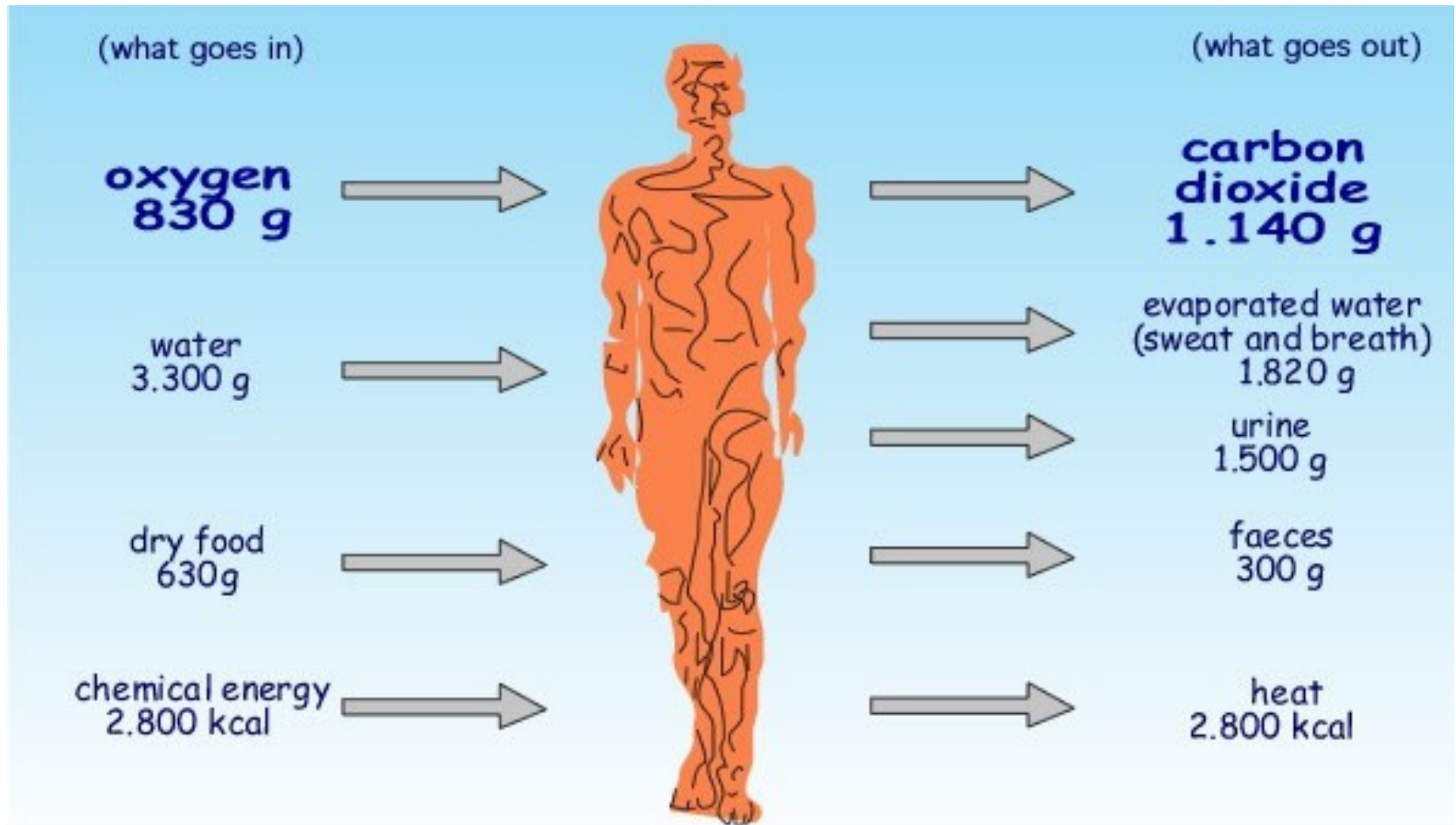


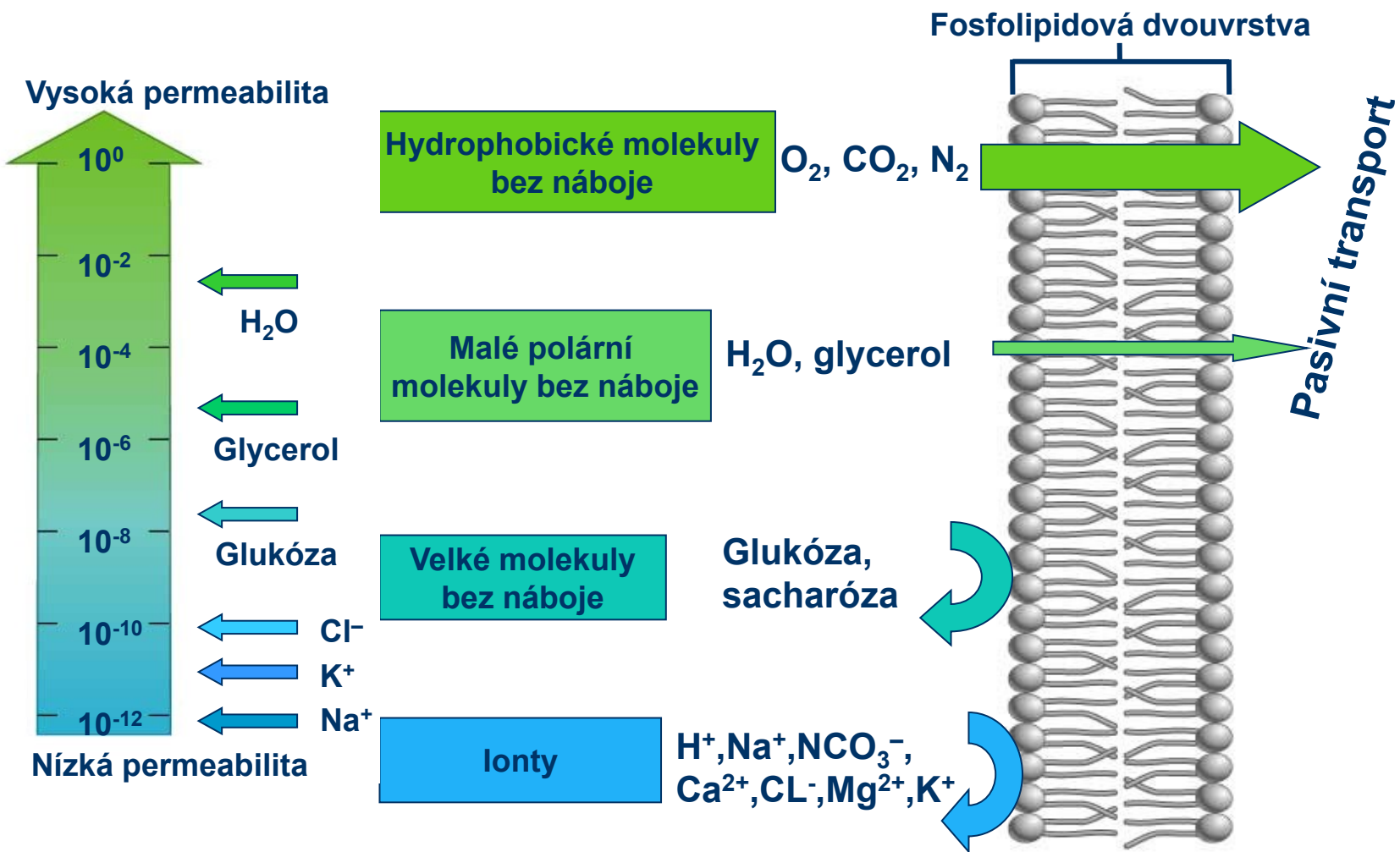
# „ABC“ o ABC transportérech

Aktivní a pasivní transport živin  
ABC transportéry a jejich detekce  
Fyziologická role  
Kmenové buňky a regenerace  
Nádorové bujení  
Multiléková rezistence  
Regulace exprese ABC transportérů

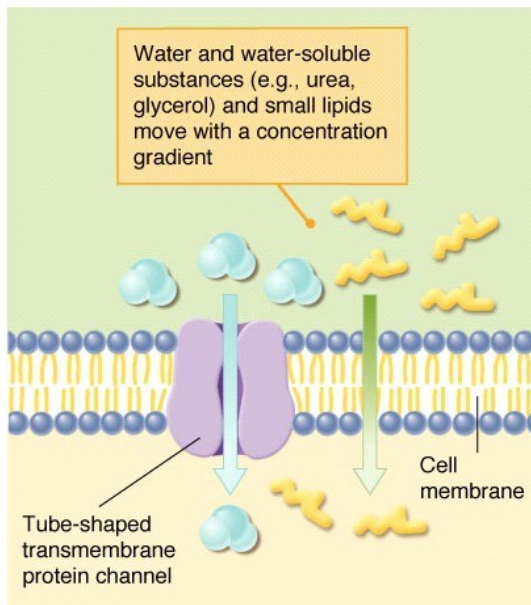




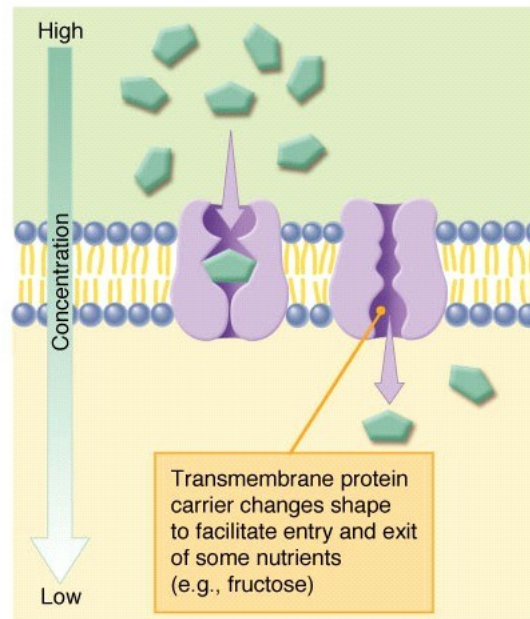
# Permeabilita živin



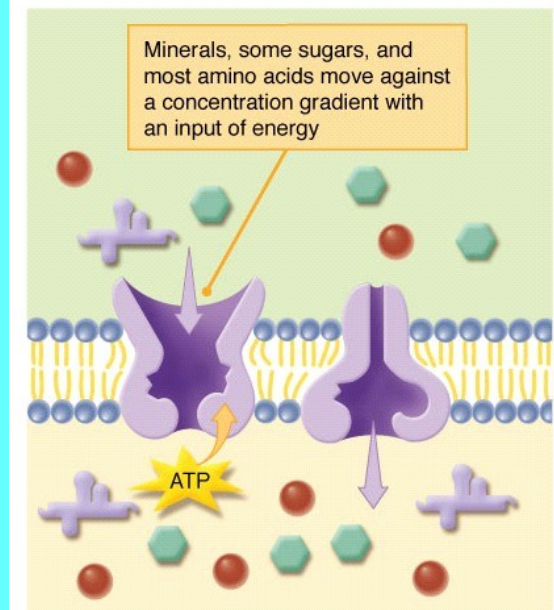
## PASSIVE DIFFUSION



## FACILITATED DIFFUSION

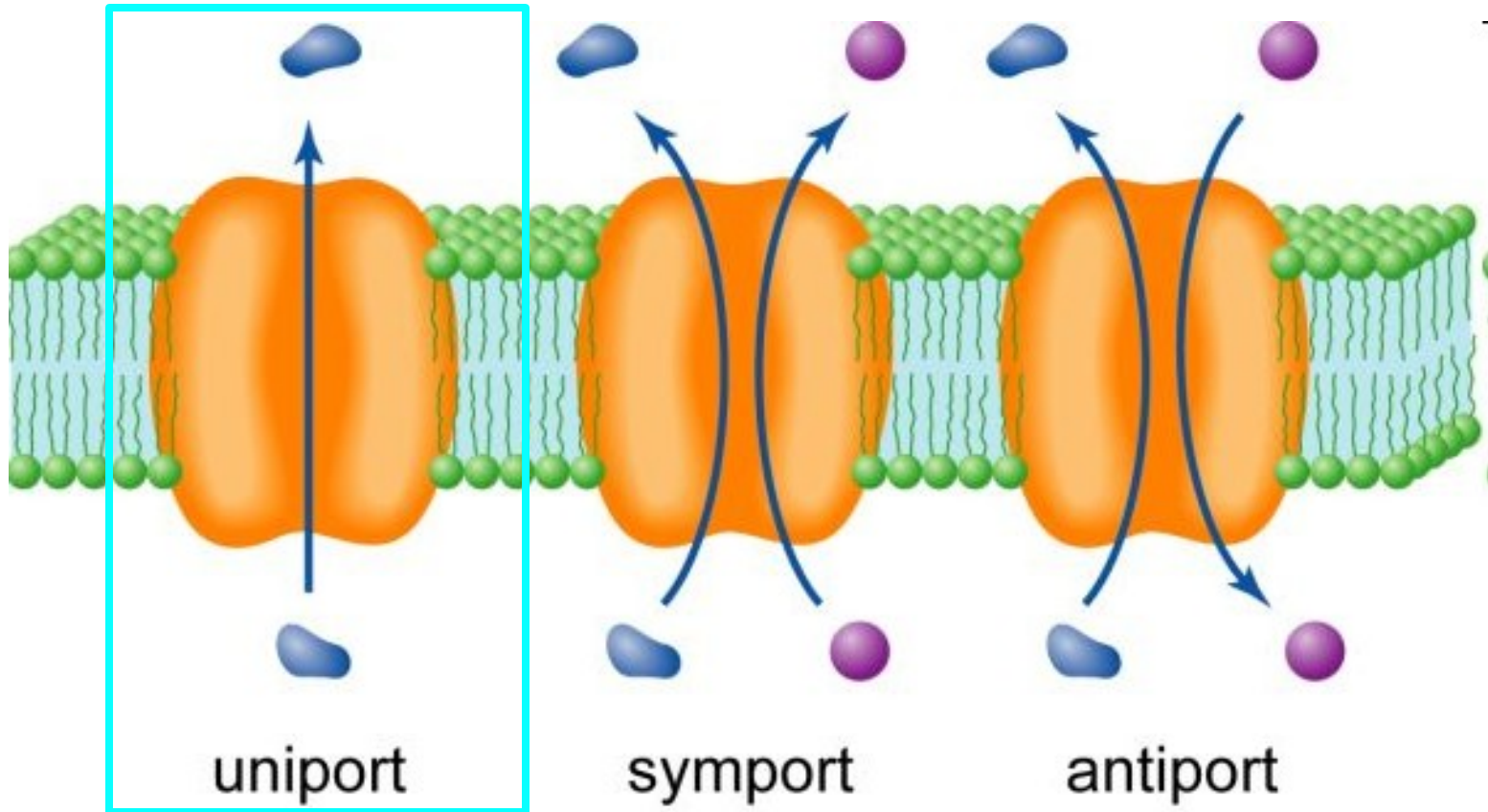


## ACTIVE TRANSPORT



# Typy aktivního transportu

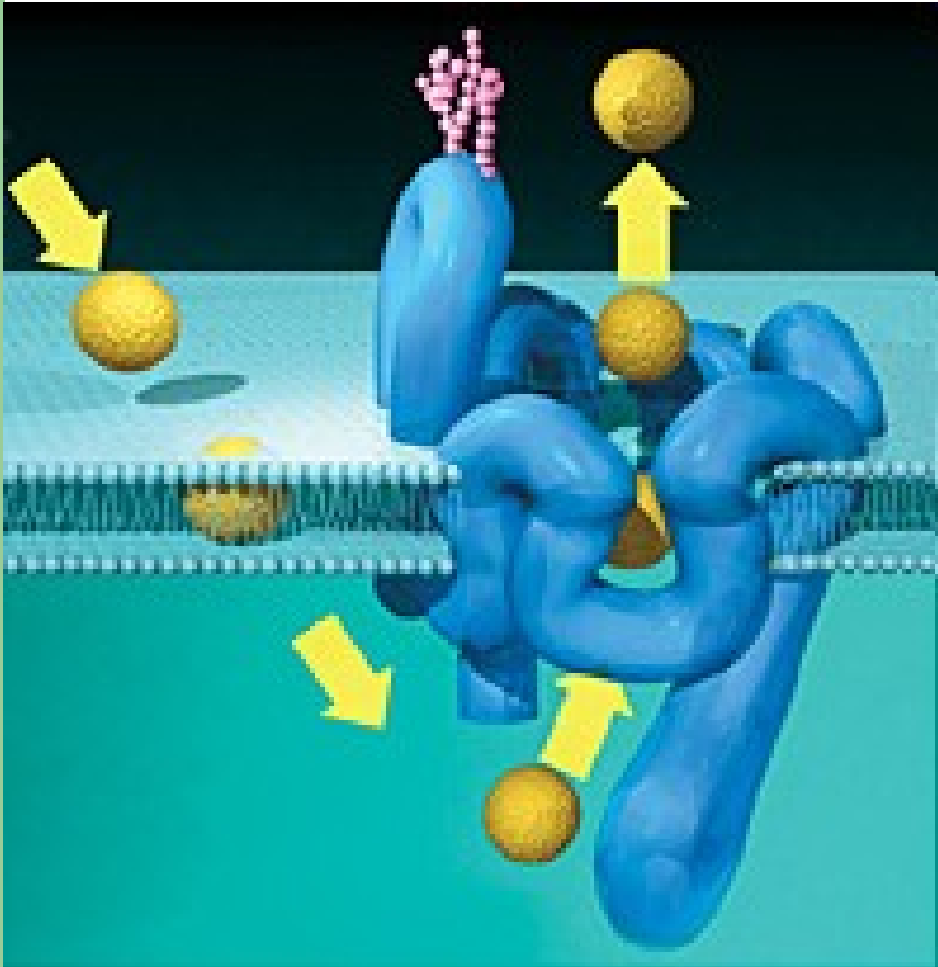
<http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120068/bio04.swf>



Transportér  
specifický pro  
jednu molekulu

Transportér  
pro dvě molekuly  
ve stejném směru  
(H<sup>+</sup>/sacharóza)

Transportér  
pro dvě molekuly  
v opačném směru

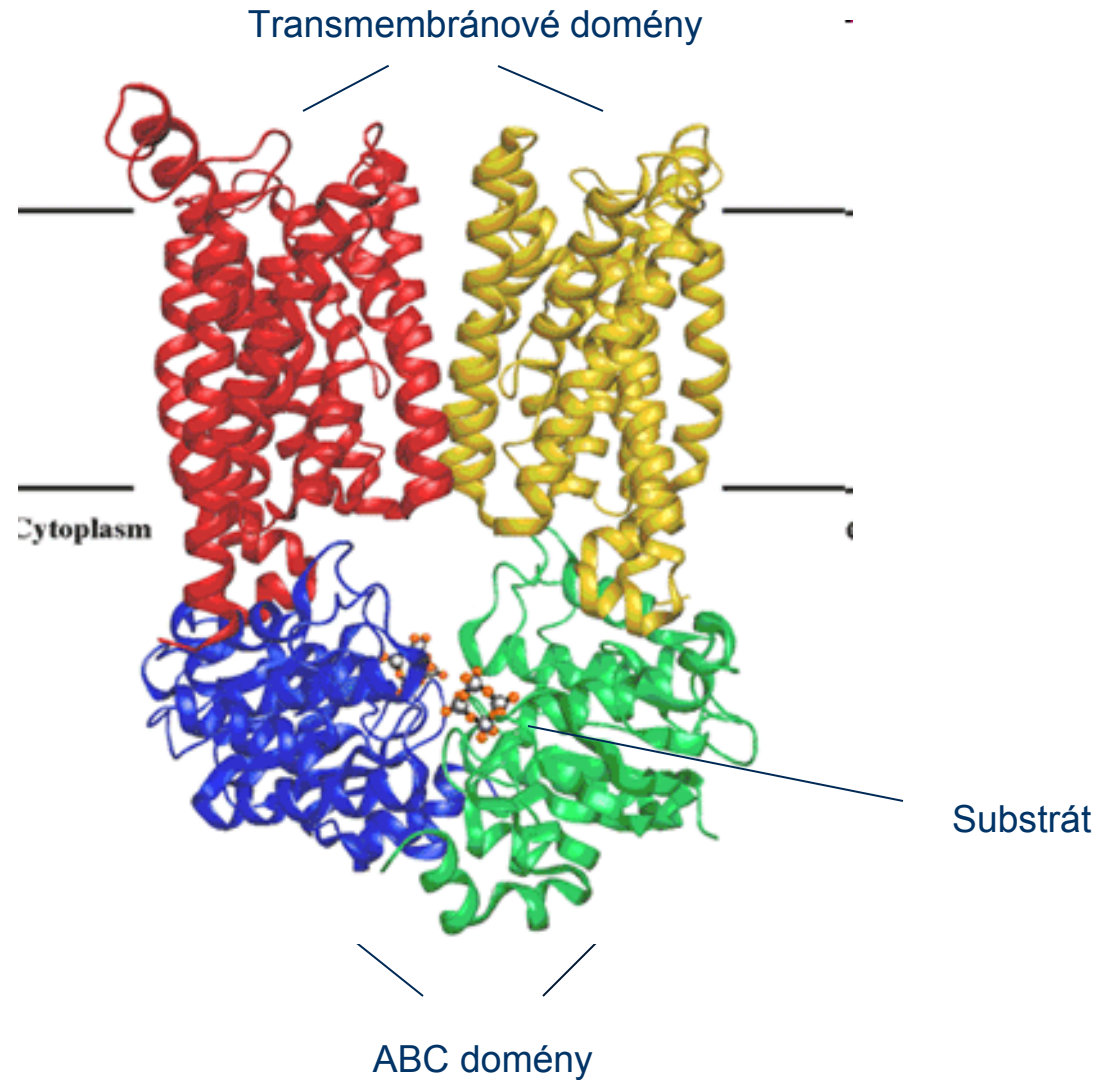


- **ATP-binding cassette**
- Za spotřeby **ATP** pumpují toxické látky/metabolické produkty **VEN** z buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám



# Krystalografická struktura

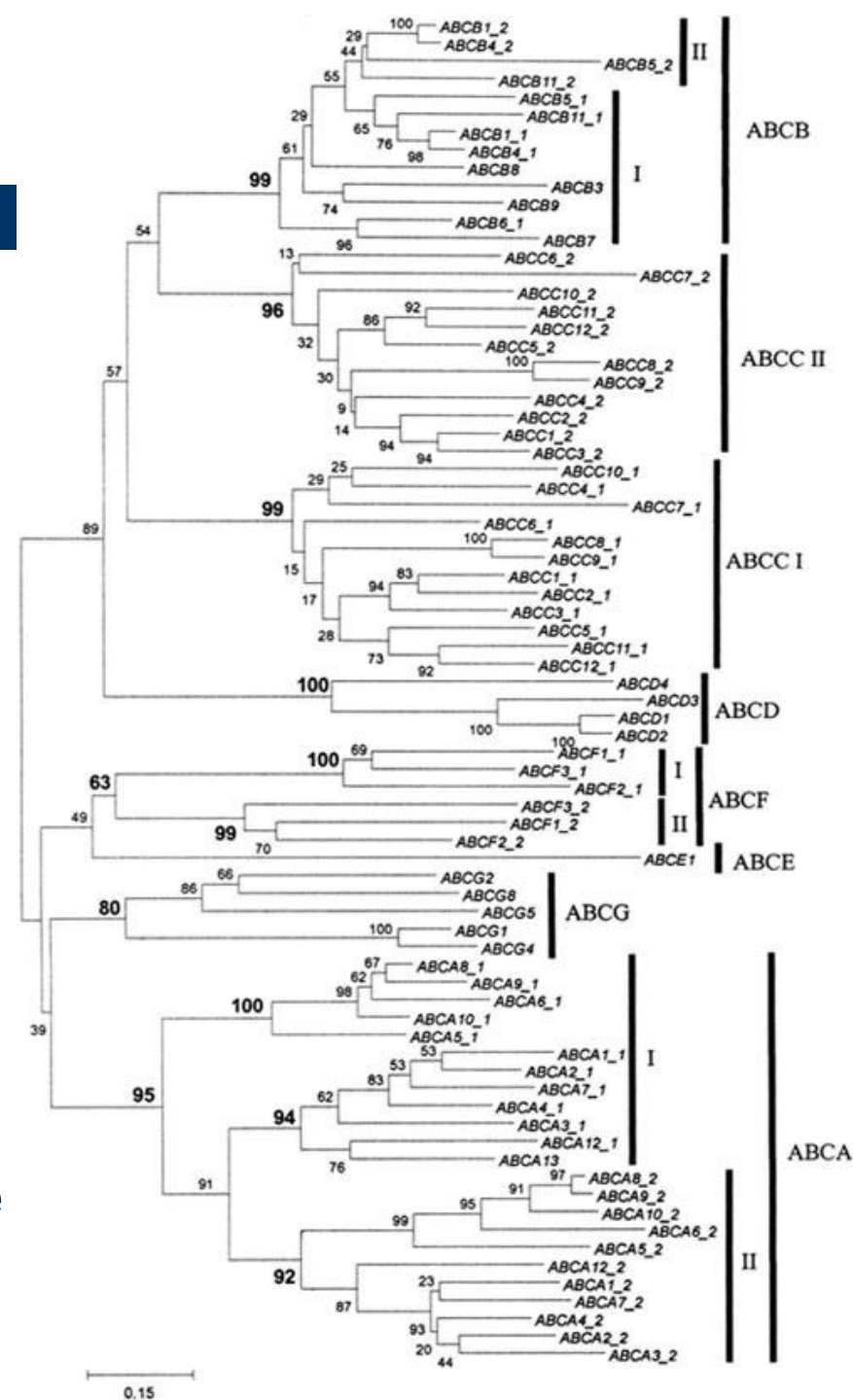
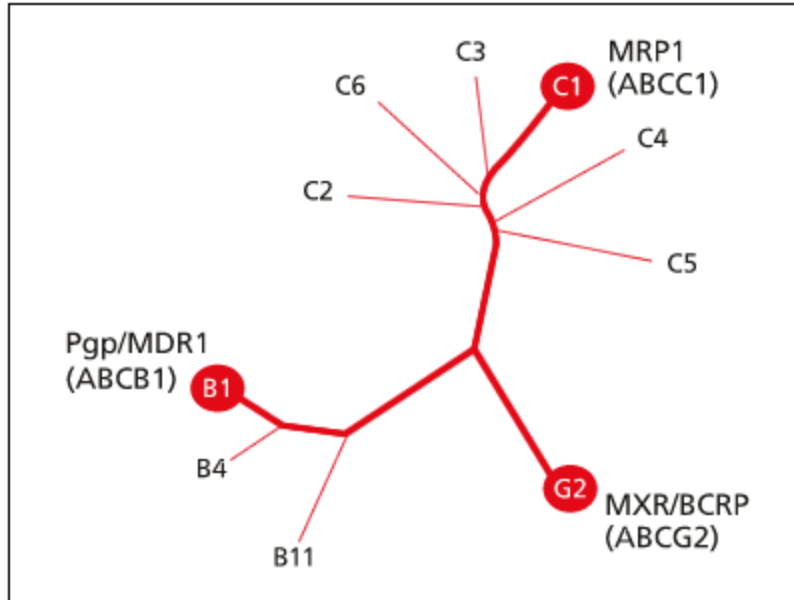
[http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights\\_archive/Rees\\_Fig1-1.gif&](http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/Rees_Fig1-1.gif&)





# Filogenetický strom ABC transportérů

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>

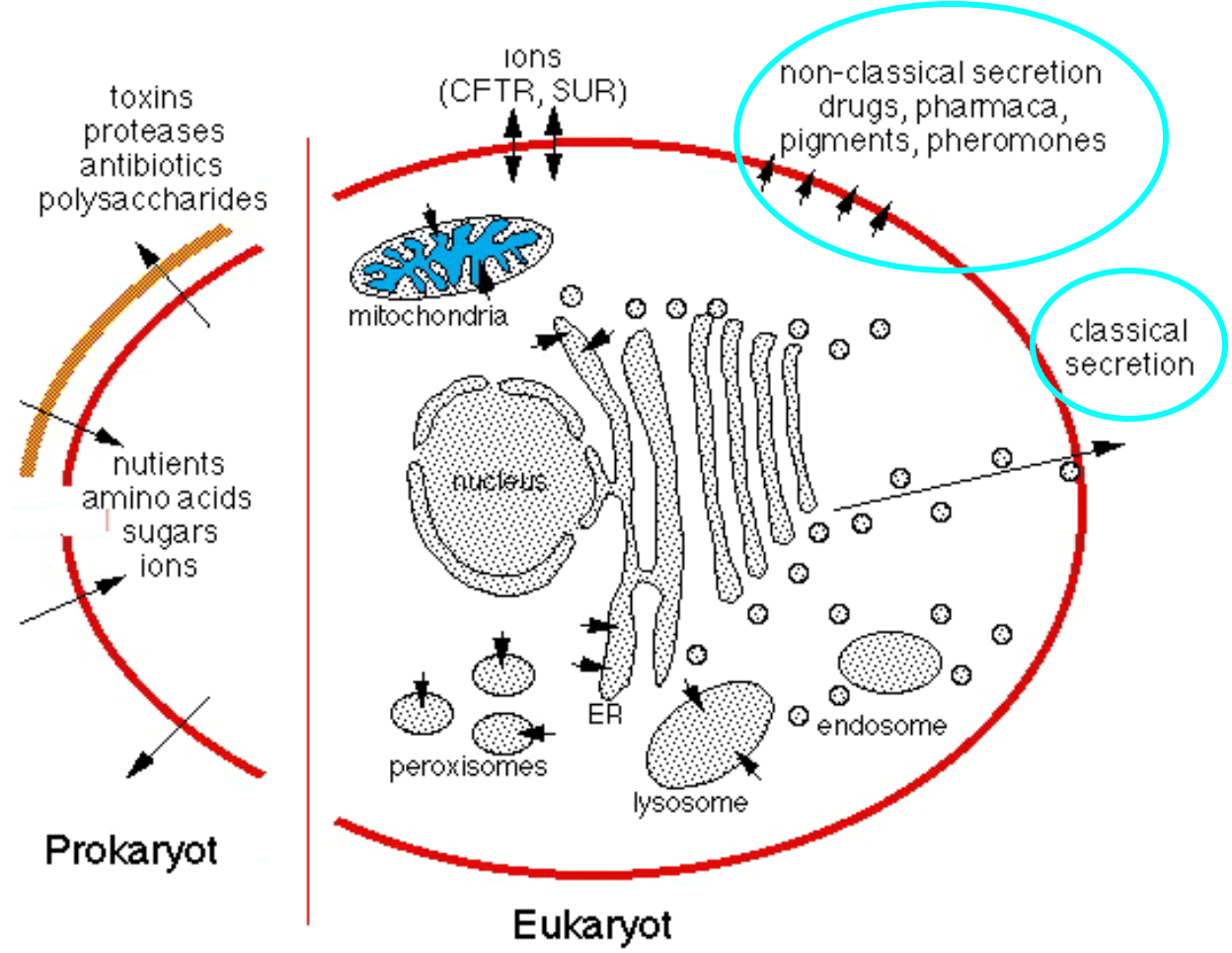


48 různých proteinů u lidí

7 rodin (A-G) podle homologie

# Výskyt ABC transportérů

<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2000/buxton/a>



Šipky označují výskyt a směr transportu

# **Fyziologická role ABC transportérů**

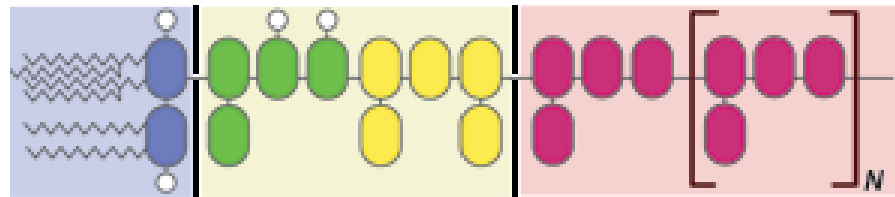
# Substráty ABC transportérů - výživa

<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2000/buxton/a>

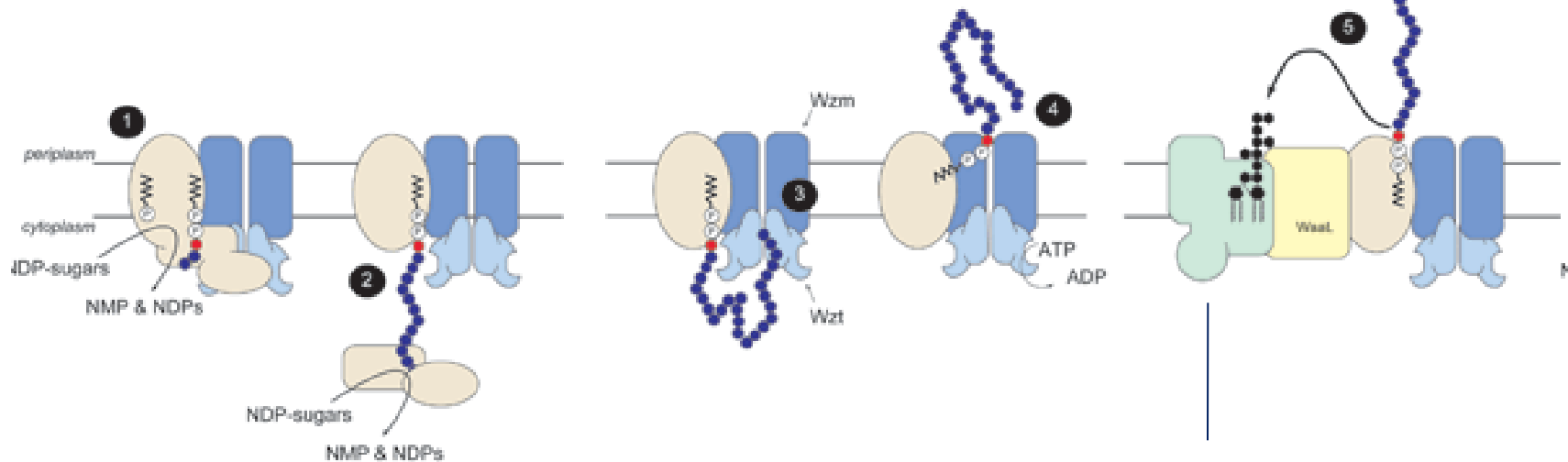
Živina	Membránový Transportér	Efekty
Fytochemikálie z výživy	➤ P-glycoprotein ( <b>MDR1</b> )	Inhibice
Flavonoidy (quercetin,) flavonoid glycosidy (genistein-7-glucosid) a flavonoid glucuronidy – ovoce, zelenina	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 1 (<b>MRP1</b>)</li> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 2 (<b>MRP 2</b>)</li> <li>➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (<b>MXR</b>)</li> <li>➤ P-glycoprotein (<b>MDR1</b>)</li> </ul>	Akumulace, transport a potenciální efekty živiny
Flavonoid-like molecules (polyphenol phloretin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 1 (<b>MRP1</b>)</li> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 2 (<b>MRP 2</b>)</li> <li>➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (<b>MXR</b>)</li> <li>➤ P-glycoprotein (<b>MDR1</b>)</li> </ul>	Akumulace, transport a potenciální efekty živiny
Extrakty z hořkého melounu (1-monopalmitin), grape fruitu (bergamottin and quercetin), sóji	➤ P-glycoprotein ( <b>MDR1</b> )	Inhibice
Extrakt z hroznových jader	➤ P-glycoprotein ( <b>MDR1</b> )	Inhibice
Steroly (e.g. Cholesterol)	➤ ABCA1, ABCG1, ABCG5 and ABCG8	Substrát
Sezamové semínko (Isophosphatidylcholine, linoleoyl)	➤ Některé transportéry ve střevu	Inhibice
Mono-, di-, and triglutamáty folátů	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (<b>MXR</b>)</li> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 1 (<b>MRP1</b>)</li> </ul>	Substrát
Rostlinné výtažky	➤ P-glycoprotein ( <b>MDR1</b> )	Inhibice (Curcumin, ginsenosides, piperine, some catechins from green tea, silymarin from milk thistle); Some catechins from green tea (modulation); Hyperforin, kava (Activation of pregnane X receptor, an orphan nuclear receptor acting as a key regulator of MDR1)

[http://www.uoguelph.ca/~cwhitfie/images/abc\\_transporter.gif](http://www.uoguelph.ca/~cwhitfie/images/abc_transporter.gif)

Lipid    fukóza    N-acetyl  
glukosamin    galaktóza



Polysacharid

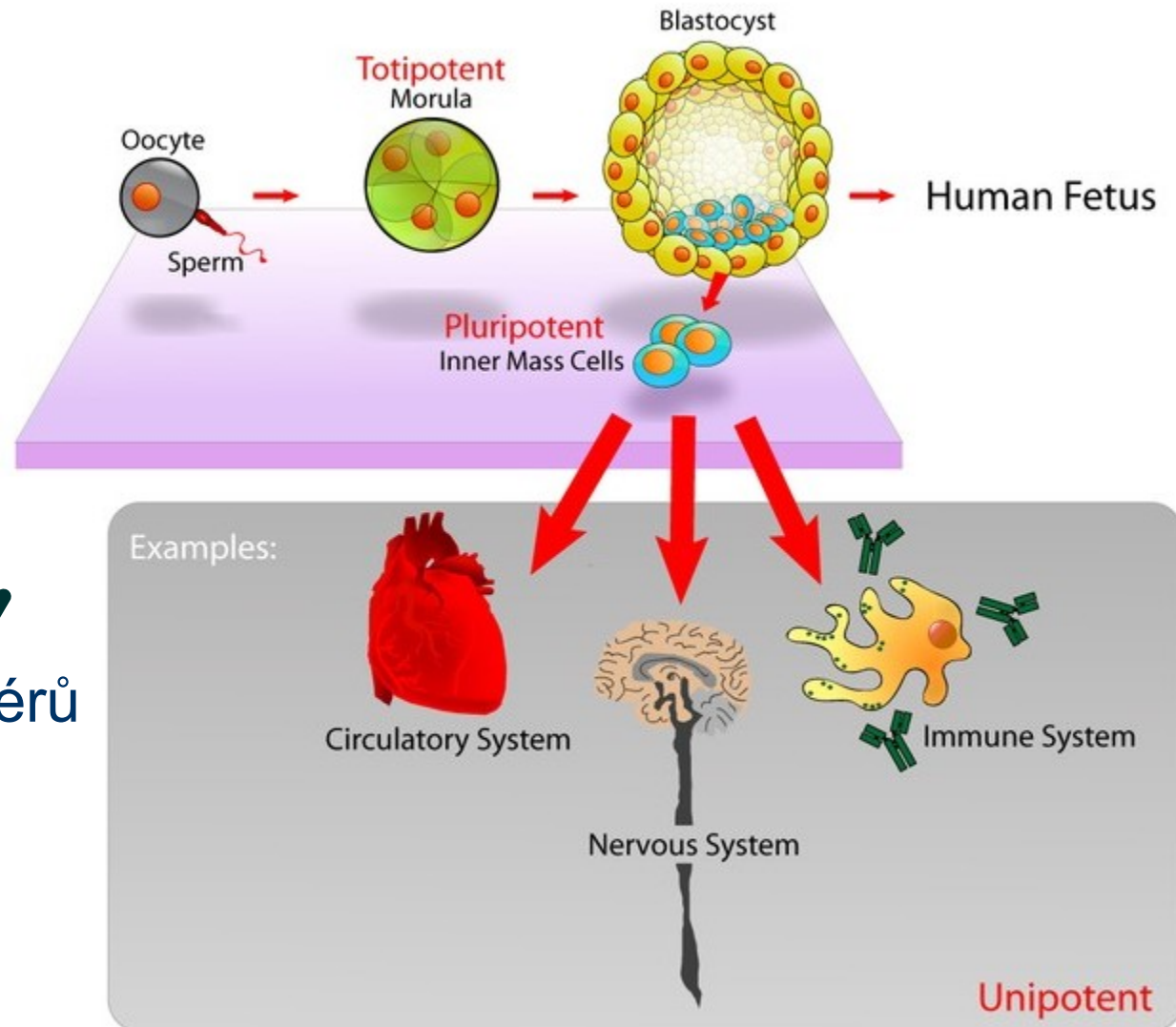


Lipidové jádro

# Kmenové buňky

[http://community.livinglakecountry.com/blogs/eagles\\_eye/Stem%20cells%20diagram%5B1%5D.jpg](http://community.livinglakecountry.com/blogs/eagles_eye/Stem%20cells%20diagram%5B1%5D.jpg)

V průběhu  
diferenciace  
klesá  
exprese  
ABC  
transportérů



## „Dye exclusion assays“

MDR1 - JC1, rhodamin 123 x **Cyclosporin D, reversin**

MRP1 - Calcein AM x **MK571, NSAID**

BCRP - Hoechst 33342 x **fumitremorgin C**

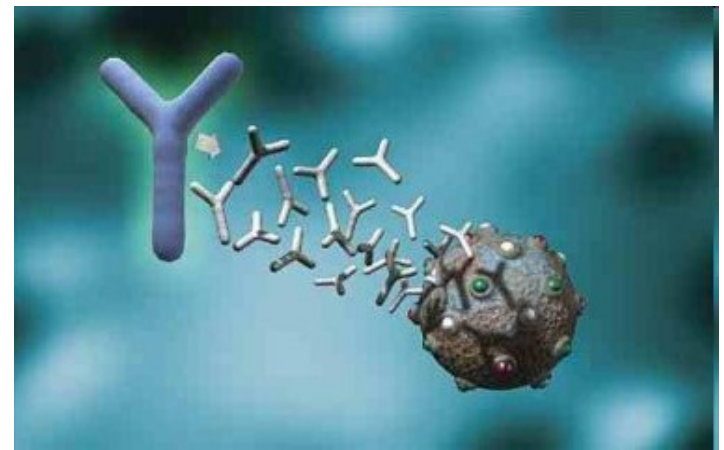
- Bodipy-prazosin

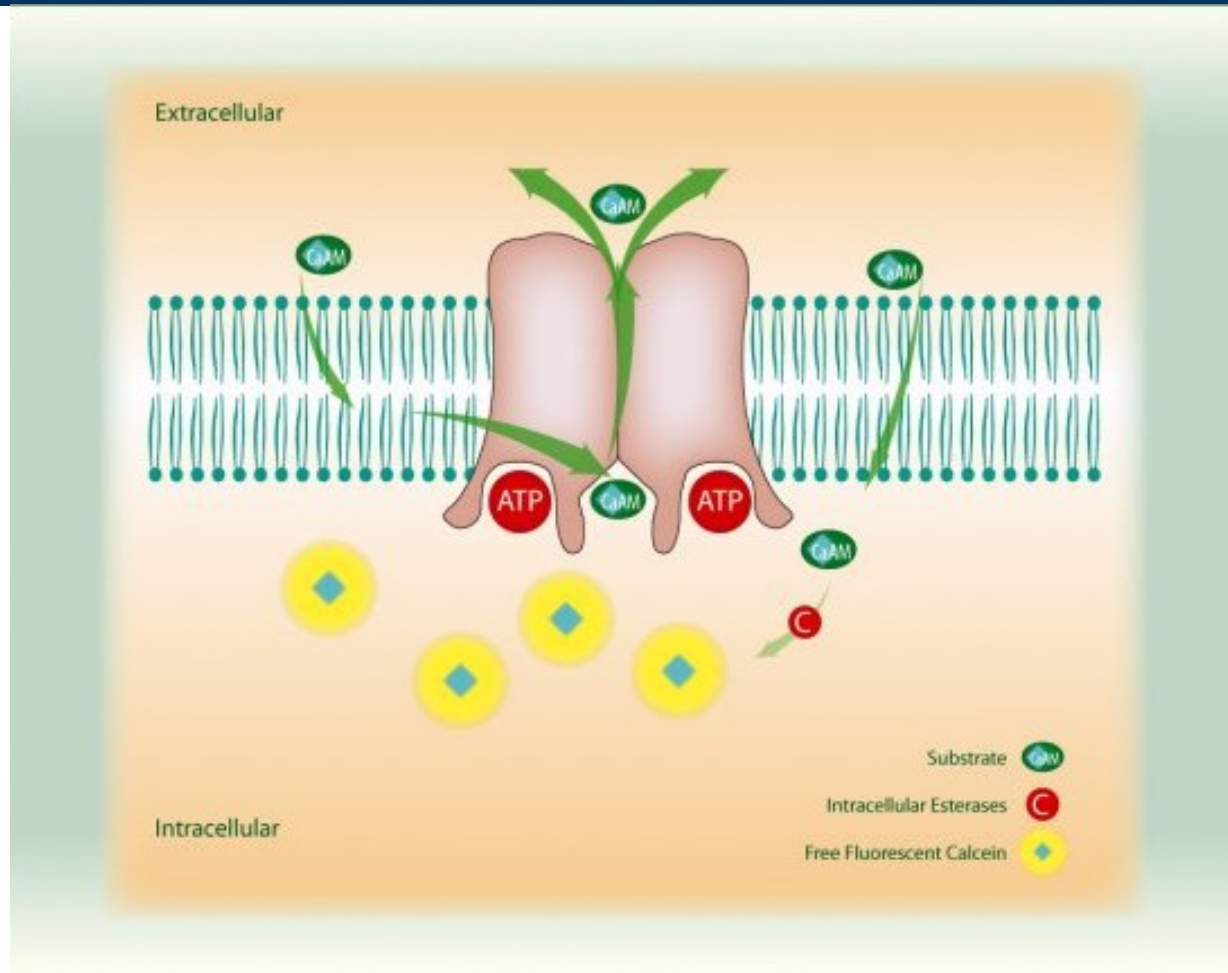
- Pheophorbid A

Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

## Imunodetekce

## qRT-PCR



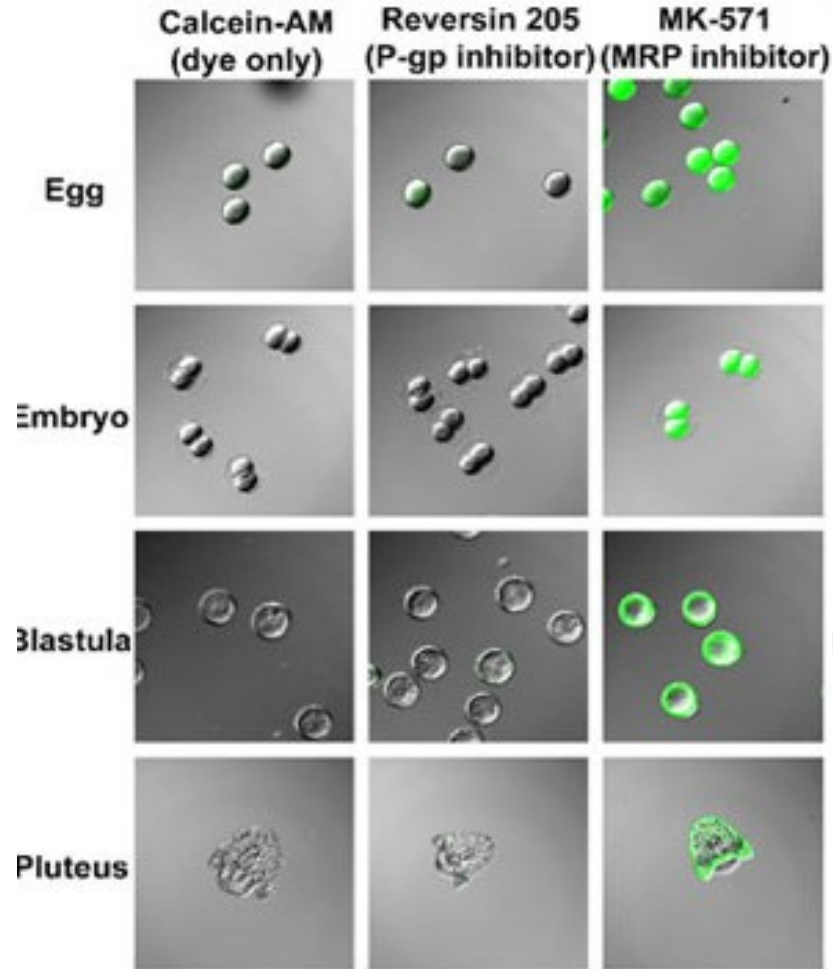
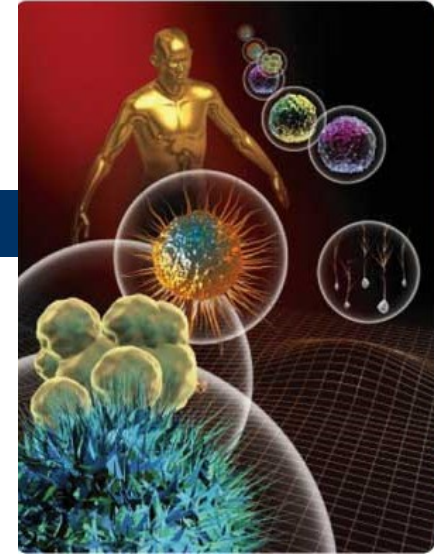


Calcein AM je substrátem MRP1, MDR1

Inhibitory - MK571, NSAID, cyclosporin D, reversin



[http://www.bml.ucdavis.edu/facresearch/images/cherr\\_fig8.jpg](http://www.bml.ucdavis.edu/facresearch/images/cherr_fig8.jpg)

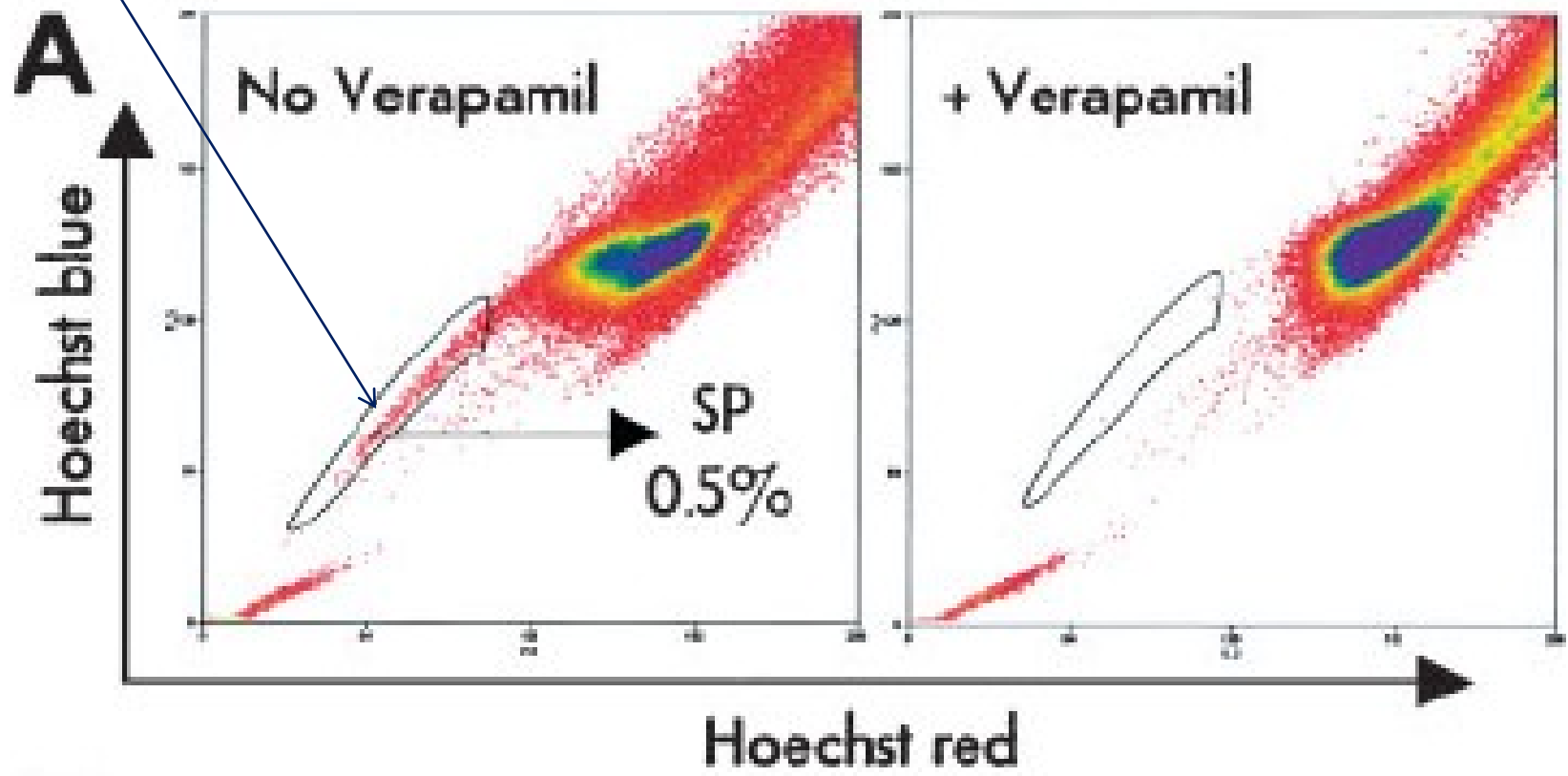


MDR1/Pgp << MRP1

# „SP“ buňky

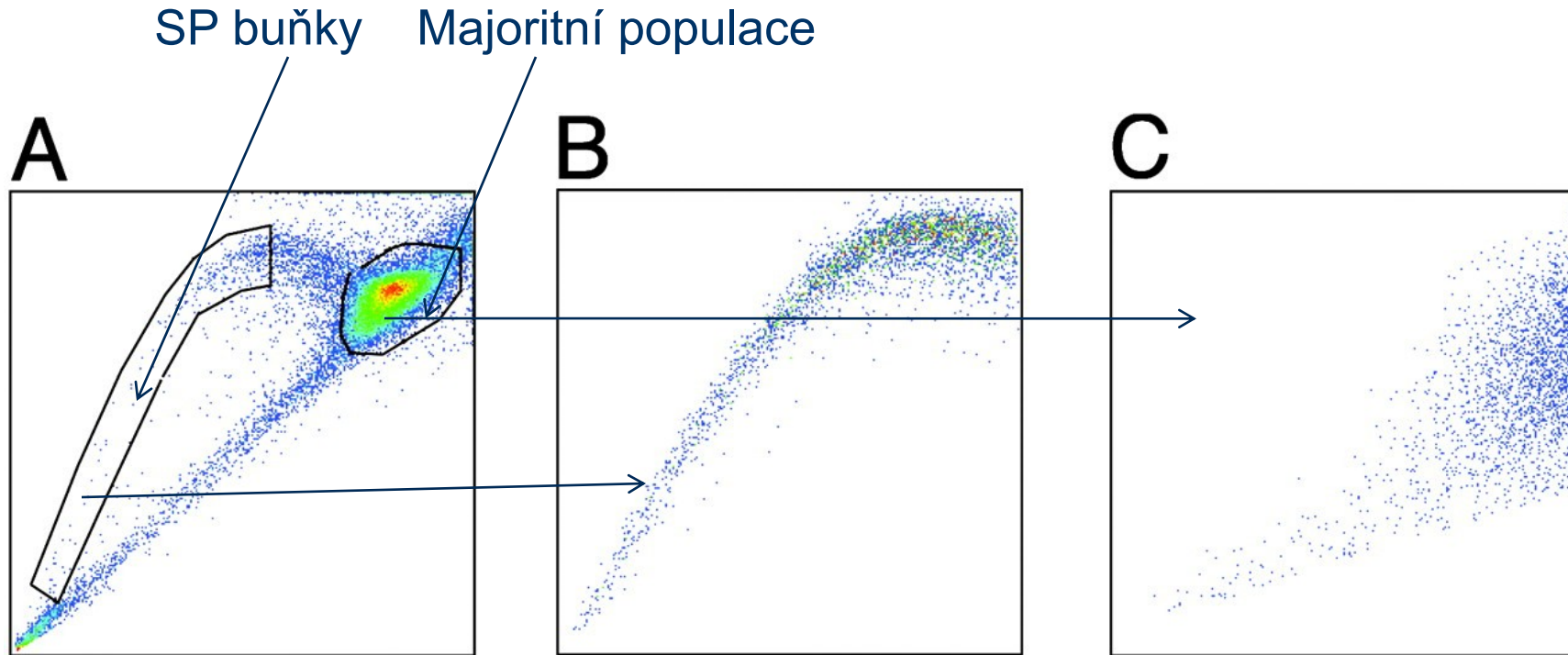
Hoechst 33342 - substrát BCRP, MDR1  
- inhibitor verapamil

<http://www.bu.edu/cms/www.bumc.bu.edu/leukemia-lymphoma-laboratory/files/Images/sidepop.jpg>



Buňky C2C12 - myoblasty

Hirschmann-Jax, C. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14228-14233



**A: V linii se vyskytují SP buňky a majoritní populace**

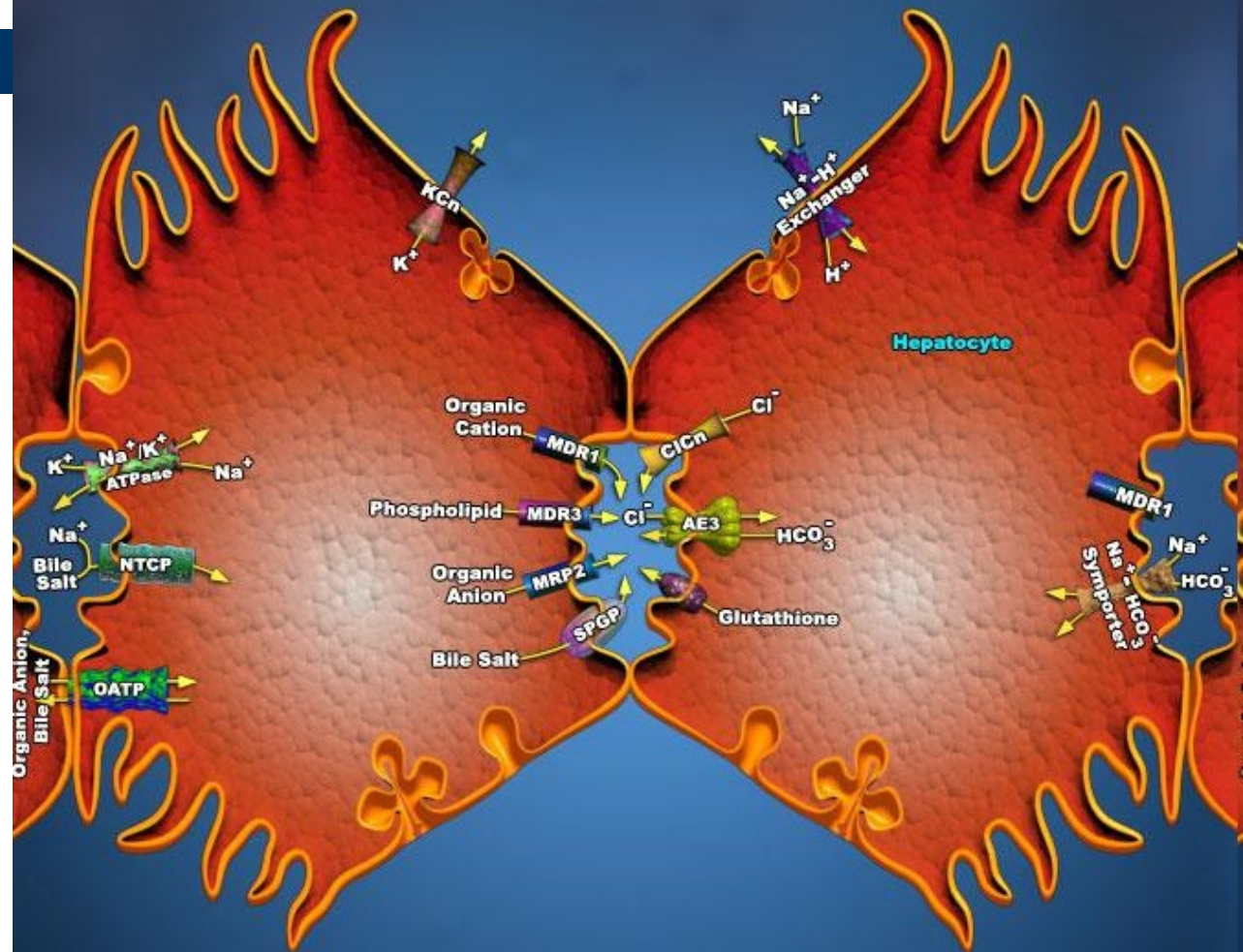
**B: SP buňky z neuroblastomové buněčné linie produkují SP a ne-SP**

**C: Buňky majoritní populace zůstávají jen majoritními**

Rozhraní  
krev vs. Hepatocyty

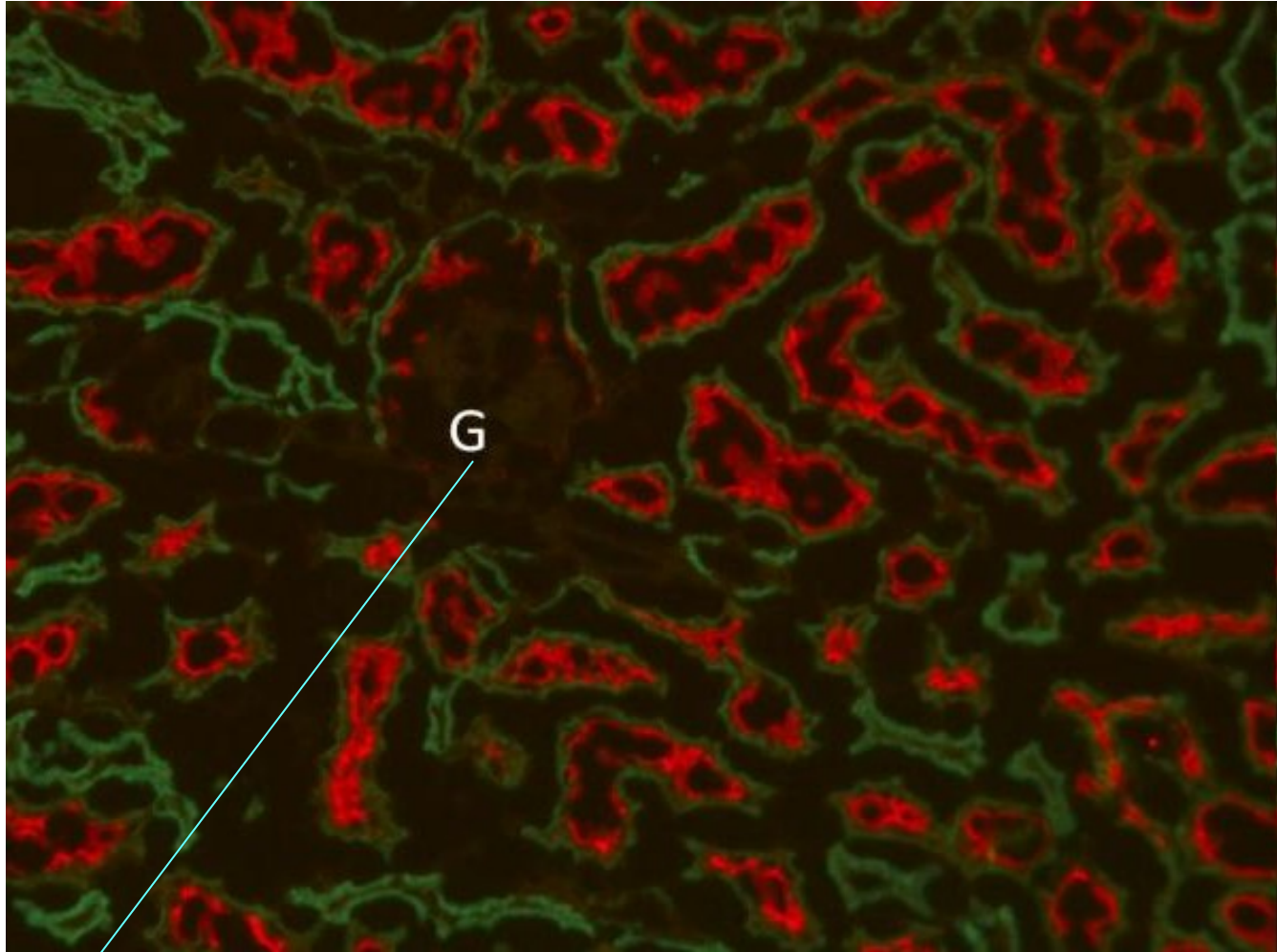
Regenerace –  
MDR + BCRP

## Hepatic ABC Transporters



# Regenerace ledvin

<http://www.sciencedaily.com/images/2009/01/090128074622-large.jpg>



glomerulus

**BCRP**

**Transporter Na<sup>+</sup>**

16 ABC genů bylo asociováno s dědičnými poruchami

**Tangierova choroba (*ABCA1*)** – poruchy sekrece cholesterolu a fosfolipidů (nadměrná hladina v buňkách, narušena homeostáza)

**Dubin Johnson syndrom (*ABCC2*)** – neschopnost jater sekretovat konjugovaný bilirubin do žluče

**Pseudoxanthoma elasticum (*ABCC6*)** – mineralizace a fragmentace elastinových vláken, problém s vitamínem K

**Cystická fibróza (*ABCC7*)** – poruchy sekrece působků pankreatu a dalších exokrinních žláz

# **Patologický výskyt**

# Teorie vzniku metastáz

[www.isrec.ch/images/research/figures/Trumpp\\_06\\_Fig\\_5.jpg](http://www.isrec.ch/images/research/figures/Trumpp_06_Fig_5.jpg)

Model klonální selekce

Model paralelní evoluce nádoru

Integrovaný model evoluce nádoru

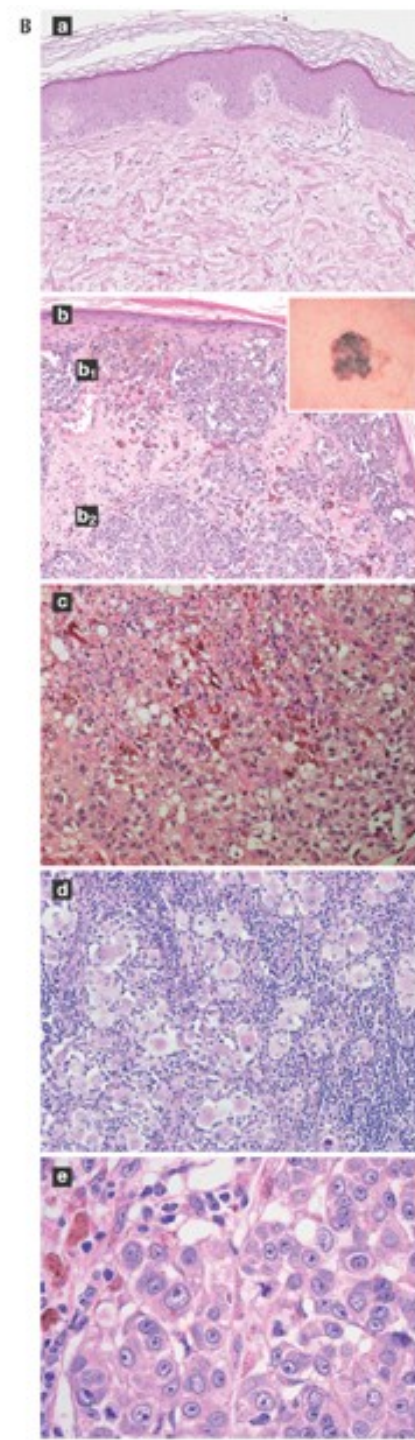
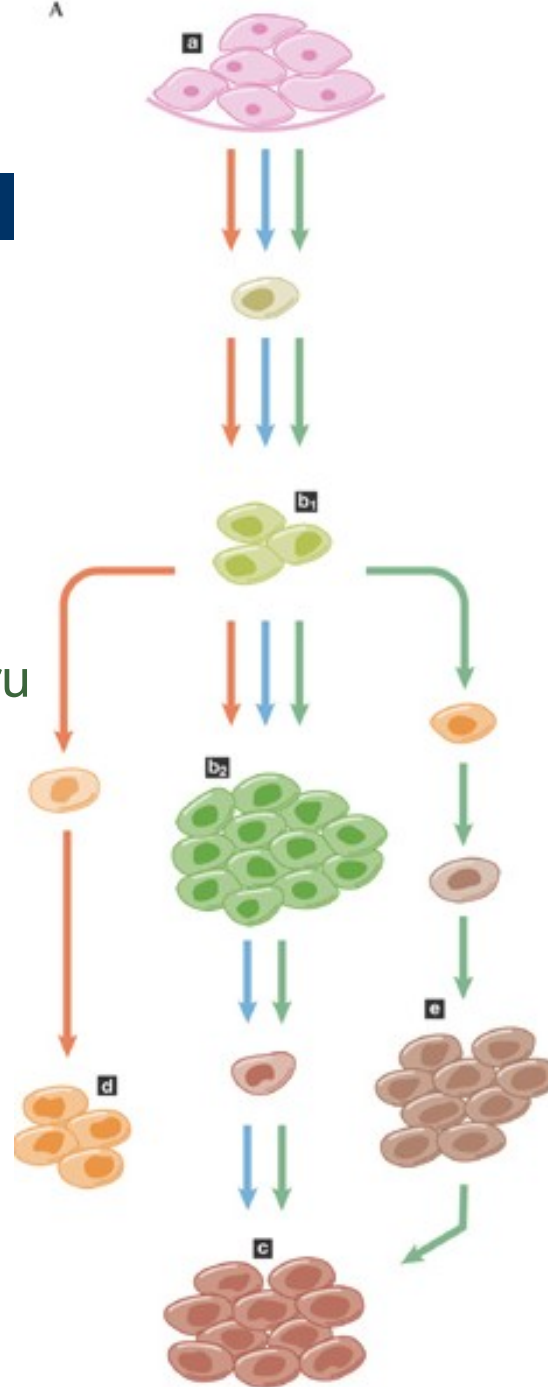
A normální kožní tkáň

B primární nádor

C subkutánní metastázy

D metastázy v lymfatické uzlině

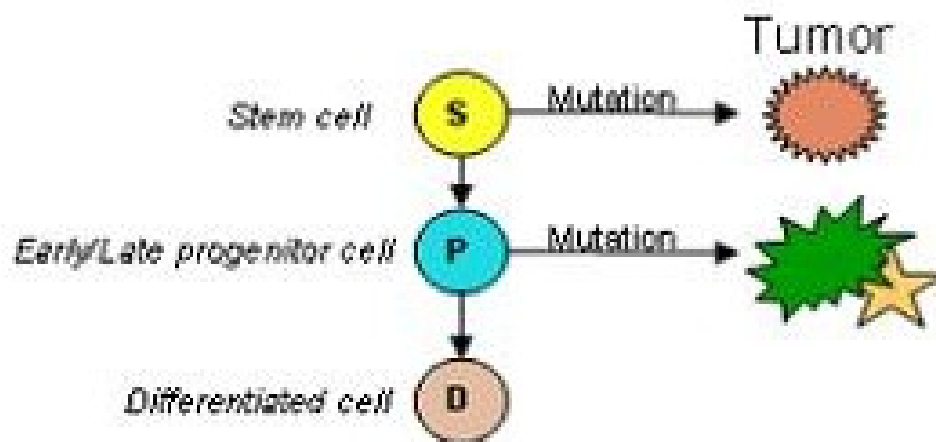
E metastázy v plicích



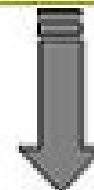


# Nádorová kmenová buňka

<http://www.gnf.org/assets/001/23050.jpg>

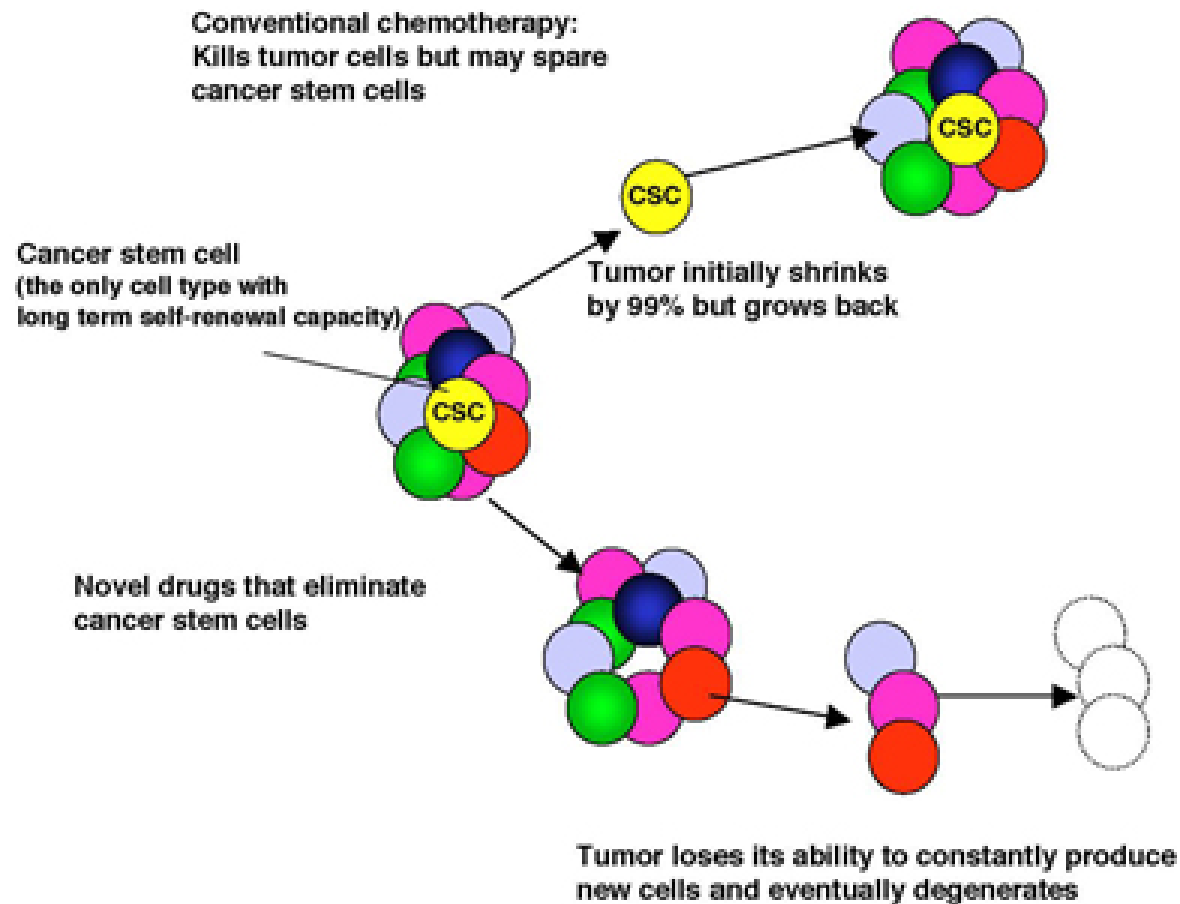


**Tumors from Stem cells**  
Heterogenous cancer  
Increased metastatic potential



**Tumors from late progenitor cell**  
Homogenous cancer  
Less metastatic potential

# Strategie léčby



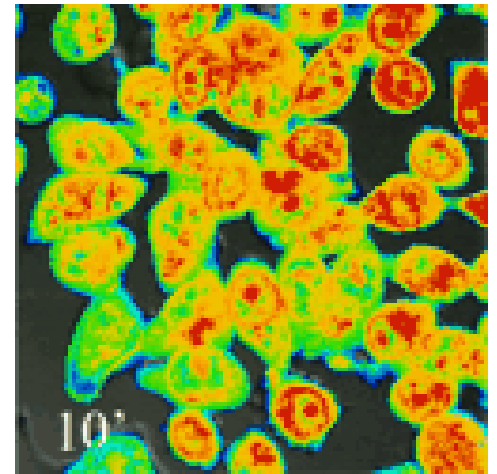
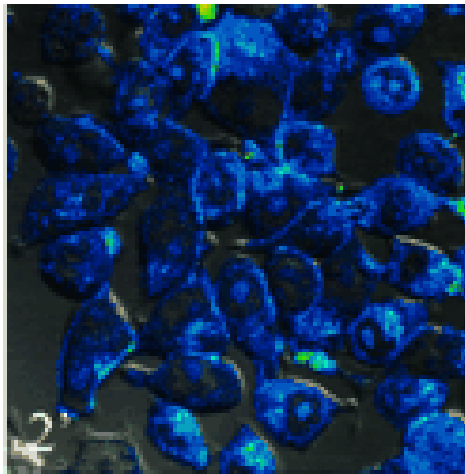
- Selhání chemoterapie (nádorové b. jsou obvykle citlivější než „zdravé“ buňky)
- *De novo*/získaný fenotyp MDR (cytotoxic *in vitro* MTT-assay)
- Mechanizmy:
  - Změny v metabolických drahách, které se podílejí na detoxifikaci látek
  - Změny v reakci organismu na poškození DNA
  - Změny v aktivitě topoizomerázy II
  - Změny v drahách regulujících apoptózu
  - **Zvýšená produkce ABC transportérů**
- Nádorová b. se vymyká vlivu svého prostředí (obsahujícího chemoterapeutikum), získává „evoluční“ výhodu

! Různé substráty -> **MULTI**léková rezistence!  
**ABC-B1 – MDR1; ABC-C1 – MRP1; ABC-G2 - BCRP**

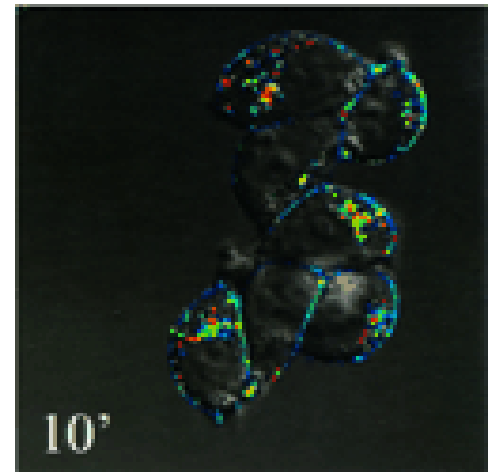
Dean et al.: *THE ROLE OF THE ABC TRANSPORTERS DRUG RESISTANCE AND PHARMACOLOGY*

Mitoxantron - substrát BCRP a MDR1

S1 wt



S1-M1-80



# Chemoterapeutika

<u>Gen</u>	<u>Substráty - chemoterapeutika</u>	<u>Inhibitory</u>
<i>ABCB1/PGP</i>	<i>colchicine, doxorubicin, VP16, adriamycin, vinblastine, digoxin</i>	<i>Verapamil, PSC833</i>
<i>ABCC1/MRP</i>	<i>doxorubicin, daunorubicin, VP16, colchicines, etoposide, rhodamine</i>	<i>Cyclosporin A, V-104</i>
<i>ABCG2/BCRP</i>	<i>Mitoxantrone, topotecan, CPT-11, rhodamine</i>	<i>Fumitremorgin C, GF120918</i>

## Pgp substráty ve vstupní terapii:

*Podle: The Medical Letter*

Lung: SCLC: C + G or C + Taxol or C + Vinorelbine

NSCLC: Taxol + P

Breast: Adriamycin + C Taxol or C + Adriamycin + F or CMF

Prostate: GnRH analogue

Colorectal: 5-Fu + L

Pancreas: G

Ovarian: C + Taxol

Uterus: M or Adriamycin + P ± C

Lymphoma: HD: Adriamycin + B + Vinblastine + D or M + Vincristine + PP/ABV

NHL: C + Adriamycin + Vincristine + P or C + Vincristine + P

High grade: C + Adriamycin + Vincristine + P + M

Leukemia: ALL: Vincristine + P + L-asparaginase + Adriamycin / Daunomycin

AML: Ara-C + Daunomycin / Idarubicin

CLL: C + Vincristine + P or Fludarabine

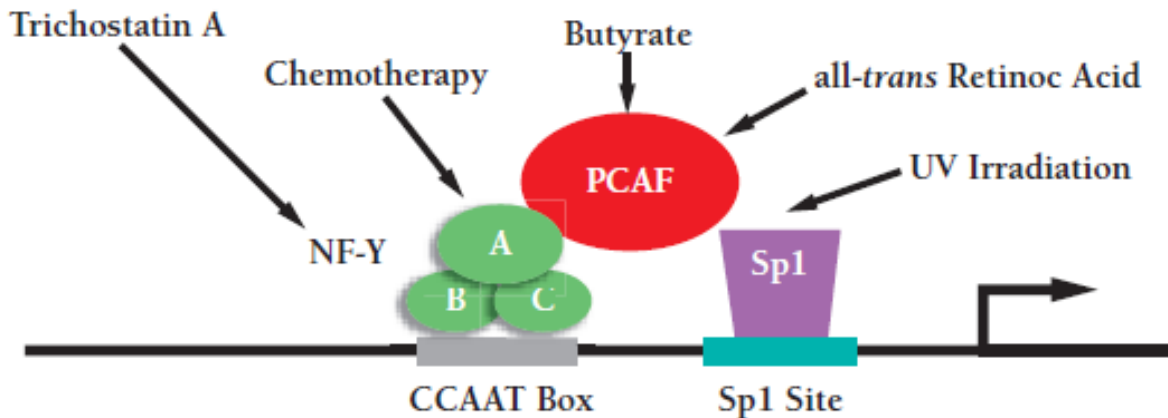
CML: Gleevec

Bladder: M + Vinblastine + Adriamycin + C

Myeloma: Vincristine + Adriamycin + D or MP

# **Aktuální projekt**

## ABC transportéry



MDR1 enhancer: Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. Mol Interv. 2001 Jun;1(2):117-25

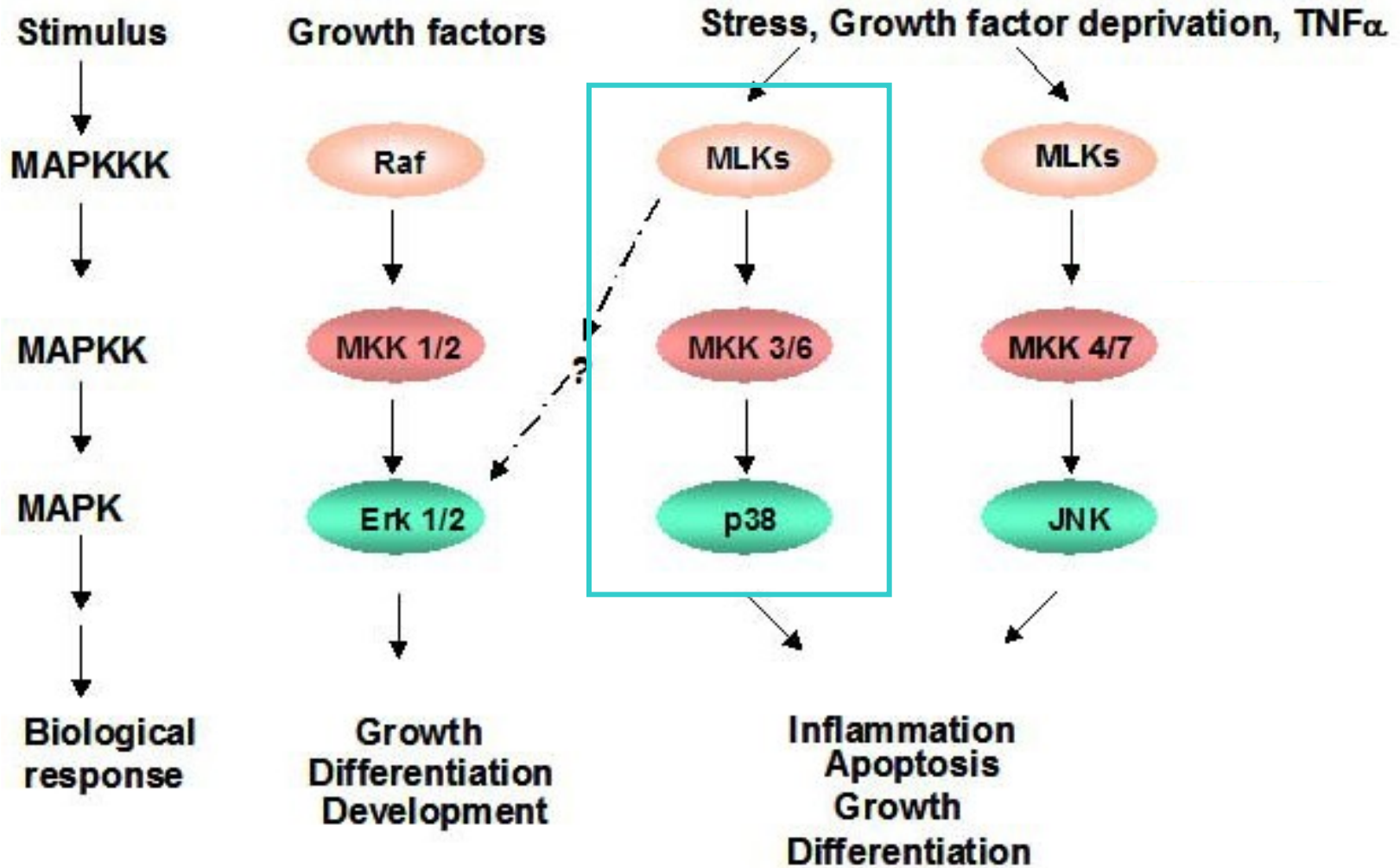
- Stres (teplo, **zánět**, hypoxie, UV záření, diferenciační činidla) vedou k zvýšení jejich exprese – enhancerom
- Rychlé zvýšení exprese po inkubaci s jejich substráty (doxorubicin, vinca alkaloidy, etoposid, taxely) = **jak zamezit zvýšení exprese dřív než nastane???**

**Studium signálních drah vedoucích k zvýšené expresi ABC transportérů ve stresových podmínkách – role p38 MAP kinázy**

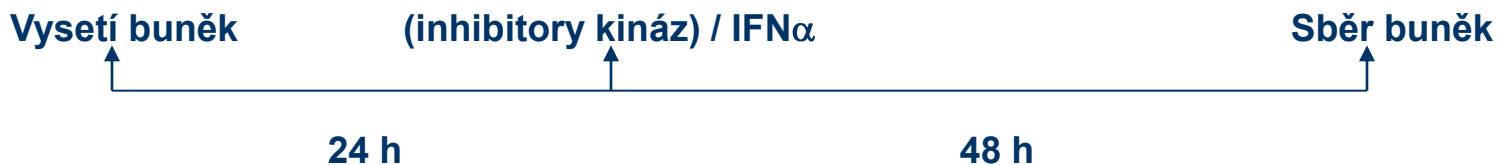


# MAPK

<http://www.bch.msu.edu/faculty/gallo/mapk-pathways-new.jpg>



- Modelová buněčná linie
  - A549 epiteliální buňky NSCLC
  - mESC wt, mESC p38-/-
  - HL-60 transfektanti
- Modelový treatment
  - IFN $\alpha$  (prozánětlivý cytokin, terapie CML, melanomů..., kombinace s imanitibem, cytarabinem, obnovuje bun. cyklus buněk v G0)
  - Chemoterapeutika
- Experimentální design

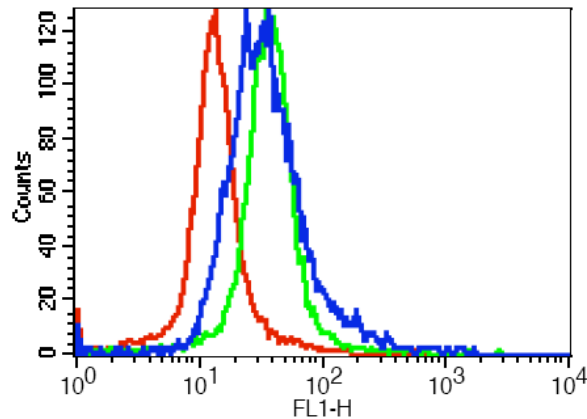


- Dye exclusion assays (průtoková cytometrie)
  - MDR1: JC1 / Cyclosporin D
  - MRP1: Calcein AM / MK571
  - BCRP: bodipy-prazosin, pheophorbid A / Fumitremorgin C
- Exprese studovaných proteinů
  - Western blotting, qRT-PCR

## „Dye exclusion assays“

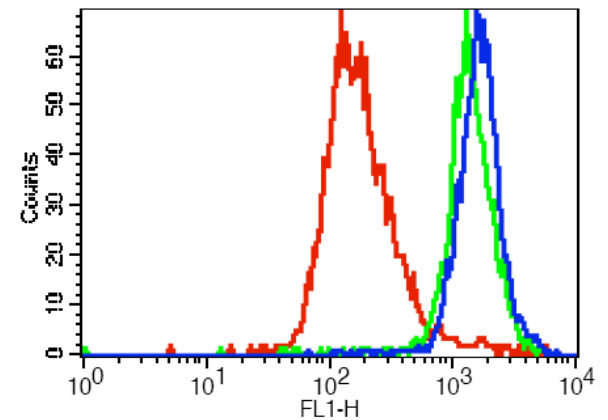
### JC1(MDR1/CSD)

median 12 31 34



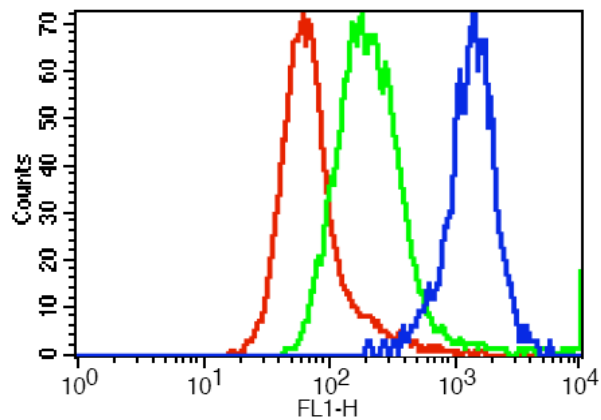
### Calcein AM (MRP1/MK571)

median 151 1252 149

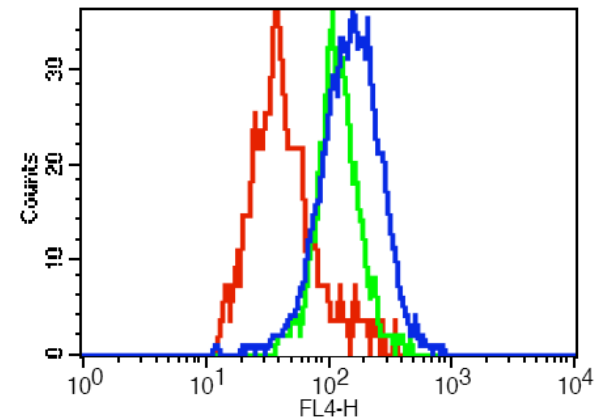


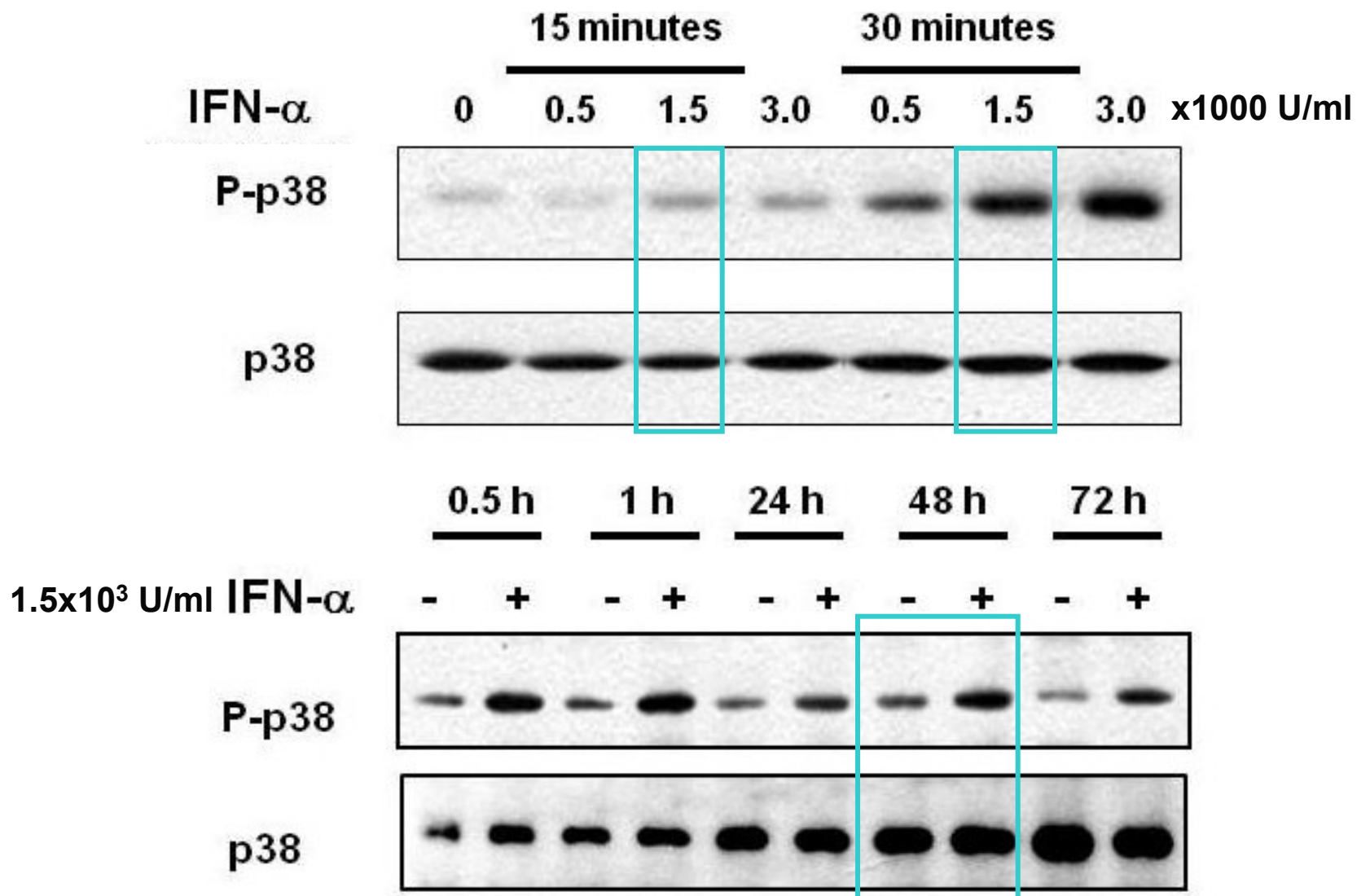
### Bodipy-prazosin (BCRP/Fumitremorgin C) Pheophorbid A

median 63 191 128

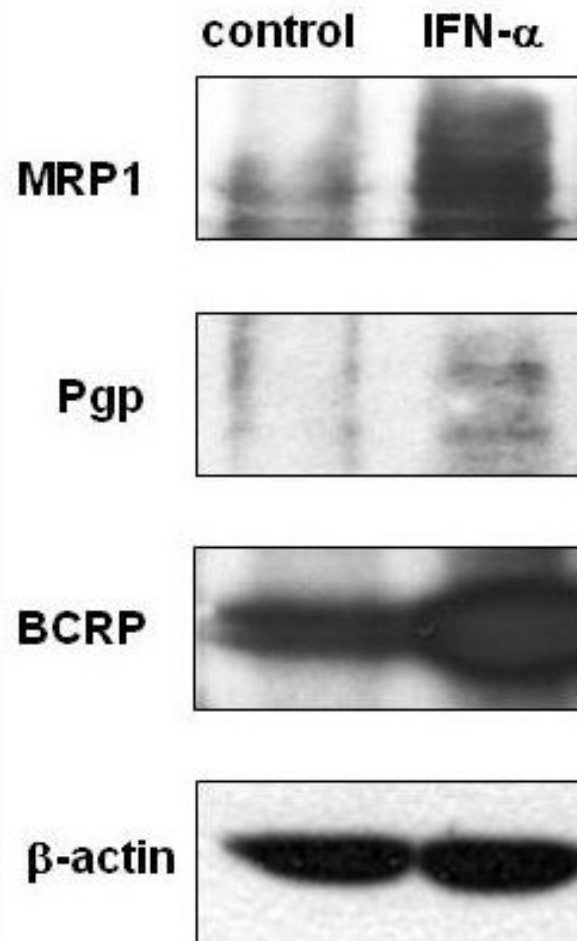


median 42 109 142





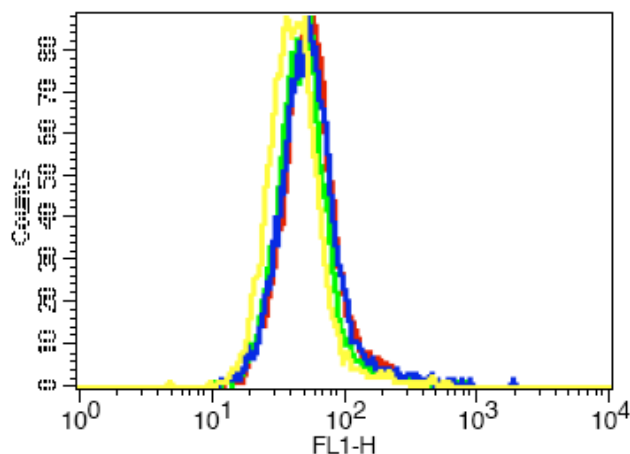
## „Western Blotting“



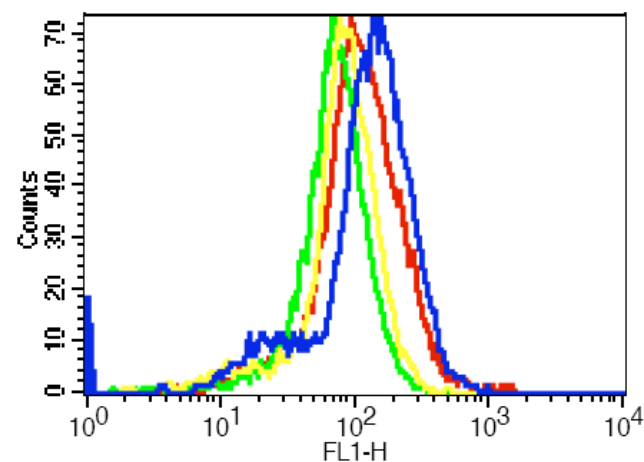
IFN $\alpha$  snižuje funkčnost MRP1 a BCRP,  
inhibice p38 tento efekt zvrátí

## „Dye exclusion assays“

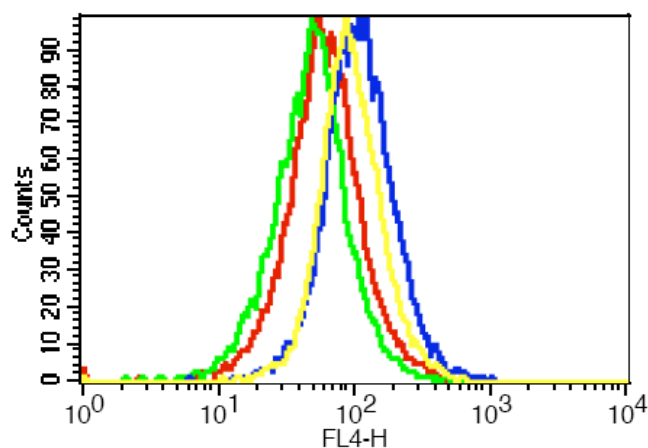
### JC1(MDR1)



### Calcein AM (MRP1)



### Pheophorbid A (BCRP)

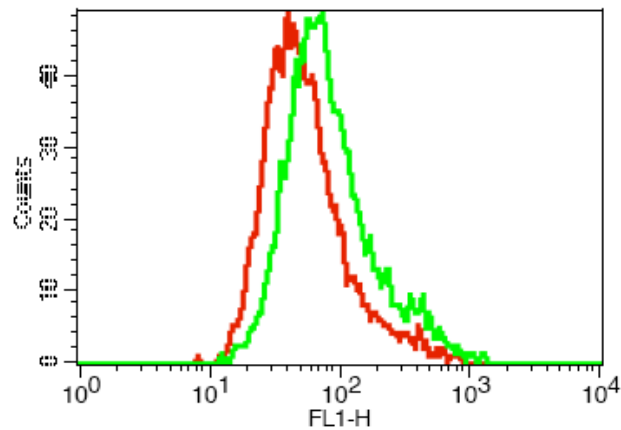


	JC1	Calc.	Pheo.
<span style="color: red;">—</span> Kontrola	55,7	111,4	56,3
<span style="color: green;">—</span> IFN $\alpha$	50,9	73,6	45,7
<span style="color: blue;">—</span> SB203580	57,7	148,5	99,1
<span style="color: yellow;">—</span> IFN $\alpha$ + SB	42,9	87,4	85,8

## „Dye exclusion assays“

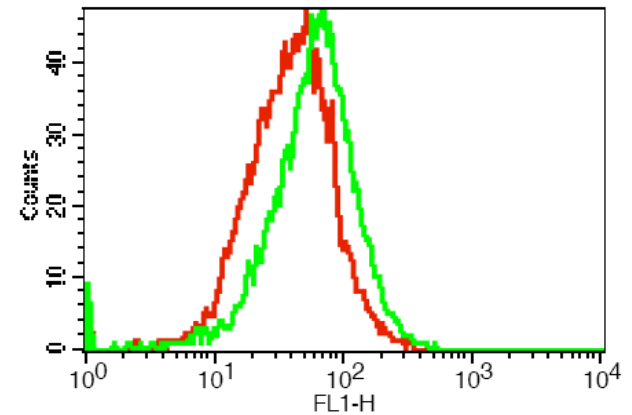
## JC1(MDR1)

median 45.3 67.9

— p38+/+  
— p38-/-

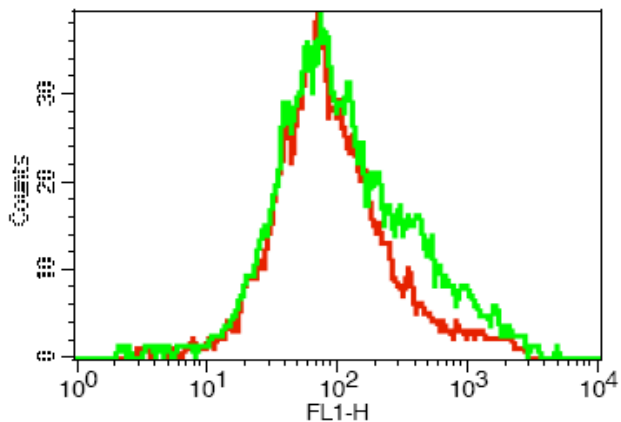
## Calcein AM (MRP1)

median 37.5 57.2



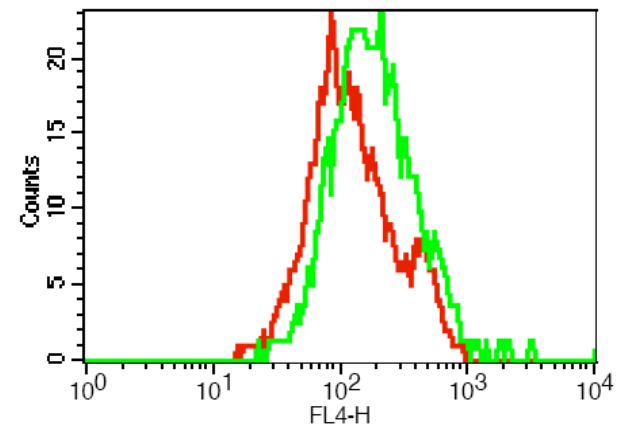
## Bodipy-prazosin (BCRP)

median 74.3 90.5



## Pheophorbid A

median 107.1 164.5



# Substráty ABC transportérů

	HL-60	MDR1	MRP1	BCRP
0,1 mM Actinomycin D	0,71	0,44	0,94	0,42
5 mM Actinomycin D	0,26	0,16	0,78	0,16
0,1 ug/ml Mitomycin	0,91	1,07	0,83	1,13
0,2 ug/ml Mitomycin	0,97	0,87	0,91	1,38
0,4 ug Mitomycin	0,94	0,81	0,94	1,40
0,5 ug/ml Mitomycin	0,61	0,32	0,53	0,63
1 ug/ml Mitomycin	0,69	0,62	0,28	0,61
0,01 nM Roscovitin	0,48	0,77	0,55	0,35
0,1 nM Roscovitin	0,75	0,57	0,42	0,23
0,1 ug/ml Geldanamycin	0,55	0,94	0,86	0,62
0,4 ug/ml Geldanamycin	0,41	0,84	0,75	0,52
0,5 ug/ml Geldanamycin	0,06	0,06	0,34	0,15
1 uM 5-azacytidin	0,93	0,81	0,86	1,22
2 uM 5-azacytidin	0,97	0,74	0,81	1,29
35 uM 5-azacytidin	1,07	0,66	0,90	1,03
0,1 ug/ml Nocodazol	0,49	0,31	0,57	0,48
1 mM Butyrát sodný	0,95	0,71	0,86	1,05
10 uM Pioglitazon	0,93	0,98	1,12	0,80
1 uM Valinomycin	0,89	0,64	0,80	0,48
2 uM Valinomycin	0,76	0,85	0,68	0,74
3 uM Valinomycin	0,56	0,60	0,56	0,99
0,01 uM Camptothecin	0,67	0,63	0,76	0,77
0,1 uM Camptothecin	1,03	0,71	0,76	0,83
10 uM Camptothecin	0,22	0,17	0,62	0,28
2 ug/ml Ionomycin	1,33	1,22	0,95	2,02
3 ug/ml Ionomycin	1,58	1,42	1,05	1,96
5 ug/ml Ionomycin	2,02	1,75	1,09	2,14



- IFN $\alpha$  indukuje stabilní zvýšení aktivity p38 MAPK
- IFN $\alpha$  vede k zvýšení exprese ABC transportérů
- Inhibice p38 sníží expresi ABC transportérů

# Děkuji za pozornost

ABC transporters' by Vicky Summersby, inspired by the Review on p218

