

Az ABCG2 fehérje specifikus gátlásával növelhető a fotodinámiás terápia hatékonysága

Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy

BEBES ATTILA¹, NAGY TÜNDE DR.², BATA-CSÖRGŐ ZSUZSANNA DR.^{1,3},
KEMÉNY LAJOS DR.^{1,3}, DOBOZY ATTILA DR.^{1,3}, SZÉLL MÁRTA DR.³

Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika¹,
SOLVO Biotechnology Zrt.², MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport³, Szeged

ÖSSZEFOGLALÁS

A fotodinámiás terápia egy fényérzékenyítő anyag tumorokban való szelektív felhalmozódásán alapul, amelyet a célszövet elpusztítása követ, a megfelelő fényforrással való megvilágítás során. A protoporfirin-IX egy ismert fényérzékenyítő molekula, amely az ABCG2 transzporter endogén szubsztátja. Az ABCG2 fehérje az ATP-binding cassette transzporter szupercsaládba tartozik, ismert multidrog rezisztenciával kapcsolatos protein. Jelen munka során az ABCG2 transzporter a porfirinek keratinocitákból való kipumpálásában játszott szerepét vizsgáltuk, valamint azt, hogy egy nem mérgező, specifikus ABCG2 transzporter gátló, a Ko-134 molekula milyen hatással van a fotodinámiás terápia hatékonyságára. Delta-aminolevulinsav előkezelést követően vizsgáltuk HaCaT keratinocitákban az intracelluláris porfirin szintjét, valamint jellemeztünk egy in vitro fotodinámiás terápiai modellt HaCaT sejtek, valamint terápiásan elfogadott fényforrás felhasználásával. Kimutattuk, hogy a HaCaT sejtekben felhalmozódó porfirinek mennyisége összefüggésben van a sejtekben kifejeződő ABCG2 fehérje szinttel, továbbá azt, hogy az ABCG2 transzporter specifikus gátlása a Ko-134 molekula segítségével szignifikánsan emelte a keratinociták érzékenységét a fotodinámiás terápiával szemben. Eredményeink igazolják, hogy az ABCG2 fehérje fontos célmolekula lehet a bőrléziók fotodinámiás terápiai kezelése során: specifikus gátlása a nem-toxikus Ko-134 által ígéretes lehet a terápiai hatékonyság növelése szempontjából.

Kulcsszavak:

keratinocita - fotodinámiás terápia - ABCG2
- porfirin - transzporter gátlás

SUMMARY

Photodynamic therapy is based on the selective accumulation of a photosensitizer in tumors, followed by target tissue destruction upon illumination. Protoporphyrin IX, a well-known photosensitizer, was recently reported as an endogenous substrate for the multidrug transporter ABCG2. We studied the role of ABCG2 protein in the porphyrin extrusion ability of keratinocytes, paying particular attention to the impact of the specific inhibition of ABCG2 on photodynamic therapy efficacy. An in vitro model of photodynamic therapy on HaCaT cells was established with a therapeutically approved narrow-bandwidth red-light source. The porphyrin extrusion ability of HaCaT cells proved to correlate with their ABCG2 expression, which was higher in proliferating cells than in differentiated cells. Moreover, the specific inhibition of ABCG2 resulted in an increased sensitivity of keratinocytes to photodynamic therapy in vitro. These results suggest that ABCG2 may serve as a target molecule via which to improve the photodynamic therapy of skin lesions: its inhibition is a promising therapeutic modality.

Key words:

keratinocyte - photodynamic therapy -
ABCG2 - porphyrin - transporter inhibitor

Rövidítések: fotodinámiás terápia, PDT; protoporfirin IX, PPIX; delta-aminolevulinsav, DALA; főtájis borjú szérum, FBS; Tris-pufferolt sóoldat, TBS; borjú szérum albumin, BSA

Levelező szerző: Bebes Attila, Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika,
7620. Szeged, Korányi fasor 6. e-mail: bebes.attila@gmail.com

A fotodinamiás terápia (PDT) alapja egy fényérzékenyítő anyag szelektív felhalmozódása a célsejtekben, ezt követi egy specifikus fényforrással való besugárzás. A fényérzékenyítő anyaggal kezelt területet adott hullámhosszú fényel megvilágítva a fényérzékenyítő molekulák gerjesztett állapotba kerülnek, ami reaktív oxigén gyökök és egyéb szabadgyökök keletkezését indítja el, amely folyamat végül a célsejt pusztulásához vezet. A PDT lehetséges indikációi között számos tumor kezelése szerepel, de különösképpen hatékonyak bizonyultak a bőr felszínén található tumoros léziók gyógyításában, főként bazalióma és aktinikus keratózis esetében (1).

A legelterjedtebben használt fényérzékenyítő molekula a protoporphyrin IX (PPIX), gyakorlatilag minden sejtből keletkezik a hem bioszintézise során. A bioszintézis útján utolsó lépésében a PPIX-ből vas ion (Fe^{2+}) csatlakozásával szintetizálódik a hem, amely számos fehérje működéséhez elengedhetetlen. A porfirin bioszintézis sebességmeghatározó lépése, és kulcsfontosságú szabályozó eleme, amikor szukcinil-koenzim-A-ból delta-aminolevulinsav (DALA) keletkezik (2). DALA vagy metil-észter származékának adagolásával ez a szabályozó lépés megkerülhető, amelynek eredményeképpen a sejtek nagy mennyiségű PPIX-t halmozhatnak fel. PDT-ben gyógyszer előanyagként legtöbbször DALA-t alkalmaznak a célsejtek fényérzékenyítésére. A sejtekben szabadon előforduló PPIX citotoxikus, megfelelő hullámhosszú fény segítségével gerjesztett állapotba hozható, amely aztán a sejt halálát előidéző szabad gyökök generálásához vezet (3). A szabad porfirinek intracelluláris koncentrációja ezért szigorúan szabályozott bioszintetikus/katabolikus, valamint influx/efflux rendszerek által.

Az ABC transzporter szuperfamilia tagja az ABCG2 fehérje a hem efflux rendszer nemrég jellemzett tagja. A 70 kDa méretű polipeptid homodimer formában válik funkcióképesé. Az ABCG2 protein a tumorok szerzett multidrog rezisztenciájában játszik fontos szerepet, a tumorsejtek kemoterápiás gyógyszerek széles skáláját képes eltávolítani, így biztosítva túlélésüket (4). Az ABCG2 transzporter endogén eredetű szubsztrátjai sokáig nem voltak ismertek. ABCG2 *knock-out* egereket módosított, peophorbide(a)-t nagy mennyiségben tartalmazó étrenden tartottak, és az állatok bőrén fototoxikus tünetek jelentkeztek (5). A pheophorbide(a), amely szerkezetileg jelentős hasonlóságot mutat a porfirinekkel, szájon át adva felhalmozódik az ABCG2 *knock-out* állatokban, ami fényérzékenységhöz vezet. Krishnamurthy és mtsai kimutatták, hogy az ABCG2 transzporter jelentős mértékben hozzájárul a sejtek védelméhez a káros porfirinek toxikus hatása ellen, különösen érvényes ez hipoxiás körülmények között (6). Az ABCG2 fehérje magas szintű kifejeződése a sejtekben a porfirinek sejtől való eliminációját, ami megnövekedett rezisztenciát jelent a PDT kezelés ellen. A fényérzékenyítő anyagok hatékonyságának növelése fontos kutatási szempont, a PDT-vel kezelt léziók könnyebb gyógyulása érdekében, valamint a káros mellékhatások enyhítése miatt. Az ABCG2 transzporter fon-

tos támadáspontja lehet a PDT hatékonyságának javítására irányuló vizsgálatoknak.

Célunk az ABCG2 transzporter szerepének vizsgálata – mint lehetséges célmolekula – különféle bőrgyógyászati eredetű kórképek esetében alkalmazott PDT hatékonyságának növelése érdekében. Munkánk során arra kerestünk választ, hogy az ABCG2 fehérje mennyiben járul hozzá a porfirinek keratinocitákból való eltávolításához. Kísérleteinkhez az immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonalat használtuk. Ezt követően egy *in vitro* PDT modellben az ABCG2 transzporter specifikus gátlásának a hatását tanulmányoztuk. A Ko-134 gátlószert alkalmaztuk, amely a fumitremorgin C gombaméreg nem-toxikus analógja.

Anyagok és módszerek

HaCaT sejtek tenyésztése

A HaCaT keratinocita sejtvonal, amely normál humán keratinociták spontán immortalizációjával létrejött sejtvonal, Prof. N. E. Fusenig laboratóriumából származik (7). A HaCaT sejteket 75 cm² alapterületű flaskában tartottuk fenn, 4,5 g/l glükóz tartalmú DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) tápfolyadékot használtunk 10% főtájs borjú szérummal (FBS, HyClone), 1% L-Glutaminnal és 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal (Sigma) kiegészítve. A sejteket 37 °C hőmérsékletű termosztátban 100% páratartalom mellett tenyésztettük, a tápfolyadékot kétnaponta cseréltük.

Keratinocita differenciációs modellek

A HaCaT sejtek szinkronizálása Pivarcsi és mtsai által beállított és leírt módszerrel történt (8). A sejtek a teljes konfluencia elérését követően a kontakt gátlás állapotában egy héten keresztül normál körülmények között lettek tenyésztve, majd szérummentes tápfolyadékban további egy hétig tartottuk a sejteket. Ezután a HaCaT keratinocitákat 5x10⁵ sejt/cm² sűrűségben kipasszáltuk szérumot tartalmazó tápfolyadékban. A szinkronizálási eljárás végétől számított 0 és 24 óra elteltével vettünk mintákat.

Valós idejű reverz-transzkriptáz PCR

A sejtekből az RNS-t TRIzol reagens (Invitrogen) segítségével vontuk ki a gyártó által megadott protokoll szerint. A cDNS-t iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) felhasználásával 1 µg RNS-ből írtuk át. A valós idejű RT-PCR kísérleteinkhez a Universal Probe Library (UPL, Roche) rendszert használtuk. A használt UPL primerek: 18S(f) 5'-ctcaacacgggaacacac-3', 18S(r) 5'-cgctccaccaactagaac-3', ABCG2(f) 5'-tggcttagactcaagcacagc-3', ABCG2(r) 5'-tcgtccctgtagacac-3' a használt próbák: #77 (18S), #56 (ABCG2). A reakciókat és kiértékelésüket egy iQ5 Real-Time PCR Detection Machine (Bio-Rad) és a hozzá tartozó program segítségével végeztük el. A relatív mRNS szintek meghatározásához a 2^{-ΔΔCt} módszert alkalmaztuk (9). Az ABCG2 gén kifejeződését a 18S riboszómális RNS gén expressziójához normalizáltuk.

Western blot

A sejteket fehérje lízis pufferben (Sigma) óvatosan felfuszpendáltuk. Harminc percig 4 °C-on inkubáltuk, majd 10 000g centrifugálást követően a felüliszót használtuk a továbbiakban. A lízátumok fehérje tartalmát BCA Protein Assay (Pierce) segítségével határoztuk meg. Nátrium dodecilszulfát (SDS, Sigma) poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel 7,5%-os gél alkalmazásával méret szerint elválasztottuk a fehérjéket, 40 µg összfehérjét vittünk fel mintánként. Egér anti-humán ABCG2 (1:300, Calbiochem) és egér anti-humán α-aktin (1:500, Sigma) elsődleges ellenanyagokat használtunk a vizsgált fehérjék kimutatásához. A 3% tejport tartalmazó TBS-ben kihígított elsődleges ellenanyagokkal egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4 °C-on, majd mosást követően az egér IgG ellen termeltetett alkalikus foszfatáz konjugált másodlagos ellenanyagot és SigmaFast BCIP/NBT (Sigma) előhívó oldatot használtunk a fehérje sávok megjelenítéséhez.

Áramlási citometriás vizsgálatok

Porfirin autofluoreszcencia méréséhez a sejteket 4 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 1 µM DALA-val (Sigma, 500 µM törzsoldat desztillált vízben oldva). Eközben a sejteket 1 µM Ko134-gyel (Solve,

500 μ M törzsoldat DMSO-ban oldva), vagy a vivőanyagával kezeljük. Ezután tripszines kezelést és centrifugálást követően PBS-ben szuszpendáltuk fel a sejteket és a mérésig sötétben jégen tartottuk őket.

Az ABCG2 fehérje felszíni festéséhez a sejteket tripszinezés és centrifugálás után 1% BSA-PBS-ben vettük fel és anti-humán ABCG2 antitesttel (1:100, 5D3 klón, R&D Systems) vagy egér IgG2b izotípus kontroll antitesttel jelöltük őket 45 percen át jégen inkubálva. Mosást követően anti-egér IgG Alexa647 konjugált másodlagos antitesttel (Molecular Probes) festettük a sejteket 45 percig jégen, majd a mérésig sötétben 4 °C-on tartottuk őket.

A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson) mértük és elemeztük, a detektálást 635 nm gerjesztés mellett az FL4 csatormán végeztük. Összesen 15000 sejtet mértünk le mintánként.

DALA kezelés és *in vitro* PDT

HaCaT keratinocitákat 4 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-n 1 μ M DALA-val és 1 μ M Ko134-el vagy a vivőanyagával. A sejteket 1,5 J/cm² dózisu besugárzásnak tettük ki egy Aktilite 128 PDT lámpa felhasználásával (635 nm emissziós csúcs, Photocure ASA). A besugárzás idejére a sejteken a tápfolyadékot vékony rétegben PBS-el helyettesítettük. A sejtek viabilitását a besugárzás után 24 órával mértük MTT viabilitás mérés alkalmazásával.

Viabilitás mérés MTT esszével

A sejtekről a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 37 °C-ra felmelegített színtelen RPMI (Sigma) tápoldattal helyettesítettük, amely 10% MTT törzsoldattal ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, 5 mg/ml, Sigma) volt kiegészítve. Négyórás, 37 °C-on történő inkubációt követően a keletkezett formazán kristályokat feloldottuk 100 μ l 0,04 M HCl tartalmú izopropanolban, majd kiegészítettük 20 μ l 10% SDS oldattal, végül az oldatot alaposan szuszpendáltuk. Spektrofotométer (Multiscan EX, Thermo Labsystems) segítségével mértük meg az egyes lyukakban az 540 nm hullámhosszon mutatott abszorbanciát, amely arányos az adott lyukban levő sejtek számával. A kapott abszorbancia értékeket mindig a kontrollként használt kezeletlen minta abszorbancia értékéhez hasonlítottuk.

Eredmények kiértékelése, statisztika

Statisztikai összehasonlítás céljából az eredményeket egy szempontú varianciaanalízis módszerével (ANOVA), a Vassarstats weboldalán (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) található program segítségével értékeltük ki. A $p < 0,05$ szignifikancia szintet tekintettük a statisztikailag szignifikáns eltérés határának.

Eredmények

A szabad porfirin felhalmozódása HaCaT sejtekben az ABCG2 expressziójától és funkciójától függ

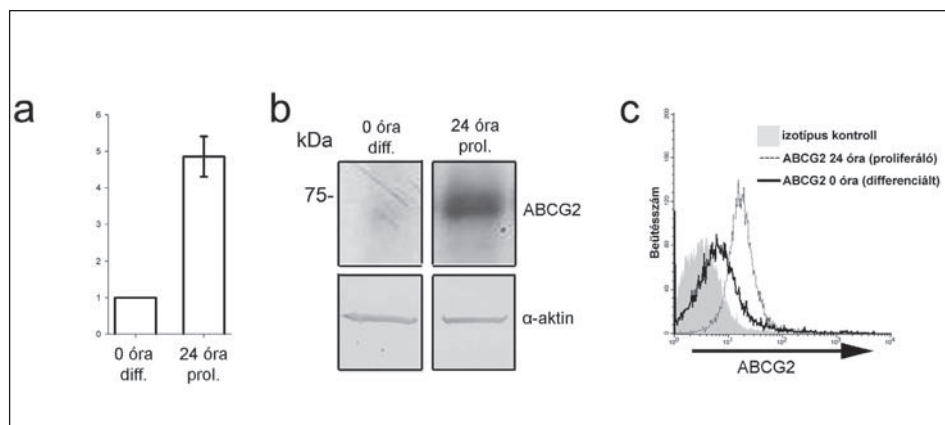
Korábbi eredményeink szerint az ABCG2 transzporter nagymértékben kifejeződik az epidermiszben különböző patológias bőrelváltozásokban, mint például a pikkelysömör, vagy a laphám karcinóma. Ezen betegségek között található olyan, amelynek a gyógyításában fontos szerephez jut a fotodinámias terápia. Az ABCG2 fehérjéről ismert, hogy közreműködik a porfirinek sejtekből való kikapcsolásában, ezért elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a fotodinámias terápia hatékonyságának javításában az ABCG2 fehérje, mint lehetséges célmolekula szerepét. *In vitro* PDT kísérletet terveztünk

HaCaT keratinociták felhasználásával. A sejteket DALA-val kezeltük, amely az intracelluláris szabad porfirinszintet jelentősen megnöveli. Négyórás 1 mM DALA-val történő előkezelést követően a sejtek porfirin tartalmát áramlási citometria segítségével határoztuk meg.

Megvizsgáltuk az összefüggést a HaCaT keratinociták ABCG2 expressziója, valamint a felhalmozódó porfirin mennyisége között. Korábbi kísérleteink alapján tudtuk, hogy szinkronizált HaCaT sejtekben az ABCG2 xenobiotikum transzporter csak igen kismértékben fejeződik ki a differenciált keratinocitákban, míg mind mRNS, mind fehérje szinten jelentősen indukálódik a proliferáló keratinocitákban (1a, b. ábra). A plazmamembránban található ABCG2 fehérje mennyiségét is megmértük áramlási citometriával, ugyanis az itt található transzporter képes a porfirinek sejtéből való eltávolítására. Proliferáló HaCaT sejtekben, 24 órával a sejtnyugalmi fázisból való kilépést követően a plazmamembrán ABCG2 szint is jelentősen emelkedik a differenciált keratinocitákat reprezentáló 0 órás mintához képest (1c. ábra).

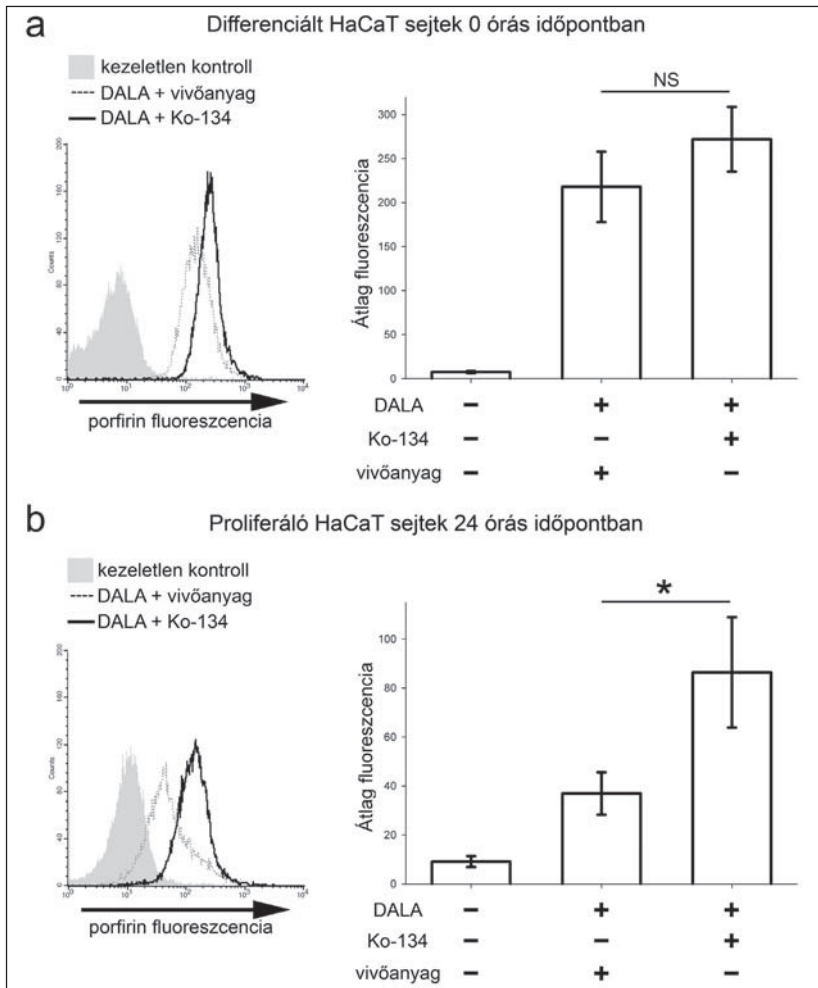
Összehasonlítottuk a DALA kezelést követően felhalmozott porfirin szinteket szinkronizált HaCaT sejtekben differenciált és proliferáló állapotokban. A nagymértékben differenciálódott 0 órás mintákban mintegy 7,5-szerese volt a porfirin mennyiség a 24 órás proliferáló sejteket tartalmazó mintákhoz képest. Továbbá, az ABCG2 fehérje funkcióját Ko-134-gyel specifikusan gátolva a 4 órás DALA kezelés során a differenciált keratinocitákban nem volt szignifikáns porfirin szint változás (2a. ábra). A proliferáló sejtekben nagy mennyiségben kifejeződő ABCG2 transzportert Ko-134 kezeléssel gátolva a keratinociták porfirin tartalma jelentős emelkedést mutatott (2b. ábra). Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az ABCG2 transzportert expresszáló keratinociták jobban ellenállnak a porfirin közvetítette PDT-nak, ez azonban kiküszöbölhető a fehérje nem-toxikus és specifikus gátlószerének, a Ko-134-nek a segítségével.

A fumitremorgin C nem toxikus analógja, a Ko-134, nagy hatékonysággal növeli a keratinociták *in vitro* PDT-ra való érzékenységét



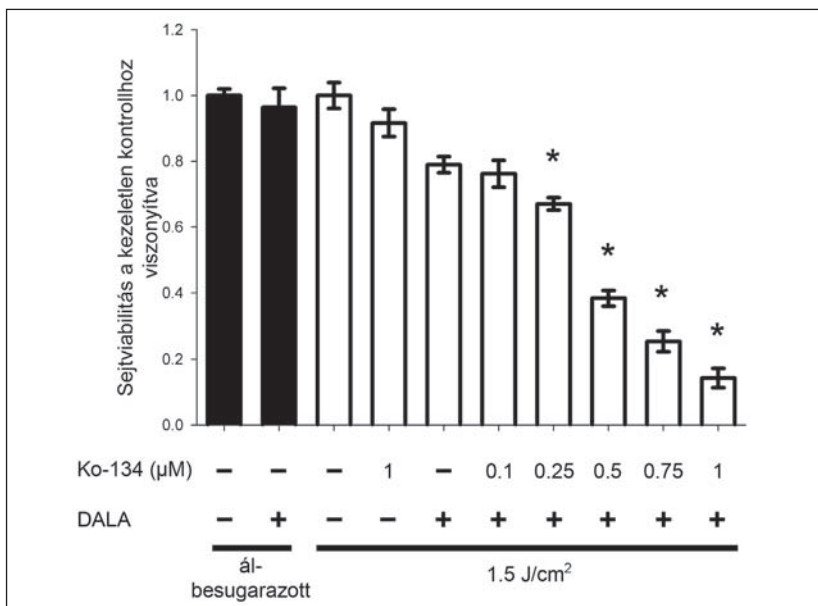
1. ábra

Az ABCG2 mRNS (a), teljes fehérje (b) és membrán fehérje (c) kifejeződése differenciált és proliferáló HaCaT sejtekben



2. ábra

Differenciált és proliferáló HaCaT sejtek által DALA kezelés után felhalmozott porfirin mennyiségének változása ABCG2 specifikus gátlása esetén; NS – nem szignifikáns, * – $p < 0,05$



3. ábra

A HaCaT sejtek viabilitásának változása ABCG2 specifikus gátlása esetén *in vitro* fotodinámiai kezelés hatására; * – $p < 0,01$

HaCaT sejtek felhasználásával egy *in vitro* PDT modellben vizsgáltuk meg az ABCG2 specifikus gátlásának hatékonyságát a sejtek porfirin közvetítette fényérzékenységre. Előkísérletekben határoztuk meg az optimális dózist. Egy nappal az Aktilite PDT készülékkel történő 1,5 J/cm² dózisu besugárzást követően a 4 órás DALA előkezelésen átesett, jól proliferáló HaCaT sejtek 78,9%-a maradt élve az MTT viabilitási teszt alapján. Ennél a dózissnál tehát már látszott a PDT kezelés hatása a porfirinnel érzékenyített sejteken, de a nagy részük túlélte a kezelést. Ezután a DALA előkezeléssel párhuzamosan az ABCG2 specifikus gátlószerével, Ko-134-gyel, különböző koncentrációkban kezeltük a sejteket. A Ko-134 kezelés dóziszfüggő módon növelte a DALA-val előkezelt HaCaT sejtek érzékenységét a PDT kezelésre (3. ábra).

Megbeszélés

Az elmúlt években derült fény arra, hogy az ABCG2 fehérje a hem-efflux transzporterek egyike, ezen fehérjék jellemzője, hogy különböző stresszhatások során a sejteket megvédi a toxikus porfirinek felhalmozódásától (10; 11). Az ABCG2 transzporter magas szintű kifejeződése jelentősen csökkenti a PPIX mennyiségét ABCG2 transzfektált HEK293 sejtekben, ezzel szemben egyéb multidrog rezisztencia asszociált xenobiotikum transzporterek esetében nem figyeltek meg ilyen hatást (12). Kimutatták, hogy az ABCG2 fontos szerepet játszik az egerek porfirin homeosztázisában, a porfirinben gazdag étrenden tartott ABCG2 knock-out egerek vörösvértestjeiben jelentősen emelkedik a porfirin típusú molekulák szintje (5). Az ABCG2 fehérje tehát kulcsfontosságú lehet a porfirin alapú terápiai és diagnosztikus alkalmazásokban, ezért ez egy intenzíven kutatott terület (13).

Az ABCG2 gén promoterében számos funkcionális *cis* elemet találtak, például a hipoxia indukálható transzkripciósfaktor (HIF1) által regulált „*hypoxia responsive*” elem, és többek között az aril-hidrokarbon receptor által szabályozott „*xenobiotic responsive*” elem (6; 14). Mindkét transzkripciósfaktor kapcsolatba hozható a különböző stressz szignalizációs útvonalakkal. A

tumorok mikrokörnyezete, valamint számos betegség esetén az érintett sejtek stressz faktorok széles skálája által befolyásolt terület.

Az ABCG2 fehérje kifejeződése korábbi irodalmi adatok alapján is a bazális keratinocitákra jellemző mind a humán (15), mind az egér (16) epidermiszben. Egészséges humán bőr *ex vivo* tenyésztése során a DALA-val inkubált mintákban jelentkező porfirin autofluoreszcencia a szuprabazális sejtekben volt megfigyelhető, a bazális sejtek nem halmoztak fel porfirineket (17). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ABCG2 szerepet játszik a keratinociták porfirin homeosztázisában, és befolyásolhatja, hogy a sejtek milyen mértékben képesek porfirinek kipumpálására *in vivo*. Egér keratinocita tenyésztésben kimutatták, hogy a sejtek differenciációs állapotától is függ a PPIX intracelluláris felhalmozódása (18). Ezzel összhangban vannak azok az eredményeink, amelyek szerint az ABCG2 fehérje kifejeződésében megfigyelt különbség proliferáló és differenciált HaCaT sejtekben arányos a DALA előkezelést követően felhalmozott porfirin mennyiségével. Anand és mtsai közölték, hogy az alacsony dózisu methotrexát kezelés növeli a PDT hatékonyságát bőr karcinóma sejtekben (19). A methotrexát az ABCG2 transzporter egyik ismert, kis hatékonysággal transzportált szubsztrátja, de elképzelhető, hogy interferál az ABCG2 közvetítette porfirin transzporttal.

A PDT egy klinikailag széles körben alkalmazott kezelési lehetőség, főként a nem-melanóma típusú bőrtumorok esetén, a terápiás indikációk folyamatos bővülést mutatnak (20, 21). Számos klinikai kísérlet hozott biztató eredményeket a PDT felhasználásáról különböző bőrelváltozások gyógyításában, például súlyos akne (22) és kután T-sejtes limfóma (23) esetében. A PDT legfontosabb lépései a fotoszenzitizáló anyag felhalmozódása a betegség által érintett szövetben, majd a célsejtek elpusztítása látható fény besugárással. Egy részletes vizsgálat ismert, ahol az ABCG2 fehérje szerepét vizsgálták a különböző fényérzékenyítőkből való eltávolításában, az eredmények szerint az ABCG2 transzporter jelentős hatással lehet a PDT hatékonyságára (12). A szerzők az ABCG2 fehérjét túltermelő sejtvonalat használtak, és egy 100 W teljesítményű halogén lámpával végezték a fénykezelést. ABCG2 gátlási kísérletekben a transzporter funkcióját fumitremorgin C segítségével blokkolták, amelyről ismert, hogy egérben neurotoxikus mellékhatásokat idéz elő. Robey és mtsai tehát igen értékes eredményekről számoltak be, azonban igen fontos, hogy az eredményeik kiegészítésre kerüljenek, és a PDT-re közvetlenül értelmezhetőek legyenek.

Munkánk során HaCaT keratinocitákat használtunk, amely az ABCG2 fehérjét sem transzfekció, sem szelekció útján nem túltermelő sejtvonal. Az általunk beállított *in vitro* PDT modellben terápiásan elfogadott fényforrást használtunk, amely szűk hullámhossz tartományban, a porfirinek specifikus gerjesztésére alkalmas, 635 nm emissziós csúcsú vörös fényt emittál. A specifikus ABCG2 gátlást lehetővé tevő Ko-134 adataink szerint már igen kis mennyiségben adagolva is jelentősen növelte

az *in vitro* PDT hatékonyságát. A Ko-134 orális vagy intraperitoneális adagolásakor a kísérleti egerekben nem figyeltek meg neurotoxikus tüneteket, a fumitremorgin C-vel ellentétben (24). A DALA előkezelés során alkalmazott Ko-134 szignifikáns mértékben csökkentheti a besugárási dózist is, amely a PDT során jelentkező nem kívánatos hatásokat csökkentheti. Eredményeink felhasználhatóak a PDT humán bőr léziók kezelésében mutatott hatásának további javításához.

Összefoglalva, az ABCG2 működését gátló, nem mérgező, specifikus inhibitorok, mint például a Ko-134 nagyon hasznosak lehetnek a bőr, vagy akár belső szervek PDT kezelésének további fejlesztése szempontjából. Az ABCG2 efflux által okozott torzító hatás is kiküszöbölhetővé válhat a tumorok fluoreszcens alapú, PPIX-mediált diagnosztikus vizsgálata során.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Asbóth XTTPSRT1, OTKA NK77436, OTKA K68680, TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0001, TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 pályázatok és a TEVA Magyarország Zrt. segítségével valósult meg.

IRODALOM

1. Gaál M., és mtsai: Fotodinámiai terápia a bőrgyógyászatban. *Orv Hetil* (2007) 148, 2227-2233.
2. Schultz I.J., és mtsai: Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *J Biol Chem* (2010) 285, 26753-26759.
3. Ponka P.: Cell biology of heme. *Am J Med Sci* (1999) 318, 241-256.
4. Krishnamurthy P. és Schuetz J.D.: Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2006) 46, 381-410.
5. Jonker J.W., és mtsai: The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99, 15649-15654.
6. Krishnamurthy P., és mtsai: The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* (2004) 279, 24218-24225.
7. Boukamp P., és mtsai: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* (1988) 106, 761-771.
8. Pivarcsi A., és mtsai: Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* (2001) 293, 206-213.
9. Livak K.J. és Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001) 25, 402-408.
10. Krishnamurthy P., Xie T., Schuetz J.D.: The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* (2007) 114, 345-358.
11. Latunde-Dada G. O., Simpson R.J., McKie A. T.: Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci* (2006) 31, 182-188.
12. Robey R. W., és mtsai: ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biol Ther* (2005) 4, 187-194.
13. Ishikawa T., és mtsai: Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis. *Adv Pharmacol Sci* (2010) 2010, 587306.
14. Tompkins L.M., és mtsai: A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem Pharmacol* (2010) 80, 1754-1761.

15. *Triel C., és mtsai*: Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* (2004) 295, 79-90.
16. *Yano S., és mtsai*: Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* (2005) 23, 834-841.
17. *Smits T., és mtsai*: Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol* (2009) 160, 849-857.
18. *Ortel B., és mtsai*: Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer* (1998) 77, 1744-1751.
19. *Anand S., és mtsai*: Low-dose methotrexate enhances aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* (2009) 15, 3333-3343.
20. *Choudhary S., Nouri K., Elsaie M.L.*: Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci* (2009) 24, 971-980.
21. *Sidoroff A. és Thaler P.*: Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer—the place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis Photodyn Ther* (2010) 7, 24-32.
22. *Riddle C.C., és mtsai*: A review of photodynamic therapy (PDT) for the treatment of acne vulgaris. *J Drugs Dermatol* (2009) 8, 1010-1019.
23. *Zane C., és mtsai*: Photodynamic therapy with methylaminolaevulinic acid as a valuable treatment option for unilesional cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* (2006) 22, 254-258.
24. *Allen J.D., és mtsai*: Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* (2002) 1, 417-425

A Nékám Alapítvány

köszöni mindazok segítségét, akik
2010. évi személyi jövedelmadójuk 1%-át
felajánlották számára.

Az Alapítvány a befolyt összeget az Alapító Okiratban meghatározott, közhasznú célokra fordítja:

- a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán zajló gyógyítási, kutatási, oktatási és innovációs tevékenység feltételeinek javítására
- a Bőrklinika ingó és ingatlan eszközállományának felújítására, modernizálására
- a betegellátás korszerűsítésére, minőségének javítására
- új kezelési módok bevezetésére, ill. az ehhez szükséges technikai feltételek megteremtésére
- fiatal orvosok hazai és külföldi képzésének támogatására

az Alapítvány kuratóriuma 2011.