

MTA doktori értekezés tézisei

**A sejtmembrán gyógyszertranszporterei: módszerfejlesztéstől a szerkezet-hatás
vizsgálatokig**

Laczka Csilla

Enzimológiai Intézet, TTK, ELKH

Budapest

2021

Tartalomjegyzék

ÖSZEFOGLALÁS	3
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
Az ABCG2 fehérje.....	6
Az OATP (Organikus anion transzporter polipeptid) család	7
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	8
III. MÓDSZEREK:.....	9
IV. FŐBB EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	10
V. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	25
VI. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	27
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	30
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	31

ÖSZEFoglalás

A sejtmembrán transzporterei membránba ágyazott fehérjék, amelyek összehangolt működése szükséges a sejt és a szervezet homeosztázisának fenntartásához. A membrántranszporterek egy része gyógyszerhatóanyagokat is felismer és befolyásolja ezek szervezeten belüli sorsát (abszorpció, disztribúció, metabolizmus és elimináció, ADME). A gyógyszertranszporterek aktivitásának megváltozása például mutációk, polimorfizmusok, vagy szubsztrátjaik és/vagy inhibitoraik együttes alkalmazása miatt, megváltozott farmakokinetikát és nem várt, akár toxikus mellékhatásokat eredményezhet (ADME-Tox). Ezt felismerve ma már a nemzetközi szabályozó hatóságok több gyógyszertranszporterrel való kölcsönhatás vizsgálatát is előírják a gyógyszerfejlesztés korai, preklinikai fázisában. Ilyen kitüntetett szerepe van többek között az ABC (ATP Binding Cassette) családba tartozó ABCG2 transzporternek és a Solute Carrier (SLC) fehérjecsaládba tartozó, a májban kifejeződő Organikus anion transzporter polipeptideknek (OATP1B1 és OATP1B3).

A doktori értekezésem alapját képező kutatások az ABCG2 fehérje és az OATP fehérjecsalád vizsgálatára irányultak. Az egyik célkitűzésünk az ABCG2 fehérje működésének és szabályozásának megértése volt, amely kapcsán vizsgáltam az ABCG2 fehérje szubsztrátfelismerésben és koleszterinérzékelésben részt vevő régióit. Tanulmányoztam továbbá egy, az ABCG2 fehérjét a sejtfelszínen felismerő antitest kötődésének mechanizmusát. Munkám másik célkitűzése a humán OATP fehérjecsalád vizsgálata volt. Ennek során többféle, fluoreszcencia-alapú és új megközelítésen alapuló mérési módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas ezeknek a transzportereknek az érzékeny kimutatására és akár nagy áteresztőképességű tesztelésére. Végezetül, az ABCG2 transzporter és az OATP fehérjecsalád több tagjának új kölcsönhatásait tártuk fel ismert gyógyszerhatóanyagokkal vagy korábban transzporter kölcsönhatásban nem jellemzett vegyületekkel. Az ABCG2 fehérjével kapcsolatos eredményeimre azóta számos további alkalmazás épült. Az OATP transzporterekre kidolgozott fluoreszcencia-alapú módszereink pedig jó alternatívái lehetnek az eddigi, radioaktív próbákra alapuló módszereknek és széleskörű felhasználást nyerhetnek.

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az emberi genomban található gének 10%-a, mintegy 2000 gén membrántranszportert vagy a membrántranszport folyamatokhoz kapcsolt fehérjét kódol (Hediger et al. 2013). A membrántranszporterek a biológiai membránokba ágyazott polipeptidek, amelyek különböző anyagok membránokon át történő, szabályozott transzlokációját végzik. A transzporterek összehangolt működése szükséges a sejt és a szervezet homeosztázisának fenntartásához. Egy részük azonban, jellemzően a multispecifikus transzporterek, nem csak az endogén eredetű anyagok (vitaminok, hormonok, tápanyagok) transzportjában vesz részt, hanem számos exogén eredetű vegyület, köztük gyógyszerhatóanyagok szervezeten belüli sorsát is befolyásolják.

A gyógyszertranszporterek az ABC (ATP Binding Cassette) és SLC (SoLute Carrier) fehérjecsaldokból kerülnek ki.

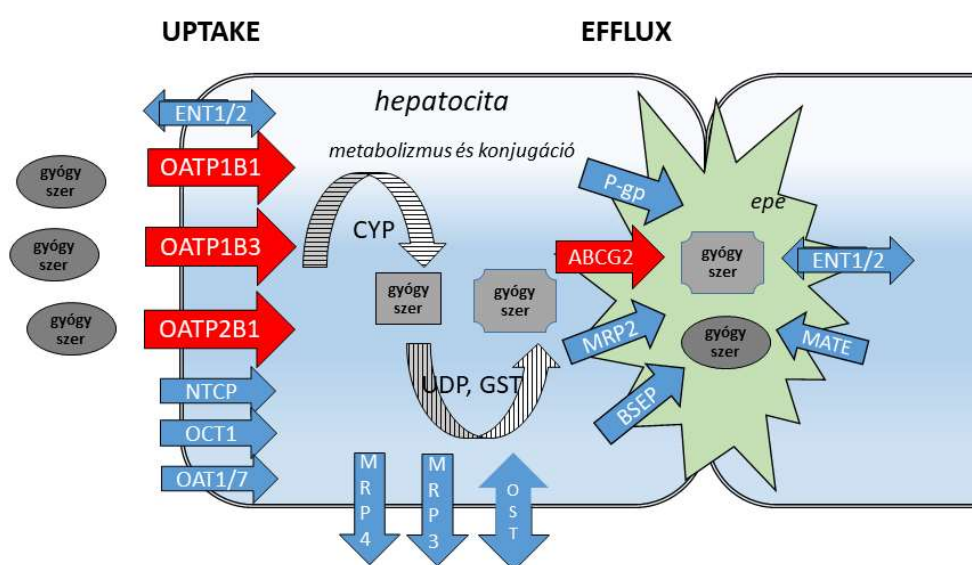
Az **ABC fehérjék** nevüket jellegzetes ATP-kötő (ATP Binding Cassette) doménjükéről kapták. A humán ABC fehérjecsald 48 tagot számlál, amelyeket szekvenciájuk hasonlósága és doménsorrendjük alapján 7 (A-G) alcaldba sorolnak (Dean 2005; Dean and Allikmets 1995). Az ABC fehérjék két fő „építőeleme” a transzmembrán (TM) domén (TMD), amely minimum 6 transzmembránon átívelő helikális struktúrából áll és a fent említett ABC motívumot is tartalmazó nukleotidkötő domén (NBD).

A **SoLute Carrierek (SLC-k)** a legnépesebb transzporter szupercald, amely több, egymással nem rokon fehérje/gén családra tagolódik. Az emberi genomban közel 500 SLC gén található, amelyek 65 SLC családba tartoznak (Hediger et al. 2013) és <http://slc.bioparadigms.org/>). Ezekben mindössze annyi a közös, hogy a kódolt fehérjék oldott anyagok membránon át történő szállítását végzik, és nem elsődlegesen aktív transzporterek (Hediger et al. 2013).

Az ABC-k és SLC-k kéz a kézben működnek a hepatobiliáris és renális exkrécióban, valamint az epiteliális és endoteliális barrierek védelmében. Ráadásul nem csak gyógyszereszubsztrátjaik és azok metabolitjainak **ADME (abszorpció, disztribúció, metabolizmus és elimináció)** tulajdonságait befolyásolják, de fontosak a szervezet hormonháztartásának és tápanyagellátásának szabályozásában is.

A gyógyszertranszporterek aktivitásának megváltozása például mutációk, polimorfizmusok, vagy szubsztrátjaik és/vagy inhibitoraik együttes alkalmazása miatt, megváltozott farmakokinetikát és nem várt, akár toxikus mellékhatásokat eredményezhet (ADME-Tox). Ezt felismerve ma már a nemzetközi

szabályozó ügynökségek, FDA (US Food and Drug Administration), EMA (European Medicines Agency) és PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan), együttműködve a nemzetközi transzporter konzorciummal (International Transporter Consortium, ITS), ajánlásaikban leírják, hogy mely transzporterek vizsgálandók a gyógyszerfejlesztés során (International Transporter et al. 2010; https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf ; <https://www.fda.gov/files/drugs/published/In-Vitro-Metabolism--and-Transporter--Mediated-Drug-Drug-Interaction-Studies-Guidance-for-Industry.pdf>). Az ajánlásban közel 30 transzporter szerepel. Az **1. ábra** a máj igazolt gyógyszertranszportereit mutatja be.



1. ábra: A májsejtek nemzetközi ajánlások alapján vizsgálendő gyógyszertranszporterei (Zamek-Gliszczyński et al. 2018) alapján. Pirossal az általam vizsgált transzportereket emeltem ki. **ABC fehérjék:** **P-gp** (P-glikoprotein, ABCB1), **MRP** (multidrog rezisztencia asszociált fehérjék, ABCC), **BSEP** (bile salt export pump, epesó transzporter, ABCB11).

SLC-k (SoLute Carriers, oldott anyag transzporterek): **OATP** (Organikus anion transzporter polipeptidek, SLCO), **OCT** (Organic cation transporter, szerves kation transzporter, SLC22A), **OAT** (Organic anion transporter, szerves anion transzporter, SLC22A), **ENT** (equilibrative nucleoside transporter, ekvilibratív nukleozid transzporter, SLC29A), **MATE** (Multidrug and toxin extrusion protein, gyógyszer és toxin transzporter, SLC47A), **NTCP** (sodium- taurocholate cotransporting polypeptide, Na-függő taurokolát transzporter, SLC10A), **OST α/β** (Organic solute transporter, Na-független epesó transzporter, SLC51A).

Az ábrán a gyógyszerek átalakításában részt vevő enzimeket is jelöltem, CYP: Citokróm P450 enzimcsalád, UDP: UDP-glükuronil-transzferáz, GST: glutation S-transzferáz.

Kutatómunkám fókuszában az ABCG2 fehérje és az SLC fehérje szupercsaládba tartozó Organikus anion transzporter polipeptidek (OATP-k) voltak.

Az ABCG2 fehérje

Az ABCG2 fehérje az **ABCG** **alcsalád** tagja (Allikmets et al. 1998; Doyle et al. 1998; Miyake et al. 1999). Az ABCG2 homodimerként működik (Kage et al. 2002; Ozvegy et al. 2001), szubsztrátjait ATP hidrolízis energiájának terhére (aktív transzporter) az őt kifejező sejtekből az extracelluláris tér felé szállítja („efflux” transzporter).

Az ABCG2 fehérje az emberi szervezet számos, jellegzetesen a határoló funkciót ellátó szövetében termelődik (Kerr, Haider, and Gelissen 2011): vér-agy gát, vékonybél, placenta, illetve a méregtelenítésben és a kiválasztásban kulcsfontosságú szervekben, így a májban és a vesében fordul elő legnagyobb mennyiségben (Zhang et al. 2003; Maliepaard et al. 2001).

Az ABCG2 fehérje 1989/99-es felfedezését követően hamar az érdeklődés középpontjába került, hiszen nem csak a farmakokinetika fontos szereplője, hanem számos fiziológiás folyamatban is részt vesz (Kerr, Haider, and Gelissen 2011), és működése a tumorok multidrog rezisztenciájáért is felelős (Robey et al. 2018; Kerr, Haider, and Gelissen 2011).

Az **ABCG2 fehérje multispecifikus transzporter**, számtalan, eltérő fizikokémiai tulajdonságú vegyületet felismer és transzportál (Kerr, Haider, and Gelissen 2011; Szafraniec et al. 2014).

Legfontosabb endogén szubsztrátjai ösztrogén konjugátumok (ösztro-3-szulfát, ösztrodiol-17 β D-glükuronid), porfirinek (hem), B2 vitamin, folsav és húgysav. Csökkent működést eredményező leggyakoribb polimorf változata (Q141K) a köszvényes esetek 10%-áért felelős (Woodward et al. 2009).

Az ABCG2 számos, gyógyszerként alkalmazott vegyületet is szállít (antivirális szerek, folsav antagonisták, kemoterápiás szerek, sztatinok, stb.) (Lee et al. 2015). Befolyásolja gyógyszer-szubsztrátjai vékonybélből történő felszívódását, hepaticus eliminációját és a vér-agy gáton történő átjutását (Schnepf and Zolk 2013; Lee et al. 2015). Az ABCG2 működése nem csak a felnőtt szervezet, hanem a magzat védelmében is fontos (Jonker et al. 2000). Az ABCG2 az immunrendszerrel analógiába állított „kemoimmunitás” rendszer része, amelynek tagjai multispecifikus ABC fehérjék és amely a szervezetünk általános, xenobiotikumokkal szembeni védelmét látja el (Sarkadi et al. 2006). Mindezekből következik, hogy az ABCG2 kiemelten fontos szereplője az ADME-Tox folyamatoknak,

FDA, EMA és PMDA ajánlás alapján a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában vizsgálandó (<http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>).

Az OATP (Organikus anion transzporter polipeptid) család

Az Organikus Anion Transzporter Polipeptidek (OATP) az emberi endotél és epitél sejtek membránjában jelen lévő transzporterek. Az emberi genomon 11 OATP-t kódoló gént (SLCO) azonosítottak. Az OATP fehérjéket Na^+ - és ATP-független szerves anion cserélőkként ("exchangerek") definiálják. Működésük pontos mechanizmusa azonban, még nem teljesen ismert.

Az OATP-k nagyméretű (>300 Da), negatívan töltött vagy amfipatikus szerves molekulákat transzportálnak. Endogén szubsztátjaik az epesók, szteroid és tiroid hormonok, prosztaglandinok és bilirubin. Az OATP fehérjecsalád több tagja multispecifikus transzporter, amelyek endogén szubsztátjaikon kívül gyógyszereket is képesek szállítani (Roth, Obaidat, and Hagenbuch 2012; Hagenbuch and Stieger 2013), meghatározva ezek szervezeten belüli sorsát. Több OATP gyógyszer-gyógyszer (DDI: drug-drug interaction) vagy étel-gyógyszer (FDI: food-drug interaction) kölcsönhatásokban is részt vesz (Kovacsics, Patik, and Ozvegy-Laczka 2017) (16.sz. közlemény). A multispecifikus, gyógyszerek ADME-Tox paramétereit befolyásoló OATP-k az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék.

Az **OATP1A2** legnagyobb mennyiségben a vér-agy gát endotél sejtjeinek lumenális oldalán található meg (Gao et al. 2000). Ezen kívül kimutatták még a kolangiocitákban, neuronokban és a vese disztális tubulus sejtjeiben (Hagenbuch and Stieger 2013). Az OATP1A2 befolyásolja szubsztátjai központi idegrendszerbe való bejutását, így lehetséges farmakológiai célpont a központi idegrendszert célzó vegyületek célbajuttatásában (Urquhart and Kim 2009; Ronaldson and Davis 2013). Expressziós mintázata alapján fontos szerepe van továbbá a szubsztátjainak az epéből, illetve a vizeletből történő reabszorpciójában.

Az **OATP2B1** igazoltan részt vesz szubsztátjai vékonybélből történő felvételében (Shitara et al. 2013), ezen kívül megtalálható a hepatociták szinuszoidális oldalán (Kullak-Ublick et al. 2001), az OATP1A2-vel azonosan a vér-agy gát endotél sejtjeiben (Gao et al. 2000), és még számos endotél vagy epitél eredetű sejtben (Hagenbuch and Stieger 2013).

Az **OATP1B1** és **OATP1B3** fehérjék expressziója a hepatocitákra korlátozódik (Konig et al. 2000; Abe et al. 2001). Ez a két fehérje az OATP család legjobban jellemzett két tagja, az FDA, EMA és PMDA ajánlásai alapján gyógyszerkölcsönhatásban vizsgálandó, amennyiben a gyógyszerjelölt molekula hepaticus eliminációját valószínűsítik.

II. CÉLKITŰZÉSEK

I. Az ABCG2 fehérjével kapcsolatos kutatásaimnak a fehérje működésének és szabályozásának megértése volt a fő célja.

I.1. Ennek során a szubsztrátfelismerést és a koleszterinérzékelést befolyásoló fehérje régiókat vizsgáltuk mutáns változatok jellemzésével. Célunk volt

- a. az ABCG2 fehérje mutációs forró pontjának feltérképezése és
- b. az ABCG2 koleszterin-szenzor régiójának felderítése.

I.2. Célunk volt továbbá egy, az ép sejtekben kifejeződő ABCG2 fehérjét felismerő antitest kötődési mechanizmusának vizsgálata.

II. Kutatómunkám további részében a humán OATP transzporter család vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia-alapú módszerek kidolgozása volt a cél, amely

- a. alkalmas a humán OATP fehérjék vizsgálatára
- b. lehetővé teszi a máj OATP1B1 és ABCG2 vagy MRP2 fehérjéinek együttes vizsgálatát
- c. közepes áteresztőképességű és megbízható mérési módszert ad
- d. automatizálható.

III. Végezetül célunk volt új hatóanyag- ABCG2 és OATP transzporter kölcsönhatások feltárása.

III. MÓDSZEREK:

A dolgozatomban bemutatott *in vitro* kísérletek során számos, az ABCG2 fehérjét, annak mutáns variánsait, illetve a humán OATP-eket tranziensen kifejező Sf9 rovarsejtet vagy stabilan termelő emlős sejtvonalat használtuk, amelyek nagy részét mi állítottuk elő.

A kísérletekben a transzporterek különböző funkcióit (ATP hidrolízis, transzport aktivitás, sejttúlélésre kifejtett hatás) vizsgáltuk, amelyhez izolált membránpreparátumokat, tisztított, rekonstituált fehérje preparátumot vagy ép sejtet módszereket használtunk.

Vizsgáltuk továbbá egy specifikus, a sejtfelszínen kifejeződő ABCG2 fehérjét felismerő antitest kötődését.

Mindezek a módszerek a dolgozatomban, illetve az annak alapját adó közleményekben megtalálhatók, itt nem adok róluk részletes leírást.

IV. FŐBB EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. [Az ABCG2 fehérjében az R482 egyedi szubsztrátfelismerést biztosít \(Özvegy-Laczka és mtsai., 2015, 1. sz közlemény\)](#)

Amint az az ABCG2 fehérjét kódoló gén azonosításakor kiderült, a citosztatikummal (mitoxantron vagy doxorubicin) szelektált, különböző egér és emlős eredetű sejtekben több esetben az R482-t érintő, pontmutáns (R482 G, T, S illetve M) ABCG2 változatok keletkeztek és szelektálódtak ki (Doyle et al. 1998; Miyake et al. 1999; Allen, Jackson, and Schinkel 2002). Jelen munka keretében részletesen vizsgáltuk, hogy az ABCG2 fehérje 482. pozíciójában található aminosav minősége hogyan befolyásolja a fehérje működését. Ezért, eltérő oldallánc karakterrel rendelkező mutáns változatokat, R482 I, M, S, D, N, K és Y, állítottunk elő, azokat rovarsejtekben termeltettük és működésüket jellemeztük. Eredményeink alapján a mutánsok 2 csoportra oszthatók: a vad típushoz képest fokozott, illetve csökkent működéssel rendelkezők. Megállapítottuk, hogy a vad típus (R482) csak rá jellemző, egyedi szubsztrátfelismeréssel rendelkezik, a metotrexát egyedül ennek a variánsnak szubsztrátja.

[Az ABCG2 koleszterin-szenzor régiójának azonosítása felé](#)

Habár az ABCG2 nem transzportálja a koleszterint (Tarling and Edwards 2011), a koleszterinnek fontos szabályozó szerepe van a fehérje működésében. Storch és mtsai. mutatták ki először, hogy az ABCG2 koleszterinben és szfingolipidben gazdag lipid raftokban található, és hogy a sejtmembrán koleszterin szintjének csökkentése (ciklodextrinnel való inkubálással (Szente and Szejtli 1999)) csökkent ABCG2 aktivitást eredményez (Storch et al. 2007). Ezzel összhangban kutatócsoportunk kimutatta, hogy az emlős sejtek plazmamembránjához képest alacsony (5-8 µg koleszterin/mg membránfehérje) membránkoleszterin tartalmú rovarsejtekben az ABCG2 fehérje aktivitása fokozható, amennyiben a rovarsejt membránokat az emlős sejtekben mérhető koleszterin szintre (40-60 µg koleszterin/mg membránfehérje) töltjük ciklodextrinbe csomagolt koleszterinnel való együtt inkubálással (Telbisz et al. 2007). Hasonló felfedezésre jutott egy másik kutatócsoport is (Pal et al. 2007). Később, rekonstituált proteoliposzómákat alkalmazva kimutattuk, hogy az ABCG2 működéséhez >20% w/w koleszterintartalom szükséges (Telbisz et al. 2013).

Az ABCG2 koleszterin „érzékelésében” részt vevő aminosavakat, fehérje régiókat azonban, amikor e munka készült, nem ismertük, hiszen a térszerkezetet csak évekkel később határozták meg. A

következő két fejezetben azt a munkánkat mutatom be, amelyben két, feltételezett szteroidkötő motívum szerepét vizsgáltuk.

2. Az LxxL régió az ABCG2 szubsztrátfelismerését és stabilitását változtatja meg (Telbisz és mtsai, 2014, 2. sz. közlemény)

Az L/MxxLxxL, illetve a rövidebb LxxL szekvencia egy igazolt szteroidkötő motívum (SBE, steroid binding element, x: tetszőleges aminosav). Munkám során az ABCG2 LxxL egyszeres és kétszeres Leu-Ala mutánsait (L555A, L558A és L555/558A) jellemeztem koleszterinérzékelés és szubsztrátfelismerés szempontjából. Ezek a kísérletek szintén Sf9 rovarsejteken történtek, mert ebben a rendszerben a membránkoleszterin hatása egyszerűen vizsgálható: az alacsony koleszterintartalmú rovarsejtek ciklodextrinbe „csomagolt” koleszterinnel való inkubálással „feltölthetők”. ATP-áz aktivitás mérésekben az L555A és L555/558A mutánsokat, figyelembe véve az expressziós szintjeiket, jelentős mértékben csökkent ATP-áz aktivitás jellemezte, amit koleszterin hozzáadásával sem lehetett jelentősen fokozni. A koleszterinnel nem töltött membránokban az L558A egyszeres mutáns ATP-áz aktivitása a vad típussal összemérhető volt. Viszont a hozzáadott koleszterin hatására, a vad típusra jellemző, szubsztrát jelenlétében fokozódó aktivitás e mutánsnál is elmaradt. Metotrexát és ösztradiol-17 β D-glükuronid transzport során nem csak az L555A és L555/558A mutánsok, hanem az L558A mutáns is inaktívnak bizonyult, transzport aktivitást még koleszterin-töltött vezikulákon sem tudunk mérni. Mindezek arra utalnak, hogy a szubsztrátfelismerése (is) sérült ezeknek a mutánsoknak. Annak érdekében, hogy az LxxL mutánsok koleszterinérzékelését jól definiált membránkörnyezetben vizsgálhassuk, az L558A és L555/558A mutánsokat tisztítottuk és eltérő koleszterintartalmú liposzómákban rekonstituáltuk. Ezekben a kísérletekben megállapítottuk, hogy az L558A variáns koleszterinérzékenysége nem tér el a vad típusétól. Az L555/558A dupla mutáns tisztításakor, azt csak kis mennyiségben sikerült előállítanunk, és függetlenül a koleszterin mennyiségtől, aktivitást sem tudunk mérni. Mindennek magyarázata lehet a fehérje csökkent stabilitása és az ABCG2 működéséhez nélkülözhetetlen homodimer kialakulásának hiánya.

Az ABCG2 térszerkezetét 2017/18-ban határozták meg (Jackson et al. 2018; Manolaridis et al. 2018; Taylor et al. 2017). Ez alapján az ABCG2 TM hélicei két „üreget” alkotnak, amelyeken a szubsztrát áthalad a transzport során. Az alsó nagyobb és a felső, kisebb üreget egy dileucin „szelep” zárja el egymástól, ami nyitja, illetve zárja az átjárást a két üreg között. Ezt a szelepet az L554 és L555 alkotja. Munkám során jelentős szubsztrátfelismerésembeli különbséget tapasztaltam az L555 mutánsnál, ami jól magyarázható azzal, hogy ez a Leu a „szelep” részeként szabályozza a szubsztrát átjutását. Ráadásul

azt tapasztaltuk, hogy az L555/558 mutáció rontja a fehérje stabilitását, legalábbis a tisztítás és rekonstrukció során. Később mások is arra jutottak, hogy az L555 kisebb, hidrofób aminosavra történő cseréje alacsonyabb fehérjeexpressziót eredményez és nem csak a szubsztrát két üreg közötti mozgásában fontos, de a fehérje feltekeredéséhez is szükséges (Manolaridis et al. 2018; Khunweeraphong et al. 2019).

3. Egyes, a feltételezett CRAC motívumba eső tirozinok az ABCG2 stabilitását változtatják meg (Gál és mtsai, 2015, 3. sz. közlemény)

Az ún. "CRAC" (cholesterol recognition amino acid consensus) motívum, amelyet a következő mintázat jellemez: L/V-(x)₍₁₋₅₎-Y-(x)₍₁₋₅₎-R/K (x: tetszőleges, nem konzervált aminosav), számos koleszterint kötő fehérjében megtalálható (Lacapere and Papadopoulou 2003; Epanand 2008). Az ABCG2 szekvenciájának vizsgálatával öt, lehetséges CRAC szekvenciát azonosítottunk. Mivel korábban igazolták, hogy a CRAC motívum központi Tyr-ja döntő szerepet játszik a koleszterin felismerésben (Martinez-Abundis et al. 2011; Epanand 2008), mi ezt cseréltük le Ser-re. Ily módon a következő mutánsokat készítettük el, Y413S, Y459S, Y469S, Y570S és Y645S. A mutánsok aktivitását Sf9 rovarsejtekben vizsgáltuk. A Y459S mutáns kivételével mindegyik fehérje változatot sikerült expresszálnunk Sf9 rovarsejtekben. A Y469S és Y645S változatok aktivitása azonban a jól detektálható fehérjeexpresszió ellenére elveszett. Ezért a Y469F és Y645F változatokat is létrehoztuk. Ezek a mutánsok, a Y413S és Y570S változatokhoz hasonlóan, jól mérhető alap ATP-áz aktivitással rendelkeztek, amit a koleszterin aktivált. Sf9 rovarsejteken és HEK-293 sejteken (ez utóbbi esetben a membránkoleszterin-szint csökkenésének hatása vizsgálható) végzett transzport mérésekben a mutánsok szubsztrátfelismerésében és koleszterinérzékelésében jelentős különbséget nem tapasztaltunk. Egyedül, a Y413S mutáns szubsztrát-stimulált ATP-áz aktivitása változott meg a koleszterintöltés hatására és tért el a vad típusétól. Ezt tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy az Y413 a koleszterinérzékelésben fontos, oly módon, hogy a fehérje transzport és ATP hidrolizáló működésének (részleges) szétkapcsolását eredményezi.

A később ismertté vált térszerkezet alapján a Y459 és Y469 az ún. „coupling hélix” részét képezik, tehát fontosak lehetnek a megfelelő térszerkezet kialakításában, ami összhangban van eredményeinkkel. A koleszterinnel viszont nincsenek közvetlen kapcsolatban. A harmadik, az ABCG2 működését döntően befolyásoló Tyr a 645. pozícióban található, és a térszerkezet alapján a 6. TM hélix része. A 6. TM hélix azonban nem vesz részt közvetlenül a szubsztrátkötő üreg kialakításában, így az általunk észlelt, az ABCG2 működésének elvesztését eredményező hatás allosztérikus lehet.

A Y413 és Y570 a térszerkezetek alapján nincsenek szoros kapcsolatban a koleszterinnel. Az Y413S mutáció viszont a szubsztrátfelismerés és az ATP hidrolízis látszólagos szétkapcsolását eredményezte. Ennek okára azonban a térszerkezet alapján sem találtunk magyarázatot.

4. A Gefitinib és Iressa az ABCG2 fehérje gátlószerei (Özvegy-Laczka és mtsai., 2004, Özvegy-Laczka és mtsai, 2005, 4. és 5. sz. közlemények)

A tirozin kinázok (TK) megváltozott működése a sejtek malignus átalakulásához vezethet. A tirozin kinázokra ható specifikus gátlószerek (tirozin kináz inhibitorok, TKI-k) fejlesztése áttörést jelentett a tumoros betegek kezelésében. Azóta is több rák típus (például krónikus mieloid leukémia, nem kissejtes tüdőrák vagy emlőrák) kezelésében használnak TKI-kat elsővonalas vagy kiegészítő terápiaként (Jiao et al. 2018). Munkám során a Gleevec/Imatinib (krónikus mieloid leukémiában alkalmazott Bcr-Abl kináz gátló, az első, az FDA által jóváhagyott TKI (Jiao et al. 2018)) és az Iressa/Gefitinib (nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő betegek kezelésére használt EGFR gátló) gyógyszereket teszteltem membránvezikula-alapú, illetve sejtes módszerekkel. Elsőként mutattuk ki, hogy az Iressa és Gleevec az ABCG2 hatékony gátlószerei, és ez a gátlás minimum egy nagyságrenddel felülmúlja a vizsgált TKI-k P-gp és MRP1 fehérjéket gátló affinitását. Eredményeink alapján a TKI-k befolyásolhatják az ABC szubsztrátok farmakokinetikáját, és az ABCG2 működését gátolva növelhetik a tumorok gyógyszerérzékenységét. Ugyanakkor alacsony koncentrációban az Iressa fokozta az ABCG2 ATP-áz aktivitását, ami arra utal, hogy transzportálódó szubsztrátja a fehérjének, az ABCG2 tehát a tumorokat rezisztenssé teheti az Iressával szemben.

A TKI-k és ABC fehérjék kapcsolatának vizsgálata azóta is intenzíven kutatott terület (a 4.sz. közleményem 2021. 09. 17-i állapot szerint 281 független idézést kapott). Mi magunk is több irányban folytattuk ezt a kutatást. Létrehoztunk például egy olyan emlős sejtes (A431 humán epidermoid karcinóma) EGF-függő modellt, aminek segítségével igazoltuk, hogy az ABCG2 működése védi a sejteket az Iressa apoptotikus hatásával szemben (Elkind et al. 2005). Később újabb TKI-król igazoltuk, hogy azok ABCG2 szubsztrátok (Hegedus, Özvegy-Laczka, Apati, et al. 2009; Hegedus, Özvegy-Laczka, Szakacs, et al. 2009; Hegedus, Truta-Feles, Antalffy, Brozik, et al. 2012; Hegedus, Truta-Feles, Antalffy, Varady, et al. 2012).

Egy ABCG2-specifikus antitest jellemzése

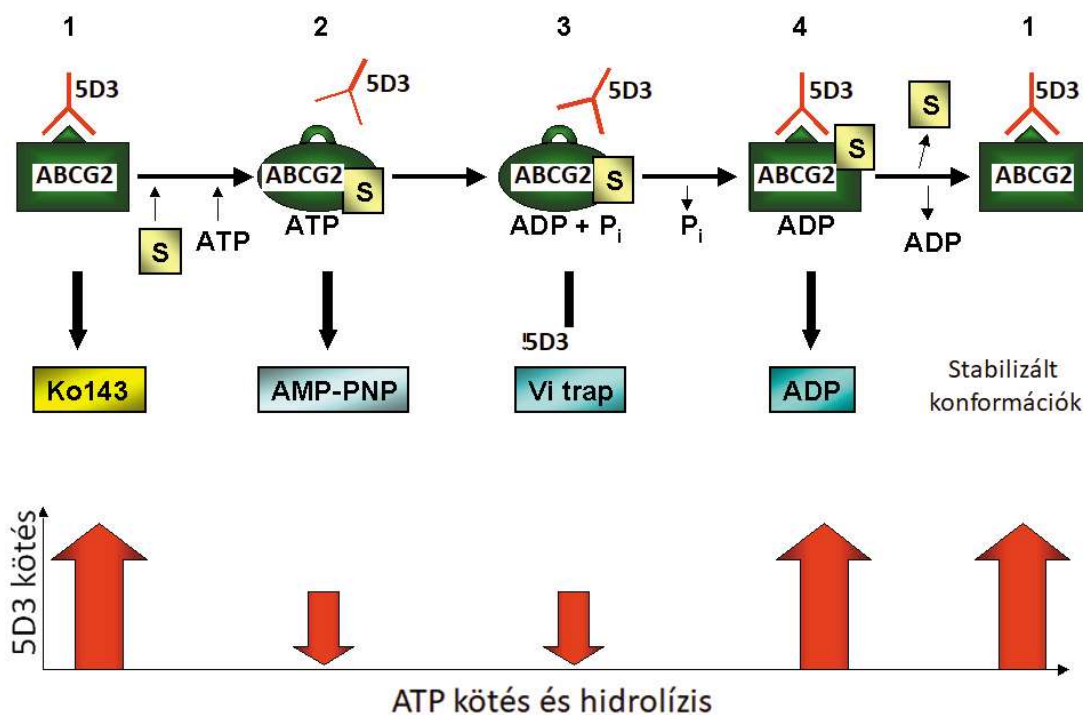
Az ABCG2 fehérje érzékeny kimutatása több területen is fontos, például 1.) az őssejtek vizsgálatában, amelyeknek az ABCG2 az egyik markere (Krishnamurthy et al. 2004; Scharenberg, Harkey, and Torok-Storb 2002), 2.) az ABCG2-t kifejező tumorok azonosításában, ami a megfelelő terápia megválasztását segítheti, illetve 3.) ABCG2 polimorfizmusok érzékeny, vérből történő gyors kimutatására (Kasza et al. 2012).

2001-ben Sorrentino és munkatársai előállították az első, és eddig egyetlen olyan antitestet (5D3), amely az ABCG2-t az intakt sejtek felszínén ismeri fel (Zhou et al. 2001). Kutatómunkám során jelentős felismeréseket tettem az ABCG2 és az 5D3 antitest közötti kölcsönhatás mechanizmusának megismerésében. Ezeket az eredményeket a következő két fejezetben foglalom össze.

5. Az 5D3 egy konformáció-szenzitív antitest (Özvegy-Laczka és mtsai., 2005, 6. sz. közlemény)

Az 5D3 antitest kötődését többféle, ABCG2-t termelő sejtvonalon és rovarsejtből izolált membránvezikulákon jellemeztük. Vizsgáltuk, hogy különböző inhibitorok és szubsztrátok hatására, illetve az ATP hidrolízis egyes (rögzíthető) fázisai során hogyan változik az antitest kötődése. Megállapítottuk, hogy nukleotidmentes állapotban, illetve a hidrolizálható ATP jelenlétében az 5D3 epitópja jól hozzáférhető. Amennyiben azonban megakasztjuk az ATP hidrolízist annak köztes állapotában (például Na-ortovanadáttal „csapdázzuk” az ADP-t, vagy egy nem hidrolizálható nukleotid analógot alkalmazunk, AMP-PNP) az 5D3 kötődése csökken (2. ábra).

Ezután többféle, igazolt ABCG2 szubsztrát hatását is megvizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy alacsony koncentrációban adva a szubsztrátok nem befolyásolták az 5D3 kötődést, míg magasabb, már gátló koncentrációban a flavopiridol fokozta azt (lásd részletesen (Özvegy-Laczka et al. 2005)). Később egy önálló tanulmányban, amelyben társszerzőként vettem részt, kimutattuk, hogy az 5D3 kötődés vizsgálata alkalmas arra, hogy a transzportálódó szubsztrátokat és inhibitorokat elkülönítsük egymástól és erre alapozva egy új vizsgálati módszert hoztunk létre (Telbisz et al. 2012).



2. ábra: Az ABCG2 egyes konformációs állapotainak és az 5D3 kötődés kapcsolata

6. Az 5D3 antitest epitópja az ABCG2 monomeren, a 3. extracelluláris hurokban található (7. sz. közlemény)

Az ABCG2 homodimerként működik. A két ABCG2-t egy diszulfid híd kovalensen rögzíti a homodimerben, azonban ez nem szükséges a fehérje működéséhez (saját vizsgálataink (Ozvegy-Laczkó et al. 2008) és (Henriksen et al. 2005)). A két ABCG2-t összekötő intermolekuláris S-S híd mellett létezik egy, a fehérje nagy, extracelluláris hurokát rögzítő, intramolekuláris S-S híd is. Mivel az 5D3 antitest epitópja nem volt ismert, nem tudhattuk, hogy azt a két ABCG2 közösen hozza-e létre. Ennek eldöntése érdekében különböző fehérje keresztkötők és ABCG2 mutánsok vizsgálatával jellemeztük az 5D3 kötődését. Megállapítottuk, hogy két ABCG2 kovalens keresztkötése nem szükséges, de nem is elegendő az 5D3 kötődéséhez. Mindezek a kísérletek azt mutatták, hogy az ABCG2 monomeren lévő epitóp rögzítése az, ami elősegíti az 5D3 kötődését. Az intra- és intermolekuláris diszulfid hidak kialakításában részt vevő Cys-Ala mutánsok, és az 5D3 Fab fragmentjével végzett vizsgálatok alapján pedig megállapítottuk, hogy az 5D3 epitóp az ABCG2 monomeren található, valószínűleg a 3. nagy extracelluláris hurokban helyezkedik el, és azt a C592 és

C608 között kialakuló diszulfid híd stabilizálja. Később ezt az ABCG2 térszerkezete alapján, ahol az 5D3 antitestet használták, hogy a fehérjét egy adott konformációban rögzítsék, megerősítették (Taylor et al. 2017).

A humán Organikus Anion Transzporter Polipeptidek vizsgálata: új módszerek, új gyógyszerkölsönhatások és mechanizmus kutatás

Az általam 2013-ban megkezdett és azóta vezetett kutatás fő célja olyan érzékeny és költséghatékony vizsgálati módszerek fejlesztése volt, amelyek az OATP-k gyógyszerkölsönhatásainak, azaz szubsztrátjaik és inhibitoraik egyszerű felderítését, működésük, illetve tumorokban betöltött szerepük megértését segítik. A létrehozott módszerek segítségével felismeréseket tettünk az OATP-k működéséről és új molekula entitások és az OATP-k közötti kölcsönhatásokat mutattunk ki. A következő fejezetekben a kutatócsoportom által ezekben a témakörökben elért saját eredményeit mutatom be.

Az OATP-k vizsgálatára alkalmas új fluoreszcens módszerek kidolgozása

7. A humán OATP-k rovarsejtekben működőképes állapotban termeltethetők és a Na-fluoreszceinnel vizsgálhatók (Patik és mtsai., 2015, 8. sz. közlemény)

Az OATP-vel kapcsolatos kutatásunk kezdeti lépéseként olyan sejtes modellt terveztünk létrehozni, amelynek segítségével az OATP fehérjecsald összes tagjának a tesztelése ugyanazon sejtes háttér mellett lehetséges. Választásunk a rovarsejt rendszerre esett, amelynek előnye, hogy általában nagy mennyiségben lehet a segítségével humán membránfehérjéket előállítani, és szemben a bakteriális vagy élesztő alapú expressziós rendszerekkel, a termeltetett plazmamembrán fehérje a rovarsejtekben a megfelelő membránba lokalizálódik és működőképes. Sikerült mind a tizenegy humán OATP-t kifejeztetni a rovarsejtekben, és a megfelelő körülmények beállításával két, korábban ismert OATP1B1 és OATP1B3 szubsztrátról igazoltuk, hogy alkalmasak lehetnek az OATP-k működésének vizsgálatára. A Na-fluoreszceint savas (pH 5,5) közegben általános OATP szubsztrátként azonosítottuk. A fluoreszcein-metotrexátról pedig kimutattuk, hogy az (szintén savas közegben, pH 6,5) az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék szubsztrátja. Ezek a festékek tehát alkalmasak az OATP-vel kölcsönható molekulák azonosítására/tesztelésére.

8. Fluoreszcens viabilitási festékek egy csoportja alkalmas a hepatikus OATP-k kiválogatására és működésének vizsgálatára (Patik és mtsai., 2018, 9. sz közlemény)

Annak ellenére, hogy a rovarsejt rendszer alkalmasnak bizonyult a teljes humán OATP család vizsgálatára, közepes áteresztőképességű funkcionális mérések kidolgozása is a célunk volt, hiszen molekulakönyvtárak tesztelésénél ez elengedhetetlen. Erre azonban a fent ismertetett tranziens expressziós rendszer nem alkalmas. Ezért az OATP fehérjéket stabilan kifejező emlős sejtvonalakat hoztunk létre és további, az OATP-k által esetlegesen felismert, de a fluoreszcenciánál kedvezőbb tulajdonságú (például alacsony passzív sejtbeli felvétel), fluoreszcens molekulákat teszteltünk. Választásunk a viabilitási festékek egy csoportjára esett, mivel annak ellenére, hogy ezek csak az átjárható/sérült plazmamembránú sejtekbe tudnak bejutni, magas fluoreszcenciát mértünk igazoltan ép sejtmembránú, OATP1B1-et kifejező sejtekben.

OATP-ket termelő sejtek kiválogatása festékfelvétel alapján

A viabilitási festékek (és kontrollként a fluoreszcein-metotrexát) felvételét tehát először a multispecifikus, a gyógyszerek transzportjában bizonyítottan részt vevő OATP-k, 1A2, 1B1, 1B3 és 2B1 fehérjéket termelő A431 sejteken teszteltük. Azonban, az OATP2B1 kivételével, csak alacsony festékfelvételt tudtunk kimutatni, ami nem meglepő, figyelembe véve a rovarsejtekhez képest lényegesen alacsonyabb OATP expressziót az A431 sejtekben. Miután megállapítottuk, hogy a Zombie Violet (ZV) és Live/Dead Green (LDG) viabilitási festékek nem toxikusak az A431 sejtek számára, kiválogattuk a magas festékfelvételt mutató sejtpopulációt. Az LDG festék segítségével így sikerült az OATP, 1A2, 1B1, 1B3, 1C1 vagy 2B1 fehérjéket kifejező sejteket dúsítani (Patik et al. 2018; Bakos et al. 2020)). Az így létrehozott OATP-ket termelő A431 sejtekben az OATP-k működését fluoreszcein-metotrexát (FL-MTX), ZV és LDG festékek felvétele alapján teszteltük. A kiválogatott sejtek megnövekedett OATP expressziót és funkciót mutattak, amely a sejteket mintegy 8 hétig tenyésztésben tartva is megmaradt.

Hepatociták OATP-inek vizsgálata

Az így létrehozott modell sejteken ezután további viabilitási festékeket teszteltünk és az előzőekben bemutatott ZV és LDG festékeken kívül további OATP szubsztrát festékeket azonosítottunk.

Ezek transzportját részletesen jellemeztük az OATP-ket (1B1, 1B3 vagy 2B1) stabilan kifejező A431 sejtvonalak segítségével, és a módszert 96-lyukú lemezre adaptáltuk. Ennek lényege, hogy kis

térfogatban, kevés anyagigénnyel és félig automatizálva kivitelezhető a mérés, tehát alkalmas OATP fehérjékkel kölcsönható molekulák közepes áteresztőképességű tesztelésére. Megállapítottuk, hogy a nagy áteresztőképességű (high-throughput, HT) követelményeknek megfelelő jel-zaj arány és reprodukálhatóság jellemzi a CascadeBlue és AF405 festékvételt (z-faktor > 0,5 (Zhang, Chung, and Oldenburg 1999), lásd a konkrét értékeket a Patik és mtsai, 2018, 9.sz. közleményben), és máj OATP (1B1, 1B3, 2B1) szubsztrát/inhibitor kölcsönhatás tesztelésre alkalmas (Patik et al. 2018).

E munka folytatásaként, a Cascade Blue olcsóbb alternatíváját keresve azonosítottuk a piranint, mint megbízható hepatikus OATP szubsztrátot (lásd bővebben a Székely és mtsai, 2020, 12. sz. közleményben).

Mivel a Cascade Blue, AF405 és piranin egyaránt szulfonált pirén származékok, ezért, annak érdekében, hogy eldöntsük, mely szerkezeti elemek fontosak ezek OATP-k általi felismerésében, további pirénvázis vegyületeket is teszteltünk. A pirénvázis vegyületek transzportját a hepatocita OATP-eket kifejező A431 sejteken mértük. A 6,8-dihidroxi-1,3-diszulfopiránin és a piranin 8-acetoxi változatát (8-acetoxi-1,3,6-triszulfopiránin) új OATP szubsztrátként azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy minimum 2, de maximum 3 szulfonát csoport kell az OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 általi felismeréshez (Ungvári és mtsai, 2021, 10. sz. közlemény).

9. Az első fluoreszcencia-alapú „add-és-mérd” módszer multispecifikus OATP-k vizsgálatára (Ungvári és mtsai., 2021, 10. sz. közlemény és PCT/HU2020/050062

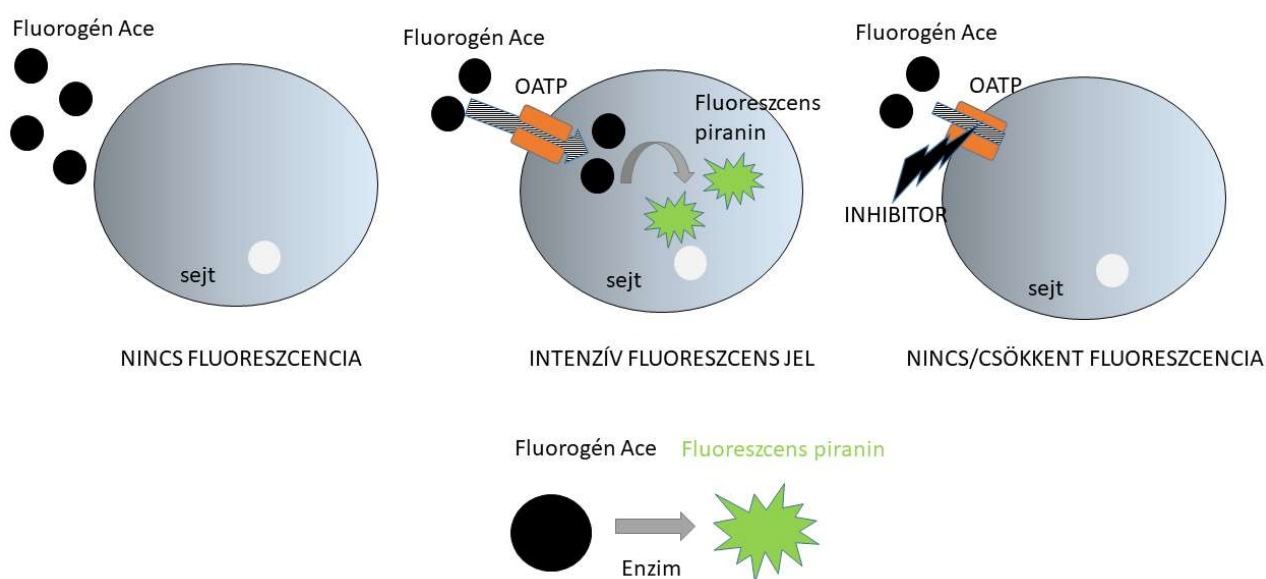
A kutatócsoportomban létrehozott sejtes modellek és mikrolemez alapú mérések lehetővé teszik a máj OATP-k és lehetséges szubsztrátjaik vagy inhibitoraik közepes áteresztőképességű azonosítását. Egy nagy áteresztőképességű módszer kidolgozásához azonban egy olyan szubsztrát lenne ideális, amelynek sejten kívüli és sejten belüli állapota, például eltérő fluoreszcencia intenzitásuk vagy spektrumuk miatt, elkülönül. Ilyen festékszubsztrátot a P-glikoprotein és MRP1/2 fehérjékre korábban már azonosítottak (Hollo et al. 1996; Hollo et al. 1994). A „calcein assay”-nek nevezett módszer azóta egy széleskörben alkalmazott, nagy áteresztőképességű módszerré nőtte ki magát (Glavinas et al. 2011).

Fluorogén OATP szubsztrátot keresve választásunk a piranin acetoxi származékára (8-acetoxi-1,3,6-triszulfopiránin) esett, amit a továbbiakban Ace-nak nevezek. Ennek két oka volt:

1.) Az acetoxi módosítás jellemzően fluorogénné teszi az eredetileg fluoreszcens molekulát (Lavis, Chao, and Raines 2011), és méréseink alapján az Ace a hepatociták OATP-inek szubsztrátja.

2.) A piranin egy pH indikátor, abszorbancia maximuma változik a pH függvényében (Gan et al. 1998)), pH 7 alatt 460 nm-en történő excitációnál fluoreszcenciája 20x-ad részére csökken. Ráadásul a fluorogén Ace sejtmentes közegben alig fluoreszkál, míg észteráz hasítást követően (például az élő sejtekbe bejutva) fluoreszcens piraninná alakul.

Ebből a kettős „erősítésből” (pH érzékeny fluoreszcencia és piranin-Ace átalakulás) adódóan azt gondoltuk, hogy a sejten kívüli, savas (pH 5.5) közegben alkalmazott Ace, a sejtben (pH 7,4) piraninná alakulva olyan jelentős fluoreszcencia növekedést fog eredményezni az OATP-t kifejező sejtekben, ami a sejten kívül feleslegben alkalmazott Ace eltávolítását nem teszi szükségessé (3. ábra).



3. ábra: Az Ace-piranin átalakuláson alapuló valós idejű OATP vizsgálati módszer működési elve

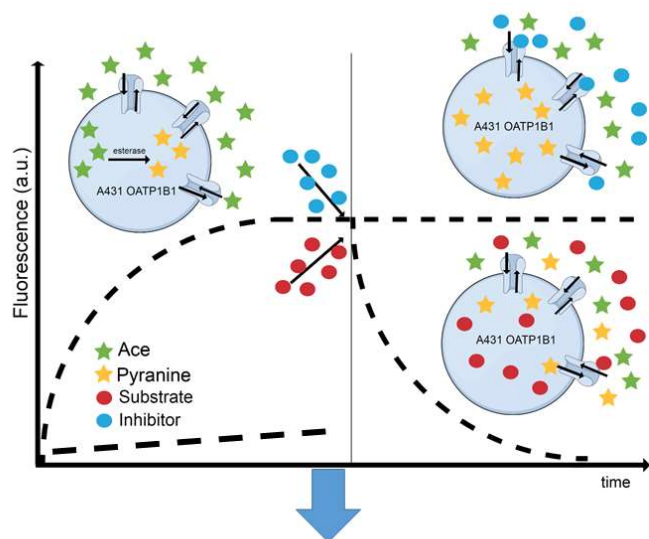
A431-OATP sejteken valós időben, a festék kimosása nélkül végzett méréseink alapján az Ace segítségével mérni tudtuk az OATP-k működését. Ráadásul, az Ace transzportján alapuló, valós idejű mérés ugyanolyan megbízhatónak bizonyult, mint a piranin, illetve a korábban alkalmazott radioaktív tesztszubsztrátok (Ungvári és mtsai., 2021, 10. sz. csatolt közlemény).

Mivel tudomásunk szerint ez az első add-és-mérd módszer az OATP-k vizsgálatára, a módszer nemzetközi szabadalmaztatását is elindítottuk (PCT/HU2020/050062, A REAL-TIME, ADD-AND-READ FLUORESCENCE-BASED ASSAY FOR TESTING FUNCTION AND DRUG INTERACTIONS OF OATP TRANSPORTERS).

10. Kompetitív ellenáramlásos módszer a szubsztrátok és nem transzportálódó inhibitorok elkülönítésére (Ungvári és mtsai., 2021, 10. sz. közlemény)

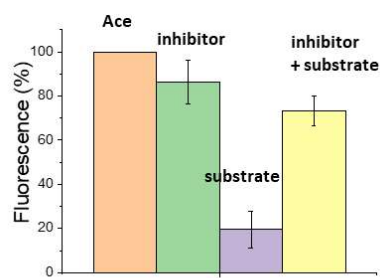
Az OATP-k vizsgálatában a fluoreszcens szubsztrátok mindinkább teret nyernek (Izumi et al. 2016; De Bruyn et al. 2011; Gui et al. 2010), azonban az ezek használatán alapuló indirekt módszerek csak a vegyület és OATP közötti kölcsönhatás meglétét mutatják ki, annak természetére, transzportálódó vagy nem transzportálódó inhibitorról van-e szó, nem világítanak rá (legalábbis ennek meghatározása bonyolult kinetikai méréseket igényel). Nemrégiben kidolgoztak egy módszert (kompetitív ellenáramlásos módszer, CCF: competitive counterflow), amellyel a tesztvegyület transzportjában egyensúlyi állapotot kialakítva, majd a vizsgálandó vegyületet a tesztsubstrát mellett feleslegben (IC_{50} 10x-es koncentrációja) adva, a vizsgált vegyületről eldönthető, hogy az szubsztrátja vagy inhibitora-e az OATP2B1 és OATP1A2 fehérjéknek (Schafer, Bock, and Meyer Zu Schwabedissen 2018; Schafer et al. 2020). A transzportálódó szubsztrát ugyanis ki tud cserélődni a tesztsubstrátra, és annak kiáramlását fogja okozni, míg a transzporter gátlószere (nem kompetitív inhibitor) nem generál tesztsubstrát kiáramlást. Ez az eljárás nem igényli a tesztelendő vegyület költséges radioaktív jelölését vagy tömegspektrometriás detektálását, tehát ezekhez a módszerekhez képest egy olcsóbb alternatívát jelent.

1) OATP1B/2B1 gyógyszer kölcsönhatások valós idejű tesztelése



A nem fluoreszcens Ace az OATP-k működése által bejut a sejtbe és ott fluoreszcens piraninná alakul.

2) A kompetitív ellenáramlásos módszer alkalmas a szubsztrátok és inhibitorok elkülönítésére



A szubsztrát piranin kiáramlást generál

4. ábra: A fluorogén Ace kettős alkalmazási lehetősége. 1) „Klasszikus” transzport aktivitás mérésben az Ace OATP-k általi felvételét a szubsztrátok és inhibitorok gátolják. 2) Kompetitív ellenáramlásos módszerben a piranin kiáramlást a transzportálódó szubsztrátok fokozzák.

Miután meggyőződünk arról, hogy az Ace transzportjában egyensúlyi állapot elérhető (amikor a be- és kiáramlás sebessége azonos), ráadásul az Ace, illetve annak a sejtben képződő származéka a piranin a sejtekből az OATP1B1 működése által ki tud jutni (efflux), ismert, OATP1B1 fehérjével kölcsönható vegyületeket teszteltünk. Ez alapján igazoltuk az új módszer alkalmasságát szubsztrátok és nem transzportálódó inhibitorok elkülönítésére (4. ábra).

Az általunk létrehozott módszer szintén újdonság a hepatocelluláris OATP-k vizsgálatában, így az a nemzetközi szabadalmi bejelentésünk egyik igénypontját képezi (PCT/HU2020/050062).

11. A szulfopirének egy csoportja és a szulforodamin 101 alkalmasak az OATP1B1 és MRP2 együttes vizsgálatára (Székely és mtsai., 2020, 11. sz. közlemény és PCT/HU2020/050014)

Kettős (vagy többszörös) transzfektáns sejt vonalakat, amelyek például a májban kifejeződő uptake és efflux transzportereket termelnek (akár többet is közülük, esetleg metabolikus enzimekkel (CYP) kombinálva), széleskörben alkalmaznak a transzcelluláris transzport folyamatok modellezésére. Ezekben a modellekben az egyik tipikus kombináció az OATP1B1 és MRP2 (ABCC2) eflux transzporter, illetve az OATP1B1 és ABCG2 együttes vizsgálata, hiszen ezek átfedő szubsztrátfelismeréssel rendelkeznek és összehangolt működésük biztosítja több endogén és exogén eredetű vegyület (például bilirubin, sztatinok) hatékony hepatikus eliminációját. A módszer a közös szubsztrát apikális-bazolaterális irányú transzportjának mérésén alapszik, amire korábban csak radioaktív próbák álltak rendelkezésre. Munkám során új OATP1B1-ABC (ABCG2 vagy MRP2) kettős transzfektáns sejt vonalakat hoztunk létre, amelyek segítségével több, fluoreszcens OATP próbát kettős, MRP2 és OATP1B1 szubsztrátként azonosítottunk, és kimutattuk ezek transzcelluláris transzportját. A kidolgozott módszer alkalmas lehet hepatociták OATP1B1 és MRP2 működésének tesztelésére, illetve új hatóanyagok OATP1B1, illetve MRP2 fehérjével való kölcsönhatásának együttes, egy rendszerben történő vizsgálatára. Mivel ez az első bizonyított fluoreszcens módszer az előző alkalmazásokra, annak nemzetközi szabadalmaztatását elindítottuk (PCT PCT/HU2020/050014).

Új vegyület-OATP kölcsönhatások azonosítása

12. Szulforodamin festékekkel az OATP1A2 és OATP1C1 fehérjék vizsgálhatók. Az elacridar, P-glikoprotein inhibitor OATP1A2 szubsztrát (Bakos és mtsai., 2020, 12. sz közlemény)

Az OATP1A2 befolyásolhatja gyógyszer-szubsztrátjai farmakokinetikáját, azok epéből és vizeletből való visszaszívódásának (reabszorpció), illetve a vér-agy gáton történő áthaladásának elősegítésével (Zhou et al. 2015). Az OATP1C1 fehérje az OATP család kevésbé jellemzett tagja, viszonylag kevés igazolt szubsztráttal. Működése azonban, mint az pár éve kiderült (Stromme et al. 2018), fontos a központi idegrendszer sejtjeinek tiroid hormon (T3) ellátásában, így az OATP1C1 farmakológiai célpont. Munkánk kezdetekor ezekre a fehérjékre nem volt elérhető fluoreszcencia-alapú tesztrendszer. Munkánk során több, a hepatocelluláris OATP-knél azonosított festékszubsztrátot, illetve további potenciális fluoreszcens szubsztrátot teszteltük OATP1A2 és OATP1C1 fehérjékkel való kölcsönhatás alapján. Több új festékszubsztrátot azonosítottunk és igazoltuk többek között, hogy a szulforodamin B, G és 101 festékek alkalmasak az OATP1A2 és OATP1C1 fehérjékkel kölcsönható vegyületek tesztelésére. Ezek segítségével kimutattuk az elacridar, tariquidar és zosuquidar, harmadik generációs P-gp gátlók és az OATP1A2 közötti kölcsönhatást, és sejtproliferációs vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az elacridar OATP1A2 szubsztrát, az OATP1A2 működése által dúsulhat a sejtekben és azok fokozott pusztulását okozhatja.

13. A 13 α - öszttronok hatékony és szelektív inhibitorai az OATP2B1 fehérjének (Laczkó-Rigó és mtsai., 2020 és 2021, 13-14. sz. közlemények)

Az OATP2B1 nemi hormon transzporter, amely többféle tumorban megnövekedett expressziót mutat (Kovacsics, Patik, and Ozvegy-Laczka 2017). Az OATP2B1 több szempontból is potenciális rákterápiás célpont. Egyrésztől működésének gátlása csökkentheti a nemihormon-függő tumorok proliferációját, másrésztől, az OATP2B1 működése révén a tumorokban citosztatikus szubsztrátjai feldúsíthatók (Windt et al. 2019). Munkánk során, együttműködve Dr. Mernyák Erzsébet (Szegedi Tudományegyetem, Szerves kémia tanszék) munkacsoportjával, a természetes öszttron 13 α epimerjeit vizsgáltuk. Ezek hatékony inhibitorai a lokális ösztrogén szintézisnek, és a szterán váz változatosan módosítható, ami szerkezet-hatás vizsgálatokat tesz lehetővé. Fluoreszcens módszereink segítségével különböző 13 α -epiöszttron származékokat tartalmazó molekulakönyvtárat teszteltünk OATP2B1 fehérjével való kölcsönhatás szempontjából. Számos 13 α -epiöszttron változatot találtunk, amelyek hatékonyan (mikromólos IC₅₀ értékkel) gátolták az OATP2B1 működését (Laczkó-Rigó et al. 2020).

Ezek alapján szerkezet-funkció összefüggéseket állapítottunk meg. Eredményeink alapján együttműködő partnerünk (Mernyák Erzsébet és csoportja) különböző ösztron módosulatokat tervezett és szintetizált, amelynek során nanomólos OATP2B1 inhibitorot sikerült fejleszteni (Joart et al. 2021). Az OATP2B1-specifikus inhibitorok alulreprezentáltak. Az újonnan azonosított ösztronvázis inhibitorok az OATP2B1 gátlószerek új csoportját képviselik, amelyek összetett sejt alapú rendszerekben, ahol több OATP is jelen van, lehetnek jó eszközök az OATP2B1 funkciójának elkülönítésére.

További vizsgálatainkban, annak érdekében, hogy az OATP2B1 inhibitor 13α -epiösztronok között lehetséges szubsztrátokat azonosítsunk (hiszen az indirekt módszerrel a kompetitív és nem kompetitív gátlószereket nem különítettük el), további vizsgálatainkban az OATP2B1 gátlószereként azonosított 13α -ösztronokat sejtproliferációs vizsgálatban is teszteltük. Ezzel a módszerrel több, 2-halogénezett 13α -ösztront potenciális OATP2B1 szubsztrátként azonosítottunk, amit a 2-bromo-epiösztronnal végzett direkt transzport mérésekben megerősítettünk (Laczko-Rigo et al. 2021). Ezek az OATP2B1 szubsztrát vegyületek a nemi hormonfüggő tumorok kezelésében jelenthetnek új stratégiát.

14. „Újrahasznosított” Covid-19 elleni gyógyszerek gátolhatják a multispecifikus OATP-k működését (Telbisz és mtsai., 2021, 15. sz. közlemény)

Második éve küzd a világ a SARS-CoV-2 vírus okozta Covid-19 betegséggel. A betegek kezelésének egyik legbiztonságosabb módja, a már korábban a szabályozó szervezetek által engedélyezett antivirális, vagy más célra fejlesztett gyógyszerek „újrahasznosítása”. Ilyen gyógyszerek többek között az antivirális favipiravir, ritonavir, lopinavir és remdesivir (Veklury). Azonban a Covid-19 betegek nagy része a valamilyen alapbetegséggel küzdő, más gyógyszert is szedő emberek közül kerül(t) ki. A többféle gyógyszer együttesen alkalmazva komoly mellékhatásokat válthat ki. Együttműködésben Sarkadi Balázs és Telbisz Ágnes csoportjával (TTK, Enzimológiai Intézet), illetve a Solvo Biotechnológiai Zrt.-vel (Budapest) egy, a gyógyszertranszporterek széles tárházát lefedő *in vitro* vizsgálatban vettünk részt az általunk fejlesztett módszerekkel. Ennek során a favipiravir kivételével hatékony gátlást mértünk a multispecifikus OATP-kre (OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1 és OATP1B3). Figyelembe véve maximális plazma koncentrációjukat az ivermectin kivételével a három antivirális szer, lopinavir, ritonavir és remdesivir is okozhatnak OATP-közvetítette gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásokat, ami további vizsgálatokat tesz indokolttá. A favipiravir egyik multispecifikus OATP-t sem gátolta, így használatkor OATP-közvetítette gyógyszerkölcsönhatást

nem várunk (Telbisz és mtsai, 2021, illetve Ambrus és mtsai, 2021, utóbbi a dolgozatomban közvetlenül fel nem használt eredmény).

V. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Jellemeztük az ABCG2 mutációs forró pontját, és megállapítottuk, hogy az R482, vad típusú változat egyedi, csak rá jellemző szubsztrátfelismeréssel rendelkezik, és több, funkcionyeréses R482 mutánst azonosítottunk.
2. Az ABCG2 koleszterin-szenzor régiójának felderítése érdekében több lehetséges szteroidkötő motívumot vizsgáltunk.
 - a. Megállapítottuk, hogy az LxxL szteroidkötő motívum leucinjai az ABCG2 fehérje szubsztrátfelismerését és aktivitását befolyásolják. Szerepük lehet továbbá a fehérje megfelelő térszerkezetének kialakításában.
 - b. A potenciális koleszterin-felismerő CRAC motívumok Tyr-jai közül hármat azonosítottunk, amelyek a fehérje expresszióját és/vagy működését befolyásolják.
 - c. Eredményeink és a későbbi térszerkezet alapján az LxxL és CRAC motívumok nem vesznek részt közvetlenül a koleszterinérzékelésben, közvetett (allosztérikus) hatásuk azonban nem kizárható.
3. Jellemeztük egy ABCG2-t felismerő antitest (5D3) kötődését:
 - a. Megállapítottuk, hogy az 5D3 egy konformáció-érzékeny antitest, ami az ABCG2 inhibitor-kötött formáját ismeri fel, az ATP hidrolízis kezdeti fázisaiban megrekedt ABCG2 fehérjéhez viszont kevésbé tud kötődni.
 - b. Megállapítottuk, hogy az 5D3 antitest epitópja az ABCG2 fehérje monomeren, a 3. extracelluláris hurokban található, és az epitóp rögzítésében az intramolekuláris diszulfid híd vesz részt.
4. Többféle specifikus és általános fluoreszcens OATP szubsztrátot azonosítottunk.
5. OATP-ket nagy mennyiségben kifejező sejteket állítottunk elő fluoreszcens festék felhalmozódása és a sejtek kiválogatása alapján.
6. Érzékeny, fluoreszcencia-alapú, közepes áteresztőképességű módszert dolgoztunk ki több OATP vizsgálatára.
7. Kidolgoztuk az MRP2 és OATP1B1 hepatikus transzporterek együttes vizsgálatára alkalmas fluoreszcencia-alapú módszert.
8. Kidolgoztuk az első, fluorogén szubsztrát felvételén alapuló módszert, amely lehetővé teszi a hepatocelluláris OATP-k valós idejű vizsgálatát.

9. Igazoltuk, hogy az OATP1B1 efflux transzporterként is működhet és két, akár nagyméretű szerves molekula kicserélésére is képes. Erre alapozva a szubsztrátok és nem transzportálódó inhibitorok elkülönítésére alkalmas (kompetitív ellenáramlásra alapuló) módszert dolgoztunk ki.
10. Az OATP2B1 új inhibitorait és egy potenciális új szubsztrátját azonosítottuk.
11. Új transzporter-gyógyszer kölcsönhatásokat mutattunk ki:
 - a. Elsőként fedeztük fel, hogy az ABCG2 a klinikumban is alkalmazott tirozin kináz gátlószereket, Gleevec és Iressa felismeri.
 - b. Egyes, a COVID-19 elleni terápiában is alkalmazott antivirális szerek a multispecifikus OATP 1A2, 1B1, 1B3 és 2B1 fehérjék inhibitorai.
 - c. A harmadik generációs P-glikoprotein inhibitorok az OATP1A2 gátlószerei, és az elacridar potenciális OATP1A2 szubsztrát.

Az OATP-k vizsgálatára kifejlesztett új módszerek szabadalmaztatását elindítottuk, két nemzetközi bejelentésünk van bírálati szakaszban.

VI. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

A dolgozatomban a PhD fokozatom megszerzése (2003) után született, már megjelent első vagy utolsó szerzős közleményeimet használtam fel.

1. **Özvegy-Laczka C**, Köblös G, Sarkadi B és Váradi A (2005) Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. *BBA-Biomembranes* **1668**, 53-63. IF.: 4,22 Független idéző: 54

2. Telbisz Á, Hegedüs C, Váradi A, Sarkadi B, **Özvegy-Laczka C**. Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites. *Drug Metab Dispos.* 2014 Apr;42(4):575-85.
IF: 3,252 Független idéző: 26

3. Gál Z, Hegedüs C, Szakács G, Váradi A, Sarkadi B, **Özvegy-Laczka C**. Mutations of the central tyrosines of putative cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequences modify folding, activity, and sterol-sensing of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Feb;1848(2):477-87. IF: 3,687 Független idéző: 12

4. **Özvegy-Laczka C**, Hegedus T, Várady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Váradi A, Kéri G, Órfi L, Német K, Sarkadi B High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol.* 2004 Jun;65(6):1485-95.
IF: 5,08 Független idéző: 281

5. **Özvegy-Laczka C**, Cserepes J, Elkind NB és Sarkadi B (2005) Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Update* **8**, 15-26.
IF.: 6,172 Független idéző: 112

6. **Özvegy-Laczka C***, Várady G, Köblös G, Ujhelly O, Cervenak J, Schuetz JD, Sorrentino BP, Koomen GJ, Váradi A, Német K és Sarkadi B (2005) Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. *J Biol Chem* **280**, 4219-27. IF: 5,854 Független idéző: 52

7. **Özvegy-Laczka C**, Laczkó R, Hegedus C, Litman T, Várady G, Goda K, Hegedus T, Dokholyan NV, Sorrentino BP, Váradi A és Sarkadi B (2008) Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J Biol Chem* **283**, 26059-70.
IF.: 5,520 Független idéző: 21
8. Patik I, Kovacsics D, Német O, Gera M, Várady G, Stieger B, Hagenbuch B, Szakács G, **Özvegy-Laczka C**. Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate. *Biochem Pharmacol.* 2015 Dec 15;98(4):649-58. IF: 5,091 Független idéző: 14
9. Patik I, Székely V, Német O, Szepesi Á, Kucsma N, Várady G, Szakács G, Bakos É, **Özvegy-Laczka C**. Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Sci Rep.* 2018 8:2630 IF: 4,011 Független idéző: 6
10. Ungvári O, Király L, Bakos É, **Özvegy-Laczka C**. 8-acetoxy-trisulfopyrene as the first activatable fluorogenic probe for add-and-read assessment of Organic anion-transporting polypeptides, OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1. *FASEB J.* 2021 Sep;35(9):e21863.
IF: 5,191
11. Székely V, Patik I, Ungvári O, Telbisz Á, Szakács G, Bakos É, **Özvegy-Laczka C**. Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 2020 Aug 1;151:105395. IF: 4,384 Független idéző: 1
12. Bakos É, Német O, Patik I, Kucsma N, Várady G, Szakács G, **Özvegy-Laczka C**. A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2. *FEBS J.* 2020 Jun;287(12):2468-2485. IF: 4,392

13. Laczkó-Rigó R, Jójárt R, Mernyák E, Bakos É, Tuerkova A, Zdrazil B, **Özvegy-Laczka C**. Structural dissection of 13-epiestrones based on the interaction with human Organic anion-transporting polypeptide, OATP2B1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020 Jun;200:105652. IF: 3,813
14. Laczkó-Rigó R, Bakos É, Jójárt R, Tömböly C, Mernyák E, **Özvegy-Laczka C**. Selective antiproliferative effect of C-2 halogenated 13 α -estrones on cells expressing Organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021 Aug 30;429 IF: 4,219
15. Telbisz Á, Ambrus C, Móznér O, Szabó E, Várady G, Bakos É, Sarkadi B, **Özvegy-Laczka C***. Interactions of Potential Anti-COVID-19 Compounds with Multispecific ABC and OATP Drug Transporters. *Pharmaceutics*. 2021 Jan 9;13(1):81 IF: 6,321 Független idéző: 5
16. Kovacsics D, Patik I, **Özvegy-Laczka C**. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017 Apr;13(4):409-424. IF: 3,151 Független idéző: 25

*: megosztott első vagy utolsó szerző

A dolgozat témájában benyújtott szabadalmak:

1. PCT/HU2020/050014 “Fluorescence method for assessing transport activity of OATPs and MRP2” benyújtás éve: 2020
2. PCT/HU2020/050062 “A REAL-TIME, ADD-AND-READ FLUORESCENCE-BASED ASSAY FOR TESTING FUNCTION AND DRUG INTERACTIONS OF OATP TRANSPORTERS” benyújtás éve: 2020

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagy hálával tartozom Várad Andrásnak (Döcének) és Sarkadi Baláznak, akik már egyetemi éveim, majd PhD munkám során a témavezetőim voltak, segítettek, irányították a munkámat, és a mai napig a mentoraim. Rengeteg tudást és támogatást kaptam, kapok tőlük. Az általuk megteremtett Biomembrán közösség igazán inspiráló és baráti közeg. Hálás vagyok, hogy a tagja lehetek.

Köszönöm Szakács Gergelynek, hogy tudásával, építő kritikáival és önzetlen támogatásával a PhD éveim kezdete óta segíti munkámat!

Az elért eredmény csapatmunka. Végtelenül hálás vagyok Bakos Évának, aki régi kollégaként és példaképmként, sok év kihagyást követően csatlakozott a munkánkhoz, és adott nagy tudásával lendületet az OATP-s kutatásainknak, inspiráló a vele való szakmai diskurzus.

Köszönettel tartozom korábbi és jelenlegi diákjaimnak, elsősorban Patik Izabelnek, Német Orsinak, Székely Virágnak, Laczkó-Rigó Rékának és Ungvári Orsinak, akik munkájukkal lehetővé tették az eredmények megszületését.

Az ABCG2-es munkákban Telbisz Ágnessel és Várady Györggyel dolgoztunk együtt, és ez az együttműködés azóta is tart, amit ezúton is nagyon köszönök! Az ABCG2-es munkákban sokat segítettek az asszisztensek, Zombori Ilona (Mica), Andrási Zsuzsa, Krizsán Éva, Kis Judit és Bézsényi Gyöngyi. Köszönöm nekik!

Köszönöm az Enzimológiai Intézet kutató közösségének, hogy befogadtak, és a Természettudományi Kutatóközpontnak a kutatásunkhoz biztosított háttérrel!

A munkámat számos ösztöndíj és pályázat támogatta, köztük a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János kutatási ösztöndíja és az OTKA (NKFIH), amit ezúton is köszönök!

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak, hogy vannak, támogatnak és elviselnek. A nagymamáknak, hogy vigyáztak a gyermekeimre, ha kellett. Négy gyermekem az életem értelme. Ők és a férjem szeretete a biztos háttér és örömforrás, ami átsegített kutatói pályám számos nehéz pillanatán.

Köszönöm mindannyiuknak!

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe, T., M. Unno, T. Onogawa, T. Tokui, T. N. Kondo, R. Nakagomi, H. Adachi, K. Fujiwara, M. Okabe, T. Suzuki, K. Nunoki, E. Sato, M. Kakyo, T. Nishio, J. Sugita, N. Asano, M. Tanemoto, M. Seki, F. Date, K. Ono, Y. Kondo, K. Shiiba, M. Suzuki, H. Ohtani, T. Shimosegawa, K. Iinuma, H. Nagura, S. Ito, and S. Matsuno. 2001. 'LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers', *Gastroenterology*, 120: 1689-99.
- Allen, J. D., S. C. Jackson, and A. H. Schinkel. 2002. 'A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance', *Cancer Res*, 62: 2294-9.
- Allikmets, R., L. M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica, and M. Dean. 1998. 'A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance', *Cancer Res*, 58: 5337-9.
- Bakos, E., O. Nemet, I. Patik, N. Kucsma, G. Varady, G. Szakacs, and C. Ozvegy-Laczka. 2020. 'A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2', *FEBS J*, 287: 2468-85.
- De Bruyn, T., S. Fattah, B. Stieger, P. Augustijns, and P. Annaert. 2011. 'Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3', *J Pharm Sci*, 100: 5018-30.
- Dean, M. 2005. 'The genetics of ATP-binding cassette transporters', *Methods Enzymol*, 400: 409-29.
- Dean, M., and R. Allikmets. 1995. 'Evolution of ATP-binding cassette transporter genes', *Curr Opin Genet Dev*, 5: 779-85.
- Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi, and D. D. Ross. 1998. 'A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15665-70.
- Elkind, N. B., Z. Szentpetery, A. Apati, C. Ozvegy-Laczka, G. Varady, O. Ujhelly, K. Szabo, L. Homolya, A. Varadi, L. Buday, G. Keri, K. Nemet, and B. Sarkadi. 2005. 'Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib)', *Cancer Res*, 65: 1770-7.
- Epand, R. M. 2008. 'Proteins and cholesterol-rich domains', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 1576-82.
- Gan, B. S., E. Krump, L. D. Shrode, and S. Grinstein. 1998. 'Loading pyranine via purinergic receptors or hypotonic stress for measurement of cytosolic pH by imaging', *Am J Physiol*, 275: C1158-66.
- Gao, B., B. Hagenbuch, G. A. Kullak-Ublick, D. Benke, A. Aguzzi, and P. J. Meier. 2000. 'Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier', *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 73-9.
- Glavinas, H., O. von Richter, K. Vojnits, D. Mehn, I. Wilhelm, T. Nagy, J. Janossy, I. Krizbai, P. Couraud, and P. Krajcsi. 2011. 'Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition', *Xenobiotica*, 41: 712-9.
- Gui, C., A. Obaidat, R. Chaguturu, and B. Hagenbuch. 2010. 'Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3', *Curr Chem Genomics*, 4: 1-8.
- Hagenbuch, B., and B. Stieger. 2013. 'The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters', *Mol Aspects Med*, 34: 396-412.
- Hediger, M. A., B. Clemençon, R. E. Burrier, and E. A. Bruford. 2013. 'The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction', *Mol Aspects Med*, 34: 95-107.
- Hegedus, C., C. Ozvegy-Laczka, A. Apati, M. Magocsi, K. Nemet, L. Orfi, G. Keri, M. Katona, Z. Takats, A. Varadi, G. Szakacs, and B. Sarkadi. 2009. 'Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties', *Br J Pharmacol*, 158: 1153-64.
- Hegedus, C., C. Ozvegy-Laczka, G. Szakacs, and B. Sarkadi. 2009. 'Interaction of ABC multidrug transporters with anticancer protein kinase inhibitors: substrates and/or inhibitors?', *Curr Cancer Drug Targets*, 9: 252-72.
- Hegedus, C., K. Truta-Feles, G. Antalffy, A. Brozik, I. Kasza, K. Nemet, T. I. Orban, C. Ozvegy-Laczka, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2012. 'PI3-kinase and mTOR inhibitors differently modulate the function of the ABCG2 multidrug transporter', *Biochem Biophys Res Commun*, 420: 869-74.
- Hegedus, C., K. Truta-Feles, G. Antalffy, G. Varady, K. Nemet, C. Ozvegy-Laczka, G. Keri, L. Orfi, G. Szakacs, J. Settleman, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2012. 'Interaction of the EGFR inhibitors gefitinib, vandetanib, pelitinib and neratinib with the ABCG2 multidrug transporter: implications for the emergence and reversal of cancer drug resistance', *Biochem Pharmacol*, 84: 260-7.
- Henriksen, U., J. U. Fog, T. Litman, and U. Gether. 2005. 'Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2', *J Biol Chem*, 280: 36926-34.
- Hollo, Z., L. Homolya, C. W. Davis, and B. Sarkadi. 1994. 'Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter', *Biochim Biophys Acta*, 1191: 384-8.

- Hollo, Z., L. Homolya, T. Hegedus, and B. Sarkadi. 1996. 'Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells', *FEBS Lett*, 383: 99-104.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf.
<https://www.fda.gov/files/drugs/published/In-Vitro-Metabolism--and-Transporter--Mediated-Drug-Drug-Interaction-Studies-Guidance-for-Industry.pdf>.
- International Transporter, Consortium, K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski, and L. Zhang. 2010. 'Membrane transporters in drug development', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 215-36.
- Izumi, S., Y. Nozaki, T. Komori, O. Takenaka, K. Maeda, H. Kusuhara, and Y. Sugiyama. 2016. 'Investigation of Fluorescein Derivatives as Substrates of Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 To Develop Sensitive Fluorescence-Based OATP1B1 Inhibition Assays', *Mol Pharm*, 13: 438-48.
- Jackson, S. M., I. Manolaridis, J. Kowal, M. Zechner, N. M. I. Taylor, M. Bause, S. Bauer, R. Bartholomaeus, G. Bernhardt, B. Koenig, A. Buschauer, H. Stahlberg, K. H. Altmann, and K. P. Locher. 2018. 'Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2', *Nat Struct Mol Biol*, 25: 333-40.
- Jiao, Q., L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang, and Y. S. Wang. 2018. 'Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance', *Mol Cancer*, 17: 36.
- Jojart, R., R. Laczko-Rigo, M. Klement, G. Kohl, G. Kecskemeti, C. Ozvegy-Laczka, and E. Mernyak. 2021. 'Design, synthesis and biological evaluation of novel estrone phosphonates as high affinity organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) inhibitors', *Bioorg Chem*, 112: 104914.
- Jonker, J. W., J. W. Smit, R. F. Brinkhuis, M. Maliepaard, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, and A. H. Schinkel. 2000. 'Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan', *J Natl Cancer Inst*, 92: 1651-6.
- Kage, K., S. Tsukahara, T. Sugiyama, S. Asada, E. Ishikawa, T. Tsuruo, and Y. Sugimoto. 2002. 'Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization', *Int J Cancer*, 97: 626-30.
- Kasza, I., G. Varady, H. Andrikovics, M. Koszarska, A. Tordai, G. L. Scheffer, A. Nemeth, G. Szakacs, and B. Sarkadi. 2012. 'Expression levels of the ABCG2 multidrug transporter in human erythrocytes correspond to pharmacologically relevant genetic variations', *PLoS One*, 7: e48423.
- Kerr, I. D., A. J. Haider, and I. C. Gelissen. 2011. 'The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty', *Br J Pharmacol*, 164: 1767-79.
- Khunweeraphong, N., D. Szollosi, T. Stockner, and K. Kuchler. 2019. 'The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid', *Nat Commun*, 10: 5433.
- Konig, J., Y. Cui, A. T. Nies, and D. Keppler. 2000. 'A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278: G156-64.
- Kovacsics, D., I. Patik, and C. Ozvegy-Laczka. 2017. 'The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 13: 409-24.
- Krishnamurthy, P., D. D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K. E. Mercer, B. Sarkadi, B. P. Sorrentino, and J. D. Schuetz. 2004. 'The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme', *J Biol Chem*, 279: 24218-25.
- Kullak-Ublick, G. A., M. G. Ismail, B. Stieger, L. Landmann, R. Huber, F. Pizzagalli, K. Fattinger, P. J. Meier, and B. Hagenbuch. 2001. 'Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver', *Gastroenterology*, 120: 525-33.
- Lacapere, J. J., and V. Papadopoulos. 2003. 'Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis', *Steroids*, 68: 569-85.
- Laczko-Rigo, R., E. Bakos, R. Jojart, C. Tomboly, E. Mernyak, and C. Ozvegy-Laczka. 2021. 'Selective antiproliferative effect of C-2 halogenated 13alpha-estrone on cells expressing Organic anion-transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1)', *Toxicol Appl Pharmacol*, 429: 115704.
- Laczko-Rigo, R., R. Jojart, E. Mernyak, E. Bakos, A. Tuerkova, B. Zdrzil, and C. Ozvegy-Laczka. 2020. 'Structural dissection of 13-epiestrones based on the interaction with human Organic anion-transporting polypeptide, OATP2B1', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 200: 105652.
- Lavis, L. D., T. Y. Chao, and R. T. Raines. 2011. 'Synthesis and utility of fluorogenic acetoxymethyl ethers', *Chem Sci*, 2: 521-30.
- Lee, C. A., M. A. O'Connor, T. K. Ritchie, A. Galetin, J. A. Cook, I. Ragueneau-Majlessi, H. Ellens, B. Feng, M. E. Taub, M. F. Paine, J. W. Polli, J. A. Ware, and M. J. Zamek-Gliszczynski. 2015. 'Breast cancer resistance protein (ABCG2) in

- clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design', *Drug Metab Dispos*, 43: 490-509.
- Maliepaard, M., G. L. Scheffer, I. F. Faneyte, M. A. van Gastelen, A. C. Pijnenborg, A. H. Schinkel, M. J. van De Vijver, R. J. Scheper, and J. H. Schellens. 2001. 'Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues', *Cancer Res*, 61: 3458-64.
- Manolaridis, I., S. M. Jackson, N. M. I. Taylor, J. Kowal, H. Stahlberg, and K. P. Locher. 2018. 'Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states', *Nature*, 563: 426-30.
- Martinez-Abundis, E., F. Correa, E. Rodriguez, E. Soria-Castro, J. S. Rodriguez-Zavala, D. Pacheco-Alvarez, and C. Zazueta. 2011. 'A CRAC-like motif in BAX sequence: relationship with protein insertion and pore activity in liposomes', *Biochim Biophys Acta*, 1808: 1888-95.
- Miyake, K., L. Mickley, T. Litman, Z. Zhan, R. Robey, B. Cristensen, M. Brangi, L. Greenberger, M. Dean, T. Fojo, and S. E. Bates. 1999. 'Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes', *Cancer Res*, 59: 8-13.
- Ozvegy-Laczka, C., R. Laczko, C. Hegedus, T. Litman, G. Varady, K. Goda, T. Hegedus, N. V. Dokholyan, B. P. Sorrentino, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2008. 'Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter', *J Biol Chem*, 283: 26059-70.
- Ozvegy-Laczka, C., G. Varady, G. Koblos, O. Ujhelly, J. Cervenak, J. D. Schuetz, B. P. Sorrentino, G. J. Koomen, A. Varadi, K. Nemet, and B. Sarkadi. 2005. 'Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface', *J Biol Chem*, 280: 4219-27.
- Ozvegy, C., T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2001. 'Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 111-7.
- Pal, A., D. Mehn, E. Molnar, S. Gedey, P. Meszaros, T. Nagy, H. Glavinas, T. Janaky, O. von Richter, G. Bathori, L. Szente, and P. Krajcsi. 2007. 'Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2', *J Pharmacol Exp Ther*, 321: 1085-94.
- Patik, I., V. Szekely, O. Nemet, A. Szepesi, N. Kucsma, G. Varady, G. Szakacs, E. Bakos, and C. Ozvegy-Laczka. 2018. 'Identification of novel cell-impermeant fluorescent substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1', *Sci Rep*, 8: 2630.
- Robey, R. W., K. M. Pluchino, M. D. Hall, A. T. Fojo, S. E. Bates, and M. M. Gottesman. 2018. 'Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer', *Nat Rev Cancer*, 18: 452-64.
- Ronaldson, P. T., and T. P. Davis. 2013. 'Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia', *Pharmacol Rev*, 65: 291-314.
- Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch. 2012. 'OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies', *Br J Pharmacol*, 165: 1260-87.
- Sarkadi, B., L. Homolya, G. Szakacs, and A. Varadi. 2006. 'Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system', *Physiol Rev*, 86: 1179-236.
- Schafer, A. M., T. Bock, and H. E. Meyer Zu Schwabedissen. 2018. 'Establishment and Validation of Competitive Counterflow as a Method To Detect Substrates of the Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1', *Mol Pharm*, 15: 5501-13.
- Schafer, A. M., H. E. Meyer Zu Schwabedissen, S. Bien-Moller, A. Hubeny, S. Vogelgesang, S. Oswald, and M. Grube. 2020. 'OATP1A2 and OATP2B1 Are Interacting with Dopamine-Receptor Agonists and Antagonists', *Mol Pharm*, 17: 1987-95.
- Scharenberg, C. W., M. A. Harkey, and B. Torok-Storb. 2002. 'The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors', *Blood*, 99: 507-12.
- Schnepf, R., and O. Zolk. 2013. 'Effect of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 on pharmacokinetics: experimental findings and clinical implications', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 9: 287-306.
- Shitara, Y., K. Maeda, K. Ikejiri, K. Yoshida, T. Horie, and Y. Sugiyama. 2013. 'Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption', *Biopharm Drug Dispos*, 34: 45-78.
- Storch, C. H., R. Ehehalt, W. E. Haefeli, and J. Weiss. 2007. 'Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro', *J Pharmacol Exp Ther*, 323: 257-64.
- Stromme, P., S. Groeneweg, E. C. Lima de Souza, C. Zevenbergen, A. Torgersbraten, A. Holmgren, E. Gurcan, M. E. Meima, R. P. Peeters, W. E. Visser, L. Honeren Johansson, A. Babovic, H. Zetterberg, H. Heuer, E. Frengen, D. Misceo, and T. J. Visser. 2018. 'Mutated Thyroid Hormone Transporter OATP1C1 Associates with Severe Brain Hypometabolism and Juvenile Neurodegeneration', *Thyroid*, 28: 1406-15.

- Szafraniec, M. J., M. Szczygiel, K. Urbanska, and L. Fiedor. 2014. 'Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2)', *Drug Metab Rev*, 46: 459-74.
- Szente, L., and J. Szejtli. 1999. 'Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development', *Adv Drug Deliv Rev*, 36: 17-28.
- Tarling, E. J., and P. A. Edwards. 2011. 'ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 19719-24.
- Taylor, N. M. I., I. Manolaridis, S. M. Jackson, J. Kowal, H. Stahlberg, and K. P. Locher. 2017. 'Structure of the human multidrug transporter ABCG2', *Nature*, 546: 504-09.
- Telbisz, A., C. Hegedus, C. Ozvegy-Laczka, K. Goda, G. Varady, Z. Takats, E. Szabo, B. P. Sorrentino, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2012. 'Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter', *Eur J Pharm Sci*, 45: 101-9.
- Telbisz, A., M. Muller, C. Ozvegy-Laczka, L. Homolya, L. Szente, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2007. 'Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter', *Biochim Biophys Acta*, 1768: 2698-713.
- Telbisz, A., C. Ozvegy-Laczka, T. Hegedus, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2013. 'Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein', *Biochem J*, 450: 387-95.
- Urquhart, B. L., and R. B. Kim. 2009. 'Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs', *Eur J Clin Pharmacol*, 65: 1063-70.
- Windt, T., S. Toth, I. Patik, J. Sessler, N. Kucsma, A. Szepesi, B. Zdrzil, C. Ozvegy-Laczka, and G. Szakacs. 2019. 'Identification of anticancer OATP2B1 substrates by an in vitro triple-fluorescence-based cytotoxicity screen', *Arch Toxicol*, 93: 953-64.
- Woodward, O. M., A. Kottgen, J. Coresh, E. Boerwinkle, W. B. Guggino, and M. Kottgen. 2009. 'Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 10338-42.
- Zamek-Gliszczynski, M. J., M. E. Taub, P. P. Chothe, X. Chu, K. M. Giacomini, R. B. Kim, A. S. Ray, S. L. Stocker, J. D. Unadkat, M. B. Wittwer, C. Xia, S. W. Yee, L. Zhang, Y. Zhang, and Consortium International Transporter. 2018. 'Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance', *Clin Pharmacol Ther*, 104: 890-99.
- Zhang, J. H., T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. 1999. 'A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays', *J Biomol Screen*, 4: 67-73.
- Zhang, W., J. Mojsilovic-Petrovic, M. F. Andrade, H. Zhang, M. Ball, and D. B. Stanimirovic. 2003. 'The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels', *FASEB J*, 17: 2085-7.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, and B. P. Sorrentino. 2001. 'The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype', *Nat Med*, 7: 1028-34.
- Zhou, Y., J. Yuan, Z. Li, Z. Wang, D. Cheng, Y. Du, W. Li, Q. Kan, and W. Zhang. 2015. 'Genetic polymorphisms and function of the organic anion-transporting polypeptide 1A2 and its clinical relevance in drug disposition', *Pharmacology*, 95: 201-8.