Rodriguez-Rodriguez, R., and Casals, N. (2020) Drug uptake-based chemoresistance in breast cancer treatment. *Biochem Pharmacol* **177**, 113959
  25. Habgood, M. D., Begley, D. J., and Abbott, N. J. (2000) Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 231-253
  26. Krizbai, I. A., Nyul-Toth, A., Bauer, H. C., Farkas, A. E., Traweger, A., Hasko, J., Bauer, H., and Wilhelm, I. (2016) Pharmaceutical Targeting of the Brain. *Curr Pharm Des* **22**, 5442-5462
  27. Weinshilboum, R. (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med* **348**, 529-537
  28. Ishikawa, T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 463-468
  29. Williams, J. A., Bauman, J., Cai, H., Conlon, K., Hansel, S., Hurst, S., Sadagopan, N., Tugnait, M., Zhang, L., and Sahi, J. (2005) In vitro ADME phenotyping in drug discovery: current challenges and future solutions. *Curr Opin Drug Discov Devel* **8**, 78-88
  30. Jonker, J. W., Wagenaar, E., Van Eijl, S., and Schinkel, A. H. (2003) Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* **23**, 7902-7908
  31. Schinkel, A. H., Mol, C. A. A. M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J. J. M., and Borst, P. (1995) Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *European Journal of Cancer* **31**, 1295-1298
  32. Maeda, K., and Sugiyama, Y. (2008) Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**, 223-235
  33. Sissung, T. M., Goey, A. K., Ley, A. M., Strope, J. D., and Figg, W. D. (2014) Pharmacogenetics of membrane transporters: a review of current approaches. *Methods Mol Biol* **1175**, 91-120
  34. Takeda, T., Hao, M., Cheng, T., Bryant, S. H., and Wang, Y. (2017) Predicting drug–drug interactions through drug structural similarities and interaction

- networks incorporating pharmacokinetics and pharmacodynamics knowledge. *Journal of Cheminformatics* **9**
35. Onakpoya, I. J., Heneghan, C. J., and Aronson, J. K. (2016) Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med* **14**, 10
  36. Csermely, P., Korcsmaros, T., Kiss, H. J., London, G., and Nussinov, R. (2013) Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **138**, 333-408
  37. Kennedy, T. (1997) Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today* **2**, 436-444
  38. DiMasi, J. A. (1995) Success rates for new drugs entering clinical testing in the United States. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **58**, 1-14
  39. Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., and Sarkadi, B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* **13**, 379-393
  40. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., and Varadi, A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* **86**, 1179-1236
  41. Blumenthal, R. D. (2005) An overview of chemosensitivity testing. *Methods Mol Med* **110**, 3-18
  42. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., and Sarkadi, B. (2004) The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* **1**, 27-42
  43. International Transporter, C., 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., and Zhang, L. (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 215-236
  44. Ho, R. H., and Kim, R. B. (2005) Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* **78**, 260-277
  45. Bugde, P., Biswas, R., Merien, F., Lu, J., Liu, D. X., Chen, M., Zhou, S., and Li,

- Y. (2017) The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opin Ther Targets* **21**, 511-530
46. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/main/home>.
47. Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012) Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **12**, 237-251
48. Castells, M., Thibault, B., Delord, J. P., and Couderc, B. (2012) Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* **13**, 9545-9571
49. Meads, M. B., Gatenby, R. A., and Dalton, W. S. (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* **9**, 665-674
50. O'Connor, D., Sibson, K., Caswell, M., Connor, P., Cummins, M., Mitchell, C., Motwani, J., Taj, M., Vora, A., Wynn, R., and Kearns, P. R. (2011) Early UK experience in the use of clofarabine in the treatment of relapsed and refractory paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **154**, 482-485
51. Krainer, M. (2003) Efficacy of Combination Therapy Versus Monotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment* **81**, 11-15
52. Greenspan, E. M., Fieber, M., Lesnick, G., and Edelman, S. (1963) Response of advanced breast carcinoma to the combination of the antimetabolite, Methotrexate, and the alkylating agent, thio-TEPA. *J Mt Sinai Hosp N Y* **30**, 246-267
53. Leventhal, B. G., Levine, A. S., Graw, R. G., Simon, R., Freireich, E. J., and Henderson, E. S. (1975) Long-term second remissions in acute lymphatic leukemia. *Cancer* **35**, 1136-1140
54. P. S. Schein, B. A. C., G. P. Canellos, R. D. Young, C. Berard,, V. T. DeVita. (1975) Results of combination chemotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer Suppl* **2**, 465-473.
55. Frei, E., 3rd, Karon, M., Levin, R. H., Freireich, E. J., Taylor, R. J., Hananian, J., Selawry, O., Holland, J. F., Hoogstraten, B., Wolman, I. J., Abir, E., Sawitsky, A., Lee, S., Mills, S. D., Burgert, E. O., Jr., Spurr, C. L., Patterson, R. B., Ebaugh, F. G., James, G. W., 3rd, and Moon, J. H. (1965) The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in

- children with acute leukemia. *Blood* **26**, 642-656
56. Frei E., r. (1985) Curative cancer chemotherapy. *Cancer research* **45(12 Pt 1)**, 6523–6537.
  57. Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Helferich, W. G., Yang, X., Boosani, C. S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Keith, W. N., Bilsland, A., Halicka, D., Newsheen, S., and Azmi, A. S. (2015) Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**, S78-S103
  58. Wang, Y., and Teng, J. S. (2016) Increased multi-drug resistance and reduced apoptosis in osteosarcoma side population cells are crucial factors for tumor recurrence. *Exp Ther Med* **12**, 81-86
  59. McLellan, L. I., and Wolf, C. R. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat* **2**, 153-164
  60. Shain KH, D. W. (2001) Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther.* **1(1)**, 69-78
  61. Valkov, N. I., & Sullivan, D. M. . (1997) Drug resistance to DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemia, lymphoma, and multiple myeloma. *Seminars in hematology* **34(4 Suppl 5)**, 48–62
  62. Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., and Menck, C. F. M. (2018) DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)* **73**, e478s
  63. Gerson, S. L., Allay, E., Vitantonio, K., & Dumenco, L. L. (1995) Determinants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **1(5)**, 519–525
  64. Gottesman, M. M., Fojo, T., and Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48-58
  65. Chai, S., To, K. K., and Lin, G. (2010) Circumvention of multi-drug resistance of

- cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chin Med* **5**, 26
66. Chun, E. H., Gonzales, L., Lewis, F. S., Jones, J., and Rutman, R. J. (1969) Differences in the in vivo alkylation and cross-linking of nitrogen mustard-sensitive and -resistant lines of Lettre-Ehrlich ascites tumors. *Cancer Res* **29**, 1184-1194
  67. Biedler, J. L., and Riehm, H. (1970) Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* **30**, 1174-1184
  68. Danø, K. (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **323**, 466-483
  69. Skovsgaard, T. (1978) Carrier-mediated transport of daunorubicin, adriamycin, and rubidazone in ehrlich ascites tumour cells. *Biochemical Pharmacology* **27**, 1221-1227
  70. W.T. Beck, M. C. C., J.L. Lefko. (1983) Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Molecular pharmacology* **24**, 485-492.
  71. Ling, V., and Thompson, L. H. (1974) Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol* **83**, 103-116
  72. Carlsen, S. A., Till, J. E., and Ling, V. (1977) Modulation of drug permeability in chinese hamster ovary cells. Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **467**, 238-250
  73. Juliano, R. L., and Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **455**, 152-162
  74. Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., and Riordan, J. R. (1986) The mdrl gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **141**, 956-962
  75. Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and



- tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 265-269
76. Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3004-3008
  77. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., and Deeley, R. G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654
  78. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., and Ross, D. D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665-15670
  79. Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* **3**, 281-290
  80. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., and et al. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448-450
  81. Locher, K. P. (2009) Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 239-245
  82. Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156-1166
  83. Polgar, O., Robey, R. W., and Bates, S. E. (2008) ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1-15
  84. Reyes, C. L., and Chang, G. (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* **308**, 1028-1031
  85. Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., and Higgins, C. F. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362-365
  86. Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* **8**, 193-204
  87. Sauna, Z. E., and Ambudkar, S. V. (2007) About a switch: how P-glycoprotein

- (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther* **6**, 13-23
88. Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**, 1091-1098
  89. Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K. P., and Rees, D. C. (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315**, 373-377
  90. Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., and Chang, G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**, 1718-1722
  91. Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V., and Xia, D. (2009) Structure of a multidrug transporter. *Nat Biotechnol* **27**, 546-547
  92. Garrigues, A., Escargueil, A. E., and Orlowski, S. (2002) The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10347-10352
  93. van Helvoort, A., Smith, A. J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A. H., Borst, P., and van Meer, G. (1996) MDR1 P-Glycoprotein Is a Lipid Translocase of Broad Specificity, While MDR3 P-Glycoprotein Specifically Translocates Phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-517
  94. Al-Shawi, M. K., Polar, M. K., Omote, H., and Figler, R. A. (2003) Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J Biol Chem* **278**, 52629-52640
  95. ter Beek, J., Guskov, A., and Slotboom, D. J. (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* **143**, 419-435
  96. Eckenstaler, R., and Benndorf, R. A. (2020) 3D structure of the transporter ABCG2-What's new? *Br J Pharmacol* **177**, 1485-1496
  97. Orlando, B. J., and Liao, M. (2020) ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. *Nat Commun* **11**, 2264
  98. Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H., and Locher, K. P. (2018) Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in

- ATP-bound and substrate-bound states. *Nature* **563**, 426-430
99. Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**, 385-427
  100. Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1991) Multidrug resistance. *Annu Rev Med* **42**, 277-286
  101. Lin, J. H., and Yamazaki, M. (2003) Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **42**, 59-98
  102. Jaramillo, A. C., Al Saig, F., Cloos, J., Jansen, G., and Peters, G. J. (2018) How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resistance* **1**, 6-29
  103. Sanfilippo, O., Ronchi, E., De Marco, C., Di Fronzo, G., and Silvestrini, R. (1991) Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristine. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **27**, 155-158
  104. Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Brodano, G., Manara, M. C., Maurici, D., Bacci, G., Bertoni, F., Picci, P., Sottili, S., Campanacci, M., and et al. (1995) Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med* **333**, 1380-1385
  105. Abolhoda, A., Wilson, A. E., Ross, H., Danenberg, P. V., Burt, M., and Scotto, K. W. (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res* **5**, 3352-3356
  106. Gregorcyk, S., Kang, Y., Brandt, D., Kolm, P., Singer, G., and Perry, R. R. (1996) p-Glycoprotein expression as a predictor of breast cancer recurrence. *Ann Surg Oncol* **3**, 8-14
  107. McLornan, D. P., McMullin, M. F., Johnston, P., and Longley, D. B. (2007) Molecular mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **3**, 363-377
  108. Xia, C. Q., and Smith, P. G. (2012) Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol* **82**, 1008-1021
  109. Leonard, G. D., Fojo, T., and Bates, S. E. (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**, 411-424

110. Binkhathlan, Z., and Lavasanifar, A. (2013) P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 326-346
111. Leonard GD, P. O., Bates SE. (2002) ABC transporters and inhibitors: new targets, new agents. *Curr Opin Investig Drugs* **3(11)**, 1652-1659.
112. Wilson, C. S., Davidson, G. S., Martin, S. B., Andries, E., Potter, J., Harvey, R., Ar, K., Xu, Y., Kopecky, K. J., Ankerst, D. P., Gundacker, H., Slovak, M. L., Mosquera-Caro, M., Chen, I. M., Stirewalt, D. L., Murphy, M., Schultz, F. A., Kang, H., Wang, X., Radich, J. P., Appelbaum, F. R., Atlas, S. R., Godwin, J., and Willman, C. L. (2006) Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* **108**, 685-696
113. Pirker R, W. J., Götzl M, Gsur A, Geissler K, Havelec L, Knapp W, Haas O, Linkesch W, Lechner K. (1992) MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Blood*. **15;80(2)**, 557-559
114. Karaszi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakacs, G., Hollo, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejto, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B., and Kappelmayer, J. (2001) Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **112**, 308-314
115. Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., and Gottesman, M. M. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-234
116. 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., and 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
117. Woodward, O. M., Kottgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B., and Kottgen, M. (2009) Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common

- functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10338-10342
118. Higashino, T., Takada, T., Nakaoka, H., Toyoda, Y., Stiburkova, B., Miyata, H., Ikebuchi, Y., Nakashima, H., Shimizu, S., Kawaguchi, M., Sakiyama, M., Nakayama, A., Akashi, A., Tanahashi, Y., Kawamura, Y., Nakamura, T., Wakai, K., Okada, R., Yamamoto, K., Hosomichi, K., Hosoya, T., Ichida, K., Ooyama, H., Suzuki, H., Inoue, I., Merriman, T. R., Shinomiya, N., and Matsuo, H. (2017) Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open* **3**, e000464
  119. Suzuki, M., Suzuki, H., Sugimoto, Y., and Sugiyama, Y. (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* **278**, 22644-22649
  120. Robey, R. W., To, K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., and Bates, S. E. (2009) ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 3-13
  121. van de Wetering, K., and Saptho, S. (2012) ABCG2 functions as a general phytoestrogen sulfate transporter in vivo. *FASEB J* **26**, 4014-4024
  122. Miyake K, M. L., Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. (1999) Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-Resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes *Cancer Res.*, 8-13
  123. Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., and Doyle, L. A. (1999) Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* **91**, 429-433
  124. Robey, R. W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J. T., Litman, T., and Bates, S. E. (2001) A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1512**, 171-182
  125. Volk, E. L., Farley, K. M., Wu, Y., Li, F., Robey, R. W., and Schneider, E. (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* **62**, 5035-5040
  126. Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver, M. J., Scheper, R. J., and Schellens, J. H.

- (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**, 3458-3464
127. Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J. Y., Chaoui, D., Marie, J. P., and Legrand, O. (2004) Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* **10**, 7896-7902
  128. Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J. Y., Tang, R., Chaoui, D., Morjani, H., Marzac, C., Marie, J. P., and Legrand, O. (2005) MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **11**, 7764-7772
  129. Ugglå, B., Stahl, E., Wagsater, D., Paul, C., Karlsson, M. G., Sirsjo, A., and Tidefelt, U. (2005) BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. *Leuk Res* **29**, 141-146
  130. Kim, J. E., Singh, R. R., Cho-Vega, J. H., Drakos, E., Davuluri, Y., Khokhar, F. A., Fayad, L., Medeiros, L. J., and Vega, F. (2009) Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* **22**, 1312-1320
  131. Turner, J. G., Gump, J. L., Zhang, C., Cook, J. M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, M. J., Dalton, W. S., and Sullivan, D. M. (2006) ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* **108**, 3881-3889
  132. Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L. A., Ross, D. D., and Kohno, S. (2001) Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1216-1223
  133. Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., Floot, B. G., and Schellens, J. H. (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* **59**, 4559-4563
  134. Sargent, J. M., Williamson, C. J., Maliepaard, M., Elgie, A. W., Scheper, R. J., and Taylor, C. G. (2001) Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid

- leukaemia. *Br J Haematol* **115**, 257-262
135. Sauerbrey, A., Sell, W., Steinbach, D., Voigt, A., and Zintl, F. (2002) Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **118**, 147-150
  136. Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., and Gottesman, M. M. (2018) Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 452-464
  137. Zhang, G. N., Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P., Ashby, C. R., Jr., Alqahtani, S., Deng, T., Bates, S. E., Kaddoumi, A., Wurpel, J. N. D., Lei, Y. X., and Chen, Z. S. (2018) Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor PD153035 reverses ABCG2-mediated multidrug resistance in non-small cell lung cancer: In vitro and in vivo. *Cancer Lett* **424**, 19-29
  138. Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Lei, Z. N., Zhang, G. N., Zhang, X. Y., Wang, D. S., Al-Rihani, S. B., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Kaddoumi, A., Shi, Z., and Chen, Z. S. (2019) Regorafenib antagonizes BCRP-mediated multidrug resistance in colon cancer. *Cancer Lett* **442**, 104-112
  139. Toyoda, Y., Takada, T., and Suzuki, H. (2019) Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. *Front Pharmacol* **10**, 208
  140. Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., and Giacomini, K. M. (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 543-560
  141. Schumann, T., Konig, J., Henke, C., Willmes, D. M., Bornstein, S. R., Jordan, J., Fromm, M. F., and Birkenfeld, A. L. (2020) Solute Carrier Transporters as Potential Targets for the Treatment of Metabolic Disease. *Pharmacol Rev* **72**, 343-379
  142. Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E. A. (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch* **447**, 465-468
  143. Oliva, R. V., and Bakris, G. L. (2014) Blood pressure effects of sodium-glucose co-transport 2 (SGLT2) inhibitors. *J Am Soc Hypertens* **8**, 330-339
  144. Motohashi, H., and Inui, K. (2013) Organic cation transporter OCTs (SLC22) and

- MATEs (SLC47) in the human kidney. *AAPS J* **15**, 581-588
145. Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* **165**, 1260-1287
  146. Neuvonen, P. J., Niemi, M., and Backman, J. T. (2006) Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **80**, 565-581
  147. Hagenbuch, B., and Stieger, B. (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* **34**, 396-412
  148. Kovacsics, D., Patik, I., and 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
  149. Buxhofer-Ausch, V., Secky, L., Wlcek, K., Svoboda, M., Kounnis, V., Briasoulis, E., Tzakos, A. G., Jaeger, W., and Thalhammer, T. (2013) Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy. *J Drug Deliv* **2013**, 863539
  150. Schulte, R. R., and Ho, R. H. (2019) Organic Anion Transporting Polypeptides: Emerging Roles in Cancer Pharmacology. *Mol Pharmacol* **95**, 490-506
  151. Wlcek, K., Svoboda, M., Thalhammer, T., Sellner, F., Krupitza, G., and Jaeger, W. (2008) Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther* **7**, 1450-1455
  152. Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M. G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P. J., and 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
  153. St-Pierre, M. V., Hagenbuch, B., Ugele, B., Meier, P. J., and Stallmach, T. (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1856-1863
  154. Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., and Tamai, I. (2003) 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



155. Pizzagalli, F., Varga, Z., Huber, R. D., Folkers, G., Meier, P. J., and St-Pierre, M. V. (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3902-3912
156. Gao, B., Huber, R. D., Wenzel, A., Vavricka, S. R., Ismail, M. G., Reme, C., and Meier, P. J. (2005) Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Exp Eye Res* **80**, 61-72
157. Zamek-Gliszczyński, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S. W., Zhang, L., Zhang, Y., and International Transporter, C. (2018) Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clin Pharmacol Ther* **104**, 890-899
158. Patik, I., Szekely, V., Nemet, O., Szepesi, A., Kucsma, N., Varady, G., Szakacs, G., Bakos, E., and 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
159. Laczko-Rigo, R., Jojart, R., Mernyak, E., Bakos, E., Tuerkova, A., Zdrzil, B., and Ozvegy-Laczka, C. (2020) Structural dissection of 13-epiestrones based on the interaction with human Organic anion-transporting polypeptide, OATP2B1. *J Steroid Biochem Mol Biol* **200**, 105652
160. Hamada, A., Sissung, T., Price, D. K., Danesi, R., Chau, C. H., Sharifi, N., Venzon, D., Maeda, K., Nagao, K., Sparreboom, A., Mitsuya, H., Dahut, W. L., and Figg, W. D. (2008) Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 3312-3318
161. Hong, Y., and Chen, S. (2011) Aromatase, estrone sulfatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: structure-function studies and inhibitor development. *Mol Cell Endocrinol* **340**, 120-126
162. Nozawa, T., Suzuki, M., Takahashi, K., Yabuuchi, H., Maeda, T., Tsuji, A., and Tamai, I. (2004) Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 1032-1037
163. Pressler, H., Sissung, T. M., Venzon, D., Price, D. K., and Figg, W. D. (2011)

- Expression of OATP family members in hormone-related cancers: potential markers of progression. *PLoS One* **6**, e20372
164. Meyer zu Schwabedissen, H. E., Tirona, R. G., Yip, C. S., Ho, R. H., and Kim, R. B. (2008) Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 9338-9347
  165. Muto, M., Onogawa, T., Suzuki, T., Ishida, T., Rikiyama, T., Katayose, Y., Ohuchi, N., Sasano, H., Abe, T., and Unno, M. (2007) Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Sci* **98**, 1570-1576
  166. Wright, J. L., Kwon, E. M., Ostrander, E. A., Montgomery, R. B., Lin, D. W., Vessella, R., Stanford, J. L., and Mostaghel, E. A. (2011) Expression of SLCO transport genes in castration-resistant prostate cancer and impact of genetic variation in SLCO1B3 and SLCO2B1 on prostate cancer outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 619-627
  167. Matsumoto, J., Ariyoshi, N., Sakakibara, M., Nakanishi, T., Okubo, Y., Shiina, N., Fujisaki, K., Nagashima, T., Nakatani, Y., Tamai, I., Yamada, H., Takeda, H., and Ishii, I. (2015) 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* **30**, 133-141
  168. Bronger, H., Konig, J., Kopplow, K., Steiner, H. H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Keppler, D., and Nies, A. T. (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* **65**, 11419-11428
  169. Al Sarakbi, W., Mokbel, R., Salhab, M., Jiang, W. G., Reed, M. J., and Mokbel, K. (2006) The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res* **26**, 4985-4990
  170. Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 251-260
  171. Liedauer, R., Svoboda, M., Wlcek, K., Arrich, F., Ja, W., Toma, C., and

- Thalhammer, T. (2009) Different expression patterns of organic anion transporting polypeptides in osteosarcomas, bone metastases and aneurysmal bone cysts. *Oncol Rep* **22**, 1485-1492
172. McFeely, S. J., Wu, L., Ritchie, T. K., and Unadkat, J. (2019) Organic anion transporting polypeptide 2B1 - More than a glass-full of drug interactions. *Pharmacol Ther* **196**, 204-215
173. Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., Jr., and Chen, Z. S. (2015) The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat* **18**, 1-17
174. List, A. F., Kopecky, K. J., Willman, C. L., Head, D. R., Persons, D. L., Slovak, M. L., Dorr, R., Karanes, C., Hynes, H. E., Doroshow, J. H., Shurafa, M., and Appelbaum, F. R. (2001) Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* **98**, 3212-3220
175. Pisco, A. O., Brock, A., Zhou, J., Moor, A., Mojtahedi, M., Jackson, D., and Huang, S. (2013) Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nat Commun* **4**, 2467
176. Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., Wong, K. K., Brandstetter, K., Wittner, B., Ramaswamy, S., Classon, M., and Settleman, J. (2010) A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* **141**, 69-80
177. Wang, X. K., and Fu, L. W. (2010) Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the MDR- related ABC transporter proteins. *Curr Drug Metab* **11**, 618-628
178. Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apati, A., Magocsi, M., Nemet, K., Orfi, L., Keri, G., Katona, M., Takats, Z., Varadi, A., Szakacs, G., and Sarkadi, B. (2009) Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* **158**, 1153-1164
179. Zhang, S., Guo, N., Wan, G., Zhang, T., Li, C., Wang, Y., Wang, Y., and Liu, Y. (2019) pH and redox dual-responsive nanoparticles based on disulfide-containing poly(beta-amino ester) for combining chemotherapy and COX-2 inhibitor to

- overcome drug resistance in breast cancer. *J Nanobiotechnology* **17**, 109
180. Zrieki, A., Farinotti, R., and Buyse, M. (2008) Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line. *Pharm Res* **25**, 1991-2001
  181. Xu, H. B., Shen, F. M., and Lv, Q. Z. (2016) Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in chemo-resistant gastric cancer xenograft mouse models through a cyclooxygenase-2-dependent manner. *Eur J Pharmacol* **776**, 1-8
  182. Pang, L. Y., Argyle, S. A., Kamida, A., Morrison, K. O., and Argyle, D. J. (2014) The long-acting COX-2 inhibitor mavacoxib (Trocoxil) has anti-proliferative and pro-apoptotic effects on canine cancer cell lines and cancer stem cells in vitro. *BMC Vet Res* **10**, 184
  183. Rizzo, M. T. (2011) Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clin Chim Acta* **412**, 671-687
  184. Li, Q., and Shu, Y. (2014) Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Mol Cell Ther* **2**, 15
  185. Szakacs, G., Hall, M. D., Gottesman, M. M., Boumendjel, A., Kachadourian, R., Day, B. J., Baubichon-Cortay, H., and Di Pietro, A. (2014) Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev* **114**, 5753-5774
  186. Deeken, J. F., Robey, R. W., Shukla, S., Steadman, K., Chakraborty, A. R., Poonkuzhali, B., Schuetz, E. G., Holbeck, S., Ambudkar, S. V., and Bates, S. E. (2009) Identification of compounds that correlate with ABCG2 transporter function in the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Mol Pharmacol* **76**, 946-956
  187. Turk, D., Hall, M. D., Chu, B. F., Ludwig, J. A., Fales, H. M., Gottesman, M. M., and Szakacs, G. (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* **69**, 8293-8301
  188. Ludwig, J. A., Szakacs, G., Martin, S. E., Chu, B. F., Cardarelli, C., Sauna, Z. E., Caplen, N. J., Fales, H. M., Ambudkar, S. V., Weinstein, J. N., and Gottesman, M. M. (2006) Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res* **66**, 4808-4815
  189. Pluchino, K. M., Hall, M. D., Goldsborough, A. S., Callaghan, R., and Gottesman,

- M. M. (2012) Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resist Updat* **15**, 98-105
190. Pape, V. F., Toth, S., Furedi, A., Szebenyi, K., Lovrics, A., Szabo, P., Wiese, M., and Szakacs, G. (2016) Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance. *Eur J Med Chem* **117**, 335-354
191. Cserepes, M., Turk, D., Toth, S., Pape, V. F. S., Gaal, A., Gera, M., Szabo, J. E., Kucsma, N., Varady, G., Vertessy, B. G., Streli, C., Szabo, P. T., Tovari, J., Szoboszlai, N., and Szakacs, G. (2020) Unshielding Multidrug Resistant Cancer through Selective Iron Depletion of P-Glycoprotein-Expressing Cells. *Cancer Res* **80**, 663-674
192. Cutler, M. J., and Choo, E. F. (2011) Overview of SLC22A and SLCO families of drug uptake transporters in the context of cancer treatments. *Curr Drug Metab* **12**, 793-807
193. Obaidat, A., Roth, M., and Hagenbuch, B. (2012) The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**, 135-151
194. Sissung, T. M., Reece, K. M., Spencer, S., and Figg, W. D. (2012) Contribution of the OATP1B subfamily to cancer biology and treatment. *Clin Pharmacol Ther* **92**, 658-660
195. Gribbon, P., and Sewing, A. (2003) Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain? *Drug Discovery Today* **8**, 1035-1043
196. Coussens, N. P., Braisted, J. C., Peryea, T., Sittampalam, G. S., Simeonov, A., and Hall, M. D. (2017) Small-Molecule Screens: A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration-Approved Drugs. *Pharmacol Rev* **69**, 479-496
197. Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A., and Roda, A. (2010) Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal Bioanal Chem* **398**, 227-238
198. Kartner, N., Riordan, J. R., and Ling, V. (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **221**, 1285-1288

199. Clarke, R., Currier, S., Kaplan, O., Lovelace, E., Boulay, V., Gottesman, M. M., and Dickson, R. B. (1992) Effect of P-glycoprotein expression on sensitivity to hormones in MCF-7 human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **84**, 1506-1512
200. Shen DW, C. C., Hwang J, Cornwell M, Richert N, Ishii S, Pastan I, Gottesman MM. (1986) Multiple Drug-Resistant Human KB Carcinoma Cells Independently Selected for High-Level Resistance to Colchicine, Adriamycin, or Vinblastine Show Changes in Expression of Specific Proteins. *J Biol Chem.* **261**, 7762-7770
201. Ivnitski-Steele, I., Larson, R. S., Lovato, D. M., Khawaja, H. M., Winter, S. S., Oprea, T. I., Sklar, L. A., and Edwards, B. S. (2008) High-throughput flow cytometry to detect selective inhibitors of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters. *Assay Drug Dev Technol* **6**, 263-276
202. Brimacombe, K. R., Hall, M. D., Auld, D. S., Inglese, J., Austin, C. P., Gottesman, M. M., and Fung, K. L. (2009) A dual-fluorescence high-throughput cell line system for probing multidrug resistance. *Assay Drug Dev Technol* **7**, 233-249
203. Fox, J. T., Sakamuru, S., Huang, R., Teneva, N., Simmons, S. O., Xia, M., Tice, R. R., Austin, C. P., and Myung, K. (2012) High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage response and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5423-5428
204. Fox, J. T., and Myung, K. (2012) Cell-based high-throughput screens for the discovery of chemotherapeutic agents. *Oncotarget* **3**, 581-585
205. <https://dtp.cancer.gov/>.
206. Shoemaker, R. H. (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* **6**, 813-823
207. Szakacs, G., Annereau, J. P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G. D., Reimers, M., Weinstein, J. N., and Gottesman, M. M. (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* **6**, 129-137
208. Rutgen, B. C., Hammer, S. E., Gerner, W., Christian, M., de Arespacochaga, A. G., Willmann, M., Kleiter, M., Schwendenwein, I., and Saalmuller, A. (2010) Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk Res* **34**, 932-938
209. Wang, E., Lee, M. D., and Dunn, K. W. (2000) Lysosomal accumulation of drugs

- in drug-sensitive MES-SA but not multidrug-resistant MES-SA/Dx5 uterine sarcoma cells. *Journal of Cellular Physiology* **184**, 263-274
210. Pape, V. F., Turk, D., Szabo, P., Wiese, M., Enyedy, E. A., and Szakacs, G. (2015) Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives. *J Inorg Biochem* **144**, 18-30
211. Toth, S. (2018) Establishment of a HTS amenable platform for the identification of compounds selectively targeting ABCB1 expressing multidrug resistant cancer. Doctoral dissertation. Molecular Medicine Doctoral School, Semmelweis University, Hungary
212. Chou, T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**, 621-681
213. Berenbaum, M. C. (1989) What is synergy? *Pharmacol Rev* **41**, 93-141
214. John K. Buolamwini, A. A. A. (2003) Novel anticancer drug protocols. pp. 297-321, Humana Press
215. Chou, T. C., and Talalay, P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* **22**, 27-55
216. Chou, T. C., Martin, N. (2005) CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. ComboSyn, Paramus, NJ.
217. Homolya, L., Hollo, M., Muller, M., Mechetner, E. B., and Sarkadi, B. (1996) A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* **73**, 849-855
218. Windt, T. (2015) Development of a cytotoxicity HTS-amenable screening method for testing NCI-DTP-based compound libraries: Assay development and evaluation. Master's Thesis. Budapest University of Technology and Economics, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Hungary
219. Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 361-398

220. Pan, J. H., Han, J. X., Wu, J. M., Sheng, L. J., Huang, H. N., and Yu, Q. Z. (2008) MDR1 single nucleotide polymorphisms predict response to vinorelbine-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Respiration* **75**, 380-385
221. Chen, Y., Agarwal, S., Shaik, N. M., Chen, C., Yang, Z., and Elmquist, W. F. (2009) P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 956-963
222. Shen, H., Lee, F. Y., and Gan, J. (2011) Ixabepilone, a novel microtubule-targeting agent for breast cancer, is a substrate for P-glycoprotein (P-gp/MDR1/ABCB1) but not breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* **337**, 423-432
223. Xiao, J. J., Foraker, A. B., Swaan, P. W., Liu, S., Huang, Y., Dai, Z., Chen, J., Sadee, W., Byrd, J., Marcucci, G., and Chan, K. K. (2005) Efflux of depsipeptide FK228 (FR901228, NSC-630176) is mediated by P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 268-276
224. Hawley, T. S., Riz, I., Yang, W., Wakabayashi, Y., Depalma, L., Chang, Y. T., Peng, W., Zhu, J., and Hawley, R. G. (2013) Identification of an ABCB1 (P-glycoprotein)-positive carfilzomib-resistant myeloma subpopulation by the pluripotent stem cell fluorescent dye CDy1. *Am J Hematol* **88**, 265-272
225. Duran, G. E., Wang, Y. C., Francisco, E. B., Rose, J. C., Martinez, F. J., Coller, J., Brassard, D., Vrignaud, P., and Sikic, B. I. (2015) Mechanisms of resistance to cabazitaxel. *Mol Cancer Ther* **14**, 193-201
226. de Wolf, C., Jansen, R., Yamaguchi, H., de Haas, M., van de Wetering, K., Wijnholds, J., Beijnen, J., and Borst, P. (2008) Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol Cancer Ther* **7**, 3092-3102
227. M Maliepaard, M. A. v. G., A Tohgo, F H Hausheer, R C van Waardenburg, L A de Jong, D Plum, J H Beijnen, J H Schellens. (2001) Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918 *Clin Cancer Res* **7**, 935-941
228. Eisenblätter, T., Hüwel, S., and Galla, H.-J. (2003) Characterisation of the brain



- multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood–brain barrier. *Brain Research* **971**, 221-231
229. Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Varady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J. D., Varadi, A., Keri, G., Orfi, L., Nemet, K., and Sarkadi, B. (2004) High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* **65**, 1485-1495
230. Polli, J. W., Humphreys, J. E., Harmon, K. A., Castellino, S., O'Mara, M. J., Olson, K. L., John-Williams, L. S., Koch, K. M., and Serabjit-Singh, C. J. (2008) The role of efflux and uptake transporters in [N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino }methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. *Drug Metab Dispos* **36**, 695-701
231. Nagai, S., Takenaka, K., Nachagari, D., Rose, C., Domoney, K., Sun, D., Sparreboom, A., and Schuetz, J. D. (2011) Deoxycytidine kinase modulates the impact of the ABC transporter ABCG2 on clofarabine cytotoxicity. *Cancer Res* **71**, 1781-1791
232. Thakkar, N., Lockhart, A. C., and Lee, W. (2015) Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) in Cancer Therapy. *AAPS J* **17**, 535-545
233. Liu, L. F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* **58**, 351-375
234. Page, S. W. D. V. R. (2012) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 5th Edition*, Elsevier, USA
235. Patel, V. A., Dunn, M. J., and Sorokin, A. (2002) Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **277**, 38915-38920
236. Daenen, S., van der Holt, B., Verhoef, G. E., Lowenberg, B., Wijermans, P. W., Huijgens, P. C., van Marwijk Kooy, R., Schouten, H. C., Kramer, M. H., Ferrant, A., van den Berg, E., Steijaert, M. M., Verdonck, L. F., and Sonneveld, P. (2004) Addition of cyclosporin A to the combination of mitoxantrone and etoposide to overcome resistance to chemotherapy in refractory or relapsing acute myeloid leukaemia: a randomised phase II trial from HOVON, the Dutch-Belgian Haemato-Oncology Working Group for adults. *Leuk Res* **28**, 1057-1067
237. Baer, M. R., George, S. L., Dodge, R. K., O'Loughlin, K. L., Minderman, H.,

- Caligiuri, M. A., Anastasi, J., Powell, B. L., Kolitz, J. E., Schiffer, C. A., Bloomfield, C. D., and Larson, R. A. (2002) Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* **100**, 1224-1232
238. Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F., and Lammers, T. (2013) Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1852-1865
239. Karai, E., Szebenyi, K., Windt, T., Feher, S., Szendi, E., Dekay, V., Vajdovich, P., Szakacs, G., and Furedi, A. (2020) Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines. *Cancers (Basel)* **12**
240. Krysan, K., Merchant, F. H., Zhu, L., Dohadwala, M., Luo, J., Lin, Y., Heuze-Vourc'h, N., Pold, M., Seligson, D., Chia, D., Goodglick, L., Wang, H., Strieter, R., Sharma, S., and Dubinett, S. (2004) COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *FASEB J* **18**, 206-208
241. Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., and De Marzo, A. M. (2004) Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* **215**, 1-20
242. Rahman, M., Selvarajan, K., Hasan, M. R., Chan, A. P., Jin, C., Kim, J., Chan, S. K., Le, N. D., Kim, Y. B., and Tai, I. T. (2012) Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. *Neoplasia* **14**, 624-633
243. Surowiak, P., Materna, V., Matkowski, R., Szczuraszek, K., Kornafel, J., Wojnar, A., Pudelko, M., Dietel, M., Denkert, C., Zabel, M., and Lage, H. (2005) Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res* **7**, R862-870
244. Bryson, V., and Szybalski, W. (1952) Microbial Selection. *Science* **116**, 45-51
245. Furedi, A., Szebenyi, K., Toth, S., Cserepes, M., Hamori, L., Nagy, V., Karai, E., Vajdovich, P., Imre, T., Szabo, P., Szuts, D., Tovari, J., and Szakacs, G. (2017) Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a

- genetically engineered mouse model of breast cancer. *J Control Release* **261**, 287-296
246. De Bruyn, T., Fattah, S., Stieger, B., Augustijns, P., and Annaert, P. (2011) Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *J Pharm Sci* **100**, 5018-5030
247. Izumi, S., Nozaki, Y., Komori, T., Takenaka, O., Maeda, K., Kusuhara, H., and 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
248. Gui, C., Obaidat, A., Chaguturu, R., and 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
249. 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., and Goto, J. (2006) Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. *J Lipid Res* **47**, 1196-1202
250. Annaert, P., Ye, Z. W., Stieger, B., and Augustijns, P. (2010) Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* **40**, 163-176
251. de Waart, D. R., Hausler, S., Vlaming, M. L., Kunne, C., Hanggi, E., Gruss, H. J., Oude Elferink, R. P., and Stieger, B. (2010) Hepatic transport mechanisms of cholyl-L-lysyl-fluorescein. *J Pharmacol Exp Ther* **334**, 78-86
252. Bednarczyk, D. (2010) Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Anal Biochem* **405**, 50-58
253. Vilas-Boas, V., Silva, R., Palmeira, A., Sousa, E., Ferreira, L. M., Branco, P. S., Carvalho, F., Bastos Mde, L., and Remiao, F. (2013) Development of novel rifampicin-derived P-glycoprotein activators/inducers. synthesis, in silico analysis and application in the RBE4 cell model, using paraquat as substrate. *PLoS One* **8**, e74425
254. Silva, R., Sousa, E., Carmo, H., Palmeira, A., Barbosa, D. J., Gameiro, M., Pinto, M., Bastos Mde, L., and Remiao, F. (2014) Induction and activation of P-glycoprotein by dihydroxylated xanthenes protect against the cytotoxicity of the

- P-glycoprotein substrate paraquat. *Arch Toxicol* **88**, 937-951
255. Silva, R., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R., Cordeiro-da-Silva, A., Lima, S. C., Carvalho, F., Bastos Mde, L., and Remiao, F. (2011) In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. *Arch Toxicol* **85**, 315-326
  256. Xia, C. Q., Milton, M. N., and Gan, L. S. (2007) Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Curr Drug Metab* **8**, 341-363
  257. Hellinger, E., Veszeka, S., Toth, A. E., Walter, F., Kittel, A., Bakk, M. L., Tihanyi, K., Hada, V., Nakagawa, S., Duy, T. D., Niwa, M., Deli, M. A., and Vastag, M. (2012) Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm* **82**, 340-351
  258. Elkind, N. B., Szentpetery, Z., Apati, A., Ozvegy-Laczka, C., Varady, G., Ujhelly, O., Szabo, K., Homolya, L., Varadi, A., Buday, L., Keri, G., Nemet, K., and Sarkadi, B. (2005) Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res* **65**, 1770-1777
  259. Furedi, A., Toth, S., Szebenyi, K., Pape, V. F., Turk, D., Kucsma, N., Cervenak, L., Tovari, J., and Szakacs, G. (2017) Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity. *Mol Cancer Ther* **16**, 45-56
  260. Alvarez, M., Paull, K., Monks, A., Hose, C., Lee, J. S., Weinstein, J., Grever, M., Bates, S., and Fojo, T. (1995) Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *J Clin Invest* **95**, 2205-2214
  261. Tang, S. C., Nguyen, L. N., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2014) Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int J Cancer* **134**, 1484-1494
  262. Clemens, J., Seckinger, A., Hose, D., Theile, D., Longo, M., Haefeli, W. E., Burhenne, J., and Weiss, J. (2015) Cellular uptake kinetics of bortezomib in

- relation to efficacy in myeloma cells and the influence of drug transporters. *Cancer Chemother Pharmacol* **75**, 281-291
263. Hall, M. D., Handley, M. D., and Gottesman, M. M. (2009) Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 546-556
264. Brenner, S., Riha, J., Giessrigl, B., Thalhammer, T., Grusch, M., Krupitza, G., Stieger, B., and Jager, W. (2015) The effect of organic anion-transporting polypeptides 1B1, 1B3 and 2B1 on the antitumor activity of flavopiridol in breast cancer cells. *Int J Oncol* **46**, 324-332
265. Abe, T., Unno, M., Onogawa, T., Tokui, T., Kondo, T. N., Nakagomi, R., Adachi, H., Fujiwara, K., Okabe, M., Suzuki, T., Nunoki, K., Sato, E., Kakyō, M., Nishio, T., Sugita, J., Asano, N., Tanemoto, M., Seki, M., Date, F., Ono, K., Kondo, Y., Shiiba, K., Suzuki, M., Ohtani, H., Shimosegawa, T., Iinuma, K., Nagura, H., Ito, S., and Matsuno, S. (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* **120**, 1689-1699
266. Fahrmayr, C., König, J., Auge, D., Mieth, M., and 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
267. De Bruyn, T., van Westen, G. J., Ijzerman, A. P., Stieger, B., de Witte, P., Augustijns, P. F., and Annaert, P. P. (2013) Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. *Mol Pharmacol* **83**, 1257-1267
268. Baker, S. D., Verweij, J., Cusatis, G. A., van Schaik, R. H., Marsh, S., Orwick, S. J., Franke, R. M., Hu, S., Schuetz, E. G., Lamba, V., Messersmith, W. A., Wolff, A. C., Carducci, M. A., and Sparreboom, A. (2009) Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther* **85**, 155-163
269. Leblanc, A. F., Sprowl, J. A., Alberti, P., Chiorazzi, A., Arnold, W. D., Gibson, A. A., Hong, K. W., Pioso, M. S., Chen, M., Huang, K. M., Chodisetty, V., Costa, O., Florea, T., de Bruijn, P., Mathijssen, R. H., Reinbolt, R. E., Lustberg, M. B., Sucheston-Campbell, L. E., Cavaletti, G., Sparreboom, A., and Hu, S. (2018) OATP1B2 deficiency protects against paclitaxel-induced neurotoxicity. *J Clin Invest* **128**, 816-825

270. Gao, C. M., Pu, Z., He, C., Liang, D., Jia, Y., Yuan, X., Wang, G., and Xie, H. (2017) Effect of OATP1B1 genetic polymorphism on the uptake of tamoxifen and its metabolite, endoxifen. *Oncol Rep* **38**, 1124-1132
271. Callaghan, R., Luk, F., and Bebawy, M. (2014) Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metab Dispos* **42**, 623-631
272. Coley, H. M. (2010) Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors. *Methods Mol Biol* **596**, 341-358
273. Fraser, T. R. (1872) Lecture on the Antagonism between the Actions of Active Substances. *Br Med J* **2**, 485-487
274. Loewe, S. (1953) The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* **3**, 285-290
275. Elion, G. B., Singer, S., and Hitchings, G. H. (1954) Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* **208**, 477-488
276. Goldin, A., Venditti, J. M., Mantel, N., Kline, I., and Gang, M. (1968) Evaluation of combination chemotherapy with three drugs. *Cancer Res* **28**, 950-960
277. Budman, D. R., Calabro, A., and Kreis, W. (2002) Synergistic and antagonistic combinations of drugs in human prostate cancer cell lines in vitro. *Anticancer Drugs* **13**, 1011-1016
278. Carter, W. H., Gennings, C., Staniswalis, J. G., Campbell, E. D., and White, K. L. (1988) A Statistical Approach to the Construction and Analysis of Isobolograms. *J Am Coll Toxicol* **7**, 963-973
279. Lehar, J., Krueger, A. S., Avery, W., Heilbut, A. M., Johansen, L. M., Price, E. R., Rickles, R. J., Short, G. F., 3rd, Staunton, J. E., Jin, X., Lee, M. S., Zimmermann, G. R., and Borisy, A. A. (2009) Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol* **27**, 659-666
280. Wu, Q. B., and Sun, G. P. (2015) Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation. *World J Gastroenterol* **21**, 6206-6214
281. Wang, Z., Chen, J. Q., and Liu, J. L. (2014) COX-2 Inhibitors and Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract* **2014**, 132320
282. Breinig, M., Schirmacher, P., and Kern, M. A. (2007) Cyclooxygenase-2 (COX-

- 2)--a therapeutic target in liver cancer? *Curr Pharm Des* **13**, 3305-3315
283. Sun, H., Zhang, X., Sun, D., Jia, X., Xu, L., Qiao, Y., and Jin, Y. (2017) COX-2 expression in ovarian cancer: an updated meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 88152-88162
284. Hasegawa, K., Ohashi, Y., Ishikawa, K., Yasue, A., Kato, R., Achiwa, Y., Nishio, E., and Udagawa, Y. (2005) Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* **26**, 1419-1428
285. Hill, R., Li, Y., Tran, L. M., Dry, S., Calvopina, J. H., Garcia, A., Kim, C., Wang, Y., Donahue, T. R., Herschman, H. R., and Wu, H. (2012) Cell intrinsic role of COX-2 in pancreatic cancer development. *Mol Cancer Ther* **11**, 2127-2137
286. Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ramakrishnan, V., and Lucci, A. (2005) COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* **26**, 1393-1399
287. Moon, H., White, A. C., and Borowsky, A. D. (2020) New insights into the functions of Cox-2 in skin and esophageal malignancies. *Exp Mol Med* **52**, 538-547
288. Petkova, D. K., Clelland, C., Ronan, J., Pang, L., Coulson, J. M., Lewis, S., and Knox, A. J. (2004) Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Respir Med* **98**, 164-172
289. van Vliet, E. A., Zibell, G., Pekcec, A., Schlichtiger, J., Edelbroek, P. M., Holtman, L., Aronica, E., Gorter, J. A., and Potschka, H. (2010) COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology* **58**, 404-412
290. Liu, B., Qu, L., and Tao, H. (2009) Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance. *Cell Biol Int* **34**, 21-25
291. Liu, B., Qu, L., and Yan, S. (2015) Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int* **15**, 106
292. Tamura, D., Saito, T., Murata, K., Kawashima, M., and Asano, R. (2015) Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX2independent mechanisms. *Int J Oncol* **46**, 1393-1404
293. Murakami, A., Shibahashi, A., Iwasaki, R., Kawabe, M., Murakami, M., Sakai,

H., and Mori, T. (2018) Combination Chlorambucil/Firocoxib or Chlorambucil/Prednisolone Treatment for Inflammatory Colorectal Polyps in Miniature Dachshunds. *J Am Anim Hosp Assoc* **54**, 161-166



## 10. Saját publikációk jegyzéke

### a. Dolgozat részét képező publikációk

**Tímea Windt**, Szilárd Tóth, Izabel Patik, Judit Sessler, Nóra Kucsma, Áron Szepesi, Barbara Zdrzil, Csilla Özvegy-Laczka, Gergely Szakács: Identification of anticancer OATP2B1 substrates by an in vitro triple-fluorescence-based cytotoxicity screen. *Archives of Toxicology*, 2019 March, **93**: 953–964

Edina Karai, Kornélia Szabéni, **Tímea Windt**, Sára Fehér, Eszter Szendi, Valéria Dékay, Péter Vajdovich, Gergely Szakács and András Füredi: Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines. *Cancers*, 2020 May, 12(5): 1117.

### b. Dolgozat részét nem képező publikációk

Zita Rádai, **Tímea Windt**, Veronika Nagy, András Füredi, Nóra Zsuzsa Kiss, Ivan Randelović, József Tóvári, György Keglevich, Gergely Szakács, Szilárd Tóth: Synthesis and anticancer cytotoxicity with structural context of an  $\alpha$ -hydroxyphosphonate based compound library derived from substituted benzaldehydes.

*New Journal of Chemistry*, 2019 Jan, 43: 14028-14035

Zita Rádai, Petra Szeles, Nóra Zsuzsa Kiss, László Hegedűs, **Tímea Windt**, Veronika Nagy, György Keglevich: Green synthesis and cytotoxic activity of dibenzyl alfa-hydroxyphosphonates and alfa- hydroxyphosphonic acids.

*Heteroatom Chemistry*, 2018 July, 29: (4) e21436

Daniella Takács, Ákos Csonka, Ádám Horváth, **Tímea Windt**, Márió Gajdács, Zsuzsanna Riedl, György Hajós, Leonard Amaral, József Molnár, Gabriella Spengler: Reversal of ABCB1-related Multidrug Resistance of Colonic Adenocarcinoma Cells by Phenothiazines.

*Anticancer Research*, 2015 June, 35: (6) 3245-3251

## 11. Köszönetnyilvánítás

Itt szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak mindenkinek, aki a tézisemhez szükséges munkában közreműködött és segítséget nyújtott.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Szakács Gergelynek a támogatását, amelyek alapvető mértékben hozzájárultak a tézisem, illetve az ehhez kapcsolódó tudományos publikációk megjelenéséhez.

A dolgozatban tárgyalt eredmények nem jöhettek volna létre a Membrán Fehérje Kutatócsoport tagjainak támogatása nélkül. Külön köszönöm Tóth Szilárdnak, hogy bevezetett az automatizálás világába, mentorként támogatott és részt vett a dolgozatban ismertetett kísérletek végrehajtásában és kiértékelésében.

Köszönöm dr. Laczka Csillának, hogy bármikor felkereshettem uptake transzporterekkel kapcsolatban felmerülő kérdéseimmal. Hálás vagyok a rengeteg konzultációért, a konstruktív kritikákért, a szakmai támogatásért, amikkel végig kísért a doktori munkám során. A kísérletes munka során rengeteg támogatást kaptam Bakos Évától, amit ezúton is szeretnék megköszönni.

Külön köszönöm Sessler Juditnak, hogy bevezetett a programozás rejtelseibe, létrehozta és folyamatosan fejlesztette a munkámhoz elengedhetetlen citotoxicitási adatbázist.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Karai Edinának az együtt végzett közös kutatómunkáért és a laboron belül és kívül töltött vidám pillanatokért. Hatalmas köszönet illeti a fluoreszcens sejtek létrehozásáért a FACS labor, és a víruslabor munkatársait, illetve Kucsma Nórát, aki a sejtvonalak létrehozásán túl számos alkalommal segített gyakorlati tanácsokkal.

Végezetül szeretném kifejezni hálámat családomnak és barátaimnak, hogy a legnehezebb pillanatokban is mellettem álltak és biztattak a tézis befejezésére (is).

*Sic Itur ad Astra.*



# Identification of anticancer OATP2B1 substrates by an in vitro triple-fluorescence-based cytotoxicity screen

Tímea Windt<sup>1</sup> · Szilárd Tóth<sup>1</sup> · Izabel Patik<sup>1</sup> · Judit Sessler<sup>1</sup> · Nóra Kucsma<sup>1</sup> · Áron Szepesi<sup>1</sup> · Barbara Zdrzil<sup>2</sup> · Csilla Özvegy-Laczka<sup>1</sup> · Gergely Szakács<sup>1,3</sup> 

Received: 22 October 2018 / Accepted: 13 December 2018 / Published online: 12 March 2019  
© The Author(s) 2019

## Abstract

Membrane transporters play an important role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. The cellular accumulation of many drugs is the result of the net function of efflux and influx transporters. Efflux transporters such as P-glycoprotein/ABCB1 have been shown to confer multidrug resistance in cancer. Although expression of uptake transporters has been confirmed in cancer cells, their role in chemotherapy response has not been systematically investigated. In the present study we have adapted a fluorescence-based cytotoxic assay to characterize the influence of key drug-transporters on the toxicity of approved anticancer drugs. Co-cultures of fluorescently labeled parental and transporter-expressing cells (expressing ABCB1, ABCG2 or OATP2B1) were screened against 101 FDA-approved anticancer drugs, using a novel, automated, triple fluorescence-based cytotoxicity assay. By measuring the survival of parental and transporter-expressing cells in co-cultures, we identify those FDA-approved anticancer drugs, whose toxicity is influenced by ABCB1, ABCG2 or OATP2B1. In addition to confirming known substrates of ABCB1 and ABCG2, the fluorescence-based cytotoxicity assays identified anticancer agents whose toxicity was increased in OATP2B1 expressing cells. Interaction of these compounds with OATP2B1 was verified in dedicated transport assays using cell-impermeant fluorescent substrates. Understanding drug transporter interactions is needed to increase the efficacy of chemotherapeutic agents. Our results highlight the potential of the fluorescence-based HT screening system for identifying transporter substrates, opening the way for the design of therapeutic approaches based on the inhibition or even the exploitation of transporters in cancer cells.

**Keywords** High-throughput screen · Anticancer drugs · Cytotoxicity · ATP-binding cassette transporters · Organic Anion Transporting Polypeptides

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02417-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

\* Szilárd Tóth  
toth.szilard.enzim@ttk.mta.hu

\* Gergely Szakács  
szakacs.gergely@ttk.mta.hu

<sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for National Sciences, HAS, Budapest 1117, Hungary

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Division of Drug Design and Medicinal Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>3</sup> Institute of Cancer Research, Medical University Vienna, Vienna, Austria

## Introduction

Plasma membrane proteins play important roles in regulating the cellular uptake and efflux of nutrients, xenobiotics and drugs. Expressed in pharmacological barriers, transporters modulate the absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of compounds (Szakács et al. 2008; César-Razquin et al. 2015). Drug exporters such as ABCB1 (P-glycoprotein/Pgp), ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP) or ABCC1 (Multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, and typically mediate the transmembrane transport of a wide variety of xenobiotics, drugs, lipids, sterols, and metabolic products by utilizing the energy of ATP hydrolysis (Ambudkar et al. 1999; Fletcher et al. 2010). Transporters mediating drug import are members of the solute carrier (SLC) superfamily. SLC transporters also influence drug disposition and efficacy, and are sites of drug–drug interactions leading to toxicity (Giacomini et al. 2010; Giacomini and Huang 2013). One of the major SLC uptake transporters involved in ADME processes are members of the OATP (organic anion transporting polypeptide, SLCO) family. OATPs are anion exchangers mediating the cellular uptake of

organic compounds with a molecular weight of more than 300 Da in an ATP- and Na<sup>+</sup> independent manner (Roth et al. 2012). The liver-specific OATP1B1 (SLCO1B1) and OATP1B3 (SLCO1B3) are responsible for the hepatic detoxification of numerous drugs. According to recent FDA (US Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency) recommendations, these uptake transporters must be investigated for interaction with any novel molecular entity undergoing hepatic clearance (Giacomini and Huang 2013). OATP2B1 (SLCO2B1) is also a multispecific transporter, mediating cellular uptake of a plethora of clinically applied medicines (e.g., statins, antihistamines, and antivirals) (Tamai and Nakanishi 2013; Yu et al. 2017). However, in contrast to the members of the OATP1B subfamily, the role of OATP2B1 in hepatic clearance has not yet been proven. Owing to its wider tissue expression, OATP2B1 may participate in drug absorption from the intestine or across the blood–brain barrier (Nakanishi and Tamai 2012; Gao et al. 2015).

In the last decade, several studies revealed that the multidrug resistance phenotype in tumors is associated with the overexpression of certain ABC transporters, termed multidrug resistance (MDR) proteins. Expressed in cancer cells, ABCB1, ABCG2 or ABCC1 mediate the efflux of chemotherapeutics, allowing the survival of multidrug-resistant clones despite toxic chemotherapy (Gottesman et al. 2002). While OATP2B1 overexpression has been demonstrated in various tumors (e.g., breast cancer, gliomas, bone cysts), its role in chemotherapy response (sensitivity) has not been proven (Matsumoto et al. 2015; Kovacsics et al. 2017). In particular, the range of OATP2B1 substrates among currently used chemotherapeutics is not known. In the present study, we have adapted a fluorescence-based cytotoxic assay to identify the influence of key drug transporters on the toxicity of approved anticancer drugs. By measuring the survival of parental and transporter-expressing cells in co-cultures exposed to the drugs included in the NCI DTP oncology drug set, we identify those FDA-approved anticancer drugs, whose toxicity is influenced by the drug transporters.

## Methods

### Cell lines and culture conditions

A431 and Mes-Sa cell lines, including Mes-Sa/Dx5 were obtained from ATCC. ABCB1 and ABCG2 were expressed in A431 and Mes-Sa cells using lentiviral transduction (Pape et al. 2015), while OATP2B1 expressing cells were generated as described previously (Patik et al. 2018). After the transduction, cell lines were tested by flow cytometry and were sorted based on transporter expression/function, and in the case of the OATP2B1-expressing cell line, on CD4 protein expression. Parental, SLCO2B1, ABCG2 and ABCB1 overexpressing cell lines were transduced with the fluorescent

protein expressing lentiviral supernatants produced with pRRL-EF1-mCherry, -mOrange or -eGFP expression plasmid in a second round of transduction. Mes-Sa/Dx5-eGFP cells were repeatedly cultured in 500 nM doxorubicin to ensure homogenous expression of Pgp. All cell lines were cultured at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SigmaAldrich, 52100047), supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (ThermoFisher). Functional expression of ABCB1 and ABCG2 was regularly checked with cytotoxicity assays using mitoxantrone in the absence or presence of tariquidar. Functional expression of OATP2B1 in A431-2B1 was verified by the Cascade Blue uptake assay (Patik et al. 2018) in the presence or the absence of estrone-3-sulfate (Fig. S1).

### Fluorescence-based cytotoxicity assays

All experiments were performed using a robotic pipetting workstation (Hamilton Robotics STAR Let). Cells were seeded at a final cell density of 1875 cells per well in 384well plates in the triple co-culture (625 cells from each lines) and at 2500 cells per well in the A431 control and A431-2B1 co-culture (1250 cells from both) systems. Co-cultured cells were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> under humidified atmosphere prior to the addition of drugs. In the primary assays, compounds were added in a six-point dose response format with threefold dilution (the final volume was 60 µl, DMSO did not exceeded 1%). Six compounds (valrubicin, doxorubicin, daunomycin, mitoxantrone, mithramycin, dactinomycin) were excluded from the fluorescence-based screens because of their intrinsic fluorescence. 144 h after drug addition, fluorescence was recorded by a Perkin Elmer EnSpire microplate reader (GFP: 485<sub>ex</sub>/510<sub>em</sub>; mCherry: 585<sub>ex</sub>/610<sub>em</sub>; mOrange: 545<sub>ex</sub>/567<sub>em</sub>) by scanning the plate at a resolution of four points per well. Data were exported to a custom-made program for determining growth inhibition curves for each cell line. In confirmatory screens, compounds were tested with the same method in a nine-point dose response format. For validation, compounds were confirmed in cytotoxicity assays using the PrestoBlue cell viability reagent (ThermoFisher), according to the manufacturer's instructions.

## Data analysis

In the primary screening,  $IC_{50}$  was estimated by the intercept of the linear regression fitted on nearest values. In the confirmatory screening,  $IC_{50}$  values were obtained by sigmoidal curve fitting using the GraphPad Prism software. Differences of the  $IC_{50}$  values between the cell lines were analyzed by two-sided unpaired Student *t* test, and results were considered statistically significant at a *P* value of < 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*). Mean  $IC_{50}$  values were calculated as the average of 3–10 replicates. The Resistance Ratio (RR) was calculated by dividing the  $IC_{50}$  values measured against the multidrug resistant, transporter-expressing derivative by the cytotoxicity measured in the parental cell line; the Selectivity Ratio (SR) is the inverse of RR. Differences were considered to be biologically relevant at  $RR > 3$  or  $SR > 3$ .

## Microplate-based uptake assay

OATP-expressing A431 cells were seeded ( $7 \times 10^4$  cells in 200  $\mu$ l final volume/well) onto 96-well plates and cultured for 16–24 h at 37 °C, 5%  $C O_2$ . After reaching confluence, the supernatant was removed and the cells were washed threetimes with 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline (PBS). The cells were preincubated in the presence of the compounds for 5 min at 37 °C. The amount of solvent was kept below 0.5% throughout the study to avoid interference with the fluorescence of the dyes. The reaction was started with the addition of 50  $\mu$ l Cascade Blue fluorescent dye (10  $\mu$ M final concentration in a final volume of 100  $\mu$ l) and the plate was incubated at 37 °C for 30 min (Patik et al. 2018). The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu$ l ice-cold PBS. The supernatant was rapidly removed, and the cells were washed three-times with 200  $\mu$ l ice-cold PBS. Finally, 200  $\mu$ l PBS was added to the cells and fluorescence was measured at room temperature using an EnSpire fluorescent plate reader (Perkin Elmer) at wavelengths  $401_{ex}/419_{em}$  nm.

## Determination of Cascade Blue dye uptake by flow cytometry

A431 cells were collected after trypsinization (0.1% trypsin) and washed twice with uptake buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM  $C aCl_2$ , 1.2 mM  $K H_2PO_4$ , 12 mM  $MgSO_4$ , 25 mM MES, and 5.6 mM glucose, with the pH adjusted to 5.5 using 10 N NaOH/1 M HEPES).  $5 \times 10^5$  cells were preincubated at 37 °C with or without estrone-3-sulfate. After preincubation, 5  $\mu$ M Cascade Blue hydrazide was added in a final volume of 100  $\mu$ l for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 1 ml ice-cold 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).

## NCI DTP database and in silico screening

For in silico calculations, we focused on the NCI DTP oncology set IV compound collection and the associated cytotoxicity data released in December, 2016 (<https://dtp.cancer.gov/>). Putative substrates were identified based on correlation of cytotoxicity patterns to transporter expression within the NCI60 panel (Szakács et al. 2004).

## Materials

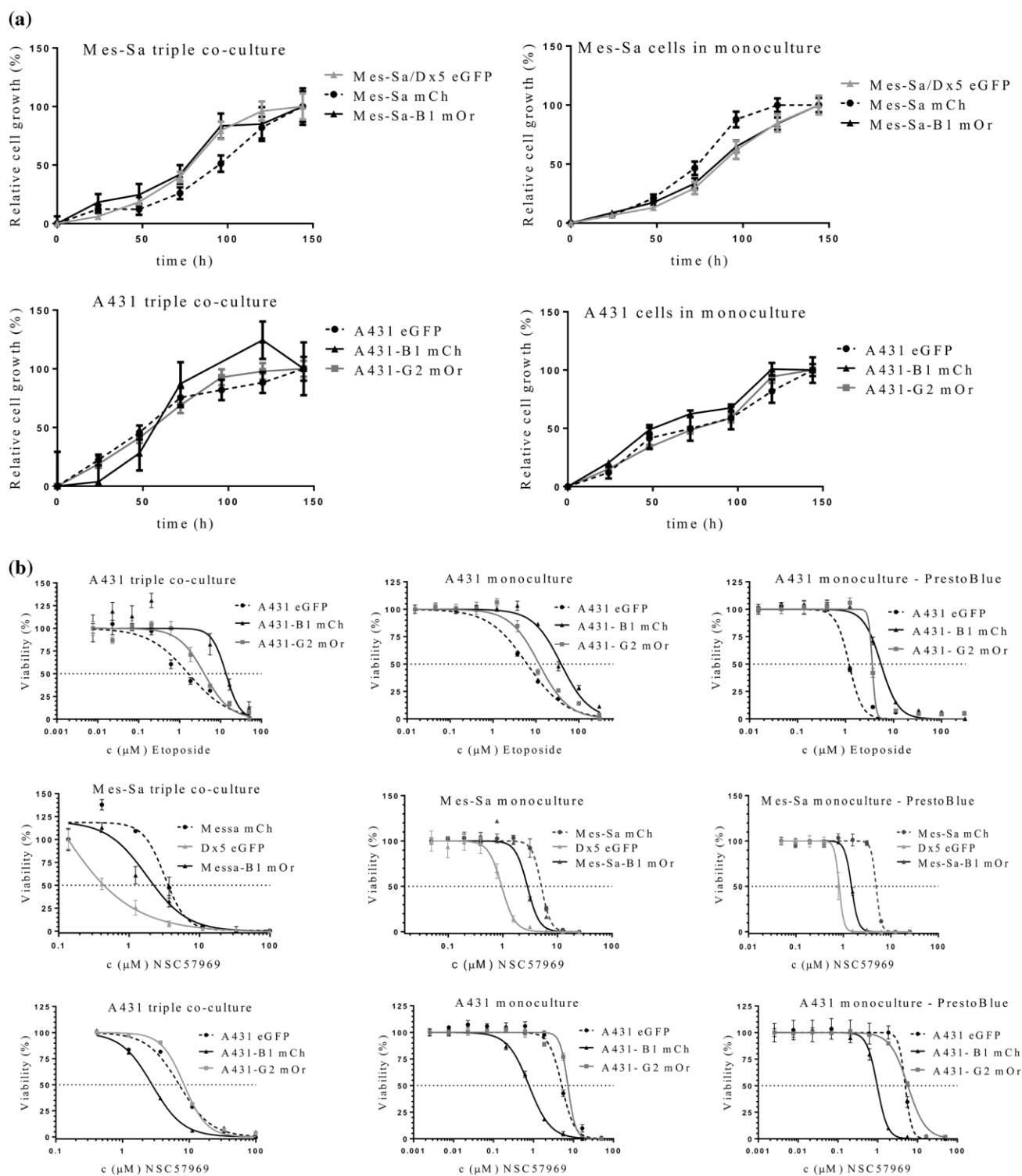
### Chemicals

The NCI DTP oncology drug set IV, containing 101 FDA-approved anticancer drugs, was obtained from the NCI/NIH DTP Open Chemical Repository as 10 mM DMSO solutions. Compounds for the follow up experiments were purchased from several vendors: methotrexate (NSC-740), teniposide (NSC-122819) and thioplex (NSC-6396) were obtained from Merck Irinotecan (NSC-616348), capecitabine (NSC-712807), bleomycin (NSC-125066), docetaxel (NSC-628503) and carfilzomib (NSC-758252) were purchased from SelleckChem; carboplatin (NSC-241240) was from Accord Healthcare; Etoposide (NSC-141540) was purchased from TEVA; estrone-3-sulfate and Cascade Blue hydrazide were from ThermoFisher Scientific

## Results

### Establishment and validation of the triple co-cultured cell cytotoxicity assay

We have shown earlier that the human epidermoid carcinoma cell line A431 provides a reliable and stable model for the characterization of the function of MDR ABC transporters ABCB1 and ABCG2 (Elkind et al. 2005; Nerada et al. 2016). For the purpose of this study we expressed the eGFP fluorescent protein in parental A431 cells, and mCherry or mOrange in A431 cells stably expressing ABCB1/Pglycoprotein (Pgp) or ABCG2, respectively. In addition, we transfected the human sarcoma cell line Mes-Sa and its multidrug-resistant counterparts (Mes-Sa/Dx5 and MesSa-B1) with mCherry (mCh), eGFP or mOrange (mOr), respectively. Transporter activity and the stable expression of the fluorescent tags were verified by functional assays and cytotoxicity experiments (Fig. S1). Correlation between the fluorescence intensity and cell number was maintained in the



triplicate co-cultures, indicating that the relative number of the parental and transporter-expressing cells can be reliably estimated by measuring the fluorescence of the individual cell lines in the same well (Fig. S2). Growth of the differently tagged cell lines could be selectively quantified both in mono- and triple co-cultures, indicating that this setup was amenable to a fluorescence-based cytotoxicity assay (Fig. 1a). The

triple-fluorescence-based cytotoxicity assay measures the growth inhibitory effect of test compounds on the co-culture of differently tagged parental and transporter-expressing cell lines. The assay was validated using etoposide, which is known to be recognized by both ABCB1

• **Fig. 1** Cell growth can be reliably monitored based on the fluorescence of differently tagged cell lines. **a** Cells were plated in a 384 well plate at a final cell density of 1875 cells per well in the triple co-culture system (625 cells from Mes-Sa mCh/Mes-Sa Dx5 eGFP/ Mes-Sa-B1 mOr cell lines; 625 cells from A431 eGFP/A431-B1 mCh/A431-G2 mOr cell lines) and at 2500 cells per well in monocultures. Fluorescence corresponding to the density of the individual cell lines was recorded at regular intervals using a plate reader. **b** Validation of the triple-co-cultured fluorescence-based cytotoxicity assay. IC<sub>50</sub> values measured in triple coculture condition and in monocultures. Mes-Sa, Mes-Sa-B1, Mes-Sa/Dx5 and A431, A431-B1, A431-G2 cells were seeded in 384 well plates and were incubated in the presence of increasing concentrations of etoposide or the MDRselective compound NSC57969 in monoculture (left) and triple coculture conditions (middle) measured with fluorescence-based cytotoxic assay, and with the PrestoBlue-based cytotoxicity assay (right). The fluorescence-based assay measured in triple coculture condition and in monoculture, compared with PrestoBlue-based cytotoxic assay provided concordant IC<sub>50</sub> results (see Table S1)

and ABCG2, as well as an MDR-selective compound (NSC57969), which preferentially kills Pgp-expressing cells (Füredi et al. 2017) (Fig. 1b). The PrestoBlue-based cytotoxicity assay and the fluorescence-based assays measured in monoculture and in triple-co-culture provided concordant results, confirming that the triple-fluorescence assay is suitable for the identification of ABC transporter substrates and MDR-selective compounds (Table S1). Interestingly, despite the overlapping substrate specificity of ABCB1 and ABCG2, ABCG2 did not sensitize cells to NSC57969.

### The triple-fluorescence-based cytotoxicity assay identifies ABC transporter substrates in the DTP oncology set IV

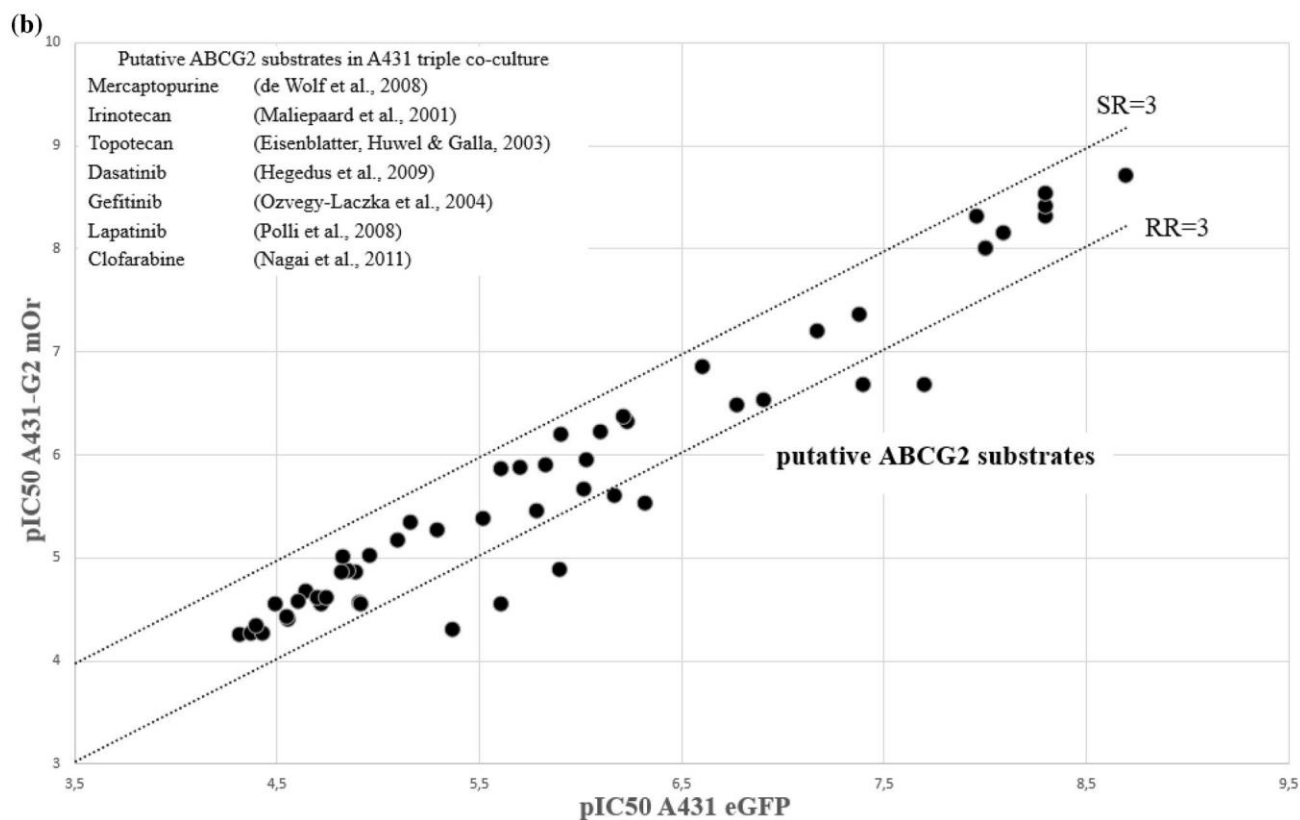
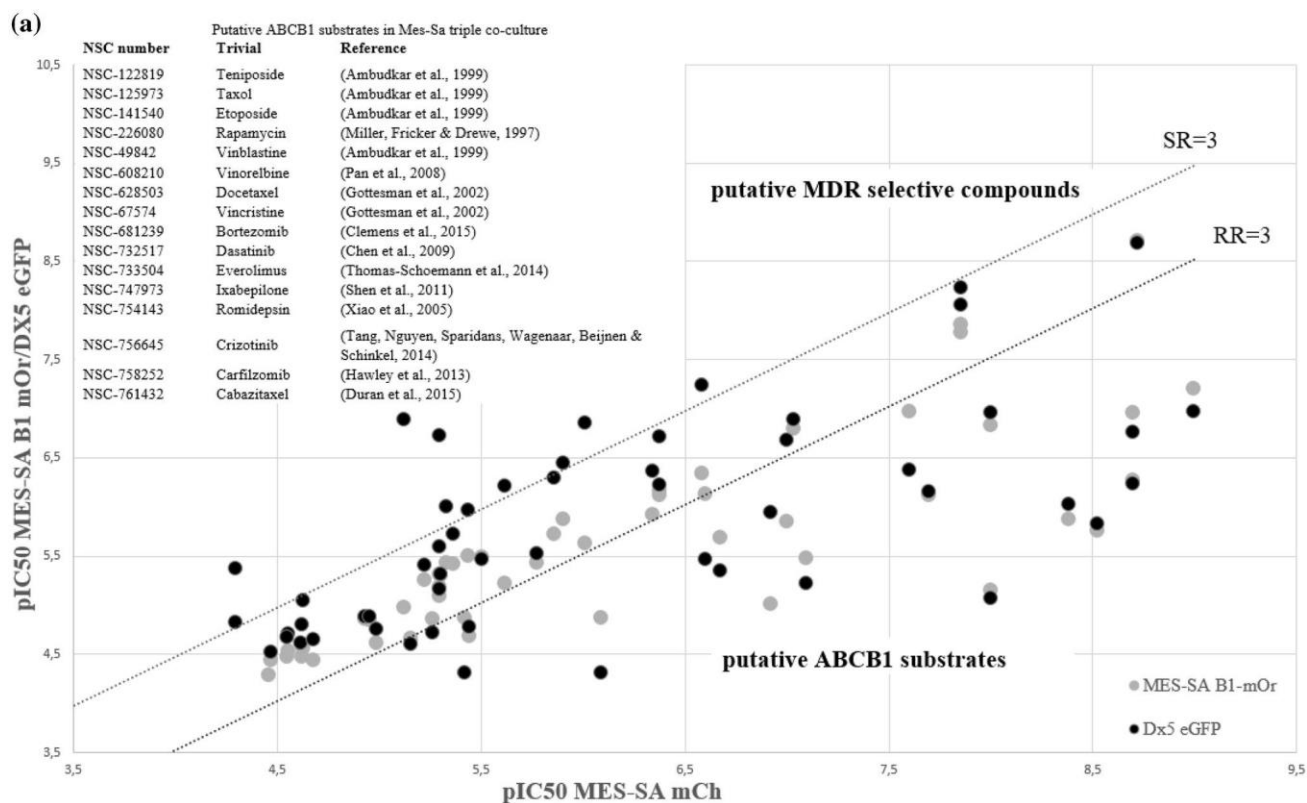
Next, we used the established co-culture model system to characterize the ability of the MDR ABC proteins to modulate the cytotoxic activity of 101 clinically used chemotherapeutics compiled in the Developmental Therapeutics Program's (DTP) oncology set IV. In the primary assays the compounds were tested in six concentrations, using a robotic pipetting workstation. As expected, the majority of the compounds were highly toxic. As compared to the parental Mes-Sa cells, approximately 20% of the oncology set compounds showed reduced toxicity against its multidrug resistant derivatives; compounds showing reduced toxicity to Mes-Sa/Dx5 cells were also less toxic to Mes-Sa/B1 cells, proving that these compounds are P-glycoprotein substrates (Fig. 2a, Table S3). Interestingly, several compounds including NSC-125066 (Bleomycin), NSC-9706 (Triethylenemelamine), NSC-6396 (Thioplex), and NSC-762 (Mechlorethamine) seemed to be more toxic against Mes-Sa/Dx5 cells. However, none of these compounds proved to preferentially kill Mes-Sa-B1 cells, indicating that the paradoxical sensitivity of Mes-Sa/Dx5 cells is independent of Pgp (Table S2). To substantiate these results, we repeated the screen using the co-culture of A431 cells. Putative Pgp substrates identified by the screen

performed by the Mes-Sa cells showed reduced toxicity to A431-B1 mCh cells (Table S3), but the collateral sensitivity of Mes-Sa/Dx5 cells could not be reproduced (Fig. S3). Next, we analyzed the differential sensitivity of parental and ABCG2-expressing A431 cells. Similarly to Pgp, ABCG2 conferred resistance to several compounds, which included known ABCG2-substrates: mercaptopurine (Wolf et al. 2008), irinotecan, topotecan (Maliepaard et al. 2001), dasatinib, gefitinib, lapatinib (Ozvegy-Laczka et al. 2004; Hegedus et al. 2009), clofarabine (Nagai et al. 2011) (Fig. 2b). On the other hand, none of the compounds were found to be more toxic to ABCG2-expressing cells.

### The fluorescence-based cytotoxicity assay identifies putative OATP2B1 transporter substrates

Our experiments performed with the co-culture systems indicated that the fluorescent protein based screen can identify ABCB1 and ABCG2 substrates. Recent evidence suggests that uptake transporters can play a significant role in the uptake of cytotoxic drugs. However, compared to MDR transporters, there are no systematic studies addressing the contribution of uptake transporters to cytotoxicity. Recently, we have established a panel of cell lines expressing the members of the OATP transporter family, OATP1B1, 1B3 and 2B1, and shown that A431 cells can be used to study the function of these OATP transporters (Patik et al. 2018). To address the ability of OATP2B1 to modulate the toxicity of the DTP compound set, we labeled OATP2B1 expressing A431 cells with mCherry. Transporter activity and the fluorescence of the cell lines were verified by FACS analysis (Figs. 3a, S1). Growth curves of the co-cultures confirmed that the relative number of the parental and OATP2B1 expressing cells can be reliably estimated (Fig. 3b), suggesting that the fluorescence-based co-culture system can be used to characterize the sensitivity of OATP2B1 expressing cells.

In the case of OATP2B1, which mediates the uptake of large, organic molecules, including chemotherapeutic compounds (Thakkar et al. 2015), we expected an increased toxicity of transporter substrate chemotherapeutics, due to their elevated accumulation in the cells. Whereas the majority of the compounds were equally toxic to A431eGFP and A431-2B1 cells, 13 approved chemotherapeutics showed increased activity against A431 cells expressing the uptake transporter (Fig. 4). Two compounds that showed uncharacteristic dose-response patterns were not pursued further (NSC-63878, NSC-613327), one compound (NSC-9706) was unavailable, and another compound was removed due to intrinsic fluorescence (NSC-757441). Increased toxicity of the remaining compounds against OATP2B1 expressing cells was confirmed in additional cytotoxicity experiments





• **Fig. 2** Screening results of the DTP oncology set IV measured against a parental Mes-Sa mCh and Pgp-expressing MDR derivatives [Mes-Sa/Dx5 eGFP (gray dots) or Mes-Sa-B1 mOr (black dots)]; **b** parental A431 and its ABCG2-expressing derivative (A431-G2). Data points represent average p IC<sub>50</sub> values derived from at least two independent experiments. To evaluate the selective toxicity of the compounds, resistance ratio (RR) was calculated by dividing the IC<sub>50</sub> values measured against the multidrug resistant, transporter-expressing derivative by the cytotoxicity measured in the parental cell line, while the selectivity ratio (SR) was calculated as the inverse of RR. Compounds displaying at least a threefold difference in toxicity (dashed line) between the control and transporter-expressing cells were considered as putative ABCB1 or ABCG2 substrates (RR > 3, see inset); or putative MDR-selective compounds (SR > 3, see Table S2)

(Table S4), indicating that these compounds may be transported by OATP2B1 into the cells. To test this proposition, we evaluated the effect of these compounds on the accumulation of CascadeBlue in A431-2B1 cells. The results clearly indicated that the putative OATP2B1-substrates identified by the fluorescence-based cytotoxicity screen show high affinity interaction with OATP2B1 (Table 1).

## Discussion

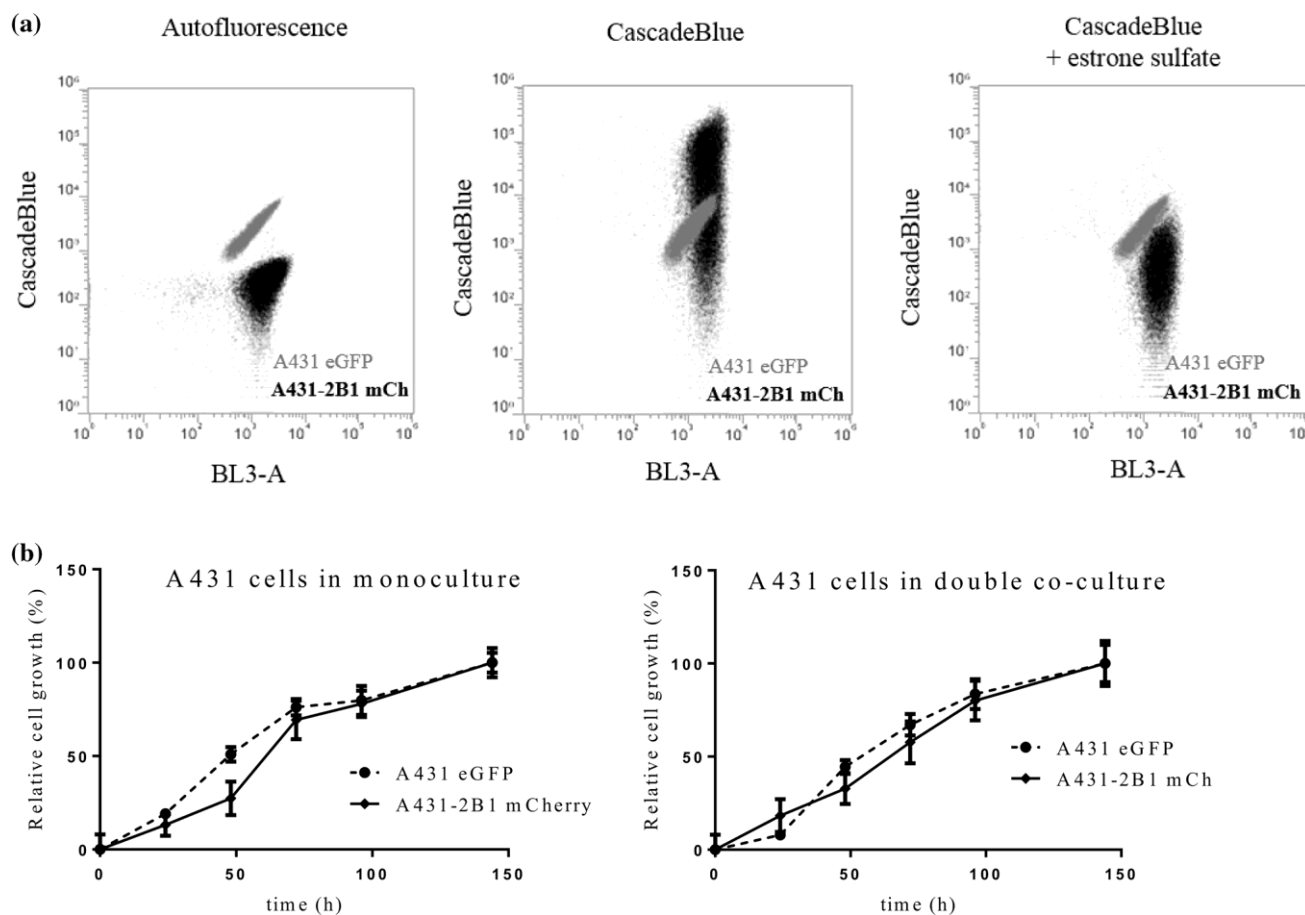
Drug transporters are widely acknowledged as important determinants of drug pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity, underlying drug–drug interactions, lack of therapeutic efficacy or unwanted toxicity. A large variety of in vitro assays have been used to characterize the interaction of compounds with transporters (Polli et al. 2001; Sarkadi et al. 2006). While each approach has unique strengths, there are also limitations, and classification of compounds as transporter substrates or inhibitors often depends on the specific assay.

Whereas pharmacological models based on, e.g., MDCK or CaCo-2 cells address the role of transporters in pharmacological barriers such as the gut or the blood–brain barrier, here we wanted to evaluate the influence of the transporters on the chemosensitivity of cancer. In this study, we characterize Mes-Sa (human sarcoma) and A431 (human epidermoid carcinoma) cells, along with their transporter-expressing derivatives. In prior work our group has shown that both cell lines are suitable for the identification of cytotoxic MDR-substrates and MDR-selective compounds (Elkind et al. 2005; Hegedűs et al. 2009; Türk et al. 2009; Nerada et al. 2016; Füredi et al. 2017; Szabó et al. 2018; Temesszentandrás-Ambrus et al. 2018). To evaluate the influence of OATP2B1 in the context of the MDR exporters, we wanted to use the same in vitro model. We found that A431 cells are particularly well suited for the evaluation of OATP function. First, A431 cells show optimal growth and adherence characteristics favoring HTS applications.

Second, A431 cells allow the stable expression of OATP transporters at relevant levels. Third, the signal to noise ratio measured in the A431 cell system was particularly high, given the very low permeability of these cells to the fluorescent dyes used to probe OATP function (Patik et al. 2018).

In oncological developments, in vitro cytotoxicity testing provides a convenient means to characterize the toxicity of new chemical entities. Since cellular accumulation of most drugs is significantly influenced by the net function of efflux and influx transporters, cytotoxicity of the compounds also depends on their interaction with transporters. Thus, cytotoxicity assays performed with pairs of parental and transporter-expressing cells can be used to identify transporter substrates. In the case of efflux pumps, compounds that are recognized for transport are expected to show reduced toxicity. In contrast, uptake transporters may increase the toxicity of their cytotoxic substrates by enhancing their cellular accumulation. The toxicity of many chemotherapeutics, including new-generation anticancer agents, are known to be blunted by efflux transporters, but the influence of uptake transporters is relatively unexplored. To improve the throughput of transporter-based cytotoxicity screens, Brimacombe et al. introduced a dual-fluorescence system in which they compared the sensitivity of the OVCAR-8 cell line with that of its drug-selected derivative NCI/ADR-RES (expressing ABCB1/Pgp), allowing sensitive and resistant cells to be treated with compounds under shared conditions in the same wells (Brimacombe et al. 2009). Here we take this approach a step further to include up to three cell lines expressing two major efflux pumps and a ubiquitous uptake transporter.

The fluorescence-based viability assay is based on the co-culture of differentially tagged cell lines. To achieve stable expression of transporters, ABCB1 and ABCG2 were expressed in A431 and Mes-Sa cells by lentiviral transduction, while SLCO2B1 expressing cells were established by the Sleeping Beauty transposon-based gene delivery system, using the 100× hyperactive SB transposase. In a second round of transduction, the cell lines were transduced with the fluorescent protein expressing lentiviral supernatants encoding mCherry, mOrange or eGFP, carefully chosen to allow parallel detection of the cell lines in the same well. Using a robotic work-flow, we were able to increase the throughput of our assay to include DTP's approved oncology set, containing most current FDA-approved anticancer drugs (Table S5). We developed three parallel cellular models to evaluate the ability of the triple-fluorescence assay to capture known ABCB1/Pgp substrates. We compared the sensitivity of the parental Mes-Sa cells with that of its drug-selected derivative (Mes-Sa/Dx5), and Mes-Sa-B1 cells, which were engineered to overexpress Pgp. In addition, we characterized the sensitivity of parental A431 cells in comparison to A431 cells expressing ABCB1 or

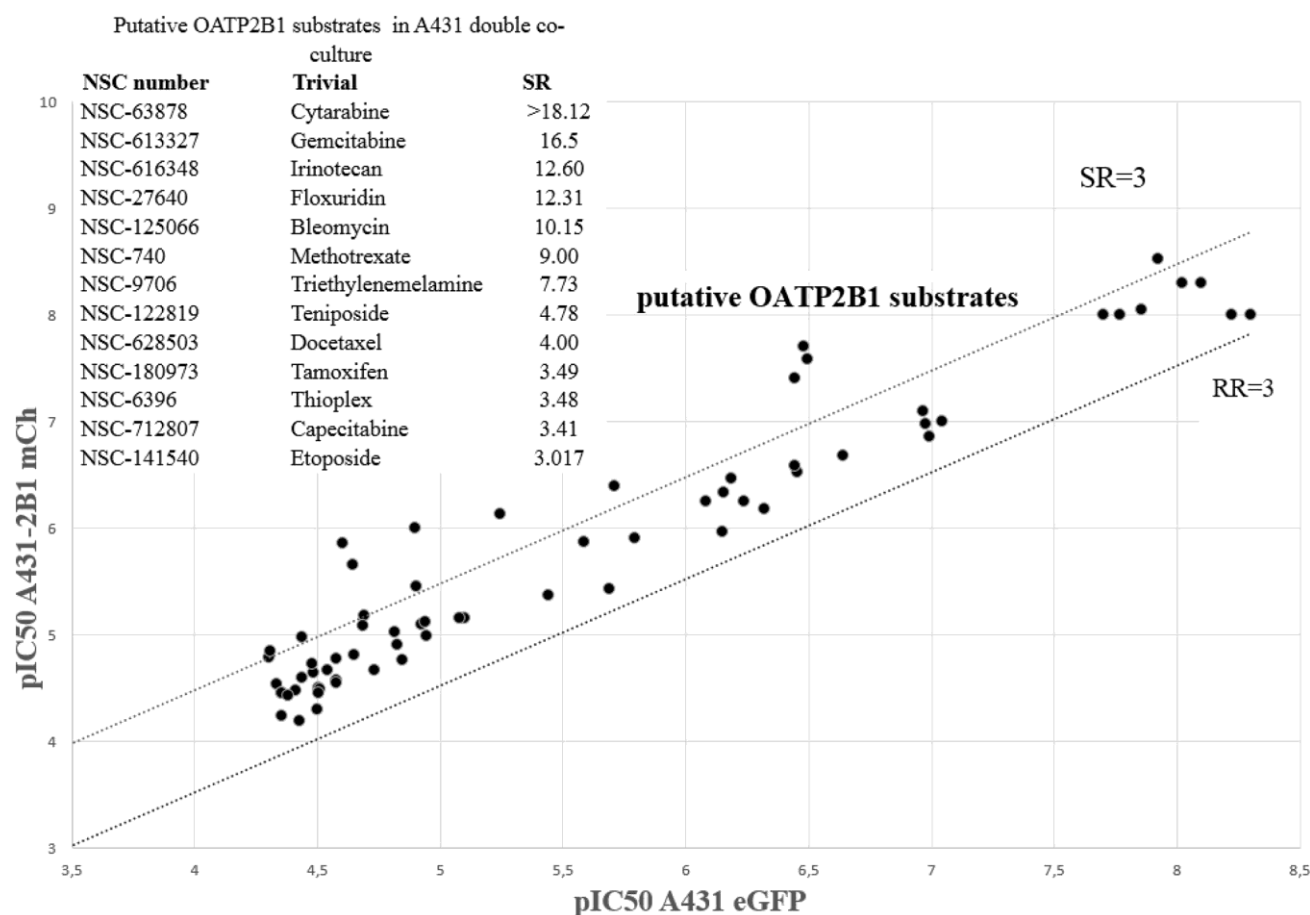


**Fig. 3** Characterization of the fluorescence-based OATP2B1 uptake transporter-expressing A431 co-culture system. **a** Transport activity of OATP2B1 can be selectively measured in the co-cultured cells. Co-culture of parental A431 eGFP (grey) and transporter expressing A431-2B1 mCh (black) cells were stained by Cascade Blue in the absence (middle) or presence (right) of the OATP2B1 inhibitor estrone-3-sulfate (cells without Cascade Blue are shown in the left panel). CB is

selectively taken up by OATP2B1-expressing cells. **b** Growth of A431 eGFP and A431-2B1 mCh cells can be reliably monitored based on the differential tagging of cells. Cells were seeded in 384-well plates in monoculture (2500 cells/well) and in coculture conditions (1250 A431 eGFP + 1250 A431-2B1 cells/well). The cells were incubated for 144 h in a final volume of 60  $\mu$ l, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, under humidified atmosphere. Cell growth corresponding to each cell line was recorded using a microplate reader

ABCG2. Results obtained with ABCB1-overexpressing cells confirmed that the triple co-culture cytotoxicity assay identifies P-glycoprotein substrates. Overall, the three P-gp positive cell lines gave similar results—however, resistance mediated by ABCB1 was not identical in the three cell lines (Table S3). The Oncology Set has also been measured across the NCI60 cell panel, and it has been shown that the toxicity pattern of ABCB1/Pgp substrates is negatively correlated with the pattern of ABCB1 expression across the NCI60 cell panel (Alvarez et al. 1995; Szakács et al. 2004). As shown in Fig. S4a, all compounds identified as putative Pgp substrates by the Mes-Sa triple co-culture assay are characterized by a negative Pearson correlation coefficient ( $PCC < -0.4$ ), indicating that the fluorescence-based triple co-culture cytotoxicity assay can be cross-validated by data from the NCI-60 screen (similar results were obtained by the A431 panel) (Fig. S4c). At the same time the *in silico* prediction missed several known Pgp substrates including vincristine, dasatinib, docetaxel, ixabepilone, cabazitaxel, teniposide and

etoposide, which were identified by both the Mes-Sa and A431 co-culture assays (Table S4). Dasatinib, which was reported to be a substrate of both P-gp and ABCG2, was less toxic to all MDR cells. Conversely, crizotinib and bortezomib, both described as Pgp substrates, was only identified by the Mes-Sa panel (RR = 9.9 and 4.3 for Mes-SaB1 and RR = 21.3 and 17 for Mes-Sa/Dx5, respectively), while the resistance ratio of these compounds were below the established threshold in the A431 cells (RR = 2.6 and 2.7, respectively). Interestingly, the DTP database contains toxicity patterns that are positively correlated to the expression of ABCB1 across the NCI60 cell panel, indicating that Pgp may potentiate, rather than reduce the toxicity of certain



**Fig. 4** Screening results of the DTP Oncology Set IV measured against parental A431 and its OATP2B1-expressing derivative (A431-2B1). Compounds displaying at least a threefold difference in

toxicity (dashed line) between the control and transporter-expressing cells were considered as putative substrates ( $SR > 3$ , see inset)

**Table 1** Inhibition of OATP2B1-mediated Cascade Blue (CB) uptake by the putative OATP2B1 substrates identified in the cytotoxicity screen

NSC number	Name	IC <sub>50</sub> (μM)
NSC-125066	Bleomycin	64.15±6.1
NSC-712807	Capecitabine	124.01±6.42
NSC-628503	Docetaxel	11.32±0.38
NSC-616348	Irinotecan	17.03±1.46
NSC-180973	Tamoxifen	10.99±0.7
NSC-740	Methotrexate	265.50±31.38
NSC-122819	Teniposide	4.59±0.4
NSC-141540	Etoposide	1.88±0.32
NSC-6396	Thioplex	574.28±282.7

Transport of CB (10 μM) was measured for 30 min in increasing concentrations of the investigated compounds. IC<sub>50</sub> values were determined by measuring the intracellular accumulation of Cascade Blue in the presence of increasing concentrations of OATP2B1 interacting compounds. Experiments were performed in triplicates with three parallels in each biological replicate. Average ± SD values of IC<sub>50</sub> values are shown

compounds (Szakács et al. 2004). Indeed, compounds such as NSC57969 show preferential toxicity to Pgp-expressing cells, proving that this well-studied drug resistance mechanism may be exploited to target resistant cancer (Hall et al. 2009). However, as seen in Figs. 2a and S3, the paradoxical toxicity of the compounds is restricted to Mes-Sa/Dx5 cells, indicating that their increased toxicity is unrelated to Pgp (Szakács et al. 2014).

Increasing evidence indicates that OATPs show altered, usually increased expression in various types of cancer, e.g., in breast, colon, lung and prostate cancers (Obaidat et al. 2012; Thakkar et al. 2015; Kovacsics et al. 2017). Increased OATP2B1 expression has been demonstrated in

a colon cancer cell line (Tamai et al. 2000), in bone cysts (Liedauer et al. 2009) and in glioma (Bronger et al. 2005). OATP overexpression may be beneficial for tumor cells by increased nutrient or hormone uptake. Indeed, it has been shown that increased uptake of hormones (ES, DHEAS) by OATPs 1A2, 1B3 and 2B1 resulted in increased survival of breast cancer cells (Nozawa et al. 2004; Arakawa et al. 2012;

Matsumoto et al. 2015). Moreover, clinical data suggests that testosterone uptake by OATP1B3 or DHEAS transport by OATP2B1 may be crucial in prostate cancer progression (Hamada et al. 2008; Wright et al. 2011). Therefore, inhibition of OATP function presents a possible strategy to cure hormone dependent cancers.

On the other hand, multispecific OATPs, such as OATP1A2, 1B1 and 2B1 may also influence the in vivo fate of drugs as well as their intratumoral concentration. Hence, increased cellular uptake of anticancer compounds by these OATPs may lead to increased drug sensitivity, offering a strategy to increase the efficacy of chemotherapy. To date, only few studies have investigated the role of OATPs in drug sensitivity. OATP1B1 has been shown to sensitize cells toward flavopiridol (Brenner et al. 2015), and OATP1B3 and OATP2B1 were shown to increase the toxicity of methotrexate and atorvastatin, respectively (Abe et al. 2001). On the analogy of efflux transporters, correlations were found between drug activity and the mRNA expression of SLC transporters across the NCI60 cell panel (Okabe et al. 2008; Lancaster et al. 2013). However, besides the above mentioned in silico screen, a systemic search for OATP-mediated cytotoxicity has not been undertaken. After validating the fluorescence-based co-culture system with traditional cytotoxicity experiments performed in monocultures (Fig. 1, Table S1), and the identification of known ABCB1 and ABCG2 substrates (Fig. 2, Table S3) we repeated the screen subjecting the co-cultures of parental and OATP2B1-expressing cells to the drug panel. In agreement with the directionality of the transport, the assay has failed to identify compounds showing reduced toxicity in transporter-expressing cells. Conversely, 13 chemotherapeutics proved to be more toxic against OATP2B1 overexpressing A431 cells, as compared to the parental line. Except for methotrexate and etoposide, none of these compounds have been reported to interact with OATP2B1. Etoposide was previously reported as substrate of OATP2B1 (Fahrmayr et al. 2012), and its close structural analog teniposide was reported to be an inhibitor for both hepatic transporters OATP1B1 and OATP1B3 (De Bruyn et al. 2013). The uniform platform introduced here allows the comparative analysis of transporter-effect on cell survival. It is interesting to note that both etoposide and teniposide are also recognized by ABCG2 (Allen et al. 2003), and etoposide is additionally recognized by ABCB1, which may mask the OATP2B1-mediated effect in tumor cells expressing several transporters. Docetaxel is also transported by all the three studied transporters, and further studies suggest interaction with OATP1B3 (Baker et al. 2009). However, it was reported that taxol is not transported by OATP2B1 (Leblanc et al. 2018), which was confirmed by our screening results (Fig. 4). We find that tamoxifen, which was reported to be a substrate of OATP1B1 (Gao et al. 2017), shows high affinity interaction with OATP2B1 (Table S5). This drug is of special interest since it is commonly used for

the treatment of ER-positive breast cancer and the facilitated uptake of tamoxifen into cancer cells by uptake transporters can, therefore, possess an advantage. However, since also efflux transporters (ABCB1 and ABCG2) recognize tamoxifen, the net-effect of this uptake/efflux interplay is unknown, when both types of transporters are expressed. The clinical relevance of transporter-mediated drug uptake depends on many pathophysiological factors including expression levels or the context of efflux transporters. The results presented in this study prove that in vitro, OATP2B1 can sensitize cells to its transported substrates. Further research should evaluate the role of the interplay of transporters in drug resistant cancer, and it will be essential to fully understand the full plethora of transporters involved in drug disposition. The methodology presented here provides an experimental tool for the comparison of efflux and uptake transport mechanisms in different variants of the same cell line.

**Acknowledgements** Open access funding provided by MTA Research Centre for Natural Sciences (MTA TTK). This work was supported by a Momentum Grant of the Hungarian Academy of Sciences (GS), the FIEK\_16-1-2016-0005 and the NKFIH FK 128751 Grants of the National Research, Development and Innovation Office, Hungary. Cs Ö-L is a recipient of the János Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. Funding from the Austrian Science Fund (3525-B20, P 29712) is also acknowledged.

**Authors' contribution** TW, SZT, IP collected the data and performed the analysis. SZT developed the coculture system. NK and ASZ developed the cell lines. JS contributed to the analysis. BZ, CSOL and GS conceived the study. GS wrote the paper with contributions from all authors.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided 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.

## References





- Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R et al (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120:1689–1699
- Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, Tellingen O van, Schinkel AH (2003) Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res* 63:1339–1344

- Alvarez M, Paull K, Monks A, Hose C, Lee J-S, Weinstein J et al (1995) Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the national cancer institute anticancer drug screen. *J Clin Invest* 95:2205–2214
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361–398
- Arakawa H, Nakanishi T, Yanagihara C, Nishimoto T, Wakayama T, Mizokami A et al (2012) 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* 84:1070–1077
- Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, Schaik RH van, Marsh S, Orwick SJ et al (2009) Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther* 85:155–163
- Brenner S, Riha J, Giessrigl B, Thalhammer T, Grusch M, Krupitza G et al (2015) The effect of organic anion-transporting polypeptides 1B1, 1B3 and 2B1 on the antitumor activity of fl vopiridol in breast cancer cells. *Int J Oncol* 46:324–332
- Brimacombe KR, Hall MD, Auld DS, Inglese J, Austin CP, Gottesman MM et al (2009) A dual-fluorescence high-throughput cell line system for probing multidrug resistance. *ASSAY Drug Dev Technol* 7:233–249
- Bronger H, König J, Kopplov K, Steiner H-H, Ahmadi R, Herold-Mende C et al (2005) ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65:11419–11428
- César-Razquin A, Snijder B, Frappier-Brinton T, Isserlin R, Gyimesi G, Bai X et al (2015) A call for systematic research on solute carriers. *Cell* 162:478–487
- De Bruyn T, Westen GJP van, Ijzerman AP, Stieger B, Witte P de, Augustijns PF et al (2013) Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. *Mol Pharmacol* 83:1257–1267
- Elkind NB, Szentpétery Z, Apáti Á, Özvegy-Laczka C, Várady G, Ujhelly O et al (2005) Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res* 65:1770–1777
- Fahrmayr C, König J, Auge D, Mieth M, Fromm M (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
- Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 10:147–156
- Füredi A, Tóth S, Szabéniyi K, Pape VFS, Türk D, Kucsma N et al (2017) Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line-specific eff from P-glycoprotein-induced toxicity. *Mol Cancer Ther* 16:45–56
- Gao B, Vavricka SR, Meier PJ, Stieger B (2015) 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 Arch* 467:1481–1493
- Gao C-M, Pu Z, He C, Liang D, Jia Y, Yuan X et al (2017) Effect of OATP1B1 genetic polymorphism on the uptake of tamoxifen and its metabolite, endoxifen. *Oncol Rep* 38:1124–1132
- Giacomini KM, Huang S-M (2013) Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 94:3–9
- Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X et al (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9:215–236
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48–58
- Hall MD, Handley MD, Gottesman MM (2009) Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol Sci* 30:546–556
- Hamada A, Sissung T, Price DK, Danesi R, Chau CH, Sharifi N et al (2008) Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 14:3312–3318
- Hegedus C, Özvegy-Laczka C, Szakács G, Sarkadi B (2009) Interaction of ABC multidrug transporters with anticancer protein kinase inhibitors: substrates and/or inhibitors? *Curr Cancer Drug Targets* 9:252–272
- Hegedüs C, Özvegy-Laczka C, Apáti Á, Magócsi M, Németh K, Órfi L et al (2009) Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* 158:1153–1164
- Kovacsics D, Patik I, Özvegy-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
- Lancaster CS, Sprowl JA, Walker AL, Hu S, Gibson AA, Sparreboom A (2013) Modulation of OATP1B-type transporter function alters cellular uptake and disposition of platinum chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 12:1537–1544
- Leblanc AF, Sprowl JA, Alberti P, Chiorazzi A, Arnold WD, Gibson AA et al (2018) OATP1B2 deficiency protects against paclitaxel-induced neurotoxicity. *J Clin Invest* 128:816–825
- Liedauer R, Svoboda M, Wlcek K, Arrich F, Jäger W, Toma C et al (2009) Different expression patterns of organic anion transporting polypeptides in osteosarcomas, bone metastases and aneurysmal bone cysts. *Oncol Rep* 22:1485–1492
- Maliepaard M, Gastelen MA van, Toho A, Hausheer FH, Waardenburg RC van, Jong LA de et al (2001) Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin Cancer Res* 7:935–941
- Matsumoto J, Ariyoshi N, Sakakibara M, Nakanishi T, Okubo Y, Shiina N et al (2015) 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* 30:133–141
- Nagai S, Takenaka K, Nachagari D, Rose C, Domoney K, Sun D et al (2011) Deoxycytidine kinase modulates the impact of the ABC transporter ABCG2 on clofarabine cytotoxicity. *Cancer Res* 71:1781–1791
- Nakanishi T, Tamai I (2012) Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 27:106–121
- Nerada Z, Hegyi Z, Szepesi Á, Tóth S, Hegedüs C, Várady G et al (2016) Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol* 89: 826–834
- Nozawa T, Suzuki M, Takahashi K, Yabuuchi H, Maeda T, Tsuji A et al (2004) Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-dependent breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1032–1037
- Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B (2012) The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:135–151
- Okabe M, Szakács G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T et al (2008) Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther* 7:3081–3091
- Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Várady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Varadi A et al (2004) High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* 65:1485–1495

- Pape VFS, Türk D, Szabó P, Wiese M, Enyedy EA, Szakács G (2015) Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives. *J Inorg Biochem* 144:18–30
- Patik I, Székely V, Németh O, Szepesi Á, Kucsma N, Várady G et al (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
- Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO et al (2001) Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 299:620–628
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165:1260–1287
- Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev* 86:1179–1236
- Szabó E, Türk D, Telbisz Á, Kucsma N, Horváth T, Szakács G et al (2018) A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions. *PLoS One* 13:e0190629
- Szakács G, Annereau J-P, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ et al (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6:129–137
- Szakács G, Váradi 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
- Szakács G, Hall MD, Gottesman MM, Boumendjel A, Kachadourian R, Day BJ et al (2014) Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev* 114:5753–5774
- Tamai I, Nakanishi T (2013) OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. *Curr Opin Pharmacol* 13:859–863
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M et al (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273:251–260
- Temesszentandrás-Ambrus C, Tóth S, Verma R, Bánhegyi P, Szabadkai I, Baska F et al (2018) Characterization of new, efficient mycobacterium tuberculosis topoisomerase-I inhibitors and their interaction with human ABC multidrug transporters. *PLoS One* 13:e0202749
- Thakkar N, Lockhart AC, Lee W (2015) Role of organic anion-transporting polypeptides (OATPs) in cancer therapy. *AAPS J* 17:535–545
- Türk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM et al (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 69:8293–8301
- Wolf C de, Jansen R, Yamaguchi H, Haas M de, Wetering K van de, Wijnholds J et al (2008) Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol Cancer Ther* 7:3092–3102
- Wright JL, Kwon EM, Ostrander EA, Montgomery RB, Lin DW, Vessella R et al (2011) Expression of SLCO transport genes in castration-resistant prostate cancer and impact of genetic variation in SLCO1B3 and SLCO2B1 on prostate cancer outcomes. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 20:619–627
- Yu J, Zhou Z, Tay-Sontheimer J, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I (2017) Intestinal drug interactions mediated by OATPs: a systematic review of preclinical and clinical findings. *J Pharm Sci* 106:2312–2325

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliation

# Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines

Edina Karai <sup>1,2</sup> , Kornélia Szabó <sup>1,3</sup>, Tímea Windt <sup>1</sup> , Sára Fehér <sup>2</sup>, Eszter Szendi <sup>2</sup>, Valéria Dékay <sup>2</sup>, Péter Vajdovich <sup>2</sup>, Gergely Szakács <sup>1,3,\*</sup>  and András Füredi <sup>1,3,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre of Natural Sciences, Eötvös Loránd Research Network, Magyar Tudósok körútja 2, H-1117 Budapest, Hungary; karaiedina@gmail.com (E.K.); ks863@cam.ac.uk (K.S.); windt.timea@gmail.com (T.W.)
- <sup>2</sup> Department of Clinical Pathology and Oncology, University of Veterinary Medicine Budapest, István utca 2, H-1078 Budapest, Hungary; sara.feher25@gmail.com (S.F.); Szendi.Eszter@univet.hu (E.S.); dr.valeria.dekay@gmail.com (V.D.); Vajdovich.Peter@univet.hu (P.V.)
- <sup>3</sup> Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8A, A-1090 Vienna, Austria \*  
Correspondence: andras.fueredi@meduniwien.ac.at (G.S.); gergely.szakacs@meduniwien.ac.at (A.F.)



Received: 1 April 2020; Accepted: 24 April 2020; Published: 29 April 2020

**Abstract:** Background: Treatment of malignancies is still a major challenge in human and canine cancer, mostly due to the emergence of multidrug resistance (MDR). One of the main contributors of MDR is the overexpression P-glycoprotein (Pgp), which recognizes and extrudes various chemotherapeutics from cancer cells. Methods: To study mechanisms underlying the development of drug resistance, we established an in vitro treatment protocol to rapidly induce Pgp-mediated MDR in cancer cells. Based on a clinical observation showing that a 33-day-long, unplanned drug holiday can reverse the MDR phenotype of a canine diffuse large B-cell lymphoma patient, our aim was to use the established assay to prevent the emergence of drug resistance in the early stages of treatment. Results: We showed that an in vitro drug holiday results in the decrease of Pgp expression in MDR cell lines. Surprisingly, celecoxib, a known COX-2 inhibitor, prevented the emergence of drug-induced MDR in murine and canine lymphoma cell lines. Conclusions: Our findings suggest that celecoxib could significantly improve the efficiency of chemotherapy by preventing the development of MDR in B-cell lymphoma.

**Keywords:** lymphoma; multidrug resistance; P-glycoprotein; drug holiday; COX-2 inhibitors; celecoxib

## 1. Introduction

Despite newly developed therapies and protocols, treatment of lymphomas mostly results in transient remission because of the rapid emergence of therapy resistance [1]. Dogs have shared a common environment with humans for thousands of years. Canine lymphomas and human non-Hodgkin lymphomas (NHLs) show strong similarities in genetics, therapy response, histopathology, and disease progression [1–5]. Spontaneously occurring canine lymphoma has been considered a comparative animal model to study mechanisms underlying therapy resistance and to investigate novel therapeutic agents for human NHLs [6,7].

Canine lymphoma is usually treated with multiagent chemotherapy, such as the CHOP-protocol (cyclophosphamide (C), doxorubicin (H, hydroxydaunorubicin), vincristine (O, Oncovin), and prednisone (P)). Although this treatment regimen initially seems successful, tumor recurrence can be expected and the relapsed tumor is often resistant to additional treatment. Cancer cells can become therapy-resistant through multiple mechanisms that include changes in drug metabolism, the decreased uptake of chemotherapy agents, increased DNA repair, and inhibition of apoptotic pathways [1,8]. One of the most common mechanisms is based on the active efflux of drugs from the cells mediated by transport proteins of the ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette (ABC) superfamily, including P-glycoprotein (Pgp, ABCB1 (ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1)), MRP1 (Multidrug Resistance-Associated Protein 1) (ABCC1 (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1)), and BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (ABCG2 (ATP-binding Cassette Subfamily G Member 2)). Pgp extrudes a wide spectrum of cytotoxic compounds from the cell, resulting in decreased intracellular drug concentrations [8–10]. Several classes of anticancer drugs used in human and veterinary medicine are substrates for Pgp [11]. Studies have repeatedly linked the overexpression of P-glycoprotein to drug-resistant canine cancers [8,12,13]. Expression of Pgp was demonstrated in mast cell tumors [14], mammary tumors [15], pulmonary carcinoma [16], and lymphoma [17,18]. Recently, we determined the impact of Pgp function on therapy response and survival in canine lymphoma, using a quantitative measure based on the Pgp-mediated efflux of calcein AM (acetoxymethyl) [19]. In agreement with studies measuring the Pgp-mediated efflux of rhodamine 123 [20], our results confirmed the negative effect of P-glycoprotein function on therapy response and survival [21].

Drug holidays have been proposed to limit the development of resistance in cancer treatment [22]. According to this concept, resistance can be reversed by introducing a pause in the treatment. In absence of chemotherapy, adaptations driving resistance often prove to be a disadvantage, providing a new selection pressure against resistant populations. The molecular basis of the negative selection during drug holidays is not known. Reversal of therapy resistance is believed to be linked to reversible, nonmutational changes. However, the required length of drug holiday in different cancer types is not precisely established because only a few clinical studies are available [22,23]. In leukemia cells, Pgp is rapidly induced by vincristine treatment, but after drug removal the expression of Pgp was shown to return to initial levels [24]. This reversibility indicates a regulatory mechanism that can switch the expression of MDR (multidrug resistance) proteins on and off during periods of treatment and drug holidays, respectively. Induction and silencing of Pgp expression may be explained by epigenetic changes and/or transcription factor activation. Interestingly, drug resistance can be modulated by the combination of epigenetic inhibitors such as histone deacetylase inhibitors (HDACis) with chemotherapy [6,25–29]. Additionally, cyclooxygenase (COX)-2, a key enzyme responsible for the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid, was shown to influence Pgp expression. Cells virally transduced with COX-2 show high levels of Pgp expression and rhodamine efflux activity, however, the mechanistic link between COX-2 and Pgp remains to be identified [30].

To study mechanisms underlying the development of drug resistance and the effect of drug holidays, we established an *in vitro* treatment protocol to rapidly induce Pgp-mediated MDR in cancer cells. Our ultimate goal was to identify clinically relevant COX-2 and HDACis that may prevent or delay the emergence of drug resistance during chemotherapy. Here we show that celecoxib, a potent COX-2 inhibitor, prevents doxorubicin-induced MDR by inhibiting the expression of Pgp. Our findings suggest that inclusion of celecoxib in the treatment protocols may significantly improve efficiency of chemotherapy by preventing the development of MDR in B-cell lymphoma.



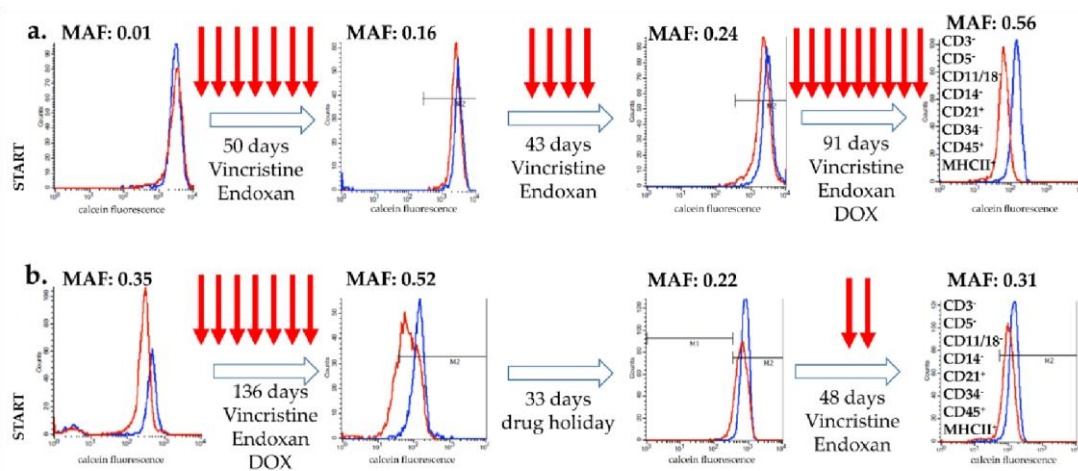
## 2. Results

### 2.1. Pgp-Mediated Drug Resistance Is Temporarily Reversed by a Drug Holiday: A Clinical Case Study of Two Canine Lymphoma Patients

Two canine patients were diagnosed with B-cell lymphoma (Table S1). Both patients were treated according to the modified CHOP protocol (Table S2). Multidrug resistance was quantitated by the calcein assay and the activity of Pgp was expressed as a dimensionless value (multidrug resistance activity factor (MAF)) [31].

Case 1 (Figure 1a): The calcein assay performed at the time of diagnosis indicated a lack of P-glycoprotein activity (MAF = 0.01) in the treatment-naïve tumor cells of Patient 1. After 7 rounds of treatment, the MAF value was 0.16 (day 51), which increased with an additional 4 rounds of treatment, reaching MAF = 0.24 at day 93. Pgp function, characterized by repeated calcein assays performed on isolated tumor cells, showed further increase at day 184, after 9 additional rounds of chemotherapy, reaching high levels (MAF = 0.56) usually observed in Pgp-overexpressing cell lines, such as HCT-15, CHO K1, and HCT-8, exhibiting a MAF of 0.63, 0.64, and 0.46, respectively [32]. The immunophenotype of the lymphoma remained identical during the course of the 184 days (Figure 1a).

Case 2 (Figure 1b): Tumor cells isolated from Patient 2 showed significant Pgp activity at the time of diagnosis (MAF = 0.35), which further increased following 7 additional treatments (MAF = 0.52 at day 135). At this point, due to financial reasons, the treatment was temporarily halted for 33 days. Surprisingly, this unplanned drug holiday resulted in a significant decrease of Pgp activity (MAF = 0.22). However, following two additional cycles of treatment, tumor cells regained Pgp expression (MAF = 0.31), indicating the re-emergence of the resistant phenotype at day 217. The immunophenotype of the lymphoma remained identical during the course of the 217 days (Figure 1b).

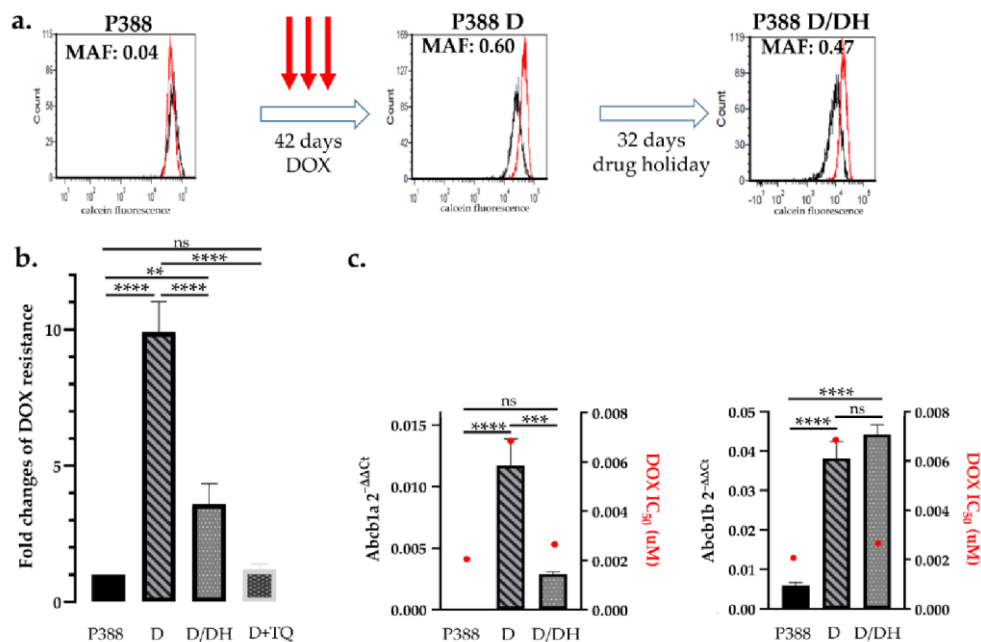


**Figure 1.** Changes in P-glycoprotein function during chemotherapy in two B-cell lymphoma canine patients. P-glycoprotein activity, as determined by the calcein assay (MAF values), was monitored during therapy (treatments are indicated by arrows). Flow cytometry histograms show the calcein fluorescence of cancer cells incubated with (blue) and without (red) the Pgp inhibitor verapamil. (a) Patient 1 showed the typical kinetics of acquired multidrug resistance. (b) In the case of Patient 2, MDR was reversed by a 33-day-long (unplanned) drug holiday. The immunophenotype of the lymphoma remained identical during the treatment in both case (results show data of the final measurement).

### 2.2. A Novel Assay to Study the Rapid Emergence of Drug Resistance and the Effect of Drug Holiday

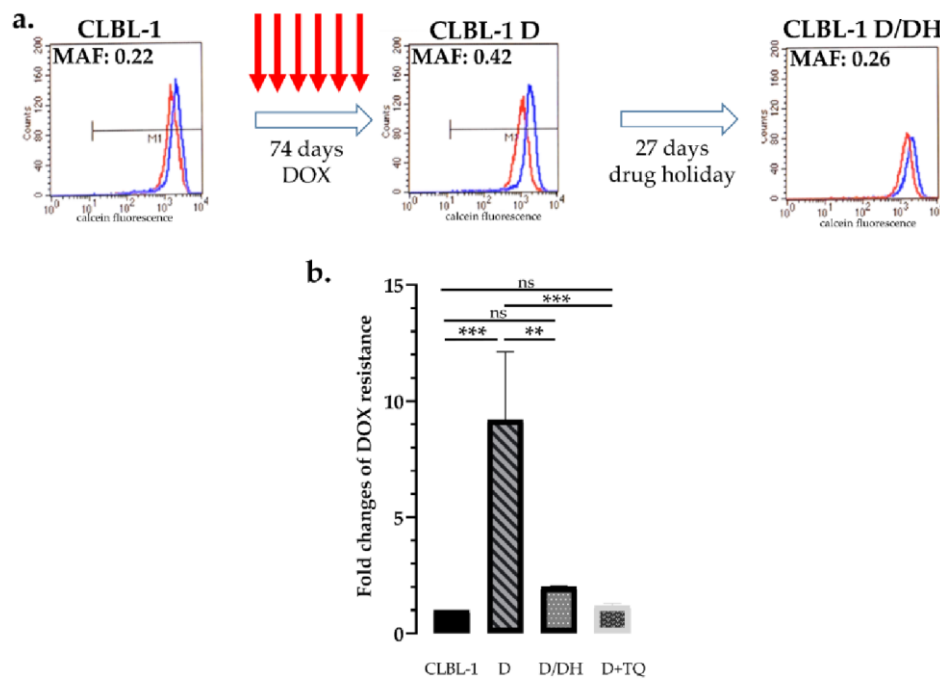
To study mechanisms underlying chemotherapy-induced drug resistance and renewed sensitivity following drug holidays, we established an in vitro assay based on the treatment of lymphoma cell lines. Our aim was to model clinical protocols by treating drug-naïve cells with high concentrations of

doxorubicin for 5 days, followed by culturing cells in drug-free medium. Treatment with IC<sub>10</sub> (Inhibitory Concentration 10) of doxorubicin equals the concentration which kills 90% of the cells, however, surviving cells were able to recover and proliferate over time. After 3 cycles of doxorubicin (13 nM) treatment, P388 cells showed a significant increase in P-glycoprotein function (P388 D), evidenced by a dramatic increase of the MAF value (from  $0.02 \pm 0.02$  to  $0.68 \pm 0.16$ ). Intriguingly, a 32-day-long “drug holiday”, during which P388 D cells were cultured without doxorubicin (P388 D/DH), resulted in a decrease of the MAF value (0.47) (Figure 2a). In line with the observed changes in P-glycoprotein activity, P388 D cells were 9.9-fold resistant to doxorubicin (DOX) ( $p < 0.0001$ ), while P388 D/DH cells showed only 3.6-fold resistance to DOX as compared to parental P388 cells (Figure 2b). The direct involvement of Pgp in the acquired resistance of P388 D cells was verified by the addition of the P-glycoprotein inhibitor tariquidar (TQ). In agreement with the functional results, mRNA (messenger ribonucleic acid) expression of the mouse *Abcb1a* gene increased in P388 D ( $p < 0.0001$ ) and decreased in P388 D/DH cells ( $p = 0.0003$ ), while the expression of *Abcb1b* was equally high in both treatment groups compared to P388 ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2c, Figure S1).



**Figure 2.** Effect of doxorubicin treatment and drug holiday on mouse P388 lymphoblastic leukemia cells. (a) Parental P388 cells were treated with 13 nM DOX. After 3 cycles of DOX treatment (42 days) P388 D cells showed a significant increase in P-glycoprotein activity (MAF 0.6 vs. MAF 0.04), which was significantly reduced after a 32-day-long drug holiday (MAF 0.47). Flow cytometry histograms show the results of the calcein assay of cells assayed in the presence (red) or absence (black) of the Pgp inhibitor verapamil. (b) Changes of doxorubicin sensitivity as a result of drug treatment and drug holiday. Sequential DOX treatments of P388 cells resulted in a 9.9-fold increase of doxorubicin tolerance (P388 D), which was significantly reduced following a drug holiday (P388 D/DH). Resistance of P388 D cells was abrogated in the presence of tariquidar (P388 D + TQ) (c) *Abcb1a* and *b* mRNA expression and DOX IC<sub>50</sub> values (red dots) of P388 parental cells (P388) after DOX treatment (D) and following drug holiday (D/DH). Statistical analysis was performed on mRNA samples, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Similar results were obtained with a canine B-cell lymphoma cell line: Parental CLBL-1 cells express low levels of Pgp (MAF =  $0.16 \pm 0.03$ ), which were significantly increased after 6 rounds of doxorubicin treatment (MAF =  $0.39 \pm 0.05$ ), resulting in the increased doxorubicin resistance of the cells. Again, culturing of the cells for 27 days without doxorubicin decreased the MAF value to  $0.3 (\pm 0.04)$  and increased the sensitivity of cells to doxorubicin ( $p = 0.0006$ ) (Figure 3a,b).

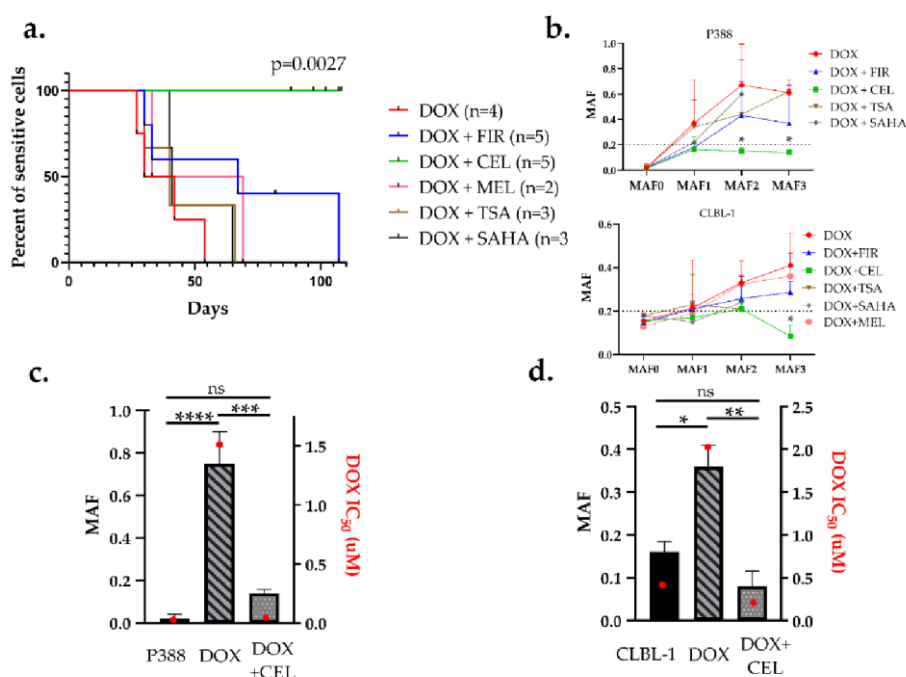


**Figure 3.** Effect of doxorubicin treatment and drug holiday on canine CLBL-1 B-cell lymphoma cells. (a) After 6 cycles of DOX treatment (74 days) parental CLBL-1 cells showed a significant increase in P-glycoprotein activity (MAF 0.42 vs. 0.22), which was significantly reduced after a 27-day-long drug holiday (MAF 0.26). Flow cytometry histograms show the results of the calcein assay of cells assayed with (blue) or without (red) the Pgp inhibitor verapamil. (b) Changes of doxorubicin sensitivity as a result of drug treatment and drug holiday. Sequential DOX treatments of CLBL-1 cells resulted in a 9.2-fold increase of doxorubicin tolerance, which was significantly reduced following the period of drug holiday. Resistance of CLBL-1 DOX cells was abrogated in the presence of tariquidar (D + TQ). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant.

### 2.3. Celecoxib Prevents the Development of Pgp-Mediated Drug Resistance In Vitro

As drug holidays are not routinely introduced in therapies, we next tested drug combinations to prevent or delay the emergence of acquired resistance. We chose three COX-2 inhibitors and two HDAC (histone deacetylase) inhibitors that are routinely used in the veterinary practice. Drug-naïve cells were treated in 9 consecutive cycles either with DOX alone, or DOX in combination with subtoxic doses ( $IC_{80}$ ) of SAHA (suberanilohydroxamic acid), trichostatin-A (TSA), celecoxib (CEL), firocoxib (FIR), or meloxicam (MEL). Concentrations for each drug were selected in separate cytotoxicity experiments as described in the Materials and Methods section (Figure S2). MAF was determined after every third treatment. The median time to reach MAF 0.2 (considered as the threshold of resistance), was 40, 41, 51, and 67 days for DOX + TSA ( $n = 3$ ), DOX + SAHA ( $n = 3$ ), DOX + MEL ( $n = 2$ ) and DOX + FIR ( $n = 5$ ), respectively (Figure 4a, Figure S3). Surprisingly, celecoxib completely prevented the expression of P-glycoprotein, as none of the DOX + CEL ( $n = 5$ ) treated cultures reached the threshold of MAF = 0.2 during the 100-day-long experimental period compared to DOX ( $p = 0.0027$ , with hazard ratio = 27.38 and 95% CI (confidence interval) of ratio = 3.161 to 237.2) (Figure 4a,b).

The remarkable effect of CEL on DOX-induced MDR was further confirmed by drug sensitivity tests performed on both cell lines after 9 cycles of treatment. In the case of P388 cells, DOX alone resulted in a 160-fold increase in DOX resistance ( $IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$  untreated vs.  $IC_{50} = 1.6 \mu\text{M}$  DOX treated) while addition of CEL prevented the emergence of doxorubicin resistance ( $IC_{50}$  remained  $0.03 \mu\text{M}$ ) even after 9 cycles of treatment for at least 100 days (Figure 4c). In CLBL-1 cells, the DOX + CEL treatment even resulted in a decrease of DOX sensitivity ( $IC_{50} = 0.44 \mu\text{M}$  untreated vs.  $IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$  DOX + CEL treated), whereas DOX-treated cells were 4.5-fold resistant ( $IC_{50} = 1.99 \mu\text{M}$ ) (Figure 4d).



**Figure 4.** Celecoxib prevented the emergence of Pgp-mediated drug resistance in both P388 and CLBL-1 cells. (a) Kaplan–Meier curves of cell cultures treated with the indicated combinations. Cells were considered resistant at  $MAF \geq 0.2$ . DOX (red) in combination with firocoxib (blue), celecoxib (green), meloxicam (pink), trichostatin-A (brown), and SAHA (black) were treated in 9 sequential treatment cycles. (b) Quantitative evaluation of multidrug resistance during the course of various treatments in P388 and CLBL-1 cells. MAF was measured after every third treatment cycle (MAF1–3). (c,d) Relation of MAF and drug sensitivity. MAF (patterned bars) and DOX  $IC_{50}$  values (red squares) of parental (sensitive), DOX-treated, and DOX + CEL-treated (c) P388 cells, and (d) CLBL-1 cells, measured after 9

sequential treatment cycles (at around day 100). Statistical analysis was performed on MAF values, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns: not significant.

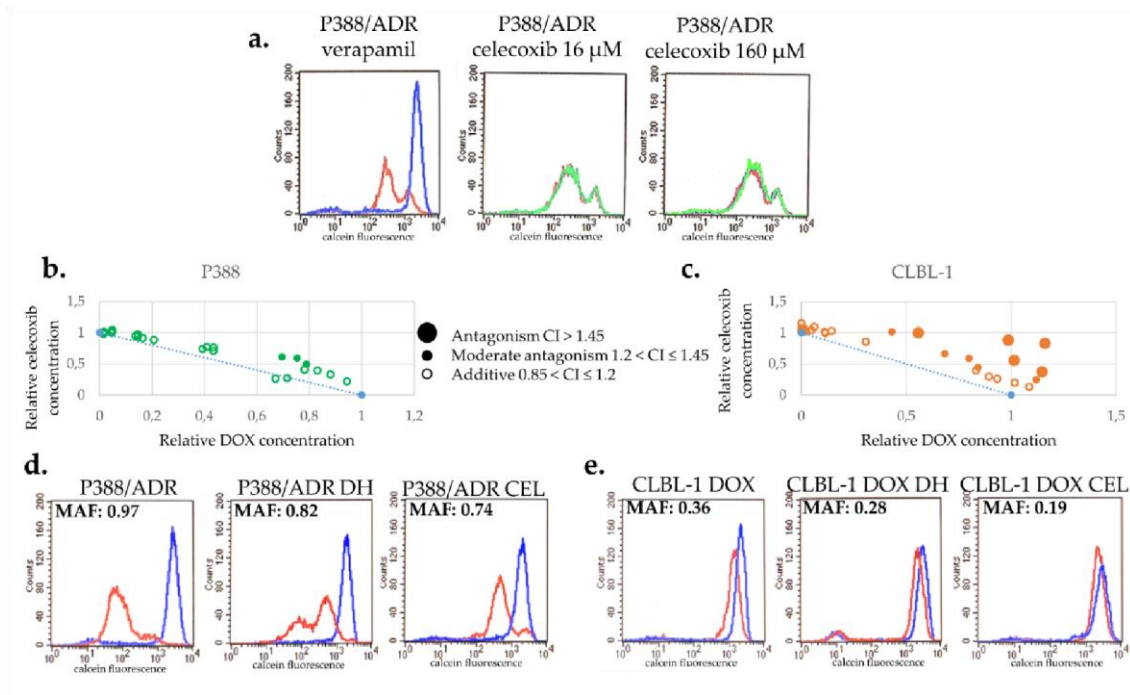
#### 2.4. Celecoxib Prevents the Emergence of Drug Resistance without Inhibiting Pgp or Contributing to the Toxicity of DOX

We tested the effect of CEL on the calcein accumulation of P388/ADR cells, which overexpress Pgp as a result of continuous drug selection [33]. While P388/ADR cells show low calcein fluorescence (red) due to the Pgp-mediated efflux of calcein AM, the Pgp inhibitor verapamil restores fluorescence by blocking dye efflux (blue). In contrast, CEL (up to 160  $\mu M$ ) had no effect on cellular fluorescence, indicating that it does not inhibit Pgp (Figure 5a).

Interestingly, combined treatment with DOX + CEL significantly delayed the repopulation of the flasks (8 and 22 days following treatment with DOX and DOX + CEL, respectively) (Figure S4). To rule out synergistic toxicity, the toxicity of the combined treatment was evaluated in short-term toxicity assays. Surprisingly, CEL and DOX proved to be antagonistic, rather than synergistic in both cell lines, suggesting that the ability of CEL to prevent DOX-induced MDR is not due to the increased toxicity of the combination treatment (Figure 5b,c).

To investigate the effect of CEL on Pgp expression, we cultured P388/ADR and CLBL-1 D cells in the absence or presence of CEL. Treatment with CEL decreased the MAF of both cell lines slightly more than the drug holiday (Figure 5d,e). In the case of P388/ADR cells, the MAF value changed from 0.90 ( $\pm 0.08$ ) to 0.73 ( $\pm 0.1$ ) during the 28 days of the drug holiday, whereas cells treated with CEL exhibited a MAF 0.65

( $\pm 0.1$ ) after a 28-day-long treatment (Figure 5d). Similar results were obtained with CLBL-1 D cells (MAF  $0.39 \pm 0.05$ ), exhibiting MAF = 0.30 ( $\pm 0.04$ ) following a drug holiday of 18 days, and MAF = 0.23 ( $\pm 0.04$ ) following an 18-day treatment with CEL (Figure 5e).



**Figure 5.** Celecoxib is not a Pgp inhibitor and does not increase the toxicity of DOX. (a) In contrast to verapamil (blue), a known Pgp inhibitor, 16–160  $\mu\text{M}$  CEL (green) does not inhibit the function of Pgp. (b,c) CEL does not show synergistic toxicity with DOX in P388 (b) or in CLBL-1 (c) cells. (d,e) Effect of CEL treatment on MDR in Pgp-expressing P388/ADR (d) and CLBL-1 D (e) cells. CEL treatment resulted in a more pronounced reduction of MAF in Pgp-expressing P388/ADR (d) and CLBL-1 D (e) cells than drug holiday (DH).

### 3. Discussion

Lymphoma is responsible for a significant fraction of cancer mortality in canine and human patients [1]. Novel strategies are urgently required to increase treatment efficacy in the human and veterinary clinical practice. Anthracycline-based chemotherapy protocols are initially successful, but tumor cells often become resistant [34]. Overexpression of P-glycoprotein results in multidrug resistance and an unfavorable response to therapy of canine lymphoma patients [17,35].

Several different drug resistance mechanisms were identified in cancer [36]. Malignant cells can metabolize drugs through the CYP (cytochrome P450) system [37], alter drug targets [38], increase DNA repair to overcome DNA-damaging toxic insults [39], modify apoptotic pathways to avoid cell death [40], undergo epithelial-to-mesenchymal transition [41], or use rapid epigenome modifications to reversibly adopt drug sensitive and resistant phenotypes [42]. Pgp can protect cancer cells by reducing the intracellular concentrations of drugs below a cell-killing threshold. Pgp recognizes a wide array of currently used chemotherapeutics, but the extent to which it contributes to clinical multidrug resistance has remained a matter of debate. Although the strategy of transporter inhibition could not be validated in clinical trials, mounting evidence continues to support the role of Pgp in clinical multidrug resistance in some settings [43]. Pgp contributes to therapy resistance in acute myeloid leukemia [44–46], ovarian and breast cancer [47,48], ependymoma [49], medulloblastoma [50], melanoma [51], and hepatocellular carcinoma [52]. Recently, we and others have shown that resistance to anthracycline-based chemotherapy is almost universally based on the overexpression of Pgp in a clinically relevant mouse model of hereditary breast cancer [53–57]. As a result of its broad substrate specificity, Pgp also extrudes

fluorescent dyes such as calcein AM [58,59]. Clinical studies have shown that the calcein assay can be used as a quantitative, standardized, and inexpensive screening test in a routine clinical laboratory setting to detect Pgp activity and to identify patients with unfavorable therapy responses [31].

Using a functional assay, we followed the emergence of Pgp-mediated resistance in two canine patients. As expected, we found that continuous chemotherapy induced drug resistance. Surprisingly, in patient 2, a pause in the therapy resulted in a reversible reduction of resistance along with the temporary re-sensitization of the tumor to the treatment (Figure 1). Several studies have reported similar findings in human cancer patients, showing the beneficial effect of drug holidays on treatment efficiency. Even after therapy failure, lung cancer patients were shown to respond to EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) treatment following a short period of drug holiday [60,61]. Similarly, melanoma patients who discontinue BRAF (B-Raf Proto-Oncogene)-directed therapy due to progression or other causes can benefit from retreatment at a later stage [62]. The possible benefit of treatment rechallenge with chemotherapy has also been described in canine patients [63]. In the veterinary practice, drug holidays are typically inserted to reduce the toxic side effects of chemotherapy. The striking effect of the short drug holiday observed in Patient 2 prompted us to set up an *in vitro* assay modelling the development of clinical drug resistance and the effect of drug holiday on drug sensitivity.

*In vitro* models of Pgp-mediated MDR have been typically established by the stepwise selection of cells in increasing concentrations of cytotoxic compounds [64,65]. Because of the lengthy selection procedure, MDR cells such as P388/ADR [33] express extremely high levels of P-glycoprotein, and thus do not provide a realistic model of clinical MDR. Here, we introduced a new approach for the study of acquired resistance, in which treatment with high concentrations of toxic chemotherapy is followed by recovery periods in drug-free medium. We found that repeated treatment cycles eventually led to multidrug resistant cells that express moderate, clinically relevant levels of Pgp [53,57] (Figures 2 and 3). Using this protocol, we investigated the development of Pgp-mediated drug resistance and the effects of drug holiday in a mouse lymphoblastic leukemia (P388) and a canine B-cell lymphoma (CLBL-1) cell line. In line with clinical observations, we observed a rapid and reversible induction of Pgp expression in both cells.

Following high-dose EGFR-inhibitor treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, a drug-tolerant “persister” population exhibiting reversible drug resistance can be consistently detected [42]. Significantly, inhibition of the KDMA5a histone demethylase results in the selective depletion of the persister subpopulation, leading to renewed sensitivity to EGFR inhibitors. Similarly, persisters originating from T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) rely on the chromatin modifier protein BRD4, consistent with the benefit of the BRD4 inhibitor JQ1 in primary human leukemias [25]. These findings establish the rationale for incorporating epigenetic modulators in combination therapies. To test the relevance of epigenetic regulatory mechanisms in the reversible induction of Pgp expression, we repeated our experiments in the presence of clinically used epigenetic inhibitors (SAHA, TSA). In contrast to our expectations, the inhibitors did not influence the emergence of acquired drug resistance (Figure 4a). Hematological malignancies are particularly sensitive to HDACis [66], but for our purposes the epigenetic inhibitors had to be administered at nontoxic concentrations (Figure S2), which may have resulted in suboptimal concentrations.

Another clinically feasible approach to interfere with the drug-induced overexpression of Pgp may rely on the inhibition of COX-2. Selective COX-2 inhibitors (i.e., celecoxib, firocoxib, or meloxicam) have pro-apoptotic and anti-proliferative effects in human and canine tumors [67–70]. Interestingly, Pgp was shown to mediate celecoxib-induced apoptosis by activating caspase-3 and increasing cytochrome c release from the mitochondria [71]. In addition, immunohistochemical analyses of human breast tumor specimens revealed a strong correlation between expression of COX-2 and Pgp [72]. Based on mounting evidence supporting the link between COX-2 and Pgp-mediated drug resistance [30], we tested a panel of clinically used COX-2 inhibitors in our assay.

Strikingly, addition of celecoxib completely prevented the development of MDR in both cell lines (Figure 4). Since celecoxib does not influence Pgp function (Figure 5a) or DOX toxicity (Figure 5b,c), its ability to prevent MDR is likely mediated by repressing the expression of Pgp. Although COX-2 is known to regulate Pgp expression via c-Jun phosphorylation [73] or PGE2 [74], lack of Pgp repression by firocoxib or meloxicam indicates that the effect of celecoxib is independent from the inhibition of COX-2. Inhibition of Pgp expression may be related to celecoxib's many off-target effects, such as inhibition of cancer-associated carbonic anhydrases [75], the master kinase PDK1 [76,77], or the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase [78]. Future work will be needed to demonstrate whether this promising effect can be exploited in the human and canine cancer clinic.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Drugs

Doxorubicin (DOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), celecoxib (CEL, Sigma-Aldrich), trichostatin-A (TSA, Tocris Bioscience, Bristol, UK), SAHA (Tocris Bioscience), and firocoxib (FIR, Sigma-Aldrich) were purchased from the manufacturers. Meloxicam (MEL, Ceva, Libourne, France) was a kind gift from Ceva Animal Health, LLC.

##### 4.2. Cell Lines

The mouse leukemic P388 and its doxorubicin-selected subline P388/ADR were obtained from the National Cancer Institute's Developmental Therapeutics Program (National Institutes of Health). The canine B-cell lymphoma CLBL-1 cell line was a kind gift from Dr. Barbara Rütgen (University of Veterinary Medicine, Vienna) [3]. P388/ADR cells were maintained in 500 nmol/L doxorubicin (Adriamycin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to ensure Pgp expression. Cells were cultured in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) media (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 mmol/L glutamine, and 50 units/mL penicillin and streptomycin (Life Technologies). All cell lines were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

##### 4.3. In Vitro Cell Viability Assay

To test the cytotoxicity of mono and combined treatments, cells were seeded into 96- or 384-well tissue culture plates at 2500 (P388) or 100,000 (CLBL-1) cells/well density in 100 µL or 20 µL medium, respectively. Drug combinations were added to the plates by a Hamilton StarLet liquid handling workstation. The plates were incubated for 120 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

IC<sub>50</sub> and growth inhibition (GI) values were assessed by the PrestoBlue<sup>®</sup> assay (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 96 or 384-well plates, treated in the given concentration range with the indicated compounds. Viability of the cells was measured spectrophotometrically using an EnSpire microplate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Data were normalized to untreated cells; curves were fitted by the Graph Pad Prism 8 software using the sigmoidal dose–response model. Curve fit statistics were used to determine the selected IC values. In the case of the drug combinations, GI<sub>50</sub> values of 'compound 1' with the fixed concentrations of 'compound 2' (and vice versa) were paired, and plotted on an equipotent graph as GI<sub>50</sub> isoboles. For each data point of the isobole, significance was calculated as the combination index (CI) [79]. Drug combinations were considered to indicate synergism (CI ≤ 0.7), moderate synergism (0.7 < CI ≤ 0.85), additive (0.85 < CI ≤ 1.2), moderate antagonism (1.2 < CI ≤ 1.45), and antagonism was defined as CI > 1.45, respectively.

##### 4.4. In Vitro Model System to Study the Development of Drug Resistance

For every drug (except for doxorubicin and firocoxib), IC<sub>80</sub> values (drug concentration which kills approximately 20% of the cells) were determined for both cell lines using cytotoxicity assays. In the case

of doxorubicin, the concentration killing 90% of the cells ( $IC_{10}$ ) was used. Firocoxib, which was not toxic even at 1000  $\mu$ M, was used at the concentration corresponding to the  $IC_{80}$  concentration of celecoxib. P388 cells ( $10^6$ ) were treated with 13 nM doxorubicin (DOX) for 120 h in T75 suspension flasks (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). When used in combination, DOX was complemented with celecoxib (16  $\mu$ M), firocoxib (16  $\mu$ M), trichostatin-A (30 nM), or SAHA (0.4  $\mu$ M). Following incubation with the drugs, surviving cells were cultured further in drug-free medium. The medium was changed every 5 days until the surviving cells reached the initial density of  $10^6/18$  mL (termed as “repopulation”). Treatments were repeated multiple times; the emergence of P-glycoprotein-mediated drug-resistance was followed by the calcein assay [80]; chemosensitivity of the cells was characterized by cytotoxicity assays.

In case of CLBL-1 cells, the initial cell number was  $10^7$ , and the treatment lasted for 120 h. The following concentrations were used for each drug: DOX (0.3 nM), trichostatin-A (50 nM), SAHA (0.7  $\mu$ M), celecoxib (26  $\mu$ M), firocoxib (26  $\mu$ M), and meloxicam (20  $\mu$ M).

#### 4.5. Immunophenotyping of CLBL-1 Cells

The following antibodies (AbD Serotec, Kidlington, UK) were used to determine the immunophenotype of the canine lymphomas by flow cytometry: CD3 FITC (clone CA17.2A12), CD5 FITC (clone YKIX322.3), CD11/18 FITC (clone YKIX490), MHC II FITC (clone YKIX334.2), CD14 PE (clone, TÜK4), CD21 PE (clone CA2.1D6), CD34 PE (clone 1H6), and CD45 APC (clone YKIX716.13). The same panel was used to verify the immunophenotype of the CLBL-1 cells (Table S3).

#### 4.6. Determination of MDR Activity Factor (MAF) with the Calcein Assay

The 250,000 cells were incubated with 0.25 mmol/L calcein AM (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA) in medium with or without 10 mmol/L verapamil for 10 min at 37 °C. Cells were washed with ice-cold PBS, and calcein accumulation was measured with a FACScan or FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Dead cells were excluded based on 7-AAD (7-aminoactinomycin D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) permeability.

For the clinical cases, lymphoid cells were collected during surgical biopsy under general anesthesia or by fine-needle aspiration. Lymph node samples were immersed into dissociation medium containing Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), 200 U/mL collagenase type II, and 0.6 U/mL dispase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After a 30-minute-long incubation at 37 °C, cells were separated by a 40- $\mu$ M cell strainer. Isolated cells were centrifuged at 300 g. Cells were selected based on size and granularity; viable cells were gated based on 7-AAD exclusion. The 10,000 7-AAD negative cells were analyzed. The activity of Pgp was expressed as a dimensionless value using the mean fluorescence intensity measured in the presence and absence of verapamil (mean fluorescence inhibited (MFI) and noninhibited (MFNI), respectively). The MAF was determined using the following formula:  $MAF = (MFI - MFNI)/MFI$  [31,80].

#### 4.7. RNA Isolation and RT-PCR

P388 cells were homogenized in TRIzol™ Reagent (Life Technologies). Total RNA was isolated using Direct-zol® MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. To prevent DNA contamination, in-column DNase I treatment was used. Then, 300-ng total RNA was reverse transcribed to cDNA using the Promega Reverse Transcription System Kit. Abcb1a, Abcb1b, and Actin  $\beta$  (Act $\beta$ ) mRNA levels were quantified by TaqMan® assays (ThermoFisher), using the StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies). The mRNA fold changes were determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.



#### 4.8. Canine B-Cell Lymphoma Case Studies

Two canine patients diagnosed with B-cell lymphoma at the Veterinary Hematology and Oncology Clinic (Budapest) were treated according to the modified CHOP protocol consisting of doxorubicin (Adriamycin injection, Pharmacia & Upjohn S.p.A. Co., Milan, Italy) 30 mg/m<sup>2</sup>: week 2, 11, 20; vincristi (Vincristine liquid injection, Gedeon Richter Co., Budapest, Hungary) 0.75 mg/m<sup>2</sup>: week 1, 3–10, and 12–19; cyclophosphamide (Endoxan injection, Baxter Co., Deerfield, IL, USA) 250 mg/m<sup>2</sup>: week 5, 8, 14, 17; prednisolone (Prednisolone tablet, Gedeon Richter Co., Budapest, Hungary): 2 mg/kg BW (body weight) week 1, perorally (po) daily, once a day (SID), 1.5 mg/kg BW week 2 po daily, SID, 1 mg/kg BW week 3 po daily, SID, 0.5 mg/kg BW week 4, po daily, SID [81].

Case 1: German shepherd, male, 3.5 years old. Large cell immunoblastic lymphoma was diagnosed in stage V (substage b). Case 2: Cocker spaniel, female, 6.5 years old. Diffuse large B-cell lymphoma was diagnosed in stage IV (substage a). All dogs were staged and substaged according to the scheme established by the World Health Organization (WHO) [82].

Initial diagnosis was made by chest X-ray, abdominal ultrasonography, complete blood count, and routine plasma clinical chemistry analyses together with right prescapular lymph node excision and bone marrow aspiration cytology based on the informed consent of the owner (Supplementary Materials 1 and Methods 1). Histopathology and immunophenotyping of the tumor cells were determined by FACS analysis of the excised lymph node. At the time of diagnosis, during treatment, and at the end of chemotherapy, Pgp-mediated drug resistance was monitored by the calcein assay and the immunophenotype of tumor cells was characterized by flow cytometry.

#### 4.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). One-way or two-way ANOVA followed by Tukey's multiple test was used for comparisons between treatment groups and MAF values for each cell line. The difference between Kaplan–Meier survival curves was determined by log-rank test. The  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

### 5. Conclusions

In conclusion, this work demonstrates that celecoxib effectively blocks the emergence of multidrug resistance by preventing the doxorubicin-induced upregulation of P-glycoprotein. We demonstrated that doxorubicin treatment induces MDR in lymphoma cell lines, while addition of celecoxib inhibits the development of resistance. Since celecoxib is not a Pgp inhibitor and the combination of the two drugs did not increase toxicity, we conclude that celecoxib prevents the emergence of MDR by interfering with Pgp expression. Our results show that the drug holiday effect can be mimicked in vitro with a clinically used COX-2 inhibitor, offering a novel strategy to prolong response to therapy and to delay or prevent the development of drug resistance. Based on these results a randomized double-blind controlled study was initiated in the Veterinary Hematology and Oncology Clinic in Hungary.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/5/1117/s1>. Table S1: Immunohistochemical findings of the two patients, Table S2: Detailed description of the used treatment protocols, Table S3: Cell surface markers used for immunophenotyping CLBL-1 cells, Figure S1: The mRNA expression of P388 cells after DOX treatment and following a drug holiday including data obtained from P388/ADR cells (doxorubicin selected subline of P388), Figure S2: Cytotoxicity curves of P388 (a) and CLBL-1 (b) cells showing drug sensitivity to doxorubicin (DOX), SAHA, trichostatin A (TSA), celecoxib (CEL), and firocoxib (FIR) for both cell lines. Meloxicam (MEL) was tested only on CLBL-1 cells (b), Figure S3: Kaplan–Meier curves of cell cultures including actual MAF values, Figure S4: Kaplan–Meier curves of cell cultures including days of repopulation time, Supplementary materials 1: Cytology reports, Supplementary methods 1: Method of cytology sampling.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.K., G.S., and A.F.; methodology, E.K., K.S., and A.F.; validation, E.K., K.S., P.V., G.S., and A.F.; investigation, E.K., S.F., E.S., V.D., T.W., P.V., and A.F.; resources, P.V., G.S., and A.F.; writing—

original draft preparation, E.K. and A.F.; writing—review and editing, E.K., K.S., P.V., G.S., and A.F.; visualization, E.K., T.W., and A.F.; supervision, G.S., A.F., and P.V.; project administration, E.K. and A.F.; funding acquisition, G.S. and A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Research, Development, and Innovation Office of Hungary (2019-1.3.1-KK-2019-00007 to G.S. and A.F.) and a Momentum Grant from the Hungarian Academy of Sciences (G.S.).

**Acknowledgments:** We thank Judit Sessler, Szilárd Tóth, and the owners of the two canine patients. The in vitro drug combination test system was developed by Szilárd Tóth. Dose–response curve fitting and calculation of IC<sub>50</sub> values were performed by a custom program written by Judit Sessler in C#.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Stephen, W.; Vail, D.; Page, R. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology—5th Edition*. Available online: <https://www.elsevier.com/books/withrow-and-macewens-small-animal-clinical-oncology/9781437723625> (accessed on 10 December 2018).
2. Fournel-Fleury, C.; Magnol, J.P.; Bricaire, P.; Marchal, T.; Chabanne, L.; Delverdier, A.; Bryon, P.A.; Felman, P. Cytohistological and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphomas. *J. Comp. Pathol.* **1997**, *117*, 35–59. [[CrossRef](#)]
3. Rütgen, B.C.; Hammer, S.E.; Gerner, W.; Christian, M.; de Arespacochaga, A.G.; Willmann, M.; Kleiter, M.; Schwendenwein, I.; Saalmüller, A. Establishment and Characterization of a Novel Canine B-Cell Line Derived from a Spontaneously Occurring Diffuse Large Cell Lymphoma. *Leuk. Res.* **2010**, *34*, 932–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Teske, E. Canine Malignant Lymphoma: A Review and Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphoma. *Vet. Q.* **1994**, *16*, 209–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Marconato, L.; Gelain, M.E.; Comazzi, S. The Dog as a Possible Animal Model for Human Non-Hodgkin Lymphoma: A Review. *Hematol. Oncol.* **2013**, *31*, 1–9. [[CrossRef](#)]
6. Dias, J.N.R.; Aguiar, S.I.; Pereira, D.M.; André, A.S.; Gano, L.; Correia, J.D.G.; Carrapiço, B.; Rütgen, B.; Malhó, R.; Peleteiro, C.; et al. The Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Is a Potent Antitumor Agent in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28586–28598. [[CrossRef](#)]
7. Kong, Y.; Barisone, G.A.; Sidhu, R.S.; O'Donnell, R.T.; Tuscano, J.M. Efficacy of Combined Histone Deacetylase and Checkpoint Kinase Inhibition in a Preclinical Model of Human Burkitt Lymphoma. *Mol. Med.* **2015**, *21*, 824–832. [[CrossRef](#)]
8. Zandvliet, M.M.J.M. Drug Resistance in Canine Multicentric Lymphoma. Available online: <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/313141> (accessed on 10 December 2018).
9. Gottesman, M.M.; Fojo, T.; Bates, S.E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58. [[CrossRef](#)]
10. Mealey, K.L.; Barhoumi, R.; Rogers, K.; Kochevar, D.T. Doxorubicin Induced Expression of P-Glycoprotein in a Canine Osteosarcoma Cell Line. *Cancer Lett.* **1998**, *126*, 187–192. [[CrossRef](#)]
11. Mealey, K.L.; Fidel, J. P-Glycoprotein Mediated Drug Interactions in Animals and Humans with Cancer. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 1–6. [[CrossRef](#)]
12. Vajdovich, P.; Koltai, Z.; Dékay, V.; Kungl, K.; Harnos, A. Evaluation of Pgp (MDR1) Immunohistochemistry in Canine Lymphoma—Prognostic and Clinical Aspects. *Acta Vet. Hung.* **2018**, *66*, 309–328. [[CrossRef](#)]
13. Pawłowski, K.M.; Mucha, J.; Majchrzak, K.; Motyl, T.; Król, M. Expression and Role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in Multidrug Resistance of Canine Mammary Cancer Cells. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Teng, S.-P.; Hsu, W.-L.; Chiu, C.-Y.; Wong, M.-L.; Chang, S.-C. Overexpression of P-Glycoprotein, STAT3, Phospho-STAT3 and KIT in Spontaneous Canine Cutaneous Mast Cell Tumours before and after Prednisolone Treatment. *Vet. J.* **2012**, *193*, 551–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Kim, N.-H.; Hwang, Y.-H.; Im, K.-S.; Kim, J.-H.; Chon, S.-K.; Kim, H.-Y.; Sur, J.-H. P-Glycoprotein Expression in Canine Mammary Gland Tumours Related with Myoepithelial Cells. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 1346–1352. [CrossRef]
16. Hifumi, T.; Miyoshi, N.; Kawaguchi, H.; Nomura, K.; Yasuda, N. Immunohistochemical Detection of Proteins Associated with Multidrug Resistance to Anti-Cancer Drugs in Canine and Feline Primary Pulmonary Carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 665–668. [CrossRef] [PubMed]
17. Lee, J.J.; Hughes, C.S.; Fine, R.L.; Page, R.L. P-Glycoprotein Expression in Canine Lymphoma: A Relevant, Intermediate Model of Multidrug Resistance. *Cancer* **1996**, *77*, 1892–1898. [CrossRef]
18. Sokołowska, J.; Urban´ska, K.; Gizin´ski, S.; Zabiłska, K.; Lechowski, R. Immunohistochemical Detection of P-Glycoprotein in Various Subtypes of Canine Lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.* **2015**, *18*, 123–130. [CrossRef]
19. Dékay, V.; Karai, E.; Szakács, G.; Füredi, A.; Szébényi, K.; Vajdovich, P. Calcein Assay for Multidrug Resistance Predicts Therapy Response and Survival Rate in Canine Lymphoma Patients. **2020**. in Preparation.
20. Lee, J.S.; Paull, K.; Alvarez, M.; Hose, C.; Monks, A.; Grever, M.; Fojo, A.T.; Bates, S.E. Rhodamine Efflux Patterns Predict P-Glycoprotein Substrates in the National Cancer Institute Drug Screen. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46*, 627–638.
21. Legrand, O.; Simonin, G.; Perrot, J.Y.; Zittoun, R.; Marie, J.P. Pgp and MRP Activities Using Calcein-AM Are Prognostic Factors in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients. *Blood* **1998**, *91*, 4480–4488. [CrossRef]
22. Dhawan, A.; Nichol, D.; Kinose, F.; Abazeed, M.E.; Marusyk, A.; Haura, E.B.; Scott, J.G. Collateral Sensitivity Networks Reveal Evolutionary Instability and Novel Treatment Strategies in ALK Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1232. [CrossRef]
23. Becker, A.; Crombag, L.; Heideman, D.A.M.; Thunnissen, F.B.; van Wijk, A.W.; Postmus, P.E.; Smit, E.F. Retreatment with Erlotinib: Regain of TKI Sensitivity Following a Drug Holiday for Patients with NSCLC Who Initially Responded to EGFR-TKI Treatment. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 2603–2606. [CrossRef] [PubMed]
24. Pisco, A.O.; Brock, A.; Zhou, J.; Moor, A.; Mojtahedi, M.; Jackson, D.; Huang, S. Non-Darwinian Dynamics in Therapy-Induced Cancer Drug Resistance. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2467. [CrossRef] [PubMed]
25. Knoechel, B.; Roderick, J.E.; Williamson, K.E.; Zhu, J.; Lohr, J.G.; Cotton, M.J.; Gillespie, S.M.; Fernandez, D.; Ku, M.; Wang, H.; et al. An Epigenetic Mechanism of Resistance to Targeted Therapy in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 364–370. [CrossRef] [PubMed]
26. Moyal, L.; Feldbaum, N.; Goldfeiz, N.; Rephaeli, A.; Nudelman, A.; Weitman, M.; Tarasenko, N.; Gorovitz, B.; Maron, L.; Yehezkel, S.; et al. The Therapeutic Potential of AN-7, a Novel Histone Deacetylase Inhibitor, for Treatment of Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome Alone or with Doxorubicin. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146115. [CrossRef] [PubMed]
27. Chun, P. Histone Deacetylase Inhibitors in Hematological Malignancies and Solid Tumors. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38*, 933–949. [CrossRef] [PubMed]
28. Xu, W.S.; Parmigiani, R.B.; Marks, P.A. Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action. *Oncogene* **2007**, *26*, 5541–5552. [CrossRef]
29. Mackmull, M.-T.; Iskar, M.; Parca, L.; Singer, S.; Bork, P.; Ori, A.; Beck, M. Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) Cause the Selective Depletion of Bromodomain Containing Proteins (BCPs). *Mol. Cell. Proteom.* **2015**, *14*, 1350–1360. [CrossRef]
30. Vimal, A.P.; Dunn, M.J.; Sorokin, A. Regulation of MDR-1 (P-Glycoprotein) by Cyclooxygenase-2.—PubMed—NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138126> (accessed on 18 November 2019).
31. Karászi, E.; Jakab, K.; Homolya, L.; Szakács, G.; Holló, Z.; Telek, B.; Kiss, A.; Rejtő, L.; Nahajevszky, S.; Sarkadi, B.; et al. Calcein Assay for Multidrug Resistance Reliably Predicts Therapy Response and Survival Rate in Acute Myeloid Leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2001**, *112*, 308–314. [CrossRef]
32. Lebedeva, I.V.; Pande, P.; Patton, W.F. Sensitive and Specific Fluorescent Probes for Functional Analysis of the Three Major Types of Mammalian ABC Transporters. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22429. [CrossRef]
33. Schabel, F.M.; Skipper, H.E.; Trader, M.W.; Laster, W.R.; Griswold, D.P.; Corbett, T.H. Establishment of Cross-Resistance Profiles for New Agents. *Cancer Treat. Rep.* **1983**, *67*, 905–922.

34. Zandvliet, M.; Teske, E.; Schrickx, J.A. Multi-Drug Resistance in a Canine Lymphoid Cell Line Due to Increased P-Glycoprotein Expression, a Potential Model for Drug-Resistant Canine Lymphoma. *Toxicol. Vitro* **2014**, *28*, 1498–1506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moore, A.S.; Leveille, C.R.; Reimann, K.A.; Shu, H.; Arias, I.M. The Expression of P-Glycoprotein in Canine Lymphoma and Its Association with Multidrug Resistance. *Cancer Investig.* **1995**, *13*, 475–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)* **2014**, *6*, 1769–1792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rodriguez-Antona, C.; Ingelman-Sundberg, M. Cytochrome P450 Pharmacogenetics and Cancer. *Oncogene* **2006**, *25*, 1679–1691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kobayashi, S.; Boggon, T.J.; Dayaram, T.; Jänne, P.A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B.E.; Eck, M.J.; Tenen, D.G.; Halmos, B. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 786–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Olausson, K.A.; Dunant, A.; Fouret, P.; Brambilla, E.; André, F.; Haddad, V.; Taranchon, E.; Filipits, M.; Pirker, R.; Popper, H.H.; et al. DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 983–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Reed, J.C. Bcl-2: Prevention of Apoptosis as a Mechanism of Drug Resistance. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **1995**, *9*, 451–473. [[CrossRef](#)]
41. Singh, A.; Settleman, J. EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 4741–4751. [[CrossRef](#)]
42. Sharma, S.V.; Lee, D.Y.; Li, B.; Quinlan, M.P.; Takahashi, F.; Maheswaran, S.; McDermott, U.; Azizian, N.; Zou, L.; Fischbach, M.A.; et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* **2010**, *141*, 69–80. [[CrossRef](#)]
43. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 452–464. [[CrossRef](#)]
44. Pirker, R.; Wallner, J.; Götzl, M.; Gsur, A.; Geissler, K.; Havelec, L.; Knapp, W.; Haas, O.; Linkesch, W.; Lechner, K. MDR1 RNA Expression Is an Independent Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **1992**, *80*, 557–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Doxani, C.; Voulgarelis, M.; Zintzaras, E. MDR1 mRNA Expression and MDR1 Gene Variants as Predictors of Response to Chemotherapy in Patients with Acute Myeloid Leukaemia: A Meta-Analysis. *Biomarkers* **2013**, *18*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Campos, L.; Guyotat, D.; Archimbaud, E.; Calmard-Oriol, P.; Tsuruo, T.; Troncy, J.; Treille, D.; Fiere, D. Clinical Significance of Multidrug Resistance P-Glycoprotein Expression on Acute Nonlymphoblastic Leukemia Cells at Diagnosis. *Blood* **1992**, *79*, 473–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gillet, J.-P.; Wang, J.; Calcagno, A.M.; Green, L.J.; Varma, S.; Elstrand, M.B.; Trope, C.G.; Ambudkar, S.V.; Davidson, B.; Gottesman, M.M. Clinical Relevance of Multidrug Resistance Gene Expression in Ovarian Serous Carcinoma Effusions. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2080–2088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Christie, E.L.; Pattnaik, S.; Beach, J.; Copeland, A.; Rashoo, N.; Fereday, S.; Hendley, J.; Alsop, K.; Brady, S.L.; Lamb, G.; et al. Multiple ABCB1 Transcriptional Fusions in Drug Resistant High-Grade Serous Ovarian and Breast Cancer. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Coyle, B.; Kessler, M.; Sabnis, D.H.; Kerr, I.D. ABCB1 in Children’s Brain Tumours. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 1018–1022. [[CrossRef](#)]
50. Othman, R.T.; Kimishi, I.; Bradshaw, T.D.; Storer, L.C.D.; Korshunov, A.; Pfister, S.M.; Grundy, R.G.; Kerr, I.D.; Coyle, B. Overcoming Multiple Drug Resistance Mechanisms in Medulloblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*, 57. [[CrossRef](#)]
51. Luo, Y.; Ellis, L.Z.; Dallaglio, K.; Takeda, M.; Robinson, W.A.; Robinson, S.E.; Liu, W.; Lewis, K.D.; McCarter, M.D.; Gonzalez, R.; et al. Side Population Cells from Human Melanoma Tumors Reveal Diverse Mechanisms for Chemoresistance. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132*, 2440–2450. [[CrossRef](#)]

52. Effendi, K.; Mori, T.; Komuta, M.; Masugi, Y.; Du, W.; Sakamoto, M. Bmi-1 Gene Is Upregulated in Early-Stage Hepatocellular Carcinoma and Correlates with ATP-Binding Cassette Transporter B1 Expression. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 666–672. [[CrossRef](#)]
53. Rottenberg, S.; Nygren, A.O.H.; Pajic, M.; van Leeuwen, F.W.B.; van der Heijden, I.; van de Wetering, K.; Liu, X.; de Visser, K.E.; Gilhuijs, K.G.; van Tellingen, O.; et al. Selective Induction of Chemotherapy Resistance of Mammary Tumors in a Conditional Mouse Model for Hereditary Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12117–12122. [[CrossRef](#)]
54. Pajic, M.; Iyer, J.K.; Kersbergen, A.; van der Burg, E.; Nygren, A.O.H.; Jonkers, J.; Borst, P.; Rottenberg, S. Moderate Increase in Mdr1a/1b Expression Causes in Vivo Resistance to Doxorubicin in a Mouse Model for Hereditary Breast Cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6396–6404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rottenberg, S.; Vollebergh, M.A.; de Hoon, B.; de Ronde, J.; Schouten, P.C.; Kersbergen, A.; Zander, S.A.L.; Pajic, M.; Jaspers, J.E.; Jonkers, M.; et al. Impact of Intertumoral Heterogeneity on Predicting Chemotherapy Response of BRCA1-Deficient Mammary Tumors. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2350–2361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Füredi, A.; Tóth, S.; Szebényi, K.; Pape, V.F.S.; Türk, D.; Kucsma, N.; Cervenak, L.; Tóvári, J.; Szakács, G. Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 45–56. [[CrossRef](#)]
57. Füredi, A.; Szebényi, K.; Tóth, S.; Cserepes, M.; Hámori, L.; Nagy, V.; Karai, E.; Vajdovich, P.; Imre, T.; Szabó, P.; et al. Pegylated Liposomal Formulation of Doxorubicin Overcomes Drug Resistance in a Genetically Engineered Mouse Model of Breast Cancer. *J. Control. Release* **2017**, *261*, 287–296. [[CrossRef](#)]
58. Homolya, L.; Holló, Z.; Germann, U.A.; Pastan, I.; Gottesman, M.M.; Sarkadi, B. Fluorescent Cellular Indicators Are Extruded by the Multidrug Resistance Protein. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21493–21496.
59. Homolya, L.; Holló, M.; Müller, M.; Mechetner, E.B.; Sarkadi, B. A New Method for a Quantitative Assessment of P-Glycoprotein-Related Multidrug Resistance in Tumor Cells. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 849–855. [[CrossRef](#)]
60. Kurata, T.; Tamura, K.; Kaneda, H.; Nogami, T.; Uejima, H.; Go, G.O.A.; Nakagawa, K.; Fukuoka, M. Effect of Retreatment with Gefitinib (“Iressa”, ZD1839) after Acquisition of Resistance. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 173–174. [[CrossRef](#)]
61. Yano, S.; Nakataki, E.; Ohtsuka, S.; Inayama, M.; Tomimoto, H.; Edakuni, N.; Kakiuchi, S.; Nishikubo, N.; Muguruma, H.; Sone, S. Retreatment of Lung Adenocarcinoma Patients with Gefitinib Who Had Experienced Favorable Results from Their Initial Treatment with This Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor: A Report of Three Cases. *Oncol. Res.* **2005**, *15*, 107–111. [[CrossRef](#)]
62. Valpione, S.; Carlino, M.S.; Mangana, J.; Mooradian, M.J.; McArthur, G.; Schadendorf, D.; Hauschild, A.; Menzies, A.M.; Arance, A.; Ascierto, P.A.; et al. Rechallenge with BRAF-Directed Treatment in Metastatic Melanoma: A Multi-Institutional Retrospective Study. *Eur. J. Cancer* **2018**, *91*, 116–124. [[CrossRef](#)]
63. Cara, S.; Tannock, I.F. Retreatment of Patients with the Same Chemotherapy: Implications for Clinical Mechanisms of Drug Resistance. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 23–27. [[CrossRef](#)]
64. Harker, W.G.; Sikić, B.I. Multidrug (Pleiotropic) Resistance in Doxorubicin-Selected Variants of the Human Sarcoma Cell Line MES-SA. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4091–4096. [[PubMed](#)]
65. Shen, D.W.; Cardarelli, C.; Hwang, J.; Cornwell, M.; Richert, N.; Ishii, S.; Pastan, I.; Gottesman, M.M. Multiple Drug-Resistant Human KB Carcinoma Cells Independently Selected for High-Level Resistance to Colchicine, Adriamycin, or Vinblastine Show Changes in Expression of Specific Proteins. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7762–7770. [[PubMed](#)]
66. Ageberg, M.; Rydström, K.; Relander, T.; Drott, K. The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Sensitizes Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell Lines to CHOP-Induced Cell Death. *Am. J. Transl. Res.* **2013**, *5*, 170–183. [[PubMed](#)]
67. Pang, L.Y.; Argyle, S.A.; Kamida, A.; Morrison, K.O.; Argyle, D.J. The Long-Acting COX-2 Inhibitor Mavacoxil (Trocoxil™) Has Anti-Proliferative and pro-Apoptotic Effects on Canine Cancer Cell Lines and Cancer Stem Cells in Vitro. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*, 184. [[CrossRef](#)]
68. Knottenbelt, C.; Chambers, G.; Gault, E.; Argyle, D.J. The in Vitro Effects of Piroxicam and Meloxicam on Canine Cell Lines. *J. Small Anim. Pract.* **2006**, *47*, 14–20. [[CrossRef](#)]

69. Murakami, A.; Shibahashi, A.; Iwasaki, R.; Kawabe, M.; Murakami, M.; Sakai, H.; Mori, T. Combination Chlorambucil/Firocoxib or Chlorambucil/Prednisolone Treatment for Inflammatory Colorectal Polyps in Miniature Dachshunds. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2018**, *54*, 161–166. [[CrossRef](#)]
70. Tamura, D.; Saito, T.; Murata, K.; Kawashima, M.; Asano, R. Celecoxib Exerts Antitumor Effects in Canine Mammary Tumor Cells via COX-2-independent Mechanisms. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1393–1404. [[CrossRef](#)]
71. Fantappiè, O.; Solazzo, M.; Lasagna, N.; Platini, F.; Tessitore, L.; Mazzanti, R. P-Glycoprotein Mediates Celecoxib-Induced Apoptosis in Multiple Drug-Resistant Cell Lines. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4915–4923. [[CrossRef](#)]
72. Ratnasinghe, D.; Daschner, P.J.; Anver, M.R.; Kasprzak, B.H.; Taylor, P.R.; Yeh, G.C.; Tangrea, J.A. Cyclooxygenase-2, P-Glycoprotein-170 and Drug Resistance; Is Chemoprevention against Multidrug Resistance Possible? *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2141–2147.
73. Sui, H.; Zhou, S.; Wang, Y.; Liu, X.; Zhou, L.; Yin, P.; Fan, Z.; Li, Q. COX-2 Contributes to P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance via Phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in Colorectal Cancer. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 667–675. [[CrossRef](#)]
74. Roy, K.R.; Reddy, G.V.; Maitreyi, L.; Agarwal, S.; Achari, C.; Vali, S.; Reddanna, P. Celecoxib Inhibits MDR1 Expression through COX-2-Dependent Mechanism in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65*, 903–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Knudsen, J.F.; Carlsson, U.; Hammarström, P.; Sokol, G.H.; Cantilena, L.R. The Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Is a Potent Inhibitor of Human Carbonic Anhydrase II. *Inflammation* **2004**, *28*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Arico, S.; Patingre, S.; Bauvy, C.; Gane, P.; Barbat, A.; Codogno, P.; Ogier-Denis, E. Celecoxib Induces Apoptosis by Inhibiting 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 Activity in the Human Colon Cancer HT-29 Cell Line. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27613–27621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kulp, S.K.; Yang, Y.-T.; Hung, C.-C.; Chen, K.-F.; Lai, J.-P.; Tseng, P.-H.; Fowble, J.W.; Ward, P.J.; Chen, C.-S. 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1/Akt Signaling Represents a Major Cyclooxygenase-2-Independent Target for Celecoxib in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1444–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Johnson, A.J.; Hsu, A.-L.; Lin, H.-P.; Song, X.; Chen, C.-S. The Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Perturbs Intracellular Calcium by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases: A Plausible Link with Its Anti-Tumor Effect and Cardiovascular Risks. *Biochem. J.* **2002**, *366 Pt 3*, 831–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681. [[CrossRef](#)]
80. Holló, Z.; Homolya, L.; Davis, C.W.; Sarkadi, B. Calcein Accumulation as a Fluorometric Functional Assay of the Multidrug Transporter. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1994**, *1191*, 384–388. [[CrossRef](#)]
81. Stone, M.S.; Cotter, S.M.; Goldstein, M.A. Comparison of Two Protocols for Induction of Remission in Dogs with Lymphoma. *J. Am. Anim. Hosp.* **1991**, *27*, 315–321.
82. Valli, V.E.; Kass, P.H.; Myint, M.S.; Scott, F. Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment with Survival. *Vet. Pathol.* **2013**, *50*, 738–748. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).