

„ABC“ o ABC transportérech a dalřich zajímavvch tématech

❖ ABC transportéry

Fyziologick role

Asociace s chorobami

Multilkov rezistence

Detekce ABC transportérů

Aktuln projekty

❖ Biomateriály

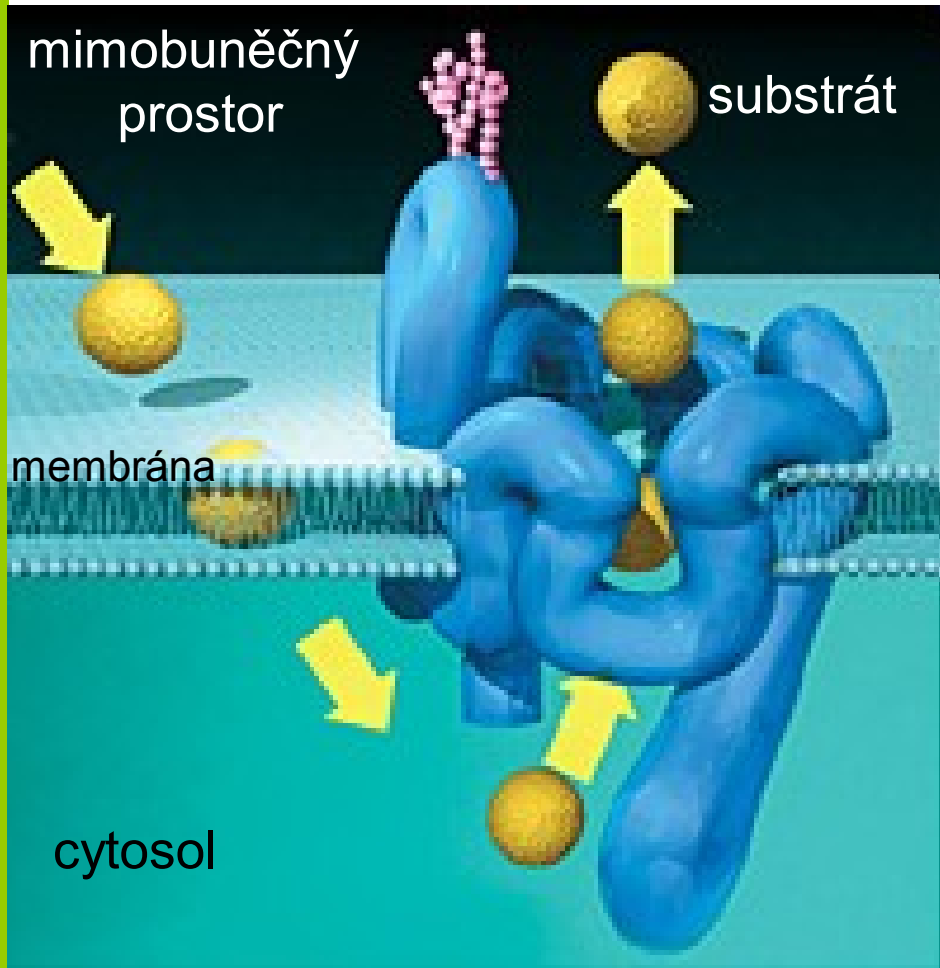
❖ Nitrovan mastn kyseliny

❖ Toxikologie



Co to jsou ABC transportéry?

http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch1_mdr.jpg



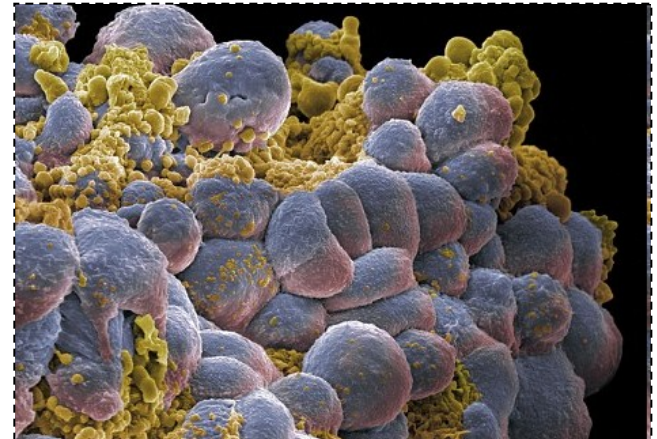
- **A**TP-**b**inding **c**assette
= NBD doména
- Za spotřeby **A**TP pumpují toxické látky/metabolické produkty **V**EN z eukariotické buňky (výjimka CFTR)
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám

Jak se na ně přišlo?

http://oceanicdefense.blogspot.com/2009_07_01_archive.html

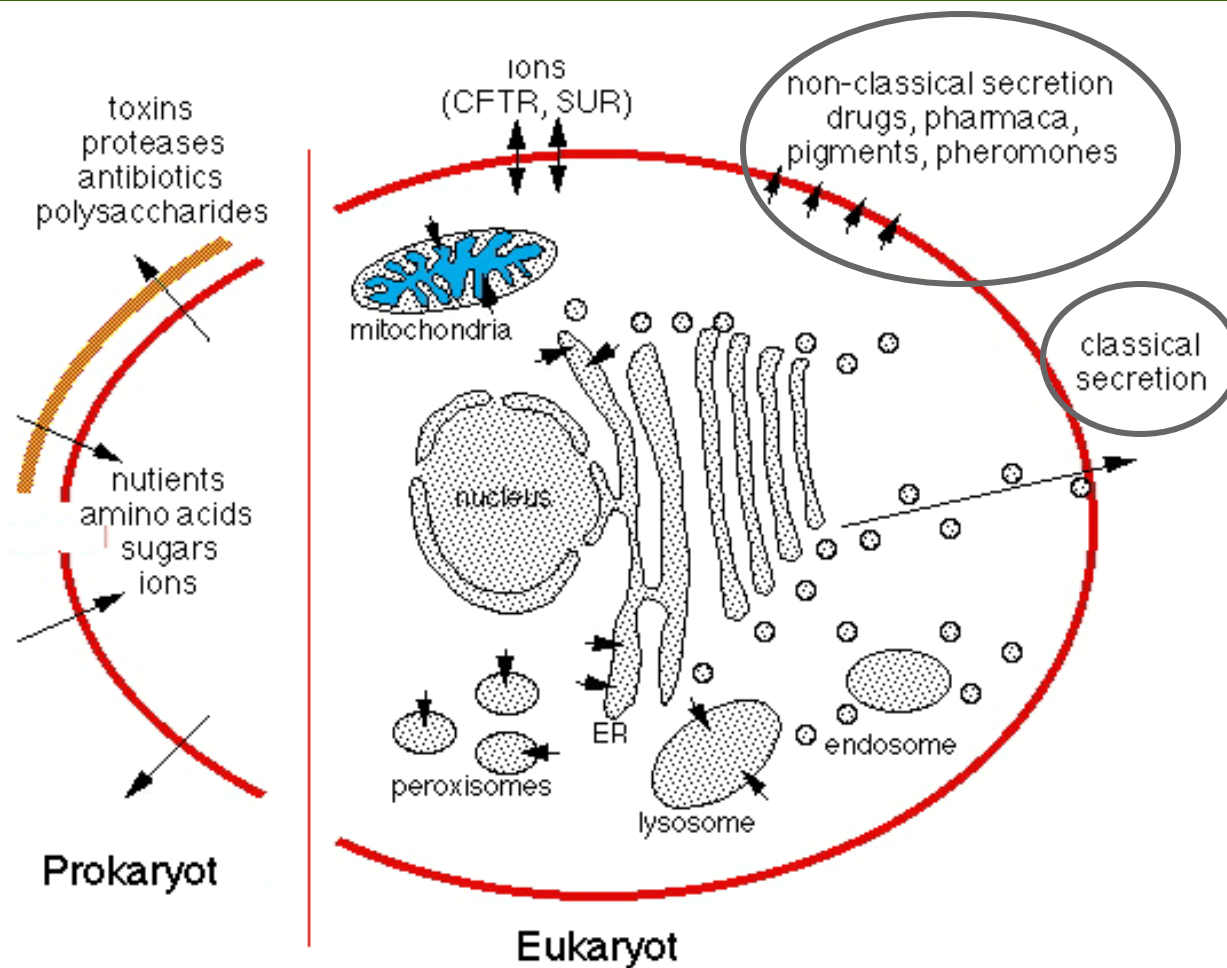
<http://www.dailymail.co.uk/health/article-1294676/>

- 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



Kde je najdeme??

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



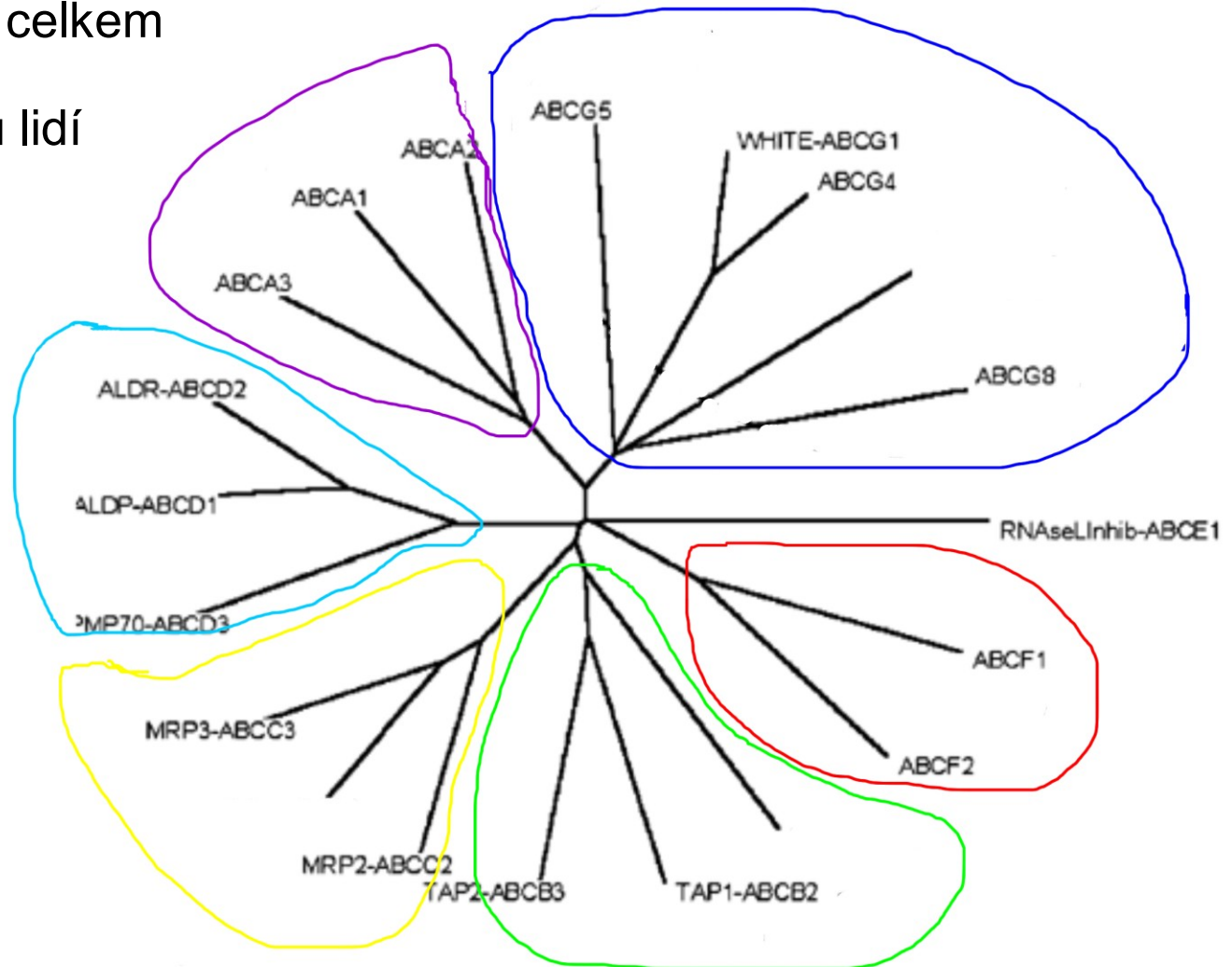
Šipky označují výskyt a směr transportu

Jak je dělíme?

http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig_tab/1206938f1.html#figure-title

100 proteinů celkem

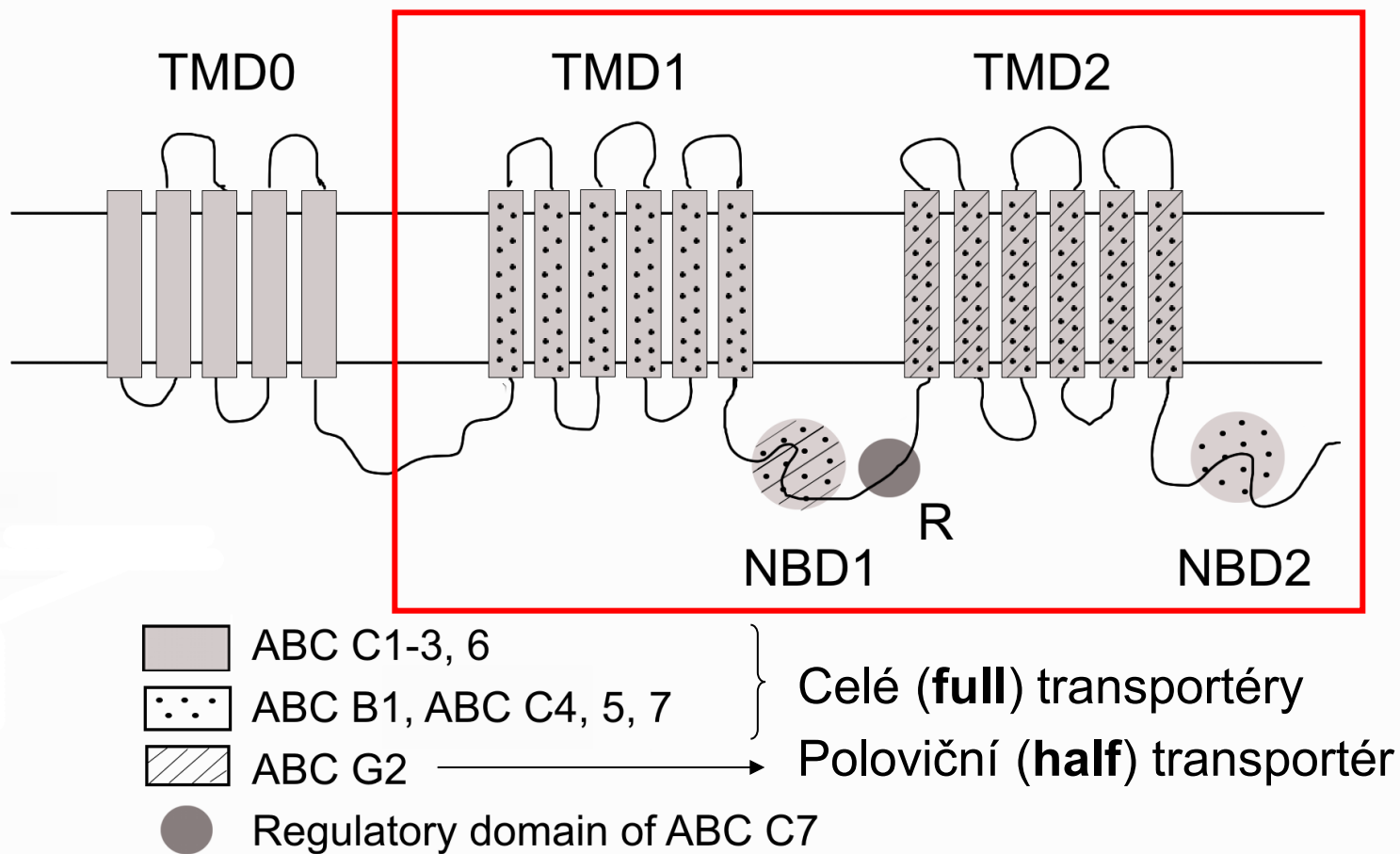
48 proteinů u lidí



7 rodin (A-G) podle sekvenční homologie

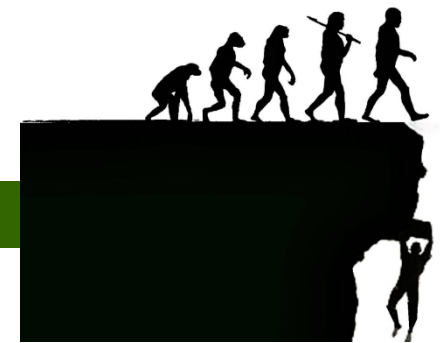
Z čeho se skládají?

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



Jak vznikly??

<http://www.theologylived.com/creation-and-human-origins/>



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

ABC B5

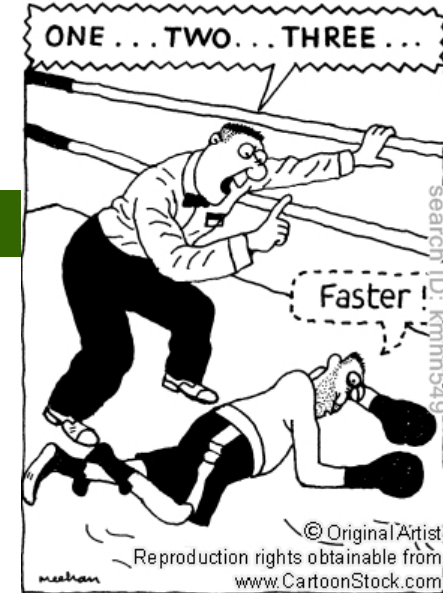
- Více sestřihových variant – dlouhá a krátká forma
- Krátká forma vznikla delecí části TMD z dlouhé formy
- Z původního half transportéru vznikla dlouhá forma a z ní krátká forma

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

Co s nimi udělá knock-out?

- 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



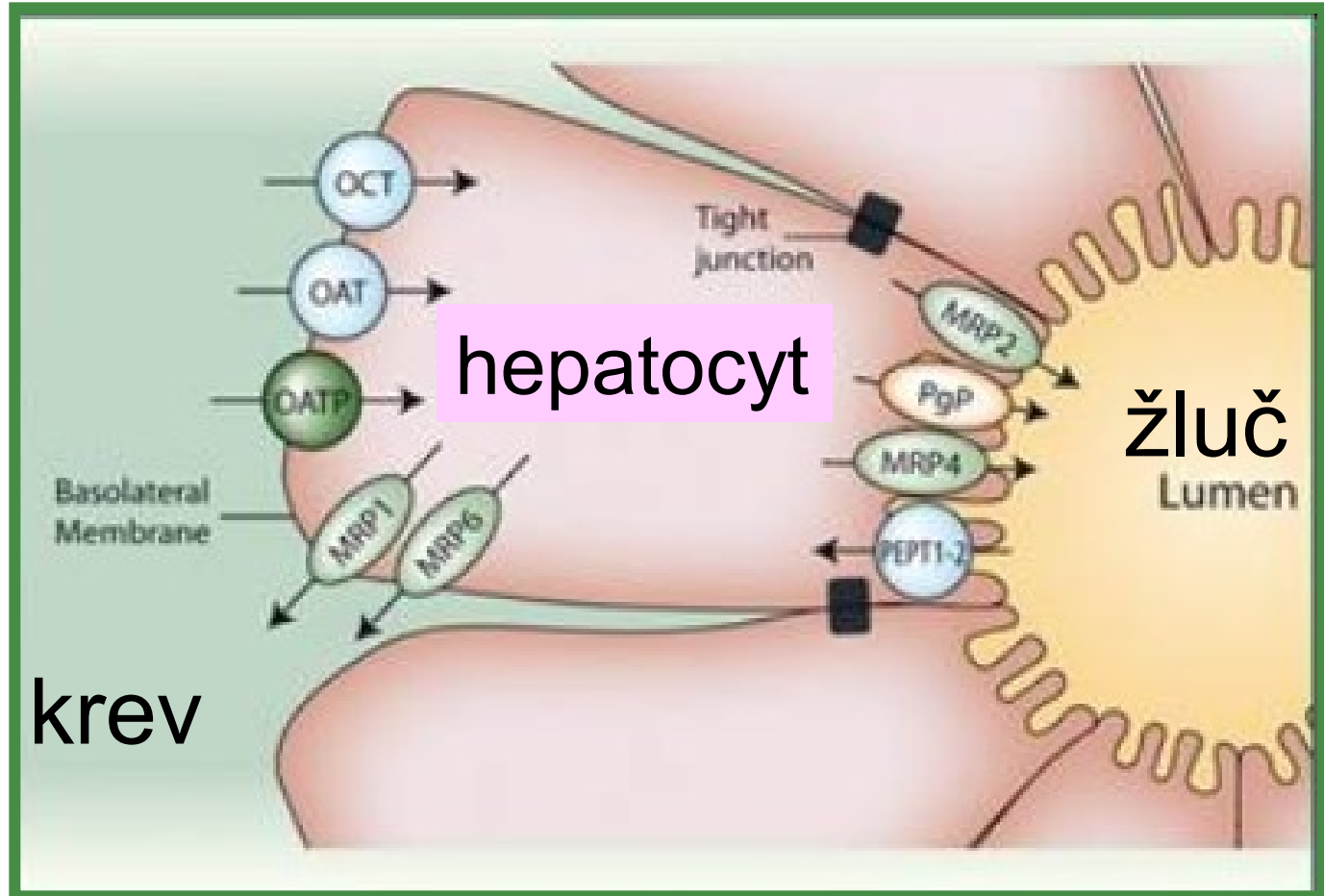
Kanál	Příklady fyziologických substrátů
MDR1	Konjugáty estrogeneru, endorfin, glutamát, beta-amyloid, steroidy, PAF
MRP1	Konjugáty glutationu a glukuronidu s leukotrienem C4, bilirubinem, žlučovými solemi
BCRP	Vitamíny (riboflavin, biotin), porfyriny, konjugáty estrogeneru

Substráty ABC transportérů ve výživě

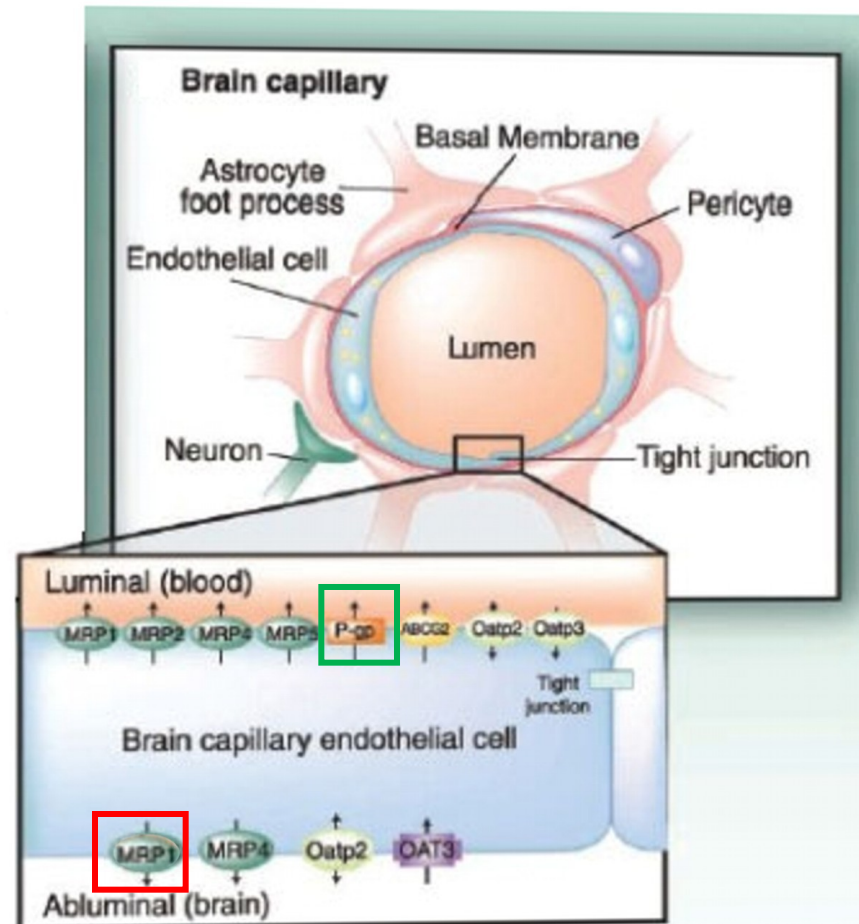


<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2000/buxton/a>

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



Polarizovaná exprese ABC transportérů je i v ledvinách, střevě, plicích...

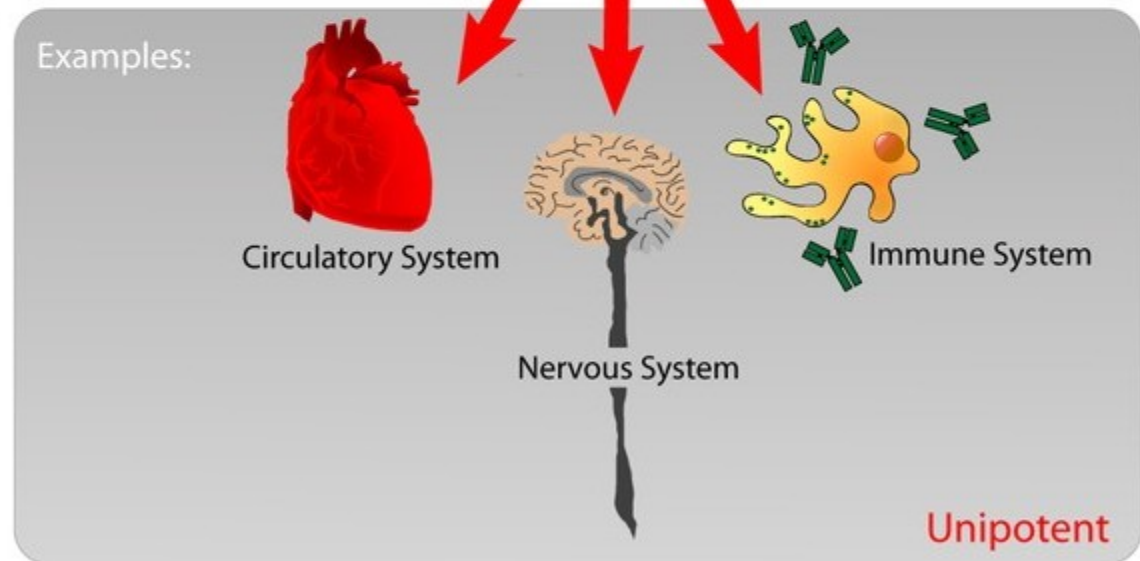
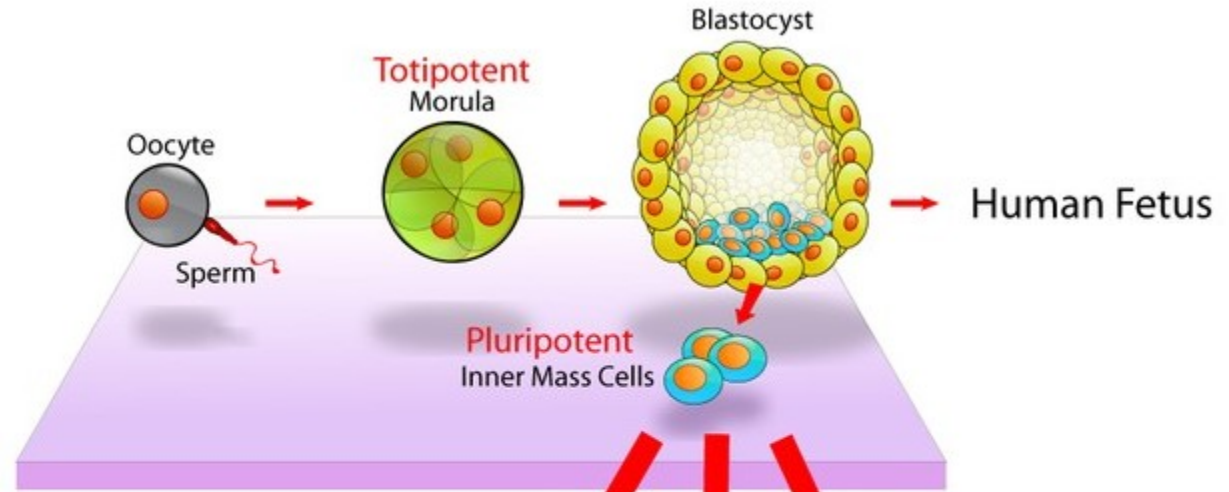


Další bariéry jsou na rozhraní placenta-fetus, krev-varlata, choroidní plexus-mozek

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)

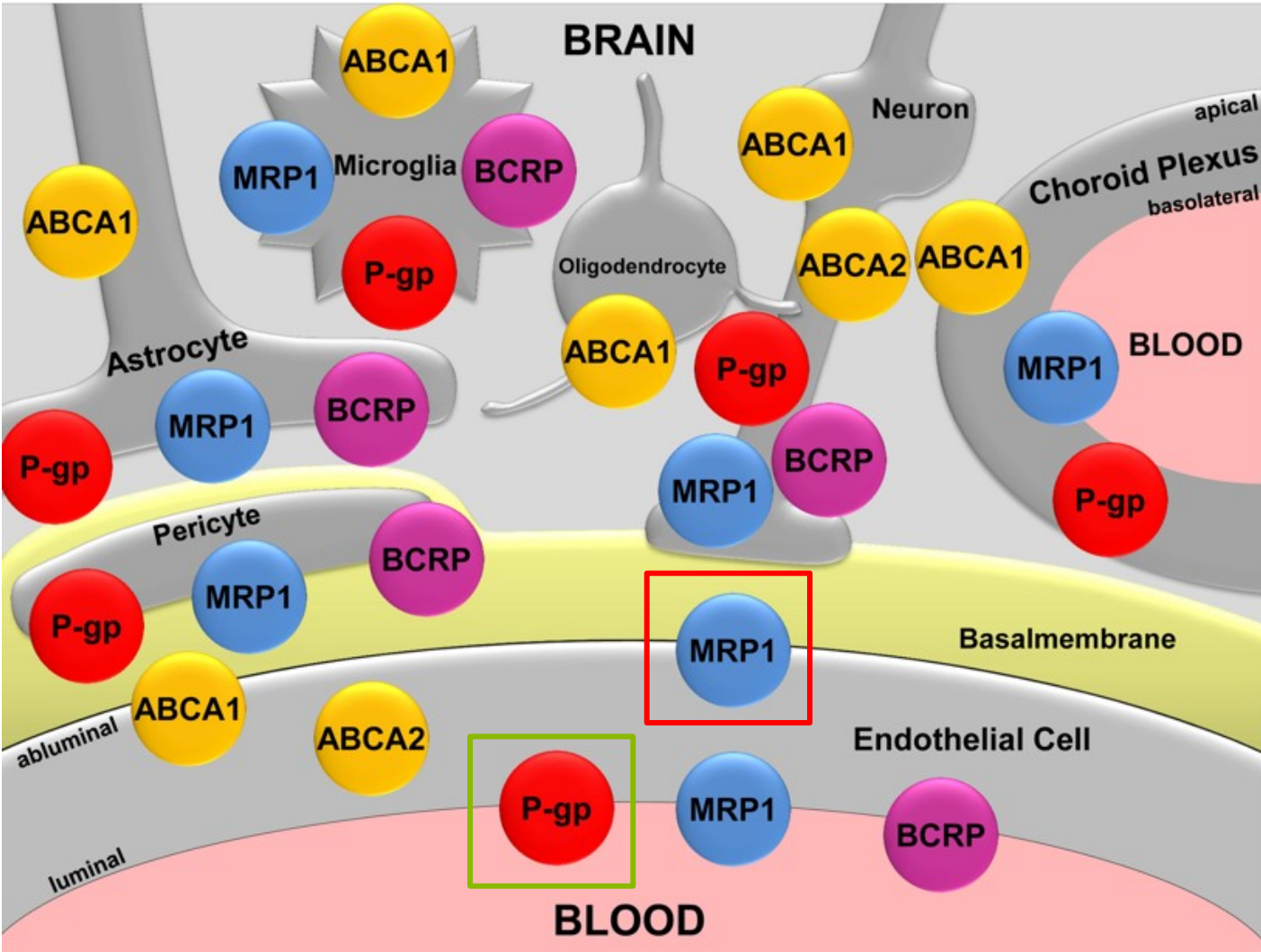
Dubin Johnson syndrom (*ABC C2*) – neschopnost jater sekretovat konjugovaný bilirubin do žluče

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– 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

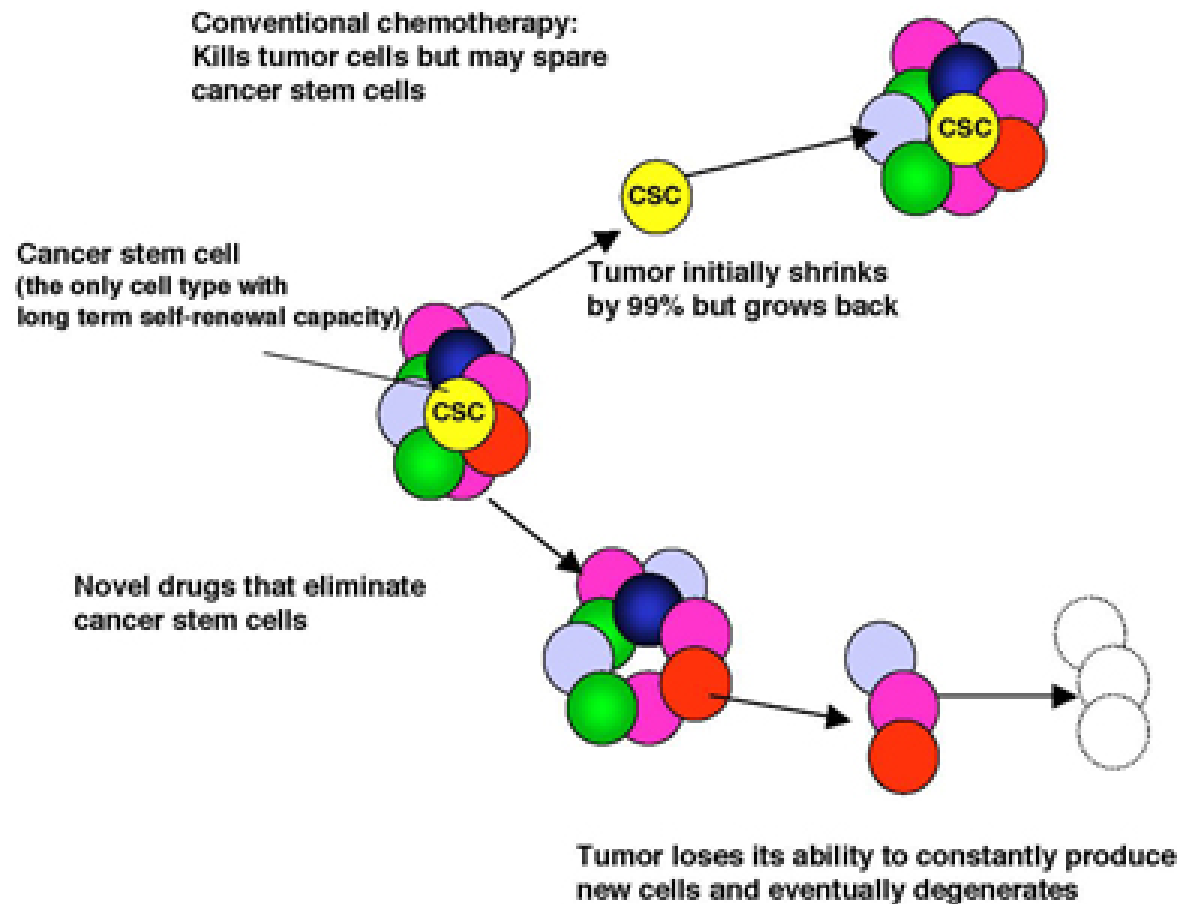
Neuroscientist 2011 17: 423 originally published online 25 April 2011



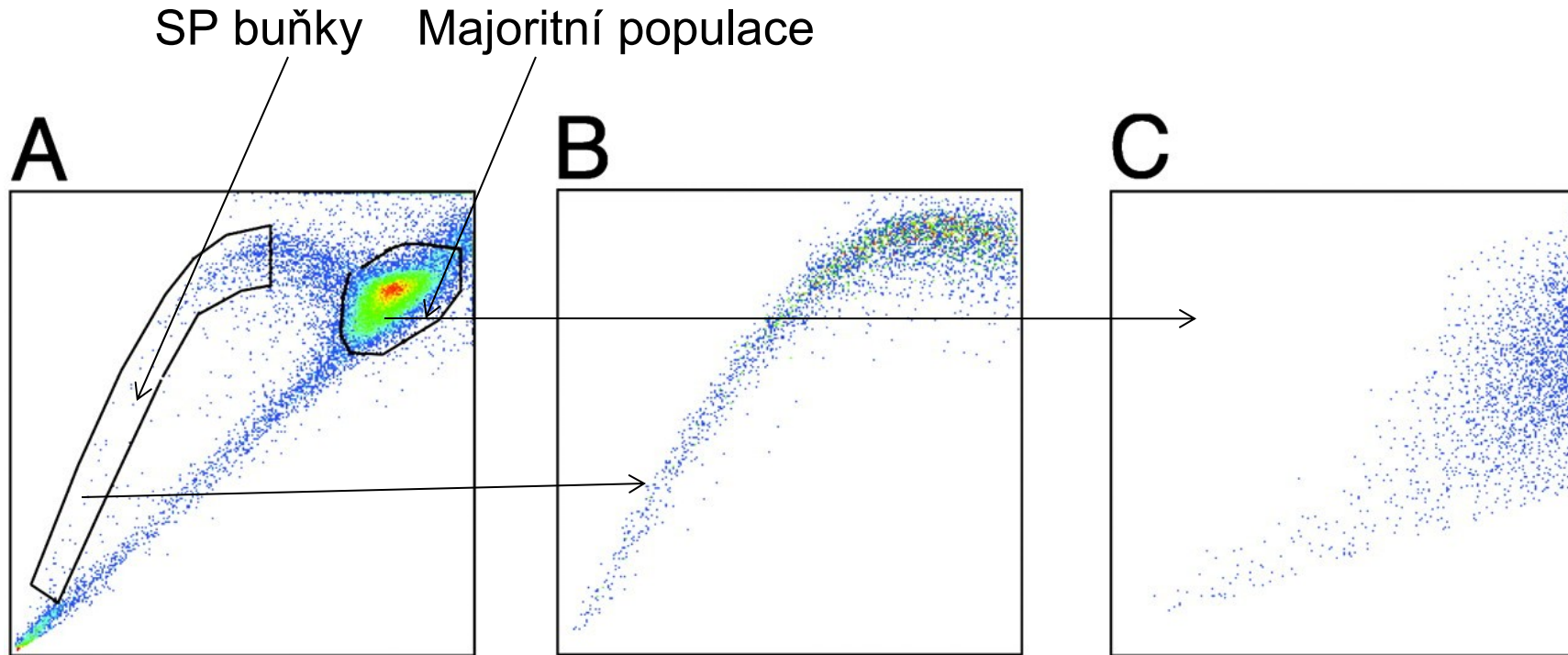
- ABC B1 exportuje A β (luminální část kapiláry)
- ABC B1a,b -/- myši – snížené odstraňování A β z mozku
- Dysfunkční ABC B1 na BBB – akumulace A β
- AD pacienti – snížená hladina ABC B1 v cévách kolem A β plaků
- Asociace mezi SNPs a rizikem vzniku AD nebyla nalezena
- ABC B1 exprese je zvýšena aktivací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

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

! Jeden transportér má různé substráty + jeden substrát je exportován více transportéry -> **MULTI**léková rezistence !

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

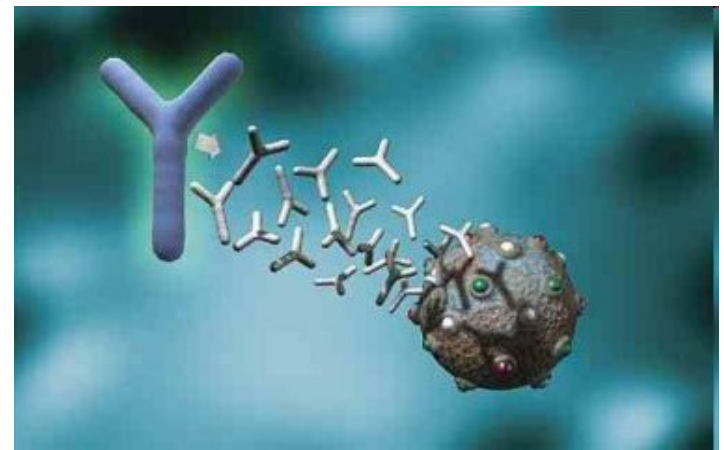
- Bodipy-prazosin

- Pheophorbid A

Obecné inhibitory transportu – verapamil, cyclosporin A

Imunodetekce

qRT-PCR



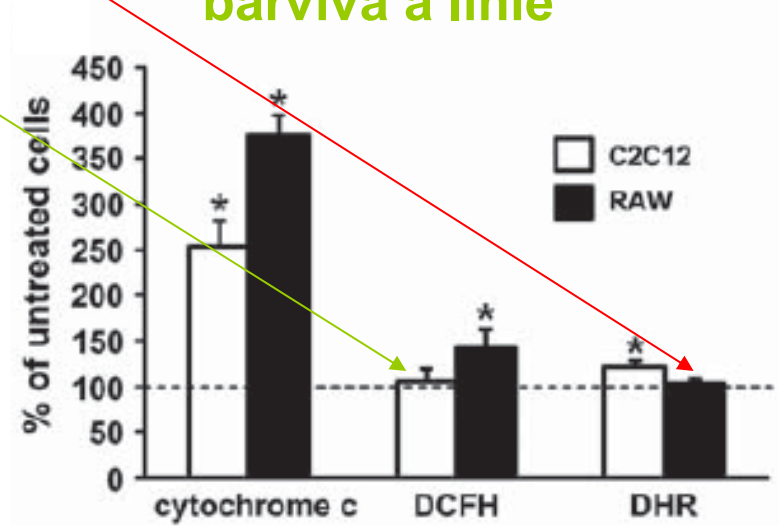
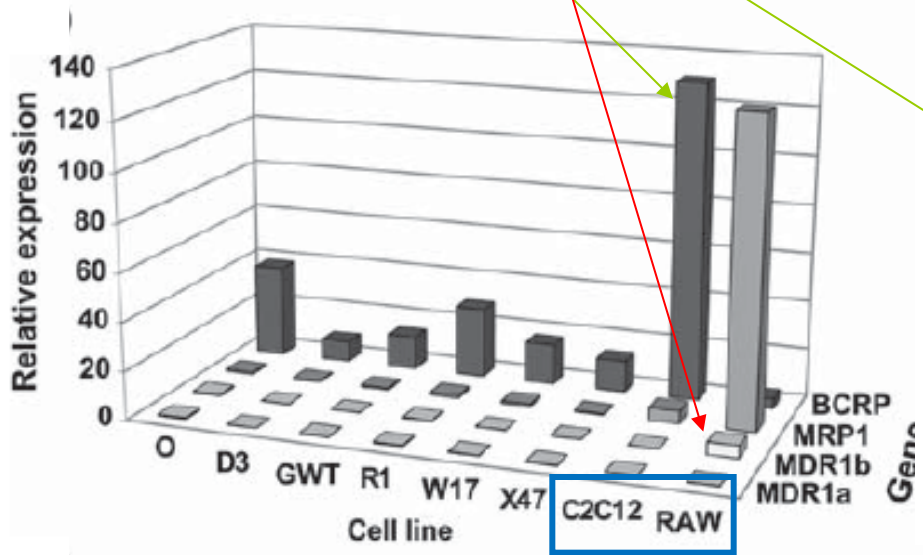
ABC transportéry ovlivňují výsledky klasických metod

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

ABC transporter	Probe								
	DCFH	DHR	DIOC6	HE	JC1	MitoSOX	TMRE	Calcein	Hoechst
MDR1	-	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++
MRP1	+	-	-	+	-	+	+	+++	-
BCRP	+++	+	-	+	+	+	-	-	+++

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

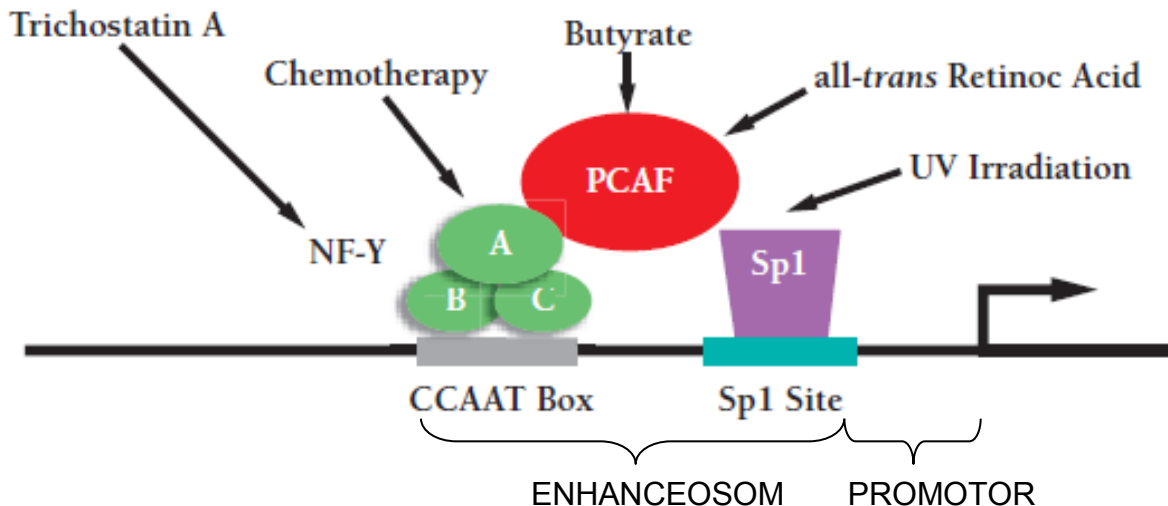
Falešně negativní
výsledek je způsoben
nevhodnou kombinací
barviva a linie



PMA indukuje produkci ROS

Aktuální projekty

Regulace transkripce

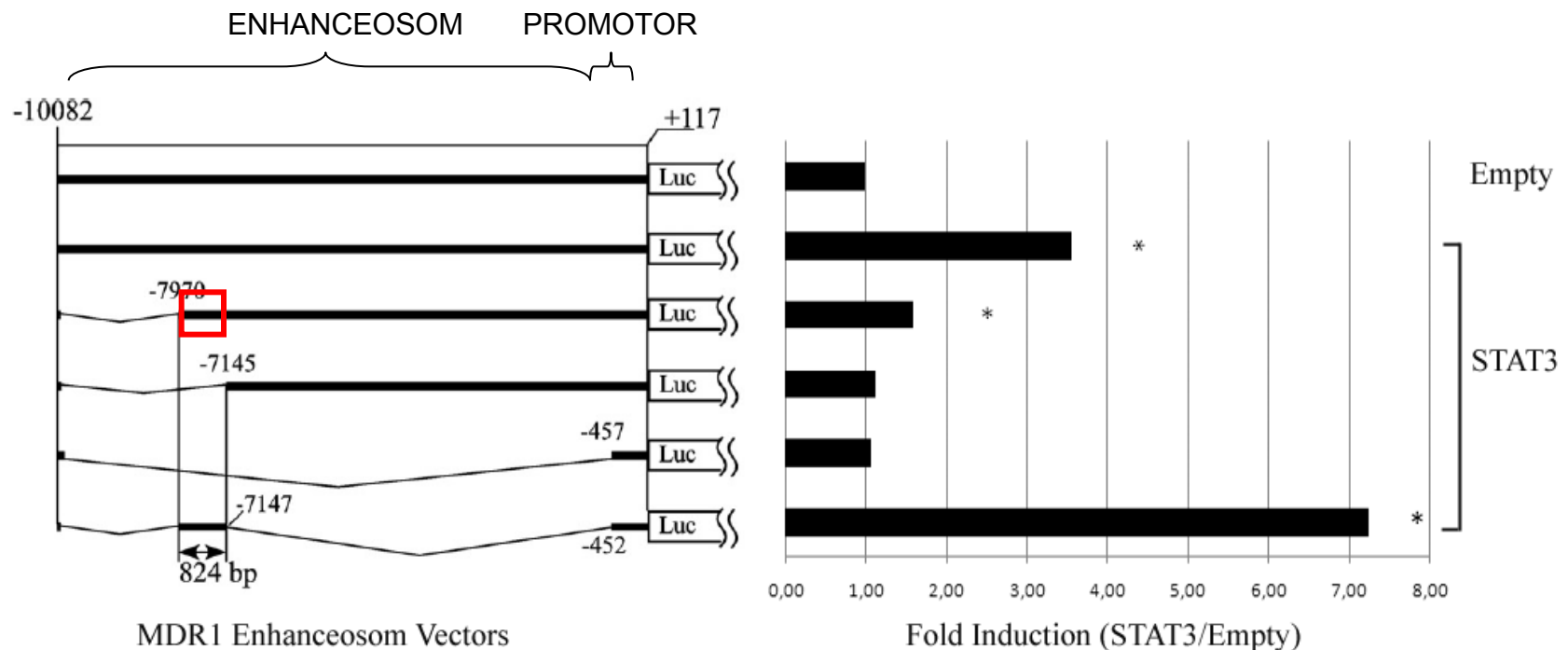


- Stres (teplo, zánět, hypoxie, UV záření, diferenciační činidla) vedou k zvýšení transkripce ABC transportérů
Studium promotoru + enhanceosomu

- Rychlé zvýšení exprese po inkubaci s jejich substráty (doxorubicin, vinca alkaloidy, etoposid, taxely)
Jak zamezit zvýšení exprese dřív než nastane???

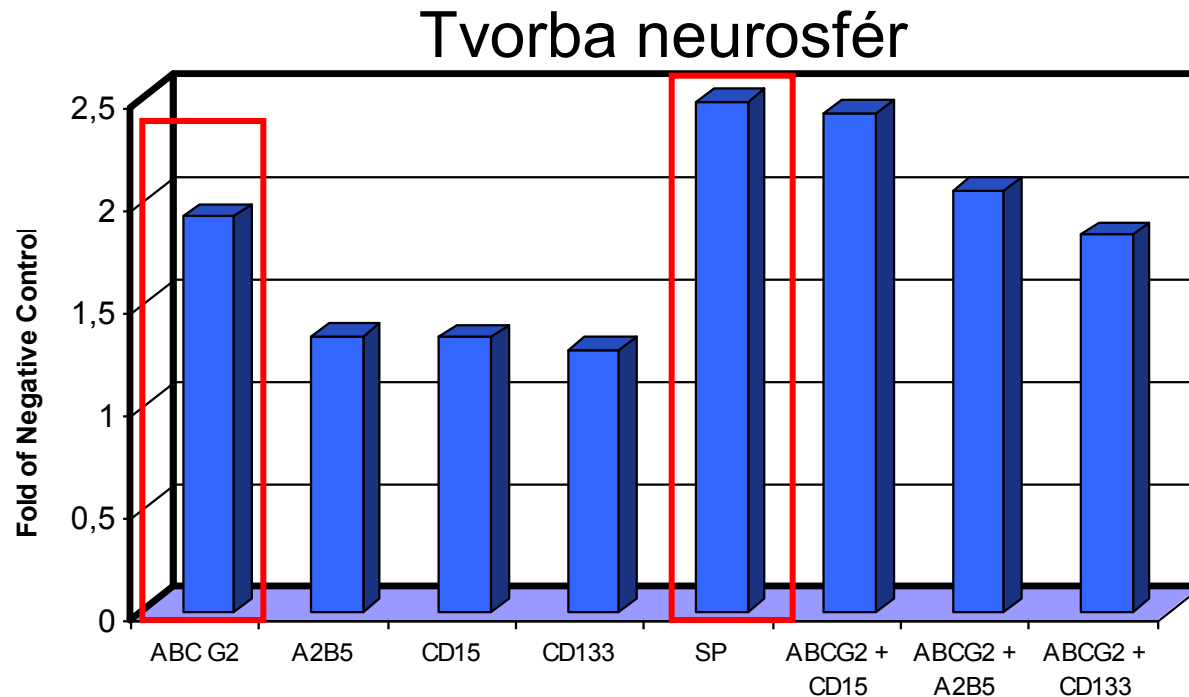
**Studium signálních drah vedoucích
k zvýšené expresi ABC transportérů**

- 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



CSC – cancer stem cells = TIC – tumor initiating cells

Pro glioblastomy se využívají markery A2B5, CD15 a CD133



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	-	++	++	-	+	+	-	++	++	-	+	+

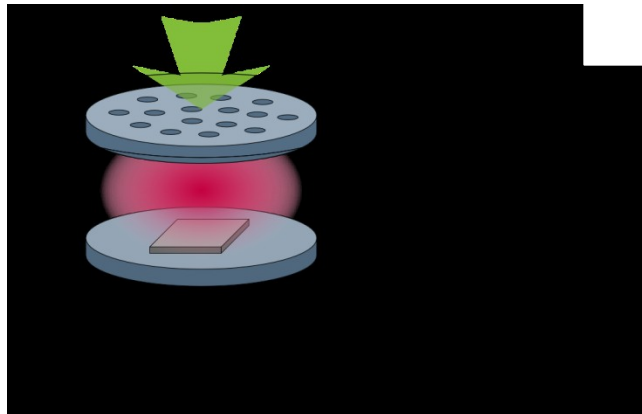
Pmel17	-	-	-	++++	++++	++++	+	++	+++	+++	++++	+++++
MDR1	+++	++++	++++	+	+	+	+	+	+++	++	+++	++++
MDR5	+	+	++	+	++	++	+	+	+	++	++	+
JAK/STAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PI3K/AKT	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
MAPK/ERK	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
MAPK/p38	++	+++	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++

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

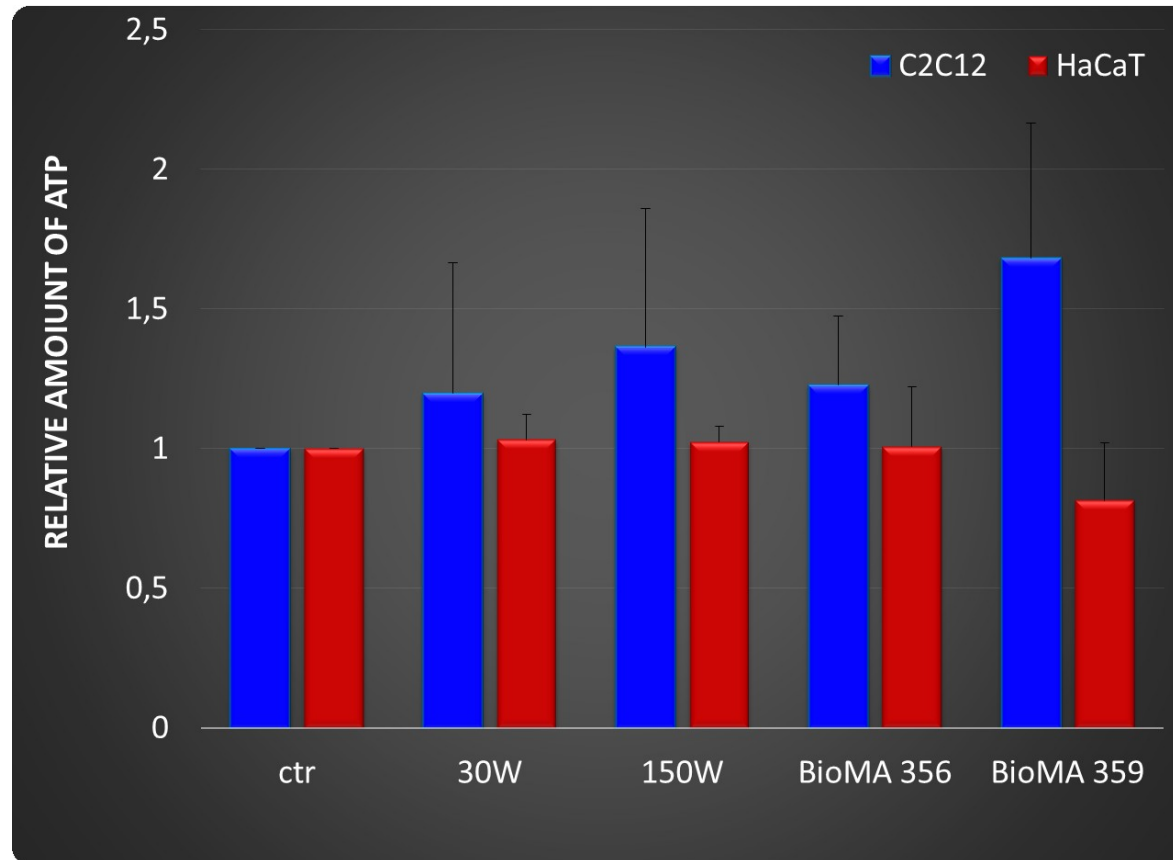
- Nejčastěji používané materiály pro medicínské účely jsou deriváty polystyrenu, polylaktátu, polycaprolaktonu a silikonu
 - nízká smáčivost, nízká volná povrchová energie, ekonomicky, časově i ekologicky náročné procesy
- Pro zvýšení přilnavosti buněk a podpory jejich růstu je nutné mít povrch s konstantní drsností, smáčivý a nabitý
- **PLAZMOVÁ FUNKCIONALIZACE POVRCHŮ**



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

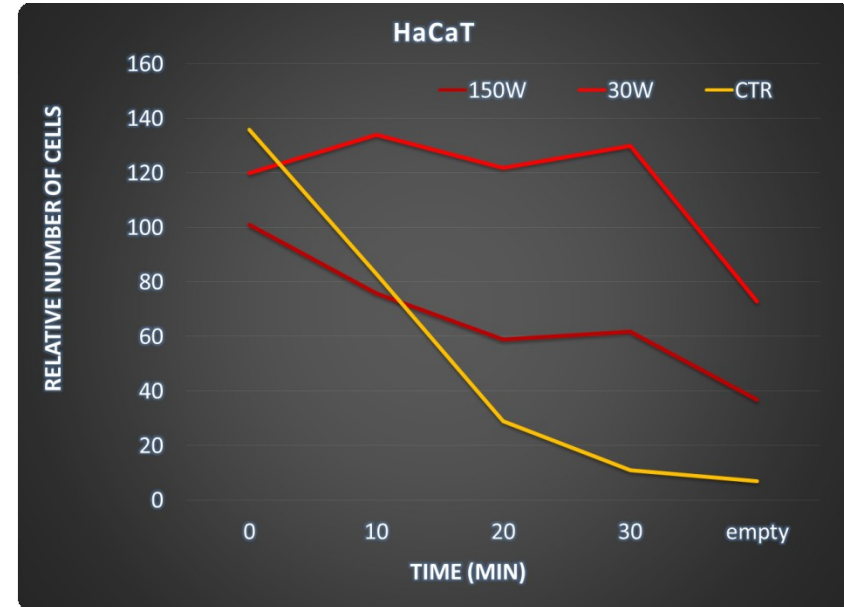
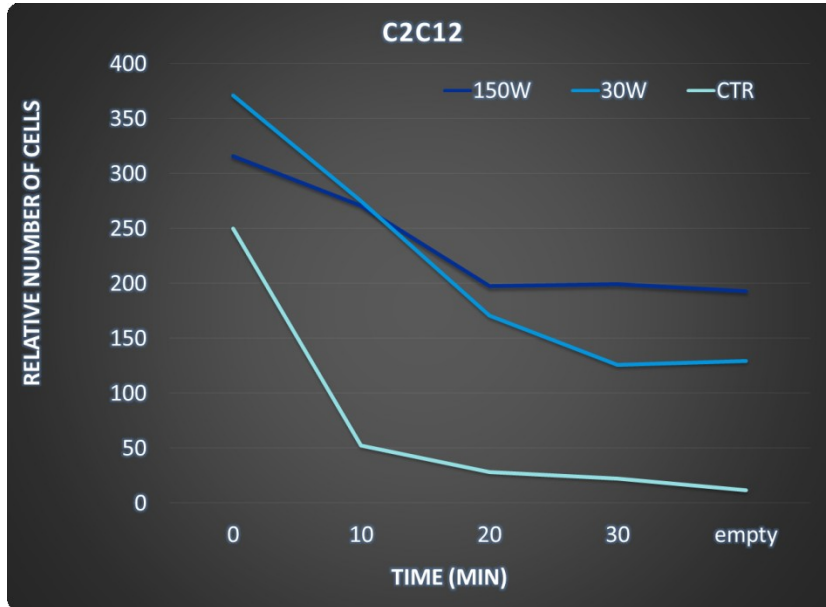
Plazmatem aktivovaný cyklopropylamin vytváří aktivní aminové (+) a karboxylové (-) funkční skupiny na povrchu polystyrenových misek a nanovláčkových membrán

- zvýšená adhezivita buněk vedoucí k jejich rychlejší proliferaci!
- studium cytokinetických parametrů a exprese povrchových molekul



ATP test – stanovení celkového množství ATP = počet buněk
Funkcionalizace zvyšuje rychlost proliferace buněk C2C12, HaCaT neovlivňuje

Adhezivita buněk

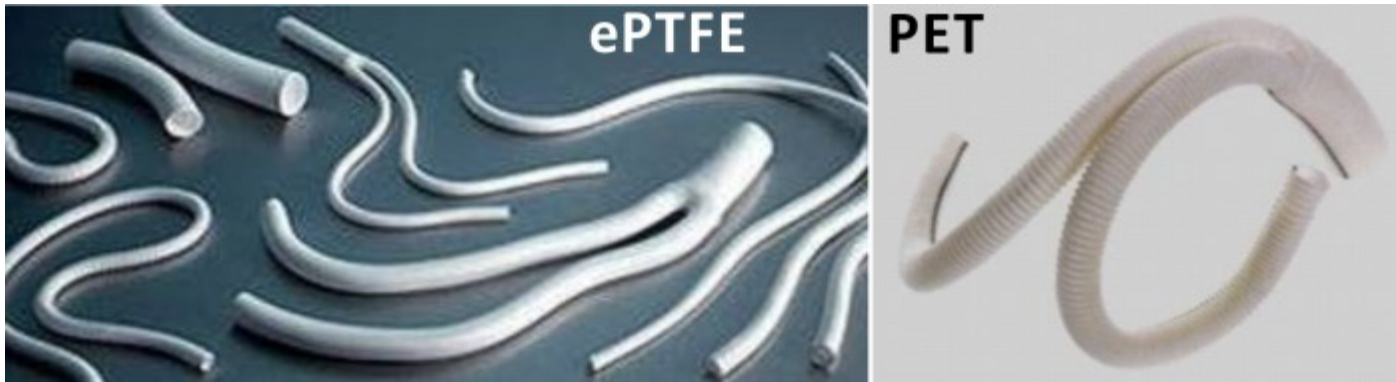


Buňky na funkcionalizovaném povrchu se nepustí po působení trypsinu
Funkcionalizace vytváří pevnější vazbu buňka-povrch
Jaký je mechanismus????

Spolupráce s ústavem fyziologie AV ČR – doc. Bačáková

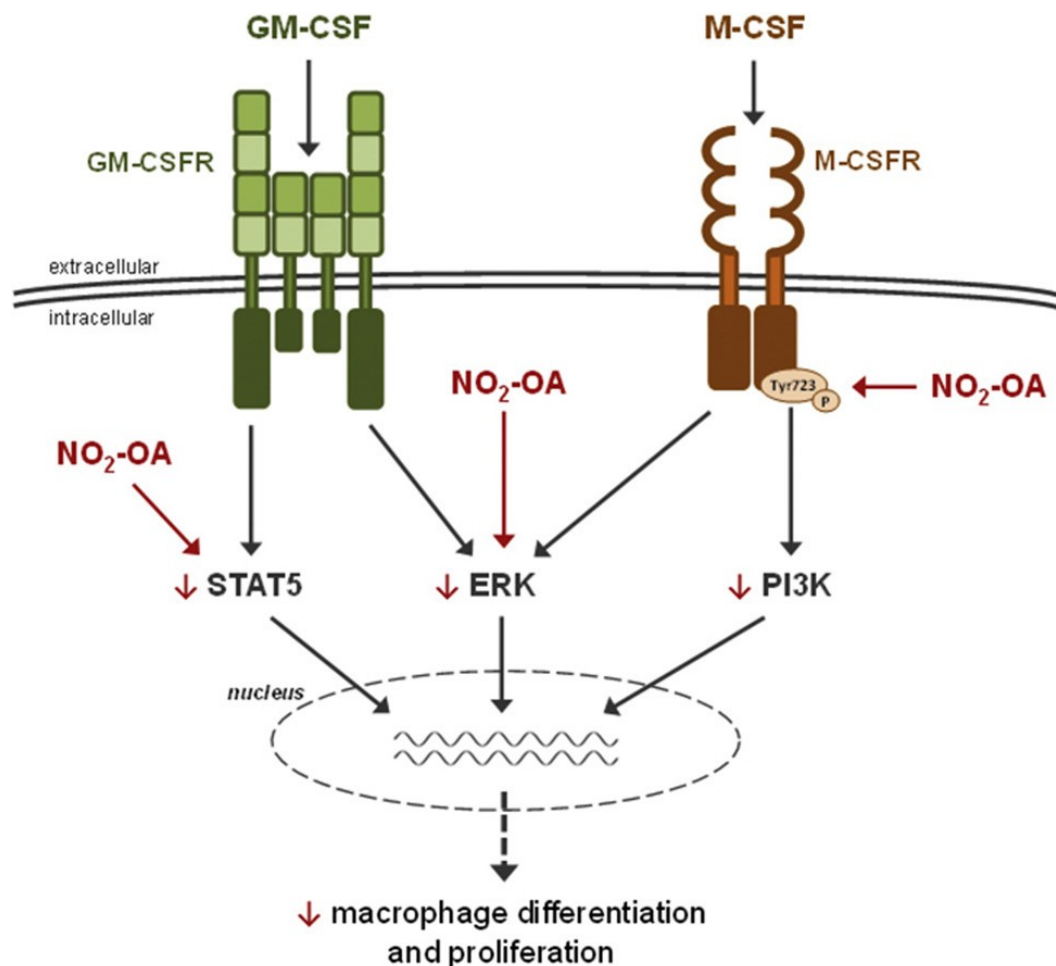
Povrchy tvořené polykaprolaktonem spřádeným do nanovláken a funkcionalizované aminy jsou vhodnými nosiči pro náhrady cév

Studium endotelových a kmenových buněk

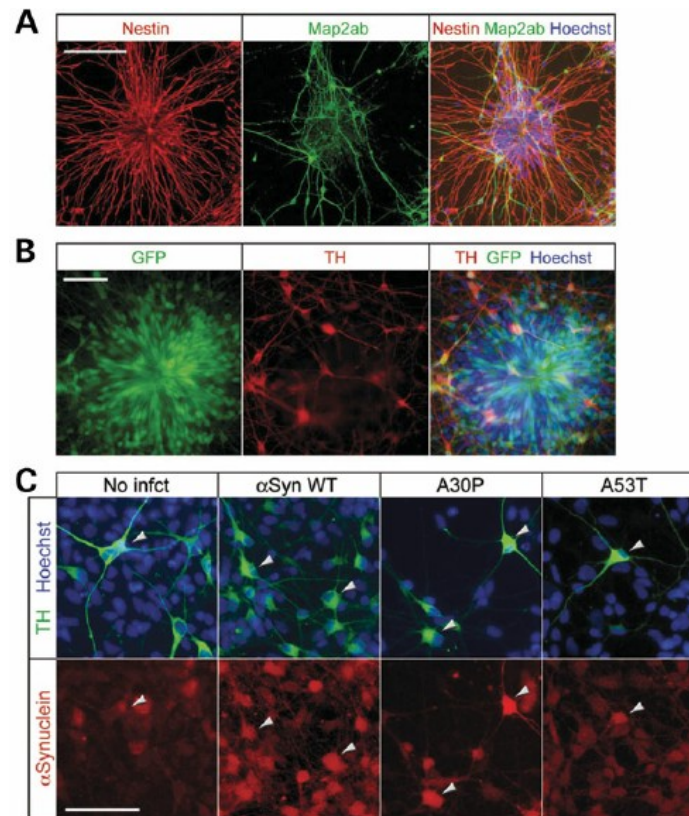


- Analýza vazebného místa STAT3 v MDR1 enhanceosomu
 - Rezistence melanomů způsobená MDR5
 - Vliv základních kinázových kaskád na transkripci ABC transportérů v nádorových a ES buňkách
 - Využití ABC transportérů pro identifikaci nádorových kmenových buněk
-
- Biokompatibilita materiálů s povrchy upravenými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

- Role nitrovaných mastných kyselin v potlačení aktivace makrofágů a snížení zánětlivé reakce



Toxikologie v praxi



Vliv chemických látek na diferenciaci neuronů

Děkuji za pozornost!

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



jipro@sci.muni.cz