

# „ABC“ o ABC transportérech

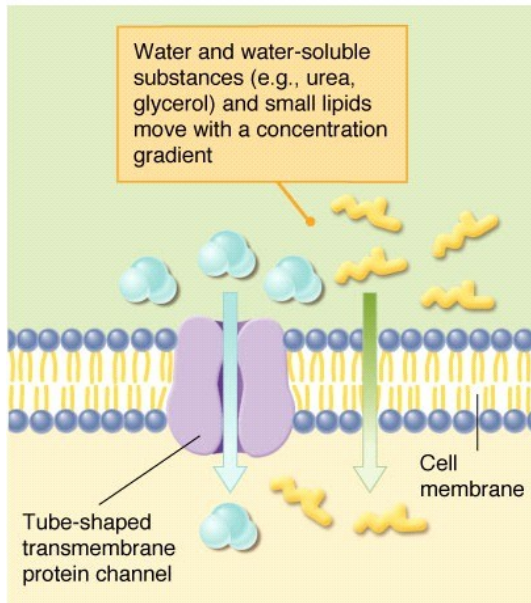
- Aktivn a pasivn transport živin
- ABC transportéry
- Fyziologick role
- Kmenov buňky
- Asociace s chorobami CNS
- Ndorov bujení
- Multilkov rezistence
- Detekce ABC transportérů
- Aktuln projekty



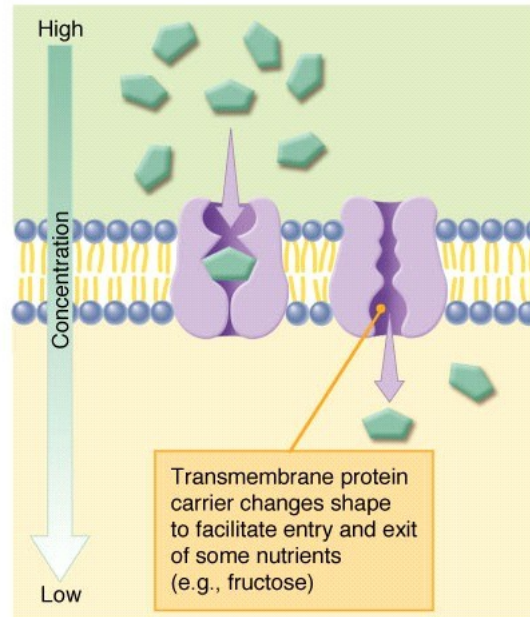
# Transport přes membránu

<http://www.solvo.hu>

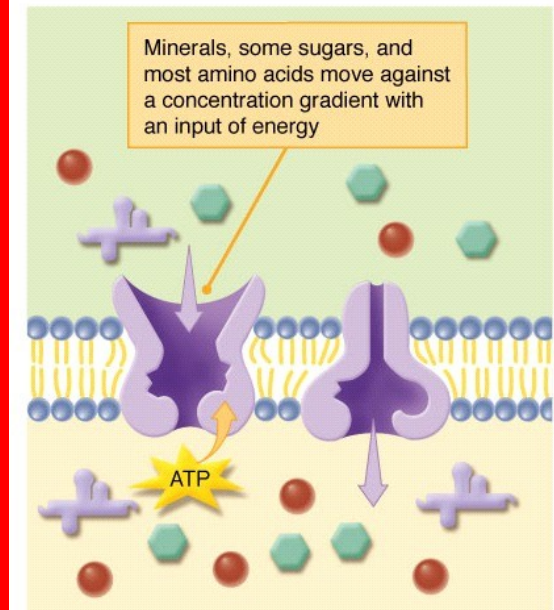
## PASSIVE DIFFUSION



## FACILITATED DIFFUSION

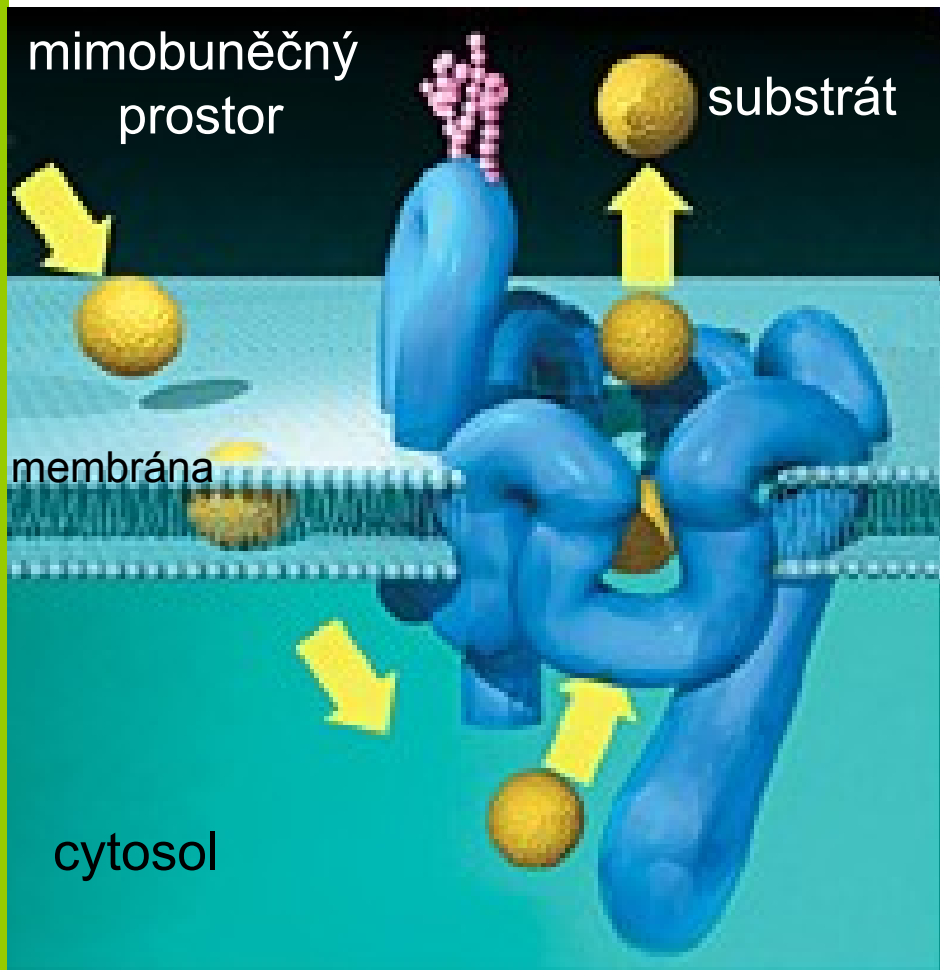


## ACTIVE TRANSPORT



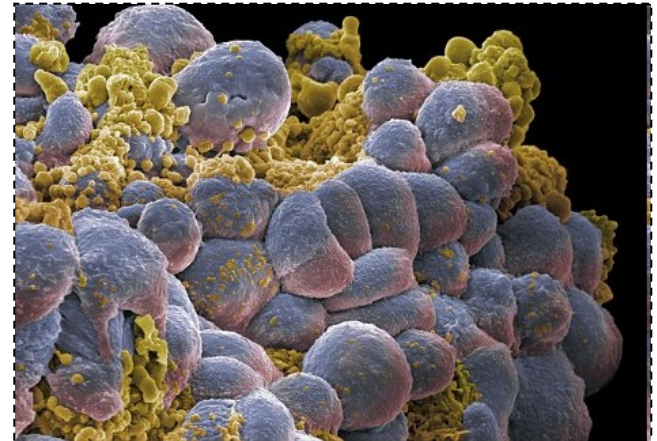
# ABC transportéry

[http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch1\\_mdr.jpg](http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch1_mdr.jpg)



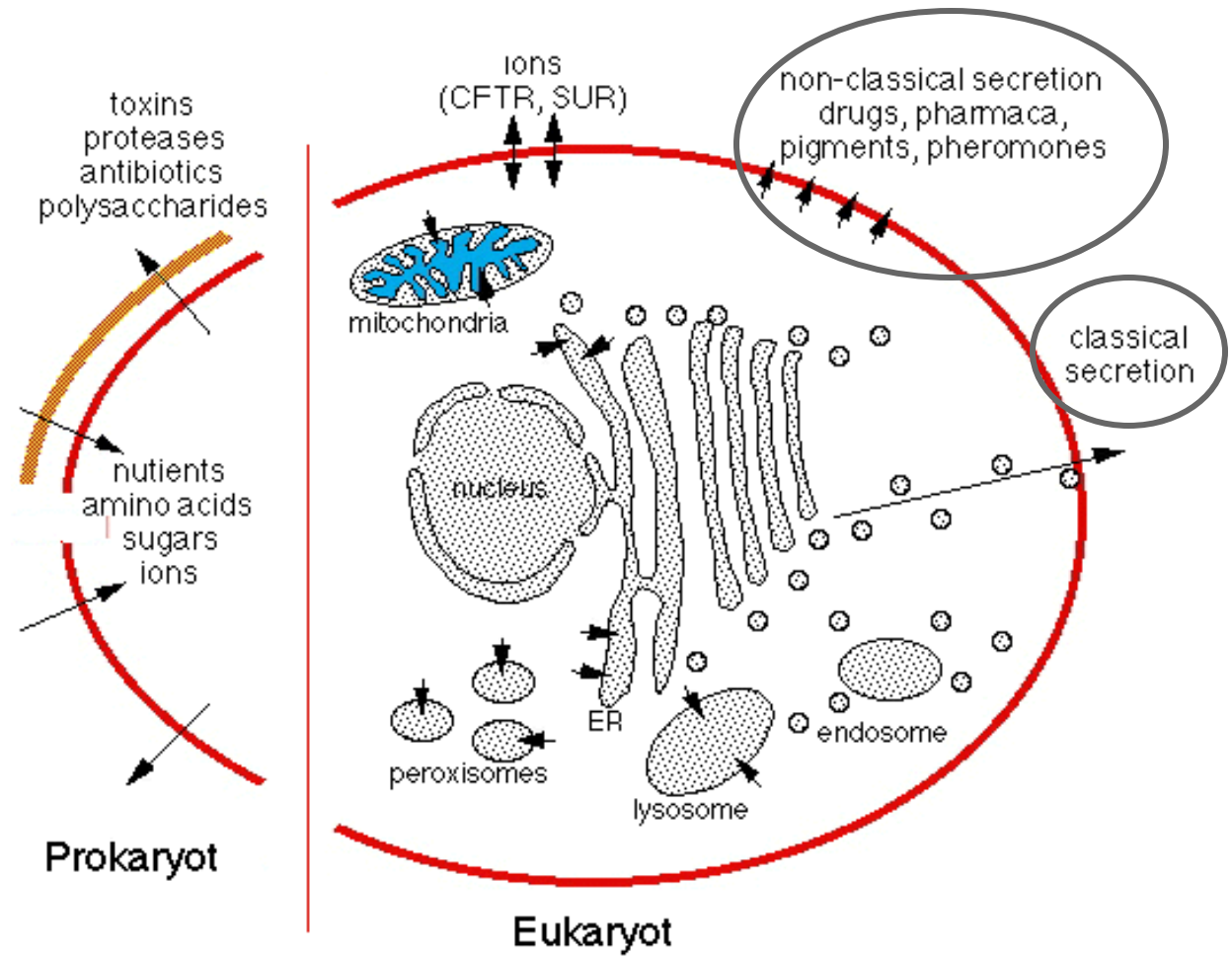
- **A**TP-**b**inding **c**assette  
= NBD doména
- Za spotřeby **A**TP pumpují toxické látky/metabolické produkty **V**EN z buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám

- 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



# Výskyt ABC transportérů

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



Šipky označují výskyt a směr transportu

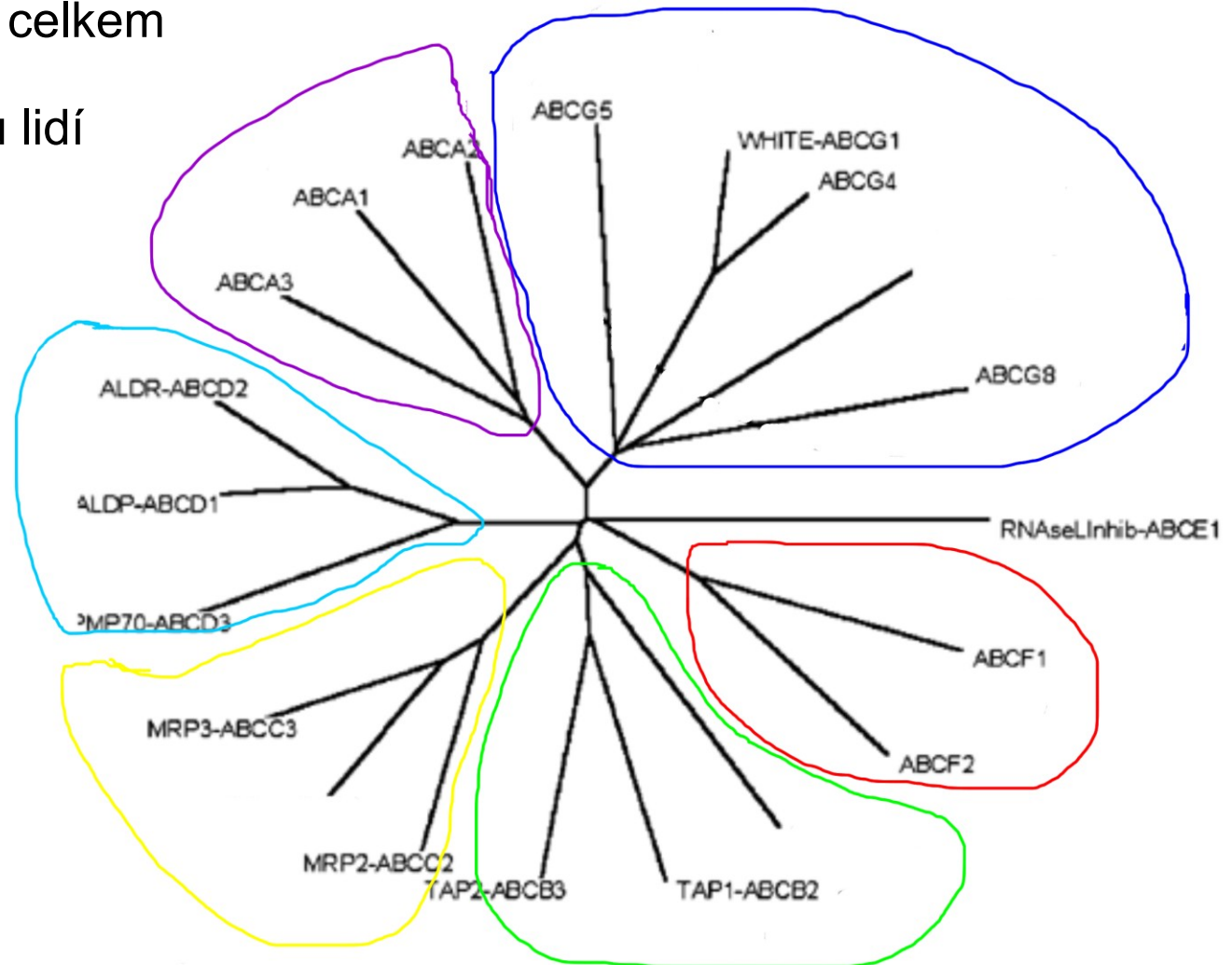


# Filogenetický strom ABC transportérů

[http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig\\_tab/1206938f1.html#figure-title](http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig_tab/1206938f1.html#figure-title)

100 proteinů celkem

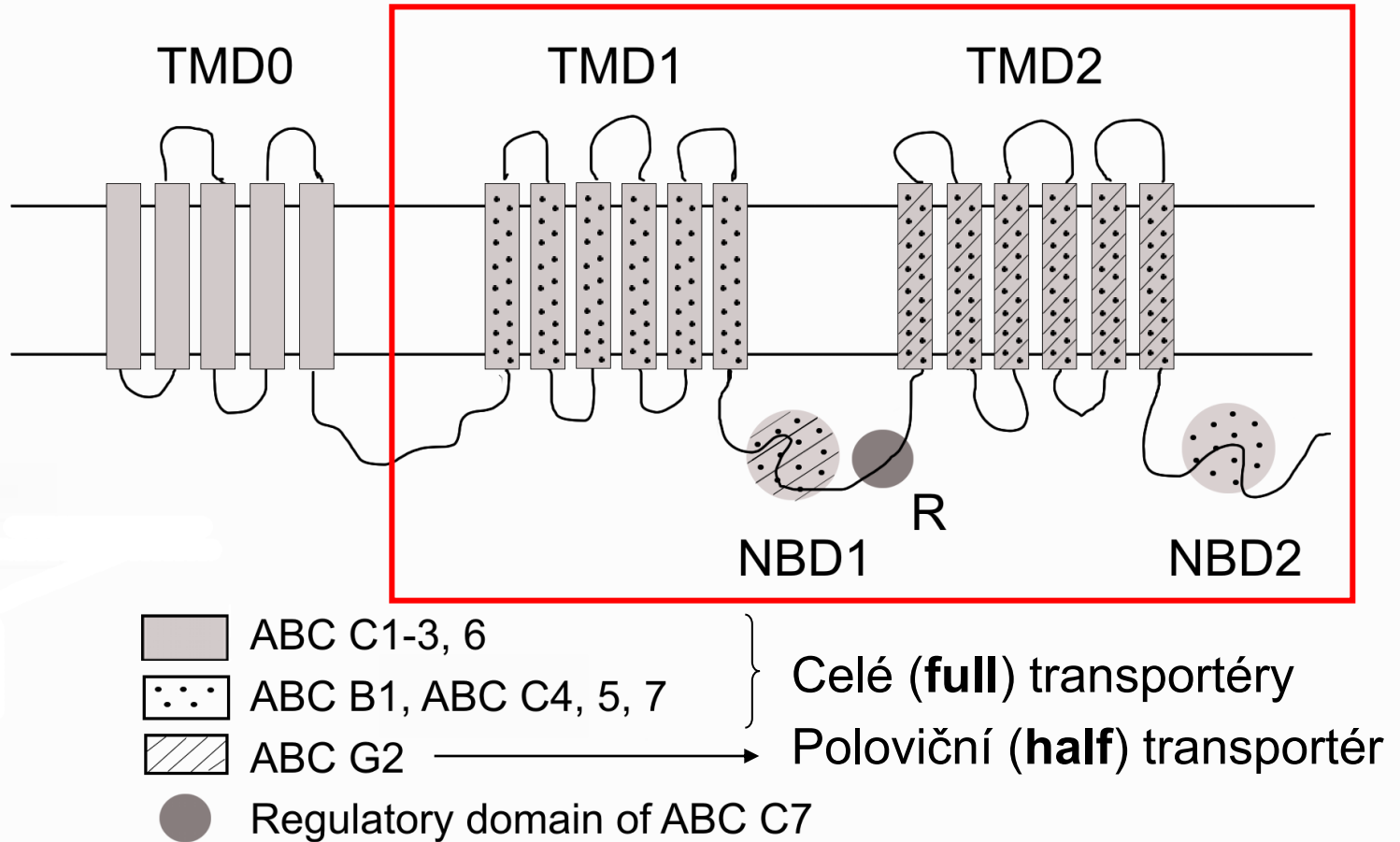
48 proteinů u lidí

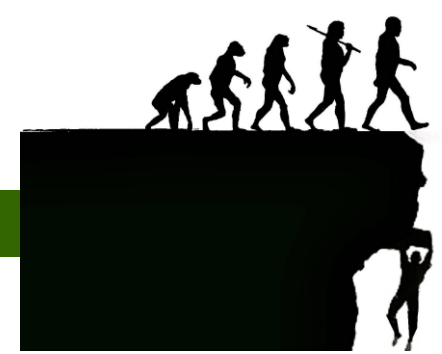


7 rodin (A-G) podle sekvenční homologie

# Struktura

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





- Nekovalentně spojený transmembránový protein a ATPáza (bakterie)
- Nejprve vznikly half transportéry
- Full transportéry vznikly jejich duplikací později

## ABC B5

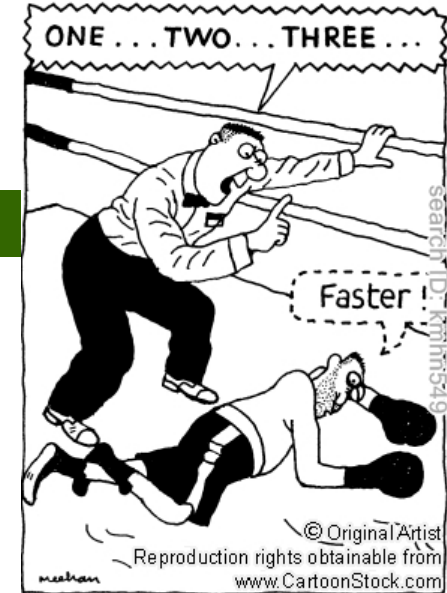
- Více sestřihových variant – dlouhá a krátká forma
- Krátká forma vznikla delecí části TMD z dlouhé formy
- Z původního half transportéru vznikla dlouhá forma a z ní krátká forma

## ABC G2 vs ABC B1

- ABC B1: N konec – TMD1 – NBD1 – TMD2 – NBD2 – C konec
- ABC G2: N konec – NBD – TMD – C konec
  - TMD ABC G2 podobnější kvasinkovým ABC transportérům
  - **Spojovací oblast** je velmi homologická



- Delece obou alel genu u myši
- Testováno 32 z 48 savčích ABC
- Jen 5 z nich je embryonálně nebo postnatálně letálních
  - ABC B7 – kolaps respiračních procesů
  - ABC E5 – selhání recyklace ribosomů
  - ABC A3 – respirační selhání (nedostatek surfaktantu)
  - ABC A12 – defekty plic a kůže
  - ABC C9 – srdeční selhání
- Jsou evolučně konzervované, ale flexibilní, a tak se mohou vzájemně zastoupit a také exportovat nové člověkem vyrobené látky



# **Fyziologická role ABC transportérů**

# Substráty



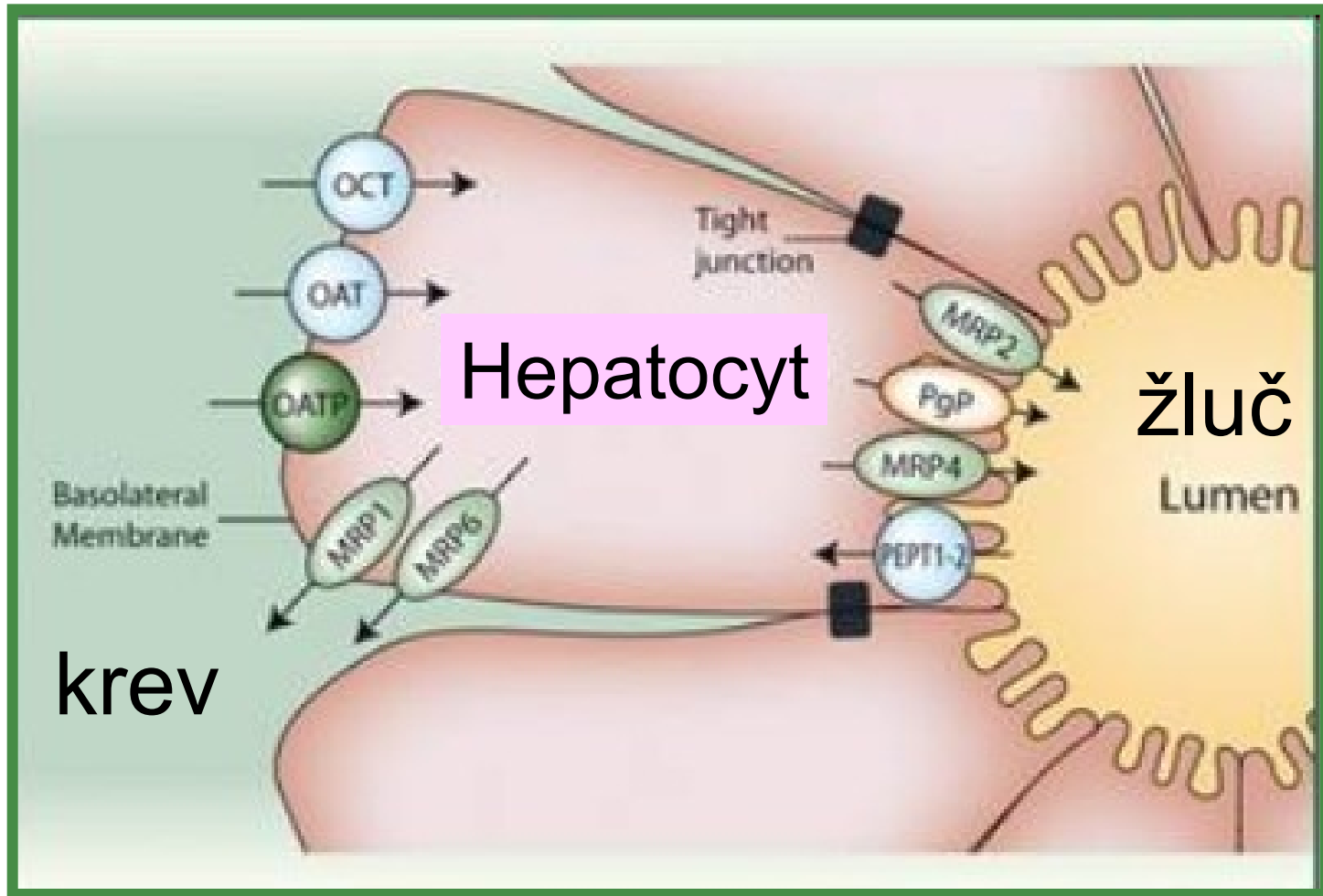
Kanál	Příklady fyziologických substrátů
<b>MDR1</b>	Konjugáty estrogeneru, endorfin, glutamát, beta-amyloid, steroidy, PAF
<b>MRP1</b>	Konjugáty glutationu a glukuronidu s leukotrienem C4, bilirubinem, žlučovými solemi
<b>BCRP</b>	Vitamíny (riboflavin, biotin), porfyriny, konjugáty estrogeneru

# Substráty ABC transportérů - výživa

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



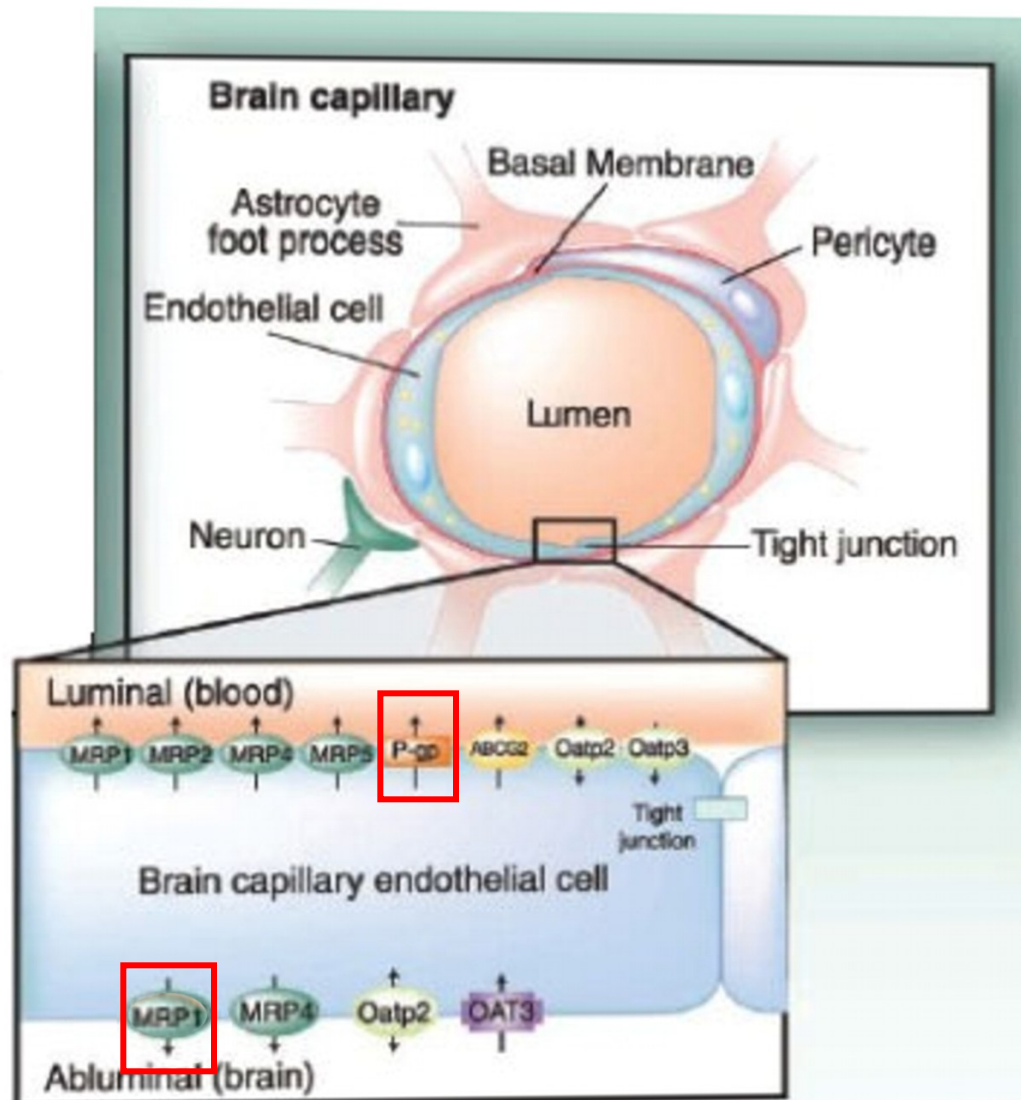
Živina	Membránový Transportér	Efekty
Flavonoidy (quercetin) jejich glukosidy a glukuronidy – ovoce, zelenina	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 1 (MRP1)</li> <li>➤ Multidrug Resistant Protein 2 (MRP 2)</li> <li>➤ Breast Cancer Resistance Protein BCRP (MXR)</li> <li>➤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



# Krevně mozková bariéra

Ochrana mozku před toxickými látkami z krve

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



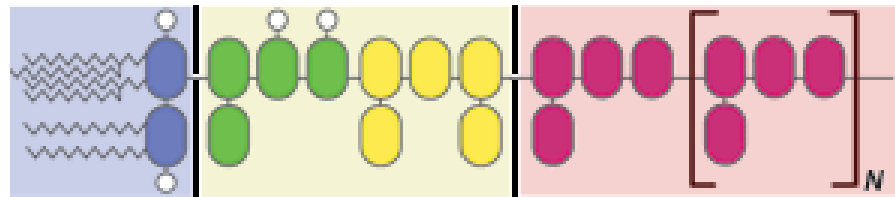


# Syntéza antigenu 0

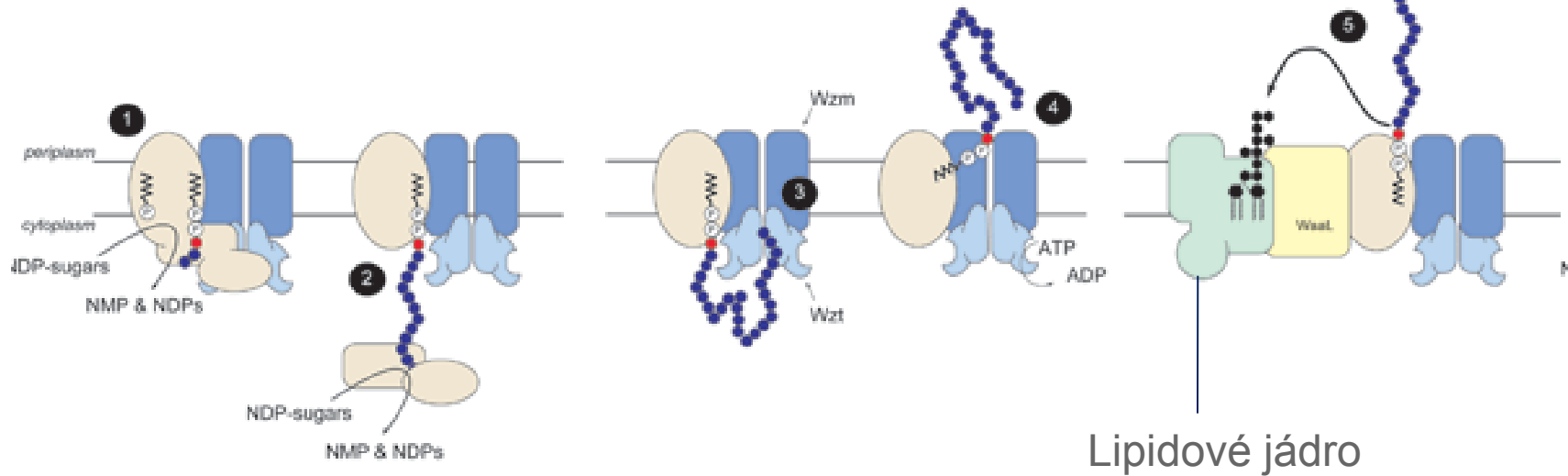
## Antigeny - lipopolysacharidy

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

Lipid    fukóza    N-acetyl  
glukosamin    galaktóza



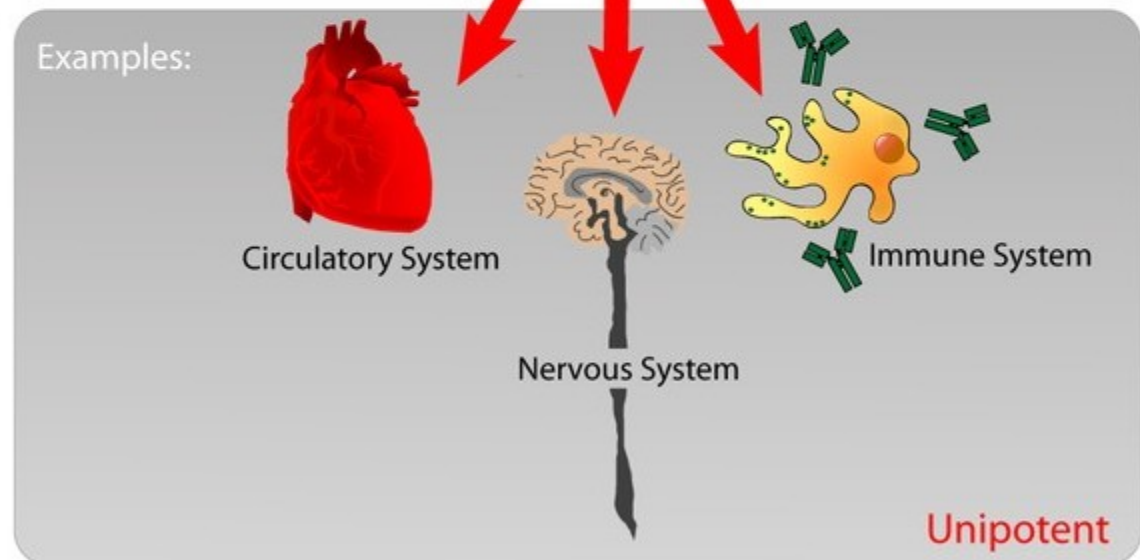
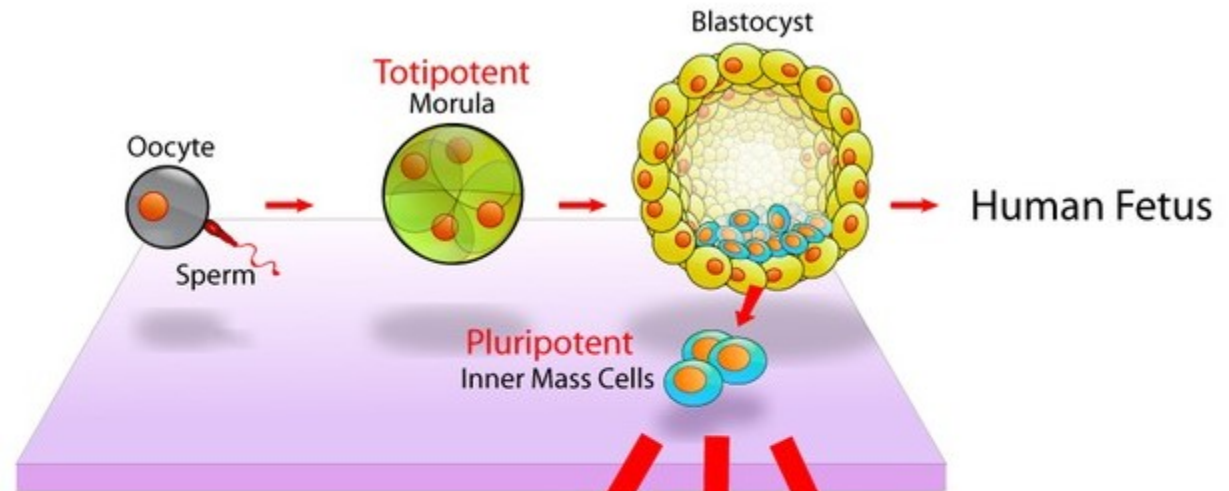
Polysacharid



# 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



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)

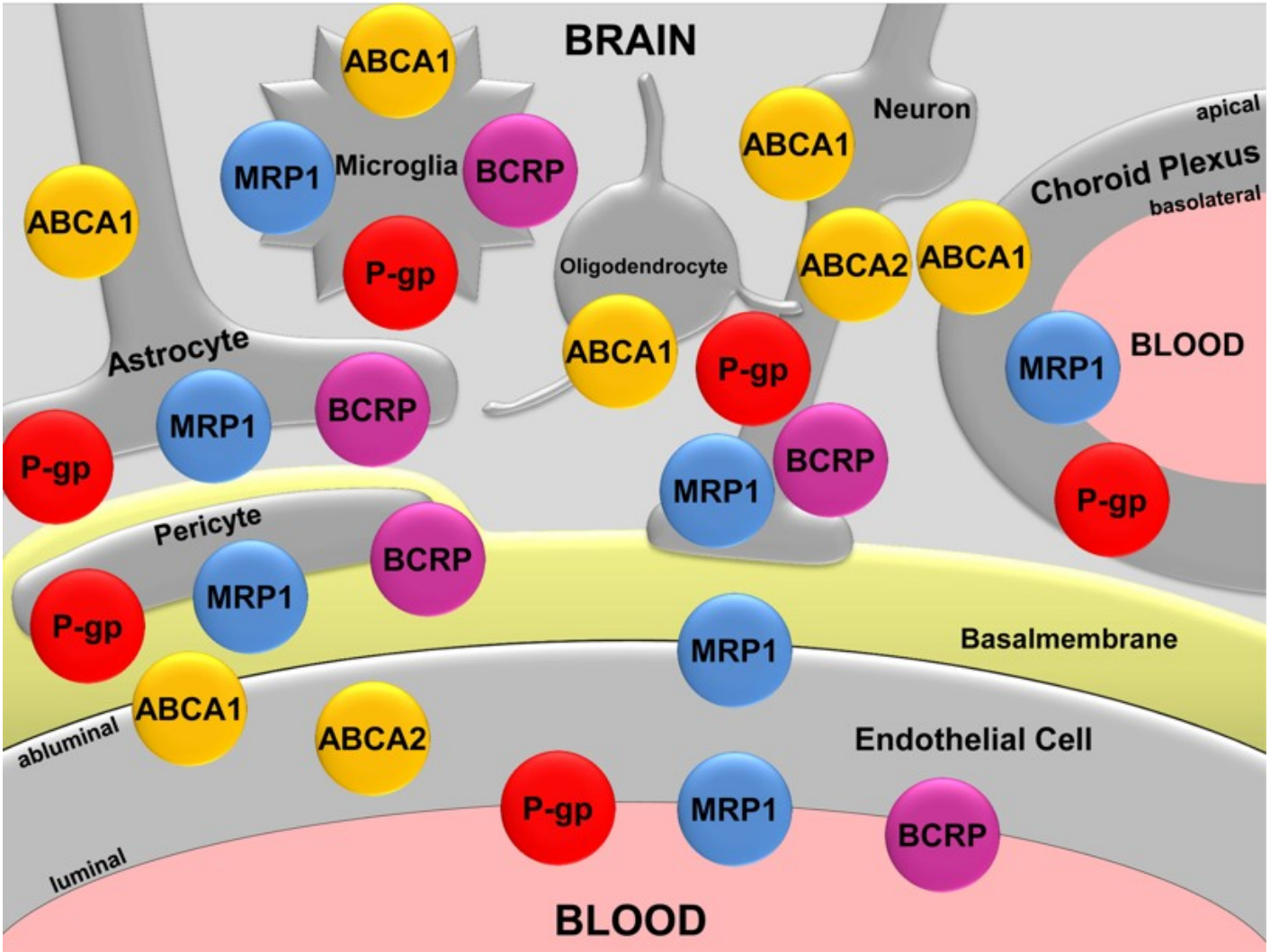
**Dubin Johnson syndrom (*ABC C2*)** – neschopnost jater sekretovat konjugovaný bilirubin do žluče

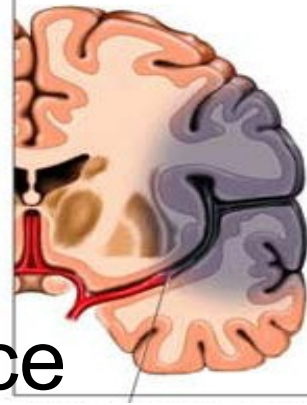
**Pseudoxanthoma elasticum (*ABC C6*)** – mineralizace a fragmentace elastinových vláken, problém s vitamínem K

**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– zvýšená exprese
  - **Následkem je horší prostupnost pro látky podporující hojení (neuroprotektiva)**
- MRP1 – export konjugátů GST - snížená exprese
  - **Následkem je zvýšená koncentrace GSSH v mozku, který je toxický**



# 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

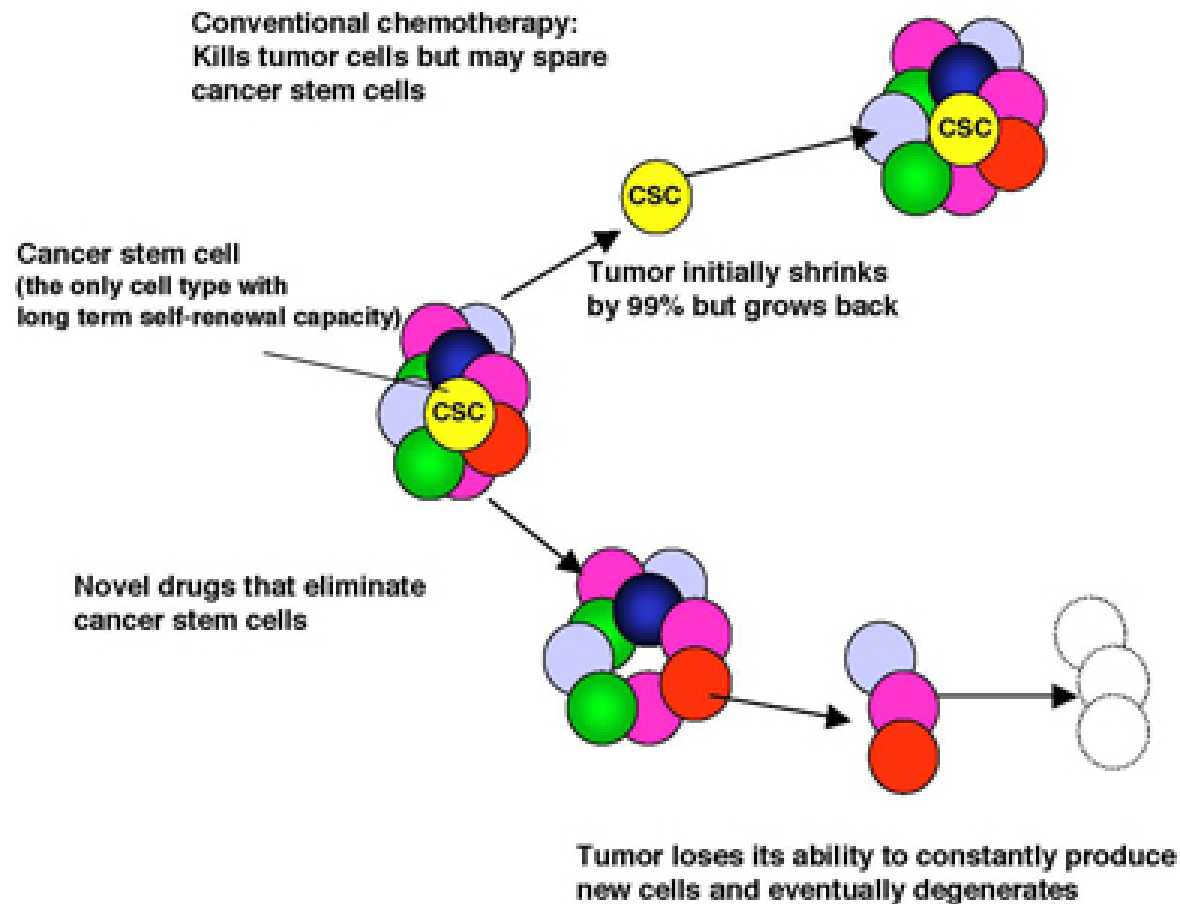
*Neuroscientist* 2011 17: 423 originally published online 25 April 2011



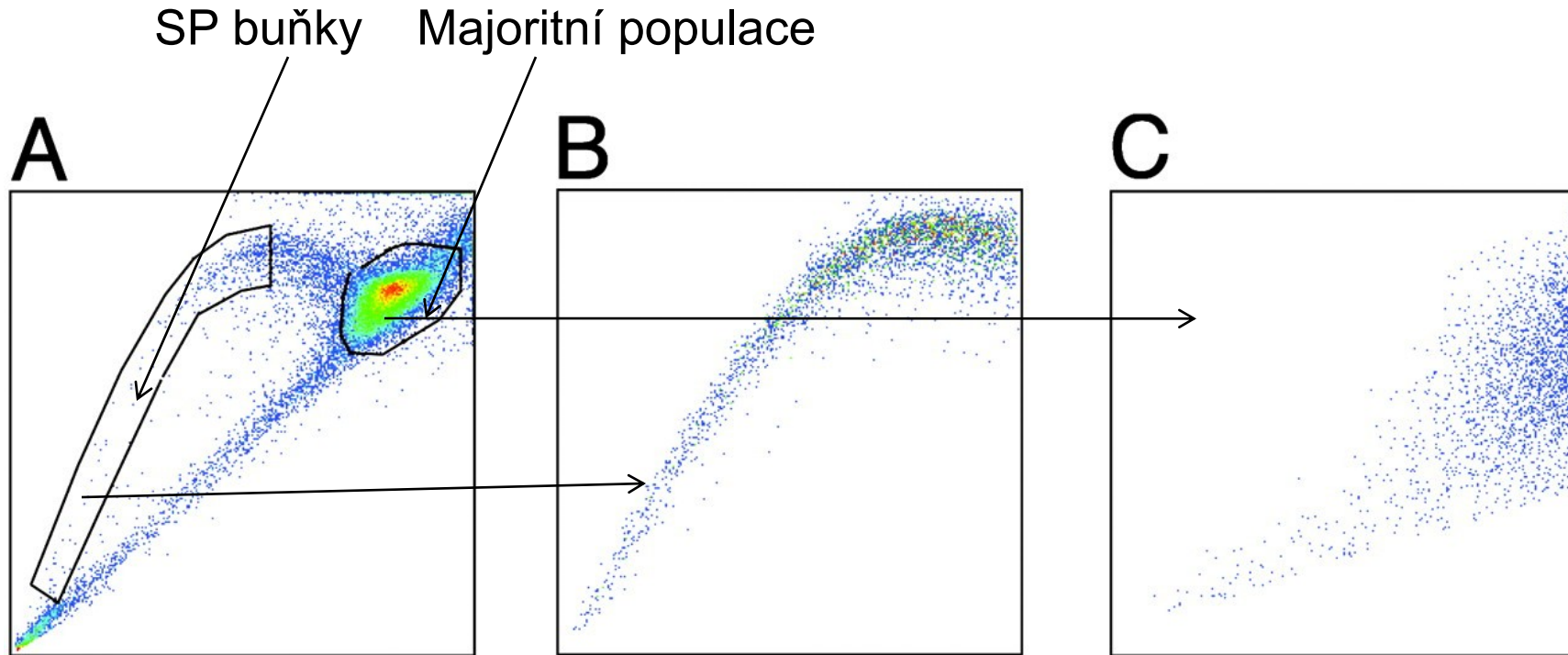
- ABC B1 exportuje A $\beta$  (luminální část kapiláry)
- ABC B1a,b -/- myši – snížené odstraňování A $\beta$  z mozku
- Dysfunkční ABC B1 na BBB – akumulace A $\beta$
- AD pacienti – snížená hladina ABC B1 v cévách kolem A $\beta$  plaků
- Asociace mezi SNPs a rizikem vzniku AD nebyla nalezena
- ABC B1 exprese je zvýšena aktivací PXR – pomalejší pokles ztráty mozkových funkcí (klinická studie)
- A $\beta$  může regulovat (snižovat) expresi ABC B1

- 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



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**

<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

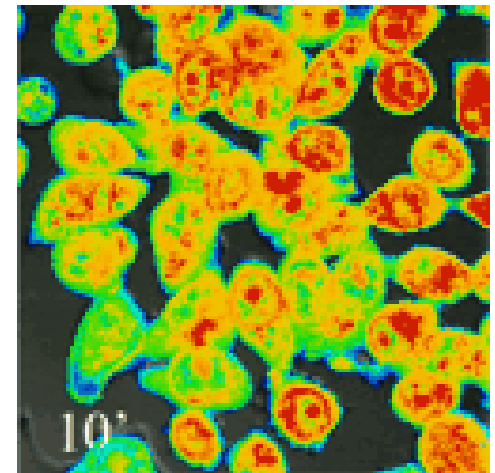
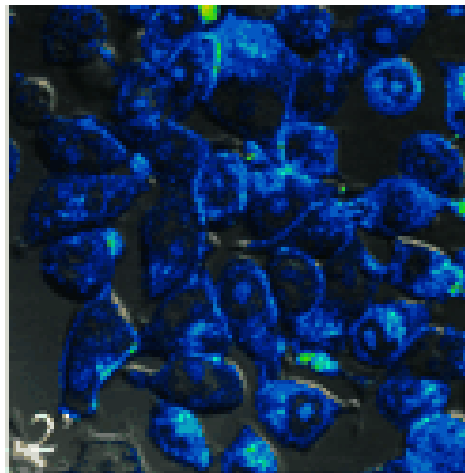
# Zkřížená rezistence

Rezistence buněk S1-M1-80 získána kultivací s Doxorubicinem (substrát MDR1 a BCRP)

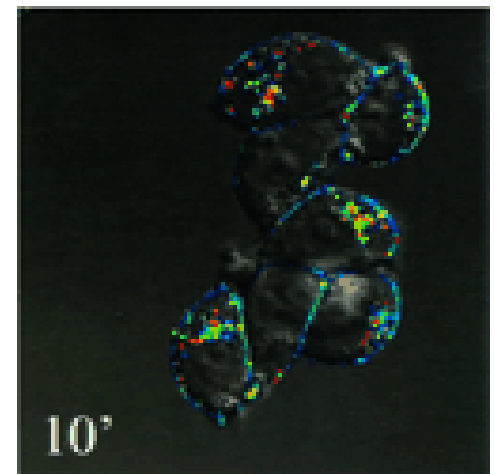
Dean et al.: the role of the abc transporters drug resistance and pharmacology

Mitoxantron - fluoreskující substrát BCRP a MDR1

S1 wt



S1-M1-80



# **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

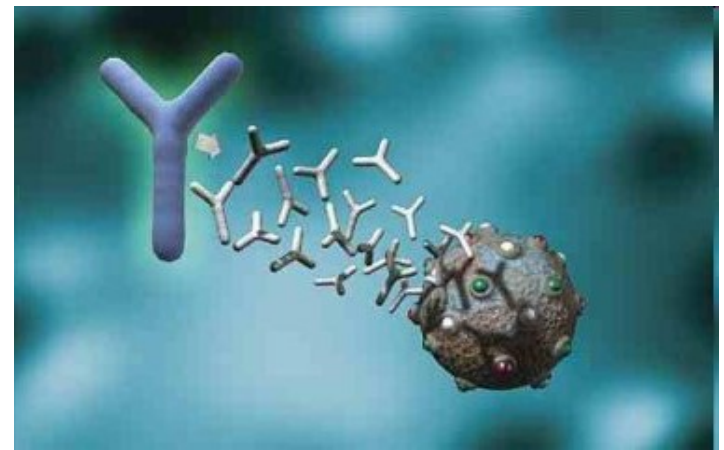
- Bodipy-prazosin

- Pheophorbid A

Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

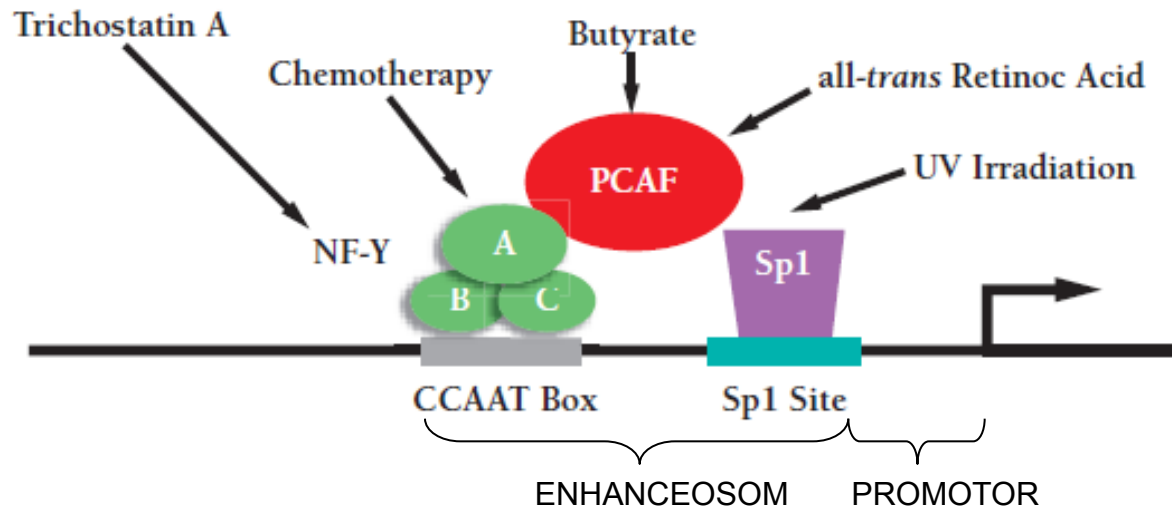
## Imunodetekce

## qRT-PCR



# **Aktuální projekty**

## Regulace transkripce

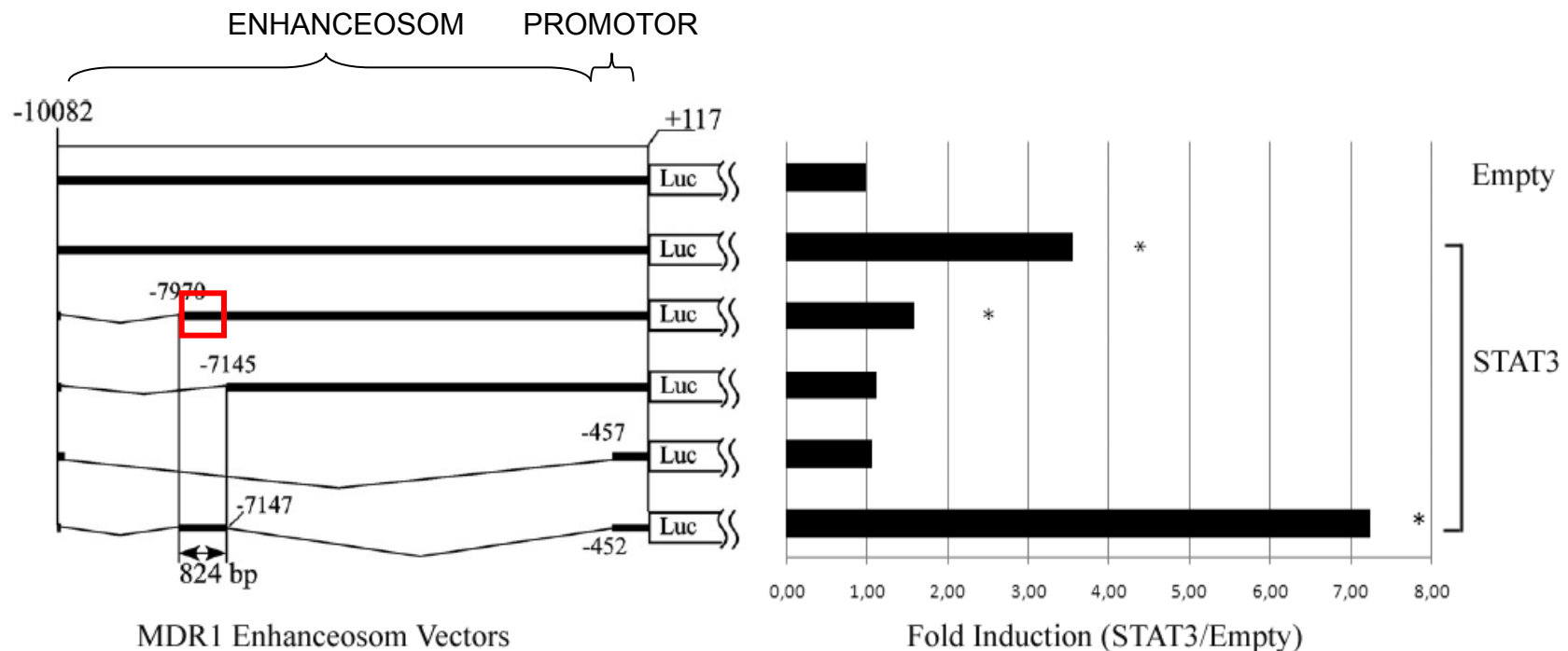


- Stres (teplo, zánět, hypoxie, UV záření, diferenciační činidla) vedou k zvýšení transkripce ABC transportérů  
**Studium promotoru + enhanceosomu**

- 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



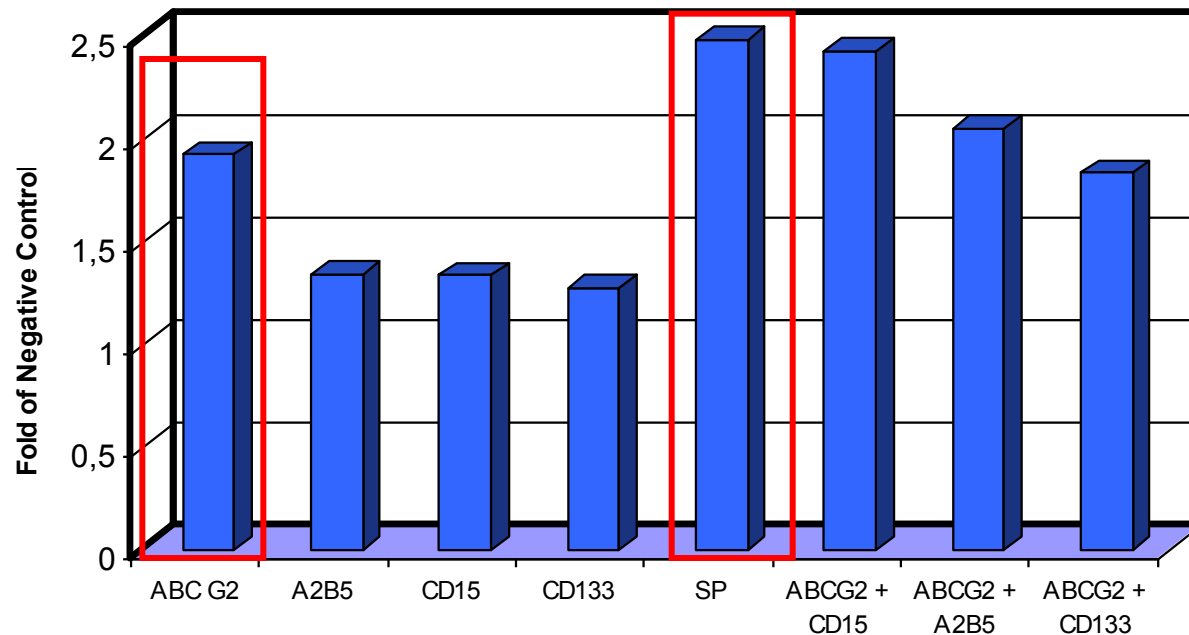
# Identifikace TIC (CSC)

CSC – cancer stem cells

TIC – tumor initiating cells

Pro glioblastomy se využívají markery A2B5, CD15 a CD133

## Tvorba neurosfér





# Rezistence melanomů

- Do reakce melanocytů na UV (Pmel17) je zapojena dráha p38 MAPK a podílí se na tom i MDR1 a MDR5

Buněčné linie Stimulace UV	A375			IPC298			MEL-JUSO			MEL4M		
	0s	10s	20s	0s	10s	20s	0s	10s	20s	0s	10s	20s
Pmel17	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
MDR1	++	++	++	+	+	+	+	+	+	++	++	++
MDR5	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+
JAK/STAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI3K/AKT	++	++	++	+	+	+	++	+	+	-	-	+
MAPK/ERK	++	+	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
MAPK/p38	-	++	++	-	+	+	-	++	++	-	+	+

Pmel17	-	-	-	++++	++++	++++	+	++	+++	+++	++++	+++++
MDR1	+++	++++	++++	+	+	+	+	+	+++	++	+++	++++
MDR5	+	+	++	+	++	++	+	+	+	++	++	+
JAK/STAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI3K/AKT	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
MAPK/ERK	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
MAPK/p38	++	+++	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++

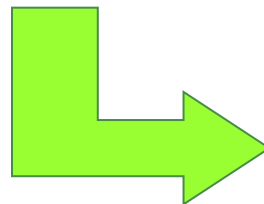
30

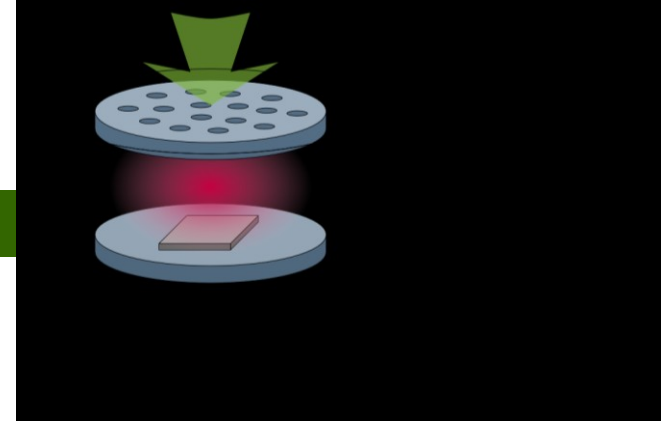
7d

- 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

## Do čeho se můžete zapojit?

- Analýza vazebného místa STAT3 v MDR1 enhanceosomu
  - Rezistence melanomů způsobená MDR5
  - Vliv základních kinázových kaskád na transkripci ABC transportérů v nádorových a ES buňkách
  - Využití ABC transportérů pro identifikaci nádorových kmenových buněk
- 
- Biokompatibilita materiálů s povrchy upravenými plazmou





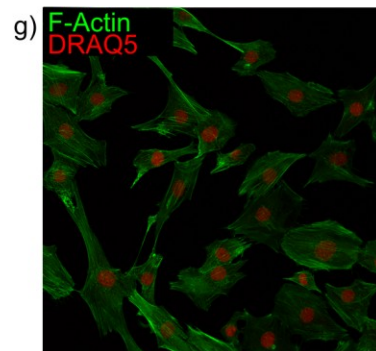
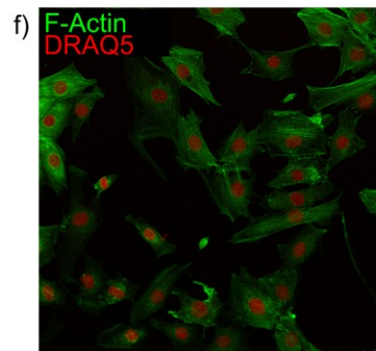
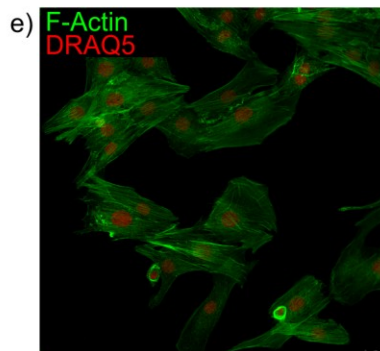
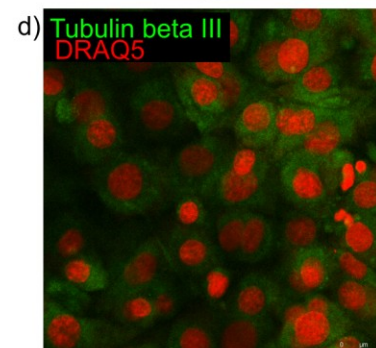
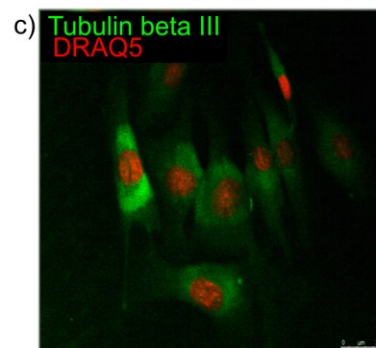
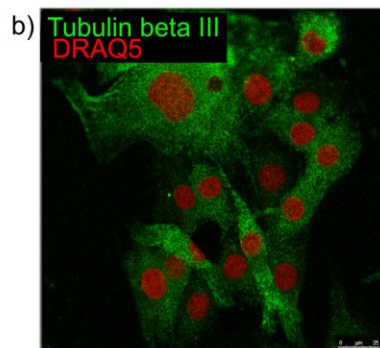
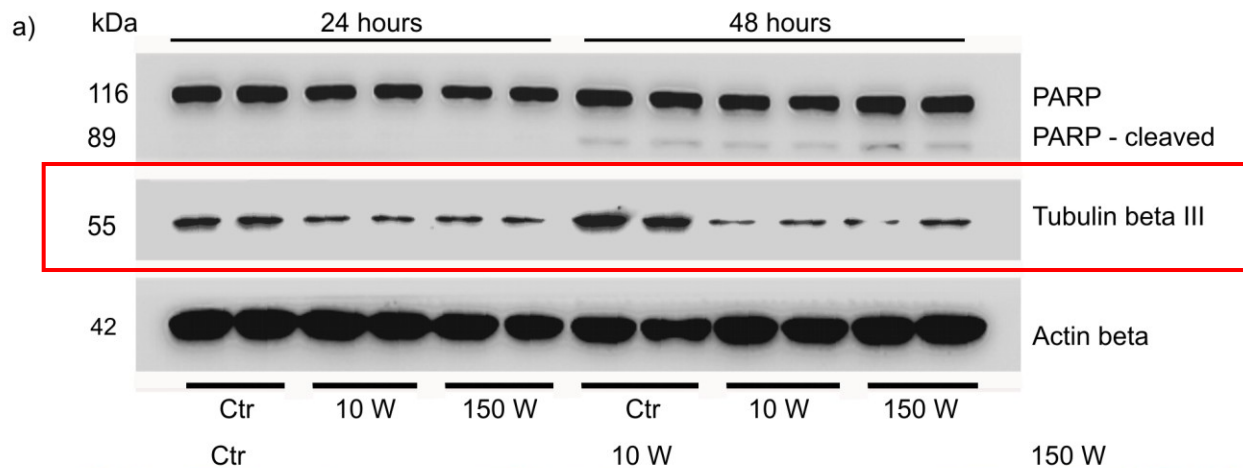
- V současné době se používají pro medicínské účely materiály na základě polystyrenu, polylaktátu, polycaprolaktonu a silikonu
  - nízká smáčivost, nízká volná povrchová energie
- Pro zvýšení přilnavosti buněk a podpory jejich růstu je nutné mít povrch s konstantní drsností, smáčivý a s povrchem pozitivně 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