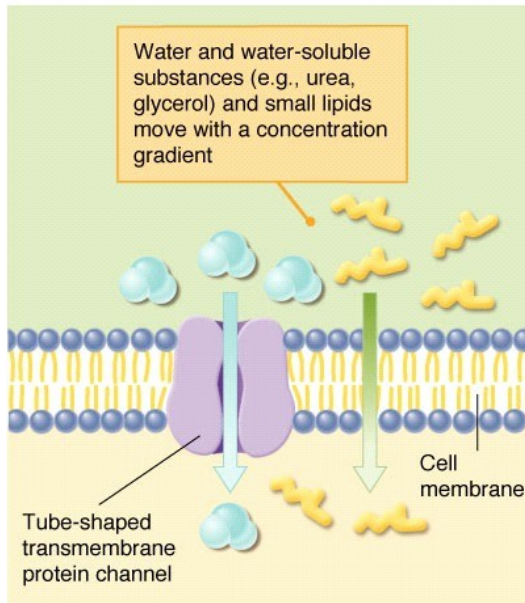


„ABC“ o ABC transportérech

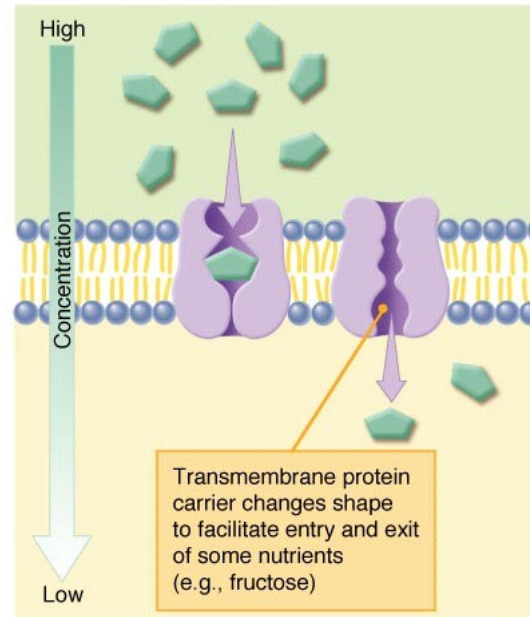
- Aktivn a pasivn transport ivin
- ABC transportéry
- Fyziologická role
- Kmenov buky
- Asociace s chorobami CNS
- Ndorov bujen
- Multilkov rezistence
- Detekce ABC transportr
- Aktuln projekty



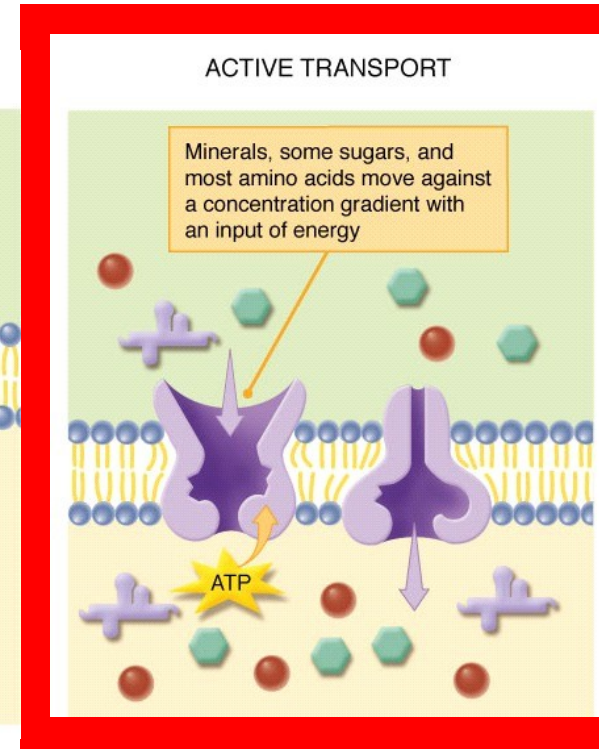
PASSIVE DIFFUSION

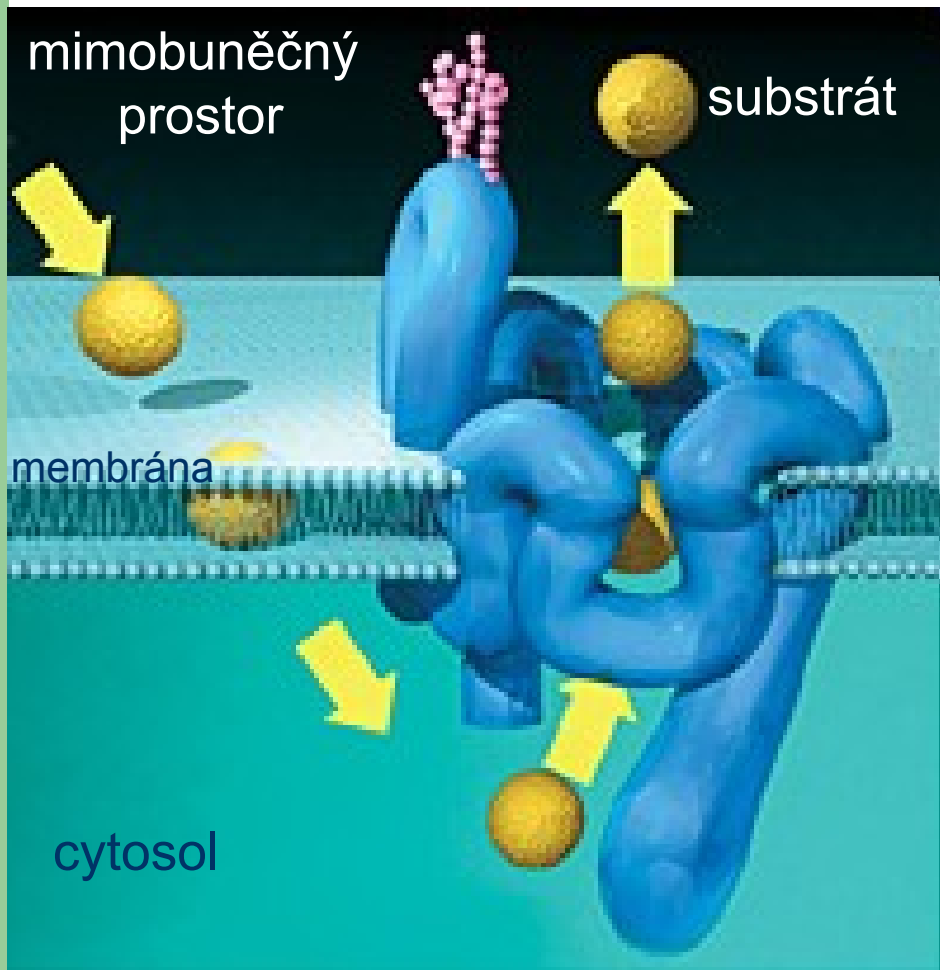


FACILITATED DIFFUSION



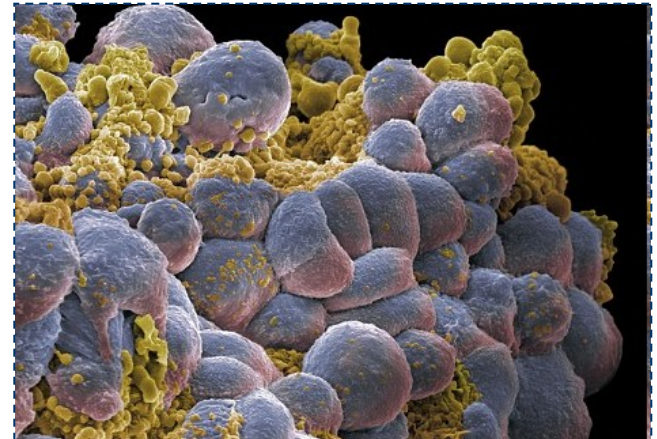
ACTIVE TRANSPORT





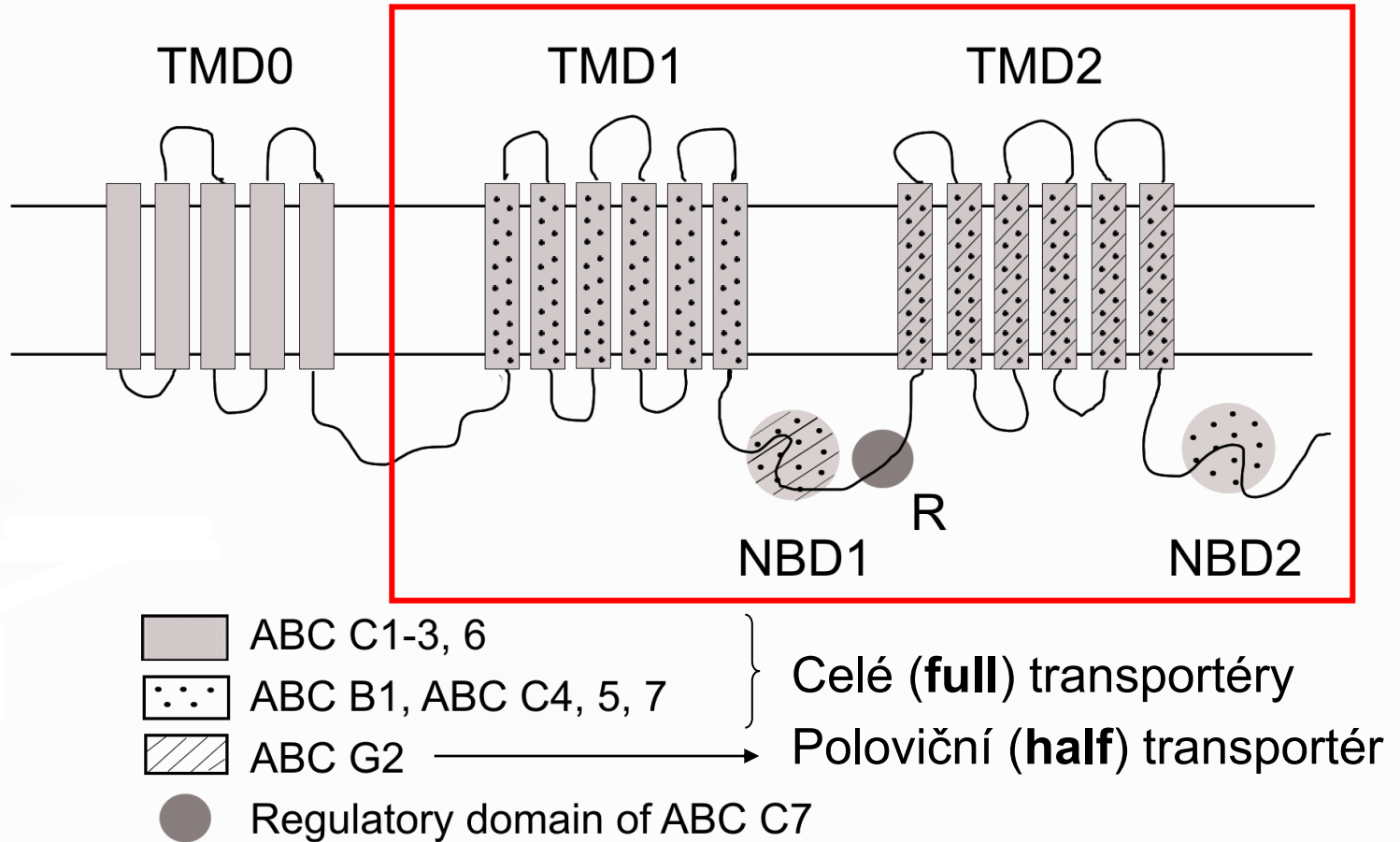
- **A**TP-**b**inding **c**assette
= NBD doména
- Za spotřeby **A**TP pumpují toxické látky/metabolické produkty **V**EN z buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám

- 50. léta – jak jednobuněčný plankton přežije ve slané vodě?
- 60. léta – iontové pumpy závislé na ATP
- 70. léta – transportéry větších molekul závislé na ATP
- 80. léta – nadměrná exprese ABC transportérů způsobuje rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapii
- Zaměření se na **MDR1, MRP1, BCRP**
- Až dosud – hledání látek, které inhibují funkci nebo expresi ABC transportérů



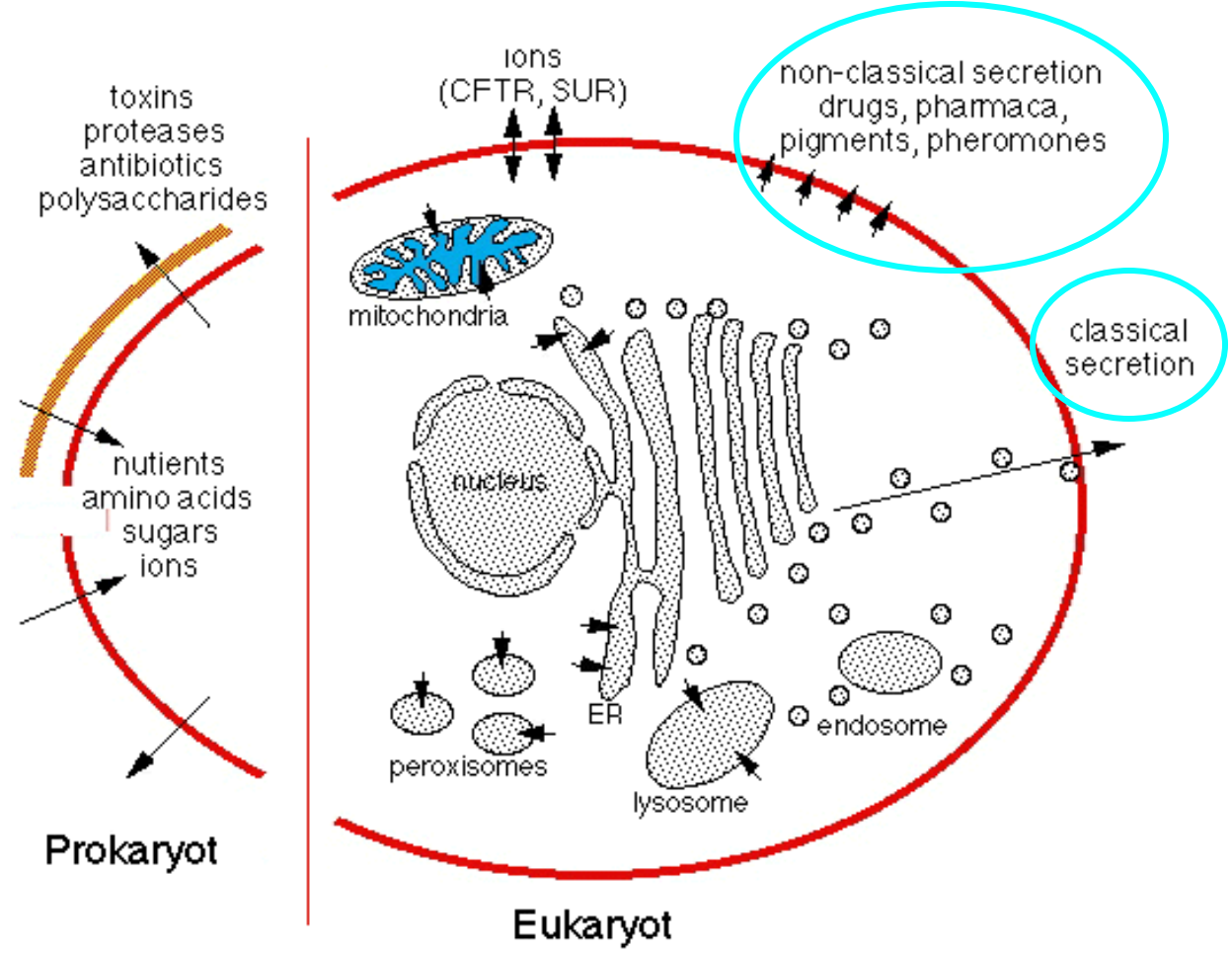
Struktura

NBD ... nukleotid (ATP) vázající doména
TMD ... transmembránová doména
R ... regulační doména



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



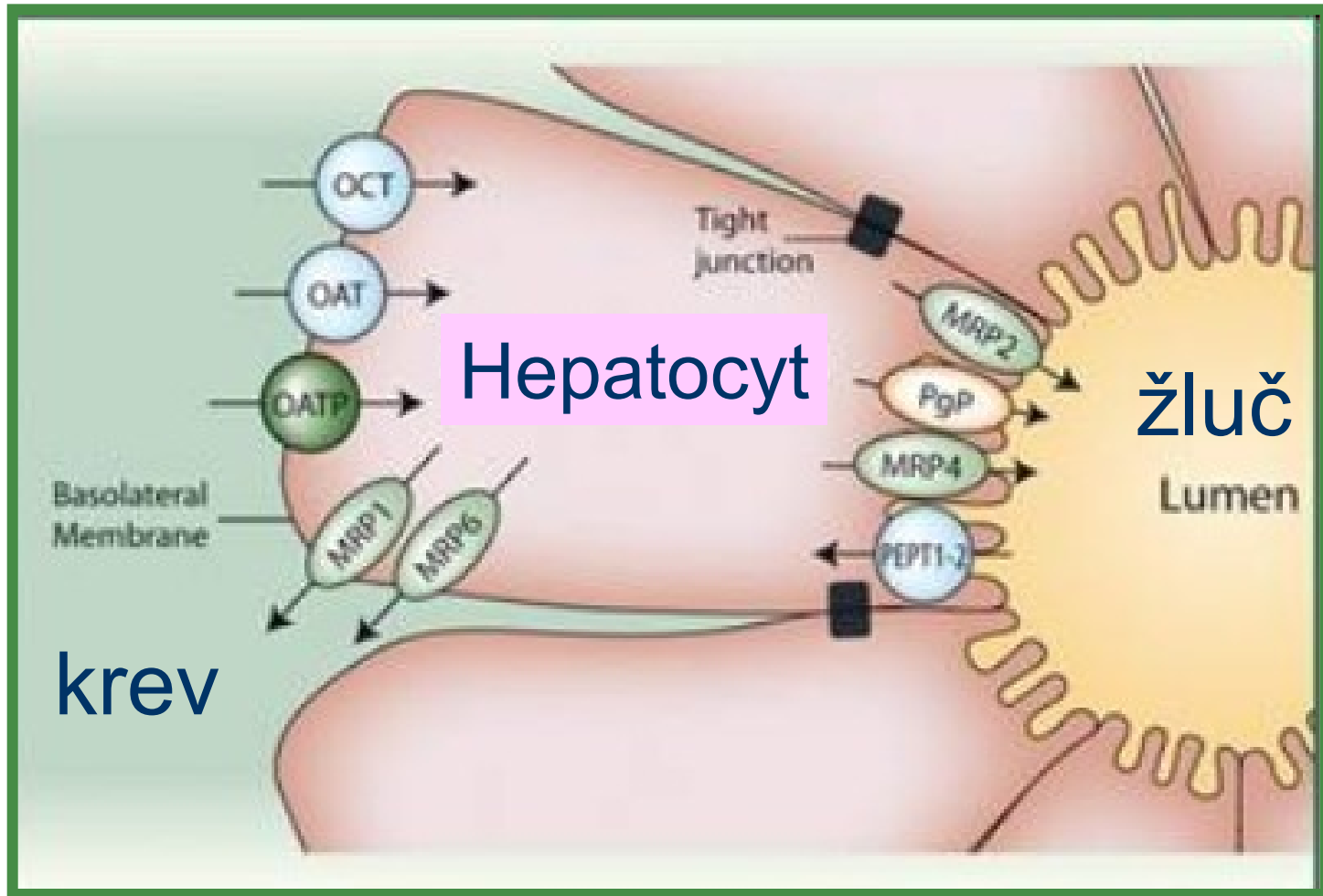
Kanál	Příklady fyziologických substrátů
MDR1	Konjugáty estrogenu, endorfin, glutamát, beta-amyloid, steroidy, PAF
MRP1	Konjugáty glutationu a glukuronidu s leukotrienem C4, bilirubinem, žlučovými solemi
BCRP	Vitamíny (riboflavin, biotin), porfyriny, konjugáty estrogenu

Substráty ABC transportérů - výživa



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

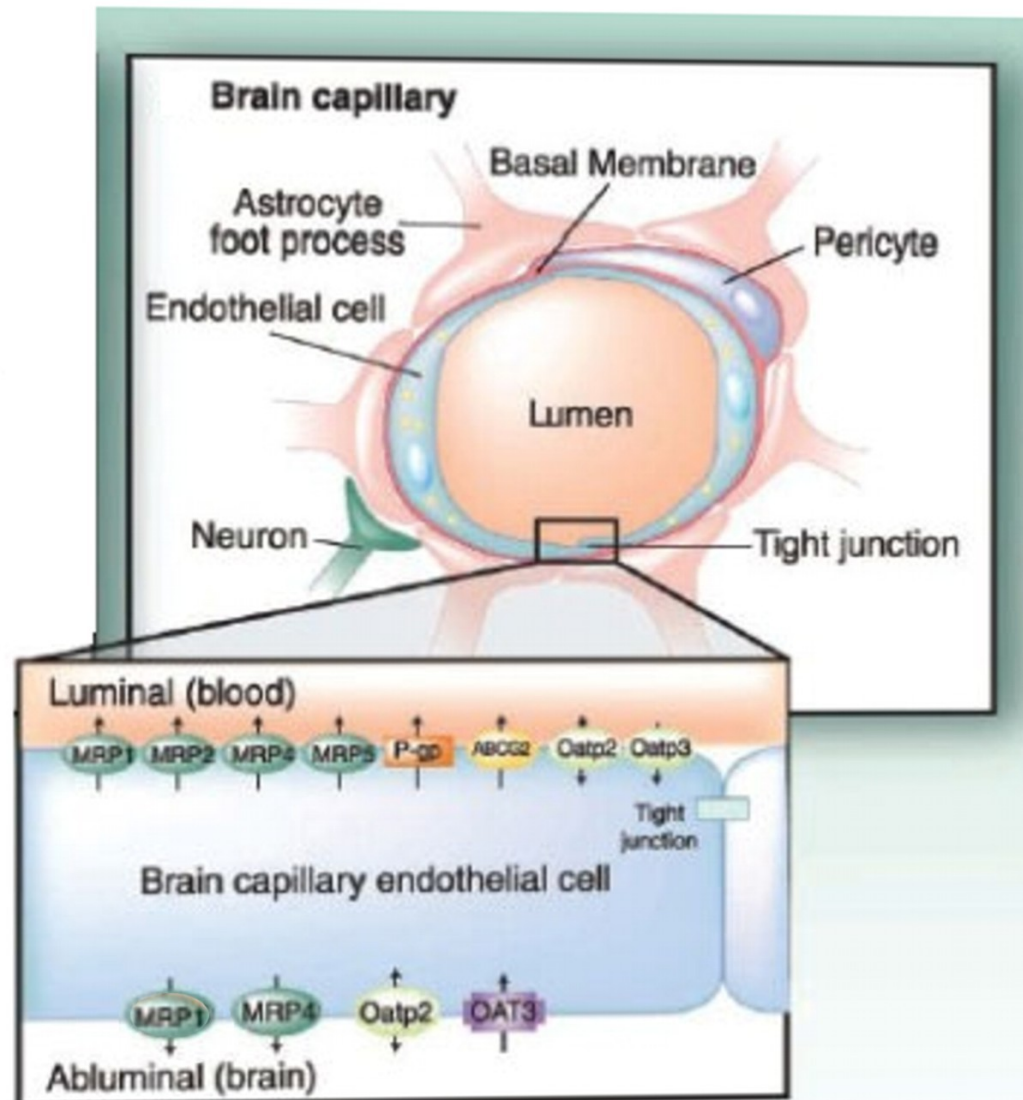
Živina	Membránový Transportér	Efekty
Flavonoidy (quercetin) jejich glukosidy a glukuronidy – ovoce, zelenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1) ➤ Multidrug Resistant Protein 2 (MRP 2) ➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR) ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Substrát
Extrakty z hořkého melounu (1-monopalmitin), grapefruitu (bergamottin and quercetin), sóji	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Inhibice
Extrakt z hroznových jader	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Inhibice
Steroly (e.g. Cholesterol)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ABCA1, ABCG1, ABCG5 and ABCG8 	Substrát
Sezamové semínko (Isophosphatidylcholine, linoleoyl)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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 Curcumin, ginsenosidy, piperin, katechiny ze zeleného čaje, silymarin, hyperforin z kávy	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P-glycoprotein (MDR1) 	Substrát/inhibitor



Krevně mozková bariéra

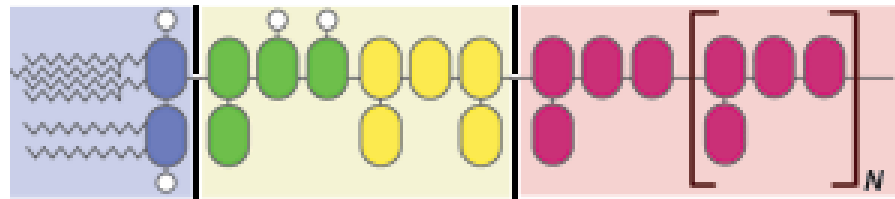
Ochrana citlivých tkání před toxickými látkami z krve

<http://www.medscape.org/viewarticle/711587>

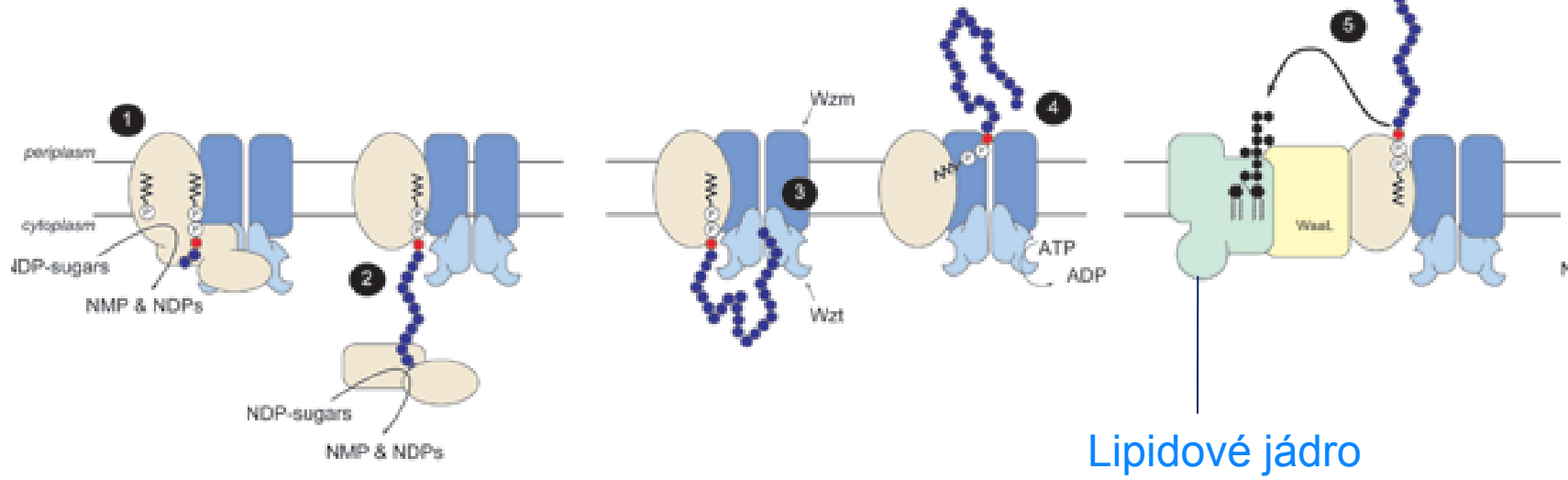


http://www.uoguelph.ca/~cwhitfie/images/abc_transporter.gif

Lipid fukóza N-acetyl
glukosamin galaktóza



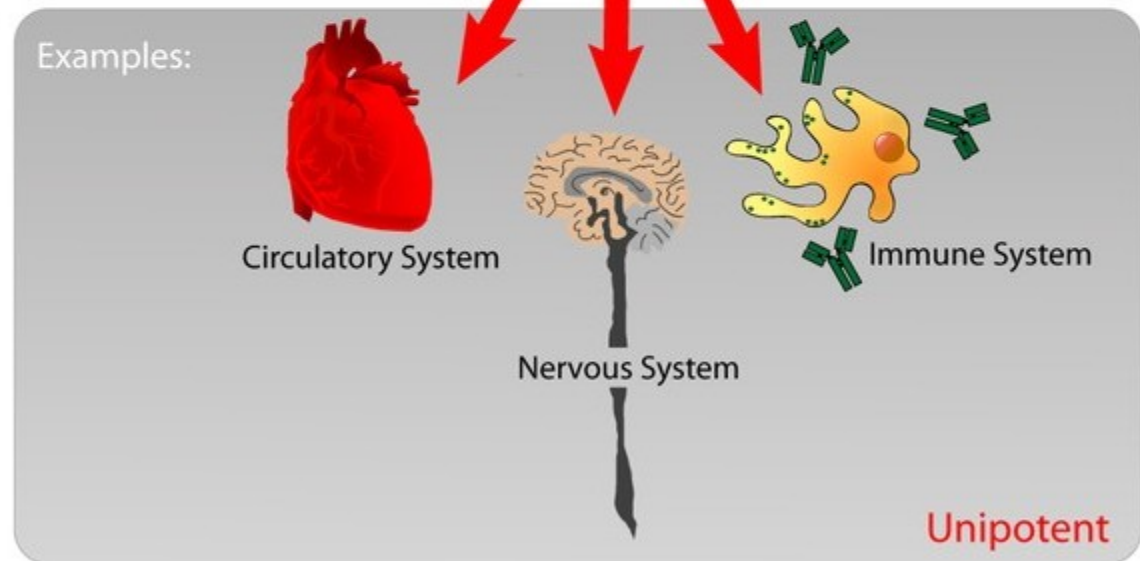
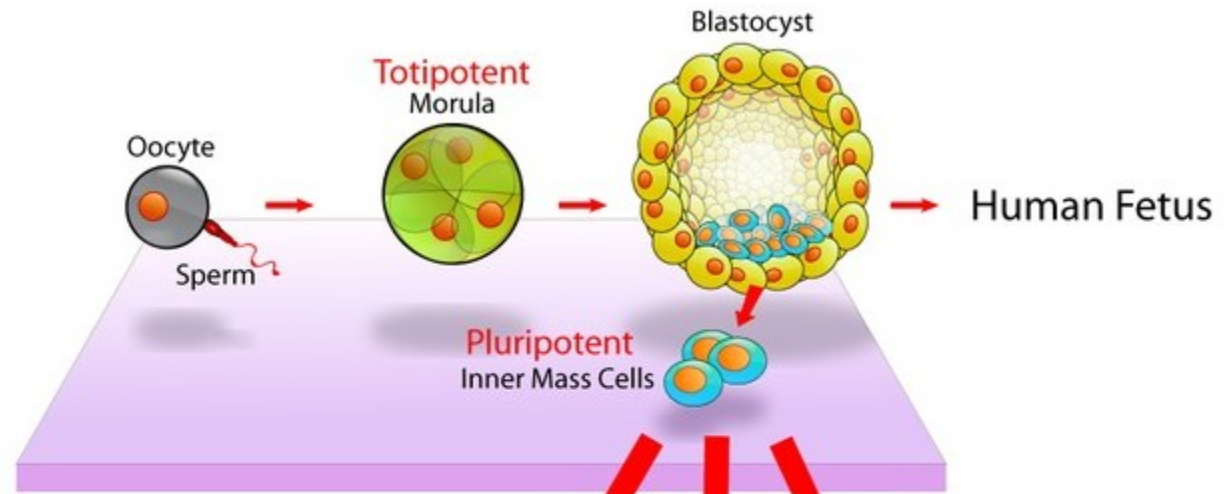
Polysacharid



Kmenové buňky

http://community.livinglakecountry.com/blogs/eagles_eye/Stem%20cells%20diagram%5B1%5D.jpg

V průběhu
diferenciace
klesá
exprese
ABC
transportérů



Výjimka: zvyšování
exprese v bariérových
tkáních

Patologický výskyt

16 ABC genů bylo asociováno s dědičnými poruchami

Tangierova choroba (*ABC A1*) – poruchy sekrece cholesterolu a fosfolipidů (nadměrná hladina v buňkách, narušena homeostáza)

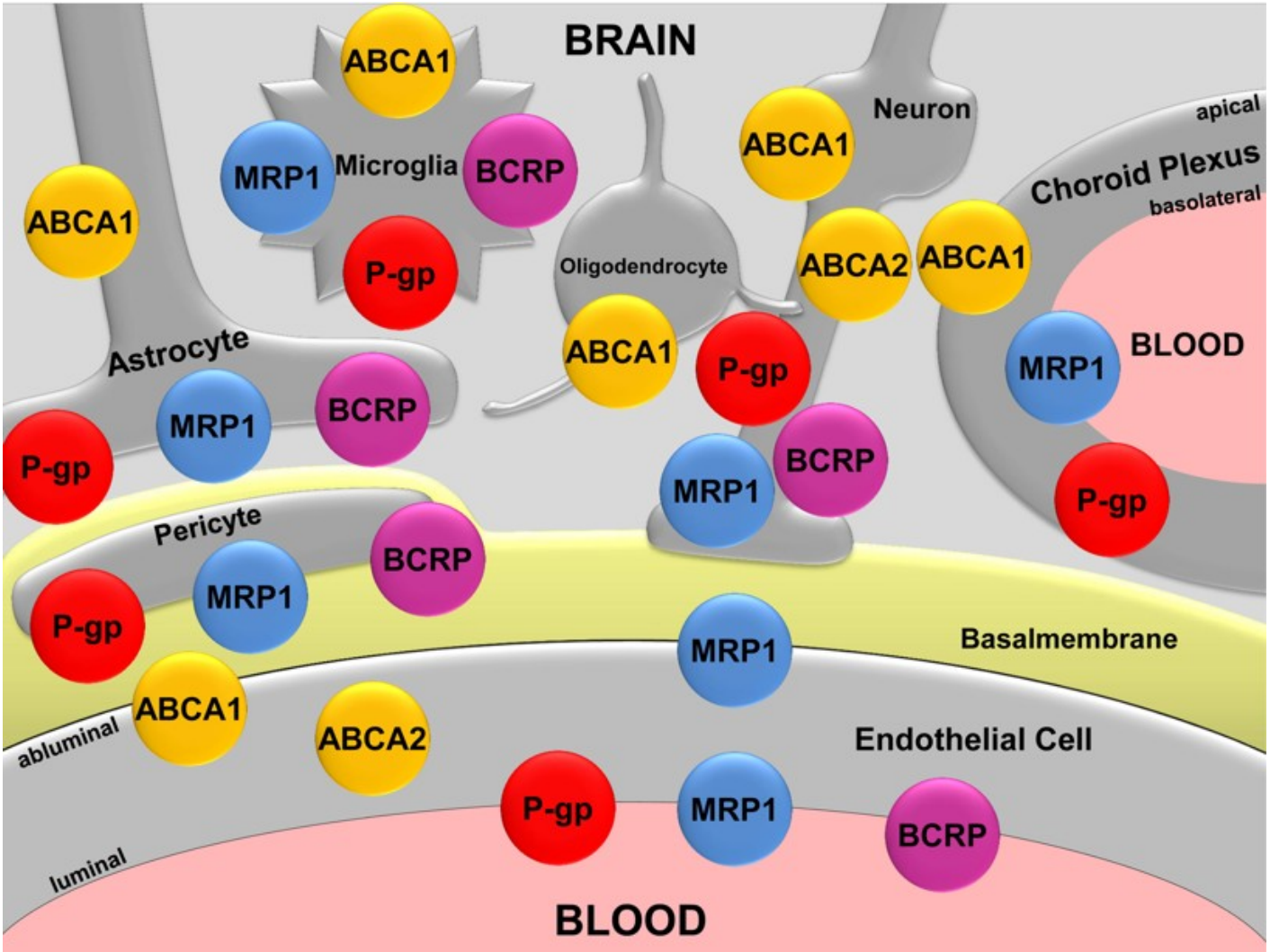
Dubin Johnson syndrom (*ABC C2*) – neschopnost jater sekretovat konjugovaný bilirubin do žluče

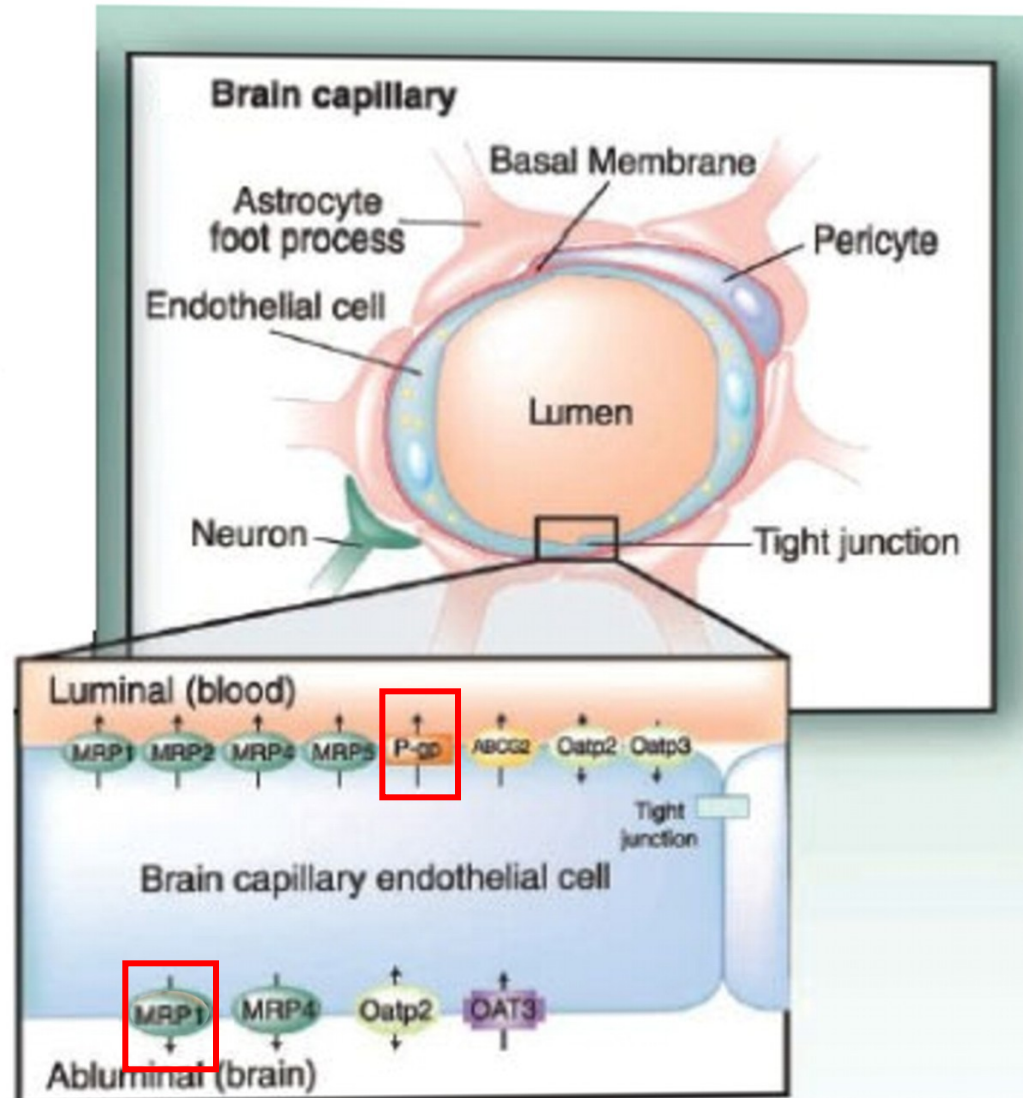
Pseudoxanthoma elasticum (*ABC C6*) – mineralizace a fragmentace elastinových vláken, problém s vitamínem K

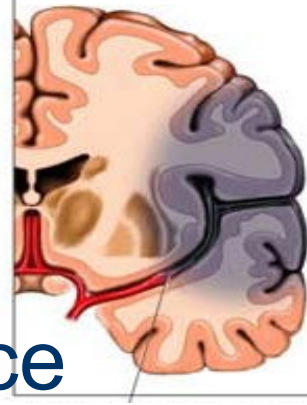
Cystická fibróza (*ABC C7*) – poruchy sekrece působků pankreatu a dalších exokrinních žláz

V mozku je HODNĚ ABC

Wolf et al. 2012. Frontiers in psychiatry.3(54): 1-14







Ischemie je následek mozkové mrtvice

- Zvýšení permeability krevně-mozkové bariéry
 - edém mozku
 - Zvýšený oxidativní stres, zánět, rozklad extracelulární matrix
 - **zhoršení poškození neuronů**
- +
- MDR1 (mozek – krev) – zvýšená exprese
- MRP1 (krev – mozek) – snížená exprese
 - **Následkem je horší prostupnost pro látky podporující hojení (neuroprotektiva)**

Asociace ABC transportérů a chorob CNS

CNS disease	ABC transporters examined in the context of this disease	References
Ischemic stroke	ABCB1,ABCCI	Spudich and others 2006; Kilic and others 2008; ElAli and Hermann 2010c
Epilepsy	ABCB1, various ABCCs, ABCG2	Seegers and others 2002; Löscher and Potschka 2005
Brain cancer	ABCB1,ABCCI,ABCG2	Porro and others 2010
Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, multiple systems atrophy	ABCB1	Bartels and others 2008; Westerlund and others 2008
Alzheimer disease	ABCA1,ABCA2,ABCB1, ABCG2	Riddell and others 2007; Mace and others 2005; Lam and others 2001; Kuhnke and others 2007; Cotte and others 2009
Adrenoleukodystrophy	ABCD1	Mosser and others 1993
Multiple sclerosis	ABCB1,ABCG2	Kooij and others 2010; Xiong and others 2009
Brain metabolic disorders	ABCA1,ABCA2,ABCC8 (SUR1),ABCC9 (SUR2), ABCG1,ABCG4	Kaminski and others 2006; Bojanic and others 2010; Kim and others 2008; Sakai and others 2007

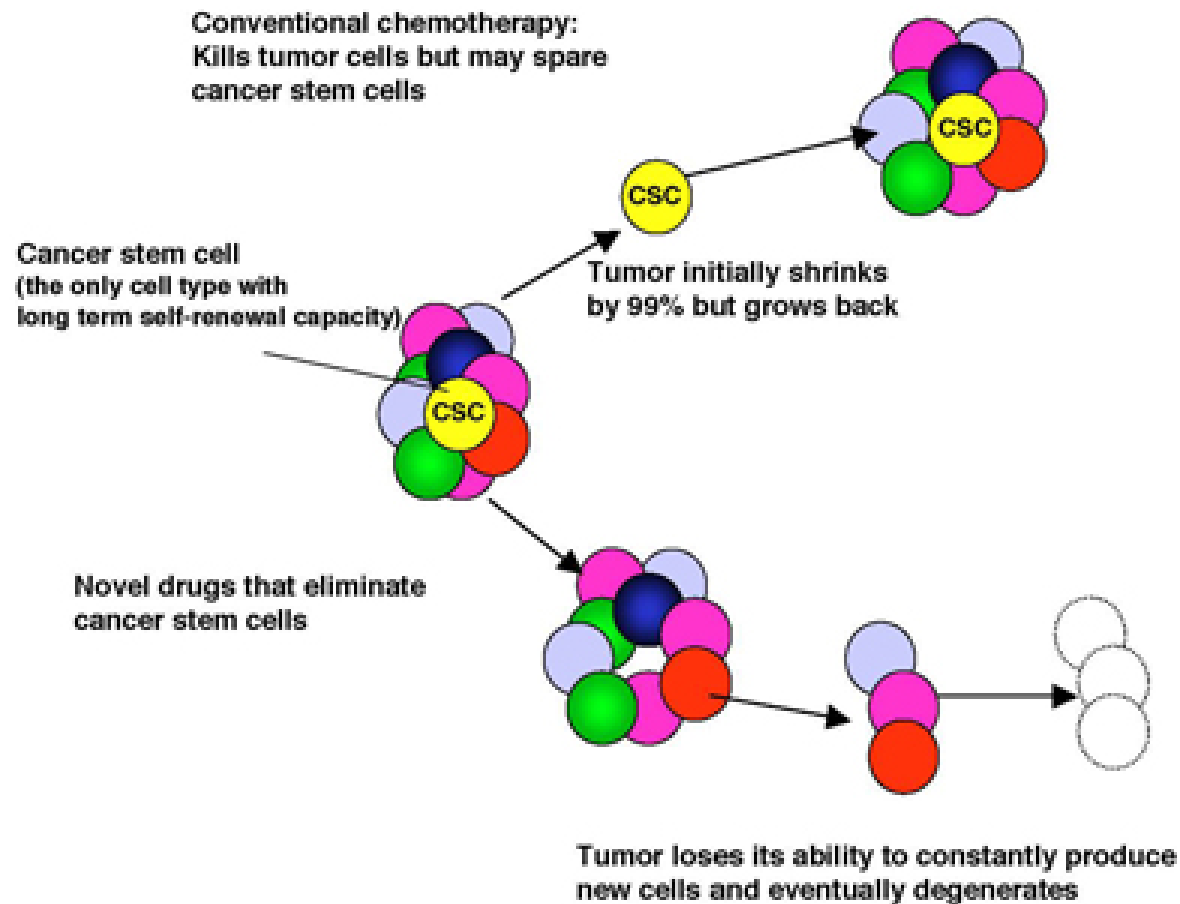
ATP-Binding Cassette Transporters and Their Roles in Protecting the Brain

Ayman ElAli and Dirk M. Hermann

Neuroscientist 2011 17: 423 originally published online 25 April 2011

- Selhání chemoterapie (nádorové b. jsou obvykle citlivější než „zdravé“ buňky)
- *De novo*/získaný fenotyp MDR
- 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 růstovou výhodu

Strategie léčby



<i>Protein</i>	<i>Substráty – chemoterapeutika</i>
<i>ABCB1/MDR1</i>	<i>colchicine, doxorubicin, etoposid, adriamycin, vinblastine, digoxin</i>
<i>ABCC1/MRP1</i>	<i>doxorubicin, daunorubicin, etoposid, colchicines, rhodamine</i>
<i>ABCG2/BCRP</i>	<i>Mitoxantrone, topotecan, CPT-11, rhodamine</i>

! Jeden transportér má různé substráty -> **MULTI**léková rezistence !

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

Metody detekce 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**

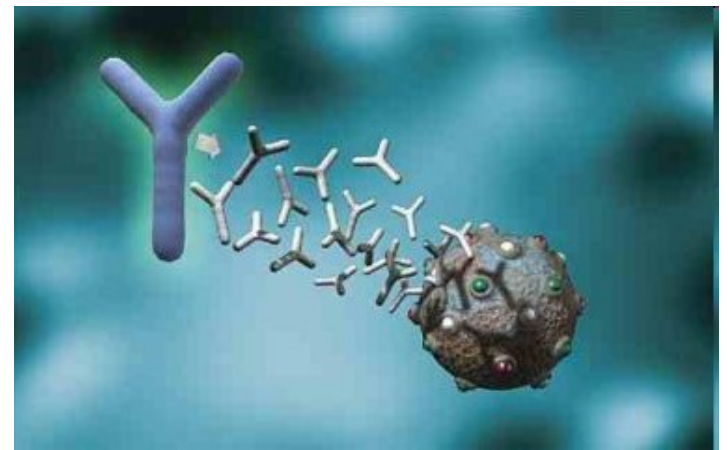
- Bodipy-prazosin

- Pheophorbid A

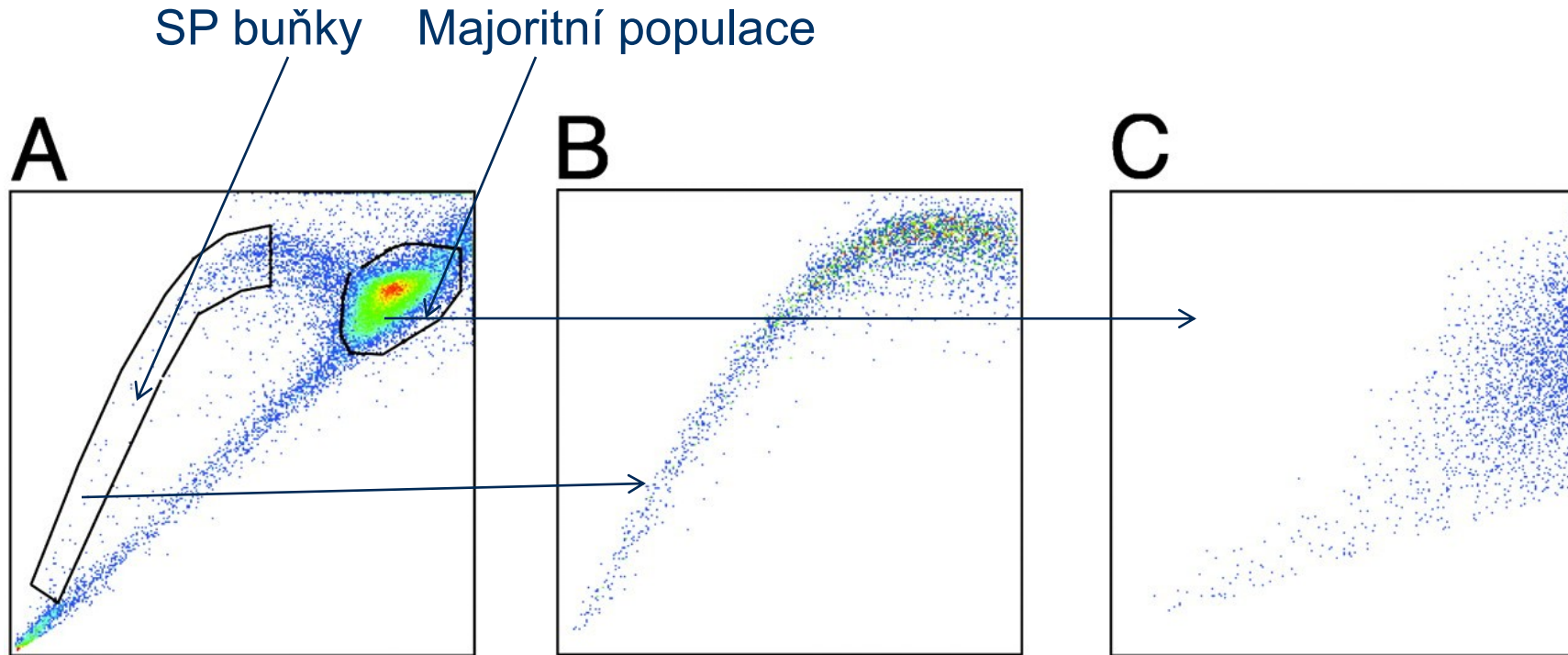
Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

Imunodetekce

qRT-PCR



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

Aktuální projekty

ABC transportéry ovlivňují výsledky klasických metod

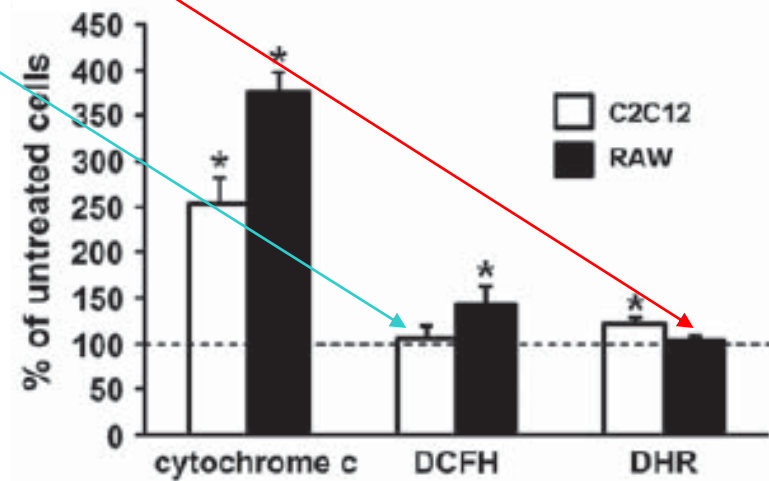
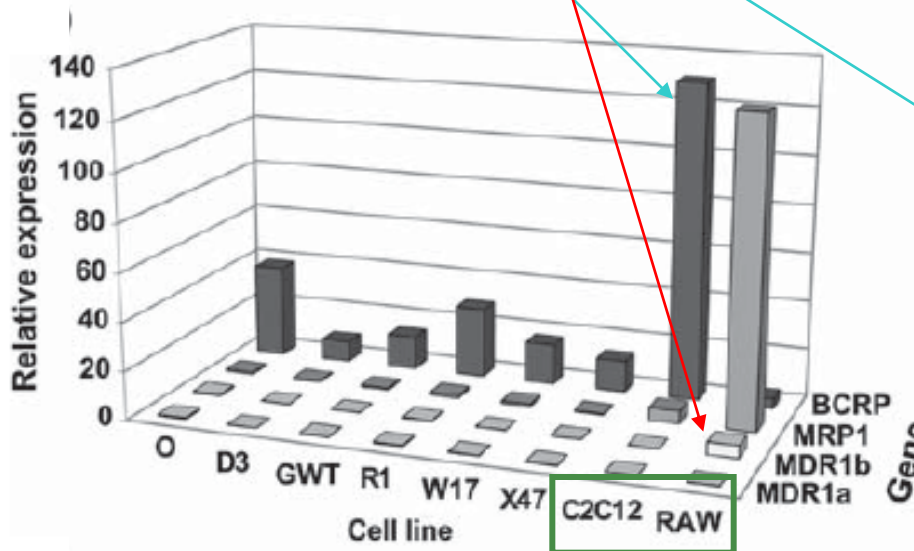
Procházková et al. 2011, Free rad res

Table I. Summary of ABC transporters' ability to efflux studied probes.

ABC transporter	Próby pro měření produkce ROS							Calcein	Hoechst
	DCFH	DHR	DIOC6	HE	JC1	MitoSOX	TMRE		
MDR1	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++
MRP1	+	-	-	+	-	+	+	+++	-
BCRP	+++	+	-	+	+	+	-	-	+++

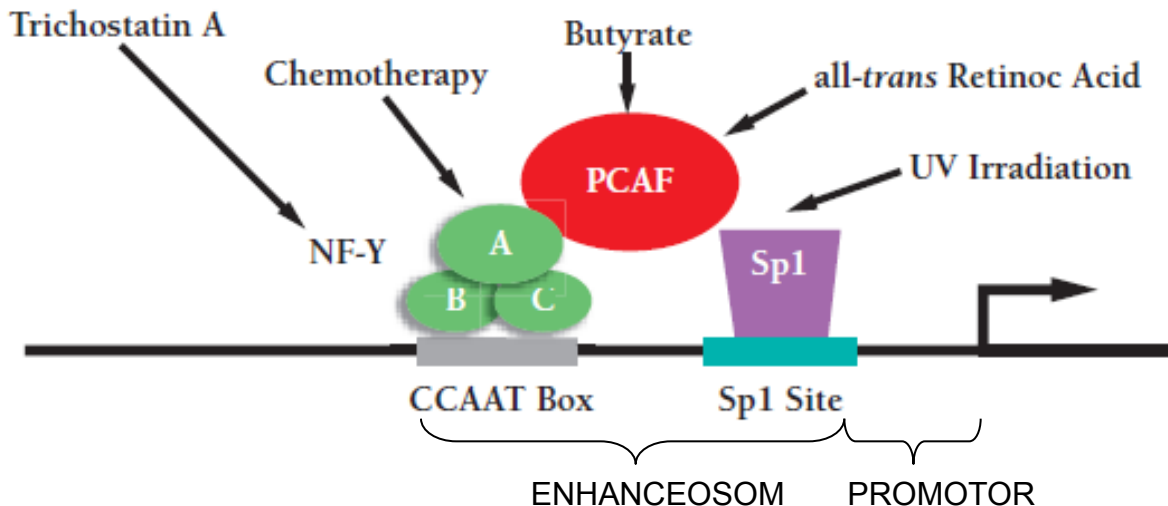
+++ , very strong substrate; + , weak substrate; - , no substrate.

**Falešně negativní
výsledek je způsoben
nevhodnou kombinací
barviva a linie**



PMA indukuje produkci ROS

Regulace transkripce

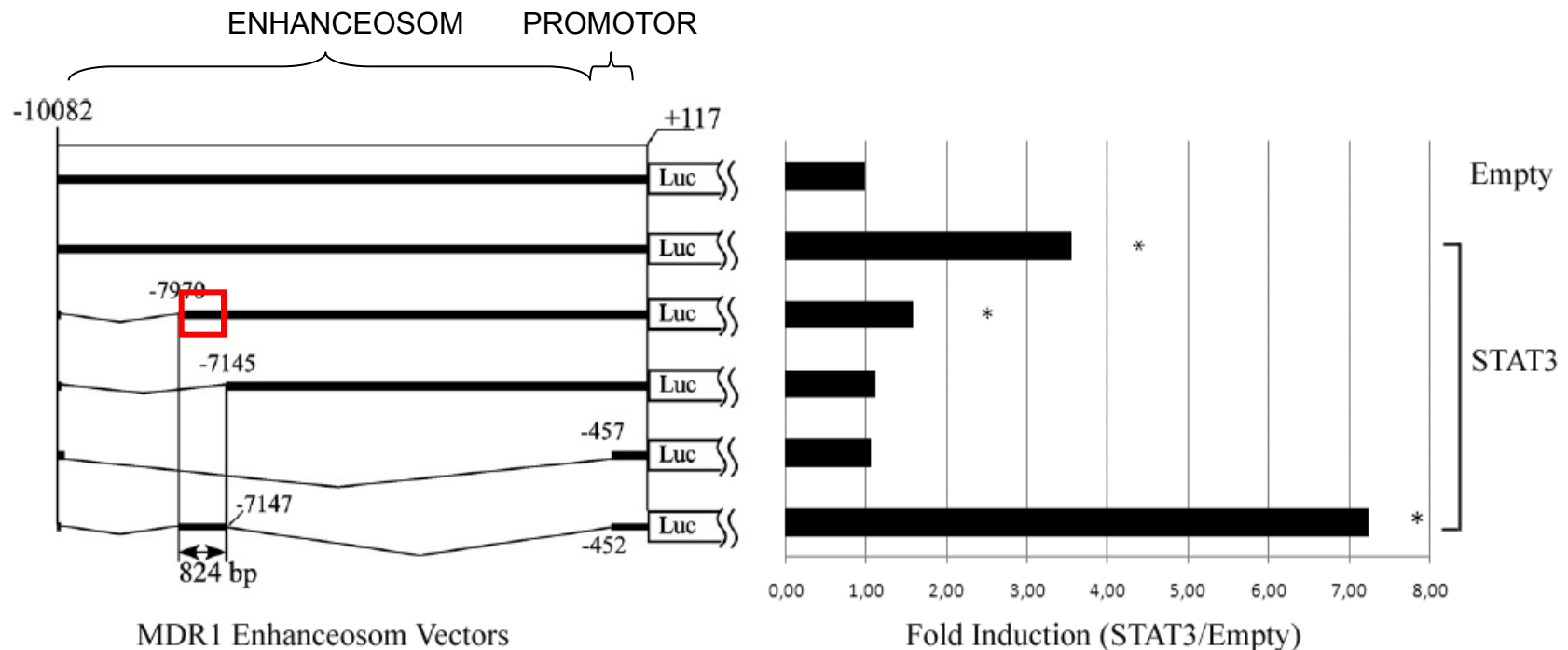


- Stres (teplo, zánět, hypoxie, UV záření, diferenciační činidla) vedou k zvýšení transkripce ABC transportérů
Studium promotoru + enhanceosomu

- 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**

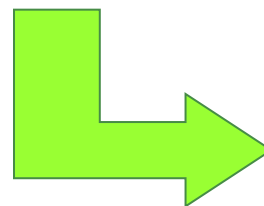
- Zvýšená exprese MDR1 je doprovázena aktivací STAT3
- Inhibice STAT3 vedla ke snížení rezistence nádorových buněk k chemoterapeutikám
- Ko-transfekce STAT3 a sady reportérů pro MDR1

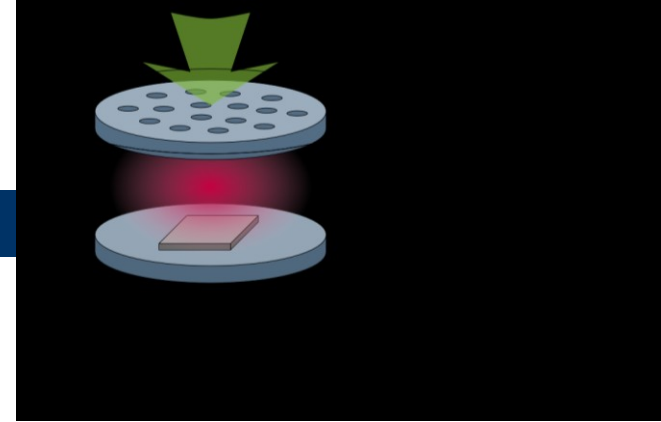


- ABC transportéry přenášejí látky aktivně VEN z buňky
- Důležité pro obranu organismu
- Jejich nadměrná exprese v rakovinných buňkách vede k multilékové rezistenci
- Substrátem ABC transportérů jsou i fluorescenční próby pro stanovení ROS, mitochondriální funkce

- Analýza vazebného místa STAT3 v MDR1 enhanceosomu
- Rezistence melanomů způsobená MDR5
- Vliv základních kinázových kaskád na transkripci ABC transportérů v nádorových a ES buňkách

- Biokompatibilita materiálů s povrchy upravenými plazmou





- V současné době se používají pro medicínské účely materiály na základě polystyrenu, polylaktátu, polycaprolaktonu a silikonu
 - nízká smáčivost, nízká volná povrchová energie

- Pro zvýšení přilnavosti buněk a podpory jejich růstu je nutné mít povrch s konstantní drsností, smáčivý a s povrchem pozitivně nabitým

Plazmatem aktivovaný cyklopropylamin vytváří aktivní aminové skupiny na povrchu polystyrenových misek

- zvýšená adhesivita buněk vedoucí k jejich rychlejší proliferaci!
- studium cytokerinických parametrů a exprese povrchových molekul?

Spolupráce se skupinou plazmových technologií na CEITEC (Doc. Zajíčková)

<http://www.ceitec.cz/ceitec-mu/plazmove-technologie/rg9>

Děkuji za pozornost

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



jipro@sci.muni.cz