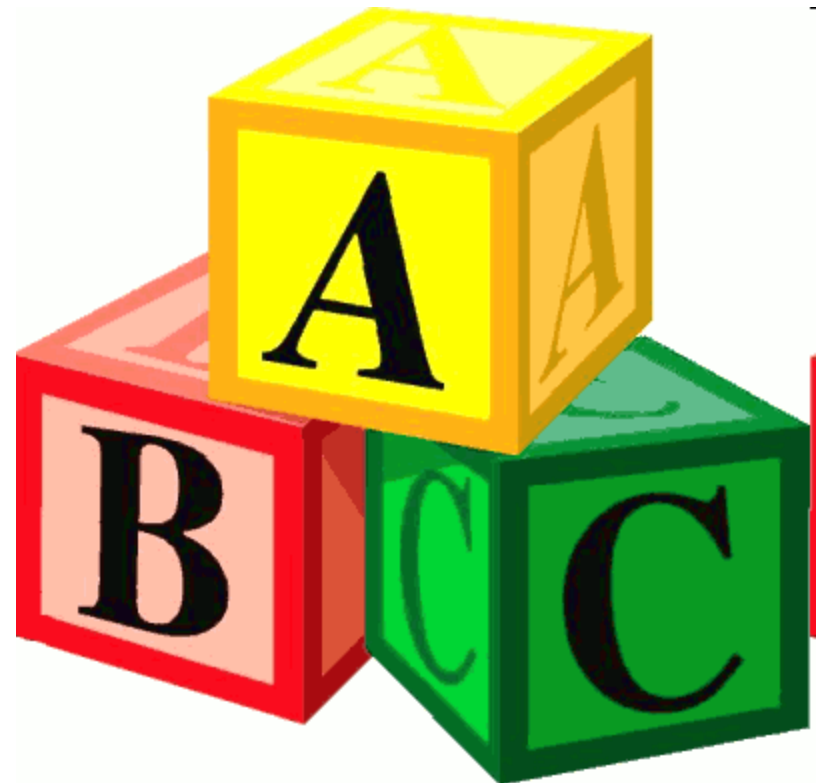
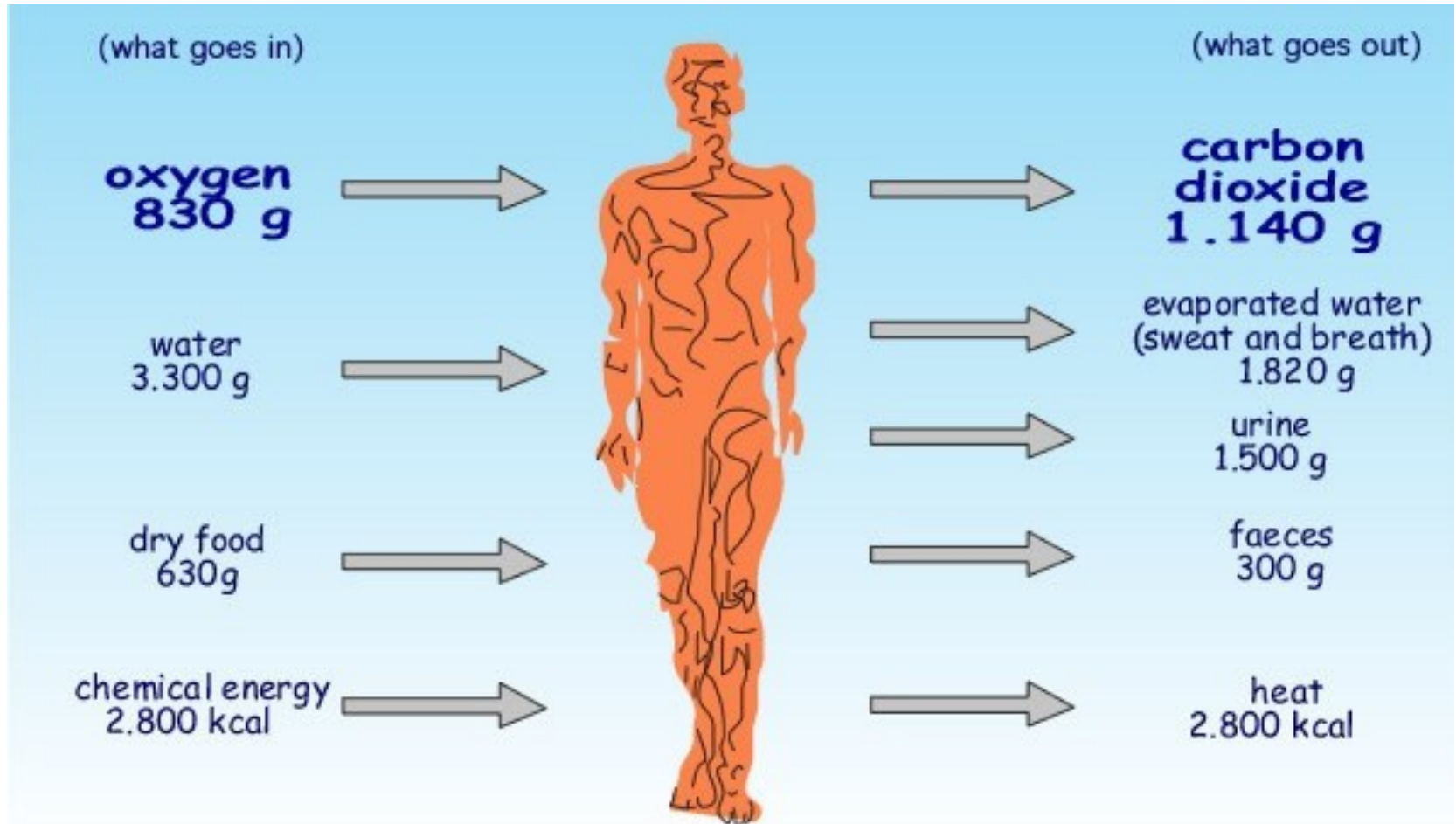


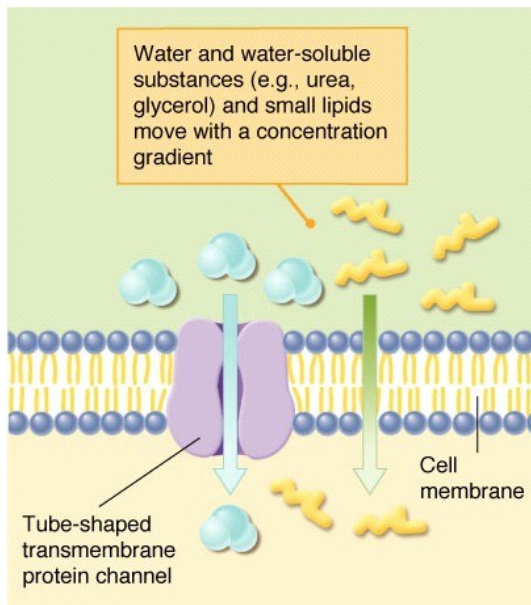
„ABC“ o ABC transportérech

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

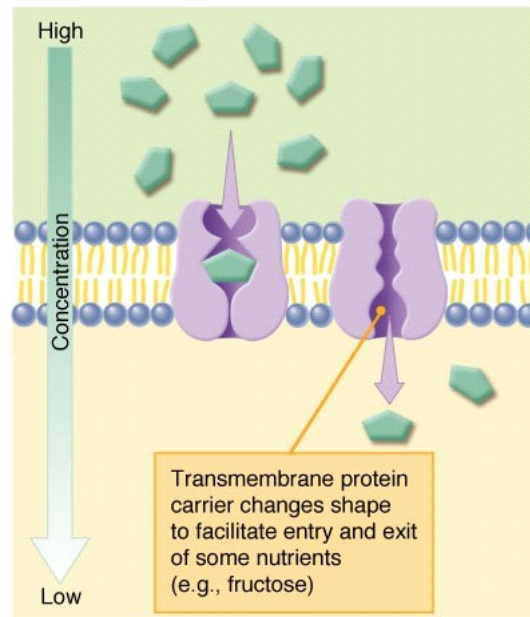




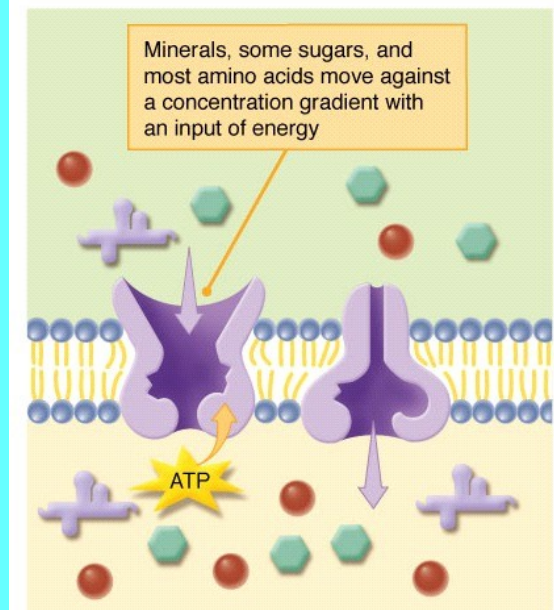
PASSIVE DIFFUSION



FACILITATED DIFFUSION

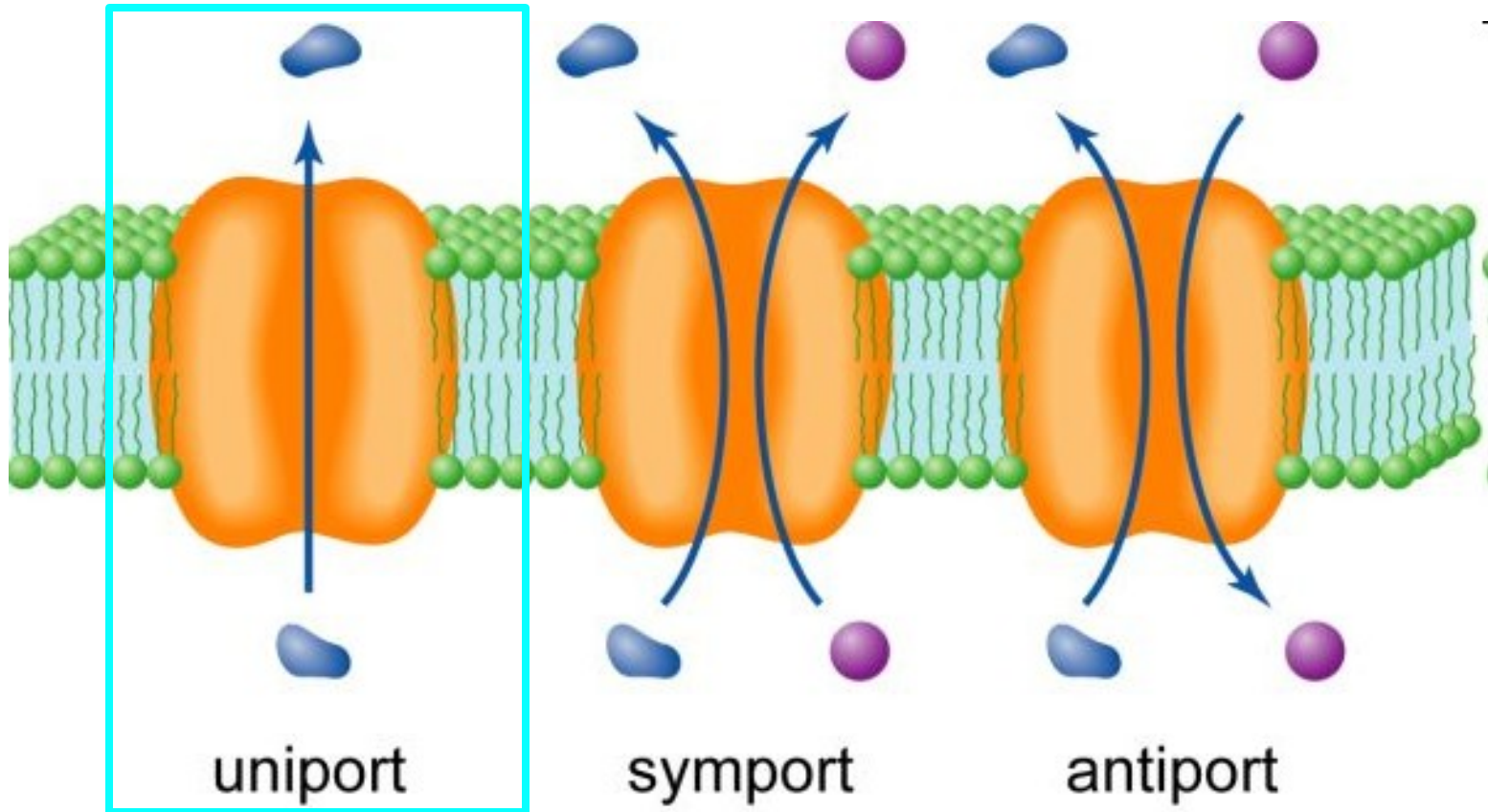


ACTIVE TRANSPORT



Typy aktivního transportu

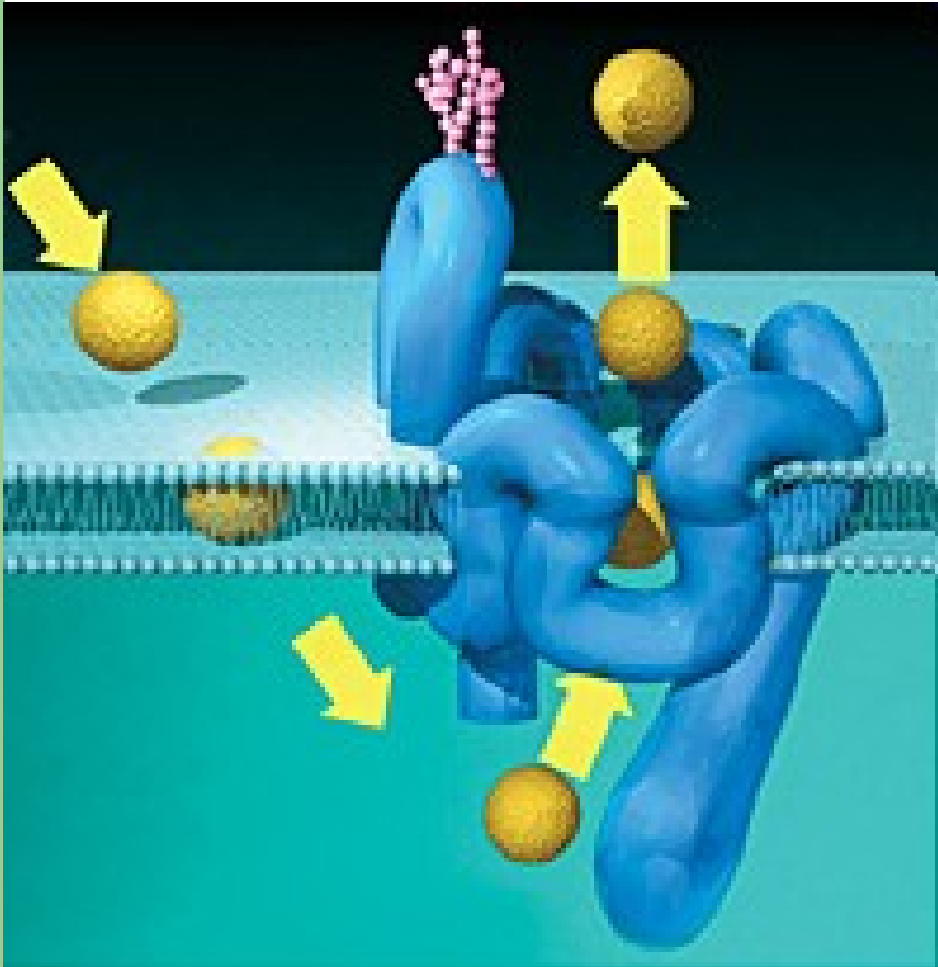
<http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120068/bio04.swf>



Transportér
specifický pro
jednu molekulu

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

Transportér
pro dvě molekuly
v opačném směru

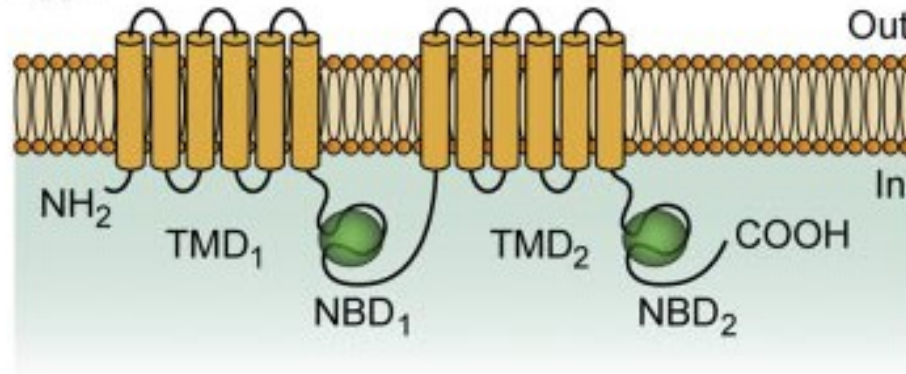


- **ATP-binding cassette**
- Za spotřeby **ATP** pumpují toxické látky/metabolické produkty **VEN** z buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám

NBD = ABC

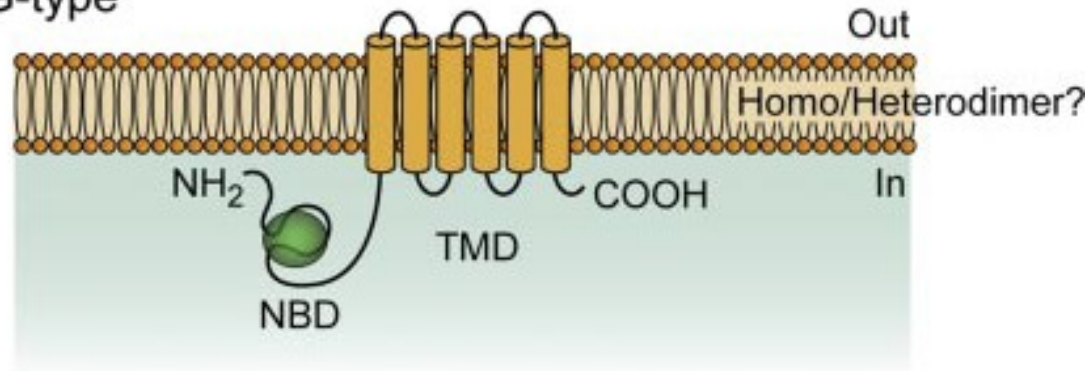
Sarkadi et al., *Physiol Rev* • VOL 86 • 2006

ABCB-type



FULL
Transporter
MDR1, MRP1

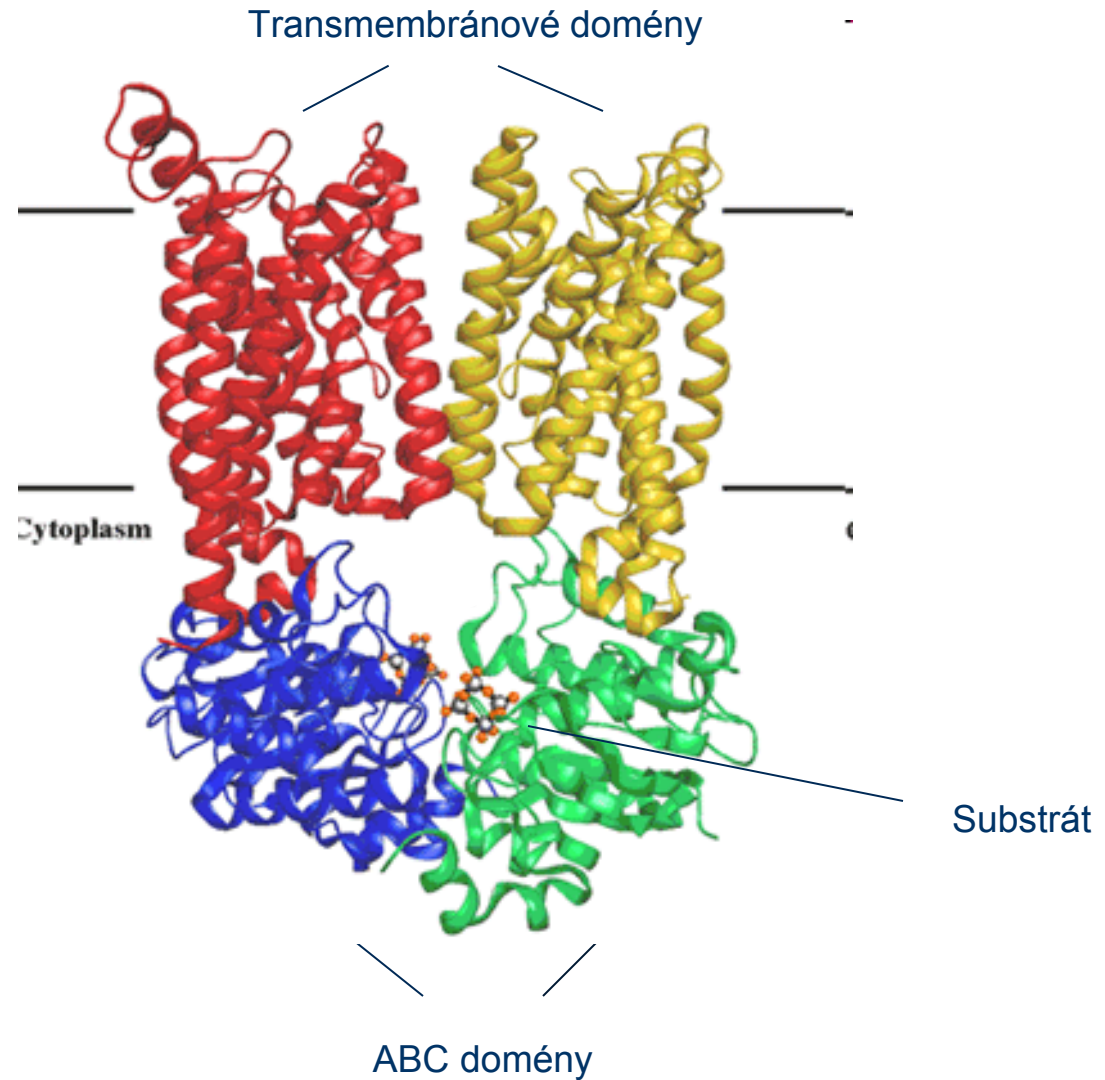
ABCG-type



HALF
Transporter
BCRP

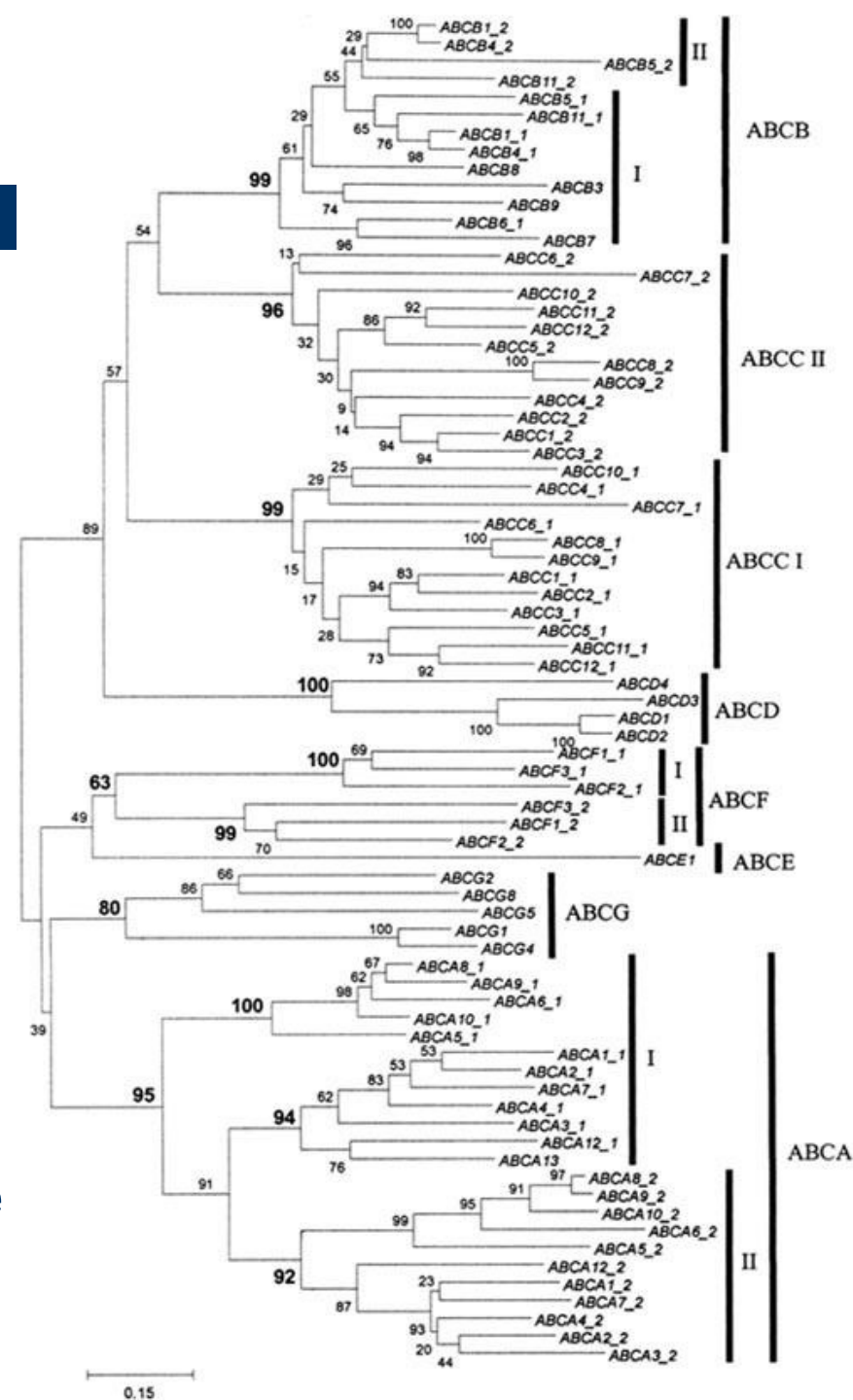
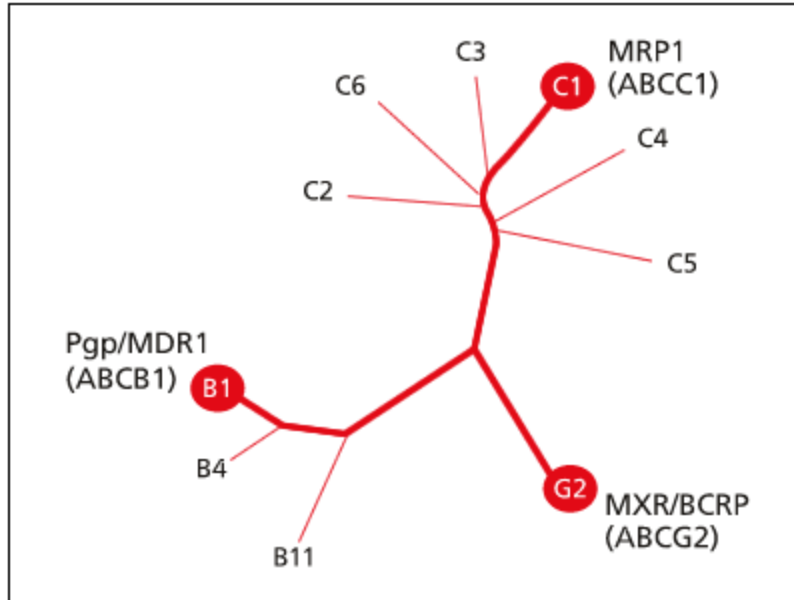
Krystalografická struktura

http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/Rees_Fig1-1.gif&



Filogenetický strom ABC transportérů

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

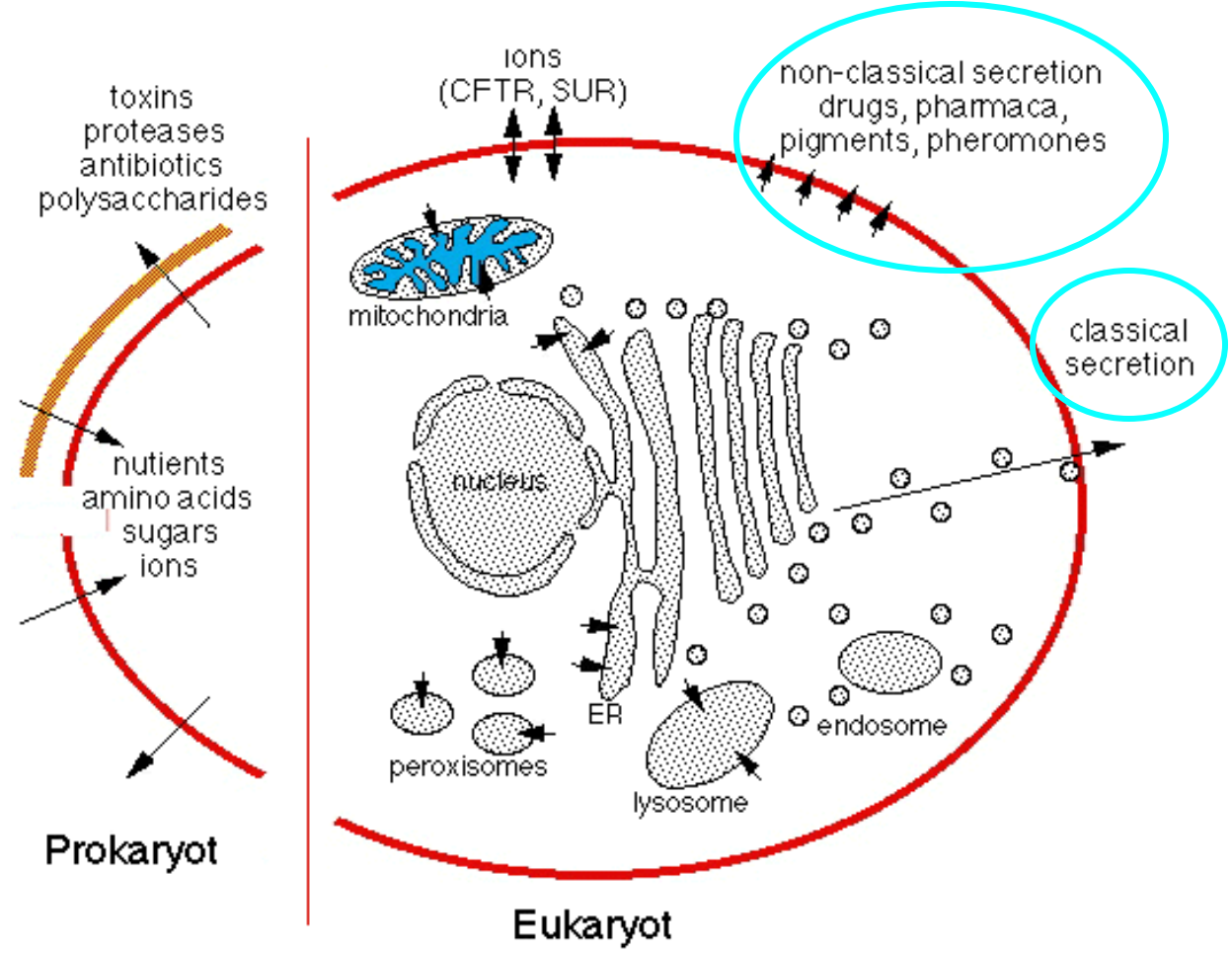


48 různých proteinů u lidí

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

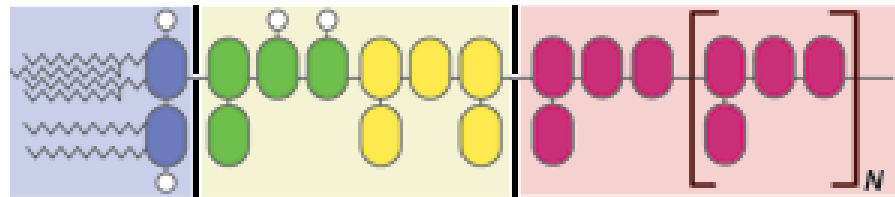
Substráty ABC transportérů - výživa

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

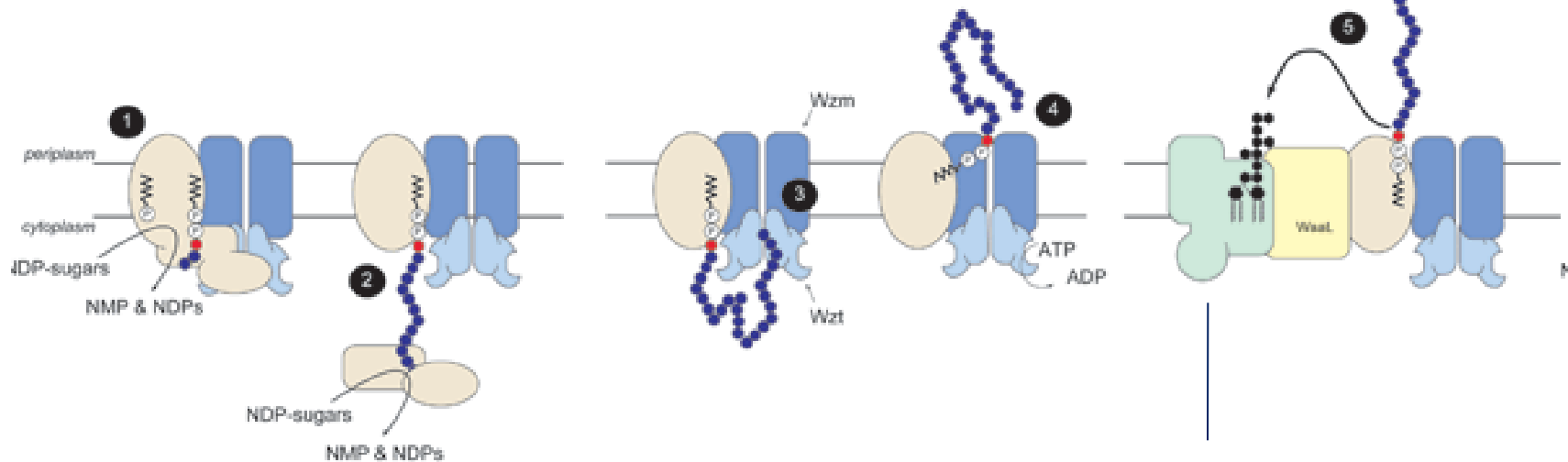
Živina	Membránový Transportér	Efekty
Fytochemikálie z výživy	➤ P-glycoprotein (MDR1)	Inhibice
Flavonoidy (quercetin,) flavonoid glycosidy (genistein-7-glucosid) a flavonoid glucuronidy – ovoce, zelenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) ➤ Multidrug Resistant Protein 2 (MRP 2) ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Akumulace, transport a potenciální efekty živiny
Flavonoid-like molecules (polyphenol phloretin)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) ➤ Multidrug Resistant Protein 2 (MRP 2) ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Akumulace, transport a potenciální efekty živiny
Extrakty z hořkého melounu (1-monopalmitin), grape fruitu (bergamottin and quercetin), sóji	➤ P-glycoprotein (MDR1)	Inhibice
Extrakt z hroznových jader	➤ P-glycoprotein (MDR1)	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"> ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) 	Substrát
Rostlinné výtažky	➤ P-glycoprotein (MDR1)	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

Lipid fukóza N-acetyl
glukosamin galaktóza



Polysacharid

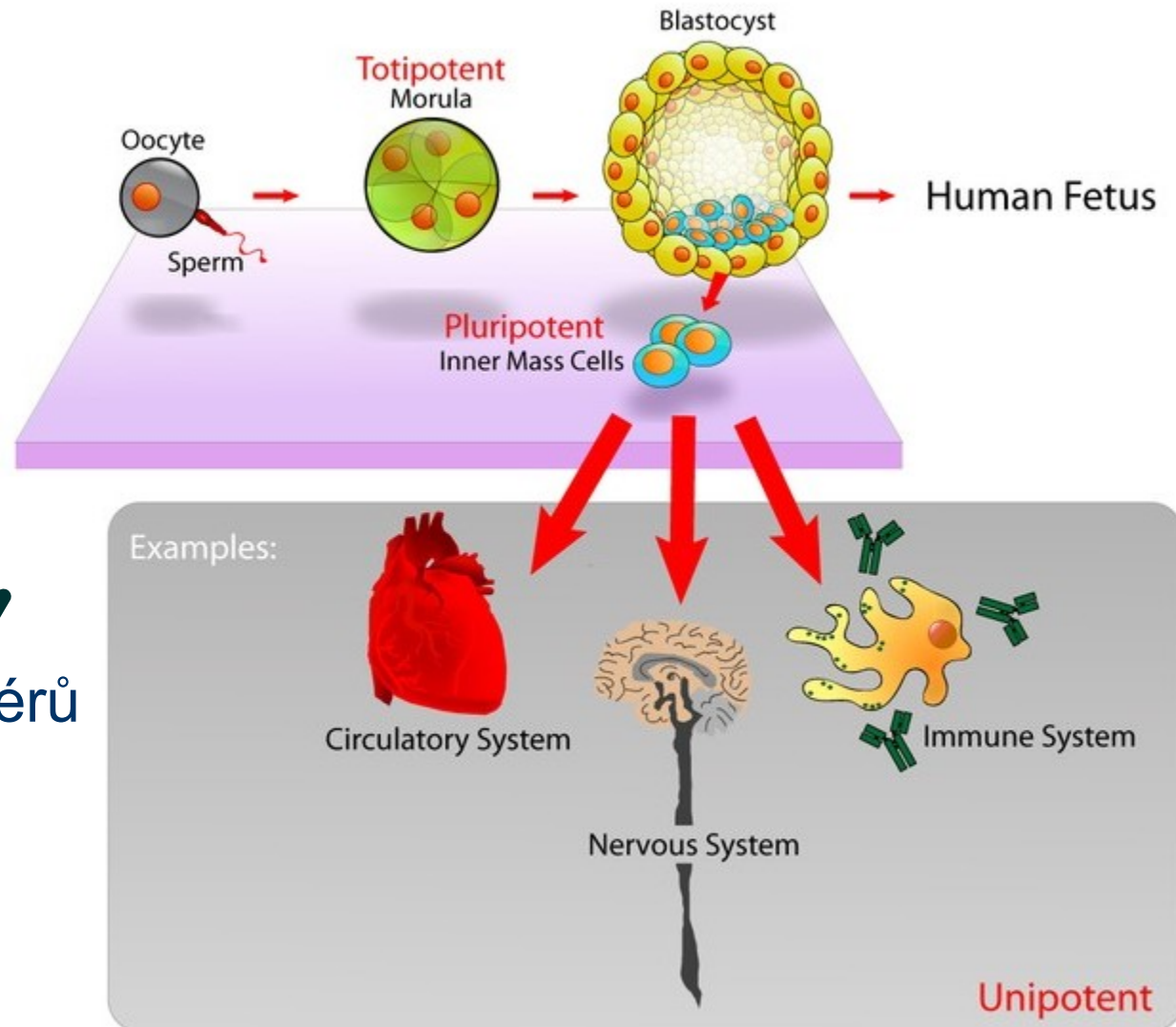


Lipidové jádro

Kmenové buňky

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

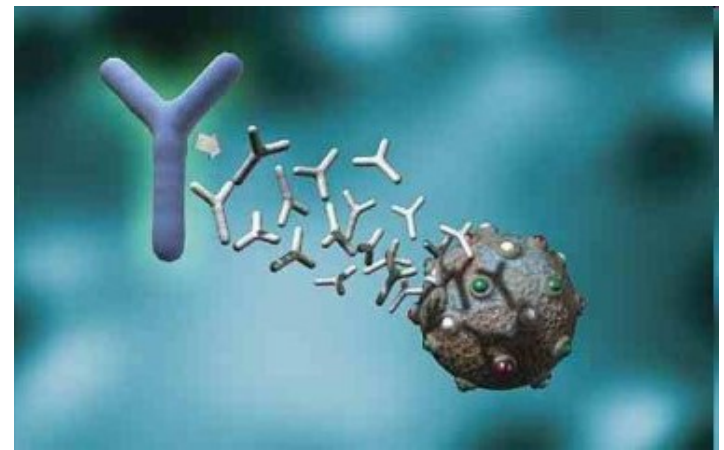
- Bodipy-prazosin

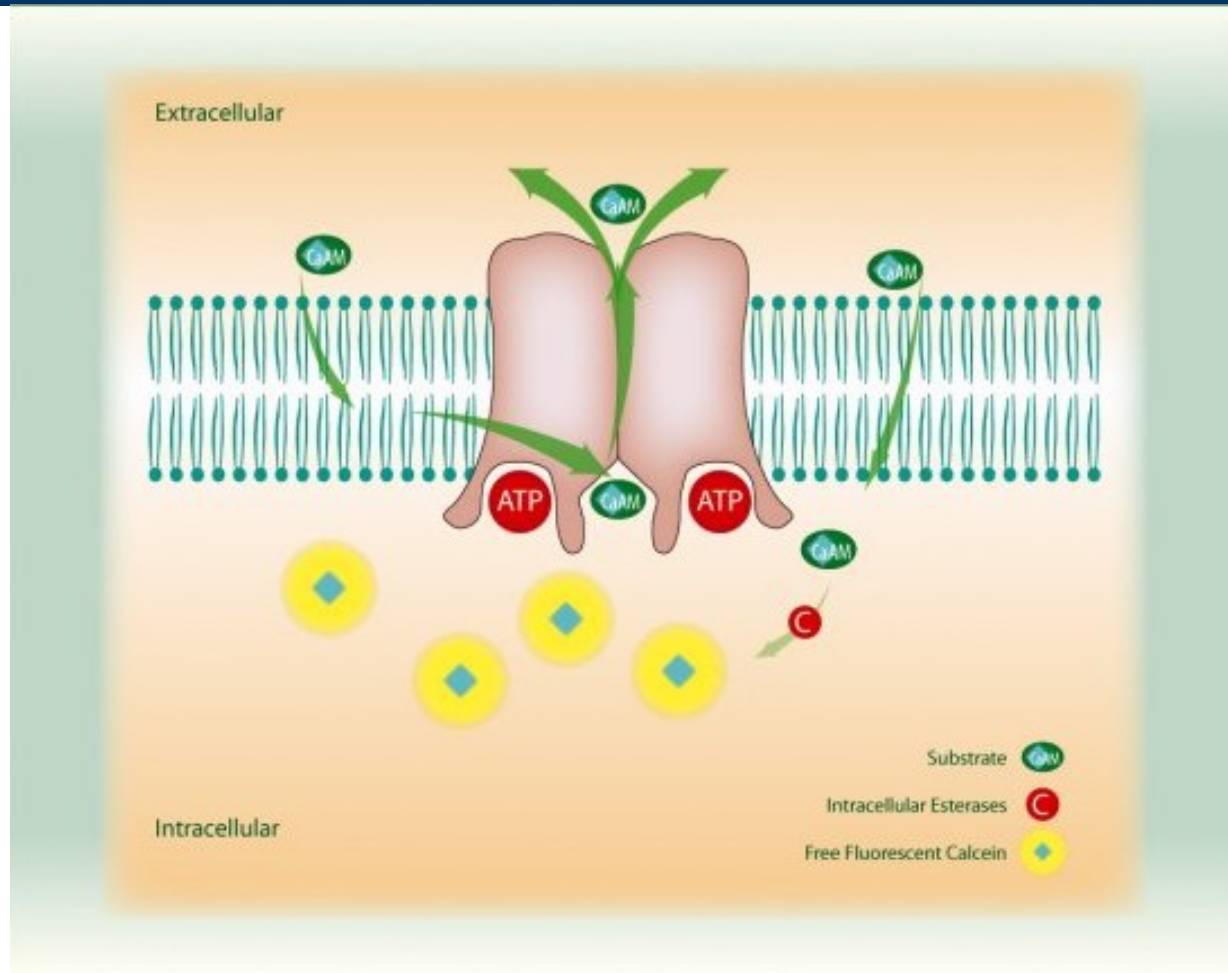
- Pheophorbid A

Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

Imunodetekce

qRT-PCR



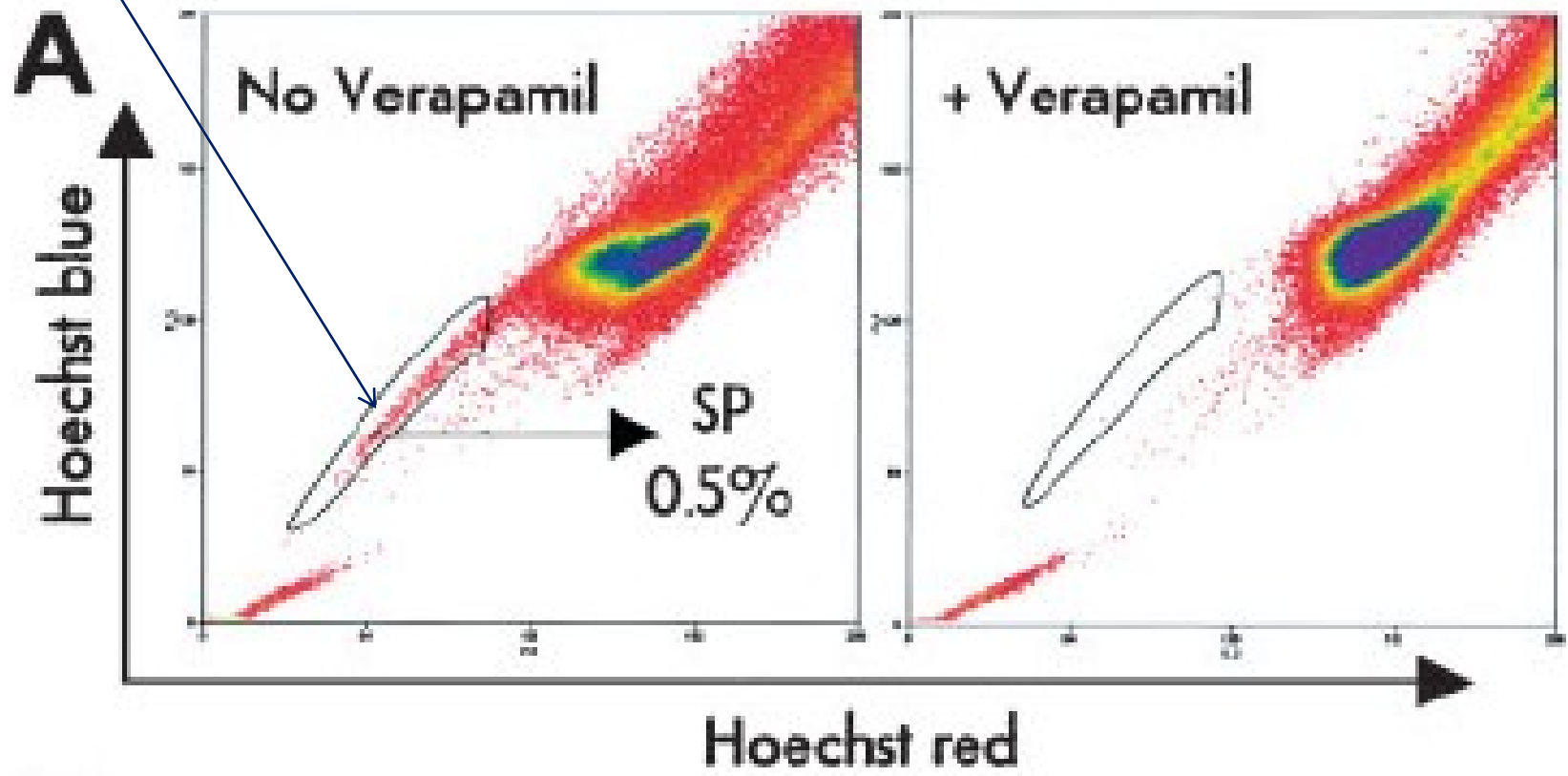


Calcein AM je substrátem MRP1, MDR1
Inhibitory - MK571, NSAID, cyclosporin D, reversin

„SP“ buňky

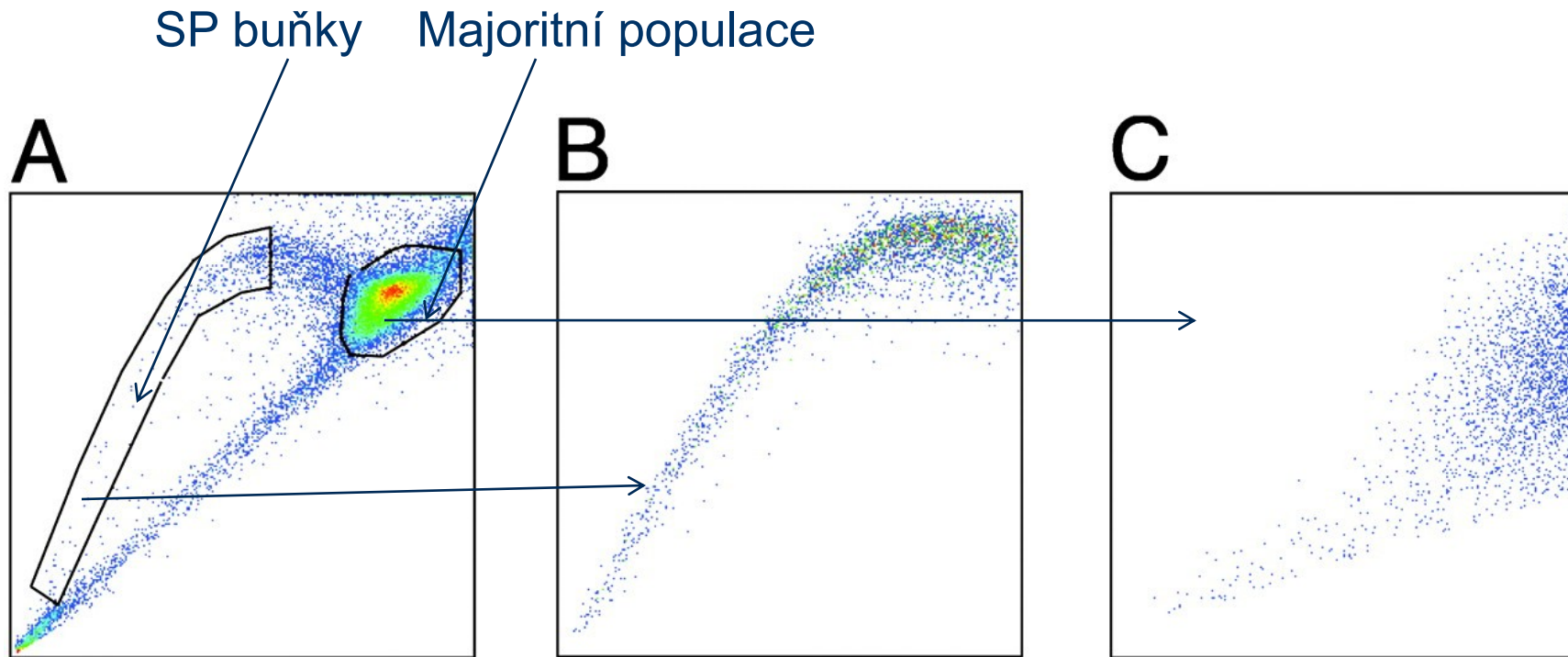
Hoechst 33342 - substrát BCRP, MDR1
- inhibitor verapamil

<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

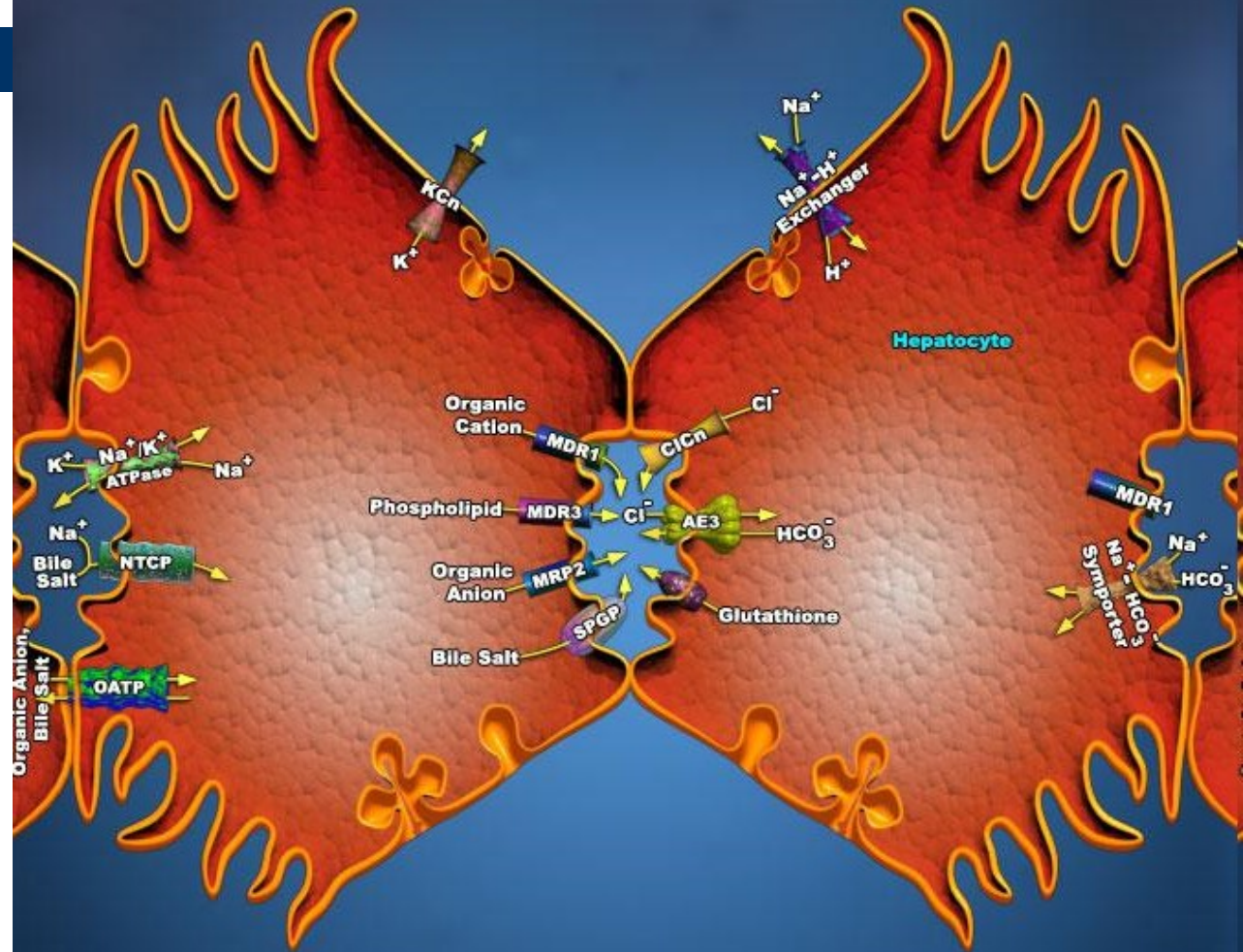
B: SP buňky z neuroblastomové buněčné linie produkují SP a ne-SP

C: Buňky majoritní populace zůstávají jen majoritními

Rozhraní
krev vs. Hepatocyty
Transport látek

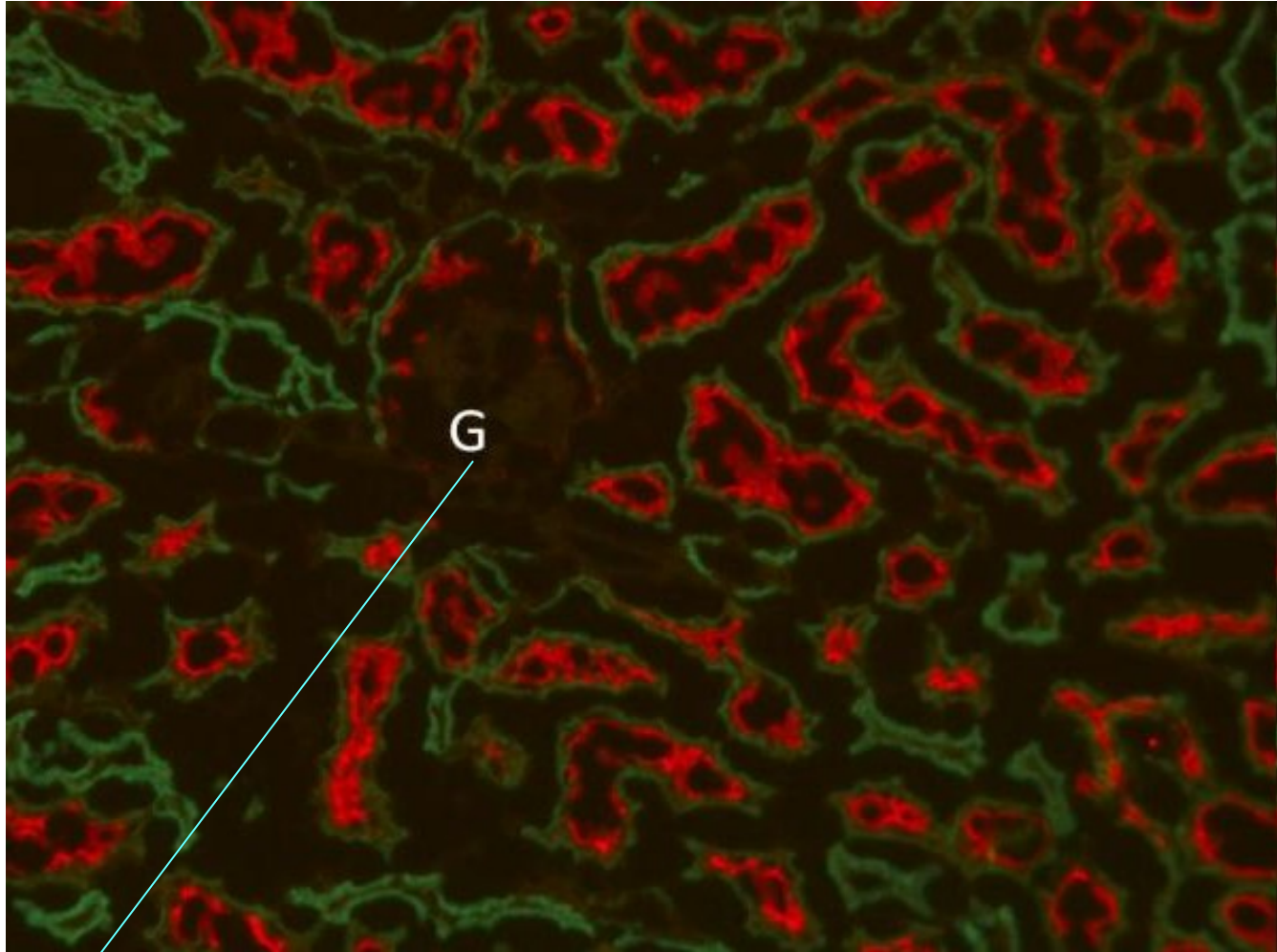
Regenerace –
MDR + BCRP

Hepatic ABC Transporters



Regenerace ledvin

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



glomerulus

BCRP

Transporter Na⁺

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

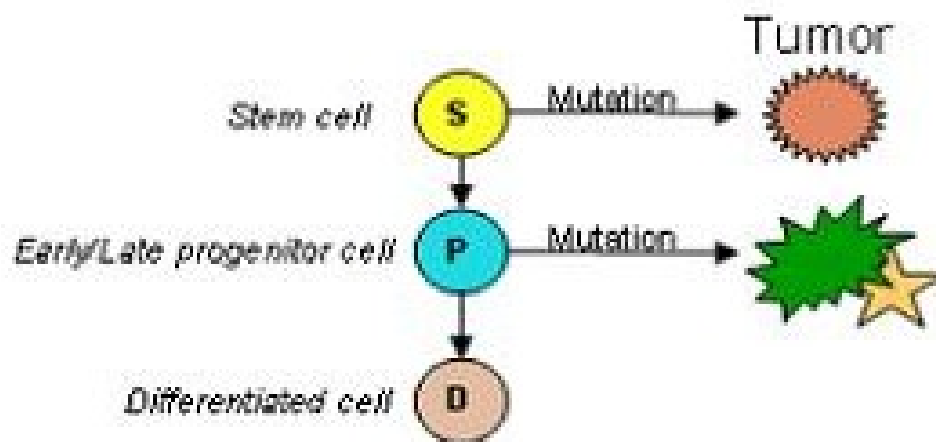
Pseudoxanthoma elasticum (*ABCC6*) – mineralizace a fragmentace elastinových vláken, problém s vitamínem K

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

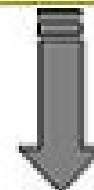
Patologický výskyt

Nádorová kmenová buňka

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

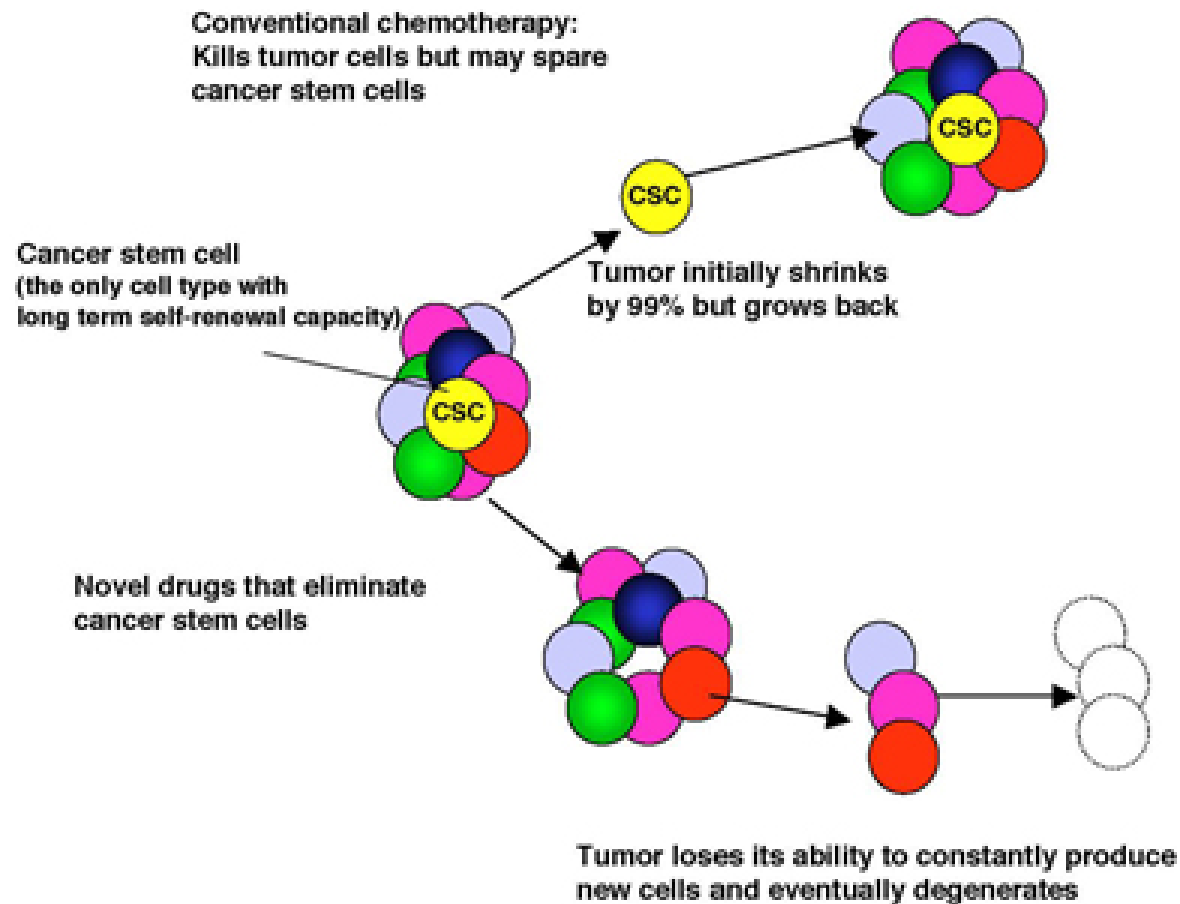


Tumors from Stem cells
Heterogenous cancer
Increased metastatic potential



Tumors from late progenitor cell
Homogenous cancer
Less metastatic potential

Strategie léčby



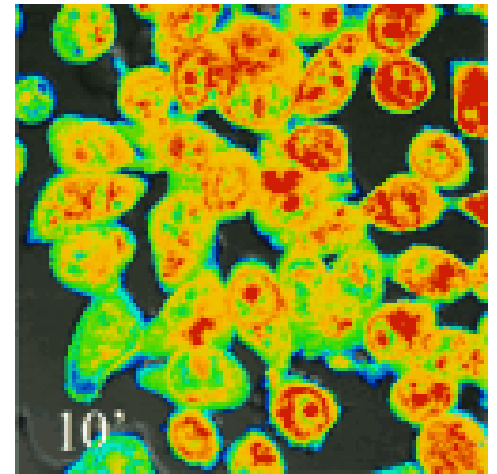
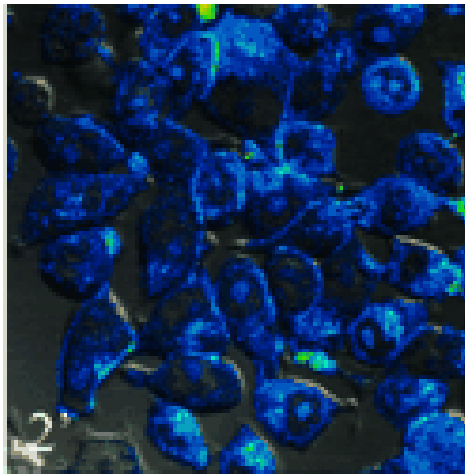
- Selhání chemoterapie (nádorové b. jsou obvykle citlivější než „zdravé“ buňky)
- *De novo*/získaný fenotyp MDR (cytotoxic *in vitro* MTT-assay)
- Mechanizmy:
 - Změny v metabolických drahách, které se podílejí na detoxifikaci látek
 - Změny v reakci organismu na poškození DNA
 - Změny v aktivitě topoizomerázy 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

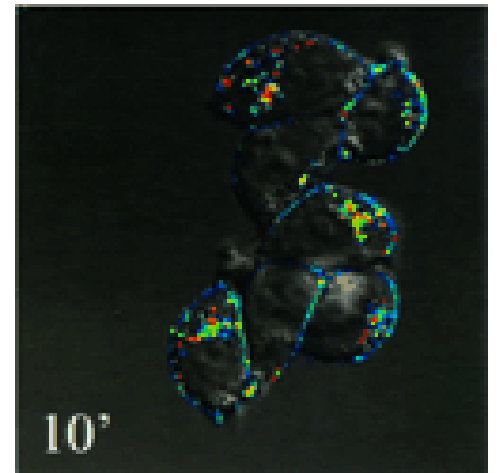
Dean et al.: *THE ROLE OF THE ABC TRANSPORTERS DRUG RESISTANCE AND PHARMACOLOGY*

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

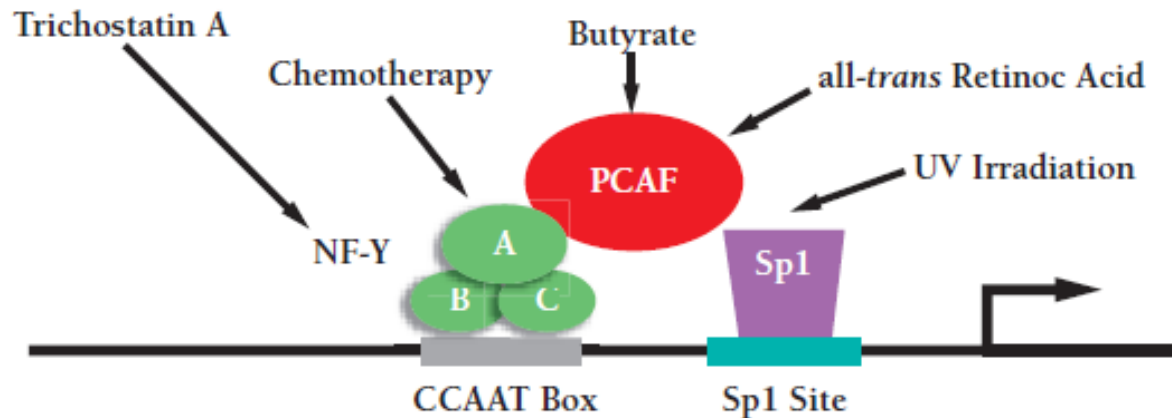
CML: Gleevec

Bladder: M + Vinblastine + Adriamycin + C

Myeloma: Vincristine + Adriamycin + D or MP

Aktuální projekt

ABC transportéry



MDR1 enhancesom: 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 – enhancesom
- Rychlé zvýšení exprese po inkubaci s jejich substráty (doxorubicin, vinca alkaloidy, etoposid, taxely) = **jak zamezit zvýšení exprese dřív než nastane???**

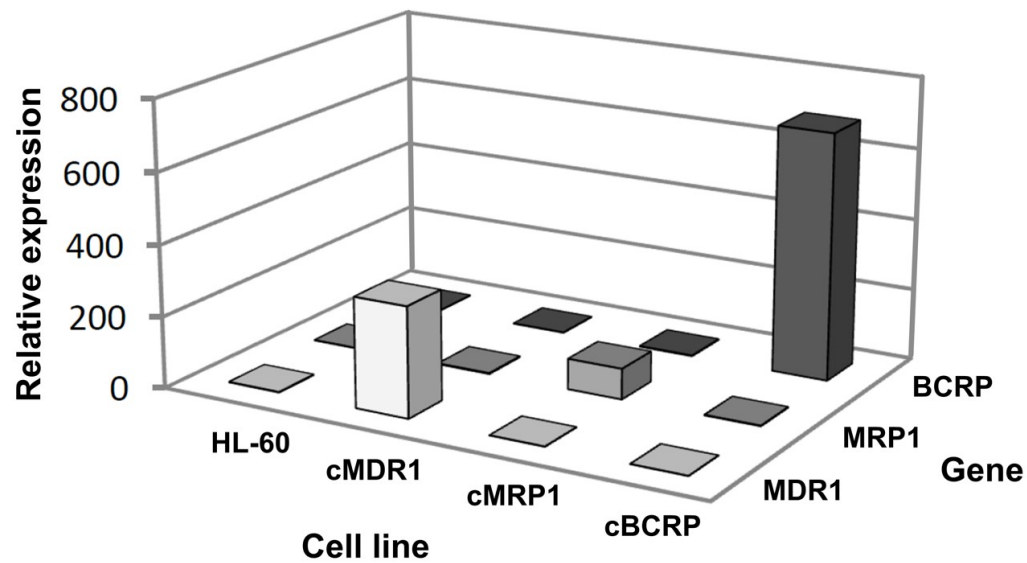
Studium signálních drah vedoucích k zvýšené expresi ABC transportérů ve stresových podmínkách

Substráty ABC transportérů

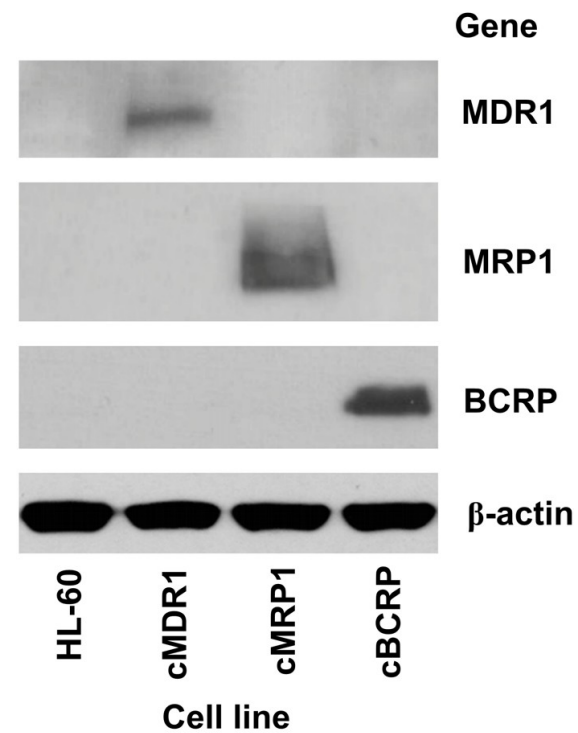
	HL-60	MDR1	MRP1	BCRP
0,1 mM Actinomycin D	0,71	0,44	0,94	0,42
5 mM Actinomycin D	0,26	0,16	0,78	0,16
0,1 ug/ml Mitomycin	0,91	1,07	0,83	1,13
0,2 ug/ml Mitomycin	0,97	0,87	0,91	1,38
0,4 ug Mitomycin	0,94	0,81	0,94	1,40
0,5 ug/ml Mitomycin	0,61	0,32	0,53	0,63
1 ug/ml Mitomycin	0,69	0,62	0,28	0,61
0,01 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

ABC nadexprimující HL-60

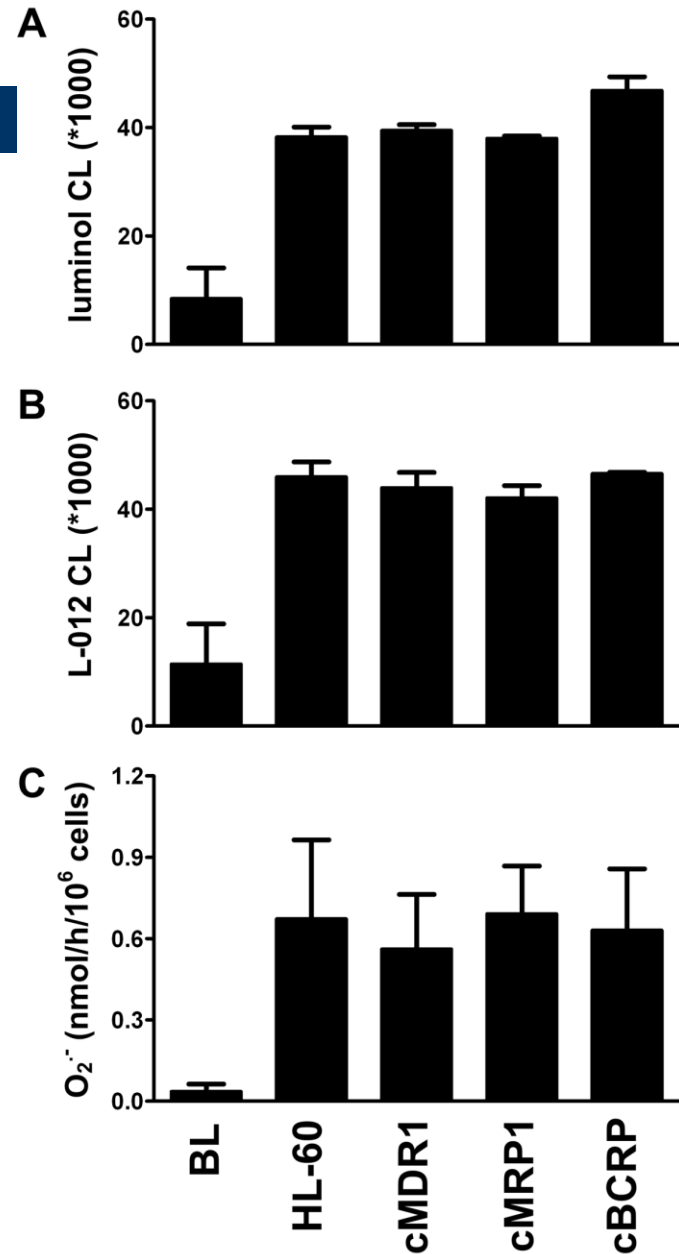
A

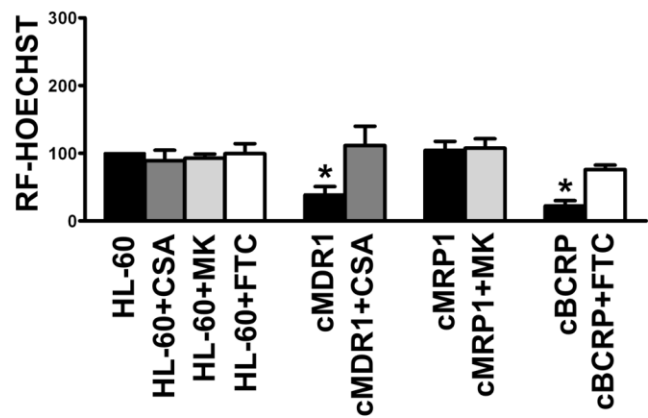
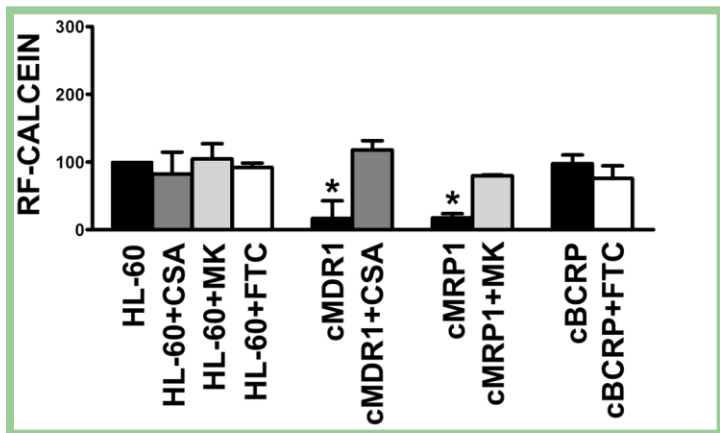
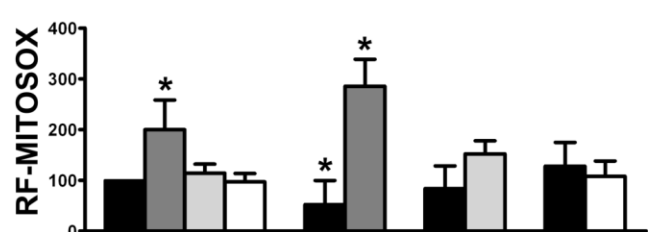
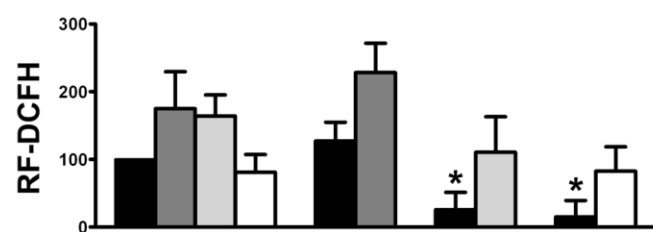
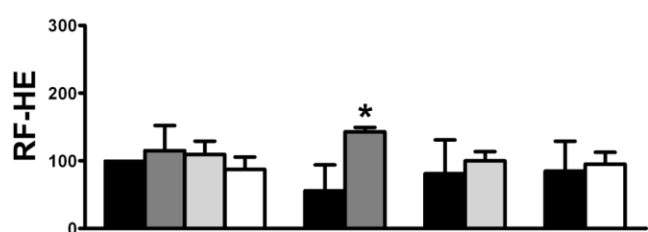
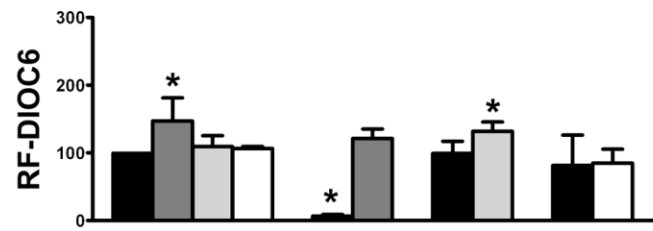
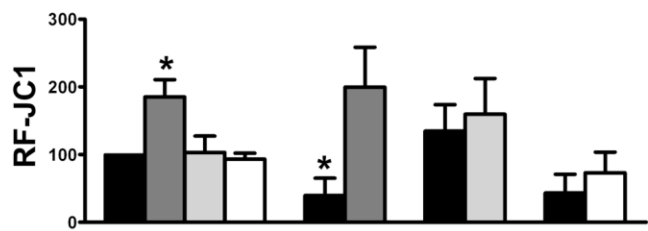
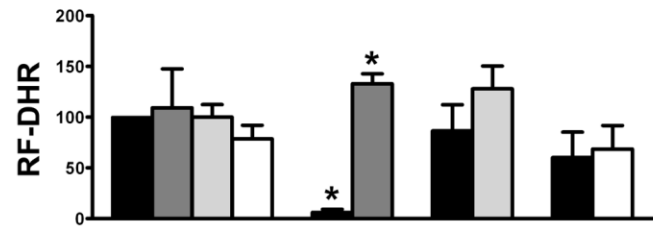
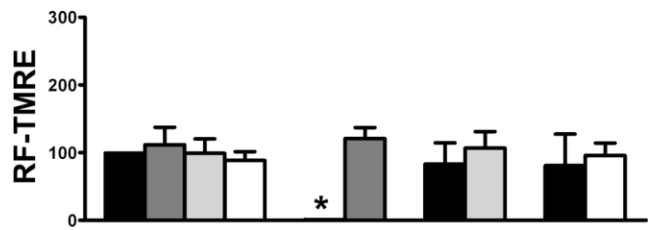


B



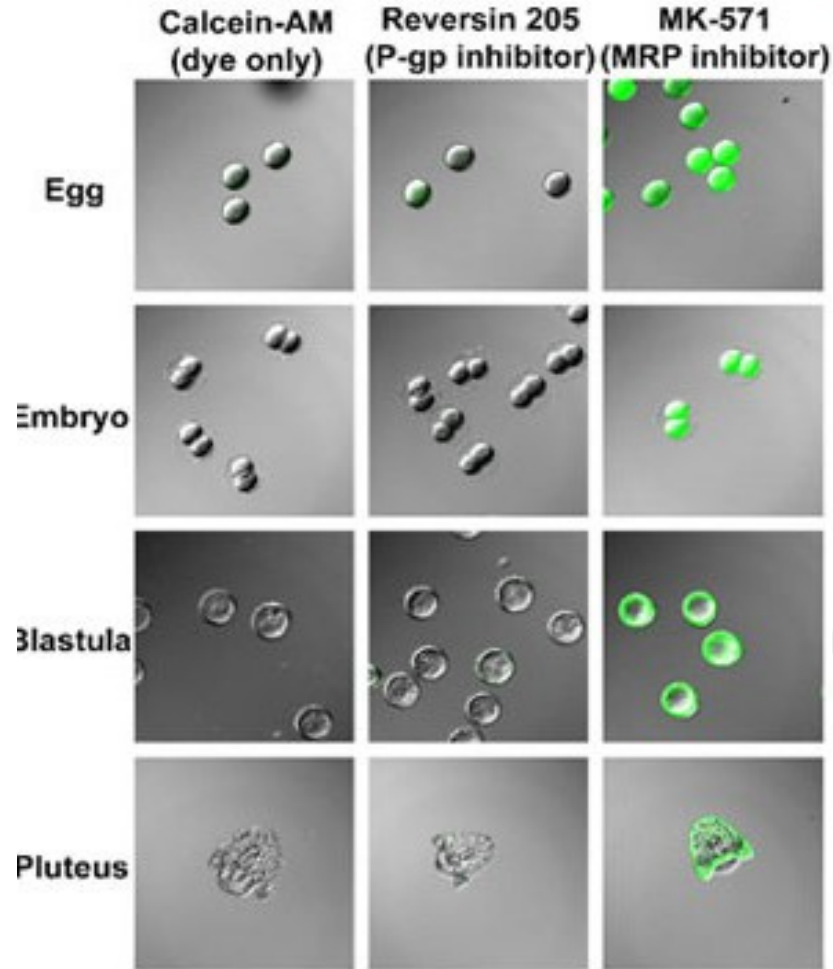
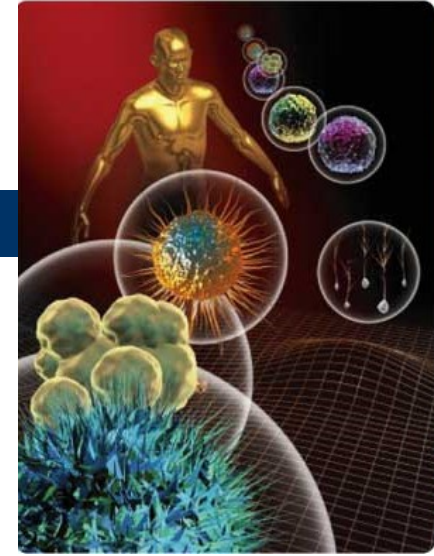
Všechny linie odvozené z HL60 produkují stejné množství ROS





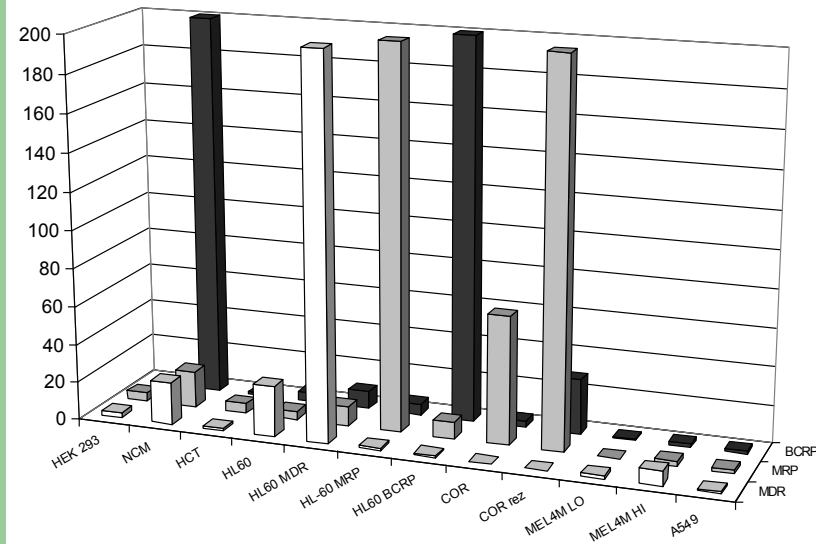
■ no inhibitor ■ MK
 ■ CSA ■ FTC

http://www.bml.ucdavis.edu/facresearch/images/cherr_fig8.jpg

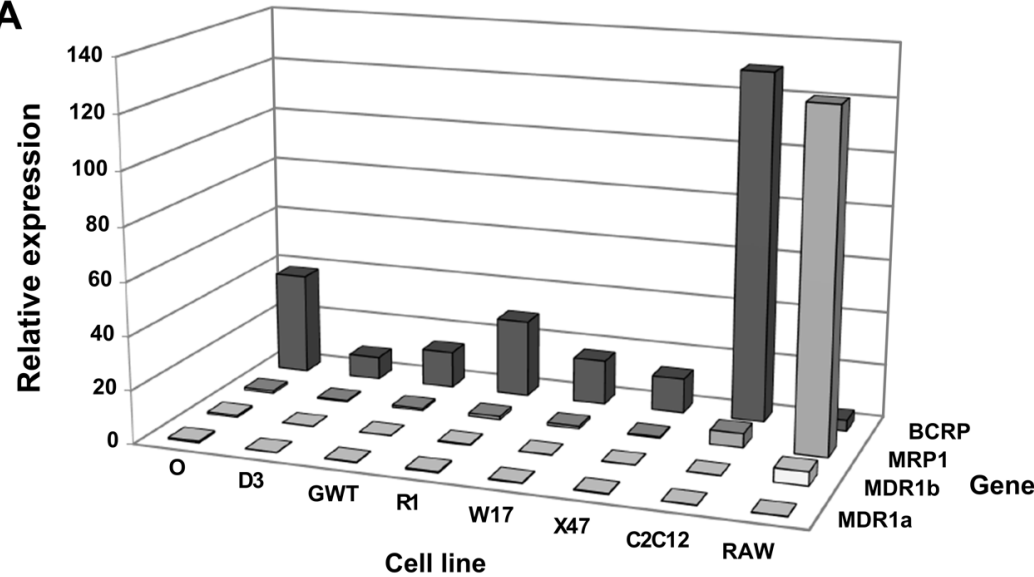


MDR1/Pgp << MRP1

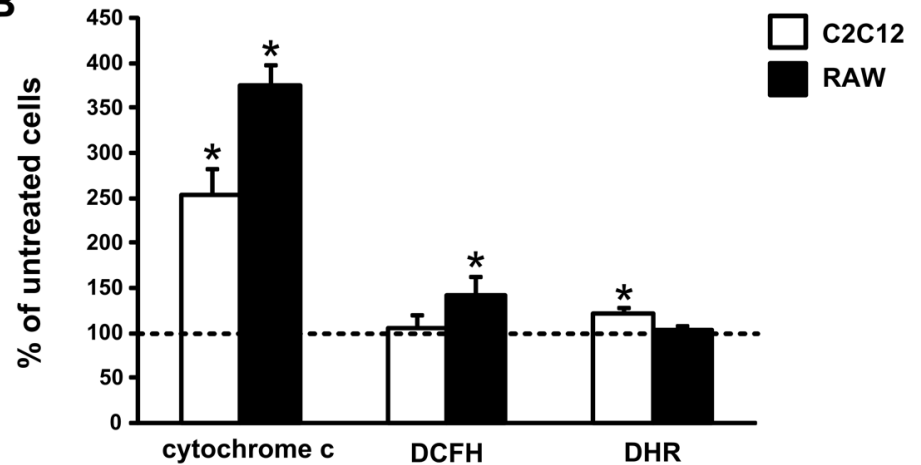
qRT PCR



A



B



Falešně negativní
výsledek je způsoben
nevhodnou kombinací
substrátu a linie

- ABC transportéry přenášejí látky aktivně VEN z buňky
- Důležité pro obranu organismu
- Jejich nadměrná exprese v rakovinných buňkách vede k multilékové rezistenci
- Substrátem ABC transportérů jsou i fluorescenční próby pro stanovení ROS, mitochondriální funkce

Děkuji za pozornost

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



jipro@sci.muni.cz