

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Marija Mioč

**POVEĆANJE OSJETLJIVOSTI TUMORSKIH STANICA NA
TERAPIJU MODULACIJOM AKTIVNOSTI TRANSPORTERA
ABCB1 I ABCG2 DIAZA KRUNASTIM ETERIMA I DERIVATIMA
PRIMAKINA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

POVEĆANJE OSJETLJIVOSTI TUMORSKIH STANICA NA TERAPIJU MODULACIJOM AKTIVNOSTI TRANSPORTERA ABCB1 I ABCG2 DIAZA KRUNASTIM ETERIMA I DERIVATIMA PRIMAKINA

Marija Mioč

Disertacija je izrađena u: Laboratorij za eksperimentalnu terapiju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor/i: izv. prof. dr.sc. Marijeta Kralj, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju IRB

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Jedan od ključnih mehanizama otpornosti tumorskih stanica je povećana ekspresija i aktivnost membranskih transportera ABCB1 i ABCG2. Cilj rada bio je ispitati mogućnost njihove inhibicije spojevima iz skupine aza-krunastih etera i derivata primakina, s namjerom pojačanja djelovanja kemoterapeutika u modelnim staničnim linijama. Pokazali smo da je struktura spoja važna za njegov inhibitorski potencijal te da su neki od derivata primakina snažni i selektivni inhibitori transportera ABCG2, dok je diaza-krunasti eter DAC-3Amid snažni inhibitor oba transportera. Rezultati ovog istraživanja dati će doprinos za dizajn novih spojeva s još boljim sposobnostima inhibicije.

Broj stranica: 134

Broj slika: 42

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 250

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: transporteri ABC, inhibitori transportera ABC, krunasti eteri, ionofori, antimalarici, višestruka otpornost na terapiju

Datum obrane: 2. prosinca 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr.sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica IRB, predsjednica povjerenstva
2. Izv. prof. dr.sc. Neda Slade, znanstvena savjetnica IRB, član
3. Prof. dr.sc. Hrvoje Lepeduš, redoviti profesor u trajnom zvanju Filozofskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, član
4. Prof. dr.sc. Zrinka Rajić, redovita profesorica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zamjena člana

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: interdisciplinary area of science
Scientific Fields: biology, basic medical sciences

ENHANCEMENT OF TUMOR CELL SENSITIVITY TO THERAPY BY MODULATION OF ABCB1 AND ABCG2 TRANSPORTER ACTIVITY WITH DIAZA CROWN ETHERS AND PRIMAQUINE DERIVATIVES

Marija Mioč

Thesis performed at: Laboratory for experimental therapy, Department of molecular medicine, Ruđer Bošković Institute

Supervisor/s: Marijeta Kralj, PhD, Senior scientist, tenured

Short abstract:

One of the major mechanisms of tumor cell resistance is the increased expression and activity of the membrane transporters ABCB1 and ABCG2. The aim of the study was to investigate the possibility of their inhibition by compounds from the group of aza-crown ethers and primaquine derivatives to enhance the effect of chemotherapeutic agents in model cell lines. We have shown that the structure of the compound is important for its inhibitory potential and that some of the primaquine derivatives are potent and selective inhibitors of the ABCG2 transporter, whereas the diaza-crown ether DAC-3Amide is a potent inhibitor of both transporters. The results of this study will help to develop new compounds with even better inhibitory properties.

Number of pages: 134

Number of figures: 42

Number of tables: 15

Number of references: 250

Original in: croatian

Key words: ABC transporters, inhibitors of ABC transporters, crown ethers, ionophores, antimalarial drugs, multiple drug resistance

Date of the thesis defense: December 2, 2022

Reviewers:

1. Maja Herak Bosnar, PhD, Senior scientist, Ruđer Bošković Institute
2. Neda Slade, PhD, Senior scientist, Ruđer Bošković Institute
3. Hrvoje Lepeduš, PhD, tenured professor, Faculty of Philosophy, University of Osijek
4. Zrinka Rajić, PhD, tenured professor, Faculty of Pharmacy and biochemistry, University of Zagreb

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „*A multidisciplinary approach to discover selective drugs targeting cancer stem cells: The role of potassium transport – MultiCaST*“ pod vodstvom dr.sc. Marijete Kralj, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju i voditeljice laboratorija.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojim dečkima, Mariju i Leu, koji su moj putokaz i svijetlo u mraku. Hvala vam na izuzetnoj žrtvi i podršci. Ovaj rad je vaš koliko i moj, samo je napisan mojom rukom.

Zahvaljujem svima koji su se našli sa mnom na ovom izazovnom ali lijepom putovanju i učinili ga mogućim.

Mojoj mentorici, Marijeti Kralj, što mi je bila i više od izvrsnog mentora – saveznik, suborac, tješitelj, ohrabritelj, podrška, lijepa riječ, vjetar u leđa. Vaš nesalomljiv duh, upornost i dobra volja su i mene vodili naprijed.

Mojim roditeljima, s kojima je započela ova avantura, jer su mi omogućili školovanje i u tome me poticali, uvijek dopuštajući da u potpunosti slijedim svoj put. Mami, od koje sam naučila biti marljiva i uporna. Tati, kojega sam uvijek viđala s knjigom u ruci i koji mi je od malih nogu usadio ljubav prema čitanju i učenju.

Mojoj sestri, za svaku riječ ohrabrenja i utjehe, za svaki dokoni razgovor uz kavu i svaki balet kojeg smo pogledale (zbog mene).

Ekipi iz Laboratorija za eksperimentalnu terapiju, Lidiji, Katji i Mladenu, koji su me ohrabivali i poticali, s kojima sam provela mnogo lijepih trenutaka u razgovoru i smijehu (i u radu ali to se podrazumijeva).

Marini, mom duhu iz čarobne svjetiljke, koja se uvijek trudila ispuniti sve moje želje. Zahvaljujem ti na tvojoj vječitoj brizi jesam li jela i jesam li odmorila. Hvala ti za svaki razgovor, poticaj i savjet.

Ekipi iz laboratorija preko puta, od milja prozvanog „café LAMBDA“, mom drugom laboratoriju i dragom utočištu. Vaša toplina, dobrotu srca i glasni smijeh su često tjerali tamne oblake iznad moje glave. Marija, Iva PM., Iva Š., Sandra i Ena, hvala vam na svim trenucima koje smo zajedno prošle. Marijani, mojoj „ruđerovskoj majci“. Hvala Vam što ste me prvi puta pozvali na kavu i kasnije prihvatili kao svoju. Hvala za svaki razgovor o umjetnosti i književnosti, za svaku utjehu, potporu i pomoć.

Nataliji, koja me je svako jutro dočekala s osmijehom, na njenoj vedrini kojom je i mene zaražavala.

Vesni, Željki, Katji i Frani, mojim prijateljima iz studentskih dana, uz koje me vežu najljepše uspomene i koji su uvijek tu za savjet i razgovor, iako se nalazimo u različitim zemljama Europe.

Svim prijateljima i članovima obitelji, koji su izravno ili neizravno pomogli ostvarenju ovog cilja. Draženu i Ani, koji su uvijek bili dobro društvo i povoljan vjetar u leđa, njihovim (mojim) djevojčicama Loreni i Lari, koje su mi grijale srce i uveseljavale me, „baki“ Duški i „djedu“ Miroslavu koji su bili podrška i veselili se mojim uspjesima, mojoj kumi Ivoni i mojim curama, Ani i Ruži, koje su tu od malih nogu i prate svaki moj korak.

Svim ostalim doktorandima i poslijedoktorandima s kojima sam dijelila iskustva i diskutirala o znanosti, životu i majčinstvu.

Članovima Povjerenstva, jer su mi izašli u susret, naoružani sposobnošću brzog čitanja. Hvala vam na savjetima i sugestijama.

Ovaj rad dugujem svima vama.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Otpornost tumorskih stanica na terapiju	1
1.2.	Obitelj transportera ABC	2
1.3.	Transporter ABCB1	7
1.4.	Transporter ABCG2.....	10
1.5.	Transporter ABCC1.....	14
1.6.	Povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na terapiju.....	15
1.6.1.	Inhibitori transportera ABCB1.....	16
1.6.2.	Inhibitori transportera ABCG2	17
1.7.	Tumorske matične stanice	18
1.8.	Krunasti eteri	20
1.9.	Derivati antimalarika primakina	23
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	27
3.	MATERIJALI I METODE.....	28
3.1.	MATERIJALI.....	28
3.1.1.	Stanične linije.....	28
3.1.2.	Membranski sustavi	28
3.1.3.	Spojevi	29
3.1.4.	Plazmidi	33
3.2.	METODE	33
3.2.1.	Stanična kultura	33
3.2.2.	Ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva <i>in vitro</i>	34
3.2.3.	Metil tiazolil tetrazolij test (MTT test)	35
3.2.4.	Praćenje ekspresije proteina metodom SDS-PAGE i Western blot.....	36
3.2.5.	Test nakupljanja supstrata	38
3.2.6.	Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3	40
3.2.7.	Priprema membranskih vezikula.....	40
3.2.8.	Test nakupljanja supstrata u izvrnutim membranskim vezikulama.....	41
3.2.9.	Mjerenje bazalne i stimulirane ATP-azne aktivnosti.....	42

3.2.10.	Transfekcija stanične linije HEK293 plazmidom pEGFP-G2.....	42
3.2.11.	Nakupljanje supstrata u stvarnom vremenu u staničnoj liniji HEK-EGFP-G2	43
3.2.12.	Imunofluorescencija	43
3.2.13.	Analiza staničnog ciklusa	44
3.2.14.	Molekularno uklapanje u protein ABCG2.....	45
3.2.15.	Mjerenje nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) u stanicama.....	46
3.2.16.	Statistička analiza podataka	47
4.	REZULTATI.....	48
4.1.	Karakterizacija modelnih staničnih linija.....	49
4.2.	Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti testiranih spojeva <i>in vitro</i>	51
4.2.1.	Antiproliferativna aktivnost mono- i diaza-18-kruna-6 etera	51
4.2.2.	Antiproliferativna aktivnost fumardiamida primakina i halogenanilina i <i>bis-urea</i> primakina i halogenanilina	58
4.2.3.	Antiproliferativna aktivnost prirodnih ionofora	61
4.3.	Utjecaj ispitivanih spojeva na aktivnost transportera ABCB1 i ABCG2.....	62
4.3.1.	Test nakupljanja supstrata transportera ABCB1 i ABCG2 u modelnim staničnim linijama.....	63
4.3.2.	Test nakupljanja supstrata transportera ABCG2 u izvrnutim membranskim vezikulama	71
4.4.	Utjecaj ispitivanih spojeva na vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3	72
4.5.	Utjecaj ispitivanih spojeva na ATP-aznu aktivnost transportera ABCB1 i ABCG2 ..	75
4.6.	Kinetika transporta supstrata u stvarnom vremenu u stanicama HEK-EGFP-G2	79
4.7.	Povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik	82
4.8.	Utjecaj ispitivanih spojeva na stanični ciklus	86
4.9.	Molekularno uklapanje u protein ABCG2	88
4.10.	Utjecaj ispitivanih spojeva na ekspresiju i lokalizaciju proteina ABCG2	93
4.11.	Utjecaj ispitivanih spojeva na stanični oksidativni stres.....	96
5.	RASPRAVA.....	98
6.	ZAKLJUČCI.....	108
7.	LITERATURA	110
8.	SAŽETAK	129
9.	SUMMARY	131
10.	ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA	133

1. UVOD

Rak je jedan od najvećih zdravstvenih problema za čovjeka u 21. stoljeću i drugi vodeći javnozdravstveni problem u svim zemljama svijeta. Sve češća pojava malignih bolesti može se pripisati starenju, rastu populacije, okolišnom zagađenju, konzumiranju alkohola i duhana, kao i nezdravom zapadnjačkom načinu prehrane. Rastući broj slučajeva raka uzrokuje značajno socijalno i ekonomsko opterećenje, te je stoga razvoj strategije za borbu protiv ove bolesti od velikog interesa.

Proces pretvorbe nemaligne stanice u malignu uključuje postepeno nakupljanje promjena koje vode do pojačane proliferacije stanica, izbjegavanja stanične smrti i inhibicije rasta, indukcije angiogeneze (nastanka novih krvnih žila), te na koncu do aktivacije staničnih programa koji vode do invazije tumora u druga tkiva i metastaziranja [1]. Rak je dinamična bolest kod koje tumor nastavlja evoluirati i nakon maligne pretvorbe, što ima za posljedicu nastanak heterogene tumorske mase unutar koje se nalaze stanice s različitom genetičkom podlogom i različitom razinom osjetljivosti na protutumorsku terapiju. Takva heterogenost može kao podlogu imati genetičku, epigenetičku, fenotipsku promjenu ili može biti posljedica promjena u transkriptomu. Heterogenost tumorske mase je dobra podloga za razvoj otpornosti tumora na terapiju [1]–[3].

1.1. Otpornost tumorskih stanica na terapiju

Za liječenje raka se, osim kirurških pristupa, primjenjuju i ciljana biološka terapija, hormonska terapija, radioterapija, imunoterapija i kemoterapija, kao prva linija obrane od tumora i neizostavna strategija u efikasnom liječenju raka krvnih stanica i metastatskih tumora [4] [5]. Pojava otpornosti tumora na kemoterapiju postaje veliki klinički problem koji dovodi do neuspjeha u liječenju, relapsa i u konačnici smrti oboljelog. Razlikujemo primarnu i stečenu otpornost, ovisno o tome javlja li se prije početka terapije ili nakon/uslijed nje. Neki od mehanizama koji dovode do ove pojave su pojačani popravak DNA, inhibicija apoptoze, promjena u signalnim putevima, inaktivacija ili smanjena koncentracija lijekova u tumorskoj stanici.

Prilikom liječenja raka kemoterapeutikom se eliminiraju stanice tumora osjetljive na terapiju, dok one koje su otporne preživljavaju i iz njih se razvija sekundarni tumor otporan na

primijenjeni kemoterapeutik [3], [6]. Posebno važan razlog otpornosti tumorskih stanica na lijekove jest prekomjerna ekspresija transportera ABC (od eng. *ATP-binding cassette*), koji doprinose razvoju tzv. višestruke otpornosti na lijekove [4], [7]. To je česti problem u liječenju oboljelih od raka, a označava neosjetljivost tumora na više funkcionalno i strukturno nepovezanih skupina lijekova [4], [8], [9]. Unatoč nastojanjima da se razviju novi protutumorski lijekovi i biološke terapije, kao i da se istraže mnogi mogući mehanizmi tumorske otpornosti na takve terapije, većina pacijenata s metastatskim rakom će umrijeti zbog razvoja višestruke otpornosti na lijekove [6], [9].

Juliano i Ling su 1976. godine otkrili da je glikoprotein veličine 170 kDa odgovoran za to što su stanice jajnika kineskog hrčka, otporne na kolhicin, dodatno razvile otpornost i na široki spektar nepovezanih lijekova. Nazvali su ga P-glikoprotein (P-gp) na temelju izmijenjene propusnosti otpornih stanica za pojedine lijekove, a koja nije pronađena u divljem tipu stanica. Kasnije je otkriveno da P-gp pripada obitelji membranskih transportera ABC te je time započelo njihovo istraživanje u kontekstu višestruke otpornosti na lijekove, ali i mnogih drugih fizioloških procesa [9], [10].

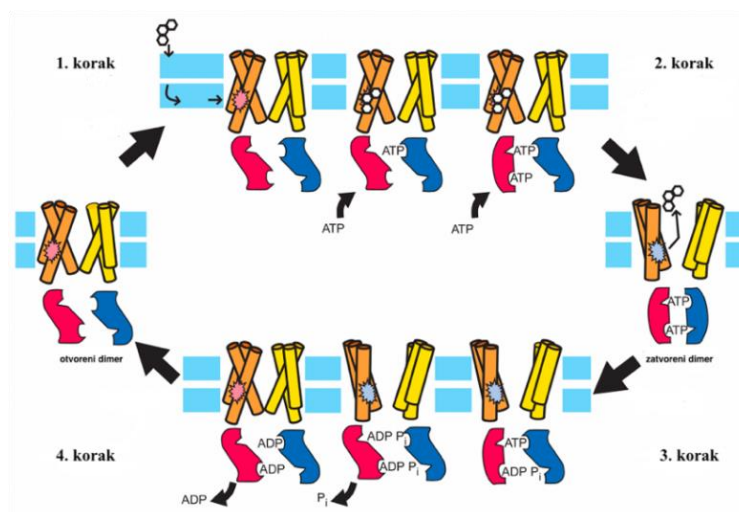
1.2. Obitelj transportera ABC

Transporteri ABC jedna su od najvećih obitelji membranskih aktivnih transportera, evolucijski dobro očuvani i prisutni u genomu svih organizama, od prokariota do čovjeka. Razvili su se kao složeni sustav stanične obrane od štetnih spojeva koji u stanice i organizme ulaze iz okoliša. Do sada je u genomu čovjeka otkriveno 48 gena koji kodiraju za različite transportere ABC, podijeljene u 7 potporodica (označenih ABCA-ABCG), na temelju sličnosti u sekvenci [5], [11].

Transporteri ABC nazvani su prema specifičnim domenama koje vežu i hidroliziraju adenozin trifosfat - ATP. Funkcionalna jedinica transportera se obično sastoji od dvije transmembranske domene (TMD) i dvije domene koje vežu ATP i čine potpuni transporter, dok se članovi nekih potporodica sastoje od jednog seta obiju domena, te formiraju heterodimere ili homodimere kako bi bili potpuno funkcionalni. Domena koja veže ATP se nalazi na karboksilnom (C) kraju polipeptidnog lanca kod većine transportera, dok je kod članova potporodice ABCG ta domena smještena na amino (N) kraju lanca [5], [8], [12]. Domena koja veže ATP je globularna proteinska jedinica koja se sastoji od nekoliko snažno očuvanih motiva proteinskih sekvenci, od kojih je motiv Leu-Ser-Gly-Gly-Gln specifičan isključivo za obitelj proteina ABC i prema

tome ih se može razlikovati od ostalih transportera koji vežu ATP. Transmembranska domena je sastavljena od šest α zavojnica koje premošćuju membranu i unutar nje se odvija prepoznavanje i vezanje supstrata [4], [9], [12].

Mehanizam prijenosa supstrata transportera ABC se intenzivno proučava eksperimentalnim i kompjuterskim metodama, ali kompletan ciklus još uvijek nije potpuno definiran. Do sada se zna da se tijekom ciklusa transporta izmjenjuju dva osnovna stanja transportera (slika 1): stanje u kojemu su domene koje vežu ATP razdvojene i protein je otvoren prema unutrašnjosti stanice (otvoreni dimer), te stanje u kojemu su te domene u formi dimera i protein je otvoren prema izvanstaničnom prostoru (zatvoreni dimer). Dok je otvoren prema unutrašnjosti, transporter ABC može vezati supstrate u transmembranskoj šupljini, a vezanje ATP-a na citoplazmatsku domenu koje uzrokuje otvaranje transportera prema izvanstaničnom prostoru smanjuje afinitet za vezanje supstrata i on se oslobađa izvan stanice (1. i 2. korak). Hidroliza ATP-a vraća transporter u početno stanje, kada je otvoren prema unutrašnjosti stanice (3. i 4. korak). Transporter sadrži dva aktivna mjesta za vezanje ATP-a, ali samo je jedna molekula hidrolizirana u datom trenutku [4], [13]–[18].



Slika 1. Ciklus transporta supstrata pomoću transportera ABC. Mjesto vezanja supstrata označeno je ružičastom i plavom bojom na transmembranskoj domeni (narančasti i žuti cilindri). Prilagođeno prema Higgins i Linton, 2004. [15]

Zanimljiva je činjenica da kod prokariota transporteri ABC gotovo uvijek služe kao pumpe za unos, dok je njihova uloga u eukariotima prenošenje tvari iz citoplazme ili stanične membrane izvan iz stanice. Transporteri ABC reguliraju stanične razine hormona, lipida, iona, ksenobiotika

i drugih malih molekula tako što ih prenose preko stanične membrane i s obzirom na to imaju brojne fiziološke uloge u organizmu. Smješteni su i u membranama organela poput mitohondrija, lizosoma, endoplazmatske mrežice i Golgijevog aparata [8], [9], [19]. Neki od njih su važni ionski kanali, poput SUR1 i SUR2 (ABCC8 i ABCC9), koji reguliraju razinu kalija, ili CFTR (ABCC7, od eng. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), koji je kloridni kanal. Heterodimer transportera ABCB2 i ABCB3 (TAP, od eng. *transporter associated with antigen processing*) sudjeluje u stečenoj imunosti tako što vrši prijenos antigenskih peptida [20]. Raspodjela transportera po tkivima odgovara njihovoj zaštitnoj ulozi u organizmu, te su stoga snažno eksprimirani na važnim farmakološkim barijerama, kao što su membrane crijevnih stanica, stanice jetre, bubrega, krvno moždana barijera i drugo (tablica 1) [21].

Tablica 1. Ekspresija i uloga različitih transportera ABC u tkivima, prilagođeno iz Glavinis i suradnici, 2008. [21]

Potporodica	Član	Mjesto ekspresije	Uloga		
ABCA	ABCA1	Sveprisutan	Prijenos kolesterola i lipida Otpornost na lijekove		
	ABCA2	Mozak			
	ABCA3	Pluća			
	ABCA4	Štapićasti fotoreceptori			
	ABCA5	Mišići, srce, testisi			
	ABCA6	Jetra			
	ABCA7	Gušterača, timus			
	ABCA8	Jajnici			
	ABCA9	Srce			
	ABCA10	Mišići, srce			
	ABCA11	Želudac			
	ABCA12	Nisko u svim tkivima			
ABCB	ABCB1	Crijeva, bubreg, jetra, testisi, mozak	Otpornost na lijekove Transport peptida u ER Transport peptida u ER Transport fosfatidilkolina Transport željeza i hema Transport žučnih soli		
	ABCB2	Sveprisutan			
	ABCB3	Sveprisutan			
	ABCB4	Jetra			
	ABCB5	Sveprisutan			
	ABCB6-8	Sveprisutan			
	ABCB9	Srce, mozak			
	ABCB10	Sveprisutan			
	ABCB11	Jetra			
	ABCC	ABCC1		Sveprisutan	Otpornost na lijekove Transport organskih aniona Otpornost na lijekove Transport nukleozida Transport nukleozida Transport kloridnih iona Transport kloridnih iona Transport kloridnih iona
		ABCC2		Jetra	
ABCC3		Pluća, tanko crijevo, jetra			
ABCC4		Prostata			
ABCC5		Sveprisutan			
ABCC6		Bubreg, jetra			
ABCC7		Egzokrine žlijezde			
ABCC8		Gušterača			
ABCC9		Srce, mišići			
ABCC10-12		Nisko u svim tkivima			
ABCD	ABCD1-4	Peroksisomi	Regulacija transporta masnih kiselina vrlo dugog lanca		
ABCE	ABCE1	Jajnici, testisi, slezena	Imunološki odgovor		
ABCF	ABCF1-3	Sveprisutan			
ABCG	ABCG1	Sveprisutan	Transport kolesterola Otpornost na lijekove Transport sterola Transport sterola		
	ABCG2	Posteljica, crijeva, mozak			
	ABCG4	Jetra			
	ABCG5	Jetra, crijeva			
	ABCG8	Jetra, crijeva			

Mutacije u genima koji kodiraju za neke od transportera rezultiraju razvojem određenih bolesti, poput cistične fibroze (ABCC7, odnosno kloridni ionski transporter CFTR), nasljedne bolesti vezivnog tkiva „pseudoksantoma elasticum“ (ABCC6), Stargardtove degeneracije makule (ABCA4), poremećaja metabolizma lipida kao što su Tangierska bolest (ABCA1) i sitosterolemija (ABCG5, ABCG8) te Harlequin ihtioze (ABCA12) [9].

Transporteri su mjesta međusobne interakcije lijekova ili lijekova i endogenih supstrata što značajno utječe na njihovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju (ADME), kao i na toksičnost. Stoga transporteri ABC imaju važnu ulogu u farmakokinetici lijekova. Na mišjem modelu koji nema transporter ABCB1 pokazano je da je ukupna izmjerena izloženost kemoterapeutiku paklitakselu, koji je supstrat ABCB1, šest puta veća nego u divljem tipu miša s aktivnim transporterom [22]. Spojevi koji inhibiraju transportere povećavaju biodostupnost i smanjuju ekskreciju drugih lijekova koji su uneseni u isto vrijeme, dok spojevi koji induciraju aktivnost transportera smanjuju apsorpciju drugih lijekova u crijevima i povećavaju njihovu ekskreciju [21], [23]–[25]. Na taj način transporteri ABC mogu utjecati na toksičnost lijekova, posebno onih koji uslijed inhibicije transportera mogu slobodno prijeći krvno-moždanu barijeru i nakupljati se u mozgu. Transporteri ABC imaju važnu ulogu i u homeostazi svojih endogenih supstrata te stoga farmakološka inhibicija njihovog transporta može uzrokovati toksičnost i druge nuspojave [21]. Zbog svoje važnosti u farmakokinetici lijekova, testovi interakcije s transporterom ABCB1 su uključeni u proces razvoja lijekova, a rade se na staničnim modelima *in vitro* ili mišjim modelima *in vivo* [23], [26].

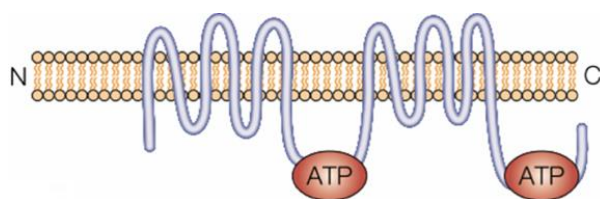
Pored njihove fiziološke uloge u organizmu, za članove nekih potporodica transportera ABC pokazano je da su prekomjerno eksprimirani u staničnim linijama tumora koje su uzgajane pod selekcijskim pritiskom određenog kemoterapeutika [5], [10], [27] i koje su razvile višestruku otpornost na lijekove. Glavni mehanizam takve otpornosti je prekomjerna ekspresija nekog od transportera ABC. Stanice tumora pokazuju heterogenost po pitanju ekspresije transportera ABC te su neprestano izložene selekciji za pojačano preživljenje i proliferaciju. S obzirom na primarnu zaštitnu ulogu transportera ABC, one stanice koje ga eksprimiraju u većoj mjeri dobivaju selektivnu prednost tijekom prilagodbe na nove uvjete, kao što je primjerice tretman kemoterapeutcima koji su mahom supstrati transportera ABC. Citotoksični agensi stoga mogu eliminirati većinu tumorske mase, ali otporne stanice koje prežive mogu dati klonove koji su također otporni na ponavljajuće cikluse kemoterapije [8].

Iako je pokazano da je najmanje 12 transportera uključeno u staničnu otpornost na terapiju, od njih su P-gp (ABCB1), MRP-1 (od eng. *Multidrug resistance associated - protein 1*, ABCC1) i BCRP (od eng. *Breast cancer resistance protein*, ABCG2) prvi otkriveni u tom kontekstu, najviše se povezuju sa fenomenom višestruke otpornosti na lijekove i klinički su najrelevantniji [5], [8], [19], [28], [29].

1.3. Transporter ABCB1

Transporter ABCB1 (P-glikoprotein, MDR1) je prototip transportera ABC, prvi otkriveni, najproučavaniji i medicinski vrlo važan [8]. Član je potporodice ABCB, koja se kod čovjeka sastoji od 11 transportera i najraznovrsnija je. U njoj se nalaze potpuni transporteri i oni koji trebaju stvoriti dimere kako bi bili funkcionalni, transmembranski transporteri koji prenose lijekove, ionski transporteri i specifični transporteri za prijenos peptida koji sudjeluju u prezentaciji antigena i imunom odgovoru [21]. Gen *MDR1* je smješten na duljem kraju kromosoma 7, na poziciji 21, i sastoji se od 28 egzona koji kodiraju glikoprotein ABCB1 dug 1280 aminokiselina, molekulske mase 170 kDa. Unutar gena *MDR1* nađeno je 15 različitih polimorfizama jednog nukleotida, koji ne utječe na lokalizaciju, razinu ekspresije ili mjerljivu promjenu funkcije transporta glikoproteina ABCB1 [11], [30]–[32].

Kristalna struktura ljudskog transportera ABCB1 do danas još nije riješena, a struktura mišjeg ortologa ima 87% homologije s ljudskim [33]. Izniman napredak metode krioelektronske mikroskopije danas omogućava uvid u strukturu membranskih proteina bez potrebe za kristalom, a s razlučivošću kakvu ima i rendgenska kristalografija, te se stoga i struktura ljudskog transportera ABCB1 sve detaljnije opisuje [34]–[36]. Transporter ABCB1 se sastoji od dvije polovice koje imaju pseudo-simetriju, a svaka je sastavljena od unutarstanične homologne domene koja sadrži dva odvojena vezna mjesta na koja se vežu i hidroliziraju molekule ATP-a, te homologne transmembranske domene koja sadrži šest α zavojnica i tvori središnju globularnu šupljinu u kojoj se nalaze najmanje tri mjesta za vezanje supstrata i modulatora (slika 2) [7], [37], [38]. Sve se četiri domene mogu nalaziti na jednom polipeptidnom lancu ili na dva odvojena lanca. Domene su povezane jedna s drugom takozvanom vezujućom regijom koja ima važnu ulogu u koordinaciji hidrolize ATP-a i prijenosa supstrata, dok su dvije polovice transportera međusobno povezane citoplazmatskom vezujućom regijom koja je jako nabijena [4].



Slika 2. Membranska topologija transportera ABCB1 i raspored transmembranskih (ljubičaste krivulje) i unutarstaničnih (crveni ovalni oblici) domena, preuzeto iz Gottesman, Fojo i Bates, 2002.

[7]

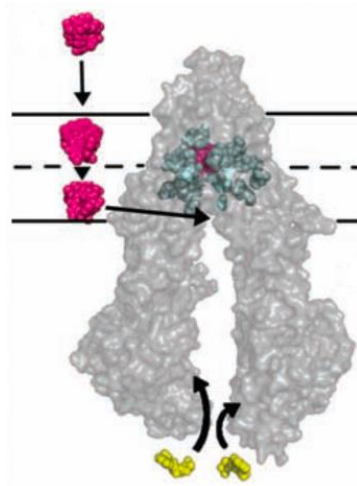
Transporter ABCB1 prepoznaje široki spektar supstrata koji pripadaju vrlo različitim kemijskim skupinama. To su većinom hidrofobne, amfipatske molekule koje mogu biti neutralne ili pozitivno nabijene, a uključuju klinički i toksikološki relevantne spojeve, kao što su protutumorski lijekovi, inhibitori proteaza virusa humane imunodeficijencije (HIV), antibiotici, antidepresivi, antiepileptici, analgetici i drugi (tablica 2) [39], [40].

Tablica 2. Supstrati transportera ABCB1, prilagođeno prema Ambudkar i sur., 1999 i Litman i sur., 2001. [39], [40]

Supstrati transportera ABCB1	
<p>Protutumorski lijekovi Vinka alkaloidi (vinkristin, vinblastin) Doksorubicin Daunorubicin Epirubicin Paklitaksel Aktinomycin D Topotekan</p> <p>Citotoksični agensi Kolhicin Etidij bromid Puomicin</p>	<p>Ciklički i linearni peptidi Gramicidin D Valinomicin</p> <p>Inhibitori HIV proteaza Ritonavir Indinavir Sakinavir</p> <p>Ostali spojevi Hoechst 33342 Rodamin 123 Kalcein-AM (acetoksimetil ester)</p>

Specifičan mehanizam kojim transporter ABCB1 prepoznaje široki spektar strukturno i funkcionalno nepovezanih supstrata za prijenos još uvijek nije dovoljno objašnjen. Istraživanja su do sada pokazala da se unutar središnje globularne šupljine nalaze najmanje tri kooperativna mjesta za vezanje supstrata i modulatora. Shapiro i Ling [41] su prva dva otkrivena vezna mjesta nazvali „H“, po tome što ima veći afinitet za vezanje supstrata Hoechst 33342 (H 33342),

odnosno „R“ zbog afiniteta prema supstratu rodaminu 123. Vezna mjesta stupaju u interakciju na način da svako od njih može stimulirati transport u suprotnom mjestu, dok si dva H mjesta ili dva R mjesta mogu međusobno inhibirati transport [38], [42]. Dosadašnja istraživanja ukazuju i na postojanje dodatnog veznog mjesta za modulatore, nazvanog „M“- vezno mjesto [33]. Pojedini supstrat/modulator ima afinitet za određeno vezno mjesto, a to se može objasniti kemijskom strukturom supstrata na temelju koje ostvaruje kontakt s različitim ostacima aminokiselina koje su specifične unutar svakog veznog mjesta [42]. Supstrati slobodno difundiraju u stanicu, a ABCB1 ih prepoznaje prije nego dođu do citoplazme, na razini stanične membrane, i izbacuje ih u izvanstanični prostor (slika 3) [8], [33], [43].



Slika 3. Model vezanja supstrata unutar transportera ABCB1. Crveno je označen supstrat kojeg transporter prepoznaje na razini stanične membrane, plavo su označeni aminokiselinski ostaci u veznim mjestima unutar središnje globularne šupljine a žuto su označene molekule ATP-a koje se vežu na unutarstanične domene. Prilagođeno prema Aller i sur., 2009. [33]

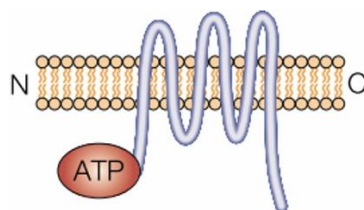
ABCB1 pokazuje visoku ekspresiju u apikalnim membranama epitelnih stanica crijevnih resica, membranama epitelnih stanica proksimalnog tubula bubrega, membranama hepatocita, te u kapilarnim endotelnim stanicama testisa i mozga. Na taj način ograničava apsorpciju ksenobiotika u gastrointestinalnom traktu, koji predstavlja prvu liniju obrane od lijekova i toksina unesenih oralno, te potiče eliminaciju ksenobiotika u jetri, bubrezima i crijevima, i regulira njihov unos u stanice i tkiva. Posebno osjetljivi organi poput mozga i testisa su zaštićeni krvno-moždanom, odnosno krvno-tkivnom barijerom, gdje ABCB1 ograničava ulaz spojevima koji bi inače prošli kroz ove barijere pasivnom difuzijom. Ekspresija ABCB1 se može detektirati i u nadbubrežnoj žlijezdi, maternici tijekom trudnoće, trofoblastima posteljice

i krvotvornim matičnim stanicama, gdje također ima ulogu zaštite od toksičnih spojeva i metabolita [8], [21].

1.4. Transporter ABCG2

Transporter ABCG2 je zadnji otkriven iz obitelji transportera ABC, a prvi puta je otkriven i identificiran u staničnoj liniji tumora dojke MCF-7 otpornoj na kemoterapeutik adriamicin (doksorubicin) u prisutnosti verapamila, poznatog inhibitora transportera ABCB1. Stanična linija MCF-7/AdrVp je pokazivala višestruku otpornost na još neke kemoterapeutike, kao što su daunorubicin i mitoksantron, ali je pokazivala osjetljivost na neke od supstrata karakteristične za transportere ABCB1 i ABCC1. To je značilo da je novi, do tada nepoznati, transporter zaslužan za fenotip višestruke otpornosti ove stanične linije. Nazvan je BCRP (od eng. *breast cancer resistance protein*) jer je izoliran iz tumorske linije dojke otporne na određene lijekove. Unosom tog proteina u osjetljivu roditeljsku staničnu liniju MCF-7 i njegovom pojačanom ekspresijom postigao se fenotip višestruke otpornosti [28], [44], [45]. Naziva se još i MXR (od eng. *mitoxantrone resistance protein*) zbog otpornosti stanica na mitoksantron [46] i ABCP (od eng. *placental ABC protein*), jer je kloniran i iz posteljice [47]. ABCG2 pripada potporodici ABCG, koja sadrži najmanje pet transportera od kojih su neki uključeni u prijenos kolesterola, fosfolipida i sterola, dok je fiziološka funkcija za neke još uvijek nepoznata. Članovi ove potporodice imaju jedinstveni raspored domena, pri čemu je domena koja veže ATP smještena na N-kraju polipeptidnog lanca, obrnuto od ostalih potporodica transportera ABC [48], [49].

Transporter ABCG2 se sastoji od jedne unutarstanične domene koja veže i hidrolizira ATP i jedne transmembranske domene koja se sastoji od šest α zavojnica i sudjeluje u prepoznavanju i vezanju supstrata i modulatora. Obje domene se nalaze na jednom polipeptidnom lancu i čine „polu-transporter“, koji stvara homodimer kako bi bio potpuno funkcionalan (slika 4) [7], [8], [49], [50].



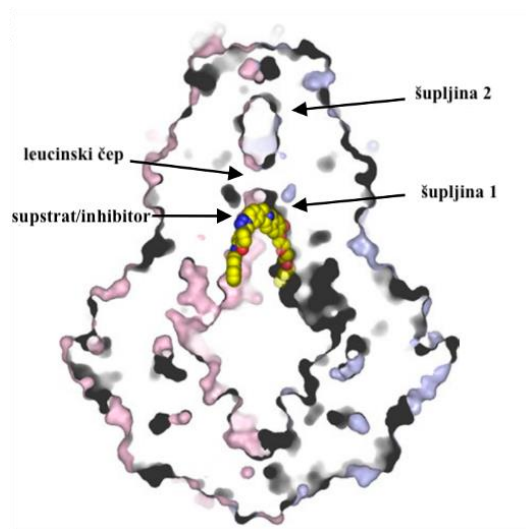
Slika 4. Membranska topologija transportera ABCG2 i raspored transmembranskih (ljubičaste krivulje) i unutarstaničnih (crveni ovalni oblici) domena, preuzeto iz Gottesman, Fojo i Bates, 2002 [7].

Gen *BCRP* je kod čovjeka smješten na duljem kraku kromosoma 4, na poziciji 22, i dugačak je 66 kb. Sastoji se od 16 egzona i kodira za membranski glikoprotein ABCG2 koji je sastavljen od 655 aminokiselina i ima molekularnu masu 72 kDa [19], [51]. Unutar gena *BCRP* pronađeno je nekoliko tisuća polimorfizama jednog nukleotida, a preko 450 njih rezultira promjenom jedne aminokiseline u proteinu i promjenom okvira čitanja gena. Polimorfizmi koji su se do sada najviše proučavali i koji utječu na funkciju transportera su Q141K, R482G ili R482T i M71V. Polimorfizam jednog nukleotida koji rezultira zamjenom aminokiseline lizin u aminokiselinu glutamin na poziciji 141 (Q141K) povezuje se s hiperuricemijom i gihtom, kao posljedica povećane koncentracije urata u krvi. Rezultira nepravilnim smatanjem proteina ABCG2, njegovom razgradnjom i smanjenom ekspresijom [52] [53]. Zamjena aminokiseline arginin sa glicinom ili treoninom na poziciji 482 (R482G ili R482T) se često može naći u tumorskim stanicama koje su bile pod selekcijskim pritiskom nekog lijeka i utječe na prijenos supstrata. Divlji tip transportera s aminokiselinom arginin prenosi kemoterapeutik mitoksantron, dok dva mutirana oblika uz mitoksantron prenose i kemoterapeutik daunorubicin i fluorescentnu boju rodamin 123 [54], [55]. Polimorfizam u kojemu je aminokiselina metionin zamijenjena valinom na poziciji 71 (M71V) rezultira smanjenom ekspresijom transportera ABCG2 i otežanim transportom mokraćne kiseline, što može dovesti do razvoja gihta [56]. Transporter ABCG2 prenosi široki spektar strukturalno različitih supstrata koji uključuje velike hidrofobne molekule koje mogu biti pozitivno ili negativno nabijene, protumorske lijekove, hormonske metabolite, inhibitore tirozin kinaza, antibiotike, flavonoide, soli mokraćne kiseline, metabolit klorofila feoforbid a, fluorescente boje poput H 33342 i BODIPY-prazosin i druge (tablica 3) [8], [19], [57].

Tablica 3. Primjeri nekih od poznatih supstrata transportera ABCG2, prilagođeno prema Robey i sur., 2009 i Polgar, Robey i Bates, 2008 [19], [57]. Zvezdicom su označeni supstrati čiji prijenos je moguć u mutiranom obliku transportera koji ima polimorfizam jednog nukleotida na poziciji 482.

Supstrati transportera ABCG2		
Protutumorski lijekovi	Fluorescentne boje	Blokatori kalcijevih kanala
Mitoksantron	Rodamin 123*	Azidopin
Daunorubicin*	BODIPY-prazosin	Dipiridamol
Doksorubicin*	Lysotracker Green*	Nitrendipen
Epirubicin*	Hoechst 33342	
Flavopiridol		Flavonoidi
Etopozid*	Antibiotici	Genistein
9-aminokamptotecin	Ciprofloksacin	Kvercetin
Topotekan	Ofloksacin	
Irinotekan	Norfloksacin	Karcinogeni spojevi
SN-38	Eritromicin	Aflatoksin B1
Metotreksat*	Nitrofurantoin	
Imatinib		Ostali spojevi
Gefitinib	Porfirini	Riboflavin
Nilotinib	Feoforbid A	Vitamin K3
	Protoporfirin IX	Folna kiselina
	Fitoporfirin	d- Luciferin
Konjugati sulfata		
Estron-3-sulfat		

Kristalna struktura transportera ABCG2 nije dostupna, te su se za uvid u strukturu proteina koristili računalni modeli temeljeni na kristalnoj strukturi heterodimera ABCG5/ABCG8 [58], koji upravlja sekrecijom neutralnih sterola u jetri i crijevima [59] i elektronska mikroskopija koja ima nisku rezoluciju. Detaljna struktura transportera ABCG2 snažne rezolucije je dobivena tek 2017. godine pomoću metode krio-elektronske mikroskopije [52], čime je omogućen uvid u mjesto vezanja supstrata i modulatora. Transmembranske zavojnice u membrani tvore „šupljinu 1“, u koju se vežu supstrati i inhibitori, a optimalna je za vezanje relativno ravnih, hidrofobnih i policikličkih molekula. „Šupljina 2“, koja se nalazi između izvanstaničnih petlji, odvojena je od šupljine 1 leucinskim čepom i ne sudjeluje u vezanju supstrata i inhibitora. Pretpostavlja se da ABCG2 prepoznaje supstrate na razini stanične membrane [60] te se oni vežu u šupljinu 1, prije nego odu u šupljinu 2 te zatim izvan stanice, dok se inhibitori također vežu u šupljinu 1, ali ostaju u njoj čvrsto vezani (slika 5). S obzirom da se vežu na isto mjesto, inhibitori najčešće djeluju kompetitivno sa supstratima jer onemogućuju njihovo vezanje i transport [52], [61].



Slika 5. Model vezanja supstrata unutar transportera ABCG2. Prilagođeno prema Jackson i sur., 2018 [61].

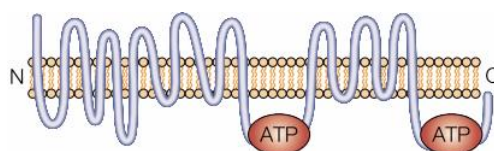
Pokazano je da transporter ABCG2 za pravilnu funkciju treba veliki udio kolesterola u membrani i da nedostatak kolesterola značajno smanjuje njegovu aktivnost, dok se taj učinak nije vidio kod mutiranih formi transportera R482G i R482T niti kod transportera ABCB1 [62] [63].

Fiziološka uloga transportera ABCG2 je zaštita organizma od ksenobiotika. Pokazuje značajnu ekspresiju u korionskom epitelu posteljice, gdje pomaže u zaštiti fetusa od lijekova i toksina iz okoliša, u kapilarama krvno-moždane barijere, u mliječnim žlijezdama, testisima, tankom i debelom crijevu, bubrezima, jetri i žuči te u krvotvornim matičnim stanicama. Matične stanice iz koštane srži, ali i mišića i drugih tkiva mogu se identificirati po tome što imaju sposobnost izbacivanja fluorescentne boje nakon bojanja s H 33342 i čine izdvojenu populaciju stanica koja se može vidjeti metodom protočne citometrije [64]. Pokazano je da je za to odgovoran transporter ABCG2 [65], [66], koji ima zaštitinu ulogu u matičnim stanicama, primjerice uslijed hipoksije i izloženosti toksičnim spojevima [8], [19], [67]. Stoga je ABCG2 dobar marker za identifikaciju i izolaciju matičnih stanica [68].

1.5. Transporter ABCC1

Transporter ABCC1 je prvi puta otkriven u staničnoj liniji tumora malih stanica pluća čovjeka (NCI-H69), koja je stekla otpornost na doksorubicin, nakon opetovanog izlaganja stanica tom kemoterapeutiku [69]. Stanična linija je razvila višestruku otpornost na razne druge lijekove te nije pokazivala ekspresiju transportera ABCB1 koji je otkriven prije toga i bio je poznati uzrok višestruke otpornosti stanica u kulturi. Dokazano je da je novi glikoprotein, nazvan MRP-1, zaslužan za ovaj fenomen i da pripada obitelji transportera ABC kao prvi otkriveni iz potporodice ABCC [70], [71]. Ostali članovi potporodice ABCC su ABCC2-6 te 10-12, zajedno sa kloridnim ionskim kanalom ABCC7 (CFTR) te ABCC8 i 9, koji su regulatori kalijevih kanala [72].

Svojom strukturom pripada skupini „dugih“ proteina ABCC, koji uz tipičnu građu transportera ABC, sa dvije transmembranske domene i dvije domene koje vežu ATP, imaju dodatnu transmembransku domenu na N-kraju polipeptidnog lanca, koja u topologiji ABCC1 sadrži pet transmembranskih zavojnica (slika 6) [7], [71].



Slika 6. Membranska topologija transportera ABCC1 i raspored transmembranskih (ljubičaste krivulje) i unutarstaničnih (crveni ovalni oblici) domena, preuzeto iz Gottesman, Fojo i Bates, 2002 [7].

Značajna ekspresija transportera ABCC1 u organizmu nađena je u plućima, testisima, bubregu, mišićima uključujući i srčani mišić te u posteljici i krvno-moždanoj barijeri, a služi kao zaštita organizma od ksenobiotika i štetnih produkata metabolizma.

Supstrati ovog transportera su protutumorski lijekovi, neki antibiotici, medijatori upale poput citokina leukotriena, konjugirani organski anioni, folati, peptidi poput glutationa, glukuronidni i sulfatni konjugati endo- i ksenobiotika, fluorescentne boje i drugi spojevi [71], [73].

1.6. Povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na terapiju

Transporteri ABC su prisutni, osim u zdravom tkivu, i u mnogim tumorima, gdje pojačana ekspresija ovih proteina može biti uzrok višestruke otpornosti na lijekove zbog pojačanog izbacivanja kemoterapeutika izvan stanice, što snižava njegovu koncentraciju i smanjuje učinkovitost. Višestruka otpornost na terapiju je otpornost tumorskih stanica na kemoterapijske lijekove koji imaju različite strukture i različite mehanizme djelovanja [6], [74].

Primjerice, pojačanu ekspresiju transportera ABCB1 nalazimo u karcinomima koji su se razvili od epitelnog tkiva u kojemu je i prije ekspresija ABCB1 bila visoka, kao što su karcinomi bubrega, jetre i debelog crijeva, te u tumorima u kojima je u početku ekspresija ABCB1 bila niska, a nakon kemoterapije i relapsa bolesti tumor pokazuje visoku ekspresiju ABCB1, poput leukemija, limfoma i multiplog mijeloma. Ekspresija transportera ABCB1 može se naći i u tumorima poput kronične mijeloične leukemije i neuroblastoma, kod kojih ovaj transporter ima ulogu u samom razvoju tumora [9], [11], [75].

Transporter ABCG2 ima važnu ulogu u otpornosti na terapiju kod hematoloških malignih oboljenja, a neki od lijekova za liječenje ovih bolesti su njegovi supstrati. Visoka ekspresija ABCG2 je pokazana u nezrelim bijelim krvnim stanicama (blastima) kod pacijenata s akutnom i kroničnom mijeloičnom leukemijom, kod kojih postoji i veća vjerojatnost slabijeg odgovora na kemoterapiju [76]–[79]. Ekspresija transportera ABCG2 također je detektirana u tumoru dojke, tumorima malih i nemalih stanica pluća, tumorima gušterače, debelog crijeva, želuca, tumorima mozga i drugim [79].

Uz brojne fiziološke uloge u organizmu, transporter ABCC1 također ima ulogu u kliničkoj otpornosti na terapiju. Povećana ekspresija ovog transportera nađena je u brojnim solidnim tumorima poput tumora malih i nemalih stanica pluća, gdje je značajan marker lošeg odgovora na terapiju [80], [81]. ABCC1 je negativni prognostički marker u ranom stadiju raka dojke, te ima važnu ulogu i u metastatskoj bolesti. Njegova ekspresija u tumoru prostate i neuroblastomu je također važna za prognozu tijeka bolesti [82].

Detekcija transportera u kliničkim uzorcima je kompleksna i prati ju niz poteškoća, a neke od njih su kontaminacija tumorskog tkiva zdravim, niska osjetljivost i specifičnost dostupnih metoda detekcije (RT-PCR i imunohistokemija), te poteškoće s kvantifikacijom rezultata dobivenih metodom imunohistokemije. Stoga još uvijek nije nađen uniformni sustav mjerenja zbog čega su rezultati istraživanja na kliničkim uzorcima, posebice solidnim tumorima, heterogeni [83].

Važan cilj istraživanja višestruke otpornosti tumora na terapiju u klinici je točno utvrditi

ekspresiju pojedinog transportera u tumorskom tkivu, odrediti je li funkcionalan i izmjeriti ima li njegova inhibicija efekt na odgovor tumora na terapiju.

Na temelju do sada pokazanih istraživanja *in vitro*, inhibicija aktivnosti transportera ABC koji sudjeluju u višestrukoj otpornosti tumora na terapiju trebala bi poboljšati odgovor na kemoterapiju na način da poveća nakupljanje kemoterapeutika unutar tumorskih stanica i njihovu osjetljivost, kada se inhibitor koristi u kombinaciji s određenim kemoterapeutikom. U tu svrhu do sada otkriveni te se još uvijek razvijaju brojni inhibitori transportera ABCB1, ABCC1 i ABCG2 [6], [9], [83].

1.6.1. Inhibitori transportera ABCB1

Do danas su razvijene tri generacije inhibitora transportera ABCB1 koje su klasificirane na temelju efikasnosti, toksičnosti i selektivnosti [84]. Prvoj generaciji inhibitora pripadaju spojevi od kojih su većina u kliničkoj upotrebi kao terapeutici za druge bolesti, poput verapamila (blokator kalcijevih kanala), ciklosporina A (imunosupresiv), kvinidina (antiaritmik), kvinina (antimalarik), rezerpina (antihipertenziv), tamoksifena (antiestrogen) i progesterona [85]. Imaju slabi učinak na inhibiciju ABCB1, slabu selektivnost i visoku toksičnost u dozama koje su potrebne za učinkovitu inhibiciju [86]. Druga generacija inhibitora je imala bolju učinkovitost i selektivnost prema ABCB1, kao i nisku toksičnost, ali su inhibirali određene enzime sustava citokroma P450, što značajno utječe na farmakokinetiku drugih lijekova. Inhibitori druge generacije uključuju derivate inhibitora prve generacije, a primjeri takvih agensa su valspodar (PSC833, analog ciklosporina A koji ne djeluje imunosupresivno), birikodar citrat (VX-710) i deksverapamil („R“ enantiomer verapamila) [87]. Treću generaciju inhibitora karakterizira još bolja efikasnost i selektivnost bez interakcije sa sustavom citokroma P450. Dizajnirani su uz pomoć računalne metode kvantitativne analize povezanosti strukture i funkcije (QSAR od eng. *quantitative structure–activity relationships*). Ovoj skupini pripadaju tarikvidar (XR9576), zosukvidar (LY335979), lanikvidar (R101933) i elakridar (F12091) [4], [83], [88]–[90]. Nakon otkrića transportera ABCG2 pokazalo se da tarikvidar i elakridar inhibiraju i ovaj transporter, te da nisu specifični samo za ABCB1 [9]. Iako su inhibitori treće generacije pokazivali obećavajući potencijal u testovima *in vitro* i *in vivo*, nisu pokazali značajan učinak u kliničkim ispitivanjima, što je dovelo do razvoja inhibitora četvrte generacije. Ovoj skupini pripadaju spojevi izolirani iz prirodnih izvora i njihovi derivati [85], peptidomimetici i dvojni ligandi (spojevi koji mogu uz ABCB1 inhibirati i neki drugi medijator

višestruke otpornosti) [91]. Premda su mnogi inhibitori transportera ABCB1 pokazali obećavajući potencijal u testovima *in vitro* i *in vivo*, niti jedan od njih još uvijek nije odobren za kliničku upotrebu.

Do sada je istraženo i prijavljeno mnogo spojeva različitih kemijskih struktura koji posjeduju inhibitorski potencijal prema transporteru ABCB1. Na temelju mjesta gdje se vežu, to mogu biti kompetitivni inhibitori koji se direktno vežu u šupljinu za vezanje supstrata, kao i nekompetitivni inhibitori koji se vežu izvan šupljine i moduliraju konformaciju transportera ili se vežu na mjesto vezanja ATP-a na unutarstaničnim domenama transportera. Neki spojevi mogu djelovati tako da naruše lipidni dvosloj i na taj način utječu na pravilnu lokalizaciju transportera na membrani, što je ključno za njegovu aktivnost. Određeni modulatori mogu smanjiti ekspresiju transportera tako što djeluju na različite signalne puteve [92]–[94].

Temeljem dosadašnjih istraživanja interakcije inhibitora i transportera ABCB1, jedna od glavnih karakteristika koju inhibitor treba imati kako bi kompetitivno blokirao vezanje supstrata je velik broj hidrofobnih i aromatskih kontakata koje ostvaruje unutar veznog mjesta. Hidrofobne molekule, koje mogu formirati hidrofobne i van der Waalsove interakcije u veznom mjestu, prisutnost aromatskih prstena, određena molekulska masa, s najmanje 18 atoma u strukturi, koja će omogućiti zauzimanje više od jedne regije unutar veznog mjesta u transporteru te mogućnost stvaranja vodikove veze s ostacima aminokiselina u veznom mjestu su neke od glavnih karakteristika potentnih inhibitora [95], [96].

1.6.2. Inhibitori transportera ABCG2

Prvi otkriveni inhibitor transportera ABCG2 je bio fumitremorgin C (FTC), toksin izoliran iz gljivice *Aspergillus fumigatus* [97], ali njegova upotreba *in vivo* nije bila moguća zbog neurotoksičnosti samog spoja. Među derivatima fumitremorgina, Ko143 se pokazao kao dosta snažan inhibitor ABCG2 u testovima *in vivo* u nanomolarnoj koncentraciji i nije imao sveukupan toksični učinak na miševce [98]. Inhibitor Ko143 nije specifičan za ABCG2, već inhibira, pri većim mikromolarnim koncentracijama, i transportere ABCB1 i ABCC1 [99]. Elakridar i tarikvidar, inhibitori transportera ABCB1, se uz Ko143 koriste za inhibiciju ABCG2 u bazičnim istraživanjima.

Molekularne osnove kemijske inhibicije ABCG2 do danas nisu potpuno jasne, jer je trodimenzionalna struktura proteina pokazana relativno nedavno metodom krioelektronske mikroskopije, kao i struktura proteina sa vezanim inhibitorom [52], [61]. U dosadašnjim istraživanjima su se, uz pomoć analize QSAR, predvidjele određene strukturne značajke koje

bi molekula trebala imati kako bi inhibirala ABCG2, a neke od njih su lipofilnost molekule, planarna struktura te sposobnost stvaranja vodikove veze. Pokazano je i da je prisutnost amina vezanog za ugljik heterocikličkog prstena u molekuli, kao i prisutnost fuzioniranih heterocikličkih prstena u strukturi, važna karakteristika za interakciju s transporterom ABCG2 [98], [100]. Modulatori mogu utjecati na aktivnost transportera tako da stupaju u interakciju s veznim mjestom za supstrate/modulatore u transporteru, te djeluju kao supstrati koji se jako sporo prenose i na taj način blokiraju prijenos drugih supstrata, ili se vežu na unutarstanične domene transportera i sprječavaju vezanje i hidrolizu ATP-a.

Do sada je prijavljeno mnogo različitih inhibitora ABCG2, među kojima su i inhibitori tirozinskih kinaza, protutumorski lijekovi koji imaju visoku specifičnost i selektivnost, a koriste se kao inhibitori receptora uključenih u proliferaciju tumora, poput gefitiniba [101], telatiniba [102], imatiniba [103], sunitiniba [104], sorafeniba [105] i drugih. Neki od njih su i supstrati transportera ABCG2 [106]. Još jedna skupina već postojećih lijekova koja djeluje inhibitorno na transporter ABCG2 su lijekovi protiv virusa HIV-a [107], [108]. Ostale skupine spojeva koje su pokazale inhibitorno djelovanje su flavonoidi i kromoni te njihovi derivati, rotenoidi, analozi fumitremorgina C i tarikvidara, prirodni spojevi i njihovi derivati poput nekih antibiotika, kurkuminoida i drugi [57], [98], [109], [110]. Niti jedan od inhibitora još uvijek nije u kliničkoj upotrebi, zbog toksičnosti i/ili slabog učinka *in vivo*.

U nekim slučajevima postoji potreba za kombiniranom inhibicijom više transportera. Na mišjim modelima, kod kojih je jedan ili više transportera disfunkcionalno, pokazano je da transporter ABCB1 i ABCG2 imaju sinergističko djelovanje u sprječavanju penetracije lijekova preko krvno-moždane barijere, što znači da je potrebno inhibirati oba transportera u slučajevima kada je nužno da terapija dođe do tumora ili do metastaza na mozgu [79], [111]–[113].

1.7. Tumorske matične stanice

Koncept tumorskih matičnih stanica (TMS) unutar tumora prvi je put potvrđen u akutnoj mijeloičnoj leukemiji, gdje je pokazano da je mala skupina leukemijskih stanica sposobna inicirati tumor nakon transplantacije u imunokompromitiranog miša (SCID, od eng. *severe combined immunodeficiency disease*). Stanice su identificirane na temelju specifičnih površinskih markera CD34⁺/CD38⁻, pri čemu je CD34 obično eksprimiran na maloj populaciji stanica u koštanoj srži, uključujući progenitorske stanice i multipotentne matične stanice. CD38 na CD34⁺ stanicama je važan marker koji označava usmjerenje prema mijeloidnoj lozi

stanica tijekom hematopoeze, što znači da fenotip CD34⁺/CD38⁻ označava nezrele stanice unutar koštane srži [114]–[116]. Tumorske matične stanice su nakon toga identificirane i u tumoru dojke, gdje je pokazano da je samo mali dio stanica, koje nose površinske markere adhezije CD44⁺/CD24⁻, sposoban inicirati tumor u SCID-mišu [117]. Nakon toga su TMS izolirane iz niza solidnih tumora, uključujući tumor mozga, debelog crijeva, prostate, gušterače, kao i iz melanoma i glioblastoma [116], [118].

Postanak heterogene tumorske mase se objašnjava modelom tumorskih matičnih stanica tako da samo mala populacija tumorskih stanica ima sposobnost tumorigeničnosti i samoobnavljanja te diferencira u različite tipove stanica, što čini hijerarhijsku organizaciju stanica unutar tumora [119].

Postoje dvije teorije o postanku TMS-a. Prema jednoj od njih TMS nastaju od normalnih matičnih stanica koje dobiju svojstvo stvaranja tumora nakon određene genetičke mutacije ili promjene iz okoliša, a prema drugoj teoriji one nastaju reprogramiranjem iz normalnih somatskih stanica nakon što te stanice dobiju svojstva matičnih stanica i postanu maligne uslijed genetičke ili heterotipske promjene. Primjerice, tumorske stanice dobivaju svojstva matičnih kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), proces koji se aktivira prilikom invazije tumora i metastaziranja. Pokazano je da indukcija EMT u imortaliziranim epitelnim stanicama dojke čovjeka (HMLE od eng. *human mammary epithelial cells*) dovodi do pojave mezenhimalnih svojstava, povećane ekspresije markera matičnih stanica te su stanice HMLE nakon procesa EMT sposobne stvarati mamosfere, agregate stanica sa svojstvima matičnih koje mogu inicirati nastanak tumora [116], [120], [121].

Transporter ABCG2 jedan je od markera TMS. Baš kao i matične stanice, TMS se mogu identificirati na temelju sposobnosti izbacivanja fluorescentne boje nakon bojanja s H 33342, supstratom ABCG2, a vide se kao izdvojena populacija stanica s niskom fluorescencijom pomoću metode protočne citometrije [122]. Iako je H 33342 također i supstrat transportera ABCB1, pokazano je da je izdvojena populacija stanica prisutna i u stanicama u kojima je utišan ABCB1, što potvrđuje da je ekspresija ABCG2 važna za fenotip TMS-a [65].

Prisutnost TMS-a u tumoru povezana je s lošijom prognozom tijekom bolesti, metastaziranjem, ponovnim javljanjem bolesti i povećanom otpornošću tumora na terapiju, zbog čega je ciljano uništenje TMS-a obećavajuća strategija u liječenju tumora [120]. Povećana ekspresija ABCG2 pronađena je u TMS izdvojenim iz različitih tumora, poput tumora pluća, jetre, gušterače i drugih [123]–[125]. Uz ABCG2, TMS imaju i snažnu ekspresiju transportera ABCB1, što ih sve zajedno štiti od kemoterapeutika i jedan je od mehanizama povećane otpornosti TMS-a na terapiju, te doprinosi sveukupnom razvoju višestruke otpornosti tumora na terapiju [67], [88],

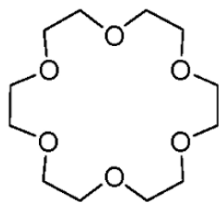
[123]. Stoga je modulacija aktivnosti transportera ABCB1 i ABCG2 obećavajuća strategija u liječenju tumora i rješavanju problema višestruke otpornosti na terapiju, kako TMS tako i ostalih stanica u tumoru.

Neuspjeh mnogih terapija protiv tumora temelji se na činjenici da lijek eliminira većinu tumorske mase, ali ne i TMS koje imaju mehanizme otpornosti, preživljavaju i sposobne su tvoriti nove tumore. Stoga je terapija lijekovima koji ciljano djeluju na TMS od velike važnosti za dugoročni učinak antitumorske terapije. Gupta i suradnici [126] su napravili opsežno pretraživanje sa 16000 prirodnih i komercijalnih kemijskih spojeva u potrazi za onima koji ciljano djeluju na TMS. Tada su prvi put otkrili da salinomycin, prirodni ionofor za kalij koji se koristi kao antibiotik u veterinarskoj medicini, pokazuje selektivnu toksičnost prema TMS, premda se ne zna mehanizam djelovanja. Nigericin, još jedan polieterski ionofor koji ima strukturu sličnu salinomicinu, također je djelovao ciljano na TMS [126].

Brojna istraživanja su pokazala da salinomycin inducira apoptozu u tumorskim stanicama čovjeka različitog podrijetla koje pokazuju otpornost na lijekove i apoptozu [127]–[129], a potvrđeno je i da ciljano djeluje na TMS kolorektalnog karcinoma čovjeka i adenokarcinoma pluća čovjeka [130], [131]. Salinomycin djeluje i kao inhibitor transportera ABCB1 [132]–[134] dok njegova interakcija s transporterom ABCG2 još nije istražena. Problem primjene salinomicina u klinici je njegova toksičnost, koja se treba ispitati u većoj kliničkoj studiji. Iz literature je, međutim, poznata mala „pilot“ studija kliničke primjene salinomicina u svrhu protutumorske terapije, gdje se primjenom salinomicina smanjilo napredovanje bolesti i metastaza, a uzrokovalo manje nuspojave od konvencionalnih kemoterapeutika [135]–[137].

1.8. Krunasti eteri

Krunasti eteri su heterociklički polieteri čija sinteza je prvi put objavljena 1967. godine [138]. To su makrociklički spojevi koji sadrže 3–20 atoma kisika u strukturi prstena, koji su razdvojeni jedan od drugoga s dva ili više atoma ugljika. Trivijalna imena krunastih etera se koriste umjesto sistematskih imena, a sastoje se na prvom mjestu od broja i tipa ugljikovodikovih prstena koji su prikvačeni za polieterski prsten krunastog etera kod onih koji ih imaju. Zatim slijedi ukupan broj atoma u polieterskom prstenu, ime skupine - „kruna“, zbog oblika molekule i sposobnosti da „okruni“ metalni ion kojeg kompleksira, te na kraju broj kisikovih atoma u prstenu. Primjer jednog takvog krunastog etera je 18-kruna-6, čija je struktura prikazana na slici 7 [139].



Slika 7. Strukturna formula 18-kruna-6 etera, preuzeto iz Kralj, Tušek-Božić i Frkanec, 2008. [139]

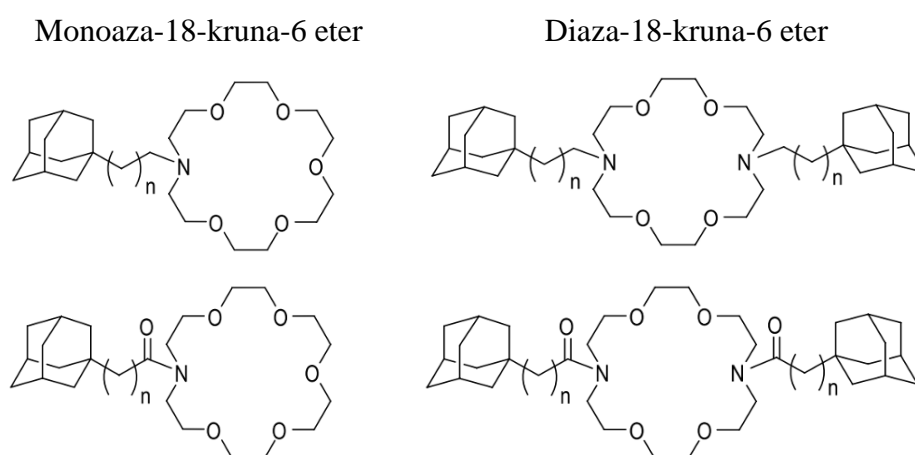
S obzirom da posjeduju hidrofobni prsten etilenskih grupa koji okružuje hidrofilnu šupljinu sastavljenu od atoma kisika etera, imaju veliki afinitet za vezanje metalnih iona (kationa) i različitih neutralnih i ionskih organskih molekula, što omogućava njihovu široku primjenu u kemiji i biokemiji [138], [139].

Kako bi se poboljšala njihova svojstva vezanja, rade se različite modifikacije krunastih etera, kao što su promjena veličine polieterskog prstena i skupine koja je za njega prikačena. Jedna od strukturnih modifikacija je i promjena atoma donora, primjerice zamjena atoma kisika u prstenu s atomima dušika, pri čemu nastaju aza-krunasti eteri. Dodatak bočnih ogranaka, posebice rigidnih policikličkih molekula poput adamantana, utječe na njihovu konformacijsku fleksibilnost i sposobnost vezanja molekula. Nadalje, lipofilni policiklički bočni ogranci povećavaju topivost krunastih etera u nepolarnoj sredini i poboljšavaju transport iona [140]–[142]. Zbog sposobnosti vezanja različitih kationa služe kao model prirodnih ionofora za proučavanje procesa prijenosa iona, pogotovo kalijevih, natrijevih i kalcijevih, preko stanične membrane [139], [143], [144].

Krunasti eteri imaju karakteristike vrlo slične prirodnim ionoforima poput valinomicina, gramicidina i salinomicina, koji djeluju na način da narušavaju protok iona kroz membranu a time i ionski gradijent, što dovodi do fiziološkog i osmotskog stresa te na taj način imaju izraženu biološku aktivnost. Do sada je sintetizirano mnogo različitih krunastih etera koji su pokazali protumikrobnu, protuparazitsku i protufungalnu aktivnost [139], [145], [146].

Brojna istraživanja potvrđuju i protutumorsku aktivnost krunastih etera, među njima i derivata 18-kruna-6 etera koji se najviše proučavaju [147]–[150]. Poznato je da između tumorskih i netumorskih stanica postoji razlika u membranskom potencijalu i koncentraciji kalijevih i drugih iona [151], [152]. Jedan od načina na koji krunasti eteri i njihovi derivati mogu djelovati na tumorske stanice je da mijenjaju koncentraciju kalijevih iona djelujući kao membranski ionofori [139]. Također, krunasti eteri mogu biti dizajnirani kao nosači konvencionalnih kemoterapeutika, primjerice 5-fluorouracila, što može optimizirati oralnu apsorpciju lijeka i smanjiti toksične nuspojave [153].

S obzirom na interakciju nekih prirodnih ionofora, poput salinomicina, s transporterom ABCB1, istražena je i pokazana inhibitorna aktivnost nekih krunastih etera spram ABCB1 [154]. Guberović i suradnici [96] su ispitali interakciju 16 mono- i diaza-18-kruna-6 etera supstituiranih adamantanom, za koje je prethodno već pokazana protutumorska aktivnost na različitim staničnim linijama tumora čovjeka [140], [141], [149], s transporterom ABCB1. Dokazali su inhibitorna svojstva nekoliko diaza-18-kruna-6 etera te pokazali da njihova aktivnost ovisi o lipofilnosti molekule i o vrsti kemijske veze (aminska ili amidna) u poveznici između polieterskog prstena i bočnog ogranka adamantana (slika 8).



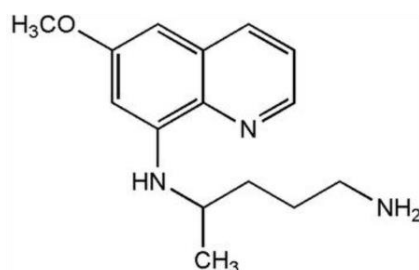
Slika 8. Strukturna formula mono- i diaza-18-kruna-6 etera supstituiranih adamantanskim bočnim ograncima. „n“ označava broj ugljikovih atoma u poveznici između polieterskog prstena i bočnog ogranka adamantana i može biti 0-3. Prilagođeno iz Guberović i sur., 2018, Mlinarić-Majerski i Šumanovac, 2002. i Šumanovac, Mlinarić-Majerski i Bertoša 2012. [96], [140], [141]

Testirani spojevi su povećali osjetljivost tumorske stanične linije s prekomjernom ekspresijom ABCB1 na kemoterapeutik paklitaksel [96], što je obećavajući rezultat za dizajn novih spojeva s još boljim inhibitornim svojstvima u borbi s višestrukom otpornošću tumora na terapiju. Interakcija krunastih etera i njihovih derivata s transporterom ABCG2 do sada još nije istražena.

1.9. Derivati antimalarika primakina

Infekcije parazitima su i dalje jedan od vodećih uzroka smrti u zemljama trećega svijeta poput zemalja Afrike, istočne Azije i indijskog potkontinenta. Jedna od najopasnijih tropskih bolesti je malarija, čiji je uzročnik jednostanični eukariot, parazit iz roda *Plasmodium*, koji se na čovjeka prenosi ubodom ženke zaraženog komarca iz roda *Anopheles*. Od pet vrsta parazita koji uzrokuju bolest kod čovjeka, *Plasmodium falciparum* i *Plasmodium vivax* su odgovorni za više od 95% slučajeva malarije u svijetu. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2021. godine procijenjen je 241 milijun slučajeva malarije u 85 zemalja [155].

Lijekovi protiv malarije (antimalarici) koji sadrže kinolin u svojoj strukturi čine većinu lijekova za liječenje ove bolesti. Prvi kinolinski antimalarici su bili prirodni alkaloidi poput kinina, izoliranog iz kore drveta kininovca. Pokušaji pripreme sintetskih antimalarika su počeli s metilenskim modrilom, nakon što je otkriveno da ono ima određenu antimalarijsku aktivnost. Jedan od prvih sintetiziranih antimalarika iz skupine 8-aminokinolina bio je pamakin ali je zbog svoje toksičnosti zamijenjen analogom primakinom, koji je po svojoj strukturi također 8-aminokinolin i koji je pokazivao manju toksičnost i visoku učinkovitost (slika 9) [156]–[158].



Slika 9. Strukturna formula antimalarika primakina, preuzeto s

<https://quod.lib.umich.edu/m/medchem1ic?page=index>.

Primakin i njegov derivat tafenokin, koji je nedavno registriran, jedini su antimalarici koji imaju učinak na dormantne jetrene stadije *P. vivax* i *P. ovale* te preveniraju njihov relaps [159]. Primakin se koristi za liječenje raznih oblika malarije i djelotvoran je protiv svih stadija parazita izvan eritrocita. Uvijek se daje u kombinaciji s drugim antimalarikom koji djeluje protiv eritrocitnih stadija parazita. Koristi se i kao gametocitocid kako bi spriječio transmisiju infekcije iz domaćina čovjeka u komarce i tako zaustavio ciklus širenja bolesti [157], [160]. Primakin se u jetri pretvara u aktivni kinonski metabolit, a predloženi mehanizam

antimalarijske aktivnosti je kroz akumulaciju medijatora oksidativnog stresa poput vodikovog peroksida što dovodi do oksidacije i oštećenja proteina [161].

Do kraja Drugog svjetskog rata, uspješna strategija u borbi protiv malarije uključivala je uporabu primakina i klorokina, još jednog sintetskog antimalarika koji je po strukturi 4-aminokinolin i koji je djelotvoran protiv eritrocitnih stadija parazita te učinkovit protiv najsmrtonosnijih sojeva *P. falciparum*. Neki od problema koji su se počeli javljati u vezi terapije su povećana hemoliza tijekom terapije primakinom u ljudi koji imaju genetičko stanje manjka enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6FD) i čiji su eritrociti pojačano osjetljivi na oksidativni stres [162], brza metabolička razgradnja do inaktivnog karboksiprimakina, što zahtjeva češće unošenje lijeka i povećava nuspojave te pojava otpornosti soja *P. falciparum* na klorokin [163]. Sve je to zahtjevalo razvoj novih, aktivnijih i sigurnijih antimalarika, iako se klorokin i primakin, uz atovakin, meflokin, artezunat i doksiciklin, i danas najčešće koriste [157], [164].

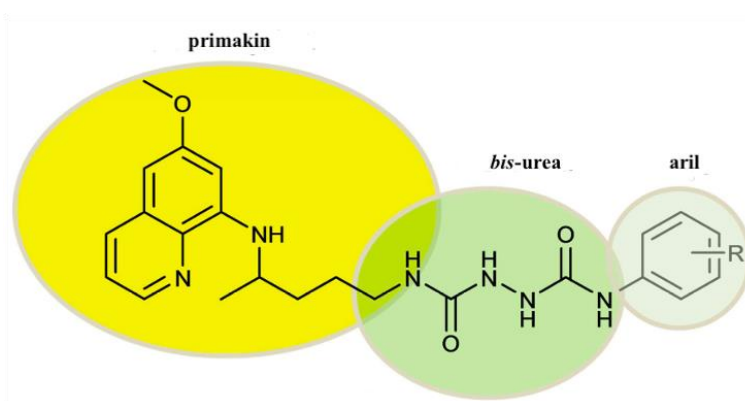
Prenamjena antimalarika u nove svrhe, primjerice u protuparazitske, protubakterijske i protuvirusne lijekove [157], [165] je primjer prenamjene već postojećih i odobrenih lijekova, što značajno smanjuje troškove razvoja lijeka i rizik od neuspjeha, te smanjuje vrijeme potrebno da lijek izađe na tržište. Prenamjena antimalarika u protutumorske lijekove je od posebnog interesa, jer mnogi antimalarici poput klorokina, hidroksiklorokina, primakina i antimalarika iz skupine artemizininina pokazuju direktnu ili adjuvantnu protutumorsku aktivnost. Mnogi od njih su u brojnim kliničkim ispitivanjima aktivnosti protiv različitih tipova tumora [156], [166]–[174].

Poznato je i da određeni antimalarici stupaju u interakciju s transporterom ABCB1 i inhibiraju ga, a neki su i njegovi supstrati [158]. Antimalarici meflokin i primakin inhibiraju ABCB1 i značajno povećavaju osjetljivost tumorskih stanica otpornih na vinblastin [164], kao i klorokin, koji povećava osjetljivost tumorskih stanica otpornih na antimitotske kemoterapeutike [175]. Značajna inhibicija transportera ABCB1 s antimalarikom kininom je također pokazana, dok antimalarik atovakon značajno inhibira aktivnost transportera ABCG2, kao i antimalarici klorokin, kinin, artemizinin, meflokin, progvanil, lumefantrin i dihidroartemizinin [176]. Antimalarik artezunat inhibira transporter ABCG2 i smanjuje njegovu ekspresiju, te povećava osjetljivost tumorskih stanica jednjaka čovjeka na kemoterapeutik mitoksantron [177].

Kako bi se poboljšala biodostupnost antimalarika, smanjila toksičnost i produljila njegova aktivnost, rade se modifikacije strukture primakina i na kinolinskom heterocikličnom prstenu i na primarnoj amino skupini. Svrha takvih modifikacija je dobiti nove, poboljšane

antimalarike ili dobiti nove spojeve s različitim biološkim aktivnostima, poput protumikrobnih, protufungalnih i protutumorskih [174], [178], [179].

Perković i suradnici [180] su pripremili seriju novih derivata primakina koji imaju *bis*-urea funkcionalnu grupu i halogenanilin u svojoj strukturi i testirali njihova antiproliferativna svojstva na osam staničnih linija tumora, kako bi ispitali koje su strukturne modifikacije potrebne za poboljšanje aktivnosti (slika 10).

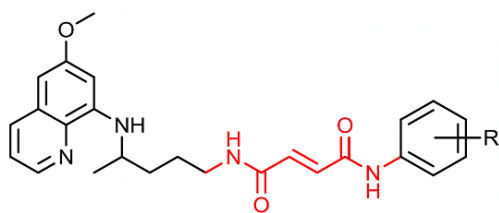


Slika 10. Kemijska struktura derivata primakina sa *bis*-urea funkcionalnom skupinom i halogenanilinom. Aril predstavlja halogen-supstituirani benzen koji vezan s *bis*-ureom preko dušika čini halogenanilin. Preuzeto iz Perković i sur., 2016. [180]

Većina pripremljenih spojeva pokazala je značajnu antiproliferativnu aktivnost u niskim mikromolarnim koncentracijama u svim ispitivanim staničnim linijama, dok je spoj s *para*-supstituiranim klorom pokazao izrazitu selektivnost u tumorskoj liniji adenokarcinoma dojke čovjeka, MCF-7.

Spojevi koji sadrže α,β -nezasićene karbonilne grupe koje se nazivaju Michaelovi akceptori, poput derivata fumarne kiseline, sposobni su za reakcije konjugirane adicije, takozvane Michaelove reakcije. To je nukleofilna adicija karbaniona ili nekog drugog nukleofila α,β -nezasićenom karbonilnom spoju. Takvi fragmenti se koriste u sintezi novih protutumorskih lijekova jer omogućuju ireverzibilno kovalentno vezanje na cisteinske ostatke specifičnog proteina i mogu regulirati selektivnost i učinkovitost lijeka od interesa [181], [182].

Rajić i suradnici [182] su dizajnirali i pripremili diamide fumarne kiseline kod kojih je jedna amidna veza postignuta s terminalnom amino skupinom primakina, a druga s halogenanilinom koji ima supstituiran klor ili trifluorometilnu skupinu u *meta* ili *para* položaju (slika 11).



Slika 11. Kemijska struktura fumardiamida primakina i halogenanilina. Crveno je označen dio koji je Michaelov akceptor. Preuzeto iz Rajić i sur., 2018 [182].

Pokazano je da su *para*-supstituirani derivati dobri polazni spojevi za razvoj antimikrobnih lijekova, dok su *meta*-supstituirani derivati pokazali selektivnost prema staničnoj liniji akutne limfoblastične leukemije i potencijalni su polazni spojevi za razvoj protutumorskih lijekova.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati mogućnost modulacije aktivnosti transportera ABCB1 i ABCG2 kako bi se postigao bolji odgovor stanica tumora na terapiju. Istražit ćemo mehanizme interakcije dviju skupina spojeva svestranog biološkog potencijala s transporterima, kao i odgovor stanica na njihovo djelovanje. Radi se o skupini monoaza- i diaza-18-kruna-6 etera supstituiranih adamantanom koji su prethodno pokazali protutumorsku aktivnost i istražuju se u različitim biološkim kontekstima te skupini fumardiamida i *bis*-urea primakina i halogenanilina koji su dizajnirani zbog poboljšanja antimalarijskog djelovanja primakina, ali i kao novi potencijalni protumikrobni i protutumorski lijekovi.

Pretpostavka ovog istraživanja je da spojevi od interesa posjeduju strukturu koja ih, temeljem literaturnih podataka, čini dobrim potencijalnim modulatorima transportera ABCB1 i/ili ABCG2. S obzirom na to da spojevi unutar pojedine skupine posjeduju specifične razlike u strukturi, očekujemo da će one utjecati na snagu interakcije s transporterom. Ukoliko pojedini spojevi pokažu inhibitorno djelovanje, konačna je pretpostavka da će povećati osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapeutike u modelnim staničnim linijama. Navedeno bi omogućilo primjenu kombinacije inhibitora i kemoterapeutika, koja bi omogućila smanjenje doze primijenjenog kemoterapeutika uz zadržavanje toksičnosti po tumorske stanice.

Rezultati ovog istraživanja rasvijetlit će utjecaj strukture testiranih spojeva na interakciju s pojedinim transporterom. Predložit ćemo mogući mehanizam inhibicije te dati doprinos za dizajn i sintezu novih spojeva s još boljim sposobnostima inhibicije aktivnosti transportera. Dodatno, uzevši u obzir važnu ulogu ABC transportera u farmakokinetici lijekova, rezultati će doprinijeti rasvjetljavanju mehanizma njihove aktivnosti, kao i dizajnu molekula s potencijalnom biološkom aktivnošću.

3. MATERIJALI I METODE

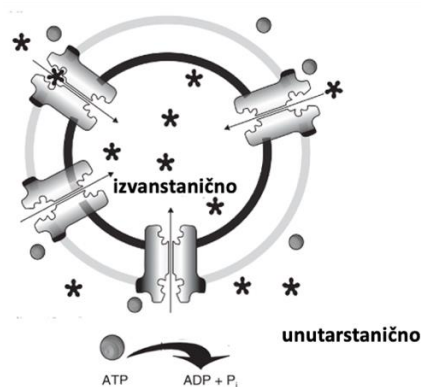
3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanične linije

U ovom radu koristili smo staničnu liniju akutne mijeloične leukemije čovjeka (PLB-985 - roditeljske stanice) i modificiranu inačicu PLB/ABCG2, s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2. Ova je linija dobivena retroviralnom transdukcijom plazmida koji nosi cDNA gena ljudskog proteina ABCG2 u stanice te selekcijom otpornih stanica mitoksantronom (stanice su dobivene ljubaznošću dr. Agnes Telbisz i dr. Balazsa Sarkadija, Institut za enzimologiju, Istraživački centar za prirodne znanosti, Budimpešta, Mađarska). Koristili smo i staničnu liniju karcinoma jajnika čovjeka A2780 (*European Collection of Authenticated Cell Cultures* – ECACC: 93112519) i modificiranu inačicu A2780/Adr (ECACC: 93112520) s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1, dobivenu izlaganjem roditeljske stanične linije A2780 kemoterapeutiku adriamicinu (doksorubicinu). U radu smo koristili i stanične linije epitela distalnog tubula nefrona bubrega psa (MDCK-II, od eng. *Madin-Darby canine kidney epithelial cell*), modificiranu inačicu MDCK-II/ABCG2 koja je stabilno transficirana plazmidom koji nosi cDNA gena ljudskog proteina ABCG2 (dobivene ljubaznošću dr. Tvrtka Smitala iz Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju, IRB, Zagreb, Hrvatska), te komercijalno dostupnu staničnu liniju bubrega embrija čovjeka HEK293 (*American Type Culture Collection* – ATCC: CRL-1573).

3.1.2. Membranski sustavi

Sustav membranskih vezikula kojeg smo koristili u ovom radu dobili smo izolacijom iz stanica ovarija kukaca *Spodoptera frugiperda* Sf9 prethodno inficiranih rekombinantnim bakulovirusom koji nosi cDNA gena ljudskog proteina ABCG2 [50], [183]–[185]. Vezikule su izvrnute, s unutarstaničnim dijelom okrenutim prema van i izvanstaničnim dijelom prema unutra, a priprema je opisana u odjeljku 3.2.7 (slika 12).

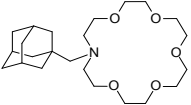
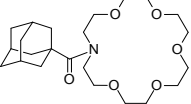
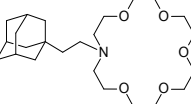
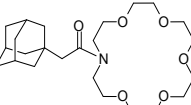
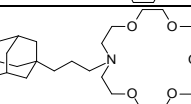
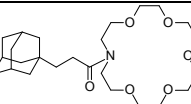
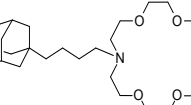
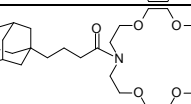
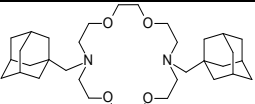
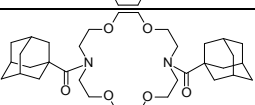
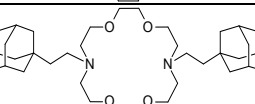
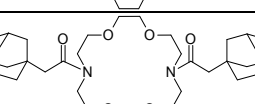
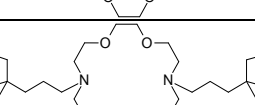
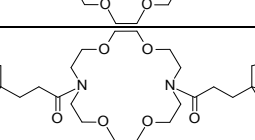


Slika 12. Shematski prikaz izvrnute membranske vezikule. Kružići predstavljaju molekule ATP-a, dok zvjezdice predstavljaju supstrat transportera ABCG2.

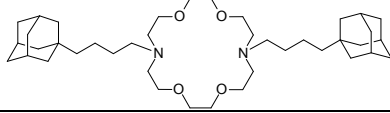
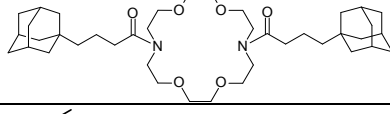
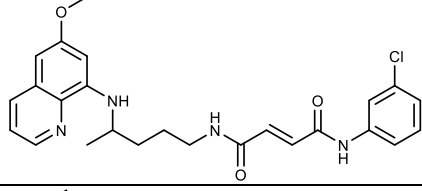
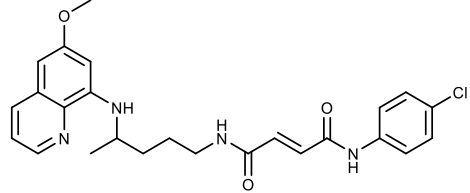
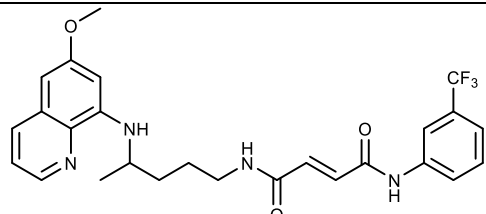
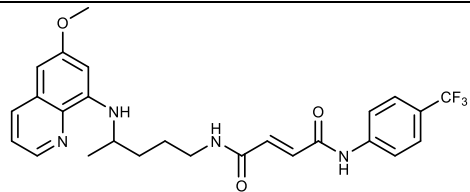
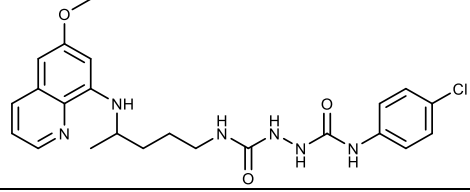
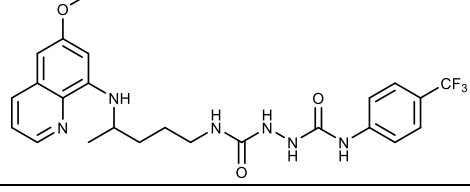
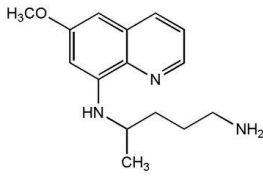
3.1.3. Spojevi

U ovom radu smo testirali monoaza- i diaza-18-kruna-6 etere supstituirane adamantanom, koji su sintetizirani u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, te skupine fumardiamida i *bis*-urea primakina i halogenanilina koje su sintetizirane u Zavodu za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu [140], [141], [180], [182]. Osim navedenih spojeva, koristili smo i komercijalno dostupne spojeve – supstrate i/ili inhibitore transportera ABC. Strukture svih spojeva koje smo koristili u ovom radu prikazane su u tablici 4.

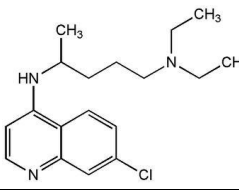
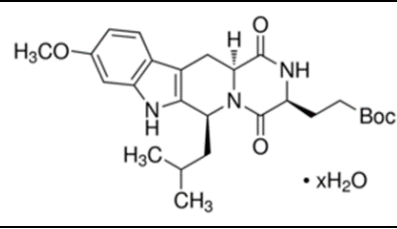
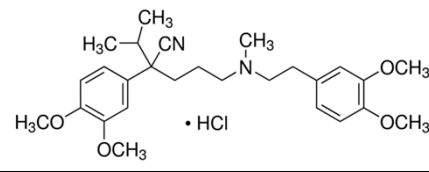
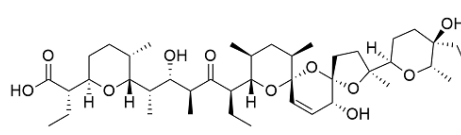
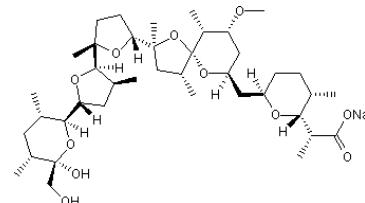
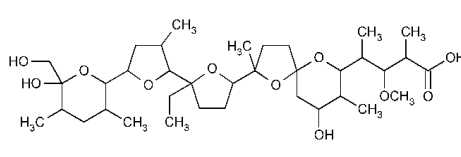
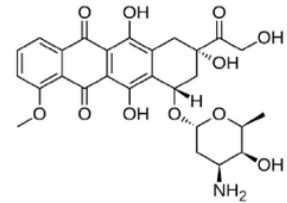
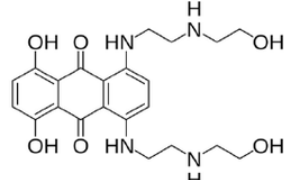
Tablica 4. Strukturne formule spojeva korištenih u radu.

Ime spoja	Struktura
MAC-1	
MAC-1Amid	
MAC-2	
MAC-2Amid	
MAC-3	
MAC-3Amid	
MAC-4	
MAC-4Amid	
DAC-1	
DAC-1Amid	
DAC-2	
DAC-2Amid	
DAC-3	
DAC-3Amid	

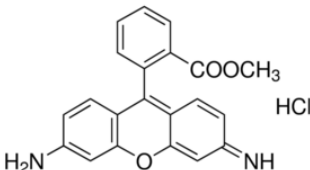
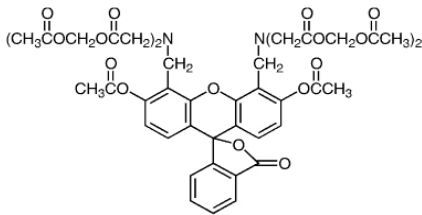
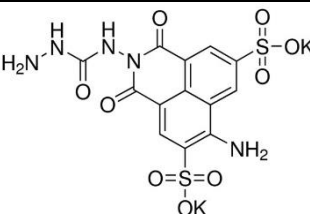
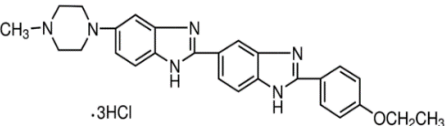
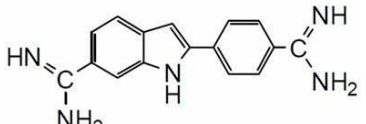
Nastavak tablice 4

DAC-4	
DAC-4Amid	
1786	
1787	
1788	
1789	
1790	
1791	
Primakin	

Nastavak tablice 4

<p>Klorokin</p>	
<p>Ko143</p>	
<p>Verapamil</p>	
<p>Salinomycin</p>	
<p>Nigericin</p>	
<p>Monenzin</p>	
<p>Doksorubicin</p>	
<p>Mitoksantron</p>	

Nastavak tablice 4

Rodamin 123	
Kalcein AM	
Lucifer yellow	
Hoechst 33342	
DAPI	

3.1.4. Plazmidi

U ovom radu koristili smo vektorski sustav pEGFP-N1 u kojemu je polipeptidni lanac transportera ABCG2 obilježen fluorescentnim zelenim proteinom (GFP) na N kraju te smo ga nazvali pEGFP-G2 (dobili smo ga ljubaznošću dr. Laszla Homolya, Institut za enzimologiju, Istraživački centar za prirodne znanosti, Budimpešta, Mađarska) [60].

3.2. METODE

3.2.1. Stanična kultura

Stanične linije uzgajali smo u sterilnim bocama za uzgoj stanica (T75, TPP Techno Plastic Products AG, Švicarska), u tekućim hranjivim podlogama (medijima) na temperaturi od 37°C,

5% CO₂ i sa visokim udjelom vlage u inkubatoru. Tekuće hranjive podloge koje smo koristili za uzgoj su slijedeće: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* s niskim udjelom glukoze, Sigma-Aldrich, SAD) za uzgoj staničnih linija MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 te RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Sigma-Aldrich, SAD) za uzgoj staničnih linija PLB-985, PLB/ABCG2, A2780 i A2780/Adr. Medije smo kompletirali s 10%-tnim fetalnim serumom goveda - FBS (od eng. *fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich, SAD), 2 mM L-glutaminom (Sigma-Aldrich, SAD), 100 jedinica/mL penicilina i 100 µg/mL streptomocina (Lonza, Švicarska). Stanice smo promatrali pod invertnim mikroskopom (Olympus CKX41, Japan) kako bismo otkrili eventualna zagađenja i presađivali ih kada bi dosegnule konfluentnost (oko 75% prekrivene površine boce), pomoću tripsina (0,25%, Capricorn Scientific, Njemačka) i EDTA (0,02% u tripsinu, Sigma-Aldrich, SAD). Prilikom presađivanja određivali smo broj stanica pod svjetlosnim mikroskopom pomoću Neubauerove komorice (Blau Brand, Njemačka) i 10%-tne otopine tripanskog modrila (Sigma-Aldrich, SAD). Stanice smo razrijedili u otopini tripanskog modrila pet puta te ih stavili u komoricu za brojanje, dimenzija 1 mm × 1 mm × 0,1 mm, sastavljenu od 4 velika kvadrata koja su podijeljena u 16 jednakih manjih kvadrata, u kojima se broje žive stanice. Broj stanica po mililitru izračunali smo prema formuli: broj stanica/mL = $(n/4) \times 5 \times 10^4$ stanica/mL, u kojoj „n“ predstavlja broj izbrojenih stanica u komorici.

3.2.2. Ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva *in vitro*

Za ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva *in vitro* koristili smo modificirani protokol prema Nacionalnom Institutu za rak (National Cancer Institute - <https://dtp.cancer.gov/>). Stanice smo nasadili na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji 1×10^4 do 3×10^4 stanica/mL, ovisno o staničnoj liniji i brzini diobe, u konačnom volumenu od 150 µL po jažici, u tetraplikatima. Idući dan pripremili smo dekatska razrjeđenja ispitivanih spojeva tako da konačne koncentracije u jažici budu 100, 10, 1, 0,1 i 0,01 µM, dodane u volumenu od 50 µL po jažici, a u negativnu kontrolu smo dodali kompletirani hranjivi medij u istom volumenu. Ispitivanje učinka spojeva na osjetljivost tumorskih stanica na mitoksantron proveli smo na isti način pomoću kombiniranog testa u kojemu smo istovremeno dodali dekatska razrjeđenja mitoksantrona u volumenu od 25 µL i 25 µL testiranog spoja kojemu je konačna koncentracija 5 µM u slučaju fumardiamida primakina i halogenanilina, a 1 ili 2 µM u slučaju diaza-krunastih etera supstituiranih adamantanom. Referentni inhibitor Ko143 dodali smo u kombinaciji s

mitoksantronom u koncentraciji od 1 μM . Mitoksantron smo dodali i kao kontrolu u volumenu od 50 μL po jažici. Vijabilnost stanica provjerili smo testom MTT nakon inkubacije pri 37°C tijekom 72h.

3.2.3. Metil tiazolil tetrazolij test (MTT test)

Aktivnost enzima dehidrogenaze, koja reducira žuti, u vodi topivi spoj 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT) u ljubičasti formazan netopiv u vodi, se koristi kao test za određivanje vijabilnosti stanica. Uklonili smo medij sa stanica i dodali 40 μL reagensa MTT (Sigma-Aldrich, SAD) u konačnoj koncentraciji 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a u praznu jažicu smo stavili isti volumen, što je poslužilo kao slijepa proba. Nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 4 sata, nastale formazanske kristale otopili smo u dimetil sulfoksidu (DMSO) uz potresanje, te smo na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Multiskan EX, Thermo Labsystems, Austrija) izmjerili apsorbanciju (optičku gustoću) pri valnoj duljini od 570 nm. Apsorbancija je direktno proporcionalna vijabilnosti stanica, a postotak rasta stanica izračunali smo prema jednom od dva slijedeća izraza:

1. Ako je (srednja vrijednost OD_{test} – srednja vrijednost OD_{t_0}) ≥ 0 onda je:

postotak rasta (%) = $100 \times (\text{srednja vrijednost } \text{OD}_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost } \text{OD}_{t_0}) / (\text{srednja vrijednost } \text{OD}_{\text{kontrola}} - \text{srednja vrijednost } \text{OD}_{t_0})$.

2. Ako je (srednja vrijednost OD_{test} – srednja vrijednost OD_{t_0}) < 0 onda je:

postotak rasta (%) = $100 \times (\text{srednja vrijednost } \text{OD}_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost } \text{OD}_{t_0}) / \text{OD}_{t_0}$,

gdje je:

srednja vrijednost OD_{test} = srednja vrijednost optičkih gustoća tretiranih stanica izmjerena 72 h nakon tretmana

srednja vrijednost OD_{t_0} = srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica izmjerena 24 h nakon nasađivanja (nulti dan)

srednja vrijednost $\text{OD}_{\text{kontrola}}$ = srednja vrijednost optičkih gustoća netretiranih stanica izmjerena nakon 72 h.

Rezultate smo prikazali na dva načina – grafički i tablično. Nakon određivanja postotka rasta stanica, za svaku pojedinačnu koncentraciju nacrtali smo krivulje odnosa koncentracije spoja i postotka rasta (od engl. *dose-response*). Iz tih krivulja linearnom regresijom smo izračunali vrijednosti IC_{50} .

3.2.4. Praćenje ekspresije proteina metodom SDS-PAGE i Western blot

Za potvrdu ekspresije proteina ABCG2 u staničnim linijama koje su stabilno transficirane genom *ABCG2*, te za praćenje ekspresije ABCG2 uslijed tretmana spojevima koristili smo metode denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata (eng. SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) i Western blot.

Stanice smo uzgajali u Petrijevim zdjelicama promjera 6 mm u hranjivim podlogama pri 37°C uz prisutstvo spojeva u koncentraciji 1, 2 i 5 μM (tijekom 72 h) ili bez (do konfluentnosti), nakon čega smo medij uklonili, stanice isprali 3 puta u fosfatnom puferu (PBS, od eng. *phosphate-buffered saline*), te ručno strugali u 50 μL RIPA pufera (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0,1% SDS, 12 mM natrijev deoksikolat) uz dodatak inhibitora fosfataza i proteinaza (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Stanične lizate skupili smo u označene tubice Eppendorf i nakon inkubacije na ledu (20 min) sonicirali ultrazvučno 5 puta tijekom 20 sekundi s 30% amplitude. Uzorke smo centrifugirali u mikrocentrifugi (Eppendorf centrifuge 5424R), tijekom 20 min pri 4°C i maksimalnoj brzini ($21130 \times g$), nakon čega smo supernatant prebacili u novu tubicu i pohranili na -80°C. Koncentraciju proteina odredili smo testom Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema protokolu proizvođača, a vrijednosti smo izmjerili na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Multiskan EX, Thermo LabSystems, Austrija) pri valnoj duljini od 570 nm.

Gelove za SDS-PAGE pripremili smo i izlivali u kalupe za izlivanje gela, a sastav gela za razdvajanje (donji gel) i gela za sabijanje (gornji gel) prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Sastav gelova za SDS-PAGE.

Kemikalije	Gel za sabijanje (5%, 5 mL)	Gel za razdvajanje (8%, 10 mL)
	Volumen (mL)	
dH₂O	2,975	4,6
akrilamid/bisakrilamid (30%/0,8% w/v)	0,67	2,6
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	-	2,6
0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8)	1,25	-
10% SDS	0,05	0,1
10% amonijev persulfat (APS)	0,05	0,1
TEMED	0,005	0,01

Uzorke smo pomiješali sa 6× Laemli puferom za nanošenje uzoraka (30 mL glicerola, 6 g SDS, 1,55 g DTT, 6,25 mL Tris 0,5M, pH 6,8, 20 mg bromfenol plavo u re-H₂O za 50 mL), u količini od 25 µg proteina po jažici, i razdvojili u gelu u Tris-glicinskom puferu za elektroforezu (pripremljen razrjeđivanjem 5 puta koncentriranog pufera koji sadrži 30 g Tris baze, 144 g glicina i 10 g SDS-a u re-H₂O za 2L) uz stalni napon od 150 V. Kao proteinski marker poznate molekulske mase koristili smo PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Nakon razdvajanja, proteine smo prenijeli na poliviniliden difluorid membranu (PVDF membranu, Roche Diagnostics GmbH), veličine pora 0,2 µm, mokrim prijenosom uz jakost struje 0,1 A preko noći, pri 4°C, u puferu za prijenos (pripremljen razrjeđivanjem 10 puta koncentriranog pufera koji sadrži 60 g Tris baze i 288 g glicina u re-H₂O za 2 L, uz dodatak 10% metanola). Membrane smo isprali u PBS-u, bojali 1 min otopinom boje amidocrno (0,1% amidocrno, 10% metanol, 2% octena kiselina, re-H₂O) na zibalici kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina te ih ispirali u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, re-H₂O) 2 puta tijekom 30 min, dok nisu bile vidljive plave vrpce na svijetloj podlozi. Membrane smo inkubirali dodatnih 30 min u finalnoj otopini za odbojavanje (25% izopropanol, 10% octena kiselina, re-H₂O), isprali 4 puta tijekom 1 min u dH₂O i 2 puta tijekom 15 min u puferu TN (15 mL NaCl koncentracije 5M, 15 mL Tris-HCl koncentracije 1M, pH 8, re-H₂O) i blokirali tijekom 60 min u 5% - tnoj otopini mlijeka u puferu TBST (12g Tris baze i 90 g NaCl u re-H₂O za 1 L, uz dodatak 1 mL Tween20).

Primarna mišja protutijela BXP-21 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD) za detekciju proteina ABCG2 i Mdr-1 (klon G-1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD) za detekciju proteina ABCB1 pripremili smo u razrijeđenju 1/100 u 5%-tnoj otopini mlijeka u puferu TBST i inkubirali smo membrane preko noći, pri 4°C uz zibanje. Idući dan smo membrane isprali 3

puta tijekom 10 min u puferu TBST i inkubirali sa sekundarnim protutijelom IgG proizvedenim u ovci, a usmjerenim protiv mišjeg primarnog protutijela, obilježenim peroksidazom iz hrena (GE Healthcare Life Sciences, SAD), kojeg smo pripremili u otopini 5%-tnog mlijeka i pufera TBST u razrjeđenju 1:4000 za ABCG2 ili 1:10000 za ABCB1, tijekom 2 h na sobnoj temperaturi.

Membrana smo isprali tri puta tijekom 10 min u puferu TBST i posušili, nakon čega smo nanijeli kemiluminiscentni reagens (oksidirajući reagens i pojačivač signala u omjeru 1:1, Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, SAD) izravno na membranu, ostavili 1 min na tamnom mjestu, uklonili ostatak reagensa i signal smo snimili pomoću uređaja za snimanje kemiluminiscencije (Uvitec Alliance Q9 Mini, Cambridge, UK). Kvantifikaciju signala dobivenih metodom Western blota napravili smo pomoću programa ImageJ (NIH, SAD).

3.2.5. Test nakupljanja supstrata

3.2.5.1. Transporter ABCB1

Kako bismo ispitali sposobnost spojeva da inhibiraju transporter ABCB1, koristili smo testove nakupljanja supstrata rodamina 123 odnosno kalceina AM (acetoksimetil ester).

Za test s rodaminom, stanične linije A2780 i A2780/Adr odvojili smo s podloge na kojoj su rasle, izbrojili, prebacili u označene Eppendorf tubice (200000 stanica po tretmanu) i centrifugirali tijekom 5 min pri 1200 rpm na sobnoj temperaturi. Medij smo uklonili, stanice resuspendirali u kompletiranom mediju RPMI-1640 uz prisutnost (ili odsutnost - kontrola) boje rodamin 123 i inkubirali u termobloku (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) tijekom 30 min pri 37°C uz lagano potresanje (300 rpm) u tami. Uzorke smo centrifugirali tijekom 5 min pri 1200 rpm i 4°C, odlili smo medij s rodaminom, stanice isprali u PBS-u, centrifugirali tijekom 5 min pri 1200 rpm i 4°C te dodali spojeve za testiranje ili komercijalni inhibitor verapamil u konačnoj koncentraciji od 10 µM.

Nakon inkubacije u termobloku tijekom 45 min pri 37°C uz lagano potresanje (300 rpm) u tami, uzorke smo centrifugirali, uklonili medij i isprali u PBS-u kako je opisano i nakon inkubacije s bojom rodamin 123. Svaki uzorak nakon ispiranja resuspendirali smo u 400 µL PBS-a i analizirali u protočnom citometru (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, SAD). Uzorke smo pobudili laserom valne duljine 488 nm, dok smo emitiranu fluorescenciju

prikupili kroz filter pri 530 nm. Rezultate smo analizirali pomoću programa FlowJo (TreeStar Inc., SAD).

Za test s kalceinom, stanične linije A2780 i A2780/Adr nasadili smo na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 30000 stanica i konačnom volumenu od 200 μ L po jažici. Idući dan medij smo odlili, stanice isprali u PBS-u i inkubirali u 200 μ L medija RPMI-1640 bez FBS uz prisutnost (ili odsutnost – kontrola) kalceina konačne koncentracije 0,25 μ M i ispitivanih spojeva konačne koncentracije 10 μ M tijekom 60 min pri 37°C, u tami.

Nakon što smo uklonili medij, stanice smo isprali u PBS-u i u zadnjem koraku prije mjerenja kalcein nakupljen unutar stanica isпусти van u otopinu pomoću 0,2%-tne otopine tritona X-100 u 200 μ L PBS-a tijekom 10 min uz potresanje na sobnoj temperaturi, što je omogućilo ravnomjerno mjerenje fluorescencije. Fluorescenciju smo mjerili na fluorimetru za mikrotitarske pločice (TECAN infinite M200, Tecan Group Ltd., Švicarska), uz ekscitaciju pri 485 nm i emisiju pri 530 nm.

3.2.5.2. Transporter ABCG2

Kako bismo ispitali sposobnost spojeva da inhibiraju transporter ABCG2, koristili smo test nakupljanja supstrata feoforbida A i H 33342.

Test sa supstratom feoforbidom A proveli smo prema protokolu opisanom za test s bojom rodamin 123 (opisano u dijelu 3.2.5.1.), na staničnim linijama MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 (20000 stanica po jažici), s konačnom koncentracijom feoforbida od 5 μ M. Uzorke smo mjerili u protočnom citometru (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, SAD) sa valnim duljinama ekscitacije pri 488 nm i emisije pri 670 nm. Rezultate smo analizirali pomoću programa FlowJo (TreeStar Inc., BD, SAD).

Za test s H 33342, stanične linije MDCK-II, MDCK-II/ABCG2, PLB i PLB/ABCG2 nasadili smo na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 25000 i konačnom volumenu od 200 μ L po jažici. Idući dan medij smo odlili, stanice isprali u PBS-u i inkubirali u 200 μ L medija bez FBS uz prisutnost (ili odsutnost – kontrola) H 33342 konačne koncentracije 0,5 μ M i testiranih spojeva konačne koncentracije 10 μ M tijekom 60 min pri 37°C, u tami. Nakon što smo medij uklonili, isprali smo stanice u PBS-u i izmjerili jačinu fluorescencije na fluorimetru za mikrotitarske pločice (TECAN infinite M200, Tecan Group Ltd., Švicarska), uz ekscitaciju pri 360 nm i emisiju pri 465 nm.

3.2.6. Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3

Za ispitivanje inhibitorne sposobnosti spojeva koristili smo protu-ABCG2 protutijelo 5D3 [186]. Ovo je protutijelo osjetljivo na promjenu konformacije transportera ABCG2 te se veže na njega dok je transporter u konformaciji s vezanim inhibitorom. U tu smo svrhu stanice PLB ili PLB/ABCG2 izbrojali i razrijedili tako da koncentracija stanica u 25 μ L po uzorku bude 150000, te smo im dodali 25 μ L otopine spoja čije konačne koncentracije trebaju biti 1, 5 i 10 μ M. U reakcijsku smjesu smo zatim dodali 0,5 μ g neobilježenog protu-ABCG2 primarnog protutijela 5D3 (Merck Millipore, Njemačka) razrijeđenog u 50 μ L PBS-a uz dodatak 5,5 mM glukoze i 1% albumina goveđeg seruma (od eng. *bovine serum albumin*, BSA) i sve zajedno inkubirali tijekom 45 min pri 37°C uz lagano potresanje. Nakon inkubacije stanice smo centrifugirali tijekom 4 min na 1500 rpm, isprali u hladnom PBS-u, ponovno centrifugirali i na njih dodali 0,25 μ g sekundarnog protutijela usmjerenog protiv mišjeg primarnog, a koje je fluorescentno obilježenog zelenom bojom (IgG-Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific, SAD), u 50 μ L PBS-a uz dodatak 5,5 mM glukoze i 0,5% BSA. Nakon 30 min inkubacije pri 37°C uz lagano potresanje, stanice smo centrifugirali, isprali u hladnom PBS-u, resuspendirali u 400 μ L PBS-a i analizirali u protočnom citometru (FACS Calibur flow cytometer, Becton Dickinson, SAD). Koristili smo valnu duljinu ekscitacije pri 488 nm i emitiranu fluorescenciju prikupili kroz filter pri 530 nm. Rezultate smo analizirali pomoću programa FlowJo (TreeStar Inc., BD, SAD).

3.2.7. Priprema membranskih vezikula

Za pripremu izvanstaničnog sustava membranskih vezikula koje nose transporter ABCG2, stanice ovarija kukaca *Spodoptera frugiperda* inficirali smo rekombinantnim bakulovirusom koji nosi cDNA gena ljudskog proteina ABCG2. Stanice smo uzgajali u bocama za uzgoj stanica (T150) pri koncentraciji od 2×10^7 stanica u 30 mL medija TNM-FH (Sigma-Aldrich, SAD) kompletiranog sa 10% FBS-a tijekom 72 h.

Nakon što smo uspješnost infekcije provjerili pod svjetlosnim mikroskopom, stanice smo skupili mehaničkim struganjem u puferu tris-manitol (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, koji sadrži 300 mM manitola i 0,5 mM fenilmetilsulfonil fluorida, Sigma-Aldrich, SAD) nakon čega smo proveli korake izolacije membranskih vezikula. Stanice smo homogenizirali i lizirali pomoću stakleno – teflonskog homogenizatora za tkiva u puferu TMEP (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, koji

sadrži 50 mM manitola, 2 mM EGTA, 10 pg/ml leupeptina, 8 pg/ml aprotinina, 0,5 mM fenilmetilsulfonil fluorida i 2 mM β -merkaptotetanol, Sigma-Aldrich, SAD) a zaostale čitave stanice i jezgri debrisi uklonili centrifugiranjem tijekom 10 min pri $500 \times g$. Supernatant smo centrifugirali tijekom 60 min pri $100000 \times g$ a talog u kojemu se nalaze membranske vezikule resuspendirali smo u puferu TMEP te smo koncentraciju proteina odredili testom Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema protokolu proizvođača. Vrijednosti smo izmjerili na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Multiskan EX, Thermo Labsystems, Austrija) pri valnoj duljini od 570 nm. Sve korake smo radili pri 4°C a membrane smo pohranili na -80°C . Prije zadnjeg koraka centrifugiranja (tijekom 60 min pri $100000 \times g$), izolirane membrane smo inkubirali s 2-4 mM kompleksa nasumično metiliranih beta ciklodekstrina (eng. RAMEB - random methylated beta, CycloLab, Mađarska) i kolesterola (CycloLab, Mađarska), pri čemu je udio kolesterola 4,4%. Stanice smo zatim razrijedili 20 puta i centrifugirali, pri čemu je uklonjen ostatak ciklodekstrina i kolesterola.

3.2.8. Test nakupljanja supstrata u izvrnutim membranskim vezikulama

Za mjerenje nakupljanja fluorescentnog supstrata *Lucifer yellow* (LY), suspenziju izvrnutih membranskih vezikula koje sadrže ljudski protein ABCG2 smo inkubirali u koncentraciji od 50 μg proteina u membrani/uzorku sa 4 mM Mg-ATP-a (Sigma-Aldrich, SAD), fluorescentnim supstratom LY (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji od 10 μM i spojevima koji se ispituju. Nakon inkubacije tijekom 10 min pri 37°C u otopini koja sadrži 40 mM MOPS, 56 mM KCl i 6 mM MgCl_2 (sve Sigma-Aldrich, SAD) u vodi, reakciju smo zaustavili hladnim puferom za ispiranje koji sadrži 40 mM MOPS-Tris i 70 mM KCl u vodi, reakcijsku smjesu prenijeli u mikrotitarske pločice s 96 jažica sa filterom (MScn HTS GFB Opaque NS, Merck Milipore, Njemačka), filtrirali pomoću vakuuma i oprali pet puta u puferu za ispiranje. Membranske vezikule koje su ostale na filteru smo izdvojili u standardne mikrotitarske pločice s 96 jažica dodavanjem 100 μL 10%-nog SDS po uzorku i centrifugiranjem pri brzini od 1200 rpm. Za optimizaciju mjerenja fluorescencije, u svaku jažicu smo dodali 100 μL DMSO i izmjerili fluorescenciju supstrata LY pomoću fluorimetra EnSpire (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) s laserom čija je valna duljina pobude i emisije pri 427 nm, odnosno 535 nm.

3.2.9. Mjerenje bazalne i stimulirane ATP-azne aktivnosti

Transporteri ABC koriste energiju ATP-a za prijenos supstrata preko membrane suprotno od koncentracijskog gradijenta, pa je količina fosfata oslobođenog u reakciji hidrolize ATP-a proporcionalna aktivnosti transportera, a može se direktno mjeriti osjetljivim kolorimetrijskim testom.

Za mjerenje bazalne i stimulirane ATP-azne aktivnosti, suspenziju izvrnutih membranskih vezikula (5-20 μg membranskih proteina) stavili smo u 0,1 mL medija koji sadrži 40 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 50 mM KCl, 2 mM ditiotritol, 500 μM EGTA-Tris, 5 mM Na-azid i 1 mM ouabain (sve Sigma-Aldrich, SAD) pri 37°C u vodenoj kupelji i ATP-aznu reakciju smo započeli dodavanjem 3,3 mM MgATP. Testirane spojeve sotopili smo u DMSO i dodali, te smo reakciju inkubirali tijekom 20 min pri 37°C u vodenoj kupelji uz miješanje, nakon čega smo ju zaustavili dodavanjem 0,1 mL otopine 5%-tnog SDS-a (Sigma-Aldrich, SAD). Kod stimulirane ATP-azne aktivnosti, u reakcijsku smjesu dodali smo i kvercetin (Sigma-Aldrich, SAD), poznati supstrat transportera ABCG2, u koncentraciji od 0,2 μM . Na uzorke smo dalje dodali 0,4 mL reagensa koji sadrži 2,5 M H_2SO_4 , 1% amonijevog molibdata, 0,014% antimonij kalij tartarata (sve Sigma-Aldrich, SAD) i 1 mL destilirane vode.

Za redukciju nastalih kompleksa dodali smo 0,2 mL svježe pripremljene 1%-tne askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich, SAD), uzorke smo prebacili u kivete i očitali optičku gustoću na spektrofotometru pri valnoj duljini od 880 nm. ATP-aznu aktivnost izrazili smo kao razliku u količini izmjenjenog anorganskog fosfata između 0 min (kada je reakcija odmah prekinuta otopinom SDS-a) i nakon inkubacije od 20 min.

3.2.10. Transfekcija stanične linije HEK293 plazmidom pEGFP-G2

Za transfekciju stanične linije HEK293 s plazmidom pEGFP-G2, koji je opisan u potpoglavlju 3.1.4., koristili smo Lipofectamine 2000 reagens (Invitrogen, SAD), prema uputama proizvođača. Stanice smo dan prije transfekcije nasadili u mediju DMEM bez antibiotika u Petrijeve posudice promjera 35 mm, podijeljene u 4 jednaka odjeljka u kojima se na dnu nalazi pokrovno stakalce debljine 0,16-0,19 mm (Cellvis, SAD). Kako bi na dan transfekcije bile 90-95% konfluentne, nasadili smo ih u koncentraciji od 100000 stanica i konačnom volumenu 500 μL po odjeljku. Svaki je odjeljak zasebna reakcija transfekcije, te smo prvo pripremili 0,8 μg DNA u 50 μL medija bez antibiotika i seruma, a 2 μL Lipofectamina 2000 smo pomiješali sa

48 μL medija bez antibiotika i seruma, te smo obje otopine inkubirali 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije suspenziju DNA i Lipofectamina smo pomiješali u konačnom volumenu od 100 μL i inkubirali 20 min na sobnoj temperaturi, te potom stavili u odjeljke sa stanicama u 500 μL medija DMEM bez antibiotika. Posudice smo lagano protresli i inkubirali tijekom 48 h pri 37°C, ali smo 4 h nakon dodavanja kompleksa na stanice medij zamijenili svježim medijem bez antibiotika.

3.2.11. Nakupljanje supstrata u stvarnom vremenu u staničnoj liniji HEK-EGFP-G2

Staničnu liniju HEK293, transficiranu plazmidom pEGFP-G2 kako je opisano ranije u odjeljku 3.2.10., koristili smo za praćenje nakupljanja supstrata H 33342 ili mitoksantrona (oboje Sigma-Aldrich, SAD) u stvarnom vremenu. Stanicama smo, 48 h nakon transfekcije, dodali H 33342 (8 μM) ili mitoksantron (5 μM) u hranjivom mediju bez FBS-a te smo pratili plavu (461 nm) odnosno crvenu (> 650 nm) fluorescenciju, čije su valne duljine pobude pri 405 nm odnosno 633 nm, pomoću konfokalnog mikroskopa (TCS X, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka) tijekom 5 min. Nakon dodavanja ispitivanog spoja (5 μM) ili poznatog inhibitora Ko143 (1 μM , Sigma-Aldrich, SAD), pratili smo plavu ili crvenu fluorescenciju tijekom dodatnih 5 min.

Za analizu kinetike transporta stanice smo na temelju zelene fluorescencije (505-525 nm) čija je valna duljina pobude pri 488 nm, podijelili na transficirane (zelene) i netransficirane, te smo nakupljanje H 33342 odredili za oboje. Za svaki tretman analizirali smo ukupno 100 stanica u četiri do šest vidnih polja tijekom 5 vremenskih perioda (0, 2, 5, 7 i 9 min), u dva zasebna eksperimenta. Plavu fluorescenciju pratili smo u regijama od interesa koje se nalaze u području stanične jezgre.

Za prikupljanje slika koristili smo program Leica Application Suite X software (LAS X, 3.1.1.15751, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka), a za uređivanje slika program Adobe Illustrator CS2. Program ImageJ (NIH, SAD) koristili smo za analizu slika.

3.2.12. Imunofluorescencija

Za praćenje promjene lokalizacije transportera ABCG2, stanice MDCK-II/ABCG2 nasadili smo u mediju DMEM na mikroskopska pokrovna stakalca koja su prethodno tretirana FBS-om

u pločicama s 24 jažice u koncentraciji od 100000 stanica po jažici. Idući dan tretirali smo ih spojevima u koncentraciji od 2 μ M. Nakon inkubacije tijekom 72 h pristupili smo bojanju ukupnog staničnog proteina ABCG2 prema slijedećem protokolu: medij smo uklonili i stanice isprali tri puta u PBS-u koji sadrži kalcij i magnezij (PBS + Ca/Mg). Uzorke smo fiksirali u 4% paraformaldehidu (PFA), pripremljenom u istom PBS-u, tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Stanice smo ponovno isprali u puferu PBS + Ca/Mg tri puta i nakon toga smo uzorke permeabilizirali s 0,1% saponinom pripremljenim u istom puferu, tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je slijedila još jedna serija ispiranja u puferu kojem smo dodali i 0,1% saponina i zatim blokiranje s 1% BSA kojeg smo pripremili u puferu PBS + Ca/Mg uz dodatak 0,1% saponina tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Stakalca smo nakon toga inkubirali s mišjim protu-ABCG2 primarnim protutijelom BXP-21 (1:100, IgG2a, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u otopini za blokiranje preko noći pri 4°C. Idući dan stakalca smo isprali tri puta u puferu PBS + Ca/Mg uz dodatak 0,1% saponina i inkubirali sa kozjim sekundarnim protutijelom usmjerenim protiv mišjeg primarnog protutijela i obilježenim s Alexa Fluor 488 bojom (IgG, Thermo Fisher Scientific, SAD) u razrjeđenju 1/250 u otopini za blokiranje tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon serije ispiranja stakalca smo obojali bojom DAPI koja boji stanične jezgre u koncentraciji od 1 μ g/mL tijekom maksimalno 2 min te smo ih zatim obilno isprali i uklopili na predmetna stakalca pomoću medija za uklapanje (Dako North America, Inc., SAD).

Uzorke smo promatrali pomoću konfokalnog mikroskopa (TCS X, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka) te smo pratili plavu (461 nm) odnosno zelenu (505-525nm) fluorescenciju čije su valne duljine pobude 405 nm odnosno 488 nm. Za prikupljanje slika koristili smo program Leica Application Suite X software (LAS X, 3.1.1.15751, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka), a za uređivanje slika program Adobe Illustrator CS2.

3.2.13. Analiza staničnog ciklusa

Za analizu staničnog ciklusa nakon tretmana spojevima od interesa, stanice PLB i PLB/ABCG2 smo razrijedili u mediju RPMI i stavili ih u pločice sa 6 jažica u koncentraciji od 200000 stanica/jažici, te ih idući dan tretirali spojevima (mitoksantron u koncentraciji od 0,02 μ M, a ispitivani spojevi u koncentraciji od 1 μ M, zasebno ili u kombinaciji). Nakon inkubacije sa spojevima tijekom 24 h, stanice smo zajedno s medijem sakupili u epruvete i centrifugirali tri puta 5 min pri 1500 rpm uz ispiranje taloga s 2,5 mL PBS-a između centrifugiranja. U zadnjem

koraku smo na talog dodali 1,5 mL PBS-a, uzorke stavili na led i uz blago miješanje u svaki postepeno, kap po kap, dodali 3 mL apsolutnog etanola ohlađenog na -20°C , kako bismo ih fiksirali te ih pohranili na -20°C . Na dan analize uzorke smo centrifugirali 5 min pri 1500 rpm i 4°C , talog isprali dva puta s 2 mL PBS-a uz centrifugiranje te u zadnjem koraku na talog u svakom uzorku dodali po 200 μL otopine RNA-ze A u koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i inkubirali ih u vodenoj kupelji (PURA, Julabo GmbH, Njemačka) tijekom 30 min pri 37°C . Otopinu propidij jodida pripremili smo u koncentraciji od 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i dodali u volumenu od 200 μL u svaku epruvetu za protočni citometar, u koje smo prebacili i uzorke nakon inkubacije s RNA-zom te smo sve zajedno inkubirali minimalno 1 h pri 4°C u mraku. Koristili smo valnu duljinu ekscitacije pri 488 nm, dok smo emitiranu fluorescenciju prikupili kroz filter pri 610 nm. Rezultate smo analizirali pomoću programa FlowJo (TreeStar Inc., BD, SAD).

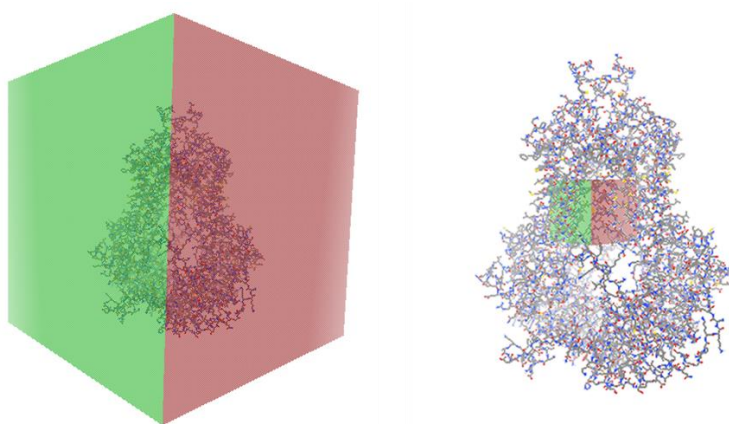
3.2.14. Molekulsko uklapanje u protein ABCG2

Molekulsko uklapanje u protein ABCG2 radila je grupa prof. Branimira Bertoše na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu [187]. Trodimenzionalne strukture diaza-18-kruna-6 etera koji imaju amidnu vezu u lancu između prstena krune i adamantanskog bočnog ogranka i diaza-18-kruna-6 etera bez amidne veze, čije vezanje na protein ABCG2 se istražuje, izradili su pomoću programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021). Trodimenzionalne strukture poznatih inhibitora i supstrata transportera ABCG2 preuzeli su iz baze podataka kemijskih molekula PubChem (Ko143 - CID: 10322450; MX - CID: 4212) [188]. Protonaciju struktura napravili su u programu MolProbity [189].

Priprema 3D-modela proteina ABCG2 uključuje 3D-strukture preuzete iz proteinske baze podataka PDB [190], dok su dijelove strukture koji nedostaju u dostupnim strukturama izgradili pomoću programa za homologno modeliranje strukture proteina SWISS-MODEL [191]. Strukture proteina koje su korištene kao predlošci za dobivanje najkvalitetnijih strukturnih modela prema SWISS-MODELU uključuju strukturu transportera s vezanim inhibitorom MZ29 (PDB kod: 6FFC i 6HIJ), strukturu s vezanim supstratom MX (PDB kod: 6VXI), strukturu s vezanim inhibitorom imatinibom (PDB kod: 6VXH) te strukturu proteina kada za njega ništa nije vezano (PDB kod: 6VXF). Svih pet strukturnih modela smo koristili u ovom istraživanju. Iz odabranih modela su uklonili molekule kolesterola, fosfatidiletanolamina i prisutnih inhibitora ili supstrata. Protonaciju proteina napravili su u programima Chimera [192], H++ [193], MolProbity [189] i Propka [194], u uvjetima pH 7,4 što odgovara pH

vrijednosti citoplazme stanica epitela dojke i neurona. Svi su programi dali jednaku protonaciju te su za molekulske uklapanje odabrali protonirane strukture koje su dobili pomoću programa MolProbity.

Pomoću programa AutoDock Vina [195] napravili su dva računa molekuskog uklapanja liganada na svim strukturnim modelima transportera ABCG2. Prilikom prvog izračuna koristili su takozvano slijepo uklapanje odnosno 3D-mreža koja obuhvaća cijeli protein, dok su u drugom izračunu koristili 3D-mrežu koja obuhvaća isključivo šupljinu 1 proteina ABCG2 i služi kao potvrda rezultata molekuskog uklapanja na cijelom proteinu (slika 13). Koordinate središta 3D-mreža odredili su u programu AutoDock Tools4 [196]. Svaka pretraga sprema 15 načina vezanja koji se nalaze unutar 2 kcal mol⁻¹ od energijski najpovoljnijeg pronađenog.



Slika 13. Veličina i položaj 3D-mreže koja obuhvaća cijeli protein (lijevo) i isključivo šupljinu 1 (desno), prikazani u programu AutoDock Tools4.

Struktura proteina s uklopljenim ligandima prikazana je pomoću programa VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey i sur. 1996), Chimera (Pettersen i sur. 2004) te Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021). Aminokiselinske ostatke koji sudjeluju u interakciji s ligandom i vrstu interakcije odredili su pomoću programa PLIP (Protein Ligand Interaction Profiler) [197].

3.2.15. Mjerenje nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) u stanicama

Za mjerenje nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (RKV), stanične linije MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 nasadili smo u mikrotitrarske pločice sa 96 jažica 24 h prije provođenja pokusa. Idućeg dana stanice smo odvojili od podloge pomoću tripsina i inkubirali u mediju DMEM koji ne sadrži FBS zajedno sa fluorescentnom bojom DCFHDA u koncentraciji od 20 μM tijekom

45 min pri 37°C. Nakon inkubacije smo dodali spojeve u koncentraciji od 10 µM bez ispiranja stanica i stanice smo inkubirali tijekom jednog sata pri 37°C. Vodikov peroksid smo koristili kao pozitivnu kontrolu. Nakon što smo uklonili medij, stanice smo isprali u PBS-u i izmjerili fluorescenciju na fluorimetru za mikrotitarske pločice (TECAN infinite M200, Tecan Group Ltd., Švicarska), uz ekscitaciju pri 485 nm i emisiju pri 535 nm.

3.2.16. Statistička analiza podataka

Sve grafikone smo prikazali kao srednju vrijednost ± standardna devijacija (SD). Za ispitivanje statističke značajnosti između uzoraka koristili smo parametrijski test ANOVA s post-hoc testom Dunnett, a statističke izračune smo radili u programu GraphPad Prism 5 (NS = nesignifikantno, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

4. REZULTATI

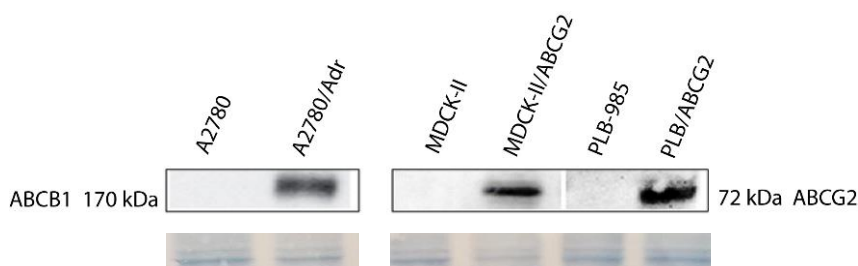
U ovom smo radu ispitili osam derivata monoaza-18-kruna-6 etera, od kojih četiri imaju amidnu vezu u poveznici između eterskog prstena i bočnog ogranka adamantana (MAC-1Amid, MAC-2Amid, MAC-3Amid, MAC-4Amid), a četiri su povezana aminskom vezom (MAC1, MAC2, MAC3, MAC4,) te osam derivata diaza-18-kruna-6 etera s amidnom vezom (DAC-1Amid, DAC-2Amid, DAC-3Amid, DAC-4Amid) i aminskom vezom (DAC-1, DAC-2, DAC-3, DAC-4,) [96], [140], [141]. Također ispitili smo četiri fumardiamida primakina i halogenanilina (1786, 1787, 1788, 1789) [182] i dva *bis*-urea primakina i halogenanilina (1790, 1791) [180]. Nizom staničnih i biokemijskih testova istražili smo interakciju spojeva s transporterima ABCB1 i ABCG2 kao i odgovor stanica na njihovo djelovanje.

Stanične linije koje smo u ovom istraživanju koristili kao model za ispitivanje aktivnosti transportera ABCG2 su stanična linija akutne mijeloične leukemije čovjeka PLB-985 i modificirana inačica PLB/ABCG2, s prekomjernom ekspresijom ABCG2 transportera koja je dobivena nakon retroviralne transdukcije plazmida koji nosi cDNA gena za ljudski protein ABCG2 u stanice PLB985 i selekcije mitoksantronom [198], [199]. Korištena je i stanična linija epitela distalnog tubula nefrona bubrega psa MDCK-II te njezina modificirana inačica MDCK-II/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 dobivena stabilnom transfekcijom stanica MDCK-II plazmidom koji nosi cDNA gena za ljudski protein ABCG2 [200]. Za ispitivanje aktivnosti transportera ABCB1 koristili smo staničnu liniju karcinoma jajnika čovjeka A2780 i modificiranu inačicu A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1, dobivenu izlaganjem roditeljske stanične linije A2780 kemoterapeutiku adriamicinu (doksorubicinu).

Osim staničnog sustava, u ovom smo radu koristili izvrnute membranske vezikule koje sadrže transporter ABCB1 ili ABCG2, a dobivene su nakon kloniranja cDNA gena za ljudski protein ABCB1 ili ABCG2 u bakulovirusni vektor i infekcije stanica ovarija kukaca Sf9 rekombinantnim virusom [50], [183].

4.1. Karakterizacija modelnih staničnih linija

Prije provođenja pokusa, ispitali smo ekspresiju transportera ABCB1 i ABCG2 u modelnim staničnim linijama koje ćemo koristiti za ispitivanje utjecaja spojeva na aktivnost transportera, pomoću metode SDS-PAGE i Western blot (slika 14).

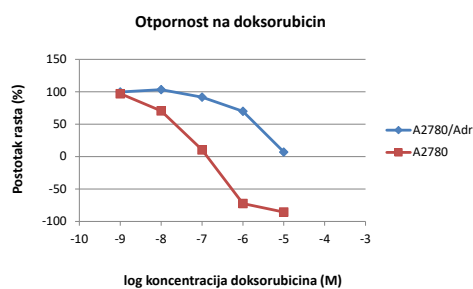


Slika 14. Ekspresija proteina ABCB1 (lijevo) i proteina ABCG2 (desno) u modelnim staničnim linijama. Rezultati su dobiveni iz ukupnog staničnog lizata metodom Western blot. Proteini ABCB1 i ABCG2 detektirani su pomoću specifičnih protutijela Mdr-1 i BXP-21, a kao kontrola jednolikog nanošenja uzoraka membrana je obojana bojom amido crno.

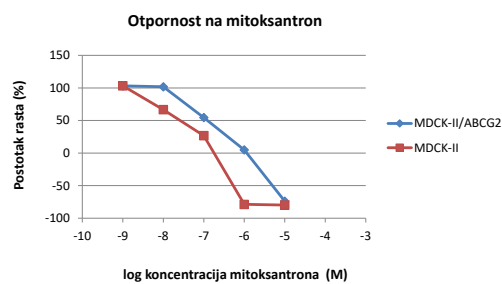
Rezultati pokazuju da modelne stanične linije A2780/Adr, MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 imaju prekomjernu ekspresiju proteina ABCB1 odnosno ABCG2, dok njihove roditeljske inačice A2780, MDCK-II i PLB-985 ne pokazuju mjerljivu ekspresiju.

S obzirom da bi stanice s povišenom ekspresijom transportera trebale biti otpornije na kemoterapeutike, koji su njihovi supstrati, testom MTT ispitali smo razliku u osjetljivosti staničnih linija s prekomjernom ekspresijom transportera i njihovih roditeljskih inačica na kemoterapeutik. Koristili smo adriamicin (doksorubicin), supstrat transportera ABCB1, odnosno mitoksantron, koji je supstrat transportera ABCG2. Rezultati prikazani na slici 15 pokazuju ovisnost postotka rasta (postotka živih stanica) o koncentraciji kemoterapeutika, dok su u tablici 6 rezultati prikazani kao vrijednosti IC_{50} , što označava koncentraciju spoja potrebnu za inhibiciju rasta 50% stanica u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama. Niže vrijednosti IC_{50} upućuju na jače djelovanje spoja.

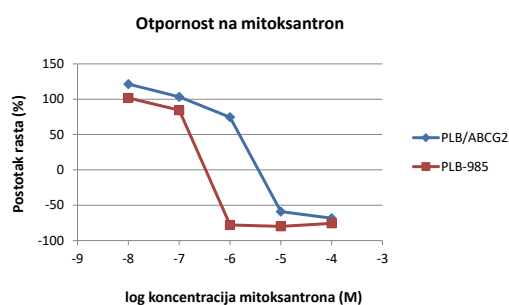
A)



B)



C)



Slika 15. Krivulje preživljenja stanica u odnosu na koncentraciju kemoterapeutika. (A) stanice A2780 i A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom ABCB1; (B) stanice MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom ABCG2; (C) stanice PLB-985 i PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom ABCG2. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

Tablica 6. Inhibicija rasta stanica A2780, A2780/Adr, MDCK-II, MDCK-II/ABCG2, PLB-985 i PLB/ABCG2 uslijed tretmana kemoterapeutikom doxorubicinom, odnosno mitoksantronom, prikazana kao vrijednost IC_{50} , određena testom MTT i izražena u μM . IC_{50} – koncentracija koja izaziva 50%-tnu inhibiciju rasta.

Spoj	IC_{50} (μM)					
	A2780	A2780/Adr	MDCK-II	MDCK-II/ABCG2	PLB-985	PLB/ABCG2
doxorubicin	$0,03 \pm 0$	$1,6 \pm 0,8$	-	-	-	-
mitoksantron	-	-	$0,03 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0$	$0,15 \pm 0,06$

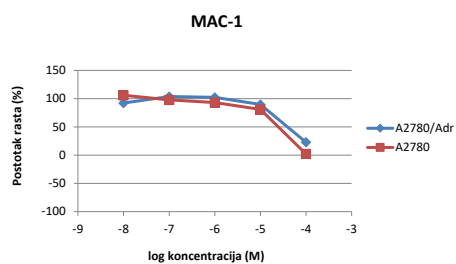
Rezultati nedvojbeno pokazuju da su stanične linije koje imaju prekomjernu ekspresiju transportera otpornije na kemoterapeutik koji je njihov supstrat, odnosno, da on inhibira njihov rast pri značajno većoj koncentraciji u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom koja je osjetljiva na kemoterapeutik u niskim koncentracijama. Time smo potvrdili da su ovi stanični modeli prikladni za provođenje daljnjih testova.

4.2. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti testiranih spojeva *in vitro*

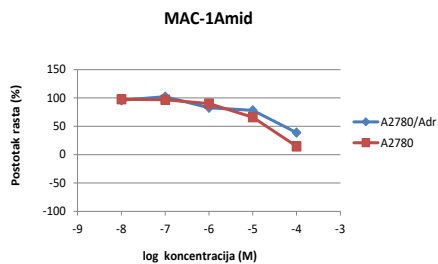
4.2.1. Antiproliferativna aktivnost mono- i diaza-18-kruna-6 etera

Antiproliferativna aktivnost mono- i diaza-18-kruna-6-etera prethodno je ispitana na stanicama A2780 i A2780/Adr od strane naše grupe [96], a rezultati su prikazani na slici 16 i 17 te u tablici 7.

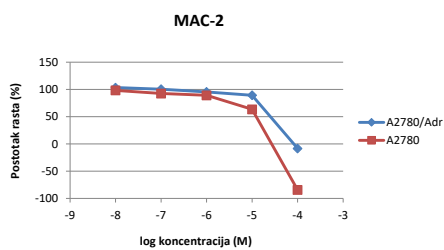
A)



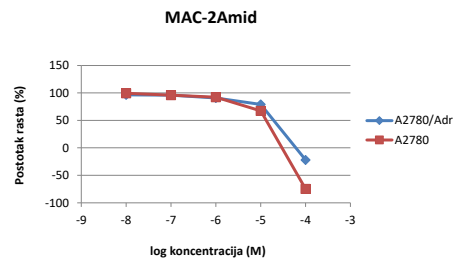
B)



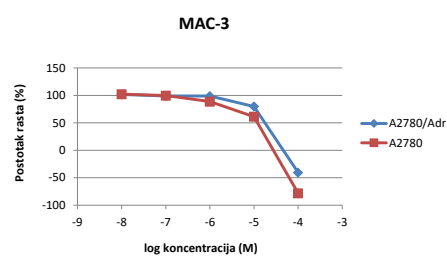
C)



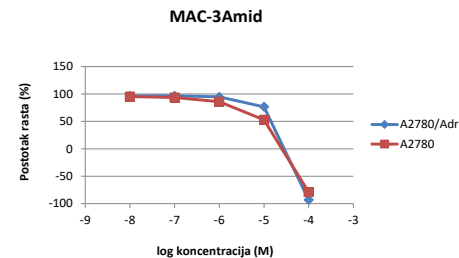
D)



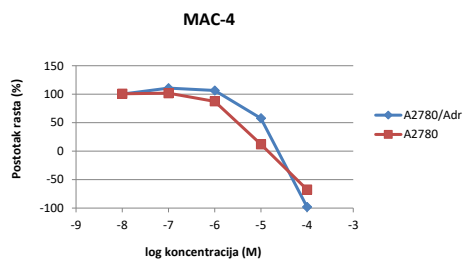
E)



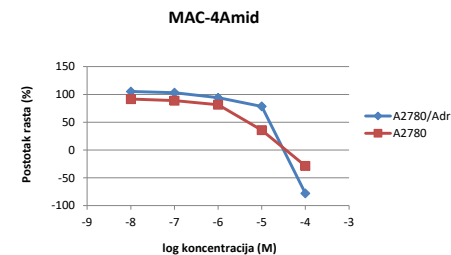
F)



G)

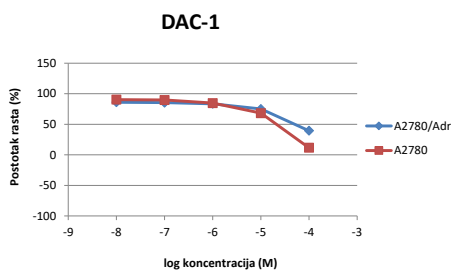


H)

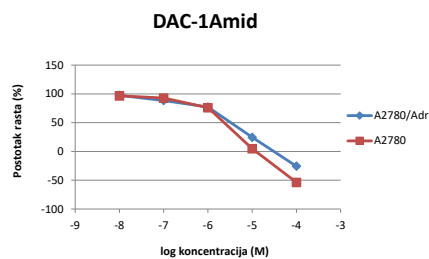


Slika 16. Krivulje preživljenja stanica A2780 i A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1 u odnosu na koncentraciju različitih monoaza-18-kruna-6 etera. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

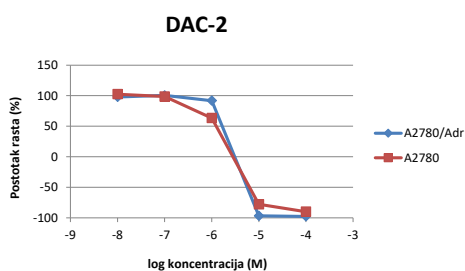
A)



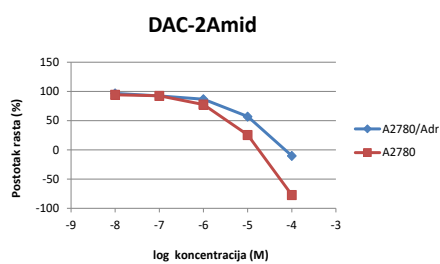
B)



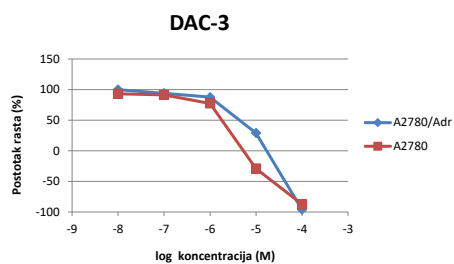
C)



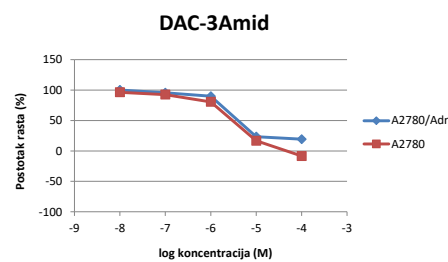
D)



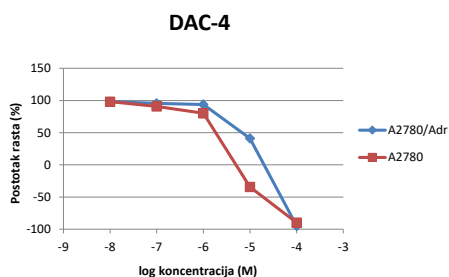
E)



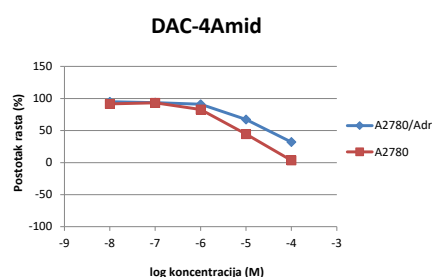
F)



G)



H)



Slika 17. Krivulje preživljenja stanica A2780 i A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1 u odnosu na koncentraciju različitih diaza-18-kruna-6 etera. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

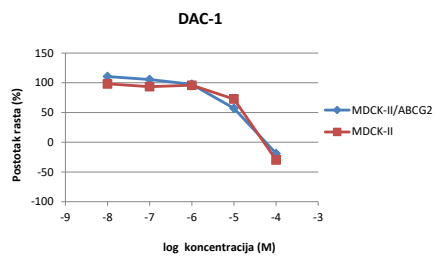
Tablica 7. Inhibicija rasta stanica A2780 i A2780/Adr uslijed tretmana mono- i diaza-18-kruna-6 eterima, prikazana kao vrijednost IC_{50} , određena testom MTT i izražena u μM .

Ime spoja	Struktura	IC_{50} (μM)	
		A2780	A2780/Adr
MAC-1		24±4	39±32
MAC-1Amid		19±12	58±44
MAC-2		12±1	26±6
MAC-2Amid		13±1	20±4
MAC-3		9±5	19±10
MAC-3Amid		11±1	14±0,9
MAC-4		3±1	11±0,1
MAC-4Amid		5±3	15±1
DAC-1		21±1,8	50±6
DAC-1Amid		2±,8	3±3
DAC-2		1±0,2	2±0,02
DAC-2Amid		5±1,7	20±5
DAC-3		2±0,5	8±2
DAC-3Amid		18±4	32±7
DAC-4		2±0,1	4±0,4
DAC-4Amid		18±3	46±15

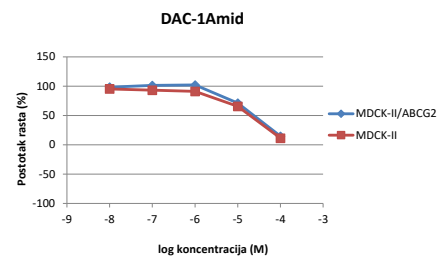
Iz rezultata je vidljivo da mono- i diaza-18-kruna-6 eteri različito inhibiraju rast obiju staničnih linija, te da su stanice A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1 nešto otpornije na tretman većinom spojeva od roditeljske stanične linije A2780. Nadalje, vidljivo je da diaza-18-kruna-6 eteri koji imaju amidnu vezu u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana pokazuju manju toksičnost od onih koji u svojoj strukturi nemaju amidnu vezu (DAC-2Amid, DAC-3Amid i DAC-4Amid spram DAC-1, DAC-2 i DAC-3). Izuzetak je spoj s najmanjim brojem ugljikovih atoma u poveznici, DAC-1Amid, koji inhibira rast pri nižim koncentracijama od DAC-1. Za razliku od njih, monoaza-18-kruna-6 eteri podjednako inhibiraju rast stanica, neovisno o razlikama u vrsti veze u poveznici između prstena krune i adamantana, ali je vidljivo da su spojevi koji imaju dulje bočne lance (s više ugljikovih atoma) i samim tim veću lipofilnost, aktivniji.

Antiproliferativnu aktivnost diaza-18-kruna-6 etera, čiju ćemo interakciju s transporterom ABCG2 proučavati u ovom radu, dodatno smo ispitali na staničnim linijama MDCK-II i PLB-985, te na MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 koje imaju prekomjernu ekspresiju proteina ABCG2. Rezultati su prikazani na slikama 18 i 19 te u tablicama 8 i 9.

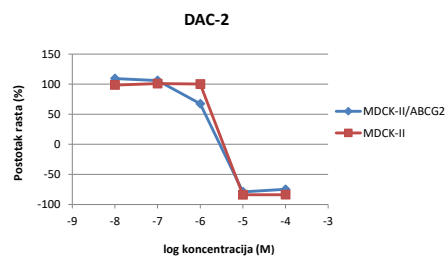
A)



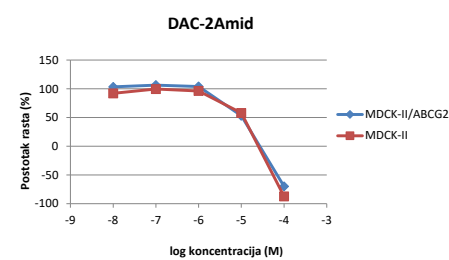
B)



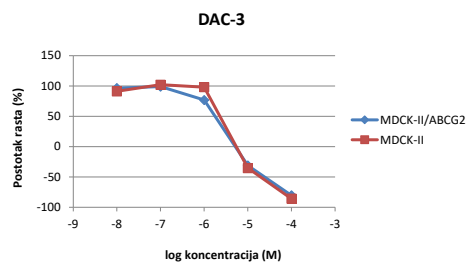
C)



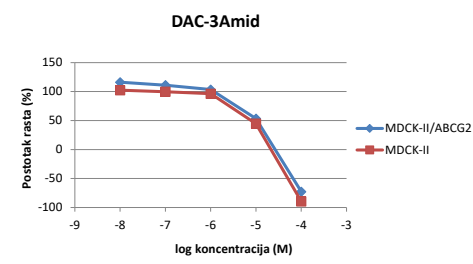
D)



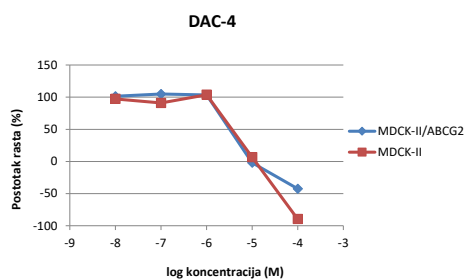
E)



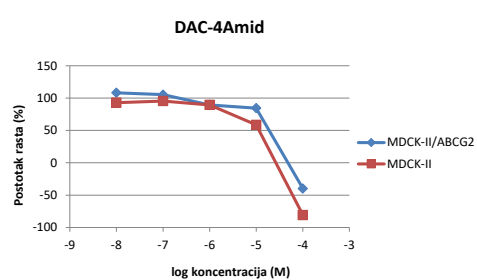
F)



G)

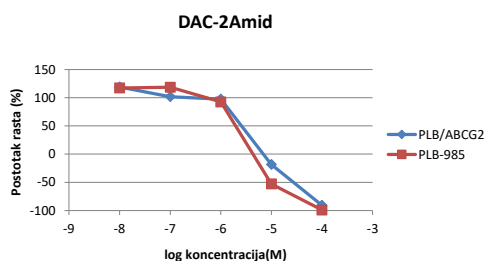


H)

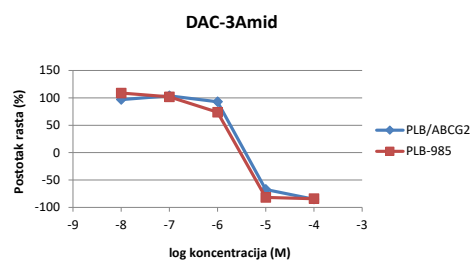


Slika 18. Krivulje preživljenja stanica MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 u odnosu na koncentraciju razčitih diaza-18-kruna-6 etera. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

A)



B)

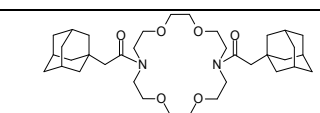
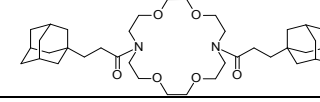


Slika 19. Krivulje preživljenja stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 u odnosu na koncentraciju DAC-2Amida (A) i DAC-3Amida (B). Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

Tablica 8. Inhibicija rasta stanica MDCK-II i MDCK-II/ABCG2 uslijed tretmana diaza-18-kruna-6 eterima, prikazana kao vrijednost IC_{50} , određena testom MTT i izražena u μM .

Spoj	Struktura	IC_{50} (μM)	
		MDCK-II	MDCK-II/ABCG2
DAC-1		$17 \pm 3,5$	$13 \pm 3,5$
DAC-1Amid		19 ± 5	$24 \pm 6,5$
DAC-2		$1,9 \pm 0,06$	$1 \pm 0,9$
DAC-2Amid		9 ± 6	9 ± 3
DAC-3		$2,5 \pm 0,8$	2 ± 1
DAC-3Amid		8 ± 3	$9 \pm 4,5$
DAC-4		$3,6 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,5$
DAC-4Amid		$11,3 \pm 3$	$18,9 \pm 4,5$

Tablica 9. Inhibicija rasta stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 uslijed tretmana diaza-18-kruna-6 eterima, prikazana kao vrijednost IC_{50} , određena testom MTT i izražena u μM .

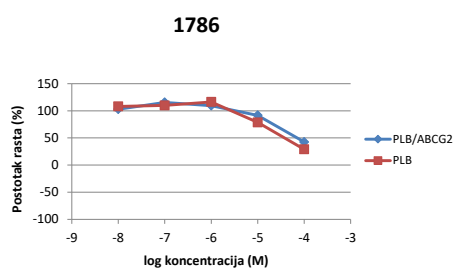
Spoj	Struktura	IC_{50} (μM)	
		PLB-985	PLB/ABCG2
DAC-2Amid		$2,02 \pm 0,08$	$2,8 \pm 1,5$
DAC-3Amid		$1,4 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,09$

Rezultati pokazuju da diaza-18-kruna-6 eteri s amidnom vezom slabije inhibiraju rast PLB-985 i MDCK-II u odnosu na spojeve s aminskom vezom. Međutim, za razliku od učinka spojeva na stanice A2780, ovi nam rezultati pokazuju da kod obje stanične linije diaza-18-kruna-6 eteri podjednako inhibiraju rast u roditeljskoj staničnoj liniji i liniji koja ima prekomjernu ekspresiju proteina ABCG2, neovisno o kemijskoj strukturi spoja. To sugerira da nevedeni spojevi nisu supstrati ABCG2, a moguće jesu supstrati ABCB1. Jedino u slučaju spoja DAC-4Amid, stanična linija MDCK-II/ABCG2 pokazuje nešto veću otpornost u usporedbi sa staničnom linijom MDCK-II (slika 18 H, tablica 8).

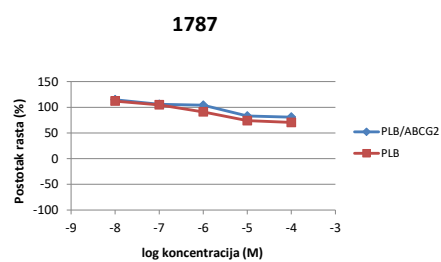
4.2.2. Antiproliferativna aktivnost fumardiamida primakina i halogenanilina i bis-urea primakina i halogenanilina

Antiproliferativnu aktivnost fumardiamida primakina i halogenanilina (spojeva 1786, 1787, 1788 i 1789) i bis-urea primakina i halogenanilina (1790 i 1791), spojeva čija će se interakcija s transporterima ABCG2 i ABCB1 također proučavati u ovom radu, ispitivali smo u staničnim linijama PLB-985 i PLB/ABCG2 testom MTT [201]. Rezultati su prikazani na slici 20 i u tablici 10.

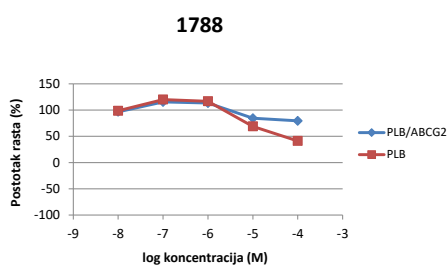
A)



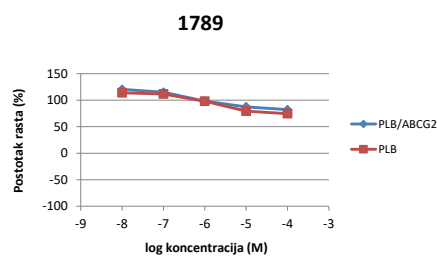
B)



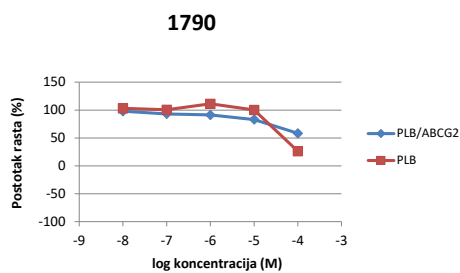
C)



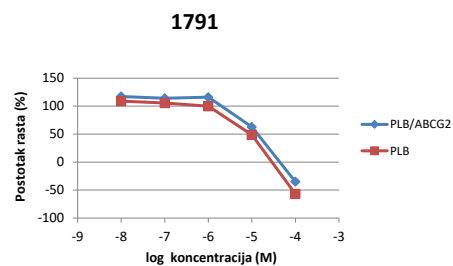
D)



E)



F)



Slika 20. Krivulje preživljenja stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 u odnosu na koncentraciju fumardiamida primakina i halogenanilina i *bis*-urea primakina i halogenanilina. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

Tablica 10. Inhibicija rasta stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 uslijed tretmana fumardiamidima primakina i halogenanilina te *bis*-urea primakina i halogenanilina, prikazana kao vrijednost IC₅₀, određena testom MTT i izražena u μM.

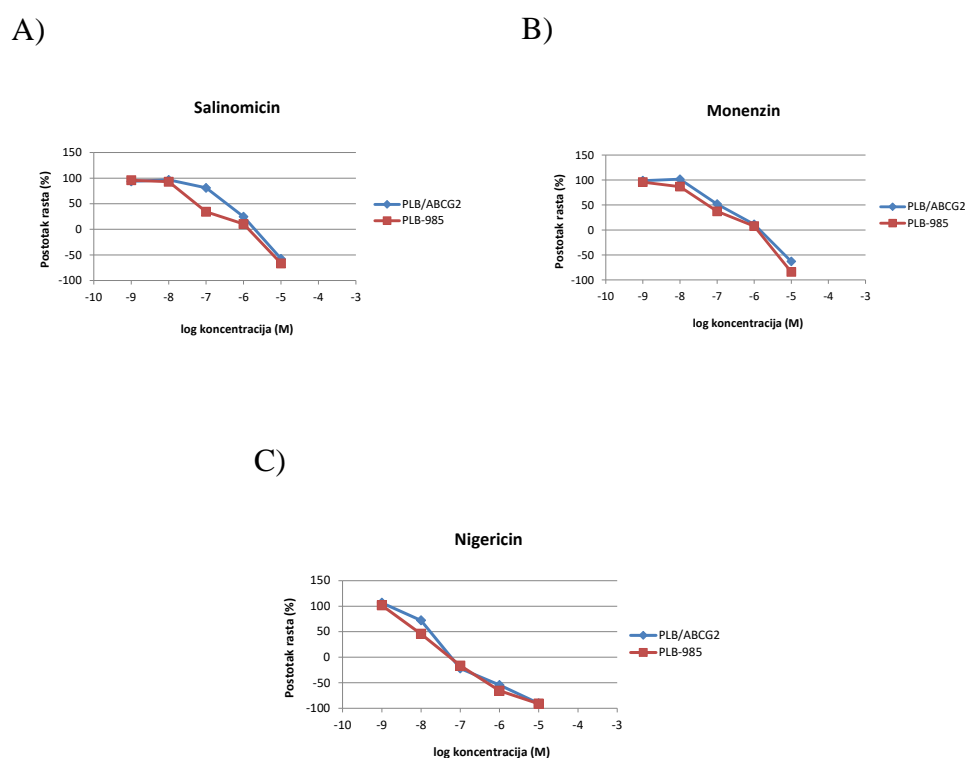
Spoj	Struktura	IC ₅₀ (μM)	
		PLB-985	PLB/ABCG2
1786		37,7 ± 0,7	68,6 ± 9,8
1787		≥100	≥100
1788		47,7 ± 14,9	≥100
1789		≥100	≥100
1790		43,8 ± 5,3	≥100
1791		9,37 ± 1,09	12,1 ± 6,1

Fumardiamidi primakina i halogenanilina 1787 i 1789, koji imaju kloridnu, odnosno, trifluorometilnu skupinu u *para*- položaju na benzenskom prstenu nisu pokazali značajnu inhibiciju rasta u testiranim koncentracijama niti u jednoj staničnoj liniji, za razliku od svojih analoga 1786 i 1788 koji iste skupine imaju u *meta*- položaju benzenskog prstena (slika 20 A-D, tablica 10). Derivat *bis*-urea primakina i halogenanilina 1791 pokazao je najveću inhibitornu aktivnost (s najnižom vrijednosti IC₅₀) koja je podjednaka u obje stanične linije (slika 20 F, tablica 10). Općenito, svi spojevi su pokazali podjednak inhibitorni učinak u obje stanične linije, osim spojeva 1788 i 1790, koji su pokazali slab inhibitorni učinak na rast stanične linije

PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom PLB-985, koja je pokazala veću osjetljivost na njih (slika 20 C i E, tablica 10).

4.2.3. Antiproliferativna aktivnost prirodnih ionofora

Antiproliferativni učinak prirodnih ionofora salinomicina, nigericina i monenzina, čija će se inhibitorna aktivnost spram transportera ABCG2 ispitati u ovom radu, ispitali smo na staničnim linijama PLB-985 i PLB/ABCG2. Vijabilnost stanica smo izmjerili nakon tretmana spojevima tijekom 72 h testom MTT, kako je već opisano. Rezultati su prikazani na slici 21 i u tablici 11.



Slika 21. Krivulje preživljenja stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 u odnosu na koncentraciju prirodnih ionofora. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

Tablica 11. Inhibicija rasta stanica PLB-985 i PLB/ABCG2 uslijed tretmana prirodnim ionoforima, prikazana kao vrijednost IC₅₀, određena testom MTT i izražena u μM.

Spoj	IC ₅₀ (μM)	
	PLB-985	PLB/ABCG2
Salinomycin	0,06 ± 0,03	0,34 ± 0,19
Monenzin	0,06 ± 0,01	0,111 ± 0,109
Nigericin	0,014 ± 0,007	0,02 ± 0,01

Prirodni ionofori pokazali su očekivan snažan utjecaj na inhibiciju rasta stanica, u skladu s literaturnim podacima [126]. Stanična linija PLB/ABCG2 se pokazala otpornijom na prirodni ionofor salinomycin spram roditeljske linije PLB-985 koja je na njega osjetljivija (slika 21 A, tablica 11), što može ukazivati na to da je salinomycin supstrat transportera ABCG2. Prirodni ionofori monenzin i nigericin djeluju inhibitorno na obje stanične linije podjednako (slika 21 B i C, tablica 11).

4.3. Utjecaj ispitivanih spojeva na aktivnost transportera ABCB1 i ABCG2

Kako bismo odredili inhibitorni potencijal spojeva na transportere ABCB1 i ABCG2, prvi korak je bio ispitati utjecaj spojeva na aktivnost transportera, odnosno, na transport njihovih supstrata. Funkcionalni testovi koje smo koristili u ovom istraživanju su testovi nakupljanja fluorescentnog supstrata unutar stanica u staničnim linijama A2780/Adr, MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 te test nakupljanja supstrata u izvrnutim membranskim vezikulama koje nose transporter ABCG2.

Princip korištenih testova je taj da se stanice ili vezikule s prekomjernom ekspresijom proteina ABCB1 ili ABCG2 inkubiraju s fluorescentnim supstratom i spojem od interesa, te se nakon određenog vremena prati fluorescencija supstrata unutar stanice/vezikule. Spojevi koji djeluju inhibitorno na transporter uzrokovat će zastoj u izbacivanju supstrata van stanice, te će doći do pojačanog nakupljanja fluorescencije unutar stanice. U slučaju izvrnutih membranskih vezikula, u kojima unutrašnjost vezikule odgovara izvanstaničnom dijelu membrane, spojevi koji imaju inhibitorno djelovanje na aktivnost transportera će zaustaviti transport supstrata u vezikulu, te će doći do značajnijeg smanjenja fluorescencije unutar vezikule.

Koristili smo koncentracije spojeva koje nisu toksične za stanice, a njih smo odredili na temelju rezultata dobivenih testiranjem antiproliferativnog učinka spojeva na pojedinu staničnu liniju. Osim toga, s obzirom da je vrijeme inkubacije u ovim testovima kratko (do jednog sata), mogućnost toksičnog učinka je mala čak i kod spojeva s nižim vrijednostima IC₅₀ izmjerenim

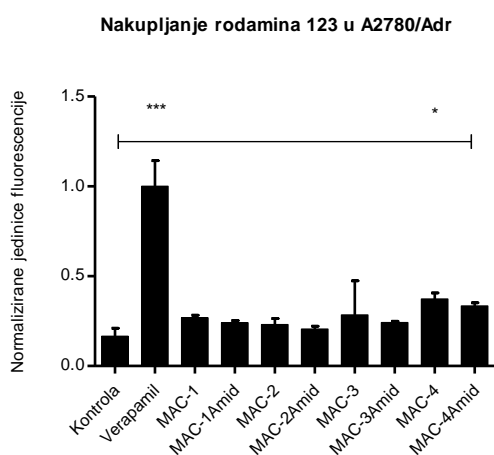
nakon 72 h. Vijabilnost stanica smo provjeravali i pod mikroskopom prije mjerenja fluorescencije na fluorimetru ili protočnom citometru. Kao kontrolne spojeve koristili smo literaturno poznate referentne inhibitore verapamil (za ABCB1) i Ko143 (za ABCG2).

4.3.1. Test nakupljanja supstrata transportera ABCB1 i ABCG2 u modelnim staničnim linijama

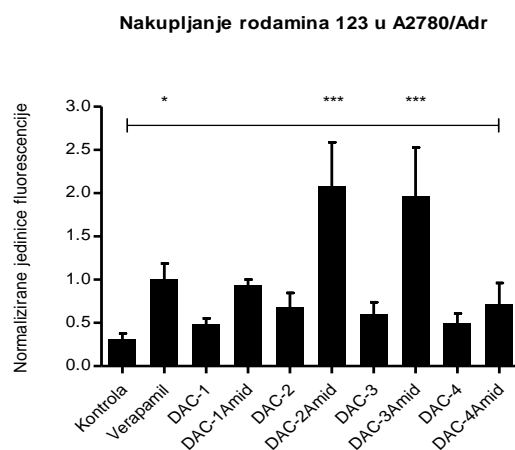
4.3.1.1. Transporter ABCB1

Inhibitorski potencijal monoaza- i diaza-18-kruna-6 etera na transporter ABCB1 ispitali smo pomoću testa nakupljanja fluorescentnih supstrata rodamina 123 i kalceina AM u staničnoj liniji A2780/Adr. Rezultati su prikazani na slici 22.

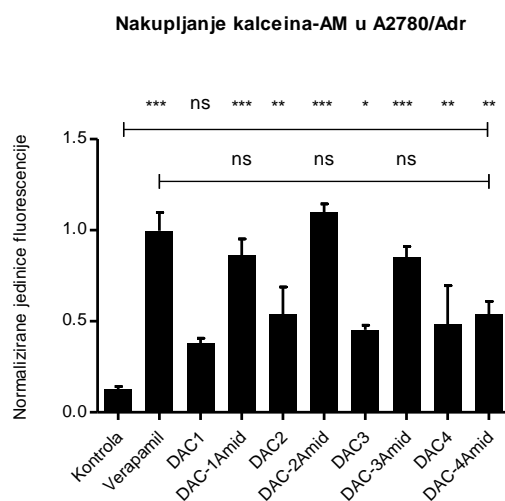
A)



B)



C)



Slika 22. Učinak krunastih etera na aktivnost transportera ABCB1. Prikazana je razina fluorescencije supstrata rodamina 123 (A, B) i kalceina AM (C) nakon izlaganja stanične linije A2780/Adr, monoaza- (A) i diaza- (B,C) 18-kruna-6 eterima te referentnom inhibitoru verapamilu u koncentraciji od 10 μM . Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

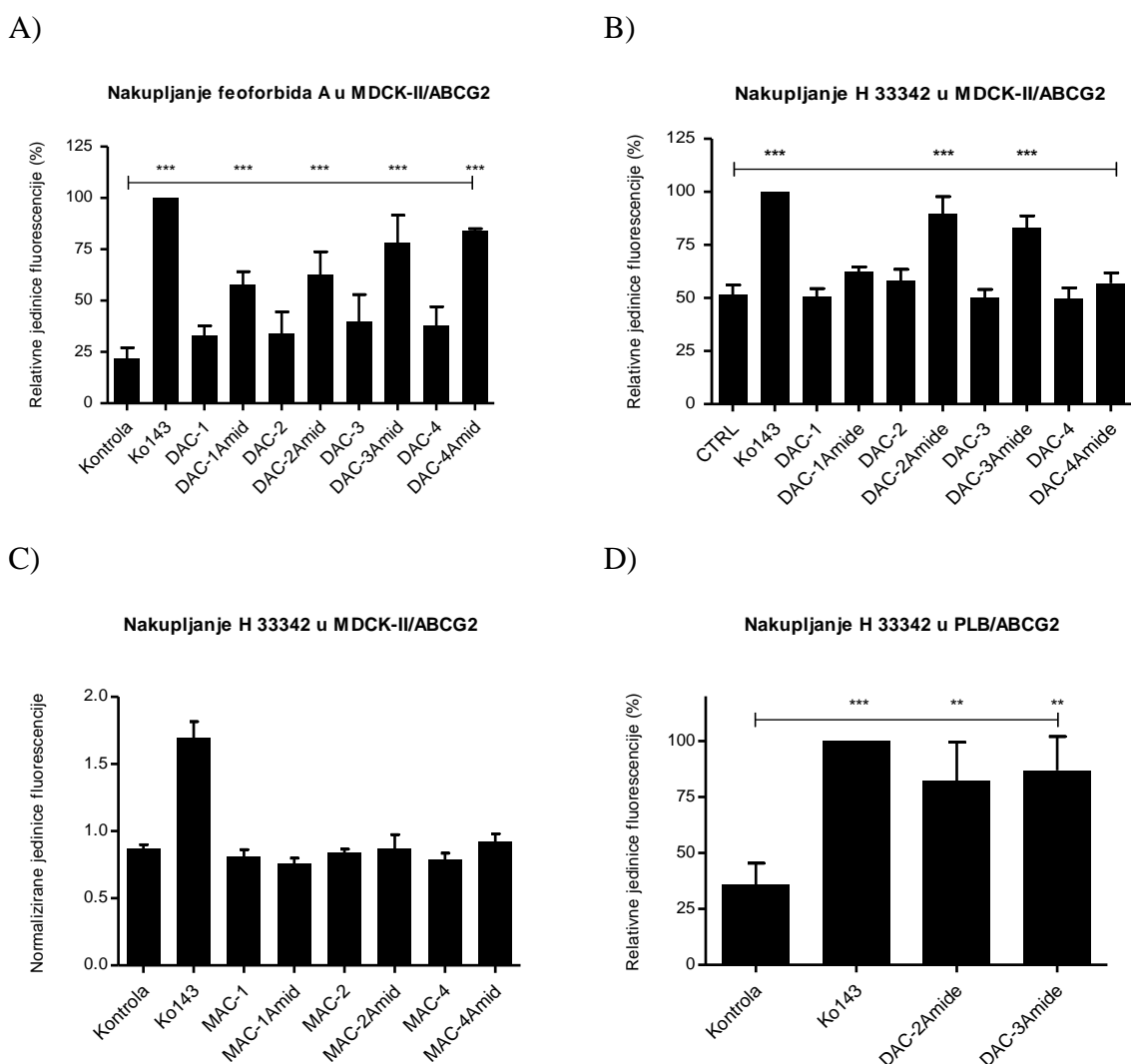
Iz rezultata je vidljivo da monoaza-18-kruna-6 eteri ne pokazuju inhibitorni potencijal spram transportera ABCB1 (slika 22 A). Spoj MAC-4 jedini je pokazao statistički značajno povećanje fluorescencije rodamina 123 u staničnoj liniji A2780/Adr, ali ono je daleko slabije od

povećanja koje se detektira nakon inhibicije transportera referentnim inhibitorom verapamilom.

S druge strane, svi diaza-18-kruna-6 eteri povećavaju fluorescenciju rodamina 123 unutar stanica, ali se dva spoja – DAC-2Amid i DAC-3Amid ističu po snažnom inhibitornom djelovanju koje je jače od onoga izazvanog verapamilom (slika 22 B). Inhibitorno djelovanje diaza-18-kruna-6 etera potvrđeno je i testom nakupljanja kalceina AM, kako bi se isključila mogućnost povećanja fluorescencije rodamina 123, koji se koristi u funkcionalnim testovima kao supstrat transportera ABCB1, uslijed promjene u membranskom potencijalu stanica, na što je ova boja osjetljiva [202]–[205]. Kalcein AM ne ovisi o membranskom potencijalu i na taj način je potvrđeno da je uzrok promjene u fluorescenciji interakcija testiranih spojeva s transporterom. Razlike u rezultatima između ova dva supstrata literaturno su poznate i očekivane, te ih možemo pripisati spomenutoj prirodi svakoga od njih [96]. U testu nakupljanja kalceina AM su svi testirani diaza-18-kruna-6 eteri pokazali povećanje fluorescencije u određenoj mjeri, ali su samo tri spoja – DAC-1Amid, DAC-2Amid i DAC-3Amid po jačini inhibicije bila usporediva s verapamilom.

4.3.1.2. Transporter ABCG2

Inhibitorni potencijal monoaza- i diaza-18-kruna-6 etera na transporter ABCG2 ispitali smo pomoću testa nakupljanja fluorescentnih supstrata feoforbida A i H 33342 u staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2, a rezultati su prikazani na slici 23.



Slika 23. Učinak krunastih etera na aktivnost transportera ABCG2. Prikazana je razina fluorescencije supstrata feoforbida A (A) i H 33342 (B-D) nakon izlaganja staničnih linija MDCK-II/ABCG2 (A, B, C) i PLB/ABCG2 (D), monoaza- (C) i diaza- (A, B, D) 18-kruna-6 eterima u koncentraciji od 10 μ M, te referentnom inhibitoru Ko143 u koncentraciji od 1 μ M. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. Rezultati su prikazani kao postotak nakupljenog supstrata u odnosu na 100%-tno nakupljanje pri maksimalnoj inhibiciji transportera uslijed djelovanja referentnog inhibitora Ko143 (A, B, D).

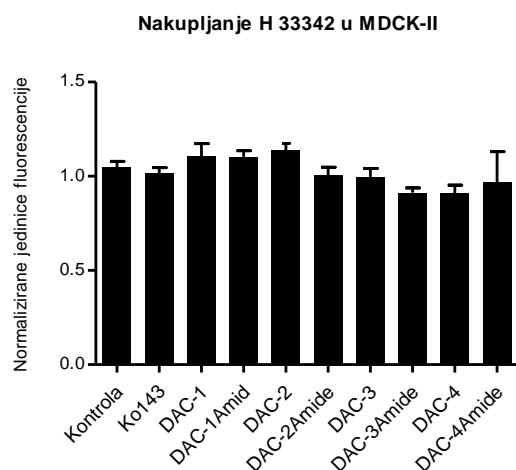
Rezultati testa nakupljanja fluorescentnog supstrata feoforbida A u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2 pokazuju da diaza-18-kruna-6 eteri koji imaju amidnu vezu u poveznici između eterskog prstena krune i bočnog ogranka adamantana djeluju inhibitorno na transporter ABCG2, dok njihovi analozi bez amidne veze u poveznici nisu imali učinak na povećanje fluorescencije unutar stanica (slika 23 A).

Navedeni su rezultati potvrđeni i testom nakupljanja fluorescentnog supstrata H 33342 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2 (slika 23 B), kao i u staničnoj liniji PLB/ABCG2 (slika 23 D). Međutim, spojevi DAC-1Amid i DAC-4Amid u ovom testu nisu pokazali statistički značajno povećanje fluorescencije, kao što je to bio slučaj u testu s feoforbidom A. Razlike koje postoje u rezultatima između dva testa su očekivane, jer se radi o dva supstrata koja imaju različitu brzinu prijenosa, pa se s obzirom na to i spojevi koji se natječu sa supstratom za vezno mjesto u transporteru vežu lakše ili teže.

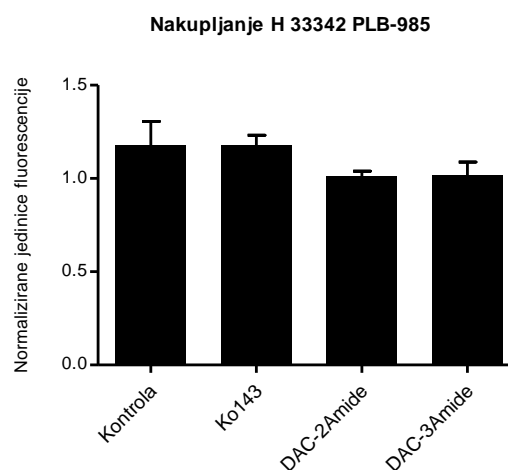
Inhibitorno djelovanje monoaza-18-kruna-6 etera na ABCG2 smo ispitali testom nakupljanja H 33342 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2, a iz rezultata je vidljivo da nijedan spoj nije imao učinak na povećanje nakupljanja fluorescentnog supstrata (slika 23 C).

Kako bismo potvrdili da je učinak diaza-18-kruna-6 etera na povećanje fluorescencije u stanicama s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 isključivo vezan za interakciju s transporterom, proveli smo test nakupljanja supstrata H 33342 i na roditeljskim staničnim linijama MDCK-II i PLB-985, a rezultati su prikazani na slici 24.

A)



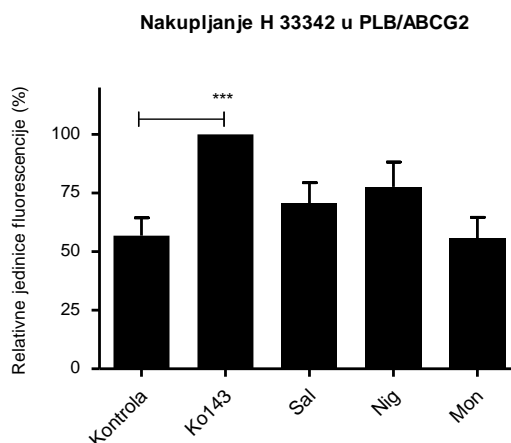
B)



Slika 24. Razina fluorescencije supstrata H 33342 nakon izlaganja roditeljskih staničnih linija MDCK-II (A) i PLB-985 (B) diaza-18-kruna-6 eterima u koncentraciji od 10 μ M, te referentnom inhibitoru Ko143 u koncentraciji od 1 μ M. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

U obje roditeljske stanične linije fluorescentni se supstrat nesmetano nakuplja tijekom vremena, neovisno o dodatku referentnog inhibitora Ko143 ili ispitivanog spoja, jer ove stanične linije nemaju transporter ABCG2 u membrani koji bi mogao izbaciti supstrat (slika 24).

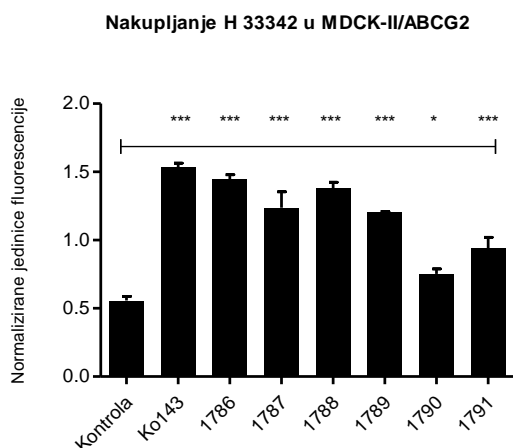
U ovom smo radu također ispitali sposobnost prirodnih ionofora salinomicina, monenzina i nigericina da inhibiraju transporter ABCG2. Dosadašnja istraživanja su pokazala da salinomicin djeluje inhibitory na transporter ABCB1 [128], [206], ali se o njegovoj interakciji s ABCG2 do sada ništa ne zna, kao ni za ostala dva ionofora. Sa ciljem ispitivanja njihovog inhibitorynog potencijala proveli smo test nakupljanja supstrata H 33342 na staničnoj liniji PLB/ABCG2, a rezultati su prikazani na slici 25. Rezultati pokazuju da niti jedan od testiranih prirodnih ionofora ne stupa u interakciju s transporterom ABCG2 i ne inhibira izbacivanje supstrata H 33342 izvan stanice.



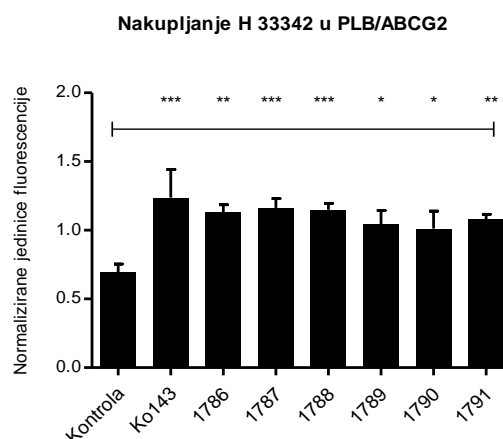
Slika 25. Razina fluorescencije supstrata H 33342 nakon izlaganja stanične linije PLB/ABCG2, s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2, prirodnim ionoforima u koncentraciji od 10 μ M, te referentnom inhibitoru Ko143 u koncentraciji od 1 μ M. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

Inhibitorni potencijal derivata antimalarika primakina - fumardiamida primakina i halogenanilina i *bis*-urea primakina i halogenanilina, kao i samih antimalarika primakina i klorokina na transporter ABCG2 ispitali smo pomoću testa nakupljanja fluorescentnog supstrata H 33342 u staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 [201], a rezultati su prikazani na slici 26.

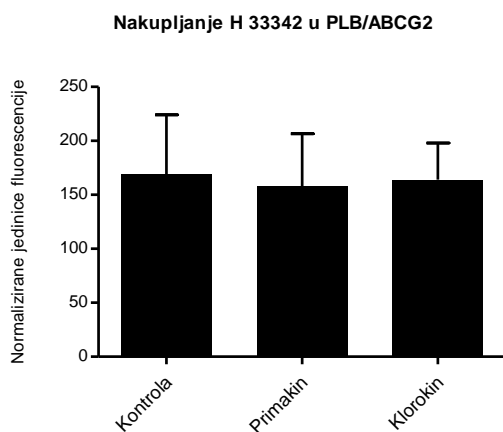
A)



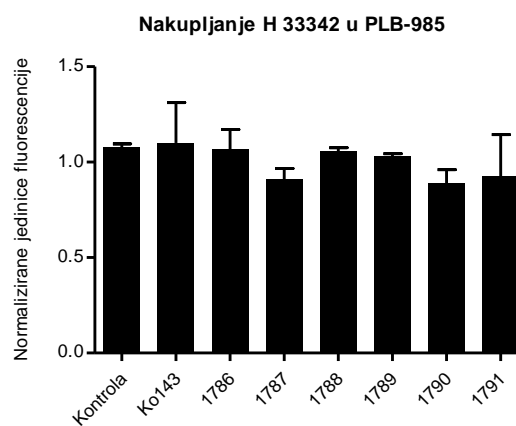
B)



C)



D)



Slika 26. Razina fluorescencije supstrata H 33342 nakon izlaganja staničnih linija MDCK-II/ABCG2 (A), PLB/ABCG2 (B, C) i roditeljske stanične linije PLB-985 (D) fumardiamidima primakina i halogenanilina i *bis*-urea primakina i halogenanilina (A, B), primakinu i klokinu (C) u koncentraciji od 10 μ M, te referentnom inhibitoru Ko143 u koncentraciji od 1 μ M. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvijezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

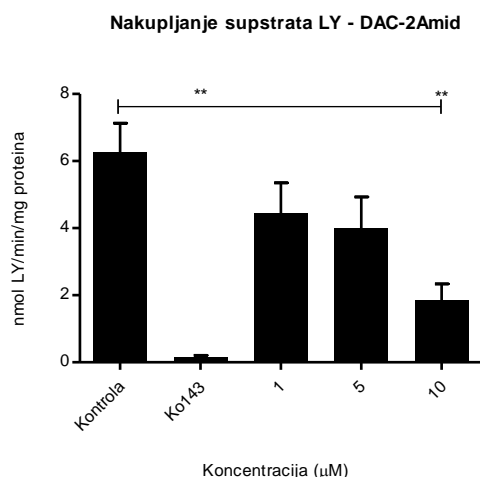
Svi testirani derivati primakina su pokazali snažan inhibitorski potencijal na transporter ABCG2 u obje stanične linije (slika 26 A i B), dok sami antimalarici primakin i klorokin nisu imali učinka na povećanje razine fluorescencije u stanicama (slika 26 C). Roditeljske stanične linije nisu pokazale razliku u nakupljanju fluorescentnog supstrata uslijed djelovanja testiranih spojeva (slika 26 D).

4.3.2. Test nakupljanja supstrata transportera ABCG2 u izvrnutim membranskim vezikulama

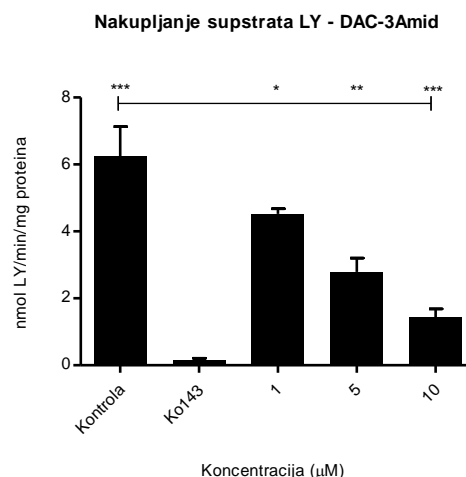
S obzirom da su spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid pokazali najjači inhibitorni potencijal od svih testiranih diaza-18-kruna-6 etera u funkcionalnim testovima nakupljanja supstrata u staničnim linijama s prekomjernom ekspresijom transportera ABCG2, u narednim smo se pokusima detaljnije fokusirali na ispitivanje njihovog učinka. Stoga smo njihov učinak također ispitali i u izvrnutim membranskim vezikulama koje u svojoj membrani imaju ABCG2. Izvrnute membranske vezikule inkubirali smo s fluorescentnim supstratom lucifer yellow (LY) i spojem od interesa tijekom 10 min uz dodatak ATP-a. Nakon zaustavljanja reakcije i ispiranja, vezikule smo filtrirali na filter pločicama i izdvojili u standardne mikrotitarske pločice s 96 jažica, nakon čega smo očitali fluorescenciju na fluorimetru.

Ukoliko spoj djeluje inhibitorno na transporter ABCG2, doći će do naglog smanjenja fluorescencije u unutrašnjosti vezikule koja odgovara izvanstaničnoj strani membrane. Iz rezultata na slici 27 vidljivo je da DAC-2Amid pokazuje inhibitorni učinak pri koncentraciji od 10 μM , dok spoj DAC-3Amid značajno smanjuje fluorescenciju supstrata LY unutar vezikula već pri koncentraciji od 1 μM .

A)



B)



Slika 27. Razina fluorescencije supstrata LY nakon inkubacije izvnutih membranskih vezikula koje nose transporter ABCG2 u membrani sa DAC-2Amidom i DAC-3Amidom u navedenim koncentracijama, te referentnim inhibitorom Ko143 u koncentraciji od 1 µM. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

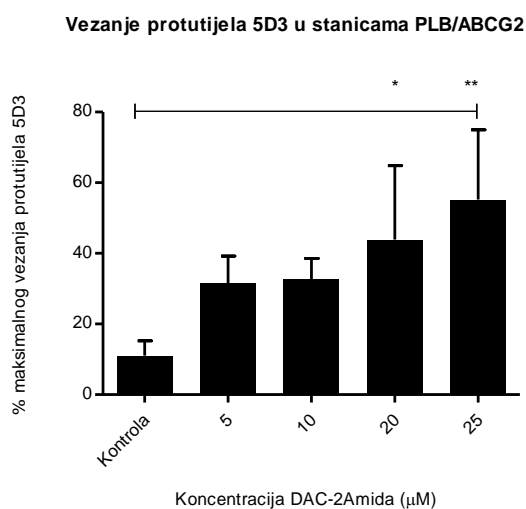
4.4. Utjecaj ispitivanih spojeva na vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3

Nakon što smo u prethodnim pokusima primjetili da određeni spojevi imaju inhibitorno djelovanje na transporter ABCG2, provjerili smo njihovu sposobnost modulacije transportera testom koji se temelji na vezanju konformacijski osjetljivog monoklonskog protutijela 5D3 na vanjski epitop proteina ABCG2 na površini stanica. Pokazano je da vezanje protutijela ovisi o konformaciji koju transporter zauzima prilikom interakcije s inhibitorom i supstratom, na način da je vezanje pojačano u slučaju interakcije s nekim od poznatih inhibitora poput Ko143, a smanjeno uslijed vezanja supstrata (osim kada je supstrat u visokim/inhibitornim koncentracijama) [186], [199].

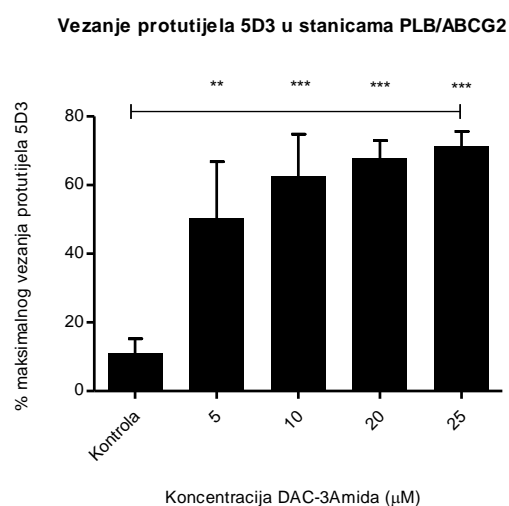
S obzirom na navedeno, test sa fluorescentno obilježenim protutijelom 5D3 može se koristiti za pouzdano mjerenje prirode interakcije testiranih spojeva i transportera ABCG2 pomoću metode protočne citometrije. Prilikom interakcije transportera i spoja koji na njega djeluje inhibitorno dolazi do povećanja fluorescencije što se detektira kao „pomak u 5D3“ (od eng. *5D3 shift*). U ovom smo radu ispitali inhibitorni potencijal DAC-2Amida, DAC-3Amida te

svih derivata primakina metodom protočne citometrije na staničnoj liniji PLB/ABCG2, nakon inkubacije tijekom 45 min uz primarno protutijelo 5D3 koje je naknadno inkubirano sa sekundarnim protutijelom obilježenim fluorescentno zelenom bojom. Rezultati su prikazani na slikama 28 i 29.

A)



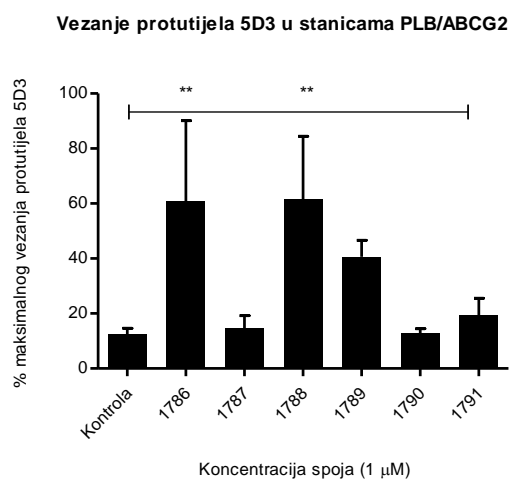
B)



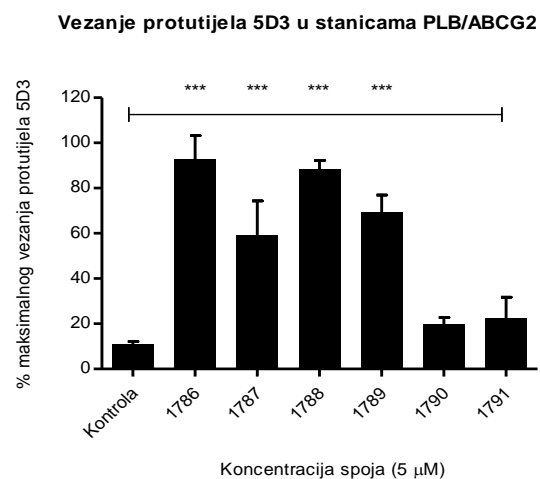
Slika 28. Utjecaj spojeva na vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3. Stanice PLB/ABCG2 tretirane su spojevima DAC-2Amid (A) i DAC-3Amid (B) u koncentracijama od 5, 10, 20 i 25 µM.

Rezultati su izraženi kao postotak maksimalnog vezanja protutijela, što odgovara tretmanu s referentnim inhibitorom Ko143 u koncentraciji od 1 µM. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

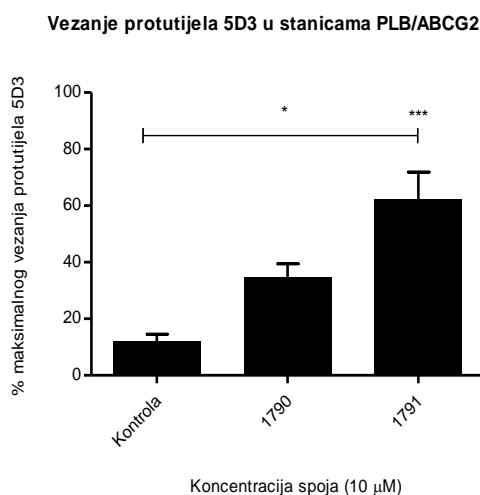
A)



B)



C)



Slika 29. Utjecaj spojeva na vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3. Stanice PLB/ABCG2 tretirane su spojevima 1786, 1787, 1788, 1789, 1790 i 1791 u koncentracijama od 1 µM (A), 5 µM (B) i 10 µM (C). Rezultati su izraženi kao postotak maksimalnog vezanja protutijela, što odgovara tretmanu s referentnim inhibitorom Ko143 u koncentraciji od 1 µM. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice označuju statističku značajnost u odnosu na negativnu kontrolu, određenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

Iz rezultata na slici 28 vidljivo je da spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid pojačavaju vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 u interakciji s transporterom ABCG2 na površini stanica PLB/ABCG2. Spoj DAC-3Amid je pokazao inhibitorski učinak već pri koncentraciji od 5 μM (slika 28 B), dok je spoj DAC-2Amid djelovao slabije i pojačao vezanje protutijela u koncentraciji od 20 μM (slika 28 A).

Inhibitorski potencijal derivata primakina smo testirali u koncentracijama od 1, 5 i 10 μM (slika 29). U slučaju fumardiamida primakina i halogenanilina, jedino su spojevi 1786 i 1788 značajno pojačali vezanje protutijela 5D3 u koncentraciji od 1 μM (slika 29 A), dok su u koncentraciji od 5 μM svi fumardiamidi primakina i halogenanilina (1786-1789) pokazali učinak, pri čemu je spoj 1786 doveo do gotovo maksimalnog vezanja protutijela koje je usporedivo s učinkom referentnog inhibitora Ko143 (slika 29 B).

Derivati *bis*-urea primakina i halogenanilina pojačali su vezanje konformacijski osjetljivog protutijela jedino u koncentraciji od 10 μM , pri čemu je spoj 1791 imao snažniji učinak od spoja 1790 (slika 29 C) [201].

4.5. Utjecaj ispitivanih spojeva na ATP-aznu aktivnost transportera ABCB1 i ABCG2

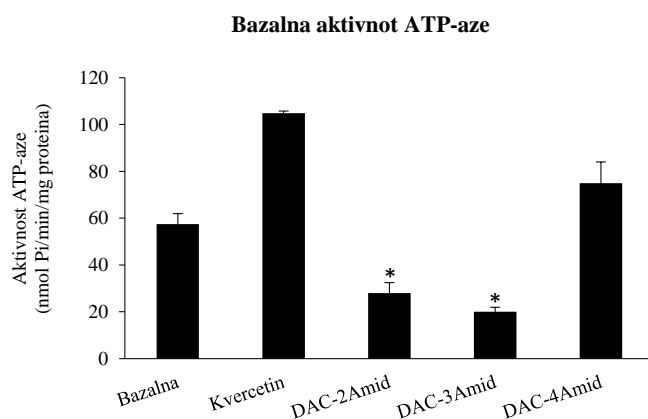
Ciklus prijenosa supstrata transportera ABC uključuje vezanje supstrata na vezno mjesto u transmembranskoj domeni, vezanje ATP-a na unutarstanične domene u kojima se odvija njegova hidroliza, te prijenos supstrata u izvanstanični prostor uslijed promjene konformacije transportera. U procesu transporta hidroliziraju se dvije molekule ATP-a u dva koraka, pri čemu se oslobađa anorganski fosfat, čiji nastanak je proporcionalan aktivnosti ATP-aze i može se pratiti kolorimetrijskim testom. Na taj način se može ispitati priroda interakcije nekog spoja s transporterom. Ukoliko je spoj supstrat transportera ABC aktivnost ATP-aze bit će povećana, a u slučaju da je inhibitor bit će značajno smanjena ili zaustavljena.

Stoga smo u ovom radu također mjerili aktivnost ATP-aze, a kako bismo detaljnije ispitali interakciju testiranih spojeva s transporterima, tj. provjerili jesu li oni njihovi inhibitori ili supstrati. Navedene smo analize proveli u izvrnutim membranskim vezikulama koje u svojoj membrani imaju transporter ABCB1 ili ABCG2 uz dodatak referentnog inhibitora, testiranih spojeva i ATP-a. Reakciju smo inkubirali 20 min, zaustavili te smo nakon kolorimetrijske reakcije izmjerili apsorbanciju na spektrofotometru i odredili količina oslobođenog fosfata.

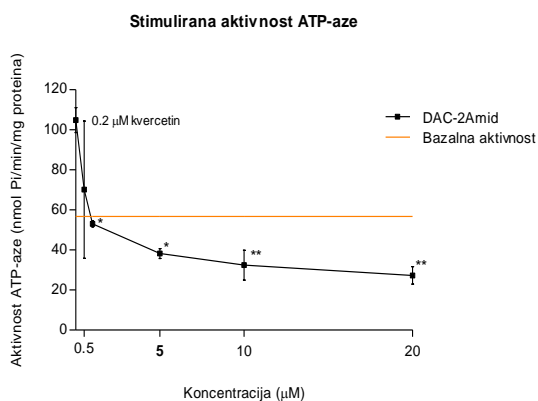
S obzirom da je inhibicija ATP-azne aktivnosti transportera ABCB1 za DAC-2Amid i DAC-3Amid ranije već pokazana [96], u ovom radu smo ispitali prirodu njihove interakcije s

transporterom ABCG2, uz spoj DAC-4Amid koji je također pokazao inhibični potencijal u testovima nakupljanja supstrata. Također smo ispitali i prirodu interakcije derivata primakina 1786, 1787 i 1789 na ATP-aznu aktivnost oba transportera - ABCB1 i ABCG2. Rezultati su prikazani na slikama 30, 31 i 32.

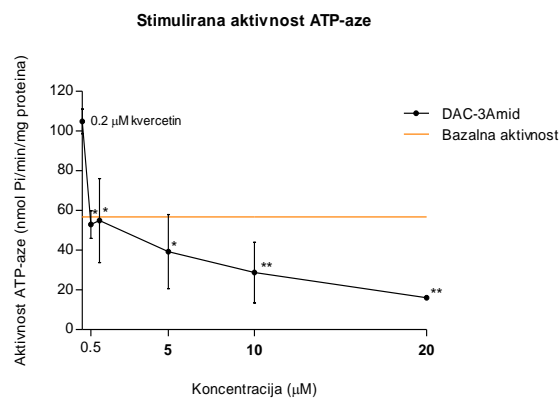
A)



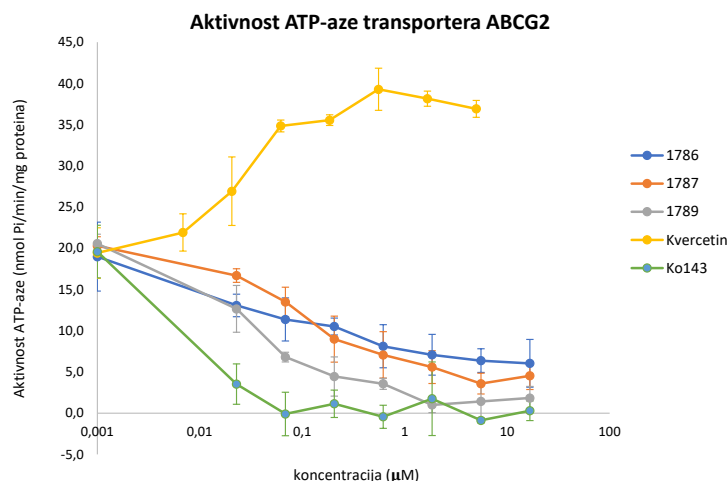
B)



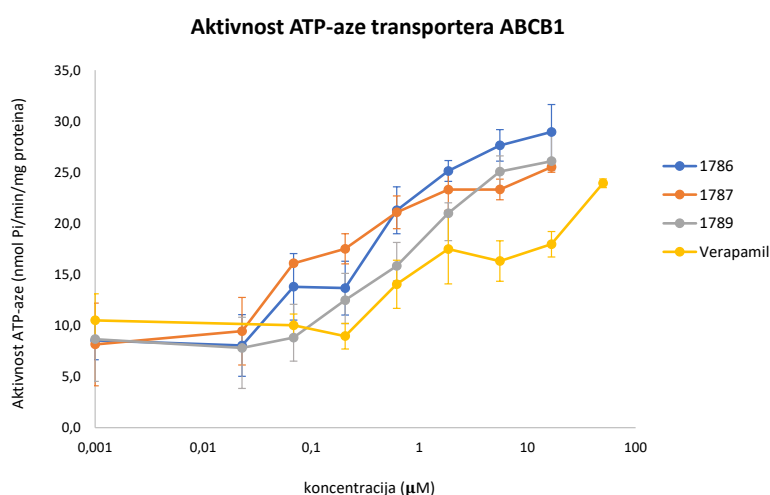
C)



Slika 30. Utjecaj DAC-2Amida, DAC-3Amida i DAC-4Amida na ATP-aznu aktivnost mjerenu u izvrnutim membranskim vezikulama koje sadrže protein ABCG2. Prikazan je utjecaj na bazalnu aktivnost u koncentraciji spojeva od 5 µM (A) i stimuliranu supstratom kvercetinom u različitim koncentracijama spojeva (B, C). Razina bazalne ATP-azne aktivnosti transportera označena je narančastom linijom. Histogrami prikazuju srednju vrijednost dva nezavisna pokusa rađena u triplikatima ± standardna devijacija (SD).



Slika 31. Utjecaj 1786, 1787 i 1789 na bazalnu ATP-aznu aktivnost mjerenu u izvrnutim membranskim vezikulama koje sadrže protein ABCG2. Ispitan je raspon koncentracije spojeva, referentnog inhibitora Ko143 (0,02, 0,05, 0,2, 0,5, 2, 5, 20 μM) i supstrata kvercetina (0,01, 0,02, 0,05, 0,2, 0,5, 2, 5 μM). Vrijednost bazalne aktivnosti ATP-aze transportera označena je kao početak svake linije u grafu i iznosi oko 20 nmol Pi/min/mg proteina. Rezultati prikazuju srednju vrijednost tri nezavisna pokusa rađena u triplikatima \pm SD.



Slika 32. Utjecaj 1786, 1787 i 1789 na bazalnu ATP-aznu aktivnost mjerenu u izvrnutim membranskim vezikulama koje sadrže protein ABCB1. Ispitan je raspon koncentracije testiranih spojeva (0,02, 0,05, 0,2, 0,5, 2, 5, 20 μM) i inhibitora/supstrata verapamila (0,05, 0,2, 0,5, 2, 5, 20, 50 μM). Vrijednost bazalne aktivnosti ATP-aze transportera označena je kao početak svake linije u grafu i iznosi oko 9 nmol Pi/min/mg proteina. Rezultati prikazuju srednju vrijednost tri nezavisna pokusa rađena u triplikatima \pm SD.

Rezultati pokazuju da spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid značajno smanjuju bazalnu aktivnost ATP-aze, dok spoj DAC-4Amid nije imao učinka. Bazalna aktivnost transportera označava aktivnost ATP-aze u odsustvu supstrata i već je poznato da izolirane membranske vezikule koje sadrže transportere ABC pokazuju određenu razinu bazalne aktivnosti [183], [207]–[210]. Ta je aktivnost veća u vezikulama koje sadrže transporter ABCG2 od onih koje imaju ABCB1, a pretpostavlja se da dolazi od endogene stimulacije transportera zbog prisutnosti određenih lipida ili derivata lipida u staničnim membranama [50].

Supstrati transportera ABC stimuliraju bazalnu aktivnost ATP-aze pa se tako može pratiti i utjecaj ispitivanih spojeva na stimuliranu aktivnost koja je postignuta dodatkom supstrata u niskim koncentracijama u sve uzorke. Takva istraživanja se rade u slučajevima kada je bazalna aktivnost ATP-aze jako niska, kako bi se bolje vidio inhibitorski učinak spoja. U ovom istraživanju smo izmjerili utjecaj DAC-2Amida i DAC-3Amida na stimuliranu aktivnost ATP-aze u prisutnosti supstrata transportera ABCG2 – kvercetin, u koncentraciji od 0,2 μM . Vidljivo je da oba spoja snižavaju aktivnost kvercetinom stimulirane ATP-azne aktivnosti već pri niskim koncentracijama. DAC-3Amid je pokazao učinak pri koncentraciji od 0,5 μM (slika 30 B i C). Premda u ovom slučaju nije bilo potrebno mjeriti utjecaj na stimuliranu aktivnost ATP-aze, jer je bazalna aktivnost u vezikulama s ABCG2 visoka, ovaj test smo proveli kao dodatnu potvrdu da testirani spojevi djeluju inhibitorski na aktivnost ATP-aze transportera ABCG2.

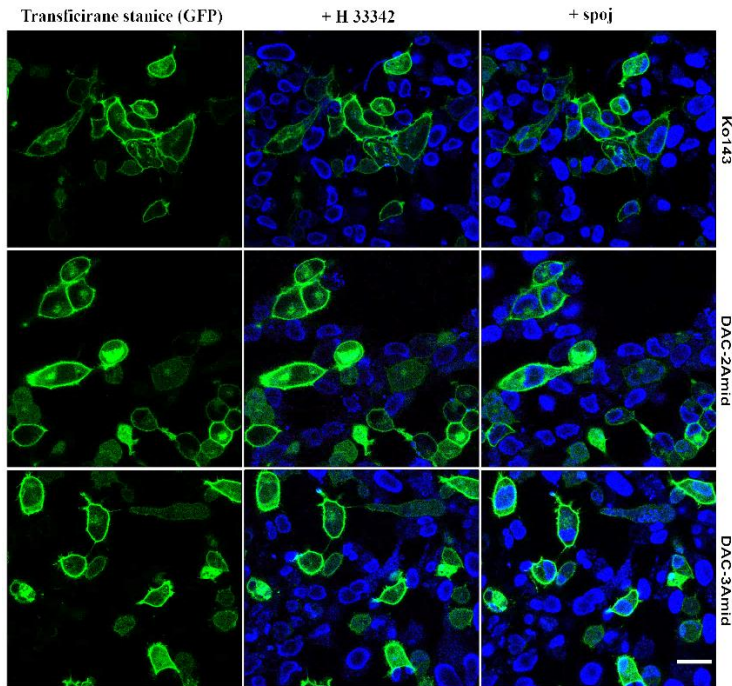
Istražili smo i utjecaj spojeva 1786, 1787 i 1789 na bazalnu aktivnost ATP-aze transportera ABCG2, te je iz rezultata vidljivo da su svi spojevi već u koncentraciji od 0,2 μM spustili razinu bazalne aktivnosti ATP-aze najmanje dvostruko, dok je spoj 1789 u toj koncentraciji spustio bazalnu aktivnost četverostruko. Isti je spoj dostigao učinak referentnog inhibitora Ko143 u koncentraciji od 2 μM . Referentni inhibitor Ko143 je u najmanjoj koncentraciji, 0,02 μM spustio razinu bazalne aktivnosti četverostruko, dok testirani spojevi nisu imali značajan učinak u toj koncentraciji. Supstrat kvercetin je pokazao snažnu stimulaciju aktivnosti ATP-aze (slika 31).

Kada smo testirali učinak spojeva 1786, 1787 i 1789 na bazalnu aktivnost ATP-aze transportera ABCB1, dobiveni rezultati su pokazali da spojevi snažno stimuliraju bazalnu aktivnost u usporedbi sa poznatim inhibitorom transportera ABCB1 – verapamilom, za kojeg je također pokazano da može stimulirati ATP-aznu aktivnost jer je i supstrat transportera ABCB1 [96]. Spojevi 1786 i 1787 su stimulirali bazalnu aktivnost dvostruko pri koncentraciji od 0,5 μM , a spoj 1789 pri 2 μM , što je snažnije od učinka kojeg je pokazao supstrat verapamil (slika 32).

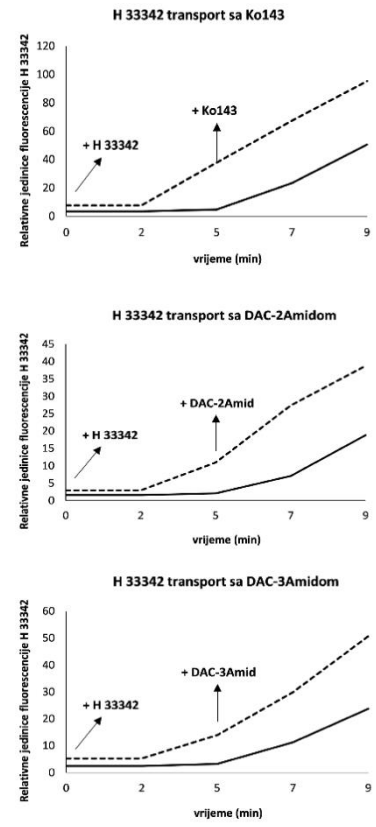
4.6. Kinetika transporta supstrata u stvarnom vremenu u stanicama HEK-EGFP-G2

U daljnjem smo istraživanju pratili utjecaj spojeva na kinetiku transporta fluorescentnog supstrata H 33342 u stvarnom vremenu u stanicama HEK-EGFP-G2, transficiranim plazmidom koji nosi *ABCG2* obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP). Testirali smo izabrane spojeve DAC-2Amid, DAC-3Amid, 1786, 1787 i 1789, koji su pokazali najveći inhibički potencijal na transporter *ABCG2* u nizu prethodnih testova. Stanice smo na temelju zelene fluorescencije podijelili na one koje su transficirane i one koje nisu, te smo pratili kinetiku transporta H 33342 u vremenskim točkama metodom konfokalne mikroskopije u oba tipa stanica na temelju plavog obojenja jezgre, kako je opisano u [211] (slika 33). Dodatno smo pratili i utjecaj spojeva na transport supstrata mitoksantrona, koji fluorescira kada se nađe u lipidnom okruženju [60]. Rezultati koje smo dobili sa spojem DAC-3Amidom su prikazani na slici 34.

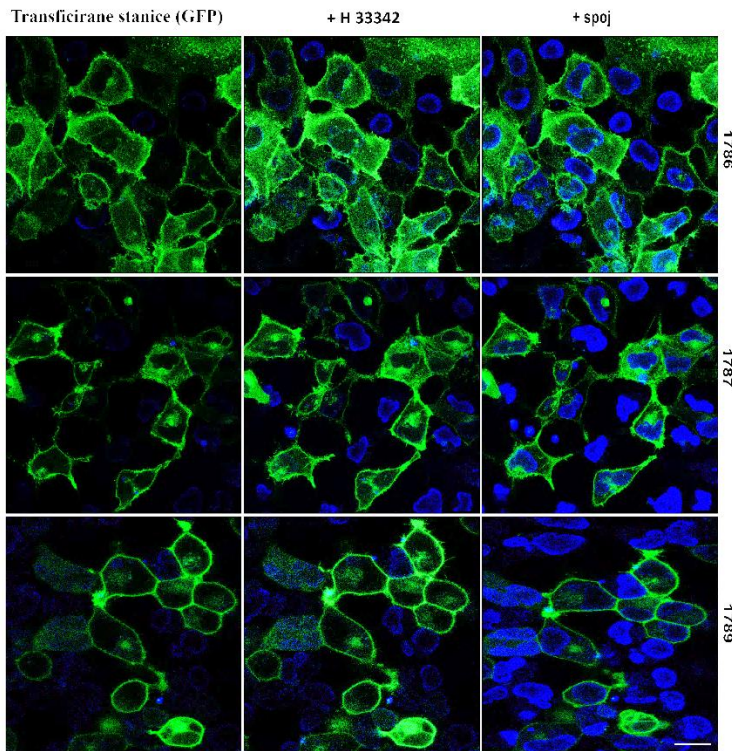
A)



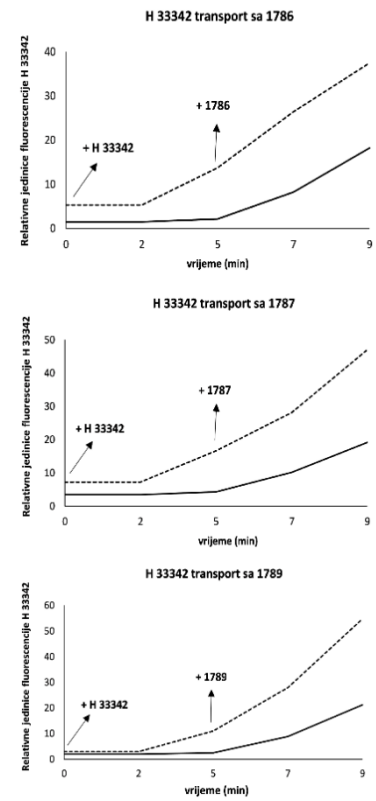
B)



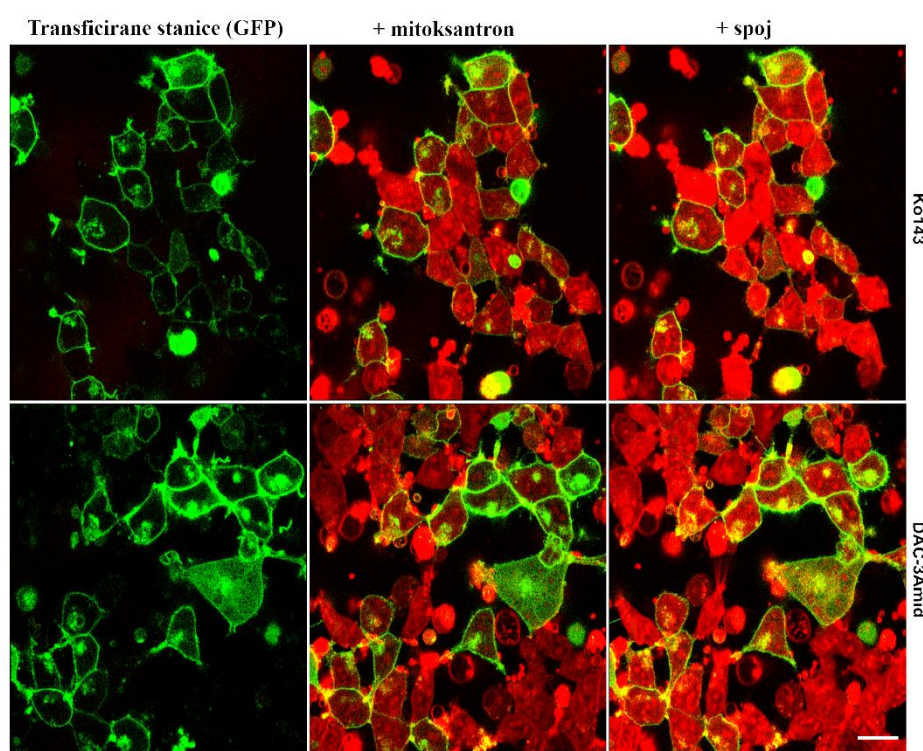
C)



D)



Slika 33. Transport H 33342 u HEK-EGFP-G2 staničnoj liniji transficiranoj plazmidom koji nosi *ABCG2* fuzioniran s genom za zeleni fluorescentni protein (EGFP). Lijevi stupac predstavlja zeleno obojenje u stanicama koje su transficirane genom za protein *ABCG2* i one koje ne pokazuju zeleno obojenje (netransficirane). Srednji stupac prikazuje stanice nakon dodatka fluorescentnog supstrata H 33342 – plavi spektar (nakon 5 min od dodatka). Desni stupac prikazuje stanice nakon dodatka referentnog inhibitora Ko143 u koncentraciji od 1 μM i spojeva DAC-2Amida, DAC-3Amida, 1786, 1787 i 1789 u koncentraciji od 5 μM (A, C). Marker predstavlja duljinu od 25 μm . Krivulje kinetike unutarstaničnog nakupljanja supstrata H 33342 su prikazane pod B i D u transficiranim (pune linije) i netransficiranim (isprekidane linije) stanicama.



Slika 34. Transport mitoksantrona (MX) u HEK-EGFP-G2 staničnoj liniji transficiranoj plazmidom koji nosi *ABCG2* fuzioniran s genom za zeleni fluorescentni protein (EGFP). Lijevi stupac predstavlja zeleno obojenje u stanicama koje su transficirane genom za protein *ABCG2* i one koje ne pokazuju zeleno obojenje (netransficirane). Srednji stupac prikazuje stanice nakon dodatka fluorescentnog supstrata MX – daleki crveni spektar (nakon 5 min od dodatka). Desni stupac prikazuje stanice nakon dodatka referentnog inhibitora Ko143 u koncentraciji od 1 μM te spoja DAC-3Amida u koncentraciji od 5 μM . Marker predstavlja duljinu od 25 μm .

Stanice koje su transficirane plazmidom koji nosi *ABCG2* emitiraju zelenu fluorescenciju i razlikuju se od netransficiranih stanica koje nemaju fluorescenciju i nisu vidljive (slika 33 A, C, slika 34). Nakon dodavanja fluorescentnog supstrata H 33342 (slika 33 A, C) ili mitoksantrona, (slika 34) tijekom nekog vremena dolazi do nakupljanja supstrata u netransficiranim stanicama, što je vidljivo kao porast plave, odnosno, crvene fluorescencije. U transficiranim stanicama nije detektirana značajna fluorescencija supstrata, zbog prisutnosti transportera *ABCG2* koji ga izbacuje van. U slučaju mitoksantrona mali dio ulazi i u transficirane stanice, ali u puno manjoj mjeri nego u netransficirane. Dodatkom referentnog inhibitora Ko143 i DAC-2Amida ili DAC-3Amida 5 min nakon dodavanja supstrata dolazi do naglog porasta fluorescencije unutar transficiranih stanica uslijed inhibicije *ABCG2*, dok dodatak spojeva nema nikakav učinak na nakupljanje fluorescentnog supstrata u netransficiranim stanicama što je vidljivo iz krivulja kinetike transporta za supstrat hoechst 33342 (slika 33 B). S obzirom da H 33342 emitira fluorescenciju tek u kontaktu s DNA u jezgri stanice i nije vidljiv u transficiranim stanicama, te je kvantifikacija slika jednostavnija i preciznija pomoću programa ImageJ, krivulje kinetike transporta su napravljene za ovaj supstrat.

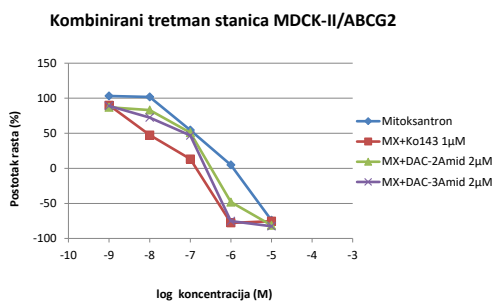
4.7. Povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik

Na temelju rezultata testova citotoksičnosti, nakupljanja fluorescentnog supstrata, vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 i aktivnosti ATP-aze transportera *ABCG2*, došli smo do zaključka da spojevi DAC-2Amid, DAC-3Amid, te derivati primakina 1786, 1787 i 1789 pokazuju svojstva potencijalnih inhibitora transportera *ABCG2*. Kako bismo dokazali da navedeni spojevi povećavaju osjetljivost tumorskih staničnih linija s prekomjernom ekspresijom transportera *ABCG2* na kemoterapeutik tako da inhibiraju *ABCG2*, tretirali smo stanice kombinacijom kemoterapeutika mitoksantrona, supstrata transportera *ABCG2*, i ispitivanog spoja.

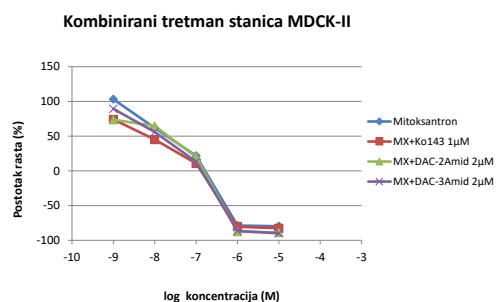
Stanična linija epitela distalnog tubula nefrona bubrega psa - MDCK-II/*ABCG2*, koja služi kao model stanica s prekomjernom ekspresijom proteina *ABCG2* i tumorska stanična linija PLB/*ABCG2* te roditeljske stanične linije MDCK-II i PLB-985, korištene kao kontrola, tretirane su tijekom 72 h kombinacijom mitoksantrona u određenom rasponu koncentracija i ranije navedenih diaza-18-kruna-6 etera ili derivata primakina u koncentraciji koja nije toksična za stanice. Ukoliko spoj djeluje inhibitory na transporter, doći će do povećanja

koncentracije mitoksantrona unutar stanice jer je zaustavljeno njegovo izbacivanje iz stanice, te će biti potrebna manja koncentracija mitoksantrona kako bi se postigla 50%-tna inhibicija rasta stanica. Rezultati su izraženi kao vrijednosti IC_{50} određene testom MTT i prikazani na slikama 35 i 36 te u tablicama 12 i 13.

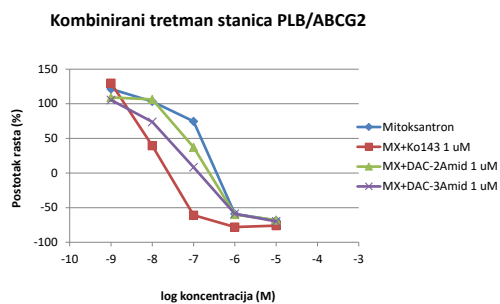
A)



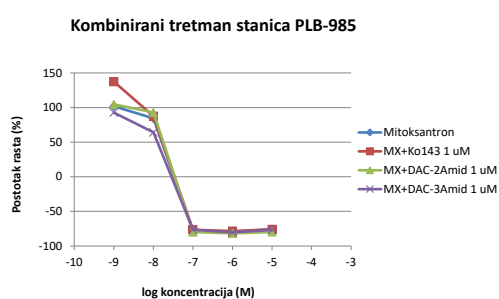
B)



C)

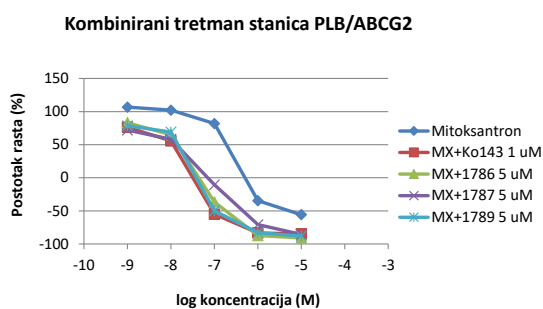


D)

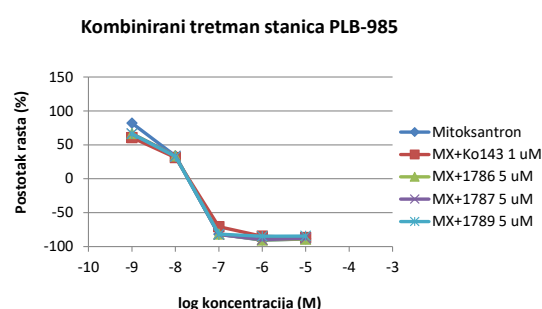


Slika 35. Krivulje preživljenja staničnih linija MDCK-II/ABCG2 (A) i PLB/ABCG2 (C) s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 i roditeljskih staničnih linija MDCK-II (B) i PLB-985 (D) u odnosu na koncentraciju kemoterapeutika mitoksantrona (MX). Prikazani su rezultati kombiniranog tretmana mitoksantronom u rasponu koncentracija (100, 10, 1, 0,1 i 0,01 μ M) i spojevima DAC-2Amid i DAC-3Amid u koncentraciji od 1 μ M (C i D) ili 2 μ M (A i B). Referentni inhibitor Ko143 u koncentraciji od 1 μ M je korišten kao kontrola. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

A)



B)



Slika 36. Krivulje preživljenja stanične linije PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 (A) i roditeljske stanične linije PLB-985 (B) u odnosu na koncentraciju kemoterapeutika mitoksantrona (MX). Prikazani su rezultati kombiniranog tretmana mitoksantronom u rasponu koncentracija (100, 10, 1, 0,1 i 0,01 μM) i spojevima 1786, 1787 i 1789 u koncentraciji od 5 μM . Referentni inhibitor Ko143 u koncentraciji od 1 μM korišten je kao kontrola. Pokusi su rađeni u tetraplikatima, svaka točka predstavlja srednju vrijednost najmanje tri nezavisna pokusa.

Tablica 12. Povećanje osjetljivosti staničnih linija MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 na kemoterapeutik mitoksantron (MX) u kombiniranom tretmanu mitoksantronom, referentnim inhibitorom Ko143 i spojevima DAC-2Amid i DAC-3Amid, prikazana kao vrijednost IC_{50} , određena testom MTT i izražena u μM .

Spoj	IC_{50} (μM)			
	PLB-985	PLB/ABCG2	MDCK-II	MDCK-II/ABCG2
Mitoksantron	0,02 \pm 0,002	0,15 \pm 0,06	0,02 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02
+ Ko143 (1 μM)	0,02 \pm 0,001	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,001	0,01 \pm 0,001
+ DAC-2Amid (1 μM)	0,02 \pm 0,0003	0,07 \pm 0,03	-	-
+DAC-3Amid (1 μM)	0,02 \pm 0,001	0,02 \pm 0,00	-	-
+ DAC-2Amid (2 μM)	-	-	0,02 \pm 0,01	0,08 \pm 0,03
+DAC-3Amid (2 μM)	-	-	0,01 \pm 0,004	0,04 \pm 0,02

Tablica 13. Povećanje osjetljivosti stanične linije PLB/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 na kemoterapeutik mitoksantron (MX) u kombiniranom tretmanu mitoksantronom, referentnim inhibitorom Ko143 (1 μ M) i spojevima 1786, 1787 i 1789 (5 μ M) prikazana kao vrijednost IC₅₀, određena testom MTT i izražena u μ M.

Spoj	IC ₅₀ (μ M)	
	PLB-985	PLB/ABCG2
Mitoksantron	0,005 \pm 0,001	0,18 \pm 0,10
+ Ko143	0,003 \pm 0,002	0,009 \pm 0,004
+ 1786	0,003 \pm 0,001	0,01 \pm 0,01
+ 1787	0,003 \pm 0,0	0,01 \pm 0,0
+ 1789	0,003 \pm 0,001	0,01 \pm 0,0

Sposobnost spojeva DAC-2 i DAC-3Amida da povećaju osjetljivost staničnih linija koje imaju prekomjernu ekspresiju proteina ABCG2 na kemoterapeutik mitoksantron ispitana je na staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2. Iz rezultata prikazanih na slici 35 i u tablici 12 vidljivo je da spoj DAC-3Amid ima jači učinak u kombiniranom tretmanu od spoja DAC-2Amida te da uspješno snižava vrijednost IC₅₀ mitoksantrona u obje stanične linije. Učinak mu je znatno izraženiji u tumorskoj staničnoj liniji PLB/ABCG2, u kojoj smanjuje vrijednost IC₅₀ mitoksantrona oko sedam puta u koncentraciji od 1 μ M, za razliku od stanične linije MDCK-II/ABCG2 u kojoj je tu vrijednost smanjio trostruko i to tek u koncentraciji od 2 μ M. Referentni inhibitor Ko143 smanjuje vrijednost IC₅₀ mitoksantrona dvanaest puta, što je bitno više od oba spoja. Iz rezultata je također vidljivo da spojevi nemaju učinka na roditeljsku staničnu liniju PLB-985, što je dokaz da je njihov učinak usmjeren prvenstveno na transporter ABCG2. Određeno smanjenje vrijednosti IC₅₀ mitoksantrona je vidljivo u roditeljskoj staničnoj liniji MDCK-II (tablica 12), a to je zbog toga što ova stanična linija prirodno sadrži transporter ABCB1 na svojoj membrani, te stoga pokazuje učinak referentnog inhibitora Ko143 i spoja DAC-3Amida, koji djeluju i kao inhibitori ABCB1 [99].

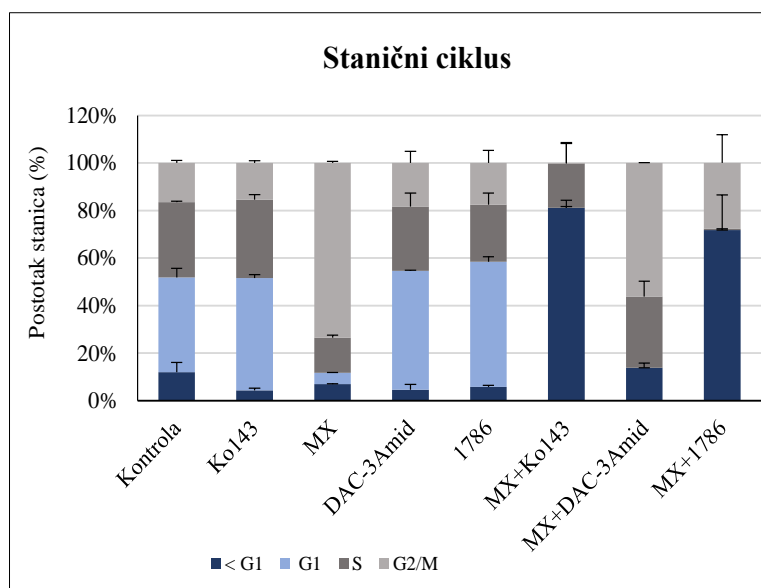
Fumardiamidi primakina i halogenanilina - 1786, 1787 i 1789 pokazali su snažan učinak na povećanje osjetljivosti tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na mitoksantron, snižavajući vrijednost IC₅₀ mitoksantrona čak osamnaest puta. Sva tri spoja su u koncentraciji od 5 μ M postigla učinak referentnog inhibitora Ko143, koji je u kombiniranom tretmanu smanjio vrijednost IC₅₀ mitoksantrona dvadeset puta. Spojevi nisu dodatno pojačali učinak mitoksantrona na roditeljsku staničnu liniju PLB-985 (slika 36, tablica 13).

4.8. Utjecaj ispitivanih spojeva na stanični ciklus

U kombiniranom tretmanu tumorske stanične linije PLB/ABCG2 sa supstratom transportera ABCG2 – mitoksantronom i testiranim spojevima pokazali smo da DAC-3Amid i derivati primakina 1786, 1787 i 1789 u velikoj mjeri povećavaju osjetljivost stanica s prekomjernom ekspresijom ABCG2 na tretman mitoksantronom. Kako bismo potvrdili da je njihovo djelovanje posljedica inhibicije ABCG2 i time pojačane toksičnosti mitoksantrona, ispitali smo utjecaj odabranih spojeva samih i u kombinaciji sa mitoksantronom na stanični ciklus.

Mitoksantron je analog antraciklinskih antibiotika i pripada skupini sintetskih antineoplastičnih lijekova. Interkalira se u molekulu DNA pomoću vodikovih veza, pri čemu dolazi do pucanja lanaca. Na sličan način djeluje i na RNA i tako inhibira sintezu obje molekule. Također djeluje i kao potentni inhibitor enzima topoizomeraze II odgovornog za odmatanje i popravak oštećene molekule DNA. S obzirom na mehanizam djelovanja, utječe na stanični ciklus na način da ga zaustavlja u fazi G2/M [212]–[214].

Cilj ovog ispitivanja je bio tretirati tumorsku staničnu liniju PLB/ABCG2 mitoksantronom u koncentraciji u kojoj će imati učinak na stanični ciklus a u kojoj neće imati izražen citotoksični učinak te spojevima DAC-3Amid i 1786, koji su odabrani na temelju toga što su u dosadašnjim testovima pokazali snažan inhibitorski učinak na transporter ABCG2 te su u velikoj mjeri povećali osjetljivost tumorske linije PLB/ABCG2 na mitoksantron u kombiniranom tretmanu. Sadržaj molekule DNA u stanicama i distribuciju po fazama ciklusa (< G1 odnosno subG1, G1, S i G2/M) pratili smo bojenjem stanica propidij jodidom koji boji DNA i rezultate analizirali metodom protočne citometrije, dok smo RNA razgradili pomoću enzima RNA-ze. Ukoliko ispitani spojevi pojačavaju osjetljivost stanica na mitoksantron, očekujemo promjene u staničnom ciklusu u kombiniranom tretmanu u odnosu na tretman samim mitoksantronom. Na slici 37 prikazani su postotci stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u kontrolnim stanicama te nakon pojedinačnog i kombiniranog tretmana tijekom 24 h.



Slika 37. Prikaz utjecaja mitoksantrona u koncentraciji $0,02 \mu\text{M}$ i spojeva DAC-3Amida, derivata primakina 1786 te referentnog inhibitora Ko143 u koncentraciji $1 \mu\text{M}$ samih i u kombiniranom tretmanu, na postotak stanica tumorske stanične linije PLB/ABCG2 u pojedinoj fazi staničnog ciklusa tijekom 24 h. Faza $< G1$ označava subG1 fazu u kojoj se obično nalaze stanice u apoptozi. MX označava mitoksantron. Pokusi su rađeni u duplikatima u dva neovisna mjerenja metodom protočne citometrije.

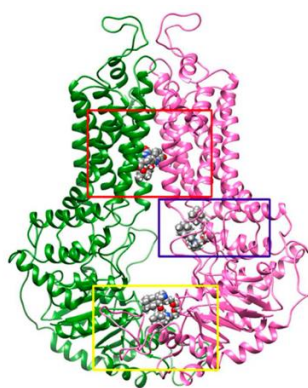
Iz rezultata je vidljivo da referentni inhibitor Ko143 te spojevi DAC-3Amid i 1786 sami ne mijenjaju značajno raspodjelu stanica po fazama staničnog ciklusa u odnosu na netretiranu kontrolu, dok sam mitoksantron uzrokuje očekivani zastoj u fazi G2/M. Kombinirani tretman mitoksantronom i spojem DAC-3Amidom tijekom 24 h je uzrokovao jače djelovanje mitoksantrona što je vidljivo u većem postotku stanica u fazi S i fazi subG1 spram samog mitoksantrona. Spoj 1786 je u kombinaciji sa mitoksantronom značajno povišio postotak stanica u fazi subG1 i pokazao snažniji učinak od spoja DAC-3Amida, kao i u prethodnom kombiniranom testu MTT, pri čemu je postigao učinak referentnog inhibitora Ko143 koji u kombinaciji s mitoksantronom značajno povećava postotak stanica u fazi subG1 u usporedbi sa tretmanom samim mitoksantronom. Na temelju literaturnih podataka faza subG1 označava mrtve stanice koje su najvjerojatnije u apoptozi, uzimajući u obzir da je glavni mehanizam mitoksantrona indukcija oštećenja DNA i apoptoza [96], [214].

4.9. Molekulsko uklapanje u protein ABCG2

Spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid su u nizu prethodnih testova pokazali snažan inhibitorski potencijal prema transporteru ABCG2, a dosadašnji rezultati ukazuju na to da spojevi stupaju u interakciju sa samim proteinom i na taj način moduliraju njegovu aktivnost ali nisu njegovi supstrati. Kako bismo utvrdili na koje se mjesto na proteinu ABCG2 spojevi mogu vezati i kako bismo dobili uvid u strukturne karakteristike koje omogućuju interakciju spoja i transportera, proveli smo analizu molekulskog uklapanja diaza-18-kruna-6 etera na protein ABCG2.

Analiza molekulskog uklapanja provedena je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u grupi prof. Bertoše [187], [215]. Za ovu su analizu napravljena dva izračuna, jedan koji obuhvaća cijeli protein i drugi koji obuhvaća šupljinu 1 transportera ABCG2, za koju je iz literature poznato da služi kao mjesto vezanja supstrata i inhibitora [16]–[18], [61].

Rezultati analize u kojoj je obuhvaćen cijeli protein pokazali su da se spojevi mogu vezati na tri različita mjesta na proteinu ABCG2: unutar šupljine 1, na prijelazu između domene koja veže ATP i transmembranske domene, te u samoj domeni koja veže ATP. Izračuni su napravljeni i za poznate inhibitore i supstrate transportera ABCG2: Ko143, FTC (fumitremorgin C), MZ29, STI (imatinib) i mitoksantron (MX). Najpovoljnije energije vezanja dobivene su za vezanje u šupljinu 1 i na mjesto prijelaza između dvije domene (slika 38, tablica 14).



Slika 38. Moguća mjesta vezanja liganada na protein ABCG2 koji se nalazi u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru, određena na temelju računa molekulskog uklapanja koji obuhvaća cijeli protein. Crvenim pravokutnikom je označena šupljina 1, plavim mjesto prijelaza između domene koja veže ATP i transmembranske domene, a žutim domena koja veže ATP. Zeleno i ružičasto su označeni monomeri proteina ABCG2.

Tablica 14. Energije vezanja liganada, koje odgovaraju energiji vezanja konformera pojedinog liganda s najmanjom energijom vezanja, na ABCG2, dobivene molekulskim uklapanjem koje obuhvaća cijeli protein. Š1 označava šupljinu 1, AVD-TMD mjesto prijelaza iz domene koja veže ATP u transmembransku domenu. Ko143, FTC, MZ29 i STI su inhibitori ABCG2, dok je MX njegov supstrat.

Ligand	Mjesto vezanja	Afinitet vezanja (kJ mol ⁻¹)
DAC-4Amid	Š1	-42,26
DAC-3Amid	Š1	-41,42
DAC-2	AVD-TMD	-41,42
DAC-1Amid	Š1	-40,58
STI	Š1	-40,58
MZ29	Š1	-39,33
DAC-2Amid	Š1	-38,91
FTC	Š1	-38,91
Ko143	Š1	-37,66
DAC-4	AVD-TMD	-36,82
DAC-3	AVD-TMD	-34,73
DAC-1	AVD-TMD	-34,31
MX	Š1	-32,64

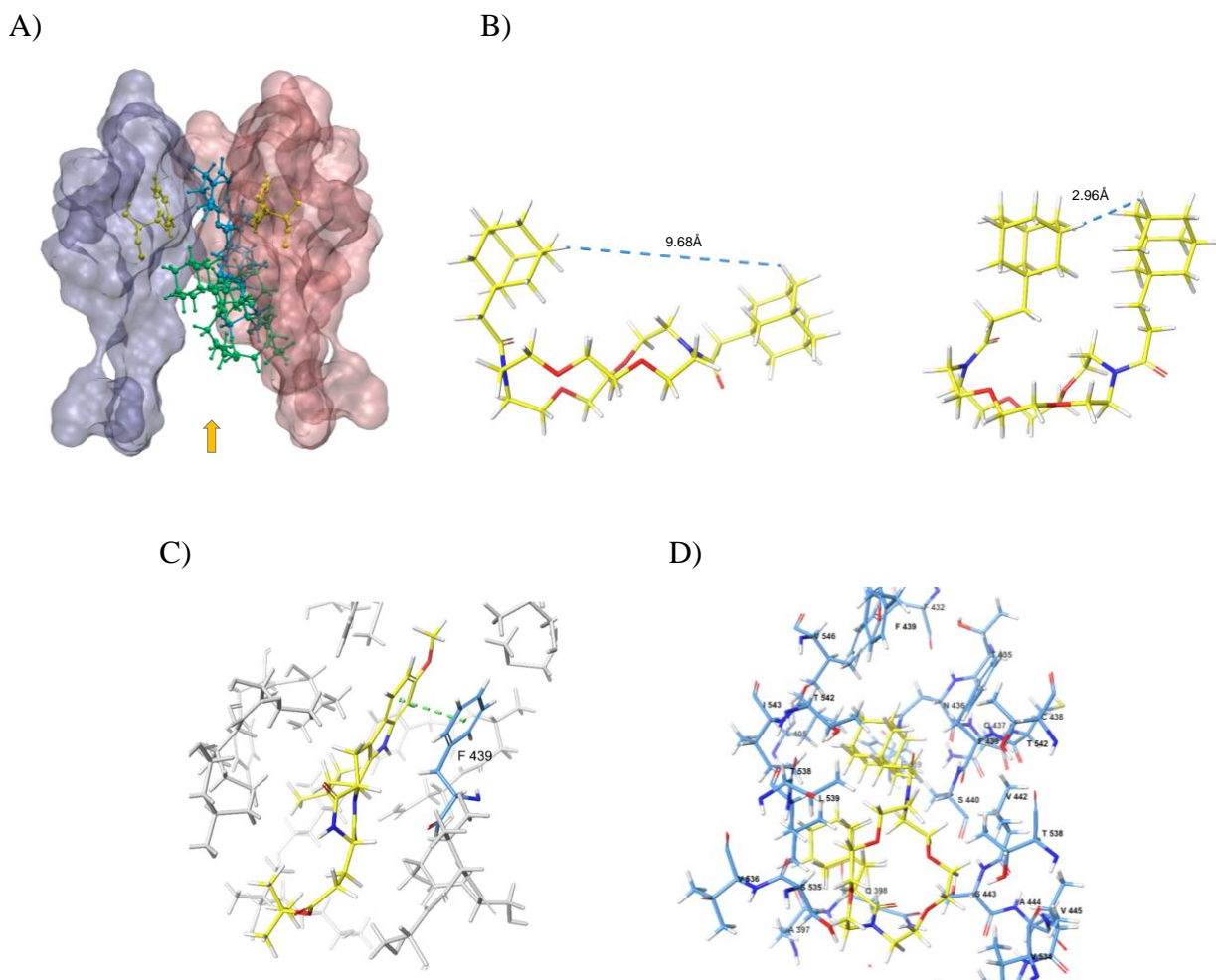
Iz rezultata prikazanih u tablici 14 vidljivo je da se diaza-18-kruna-6 eteri koji u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana imaju amidnu vezu (DAC-Amidi) preferentno vežu unutar šupljine 1, jednako kao i poznati inhibitori i supstrat ABCG2. Za derivate krunastih etera koji u svojoj strukturi nemaju amidnu vezu (DAC) najviše načina vezanja pronađeno je na mjestu prijelaza iz domene koja veže ATP u transmembransku domenu.

Rezultati analize molekulskog uklapanja u kojoj je obuhvaćena samo šupljina 1 prikazani su u tablici 15. Njima je potvrđeno da se DAC-Amidi preferentno vežu unutar šupljine 1, s energijama vezanja koje su usporedive s energijama vezanja poznatih inhibitora ABCG2. Spoj DAC-3Amid je pokazao najjači afinitet vezanja u šupljinu 1, s najpovoljnijom energijom vezanja od svih DAC-Amida, što je u skladu s rezultatima pokusa u kojima je upravo taj spoj pokazao najjači inhibički potencijal. Analiza molekulskog uklapanja u šupljinu 1 potvrdila je značajno slabiji afinitet vezanja spojeva DAC.

Tablica 15. Energije vezanja liganada na ABCG2, dobivene molekulskim uklapanjem koje obuhvaća samo šupljinu 1. Afiniteti vezanja označavaju energetske najpovoljnije načine vezanja pojedinog liganda. Ko143, FTC, MZ29 i STI su inhibitori ABCG2, dok je MX njegov supstrat.

Ligand	Afinitet vezanja (kJ mol⁻¹)
DAC-3Amid	-41,84
STI	-41,42
DAC-1Amid	-40,58
DAC-2Amid	-40,58
DAC-4Amid	-40,17
MZ29	-39,75
FTC	-38,07
DAC-2	-36,82
DAC-4	-36,82
DAC-3	-36,82
Ko143	-35,56
DAC-1	-33,89
MX	-28,03

Na temelju strukture proteina ABCG2 s uklopljenim ligandima određeni su aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u interakciji s ligandom i vrsta interakcije koju uspostavljaju. Na slici 39 prikazano je točno mjesto vezanja DAC-Amida unutar šupljine 1, te detaljno interakcija DAC-3Amida i referentnog inhibitora Ko143 s proteinom ABCG2 unutar šupljine 1.



Slika 39. Vezanje liganada unutar šupljine 1 proteina ABCG2. A) Razlike u dubini vezanja poznatih inhibitora (plavo) i DAC-Amida (zeleno) unutar šupljine 1. Žuto su označeni ostaci aminokiseline fenilalanin na poziciji 439 u polipeptidnom lancu (F439) s kojom poznati inhibitori stupaju u interakciju. B) Konformacije koje najčešće zauzimaju DAC-2Amid (lijevo) i DAC-3Amid (desno) u šupljini 1. C) 3D prikaz vezanja inhibitora Ko143 (žuto) u šupljinu 1. Interakcije pi-pi između aromatskih prstena inhibitora i aminokiseline F439 prikazane su zelenom iscrtanom linijom. D) 3D prikaz vezanja DAC-3Amida (žuto) unutar šupljine 1. Plavo su prikazani ostaci aminokiselina s kojima ostvaruje hidrofobne interakcije.

Analiza molekuskog uklapanja poznatih inhibitora transportera ABCG2 potvrdila je da je najpovoljniji način njihova vezanja stvaranje interakcije pi-pi s aminokiselinom fenilalaninom na poziciji 439 (F439) na oba polipeptidna lanca proteina ABCG2 duboko u šupljini 1, što je do sada poznato iz literature [17], [216]–[218]. Rezultati dobiveni uklapanjem DAC-Amida na protein ABCG2 pokazuju da se ovi spojevi vežu pliće u šupljini 1 u usporedbi sa poznatim inhibitorima (u razini unutarnjeg sloja fosfolipidnog dvosloja membrane), te na taj način uspostavljaju hidrofobne interakcije s aminokiselinom F439 (slika 39 A).

DAC-Amidi s parnim brojem ugljikovih atoma u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana, poput DAC-2Amida, najčešće zauzimaju otvorene konformacije unutar šupljine 1, gdje su bočni lanci rašireni i adamantilne skupine udaljene jedna od druge. Spoj DAC-3Amid, s neparnim brojem ugljikovih atoma u poveznici, zauzima zatvorenu konformaciju u kojoj su adamantilne skupine blizu jedna druge (slika 39 B).

Referentni inhibitor Ko143 aromatskim prstenom u svojoj strukturi ostvaruje interakcije pi-pi s aromatskim prstenom aminokiseline F439, što djeluje stabilizirajuće na njegovo vezanje u šupljini 1 (slika 39 C). Adamantilna skupina DAC-3Amida stvara stabilizirajuće hidrofobne interakcije s aminokiselinama valinom na poziciji 401 (V401), serinom 440 (S440), V442, treoninom 538 (T538), leucinom 539 (L539), T542, izoleucinom 543 (I543) i V546 u veznom mjestu proteina. Dodatne hidrofobne interakcije DAC-3Amid stvara sa glutaminom na poziciji 398 (Q398) koji je dio transmembranske zavojnice 5a transportera ABCG2, koja igra važnu ulogu u prijenosu supstrata iz šupljine 1 u šupljinu 2, te nakon toga u izvanstanični prostor [16] (Slika 39 D).

Vežanje DAC-3Amida unutar šupljine 1 stabilizirano je isključivo hidrofobnim interakcijama, dok spoj DAC-2Amid uz to tvori i vodikovu vezu s aminokiselinom Q398 u kojoj je dušik karboksamidne skupine glutamina donor, a kisik amidne skupine u bočnom lancu DAC-2Amida akceptor veze.

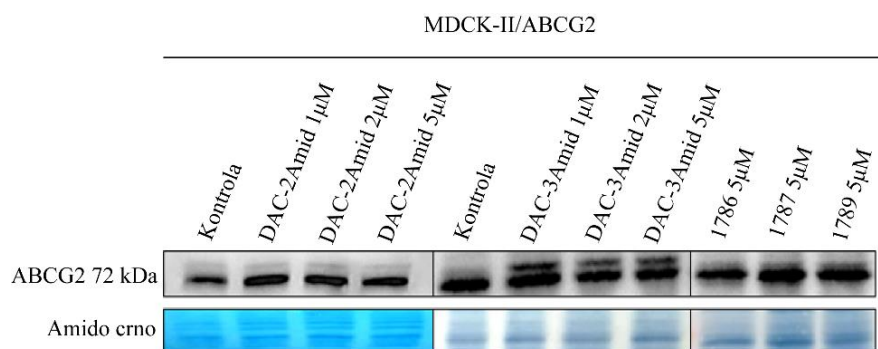
Spojevi DAC prilikom vezanja u šupljinu 1 i na mjesto prijelaza iz domene koja veže ATP u transmembransku domenu stvaraju intramolekulske vodikove veze u kojima je dušik donor a kisik akceptor, a posljedica toga je da zauzimaju zatvoreniju konformaciju u usporedbi sa DAC-Amidima.

4.10. Utjecaj ispitivanih spojeva na ekspresiju i lokalizaciju proteina ABCG2

Spojevi koji pokazuju inhibitorni potencijal prema transporterima ABC mogu imati više mehanizama djelovanja. Mogu se ponašati kao klasični inhibitori koji se vežu na specifično mjesto unutar transportera i na taj način mijenjaju njegovu konformaciju i zaustavljaju prijenos supstrata, mogu utjecati na ekspresiju proteina ABC tako da je značajno smanje, te mogu utjecati na pravilnu lokalizaciju transportera u staničnoj membrani, koja je vrlo važna za njegovu aktivnost. Mehanizam djelovanja inhibitora može biti samo jedan od ova tri načina, ili kombinacija više njih.

Spojevi DAC-2Amid, DAC-3Amid, te derivati primakina 1786, 1787 i 1789 su u svim testovima pokazali snažni inhibitorni potencijal prema transporteru ABCG2 i povećali su osjetljivost tumorske stanične linije na kemoterapeutik. Metodom molekuskog uklapanja na protein ABCG2 pokazali smo da se DAC-2Amid i DAC-3Amid vežu na specifično mjesto unutar transportera i na taj način zaustavljaju izbacivanje supstrata. Kako bismo ispitali djeluju li spojevi inhibitorno na ABCG2 još nekim dodatnim mehanizmom, istražili smo njihov utjecaj na ekspresiju i lokalizaciju proteina ABCG2.

U tu smo svrhu analizirali ekspresiju ABCG2 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2 s prekomjernom ekspresijom proteina ABCG2 nakon tretmana spojevima DAC-2Amid i DAC-3Amid u koncentracijama 1, 2 i 5 μM , te spojevima 1786, 1787 i 1789 u koncentraciji 5 μM tijekom 72 h te smo provjerili ekspresiju proteina u ukupnom staničnom lizatu metodom Western blot pomoću protutijela BXP-21, specifičnog za protein ABCG2. Rezultati su prikazani na slici 40.

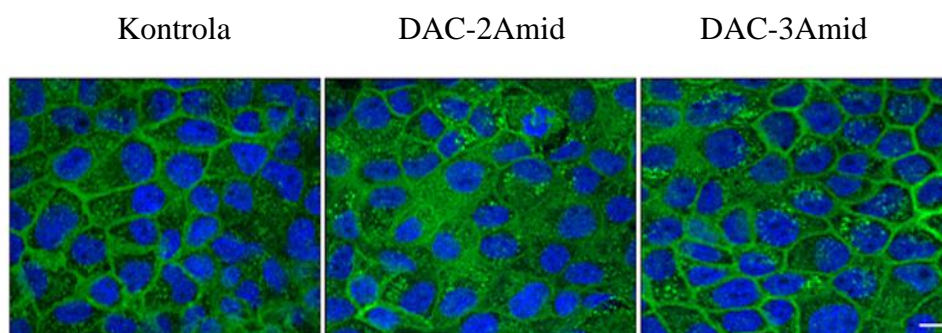


Slika 40. Utjecaj spojeva DAC-2 i DAC-3Amida u koncentraciji od 1, 2 i 5 μM , te spojeva 1786, 1787 i 1789 u koncentraciji od 5 μM na ekspresiju proteina ABCG2 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2. Rezultati su dobiveni iz ukupnog staničnog lizata metodom Western blot. Protein ABCG2 je detektiran pomoću specifičnog protutijela BXP-21, a za kontrolu jednolikog nanošenja uzoraka membrana je obojana bojom amido crno.

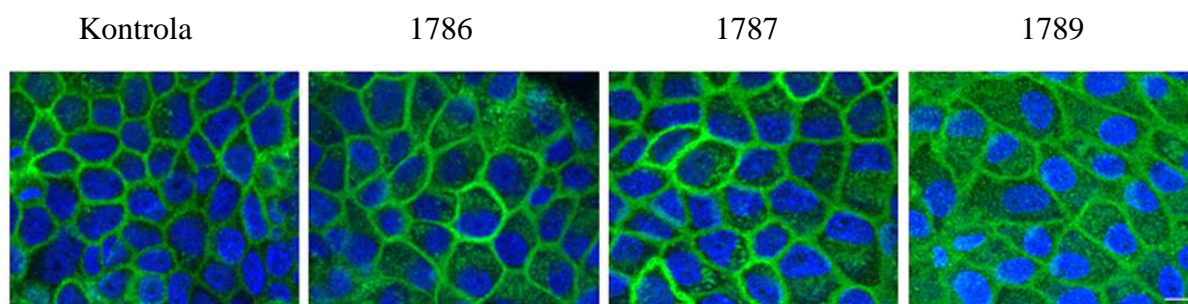
Rezultati pokazuju da niti jedan spoj ne mijenja razinu ekspresije proteina ABCG2 u ispitanim uvjetima, u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

Kako bismo ispitali utjecaj istih spojeva na lokalizaciju transportera ABCG2 u staničnoj membrani, staničnu liniju MDCK-II/ABCG2 smo tretirali navedenim spojevima u koncentraciji 2 μM tijekom 72 h. Stanice smo nakon toga fiksirali i protein ABCG2 označili fluorescentno obilježenim specifičnim protutijelom BXP-21, te smo lokalizaciju promatrali pomoću konfokalnog mikroskopa (slika 41).

A)



B)



Slika 41. Utjecaj spojeva DAC-2 i DAC-3Amida te spojeva 1786, 1787 i 1789 u koncentraciji od 2 μM na lokalizaciju transportera ABCG2 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2. Protein ABCG2 je detektiran pomoću fluorescentno obilježenog specifičnog protutijela BXP-21 a lokalizacija je praćena pomoću konfokalnog mikroskopa. Zeleno je označen transporter ABCG2, dok su plavo obilježene stanične jezgre obojene bojom DAPI. Mjerna traka odgovara duljini od 8 μm .

Iz rezultata na slici 41 vidljivo je da ispitani spojevi ne mijenjaju značajno lokalizaciju transportera ABCG2, koji se nalazi u staničnoj membrani nakon tretmana tijekom 72 h. Razlike u intenzitetu zelenog signala unutar pojedine slike su posljedica nejednolikog vezanja protutijela.

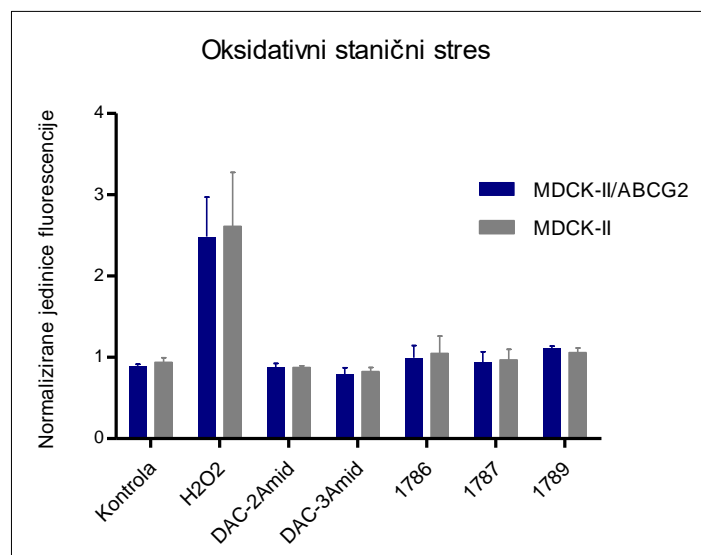
4.11. Utjecaj ispitivanih spojeva na stanični oksidativni stres

Jedan od predloženih mehanizama kojim većina kemoterapeutika i mnogi protutumorski lijekovi ubijaju tumorske stanice je povećanje razine reaktivnih kisikovih vrsta (RKV), što uzrokuje programiranu staničnu smrt [219]. Pokazano je da prirodni ionofori poput nigericina, monenzina i salinomicina povećavaju razinu RKV u mnogim tipovima tumora i na taj način djeluju protutumorski [220]–[223]. Neki krunasti eteri, primjerice 18-kruna-6 eteri, također uzrokuju povećanje oksidativnih radikala u stanicama, što može biti jedan od mehanizama njihove citotoksičnosti [224], [225].

Poznatim antimalaricima poput klorokina, kinina, artemizinina i atovakina povećanje razine RKV služi kao glavni mehanizam djelovanja protiv uzročnika malarije *Plasmodiuma*, koji je osjetljiv na oksidativni stres [226], [227].

Na temelju navedenih literaturnih podataka, u ovom smo radu ispitali utjecaj derivata krunastih etera DAC-2Amida i DAC-3Amida te derivata primakina 1786, 1787 i 1789 na stvaranje RKV u staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i MDCK-II, kako bismo provjerili je li to jedan od mehanizama njihove citotoksičnosti. Dodatno smo htjeli ispitati i postoji li razlika u razini oksidativnih radikala između roditeljske linije i linije koja ima povećanu ekspresiju transportera ABCG2, jer je pokazano da transporter ABCG2 štiti stanice od oštećenja i smrti uzrokovane oksidativnim stresom, te da inhibicijom njegove aktivnosti može doći do povećanja razine RKV (slika 42) [228], [229].

U ovom ispitivanju korištena je fluorescentna boja DCFHDA (diklorofluorescin diacetat), koja ulazi u stanice pomoću difuzije, gdje je stanični enzimi esteraze deacetiliraju do spoja DCFH koji nije fluorescentan. Različite kisikove vrste u stanici mogu oksidirati DCFH do diklorofluoresceina (DCF), koji ima snažnu fluorescenciju, te je njegova fluorescencija proporcionalna razini RKV.



Slika 42. Utjecaj derivata krunastih etera i derivata primakina na stanični oksidativni stres. Razina reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) praćena je pomoću fluorescentne boje DCFDA u stanićnim linijama MDCK-II i MDCK-II/ABCG2, nakon tretmana sa spojevima u koncentraciji od 10 μ M. Vodikov peroksid (H₂O₂) je korišten kao pozitivna kontrola. Svaki stupić prikazuje srednju vrijednost tri nezavisna pokusa. Zvezdice oznaćuju statistićku znaćajnost u odnosu na negativnu kontrolu, odrećenu parametarskim testom ANOVA uz post-hoc test Dunette. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

Rezultati pokazuju da ni derivati krunastih etera niti derivati primakina ne povećavaju razinu RKV u stanićnim linijama MDCK-II i MDCK-II/ABCG2, te da nema razlike u razini RKV između dvije stanićne linije, iz ćega zakljućujemo da to nije jedan od mehanizama djelovanja ispitanih spojeva (slika 42).

5. RASPRAVA

Rak je drugi uzrok smrtnosti u industrijaliziranim zemljama, nakon kardiovaskularnih bolesti. Uz kirurško odstranjenje i zračenje, kemoterapija je važan temelj u liječenju malignih oboljenja i prva linija obrane u metastatskoj bolesti, koja vrlo često nije izlječiva niti jednom vrstom terapije [230]. Uspješnost protutumorske terapije je ograničena razvojem otpornosti tumorskih stanica na terapiju.

Tumori su histološki heterogena skupina stanica koje imaju različite morfološke i molekularne karakteristike. Biološka heterogenost koja nastaje kroz genetičke i druge mehanizme pridonosi fenotipskim razlikama između raznih populacija stanica unutar jednog tumora, što se danas smatra glavnim pokretačem razvoja otpornosti na terapiju [231], [232]. Heterogenost stanica unutar tumorske mase može se objasniti modelom nastanka tumora iz tumorskih matičnih stanica (TMS), rijetkih samoobnavljajućih tumorskih stanica, koje imaju sposobnost inicijacije novog tumora i diferenciraju u fenotipski različite tumorske stanice. Pokazano je da TMS imaju veću otpornost na terapiju od drugih stanica unutar tumora, a s obzirom na njihovu tumorigeničnost, pridonose kliničkom relapsu bolesti [231], [233], [234].

Jedan dio tumora posjeduje takozvanu unutarnju (intrinzičnu) otpornost na terapiju i s obzirom na to nemaju značajan odgovor na, primjerice, kemoterapiju, dok drugoj skupini pripadaju tumori koji primarno pokazuju odgovor na terapiju, ali ubrzo pod selekcijskim pritiskom potentnog kemoterapeutika razvijaju otpornost na njega. Neki od do sada poznatih mehanizama kojima tumorske stanice stječu otpornost su gubitak receptora ili transportera određenog lijeka na površini stanice, specifičan metabolizam lijeka ili promjena specifične mete lijeka uzrokovana mutacijom. Takve promjene rezultiraju otpornošću stanica na manji broj protutumorskih lijekova i mogu se riješiti primjenom više lijekova koji imaju različite načine ulaska u stanicu i različite stanične mete, te omogućiti uspješnu kemoterapiju i visoku stopu izlječenja [231], [235].

Tumorske stanice, međutim, često pokazuju otpornost na više strukturno i funkcionalno nepovezanih lijekova, što je poznato kao fenomen višestruke otpornosti na lijekove. Jedan od važnijih mehanizama kojima stanice stječu višestruku otpornost na terapiju je smanjeno nakupljanje lijekova unutar stanice tako da je smanjen unos lijeka ili povećano njegovo izbacivanje [12]. Klasična višestruka otpornost tumora na terapiju uzrokovana je povećanom ekspresijom transportera ABC koji imaju sposobnost aktivnog izbacivanja širokog spektra protutumorskih lijekova iz stanice, poput vinblastina, vinkristina, doksorubicina, daunorubicina, mitoksantrona, paklitaksela, metotreksata, 5-fluorouracila, cisplatine i drugih

[7]. Od 48 članova obitelji transportera ABC, ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) i ABCC1 (MRP-1) imaju najznačajniju ulogu u višestrukoj otpornosti na terapiju i klinički su najrelevantniji. Transporter ABCB1 je prvi otkriven, najdetaljnije proučen i farmakološki vrlo važan, dok je ABCG2 otkriven najkasnije, ali je atraktivan za proučavanje zbog prisutnosti na površini TMS.

Mnogi tumori pokazuju određenu razinu ekspresije transportera ABCB1 i/ili ABCG2 [75] te se stoga nastoji pronaći inhibitor koji bi kao adjuvans klasičnoj kemoterapiji povećao osjetljivost tumorskih stanica na primjenjeni kemoterapeutik. Do sada je u tom kontekstu istraženo mnogo različitih agensa od kojih su neki bili lijekovi u upotrebi za druge indikacije, dok su drugi ciljano dizajnirani na temelju spoznaja o strukturi transportera, ali do danas još nije pronađen idealan inhibitor koji je potentan, djeluje *in vivo* i nije toksičan [7], [12], [230]. U ovom smo radu istražili interakciju dvije različite skupine spojeva s transporterima ABCB1 i ABCG2 te mogućnost modulacije njihove aktivnosti u stanicama koje imaju prekomjernu ekspresiju navedenih transportera. Prva skupina spojeva koje smo ispitali su mono- i diaza-18-kruna-6 eteri koji u svojoj strukturi imaju eterski prsten krune i bočne ogranke adamantana između kojih je poveznica s jedne (monoaza) ili s obje (diaza) strane. Spojevi se međusobno razlikuju po broju ugljikovih atoma u poveznici (1-4) i po tome sadrži li ona amidnu vezu (MAC/DAC-Amidi) ili ne (MAC/DAC) [140], [141].

Naša grupa se bavi ispitivanjem biološke i potencijalne protutumorske aktivnosti različitih spojeva te dijelom i njihovom selektivnošću prema TMS. Neki od spojeva koji se već dulje vrijeme proučavaju su spojevi koji narušavaju transport iona, poput krunastih etera i prirodnih ionofora salinomicina, monenzina i nigericina. Krunasti eteri su makrociklički spojevi koji se u kemiji koriste kao model prirodnih ionofora zbog svoje sposobnosti formiranja stabilnih kompleksa s raznim anorganskim i organskim kationima [139], [148]. Pokazano je također da imaju široki biološki potencijal od čega je značajna njihova protutumorska aktivnost, a neki od njih imaju i sposobnost inhibicije transportera ABCB1 [148], [149], [154].

Naša je grupa pokazala da dva diaza-18-kruna-6 etera – DAC-2Amid i DAC-3Amid snažno inhibiraju aktivnost transportera ABCB1 i značajno povećavaju osjetljivost stanica A2780/Adr, koje imaju prekomjernu ekspresiju tog transportera, na paklitaksel. Pokazali smo da inhibitorna svojstva ovih spojeva ovise o strukturi. Naime, potentni inhibitor treba imati optimalan broj ugljikovih atoma u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana i mora posjedovati amidnu vezu u poveznici [96].

Prikazani su rezultati antiproliferativne aktivnosti DAC i DAC-Amida u stanicama A2780 i A2780/Adr iz kojih je vidljivo da spojevi DAC, koji imaju bolju sposobnost kompleksiranja

kationa, pokazuju jaču antiproliferativnu aktivnost, što se može povezati s njihovom sposobnošću narušavanja ionske homeostaze [96]. Spojevi MAC i MAC-Amidi imaju podjednak citotoksični učinak neovisno o strukturi, premda kod njih lipofilnost igra ulogu u protutumorskoj aktivnosti, pa su stoga spojevi s duljim bočnim lancima, koji su samim time i lipofilniji, aktivniji. Obje skupine spojeva imaju nešto slabiji citotoksični učinak na stanice koje imaju prekomjernu ekspresiju ABCB1 u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom, što može ukazivati na to da se ovi spojevi prenose pomoću transportera ABCB1 i da zbog toga stanice na njih pokazuju veću otpornost [8].

Prethodno smo istražili i sposobnost spojeva MAC, MAC-Amida, DAC i DAC-Amida da moduliraju aktivnost transportera ABCB1 kroz testove nakupljanja fluorescentnih supstrata rodamina 123 i kalceina-AM. Spojevi koji djeluju inhibitorno na transporter zaustavljaju izbacivanje supstrata iz stanice i uzrokuju njegovo pojačano nakupljanje unutar stanice. Testovi su pokazali da DAC-2Amid i DAC-3Amid imaju snažan inhibitory potencijal, usporediv s onim referentnog inhibitora verapamila i u koncentracijama koje nisu toksične za stanice. Općenito su DAC-Amidi pokazali jači inhibitory potencijal u usporedbi sa spojevima DAC, premda su imali slabiji citotoksični učinak na tumorske stanice. Spojevi MAC i MAC-Amidi nisu pokazali značajan inhibitory potencijal.

Nakon što smo pokazali da DAC-2Amid i DAC-3Amid djeluju kao potentni inhibitori transportera ABCB1, u ovom radu smo detaljno istražili interakciju mono- i diaza-18-kruna-6 etera s transporterom ABCG2. Cilj je bio dobiti uvid u to koje su strukturne značajke važne kako bi ovi spojevi bili potentni inhibitori i imali sposobnost povećanja osjetljivosti tumorskih stanica s prekomjernom ekspresijom ABCG2 na kemoterapeutik mitoksantron.

Interakciju mono- i diaza-18-kruna-6 etera s transporterom ABCG2 istražili smo pomoću niza staničnih i biokemijskih testova na staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2, koje imaju pojačanu ekspresiju transportera, i njihovim roditeljskim inačicama MDCK-II i PLB-985 te izvrnutim membranskim vezikulama koje nose transporter ABCG2.

Pokazali smo da diaza-18-kruna-6 eteri imaju podjednak antiproliferativni učinak u obje stanične linije - roditeljskoj kao i onoj s prekomjernom ekspresijom transportera, što ukazuje na to da spojevi nisu supstrati ABCG2. Spojevi koji nemaju amidnu vezu u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana (DAC) pokazali su snažniji citotoksični učinak u obje stanične linije (roditeljskoj i onoj s ABCG2) kojeg ponovno možemo pripisati boljim sposobnostima kompleksiranja kationa i narušavanja ionske homeostaze u usporedbi sa DAC-Amidom, ili pak povećanoj sposobnosti narušavanja integriteta membrane stanica [96].

Utjecaj monoaza- i diaza-18-kruna-6 etera na aktivnost ABCG2 ispitali smo pomoću testova nakupljanja fluorescentnih supstrata feoforbida A i H 33342 u staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2, te supstrata LY u izvrnutim membranskim vezikulama. DAC-Amidi su pokazali značajan porast fluorescencije supstrata feoforbida A i H 33342 u obje stanične linije što znači da su djelovali inhibitory na transporter ABCG2, dok spojevi DAC nisu pokazali inhibitory potencijal. S obzirom na razlike u brzini prijenosa pojedinog supstrata postoje razlike i u sposobnosti inhibitora da se kompetitivno veže na mjesto supstrata u transporteru i blokira njegov prijenos, što je vidljivo na primjeru testa nakupljanja H 33342 u kojem su jedino spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid pokazali značajan inhibitory učinak na ABCG2 u staničnoj liniji MDCK-II/ABCG2. Upravo je zbog toga važno provesti testove s različitim supstratima transportera, kako bi se jasno izdvojili spojevi koje vrijedi detaljnije ispitati [215]. U roditeljskoj staničnoj liniji je stopa nakupljanja fluorescencije ostala ista jer se supstrat može nesmetano nakupljati unutar stanica zbog nedostatka transportera na njihovoj površini. Transport supstrata H 33342 pod utjecajem DAC-2Amida i DAC-3Amida pratili smo i u stvarnom vremenu u staničnoj liniji HEK-EGFP-G2 i HEK-293 (stanicama koje nisu transficirane genom *ABCG2*), gdje se jasno vidi razlika u nakupljanju fluorescentnog supstrata između stanica koje sadrže transporter i onih koje ga nemaju, kao i utjecaj DAC-2Amida i DAC-3Amida na njegov transport. Ovim testom je pokazano da stanice koje sadrže ABCG2 nakupljaju supstrat tek kada im se doda referentni inhibitor ili jedan od dva navedena krunasta etera, dok isti spojevi nemaju utjecaj na nakupljanje supstrata u stanicama koje ne sadrže transporter u svojoj membrani. Time smo potvrdili da se ovaj tip testa može uspješno koristiti za ispitivanje inhibitory svojstava spojeva, kako su predložili Orban i suradnici [211]. Test transporta fluorescentnog supstrata u izvrnutim membranskim vezikulama koje nose neki od transportera ABC omogućuje direktno praćenje prijenosa supstrata i utjecaja spojeva na aktivnost transportera koji je izdvojen iz stanične okoline i njenog utjecaja [184]. Spojeve DAC-2Amid i DAC-3Amid, koji su u oba stanična testa nakupljanja supstrata pokazala najveću aktivnost, potom smo ispitali u testu transporta fluorescentnog supstrata LY u izvrnutim membranskim vezikulama koje nose ABCG2. Spoj DAC-3Amid je pokazao jači inhibitory učinak jer je pri značajno nižoj koncentraciji (1 μ M) inhibirao transport supstrata LY od DAC-2Amida (10 μ M). Međutim, niti jedan od ta dva spoja nije pokazao učinak koji bi bio mjerljiv s inhibitory učinkom referentnog inhibitora Ko143.

Prirodni ionofori salinomicin i nigericin pokazuju selektivnu toksičnost prema TMS u tumoru dojke, a za salinomicin je pokazana visoka učinkovitost i selektivnost prema TMS u mnogim

drugim tipovima tumora [131], [133], [136], [137]. Jednako tako, za prirodne ionofore, salinomycin i monenzin, pokazano je da djeluju inhibitorno na transporter ABCB1 što može biti jedan od mehanizama njihove selektivnosti prema TMS koje imaju pojačanu ekspresiju transportera ABC i pokazuju povećanu otpornost na terapiju [132], [134], [236]. S obzirom na to da do danas još nije istraženo kako prirodni ionofori djeluju na ABCG2, u ovom smo radu ispitali njihovu inhibitornu sposobnost prema tom transporteru. Sva tri ionofora su pokazala citotoksični učinak u vrlo niskim koncentracijama u obje stanične linije (PLB/ABCG2 i PLB-985), što je bilo i očekivano, sukladno literaturnim podacima o njihovom učinku te se može pripisati narušavanju homeostaze iona u stanicama [220], [237]. Jedino je salinomycin djelovao slabije na staničnu liniju PLB/ABCG2 u usporedbi s roditeljskom, što navodi na pretpostavku da je on supstrat transportera ABCG2. Niti jedan ionofor nije pokazao inhibitorni učinak na ABCG2 u testu nakupljanja supstrata H 33342 u staničnoj liniji PLB/ABCG2 u ispitivanim koncentracijama, što se slaže sa pretpostavkom da bi salinomycin mogao biti supstrat ovog transportera, iako je potrebno napraviti detaljnija ispitivanja kako bi se to potvrdilo. Boesch i suradnici su također pokazali da ekspresija transportera ABCB1 i ABCG2 može uzrokovati smanjenu osjetljivost stanica na učinak ionofora salinomicina i nigericina [137].

Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela i ispitivanje utjecaja spojeva na ATP-aznu aktivnost transportera su dva testa koja, kada se primjene zajedno, govore o vrsti interakcije spoja s transporterom ABCG2 [199], [238], [239]. Telbisz i suradnici su pokazali da se fenomen „5D3 pomaka“ uslijed vezanja supstrata ili inhibitora na transporter ABCG2 može koristiti za ispitivanje tipa interakcije spoja i ABCG2. Općenito, vezanje inhibitora uzrokuje bolje vezanje fluorescentno obilježenog konformacijski osjetljivog protu-ABCG2 protutijela 5D3 na izvanstanični epitop ABCG2 i jak porast fluorescencije, dok vezanje supstrata u visokim koncentracijama također može uzrokovati pomak, ali u puno manjoj mjeri. Radi se o tome da prilikom vezanja inhibitora ili supstrata u inhibitornim koncentracijama transporter ABCG2 zauzima specifičnu konformaciju koju protutijelo 5D3 može prepoznati [186].

Mjerenje utjecaja testiranih spojeva na ATP-aznu aktivnost transportera ABC je vrsta mjerenja koja govori o prirodi interakcije spoja i transportera i jedan je od temeljnih testova za utvrđivanje inhibitorne sposobnost nekog spoja, uz test nakupljanja fluorescentnog supstrata, test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela i test kojim se prati citotoksičnost kemoterapeutika u prisustvu testiranog spoja, potencijalnog inhibitora [186], [240]. Inhibitori u pravilu smanjuju ili potpuno zaustavljaju ATP-aznu aktivnost dok je supstrati stimuliraju. Međutim, transporter ABCG2 ima relativno visoku bazalnu ATP-aznu aktivnost i neki njegovi poznati supstrati poput mitoksantrona i imatiniba ju ne mogu dodatno podignuti već ju puštaju.

Test vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 i test mjerenja ATP-azne aktivnosti svaki za sebe ne može jednoznačno odrediti prirodu interakcije spoja i transportera, ali je kombinacijom ta dva testa moguće razlikovati inhibitore od supstrata [207], [241].

U ovom smo radu proveli oba navedena testa kako bismo potvrdili rezultate testova nakupljanja supstrata koji pokazuju da spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid inhibiraju aktivnost transportera ABCG2. Spoj DAC-3Amid je u oba testa pokazao jači inhibitorni učinak od spoja DAC-2Amida. U testu vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 jačina inhibicije se izražava kao postotak od maksimalnog vezanja protutijela 5D3 odnosno maksimalne inhibicije transportera koja je postignuta referentnim inhibitorom Ko143 u koncentraciji od 1 μ M. Telbisz i suradnici predlažu da se spojevi koji postignu inhibiciju koja je najmanje 70% od maksimalne inhibicije u ovom testu smatraju potentnim inhibitorima transportera ABCG2 [186]. Spoj DAC-3Amid je u koncentraciji od 20 μ M postigao 70% maksimalne inhibicije, dok je spoj DAC-2Amid bio manje potentan i nije postigao 70% maksimalne inhibicije niti u jednoj testiranoj koncentraciji u staničnoj liniji PLB/ABCG2. Rezultati mjerenja utjecaja ova dva spoja na ATP-aznu aktivnost u izvrnutim membranskim vezikulama koje nose transporter ABCG2 također pokazuju da oba spoja inhibiraju bazalnu i stimuliranu ATP-aznu aktivnost te da DAC-3Amid ima jači inhibitorni učinak.

Konačna potvrda inhibitorne aktivnosti nekog spoja prema transporteru je test citotoksičnosti u kojem se stanice koje imaju prekomjernu ekspresiju nekog od transportera ABC istovremeno tretiraju određenim spojem i kemoterapeutikom koji je supstrat tog transportera te se prati povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na taj kemoterapeutik uslijed inhibicije transportera. U našem istraživanju pokazali smo da DAC-3Amid u niskim koncentracijama (1 μ M) značajno povećava otpornost tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na mitoksantron koji je supstrat ABCG2. Ovaj test je potvrdio jači inhibitorni učinak DAC-3Amida spram DAC-2Amida, koji nije značajno djelovao na povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na mitoksantron.

Rezultate dobivene eksperimentalno potvrdili smo i računima molekuskog uklapanja DAC i DAC-Amida u protein ABCG2, koji su pokazali da DAC-Amidi imaju jači potencijal vezanja od spojeva DAC. Molekulska uklapanje u cijeli protein je pokazalo da DAC-Amidi imaju dva potencijalna mjesta na koja se mogu vezati i inhibirati aktivnost transportera – šupljinu 1, u koju se veže i referentni inhibitor Ko143 i ostali inhibitori transportera ABCG2, kao i poznati supstrati [52], [61] te na prijelazu iz domene koja veže ATP u transmembransku domenu. Iz literature je poznato da su najpovoljniji načini vezanja potentnih inhibitora unutar šupljine 1 oni u kojima ostvaruju vodikove veze i interakcije pi-pi između aromatskih skupina spoja i

aminokiseline Phe 439 [242], [243] kao što je i dobiveno molekulskim uklapanjem referentnog inhibitora Ko143. Spoj DAC-3Amid se, za razliku od toga, veže pliče u šupljini 1 i ne ostvaruje značajne interakcije s Phe 439 već je njegovo vezanje stabilizirano hidrofobnim interakcijama s ostacima aminokiselina što je razlog i njegovog slabijeg inhibitornog učinka spram Ko143 kojeg smo pokazali eksperimentalno. Spoj DAC-3Amid prilikom vezanja u šupljinu 1 zauzima zatvoreniju konformaciju u kojoj su adamantani u bočnim ograncima blizu jedan drugoga za razliku od DAC-2Amida koji zbog kraćih bočnih lanaca zauzima otvorenu konformaciju u kojoj su adamantani udaljeni jedan od drugoga. Zauzimanje povoljnijeg položaja unutar veznog mjesta vjerojatno je razlog zašto DAC-3Amid u svim eksperimentalnim testovima postiže jači inhibitorni učinak prema transporteru ABCG2 spram DAC-2Amida. Jackson i suradnici navode da šupljina 1 transportera ABCG2 ima određenu konformacijsku rigidnost, neovisno o ligandu koji se u nju veže te da to uvelike smanjuje spektar molekula koje se mogu vezati na transporter ABCG2 [61].

Spoj DAC-2Amid je u našim ispitivanjima pokazao jači inhibitorni učinak na transporter ABCB1 spram DAC-3Amida [96]. S obzirom na to da nismo ispitali vezanje ova dva spoja metodom molekulskog uklapanja na protein ABCB1, pretpostavljamo da je razlog tome razlika u strukturi spojeva, što omogućuje DAC-2Amidu da bolje sjedne u vezno mjesto transportera i ostvari povoljnije interakcije s ostacima aminokiselina koji se tamo nalaze.

Druga skupina spojeva čiji smo učinak istraživali prvenstveno na transporter ABCG2 a onda i na ABCB1 su derivati antimalarika primakina - fumardiamidi primakina i halogenanilina (1786, 1787, 1788 i 1789) te *bis*-urea primakina i halogenanilina (1790 i 1791). U slučaju prve skupine derivata primakina radi se o diamidima fumarne kiseline kod kojih je jedna amidna veza postignuta s primakinom a druga s halogenanilinom koji ima supstituiran klor u *meta*- (1786) ili *para*- (1787) položaju, ili trifluorometilnu skupinu u *meta*- (1788) ili *para*- (1789) položaju [182]. Druga skupina derivata primakina ima u svojoj strukturi *bis*-urea središnju funkcionalnu grupu te također primakinski dio i halogenanilin koji ima supstituiran klor (1790) ili trifluorometilnu skupinu (1791) u *para*- položaju [180].

Antimalarici poput primakina, klorokina, hidrosiklorokina i artemizinina se, osim za liječenje malarije, prenamjenjuju i za druge indikacije, jer su do sada pokazali značajan protuparazitski, protuvirusni i protutumorski učinak, a neki od njih su se pokazali i kao potentni inhibitori transportera ABC [156], [170], [175], [177], [244]–[248]. Prenamjena lijekova (engleski pojam „*drug repurposing*“) je strategija pronalaska novog načina upotrebe već istraženih i odobrenih lijekova za indikaciju različitu od one za koju su razvijeni. Ovakav pristup ima mnoge prednosti pred razvojem potpuno novog lijeka, kao što su manji rizik od neuspjeha u pogledu sigurnosti

lijeka, kraći period razvoja lijeka i manji troškovi [249]. Uz prenamjenu se često rade i modifikacije postojećih lijekova, kako bi se postigao bolji učinak. Fumardiamidi primakina i halogenanilina te *bis*-urea primakina i halogenanilina, koje smo istraživali u ovom radu, su dobiveni modifikacijom strukture primakina kako bi se poboljšala njegova antimalarijska svojstva i citotoksični učinak, te je pokazano da ovi spojevi imaju snažnu protutumorsku aktivnost [180], [182]. Na temelju tih rezultata i literaturnih podataka o tome koje strukturne značajke treba imati potencijalni inhibitor (lipofilnost molekule, aromatske skupine, mogućnost stvaranja vodikove veze), te činjenice da neki antimalarici djeluju inhibitorno na transportere ABC, pretpostavili smo da bi navedeni derivati primakina mogli imati inhibitorni učinak na aktivnost transportera ABCG2 i ABCB1.

Dva fumardiamida primakina i halogenanilina koji imaju kloridnu skupinu (1786) i trifluorometilnu skupinu (1788) u *meta*- položaju na benzenskom prstenu pokazala su jači citotoksični učinak na staničnim linijama PLB/ABCG2 i PLB-985 od spojeva 1787 i 1789 koji imaju iste skupine u *para*-položaju. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima Rajić i suradnika [182] koji su pokazali da fumardiamidi primakina i halogenanilina sa supstituentima u *meta*-položaju na benzenskom prstenu imaju veću citotoksičnost prema staničnoj liniji akutne limfoblastične leukemije ljudi (DND-41), dok su oni kojima su supstituenti u *para*-položaju imali jaku antibakterijsku aktivnost. Spojevi koji pripadaju skupini *bis*-urea primakina i halogenanilina, a imaju kloridnu skupinu (1790) ili trifluorometilnu skupinu (1791) u *para*-položaju na benzenskom prstenu, pokazali su značajno jaču citotoksičnu aktivnost spram spojeva 1787 i 1789 što znači da je struktura središnje funkcionalne skupine važna za antiproliferativnu aktivnost ovih spojeva. Dodatno, stanična linija PLB/ABCG2 je pokazala značajno veću otpornost na spojeve 1788 i 1790 što nas navodi na pretpostavku da se ovi spojevi prenose pomoću ABCG2.

Svi testirani derivati primakina djelovali su inhibitorno na aktivnost transportera ABCG2 u testu nakupljanja supstrata H 33342 u staničnim linijama MDCK-II/ABCG2, MDCK-II, PLB/ABCG2 i PLB-985, a inhibitorni učinak spojeva 1786, 1787 i 1789 je potvrđen i u staničnim linijama HEK-EGFP-G2 i HEK-293 tijekom praćenja nakupljanja H 33342 u stvarnom vremenu. Antimalarici primakin i klorokin u našim istraživanjima nisu pokazali inhibitorni učinak na transporter ABCG2, što je u međuvremenu i literaturno potvrđeno [165]. Ta informacija nam govori da se modifikacijom strukture primakina može postići njegova jača inhibitorna aktivnost. Iz samog testa nakupljanja supstrata nismo mogli donijeti zaključak o razlici u inhibitornom potencijalu između dvije skupine derivata primakina, te smo ispitali vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 i izmjerili ATP-aznu aktivnosti kako bismo

uz to dobili i informaciju o prirodi interakcije pojedinog derivata s transporterom ABCG2. Spojevi 1786 i 1788, koji imaju supstituente u *meta*- položaju na benzenskom prstenu i koji su pokazali snažniju citotoksičnu aktivnost pojačali su vezanje protutijela 5D3 u najnižoj koncentraciji (1 μ M), dok su spojevi 1787 i 1789, s *para*- položajem supstituentana, pojačali njegovo vezanje u koncentraciji od 5 μ M. Pri tome su spojevi 1786 i 1789 u koncentraciji od 5 μ M dosegili 70% i više maksimalne vrijednosti inhibicije transportera, dok je 1787 bio nešto manje potentan. Derivati *bis*-urea primakina i halogenanilina pokazali su puno slabiji učinak na inhibiciju ABCG2 od fumardiamida. Ranije smo zaključili da se spojevi 1788 i 1790 prenose pomoću transportera ABCG2 jer je stanična linija koja ima prekomjernu ekspresiju ABCG2 pokazala značajnu otpornost na njih u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom. Međutim, ovi spojevi su djelovali inhibitorno u testu nakupljanja supstrata i vezanja 5D3 što ukazuje da imaju inhibitorni učinak na transporter u određenoj koncentraciji. Poznato je da su mnogi potentni inhibitori transportera ABCG2 ujedno i njegovi supstrati stoga taj rezultat nije iznenađujuć. Primjerice, Wang i suradnici nedavno su pokazali da je selektivni inhibitor receptora tirozinske kinaze ALK, spoj NVP-TAE684, supstrat transportera ABCG2 koji u određenim koncentracijama djeluje kao potentni inhibitor [250].

Utjecaj na aktivnost ATP-aze ispitali smo za one spojeve koji su pokazali jednaku citotoksičnu aktivnost u staničnoj liniji sa i bez transportera i koji su značajno pojačali vezanje 5D3 – 1786, 1787 i 1789, a rezultati su potvrdili da su ovi spojevi potentni inhibitori transportera ABCG2. Dodatno smo ispitali utjecaj ova tri spoja na aktivnost ATP-aze transportera ABCB1 i pokazali da su sva tri njegovi supstrati, što smo naknadno potvrdili i testom nakupljanja fluorescentnog supstrata kalceina-AM u stanicama A2780/Adr s prekomjernom ekspresijom ABCB1 u kojem niti jedan od njih nije povećao nakupljanje supstrata unutar stanica. To znači da možemo govoriti o inhibitorima koji su selektivni za transporter ABCG2, za razliku od diaza-18-kruna-6 etera koji su inhibitori ABCB1 i ABCG2 [96]. Spojevi 1786, 1787 i 1789 su općenito u svim testovima pokazali jači inhibitorni potencijal prema transporteru ABCG2 od diaza-18-kruna-6 etera. Ova tri derivata primakina povećala su osjetljivosti tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na mitoksantron u gotovo jednakoj mjeri kao i referentni inhibitor Ko143, dok DAC-3Amid nije postigao takav učinak.

Razlog tomu može biti i veća koncentracija primakina koja je korištena u kombiniranom testu citotoksičnosti spram koncentracije DAC-3Amida, koji je pokazivao toksičnost u višim koncentracijama. Niža citotoksičnost primakina čini ih još boljim kandidatima za inhibitore, jer je veći raspon koncentracija koje se mogu ispitati i primijeniti. Kako bismo dobili detaljniji

uvid u strukturne značajke derivata primakina koje su važne za njihov inhibitorski potencijal, u budućim je istraživanjima potrebno provesti račune molekularnog uklapanja ispitanih derivata primakina u protein ABCG2. Na temelju dosadašnjih ispitivanja možemo zaključiti da vrsta supstituenta i njegov položaj na benzenskom prstenu nije ključan za pojačani inhibitorski potencijal spoja jer spojevi 1786, 1787 i 1789 djeluju podjednako snažno, dok je struktura središnje funkcionalne skupine (fumarna kiselina ili *bis*-urea) važna. U nedavnom istraživanju, Roussel i suradnici su na primjeru derivata kromona, izomera kumarina, pokazali da pozicija bromidne skupine kao supstituenta na benzenskom prstenu spoja nije značajno utjecala na njegovu inhibitorsku aktivnost prema ABCG2, dok je uvođenje hidrofobnijih skupina u strukturu spoja bilo od velikog značaja [217].

Derivat primakina 1786 te krunasti eter DAC-3Amid u kombinaciji sa mitoksantronom u staničnoj liniji PLB/ABCG2 pojačavaju učinak kemoterapeutika na stanični ciklus. Iz literature je poznato da kemoterapeutik mitoksantron zaustavlja stanični ciklus u fazi G2/M zato što djeluje kao inhibitor topoisomerase I i sprječava pravilnu diobu stanica te aktivira apoptozu [214]. Oba su spoja u kombinaciji s mitoksantronom povećala broj stanica u fazi subG1, koja označava stanice u apoptozu, u usporedbi sa samim mitoksantronom ili kada su ispitivani svaki pojedinačno, što znači da je učinak spojeva vezan isključivo za inhibiciju transportera ABCG2 i povećano nakupljanje mitoksantrona u stanicama. Iz ovog je testa, također, vidljivo da su derivati primakina snažniji inhibitori od DAC-3Amida.

Spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid te derivati primakina 1786, 1787 i 1789 nisu pokazali dodatni mehanizam inhibicije ABCG2 kao što su smanjenje njegove ekspresije i utjecaj na njegovo pravilno pozicioniranje na staničnoj membrani, a nisu imali utjecaj ni na stanični oksidativni stres, već svoj inhibitorski potencijal ostvaruju direktnim vezanjem na transporter i kompeticijom za vezno mjesto sa supstratom.

Obje skupine spojeva koje smo ispitivali u ovom radu pokazale su potencijal za daljnji razvoj novih derivata modifikacijom postojeće strukture, s ciljem poboljšanja njihove inhibitorske aktivnosti prema transporterima ABC i rješavanja problema višestruke otpornosti tumora na terapiju.

S obzirom da se veliki broj lijekova prenosi upravo putem transportera ABC ili pak modulira njihovu aktivnost, ovi transporteri igraju ključnu ulogu u farmakokinetici mnogih lijekova te time značajno utječu na učinak liječenja. Stoga je važno poznavati prirodu interakcije pojedinog spoja s transporterom, ukoliko se derivati koje smo ispitali u ovom radu razvijaju dalje kao potencijalni protubakterijski i protutumorski lijekovi ili antimalarici, jer mogu u kombinaciji s drugim lijekovima izazvati povećanu toksičnost.

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati dobiveni testovima nakupljanja supstrata transportera ABCB1 i ABCG2 u staničnim linijama A2780/Adr, MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 koje imaju prekomjernu ekspresiju transportera ABCB1 odnosno ABCG2 te u izvrnutim membranskim vezikulama koje imaju transporter ABCG2 pokazuju da monoaza-18-kruna-6 eteri (MAC i MAC-Amidi) ne djeluju inhibitorno na transportere. S druge strane, diaza-18-kruna-6 eteri koji imaju amidnu vezu u poveznici između eterskog prstena krune i bočnog ogranka adamantana (DAC-Amidi) pokazuju značajno jači inhibitorni utjecaj na transportere ABCB1 i ABCG2 spram diaza-18-kruna-6 etera koji imaju aminske veze (DAC), iz čega se može zaključiti da je kemijska struktura spoja važna za njegovu inhibitornu aktivnost.
2. Detaljnom analizom učinka najaktivnijih spojeva koju smo proveli koristeći niz staničnih i biokemijskih testova, kao što je analiza ATP-azne aktivnosti transportera ABCG2 i vezanje konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 na vanjski epitop transportera ABCG2, pokazali smo da spojevi DAC-2Amid i DAC-3Amid značajno smanjuju aktivnost oba transportera iz čega se može zaključiti da su njihovi snažni inhibitori. Rezultati pokazuju da spoj DAC-2Amid ima snažniji inhibitorni učinak na transporter ABCB1, a DAC-3Amid značajno snažnije inhibira transporter ABCG2, premda smo pokazali da njegova aktivnost nije dosegla učinkovitost referentnog inhibitora Ko143. Ove rezultate potvrdili smo i molekulskim uklapanjem spojeva u transporter ABCG2 čime smo pokazali da se DAC-3Amid veže plice u šupljinu 1 i ne ostvaruje interakciju s aminokiselinom Phe 439, što može biti razlog slabije aktivnosti u odnosu na Ko143.
3. Nizom staničnih i biokemijskih testova na staničnim linijama MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2 te u izvrnutim membranskim vezikulama koje imaju transporter ABCG2 pokazali smo da derivati primakina 1786, 1787 i 1789 značajno smanjuju aktivnost transportera ABCG2 što dovodi do zaključka da su njegovi snažni inhibitori. Rezultati upućuju na to da je njihov inhibitorni potencijal usporediv s referentnim inhibitorom Ko143, te da imaju snažniji inhibitorni učinak od DAC-3Amida. Ispitivanjem utjecaja derivata primakina na aktivnost ATP-aze transportera ABCB1 u izvrnutim membranskim vezikulama pokazali smo da isti spojevi snažno stimuliraju njegovu aktivnost iz čega zaključujemo da djeluju kao supstrati transportera ABCB1 te da su selektivni inhibitori

transportera ABCG2.

4. Ispitivanjem utjecaja derivata primakina na aktivnost transportera ABCG2 pokazali smo da fumardiamidi primakina i halogenanilina imaju snažniji inhibitorski učinak od *bis*-urea primakina i halogenanilina, što upućuje na zaključak da je struktura središnje funkcionalne skupine važna za inhibitorski potencijal derivata primakina.
5. Rezultati dobiveni ispitivanjem antiproliferativne aktivnosti metodom MTT te specifičnog utjecaja na stanični ciklus pomoću protočne citometrije pokazali su da je tretman s kemoterapeutikom mitoksantronom u kombinaciji sa spojevima DAC-3Amid, 1786, 1787 i 1789 značajno povećao osjetljivost tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na kemoterapeutik mitoksantron, što dovodi do zaključka da su ovi spojevi dobri kandidati za rješavanje problema višestruke otpornosti tumora na terapiju.
6. Praćenjem utjecaja spojeva na lokalizaciju i ekspresiju proteina ABCG2 te molekulskim uklapanjem pokazali smo da spojevi DAC-3Amid, 1786, 1787 i 1789 svoju inhibitorsku aktivnost ostvaruju isključivo kroz interakciju sa transporterom i vezanjem u šupljinu 1, iz čega zaključujemo da po mehanizmu inhibicije djeluju kao kompetitivni inhibitori transportera ABCG2.
7. Ovim istraživanjem pokazali smo da je struktura molekule inhibitora vrlo važna za njegovu aktivnost i da se modifikacijom strukture može utjecati na snagu inhibicije. To je važan doprinos daljnjim istraživanjima potencijalnih inhibitora transportera ABC, koji bi jednoga dana mogli ući u kliničku primjenu za rješavanje problema višestruke otpornosti na terapiju, jer daje uvid u strukturne karakteristike koje omogućuju bolju interakciju s transporterima.

7. LITERATURA

- [1] I. Dagogo-Jack and A. T. Shaw, “Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, 2018, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166.
- [2] N. Vasan, J. Baselga, and D. M. Hyman, “A view on drug resistance in cancer,” *Nature*, vol. 575, no. 7782, pp. 299–309, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1730-1.
- [3] A. Persidis, “Cancer multidrug resistance,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 1, pp. 94–95, 1999, doi: 10.1038/5289.
- [4] H. Zhang, H. Xu, C. R. Ashby, Y. G. Assaraf, Z. S. Chen, and H. M. Liu, “Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp),” *Med. Res. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 525–555, 2021, doi: 10.1002/med.21739.
- [5] G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, and M. M. Gottesman, “Targeting multidrug resistance in cancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 219–234, 2006, doi: 10.1038/nrd1984.
- [6] A. Catalano *et al.*, “Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies,” *Molecules*, vol. 27, no. 3, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3390/molecules27030616.
- [7] M. M. Gottesman, T. Fojo, and S. E. Bates, “Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 48–58, 2002, doi: 10.1038/nrc706.
- [8] B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakács, and A. Váradi, “Human multidrug resistance {ABCB} and {ABCG} transporters: participation in a chemoimmunity defense system,” *Physiol. Rev.*, vol. 86, no. 4, pp. 1179–1236, 2006, doi: 10.1152/physrev.00037.2005.
- [9] R. W. Robey, K. M. Pluchino, M. D. Hall, A. T. Fojo, S. E. Bates, and M. M. Gottesman, “Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer,” vol. 18, no. 7, pp. 452–464, 2019, doi: 10.1038/s41568-018-0005-8.Revisiting.
- [10] R. L. Juliano and V. Ling, “A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants,” *BBA - Biomembr.*, vol. 455, no. 1, pp. 152–162, 1976, doi: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- [11] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, and M. M. Gottesman, “P-glycoprotein: From genomics to mechanism,” *Oncogene*, vol. 22, no. 47 REV. ISS. 6, pp. 7468–7485, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206948.
- [12] M. M. Gottesman, “Mechanisms of cancer drug resistance,” *Annu Rev Med*, vol. 53, pp. 615–627, 2002, doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103929.
- [13] S. M. Marques, L. Šupolíková, L. Molčanová, K. Šmejkal, D. Bednar, and I. Slaninová, “Screening of natural compounds as p-glycoprotein inhibitors against multidrug resistance,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 4, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9040357.
- [14] O. Barsony *et al.*, “A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-

- glycoprotein,” *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1038/srep24810.
- [15] C. F. Higgins and K. J. Linton, “The ATP switch model for ABC transporters,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 918–926, 2004, doi: 10.1038/nsmb836.
- [16] B. J. Orlando and M. Liao, “ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16155-2.
- [17] N. Khunweeraphong, D. Szöllösi, T. Stockner, and K. Kuchler, “The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-13302-2.
- [18] R. Eckenstaler and R. A. Benndorf, “3D structure of the transporter ABCG2—What’s new?,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 177, no. 7, pp. 1485–1496, 2020, doi: 10.1111/bph.14991.
- [19] R. W. Robey *et al.*, “ABCG2: A perspective,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 1, pp. 3–13, 2009, doi: 10.1016/j.addr.2008.11.003.
- [20] K. P. Locher, “Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 487–493, 2016, doi: 10.1038/nsmb.3216.
- [21] H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes, and B. Sarkadi, “The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox).,” *Drug Discov. Today*, vol. 13, no. 9–10, pp. 379–393, 2008, doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
- [22] A. V. L. Huis and S. Hospital, “Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine,” vol. 94, no. March, pp. 2031–2035, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.5.2031.
- [23] J. H. Lin and M. Yamazaki, “Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics Clinical Implications,” vol. 42, no. 1, pp. 59–98, 2003.
- [24] J. Van Asperen *et al.*, “Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833,” vol. 76, pp. 1181–1183, 1997.
- [25] B. Greiner *et al.*, “The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin Find the latest version : The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin,” no. August, 2002.
- [26] N. Mizuno, T. Niwa, Y. Yotsumoto, and Y. Sugiyama, “Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery,” vol. 55, no. 3, pp. 425–461, 2003, doi: 10.1124/pr.55.3.1.proteins.
- [27] K. Danø, “Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 323, no. 3, pp. 466–483, Oct. 1973, doi: 10.1016/0005-2736(73)90191-0.
- [28] L. A. Doyle and D. D. Ross, “Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2),” *Oncogene*, vol. 22, no. 47 REV. ISS. 6, pp. 7340–7358, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206938.
- [29] J. I. Fletcher, M. Haber, M. J. Henderson, and M. D. Norris, “ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 147–

- 156, 2010, doi: 10.1038/nrc2789.
- [30] S. Hoffmeyer, “Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 7, pp. 3473–3478, 2000, doi: 10.1073/pnas.050585397.
- [31] M. Schwab, M. Eichelbaum, and M. F. Fromm, “Genetic Polymorphisms of the Human MDR1 Drug Transporter,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 43, pp. 285–307, 2003, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140233.
- [32] U. Brinkmann, I. Roots, and M. Eichelbaum, “Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: Impact of polymorphisms on pharmacotherapy,” *Drug Discov. Today*, vol. 6, no. 16, pp. 835–839, 2001, doi: 10.1016/S1359-6446(01)01892-X.
- [33] S. G. Aller *et al.*, “Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding,” *Science (80-.)*, vol. 323, no. 5922, pp. 1718–1722, 2009, doi: 10.1126/science.1168750.
- [34] Y. Kim and J. Chen, “Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation,” pp. 2–7, 2018.
- [35] J. García-Nafria and C. G. Tate, “Cryo-electron microscopy: Moving beyond X-ray crystal structures for drug receptors and drug development,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 60, pp. 51–71, 2020, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010919-023545.
- [36] A. Alam, J. Kowal, E. Broude, I. Roninson, and K. P. Locher, “Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein,” *Science (80-.)*, vol. 363, no. 6428, pp. 753–756, 2019, doi: 10.1126/science.aav7102.
- [37] C. Martin, G. Berridge, C. F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton, and R. Callaghan, “Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 58, no. 3, pp. 624–632, 2000, doi: 10.1124/mol.58.3.624.
- [38] R. J. Ferreira, C. A. Bonito, M. J. U. Ferreira, and D. J. V. A. dos Santos, “About P-glycoprotein: a new drugable domain is emerging from structural data,” *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1002/wcms.1316.
- [39] S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, and M. M. Gottesman, “Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, pp. 361–398, 1999, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
- [40] T. Litman, T. E. Druley, W. D. Stein, and S. E. Bates, “From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 7, pp. 931–959, Jun. 2001, doi: 10.1007/PL00000912.
- [41] A. B. Shapiro and V. Ling, “Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 250, no. 1, pp. 130–137, 1997, doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00130.x.
- [42] R. J. Ferreira, M. J. U. Ferreira, and D. J. V. A. Dos Santos, “Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-

- glycoprotein.," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 7, pp. 1747–1760, 2013, doi: 10.1021/ci400195v.
- [43] F. J. Sharom, "The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs?," *J. Membr. Biol.*, vol. 160, no. 3, pp. 161–175, 1997, doi: 10.1007/s002329900305.
- [44] Y.-N. Chen, L. A. Mickley, A. M. Schwartz, E. M. Acton, J. Hwang, and A. T. Fojo, "Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 17, pp. 10073–10080, 1990.
- [45] L. A. Doyle *et al.*, "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 26, pp. 15665–15670, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.26.15665.
- [46] T. Litman *et al.*, "The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2).," *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 1, no. 2000, pp. 2011–21, 2000, doi: 10.1055/s-0028-1096972.
- [47] R. Allikmets, L. M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica, and M. Dean, "A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 23, pp. 5337–5339, 1998.
- [48] M. H. Hasanabady and F. Kalalinia, "ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer," *J. Biosci.*, vol. 41, no. 2, pp. 313–324, 2016, doi: 10.1007/s12038-016-9601-5.
- [49] H. Wang, E.-W. Lee, X. Cai, Z. Ni, L. Zhou, and Q. Mao, "Membrane Topology of the Human Breast Cancer Resistance Protein," *Biochemistry*, vol. 47, no. 52, pp. 13778–13787, 2009, doi: 10.1021/bi801644v.Membrane.
- [50] C. Özvegy *et al.*, "Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 285, no. 1, pp. 111–117, 2001, doi: 10.1006/bbrc.2001.5130.
- [51] F. Staud and P. Pavsek, "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 4, pp. 720–725, 2005, doi: 10.1016/j.biocel.2004.11.004.
- [52] N. M. I. I. Taylor, I. Manolaridis, S. M. Jackson, J. Kowal, H. Stahlberg, and K. P. Locher, "Structure of the human multidrug transporter ABCG2," *Nature*, vol. 546, no. 7659, pp. 504–509, 2017, doi: 10.1038/nature22345.
- [53] K. Noguchi, K. Katayama, and Y. Sugimoto, "Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics," *Pharmgenomics. Pers. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 53–64, 2014, doi: 10.2147/PGPM.S38295.
- [54] R. W. Robey *et al.*, "Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity," *Br. J. Cancer*, vol. 89, no. 10, pp. 1971–1978, 2003, doi: 10.1038/sj.bjc.6601370.
- [55] C. Özvegy-Laczka, G. Köblös, B. Sarkadi, and A. Váradi, "Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: Major differences in transport capacity and substrate recognition," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1668, no. 1, pp.

- 53–63, 2005, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.11.005.
- [56] B. Zámbo *et al.*, “Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25695-z.
- [57] O. Polgar, R. W. Robey, and S. E. Bates, “ABCG2: Structure, function and role in drug response,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–15, 2008, doi: 10.1517/17425255.4.1.1.
- [58] L. Lá Szló, B. Zs Sarkadi, and T. S. Hegedűs, “Jump into a New Fold—A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter,” 2016, doi: 10.1371/journal.
- [59] J. Y. Lee *et al.*, “Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8,” *Nature*, vol. 533, no. 7604, pp. 561–564, 2016, doi: 10.1038/nature17666.
- [60] L. Homolya, T. I. Orbán, L. Csanády, and B. Sarkadi, “Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1808, no. 1, pp. 154–163, 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.031.
- [61] S. M. Jackson *et al.*, “Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 25, no. April, 2018, doi: 10.1038/s41594-018-0049-1.
- [62] Á. Telbisz *et al.*, “Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1768, no. 11, pp. 2698–2713, 2007, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.06.026.
- [63] Á. Telbisz, C. Hegedűs, A. Váradi, B. Sarkadi, and C. Özvegy-Laczka, “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.*, vol. 42, no. 4, pp. 575–585, 2014, doi: 10.1124/dmd.113.055731.
- [64] B. M. A. Goodell, K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, and R. C. Mulligan, “Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replating In Vivo By Margaret A. Goodell, Katja Brose, Glenn Paradis,* A. Stewart Conner,* and Richard C. Mulligan,” vol. 183, no. April, 1996.
- [65] S. Zhou *et al.*, “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.*, vol. 7, no. 9, pp. 1028–1034, 2001, doi: 10.1038/nm0901-1028.
- [66] C. W. Scharenberg, M. A. Harkey, and B. Torok-Storb, “The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors,” *Blood*, vol. 99, no. 2, pp. 507–512, 2002, doi: 10.1182/blood.V99.2.507.
- [67] X.-W. Ding, J.-H. Wu, and C.-P. Jiang, “ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy,” *Life Sci.*, vol. 86, pp. 631–637, doi: 10.1016/j.lfs.2010.02.012.
- [68] K. D. Bunting, “ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells,” *Stem Cells*, vol. 20, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2002, doi: 10.1002/stem.200011.

- [69] J. H. Gerlach, "Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin," *Cancer Res.*, vol. 47, no. 10, pp. 2594–2598, 1987.
- [70] S. P. C. Cole *et al.*, "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line," *Science (80-.)*, vol. 258, no. 5088, pp. 1650–1654, 1992, doi: 10.1126/science.1360704.
- [71] R. G. Deeley, C. Westlake, and S. P. C. Cole, "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins," *Physiol. Rev.*, vol. 86, no. 3, pp. 849–899, 2006, doi: 10.1152/physrev.00035.2005.
- [72] R. G. Deeley and S. P. C. Cole, "Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 4, pp. 1103–1111, 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.036.
- [73] S. P. C. Cole, "Multidrug resistance protein 1 (mrp1, abcc1), a 'multitasking' atp-binding cassette (abc,) transporter," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 45, pp. 30880–30888, 2014, doi: 10.1074/jbc.R114.609248.
- [74] T. Falgui, "ABC Transporters in Human Diseases : Future Directions and Therapeutic Perspectives," 2022.
- [75] L. J. Goldstein *et al.*, "Expression of Multidrug Resistance Gene in Human Cancers," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 81, no. 2, pp. 116–124, Jan. 1989, doi: 10.1093/jnci/81.2.116.
- [76] Z. Benderra *et al.*, "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 23, pp. 7896–7902, 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0795.
- [77] D. Steinbach, W. Sell, A. Voigt, J. Hermann, F. Zintl, and A. Sauerbrey, "BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia," *Leukemia*, vol. 16, no. 8, pp. 1443–1447, 2002, doi: 10.1038/sj.leu.2402541.
- [78] B. Uggla *et al.*, "BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients," *Leuk. Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 141–146, 2005, doi: 10.1016/j.leukres.2004.06.004.
- [79] K. Natarajan, Y. Xie, M. R. Baer, and D. D. Ross, "Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Cancer Drug Resistance," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 8, pp. 1084–1103, 2012, doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.002.
- [80] W. Berger *et al.*, "Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: Prognostic implications," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 131, no. 6, pp. 355–363, 2005, doi: 10.1007/s00432-004-0653-9.
- [81] T. C. Hsia, C. C. Lin, J. J. Wang, S. T. Ho, and A. Kao, "Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression," *Lung*, vol. 180, no. 3, pp. 173–179, 2002, doi: 10.1007/s004080000091.
- [82] M. Munoz, M. Henderson, M. Haber, and M. Norris, "Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer," *IUBMB Life*, vol. 59, no. 12, pp. 752–757, 2007, doi: 10.1080/15216540701736285.

- [83] G. D. Leonard, T. Fojo, and S. E. Bates, "The Role of ABC Transporters in Clinical Practice," *Oncologist*, vol. 8, no. 5, pp. 411–424, 2003, doi: 10.1634/theoncologist.8-5-411.
- [84] R. J. Kathawala, P. Gupta, C. R. Ashby, and Z. S. Chen, "The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade," *Drug Resist. Updat.*, vol. 18, pp. 1–17, 2015, doi: 10.1016/j.drug.2014.11.002.
- [85] A. Kumar and V. Jaitak, "Natural products as multidrug resistance modulators in cancer," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 176, pp. 268–291, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.05.027.
- [86] W. S. Dalton *et al.*, "A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A southwest oncology group study," *Cancer*, vol. 75, no. 3, pp. 815–820, 1995, doi: 10.1002/1097-0142(19950201)75:3<815::AID-CNCR2820750311>3.0.CO;2-R.
- [87] Z. Binkhathlan and A. Lavasanifar, "P-glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 13, no. 3, pp. 326–346, 2013, doi: 10.2174/15680096113139990076.
- [88] A. Palmeira, E. Sousa, M. H. Vasconcelos, and M. M. Pinto, "Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 13, pp. 1946–2025, 2012, doi: 10.2174/092986712800167392.
- [89] H. M. Coley, "Chapter 15 Studies of P-Glycoprotein Inhibitors," *Business*, vol. 596, no. 1, pp. 1–18, 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-416-6.
- [90] S. Nobili, I. Landini, B. Giglioni, and E. Mini, "Pharmacological Strategies for Overcoming Multidrug Resistance," *Curr. Drug Targets*, vol. 7, no. 7, pp. 861–879, 2006, doi: 10.2174/138945006777709593.
- [91] J. Dinić *et al.*, "Novel heat shock protein 90 inhibitors suppress P-glycoprotein activity and overcome multidrug resistance in cancer cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184575.
- [92] J. Dong *et al.*, "Medicinal chemistry strategies to discover P-glycoprotein inhibitors: An update," *Drug Resist. Updat.*, vol. 49, no. December 2019, p. 100681, 2020, doi: 10.1016/j.drug.2020.100681.
- [93] T. Chen *et al.*, "Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 106–114, 2015, doi: 10.4161/15384047.2014.987062.
- [94] Z. Mao, J. Zhou, J. Luan, W. Sheng, X. Shen, and X. Dong, "Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 68, no. 2, pp. 179–183, 2014, doi: 10.1016/j.biopha.2013.10.003.
- [95] S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh, J. Behravan, and S. Arabzadeh, "Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors," *Life Sci.*, vol. 214, no. October, pp. 118–123, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
- [96] I. Guberović *et al.*, "Crown ethers reverse P-glycoprotein-mediated multidrug

- resistance in cancer cells,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32770-y.
- [97] S. K. Rabindran *et al.*, “Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C,” *Cancer Res.*, vol. 58, no. 24, pp. 5850–5858, 1998.
- [98] Y. Toyoda, T. Takada, and H. Suzuki, “Inhibitors of human ABCG2: From technical background to recent updates with clinical implications,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. MAR, pp. 1–9, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00208.
- [99] L. D. Weidner *et al.*, “The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2,” *J. Pharmacol. Exp. Ther. J Pharmacol Exp Ther*, vol. 354, no. September, pp. 384–393, 2015, doi: 10.1124/jpet.115.225482.
- [100] T. Ishikawa, H. Saito, H. Hirano, Y. Inoue, and Y. Ikegami, “Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy: Drug molecular design to circumvent multidrug resistance,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 910, pp. 267–278, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-965-5_11.
- [101] Y. Nakamura *et al.*, “Gefitinib (‘Iressa’, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 1541–1546, 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2417.
- [102] K. Sodani *et al.*, “Telatinib reverses chemotherapeutic multidrug resistance mediated by ABCG2 efflux transporter in vitro and in vivo,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 89, no. 1, pp. 52–61, 2014, doi: 10.1016/j.bcp.2014.02.012.
- [103] P. J. Houghton *et al.*, “Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7, pp. 2333–2337, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3344.
- [104] C. ling Dai *et al.*, “Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2,” *Cancer Lett.*, vol. 279, no. 1, pp. 74–83, 2009, doi: 10.1016/j.canlet.2009.01.027.
- [105] Y. Wei *et al.*, “New use for an old drug: Inhibiting ABCG2 with sorafenib,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 8, pp. 1693–1702, 2012, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0215.
- [106] C. Özvegy-Laczka, J. Cserepes, N. B. Elkind, and B. Sarkadi, “Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: Role of ABC multidrug transporters,” *Drug Resist. Updat.*, vol. 8, no. 1–2, pp. 15–26, 2005, doi: 10.1016/j.drup.2005.02.002.
- [107] A. Gupta, Y. Zhang, J. D. Unadkat, and Q. Mao, “HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2),” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 310, no. 1, pp. 334–341, 2004, doi: 10.1124/jpet.104.065342.
- [108] J. Weiss *et al.*, “Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, no. 2, pp. 238–245, 2007, doi: 10.1093/jac/dkl474.
- [109] D. Peña-Solórzano, S. A. Stark, B. König, C. A. Sierra, and C. Ochoa-Puentes, “ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators,” *Med. Res. Rev.*, vol. 37, no. 5,

- pp. 987–1050, Sep. 2017, doi: 10.1002/med.21428.
- [110] W. Mo and J. T. Zhang, “Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance,” *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–27, 2012.
- [111] B. Poller, E. Wagenaar, S. C. Tang, and A. H. Schinkel, “Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier,” *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 2, pp. 571–582, 2011, doi: 10.1021/mp1003898.
- [112] J. W. Polli *et al.*, “An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-Chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}met),” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, no. 2, pp. 439–442, 2009, doi: 10.1124/dmd.108.024646.
- [113] N. A. DeVries, J. Zhao, E. Kroon, T. Buckle, J. H. Beijnen, and O. Van Tellingen, “P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: Two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 21, pp. 6440–6449, 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1335.
- [114] T. Lapidot *et al.*, “A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice,” *Nature*, vol. 367, no. 6464, pp. 645–648, 1994, doi: 10.1038/367645a0.
- [115] D. Bonnet and J. E. Dick, “Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell,” *Nat. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 730–737, Jul. 1997, doi: 10.1038/nm0797-730.
- [116] Z. Yu, T. G. Pestell, M. P. Lisanti, and R. G. Pestell, “Cancer stem cells,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 12, pp. 2144–2151, 2012, doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.022.
- [117] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, 2003, doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- [118] R. R. Begicevic and M. Falasca, “ABC transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 11, 2017, doi: 10.3390/ijms18112362.
- [119] C. E. Meacham and S. J. Morrison, “Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity,” *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 328–337, 2013, doi: 10.1038/nature12624.
- [120] K. Eun, S. W. Ham, and H. Kim, “Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting,” *BMB Rep.*, vol. 50, no. 3, pp. 117–125, 2017, doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.3.222.
- [121] S. A. Mani *et al.*, “The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells,” *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 704–715, 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [122] A. E. Stacy, P. J. Jansson, and D. R. Richardson, “Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance,” *Mol Pharmacol*, vol. 84, no. 5, pp. 655–669, 2013, doi: 10.1124/mol.113.088609.
- [123] M. M. Ho, A. V. Ng, S. Lam, and J. Y. Hung, “Side population in human lung cancer

- cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 10, pp. 4827–4833, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3557.
- [124] G. M. Shi *et al.*, “Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 134, no. 11, pp. 1155–1163, 2008, doi: 10.1007/s00432-008-0407-1.
- [125] Y. WANG *et al.*, “A side population of cells from a human pancreatic carcinoma cell line harbors cancer stem cell characteristics,” *Neoplasma*, vol. 56, no. 5, pp. 371–378, 2009, doi: 10.4149/neo_2009_05_371.
- [126] P. B. Gupta *et al.*, “Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening,” *Cell*, vol. 138, no. 4, pp. 645–659, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.06.034.
- [127] K. Y. Kim *et al.*, “Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 413, no. 1, pp. 80–86, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.054.
- [128] D. Fuchs, A. Heinold, G. Opelz, V. Daniel, and C. Naujokat, “Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, no. 3, pp. 743–749, 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.042.
- [129] A. Huczynski, “Salinomycin - A New Cancer Drug Candidate,” *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 79, no. 3, pp. 235–238, 2012, doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01287.x.
- [130] T. T. Dong, H. M. Zhou, L. L. Wang, B. Feng, B. Lv, and M. H. Zheng, “Salinomycin selectively targets ‘CD133+’ cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 18, no. 6, pp. 1797–1804, 2011, doi: 10.1245/s10434-011-1561-2.
- [131] Y. Wang, “Effects of Salinomycin on Cancer Stem Cell in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells,” *Med. Chem. (Los. Angeles)*, vol. 7, no. 2, pp. 106–111, Mar. 2011, doi: 10.2174/157340611794859307.
- [132] R. Riccioni *et al.*, “The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor,” *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 45, no. 1, pp. 86–92, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.bcmd.2010.03.008.
- [133] M. Antoszczak, “A medicinal chemistry perspective on salinomycin as a potent anticancer and anti-CSCs agent,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 164, pp. 366–377, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.12.057.
- [134] D. Fuchs, V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz, and C. Naujokat, “Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 394, no. 4, pp. 1098–1104, 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.138.
- [135] C. Naujokat and R. Steinhart, “Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells,” vol. 2012, pp. 44–46, 2012, doi: 10.1155/2012/950658.
- [136] H. Wang, H. Zhang, Y. Zhu, Z. Wu, C. Cui, and F. Cai, “Anticancer Mechanisms of Salinomycin in Breast Cancer and Its Clinical Applications,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–13, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.654428.

- [137] M. Boesch, S. Sopper, and D. Wolf, "Ionophore Antibiotics as Cancer Stem Cell-Selective Drugs: Open Questions," *Oncologist*, vol. 21, no. 11, pp. 1291–1293, 2016, doi: 10.1634/theoncologist.2016-0159.
- [138] C. J. Pedersen, "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts," no. 157, 1967.
- [139] M. Kralj, L. Tušek-Božić, and L. Frkanec, "Biomedical potentials of crown ethers: Prospective antitumor agents," *ChemMedChem*, vol. 3, no. 10, 2008, doi: 10.1002/cmdc.200800118.
- [140] K. Mlinarić-Majerski and T. Šumanovac Ramljak, "Synthesis and alkali metal binding properties of novel N-adamantylaza-crown ethers," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 24, pp. 4893–4898, Jun. 2002, doi: 10.1016/S0040-4020(02)00444-1.
- [141] T. Šumanovac Ramljak, K. Mlinarić-Majerski, and B. Bertoša, "Alkali Metal Ion Complexation of Adamantane Functionalized Diaza-bibracchial Lariat Ethers," *Croat. Chem. Acta*, vol. 85, no. 4, pp. 559–568, Dec. 2012, doi: 10.5562/cca2100.
- [142] S. S. Basok *et al.*, "Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Aza-Crown Ethers," *Molecules*, vol. 26, no. 8, p. 2225, Apr. 2021, doi: 10.3390/molecules26082225.
- [143] M. R. Gokel *et al.*, "Crown ethers having side arms: a diverse and versatile supramolecular chemistry," *Journal of Coordination Chemistry*, vol. 74, no. 1–3. Taylor and Francis Ltd., pp. 14–39, 2021, doi: 10.1080/00958972.2021.1878352.
- [144] G. W. Gokel and I. A. Carasel, "Biologically active , synthetic ion transporters," pp. 378–389, 2007, doi: 10.1039/b605910b.
- [145] M. Yildiz, "Synthesis and antimicrobial activity of new crown ethers of Schiff base type," vol. 72, no. 3, pp. 215–224, 2007, doi: 10.2298/JSC0703215Y.
- [146] W. M. Leevy *et al.*, "Correlation of bilayer membrane cation transport and biological activity in alkyl-substituted lariat ethers," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 3, no. 9, p. 1647, 2005, doi: 10.1039/b418194h.
- [147] U. Z. Mirkhodjaev, V. A. Boldyrev, and O. V. Yarishkin, "On the Mechanism of Action of Dibenzo-18-crown-6 Diacyl-Derivatives on Malignant Tumors," no. 2005, pp. 191–196, 2021, doi: 10.1007/s10847-005-2021-z.
- [148] M. Marjanović *et al.*, "Antitumor potential of crown ethers: Structure-activity relationships, cell cycle disturbances, and cell death studies of a series of ionophores," *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 5, 2007, doi: 10.1021/jm061162u.
- [149] F. Supek *et al.*, "Could LogP be a principal determinant of biological activity in 18-crown-6 ethers? Synthesis of biologically active adamantane-substituted diaza-crowns," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 8, 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.05.009.
- [150] M. Febles *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of crown ether acyl derivatives," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 22, pp. 5591–5593, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.09.066.
- [151] J. J. Killion, "ELECTRICAL PROPERTIES OF NORMAL AND TRANSFORMED MAMMALIAN CELLS," *Biophys. J.*, vol. 45, no. 3, pp. 523–528, doi: 10.1016/S0006-3495(84)84189-2.

- [152] R. Binggeli and I. L. Cameron, “Cellular Potentials of Normal and Cancerous Fibroblasts and Hepatocytes,” vol. 40, no. June, pp. 1830–1835, 1980.
- [153] R. Muzzalupo, F. P. Nicoletta, S. Trombino, R. Cassano, F. Iemma, and N. Picci, “A new crown ether as vesicular carrier for 5-fluoruracil : Synthesis , characterization and drug delivery evaluation,” vol. 58, pp. 197–202, 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.03.010.
- [154] M. N. Borrel, M. Fiallo, I. Veress, and A. Garnier-Suillerot, “The effect of crown ethers, tetraalkylammonium salts, and polyoxyethylene amphiphiles on pirarubicin incorporation in K562 resistant cells,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, no. 12, pp. 2069–2076, Dec. 1995, doi: 10.1016/0006-2952(95)02112-4.
- [155] WHO, “World Malaria Report 2021,” 2021. [Online]. Available: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>.
- [156] V. R. Solomon and H. Lee, “Chloroquine and its analogs : A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 625, no. 1–3, pp. 220–233, 2009, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.063.
- [157] N. Vale, R. Moreira, and P. Gomes, “Primaquine revisited six decades after its discovery,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 937–953, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.ejmech.2008.08.011.
- [158] M. Foley and L. Tilley, “Quinoline Antimalarials : Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents MECHANISM THE BASIS OF PARASITES ACCUMULATE,” vol. 79, no. 1, pp. 55–87, 1998.
- [159] K. R. Tan and J. Hwang, “Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of Plasmodium vivax,” *J. Travel Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–2, 2018, doi: 10.1093/jtm/tay071.
- [160] M. Frédérick, J. Dogné, L. Angenot, and P. De Mol, “New Trends in Anti-Malarial Agents,” pp. 1435–1456, 2002.
- [161] G. Camarda *et al.*, “Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 3226, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11239-0.
- [162] J. Recht, E. A. Ashley, and N. J. White, “Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing : Divergent policies and practices in malaria endemic countries,” pp. 1–27, 2018.
- [163] S. Vangapandu, M. Jain, and K. Kaur, “Recent Advances in Antimalarial Drug Development,” no. May, 2007, doi: 10.1002/med.20062.
- [164] J. H. Kim, A. R. Choi, Y. K. Kim, and S. Yoon, “Co-treatment with the anti-malarial drugs mefloquine and primaquine highly sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing P-gp inhibition,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 441, no. 3, pp. 655–660, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.095.
- [165] Á. Telbisz *et al.*, “Interactions of anti-COVID-19 drug candidates with multispecific ABC and OATP drug transporters,” *bioRxiv*, p. 2020.11.21.392555, 2020, [Online]. Available: <http://biorxiv.org/content/early/2020/11/23/2020.11.21.392555.abstract>.

- [166] R. Duffy, C. Wade, and R. Chang, “Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review,” *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 17–18, pp. 942–953, 2012, doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.013.
- [167] A. K. Abdel-aziz, S. Shouman, E. El-demerdash, M. Elgendy, and A. B. Abdel-naim, “Chloroquine as a promising adjuvant chemotherapy together with sunitinib,” no. 2011, pp. 2011–2013, 2014, doi: 10.14800/sp.384.
- [168] F. Liu, Y. Shang, and S. Chen, “Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of lidamycin on non-small cell lung cancer cells in vitro,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 35, no. 5, pp. 645–652, 2014, doi: 10.1038/aps.2014.3.
- [169] A. Ganguli, D. Choudhury, S. Datta, S. Bhattacharya, and G. Chakrabarti, “Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis,” *Biochimie*, vol. 107, pp. 338–349, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.biochi.2014.10.001.
- [170] C. Verbaanderd *et al.*, “Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)— chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents,” pp. 1–35, 2017.
- [171] L. Liu *et al.*, “Chloroquine inhibits cell growth in human A549 lung cancer cells by blocking autophagy and inducing mitochondrial - mediated apoptosis,” no. 19, pp. 2807–2816, 2018, doi: 10.3892/or.2018.6363.
- [172] R. H. Van Huijsduijnen *et al.*, “Anticancer Properties of Distinct Antimalarial Drug Classes,” vol. 8, no. 12, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082962.
- [173] Y. K. Wong *et al.*, “Artemisinin as an anticancer drug : Recent advances in target profiling and mechanisms of action,” no. May, pp. 1492–1517, 2017, doi: 10.1002/med.21446.
- [174] B. Zorc, I. Perković, K. Pavić, Z. Rajić, and M. Beus, “Primaquine derivatives: Modifications of the terminal amino group,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 182, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111640.
- [175] A. R. Choi, J. H. Kim, Y. H. Woo, H. S. Kim, and S. Yoon, “Anti-malarial drugs primaquine and chloroquine have different sensitization effects with anti-mitotic drugs in resistant cancer cells,” *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 4, pp. 1641–1648, 2016.
- [176] S. R. Rijpma, J. J. M. W. Van Den Heuvel, M. Van Der Velden, R. W. Sauerwein, F. G. M. Russel, and J. B. Koenderink, “Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity,” *Malar. J.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1186/1475-2875-13-359.
- [177] L. Liu, L. Fu Zuo, and J. Wen Guo, “Reversal of multidrug resistance by the anti-malaria drug artesunate in the esophageal cancer Eca109/ABCG2 cell line,” *Oncol. Lett.*, vol. 6, no. 5, pp. 1475–1481, 2013, doi: 10.3892/ol.2013.1545.
- [178] I. Fernandes, N. Vale, V. de Freitas, R. Moreira, N. Mateus, and P. Gomes, “Anti-tumoral activity of imidazoquinones, a new class of antimalarials derived from primaquine,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 24, pp. 6914–6917, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.10.081.
- [179] M. Beus, D. Fontinha, J. Held, and Z. Raji, “Primaquine and Chloroquine Fumardiamides as Promising Antiplasmodial Agents,” pp. 1–15.

- [180] I. Perković *et al.*, “Novel urea and bis-urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl or halogenphenyl substituents: Synthesis and biological evaluation,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 124, pp. 622–636, 2016, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.08.021.
- [181] P. A. Jackson, J. C. Widen, D. A. Harki, and K. M. Brummond, “Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of α,β -Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions,” *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 3, pp. 839–885, Feb. 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00788.
- [182] Z. Rajić *et al.*, “Asymmetric primaquine and halogenaniline fumardiamides as novel biologically active Michael acceptors,” *Molecules*, vol. 23, no. 7, 2018, doi: 10.3390/molecules23071724.
- [183] B. Sarkadi, E. M. Price, R. C. Boucher, U. A. Germann, and G. A. Scarborough, “Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 7, pp. 4854–4858, 1992, doi: 10.1016/s0021-9258(18)42909-2.
- [184] H. Glavinas, D. Méhn, M. Jani, B. Oosterhuis, K. Herédi-Szabó, and P. Krajcsi, “Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 4, no. 6, pp. 721–732, 2008, doi: 10.1517/17425255.4.6.721.
- [185] M. Horio, M. M. Gottesman, and I. Pastan, “ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 10, pp. 3580–3584, 1988, doi: 10.1073/pnas.85.10.3580.
- [186] Á. Telbisz *et al.*, “Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 45, no. 1–2, pp. 101–109, 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2011.10.021.
- [187] K. Radman, “Molekulsko uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2,” Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2021.
- [188] S. Kim *et al.*, “PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D1388–D1395, 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa971.
- [189] C. J. Williams *et al.*, “MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation,” *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 293–315, 2018, doi: 10.1002/pro.3330.
- [190] H. M. Berman, “The Protein Data Bank,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [191] A. Waterhouse *et al.*, “SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [192] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
- [193] R. Anandakrishnan, B. Aguilar, and A. V. Onufriev, “H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. W1, pp. 537–541, 2012,

doi: 10.1093/nar/gks375.

- [194] C. R. Søndergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, “Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of p K a values,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, no. 7, pp. 2284–2295, 2011, doi: 10.1021/ct200133y.
- [195] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [196] G. M. Morris *et al.*, “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility,” *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, Dec. 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.
- [197] S. Salentin, S. Schreiber, V. J. Haupt, M. F. Adasme, and M. Schroeder, “PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. W1, pp. W443–W447, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv315.
- [198] O. Ujhelly *et al.*, “Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 14, no. 4, pp. 403–412, 2003, doi: 10.1089/104303403321209005.
- [199] C. Özvegy-Laczka *et al.*, “Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 6, pp. 4219–4227, 2005, doi: 10.1074/jbc.M411338200.
- [200] Y. Xiao *et al.*, “A 96-Well Efflux Assay To Identify ABCG2 Substrates Using a Stably Transfected MDCK II Cell Line,” *Mol. Pharm.*, vol. 3, no. 1, pp. 45–54, Feb. 2006, doi: 10.1021/mp050088t.
- [201] Karla Carević, “Utjecaj derivata primakina na modulaciju aktivnosti transportera ABCG2,” Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2020.
- [202] R. W. Robey *et al.*, “A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2).”
- [203] J. Pétriz and J. García-López, “Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123,” *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.*, vol. 11, no. 7, pp. 1124–1130, 1997, doi: 10.1038/sj.leu.2400659.
- [204] R. M. Lachowicz, B. Clayton, K. Thallman, J. A. Dix, and R. G. Van Buskirk, “Rhodamine 123 as a probe of in vitro toxicity in MDCK cells,” pp. 203–211, 1989.
- [205] S. Forster, A. E. Thumser, S. R. Hood, and N. Plant, “Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33253, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033253.
- [206] A. Hermawan, E. Wagner, and A. Roidl, “Consecutive salinomycin treatment reduces doxorubicin resistance of breast tumor cells by diminishing drug efflux pump expression and activity,” *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 3, pp. 1732–1740, 2016, doi: 10.3892/or.2015.4509.
- [207] C. Özvegy, A. Varadi, and B. Sarkadi, “Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter.

- Modulation of substrate specificity by a point mutation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 50, pp. 47980–47990, 2002, doi: 10.1074/jbc.M207857200.
- [208] É. Bakos, R. Evers, E. Sinkó, A. Váradi, P. Borst, and B. Sarkadi, “Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 57, no. 4, pp. 760–768, 2000, doi: 10.1124/mol.57.4.760.
- [209] X. B. Chang, Y. X. Hou, and J. R. Riordan, “Stimulation of ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein by nucleoside diphosphates,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 37, pp. 23844–23848, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.37.23844.
- [210] J. ter Beek, A. Guskov, and D. J. Slotboom, “Structural diversity of ABC transporters,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 143, no. 4, pp. 419–435, Apr. 2014, doi: 10.1085/jgp.201411164.
- [211] T. I. Orbán, L. Seres, C. Özvegy-Laczka, N. B. Elkind, B. Sarkadi, and L. Homolya, “Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 367, no. 3, pp. 667–673, 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.172.
- [212] N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, and X. Yang, “Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods,” vol. 116, pp. 199–205, 2005, doi: 10.1016/j.bpc.2005.04.009.
- [213] G. Roos, “Mitoxantrone Sensitivity of H U M a N,” vol. 11, no. 6, pp. 519–524, 1987.
- [214] S. N. Khan, S. K. Lal, P. Kumar, and A. U. Khan, “Effect of mitoxantrone on proliferation dynamics and cell-cycle progression,” *Biosci. Rep.*, vol. 30, no. 6, pp. 375–381, Dec. 2010, doi: 10.1042/BSR20090119.
- [215] M. Mioč *et al.*, “Interaction of crown ethers with the ABCG2 transporter and their implication for multidrug resistance reversal,” *Histochem. Cell Biol.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s00418-022-02106-z.
- [216] N. Khunweeraphong, T. Stockner, and K. Kuchler, “The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11794-w.
- [217] E. Roussel *et al.*, “Chromones bearing amino acid residues: Easily accessible and potent inhibitors of the breast cancer resistance protein ABCG2,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 202, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112503.
- [218] I. Manolaridis, S. M. Jackson, N. M. I. Taylor, J. Kowal, H. Stahlberg, and K. P. Locher, “Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states,” *Nature*, vol. 563, no. 7731, pp. 426–430, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0680-3.
- [219] H. Yang *et al.*, “The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0909-x.
- [220] V. Kaushik, J. S. Yakisich, A. Kumar, N. Azad, and A. K. V. Iyer, “Ionophores: Potential use as anticancer drugs and chemosensitizers,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 10, pp. 1–21, 2018, doi: 10.3390/cancers10100360.
- [221] S. N. Yu *et al.*, “Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated

- autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells,” *Oncol. Rep.*, vol. 37, no. 6, pp. 3321–3328, 2017, doi: 10.3892/or.2017.5615.
- [222] K. Ketola *et al.*, “Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress,” *Br. J. Cancer*, vol. 106, no. 1, pp. 99–106, 2012, doi: 10.1038/bjc.2011.530.
- [223] K. Y. Kim *et al.*, “Salinomycin induces reactive oxygen species and apoptosis in aggressive breast cancer cells as mediated with regulation of autophagy,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 4, pp. 1747–1758, 2017, doi: 10.21873/anticancer.11507.
- [224] M. M. A. Boojar and F. Goodarzi, “Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in WI38 cells following 2 macrocyclic crown ethers treatment,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 364, no. 1–2, pp. 321–327, 2006, doi: 10.1016/j.cca.2005.07.033.
- [225] M. M. A. Boojar and F. Goodarzi, “Oxidative response of rat lung tissue after crown ethers exposure and the effects of alpha-tocopherol treatment,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 370, no. 1–2, pp. 158–164, 2006, doi: 10.1016/j.cca.2006.02.004.
- [226] C. O. Egwu, I. Tsamesidis, P. Pério, J. M. Augereau, F. Benoit-Vical, and K. Reybier, “Superoxide: A major role in the mechanism of action of essential antimalarial drugs,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 167, no. December 2020, pp. 271–275, 2021, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.001.
- [227] C. O. Egwu, J. M. Augereau, K. Reybier, and F. Benoit-Vical, “Reactive oxygen species as the brainbox in malaria treatment,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 12, pp. 1–20, 2021, doi: 10.3390/antiox10121872.
- [228] S. Nie *et al.*, “Protective role of ABCG2 against oxidative stress in colorectal cancer and its potential underlying mechanism,” *Oncol. Rep.*, vol. 40, no. 4, pp. 2137–2146, 2018, doi: 10.3892/or.2018.6594.
- [229] A. G. Poleshko and I. D. Volotovskii, “The role of ABCG2 in maintaining the viability and proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells in hypoxia,” *Biophys. (Russian Fed.)*, vol. 61, no. 2, pp. 271–276, 2016, doi: 10.1134/S0006350916020159.
- [230] M. Wiese, “BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009 - present).,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, no. August, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1517/13543776.2015.1076796.
- [231] T. Shibue and R. A. Weinberg, “EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 10, pp. 611–629, 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.
- [232] A. Singh and J. Settleman, “EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer,” *Oncogene*, vol. 29, no. 34, pp. 4741–4751, 2010, doi: 10.1038/onc.2010.215.
- [233] M. Dean, T. Fojo, and S. Bates, “Tumour stem cells and drug resistance,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 4, pp. 275–284, Apr. 2005, doi: 10.1038/nrc1590.
- [234] C. E. Eyler and J. N. Rich, “Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 17, pp. 2839–2845, Jun. 2008, doi: 10.1200/JCO.2007.15.1829.

- [235] M. M. Gottesman, “How Cancer Cells Evade Chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 4, pp. 747–754, 2016.
- [236] M. Sehested, T. Skovsgaard, and H. Roed, “The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates in vitro resistance in daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumor cells,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 37, no. 17, pp. 3305–3310, 1988, doi: 10.1016/0006-2952(88)90643-0.
- [237] D. A. Kevin II, D. A. Meujo, and M. T. Hamann, “Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 4, no. 2, pp. 109–146, Feb. 2009, doi: 10.1517/17460440802661443.
- [238] C. J. Henrich *et al.*, “New inhibitors of ABCG2,” *Mol. Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 3271–3278, 2009, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0352.New.
- [239] C. Özvegy-Laczka *et al.*, “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.*, vol. 283, no. 38, pp. 26059–26070, 2008, doi: 10.1074/jbc.M803230200.
- [240] J. Rautio *et al.*, “In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: A recommendation for probe substrates,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 34, no. 5, pp. 786–792, 2006, doi: 10.1124/dmd.105.008615.paper.
- [241] C. Özvegy-Laczka *et al.*, “High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 6, pp. 1485–1495, 2004, doi: 10.1124/mol.65.6.1485.
- [242] T. Gose *et al.*, “ABCG2 requires a single aromatic amino acid to ‘clamp’ substrates and inhibitors into the binding pocket,” *FASEB J.*, vol. 34, no. 4, pp. 4890–4903, 2020, doi: 10.1096/fj.201902338RR.
- [243] J. Kowal, D. Ni, S. M. Jackson, I. Manolaridis, H. Stahlberg, and K. P. Locher, “Structural Basis of Drug Recognition by the Multidrug Transporter ABCG2,” *J. Mol. Biol.*, vol. 433, no. 13, p. 166980, 2021, doi: 10.1016/j.jmb.2021.166980.
- [244] F. M. Uckun, S. Saund, H. Windlass, and V. Trieu, “Repurposing Anti-Malaria Phytomedicine Artemisinin as a COVID-19 Drug,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. March, pp. 1–5, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.649532.
- [245] S. Kamat and M. Kumari, “Repurposing Chloroquine Against Multiple Diseases With Special Attention to SARS-CoV-2 and Associated Toxicity,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. April, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.576093.
- [246] M. Babayeva and Z. Loewy, “Repurposing drugs for COVID-19: Pharmacokinetics and pharmacogenomics of chloroquine and hydroxychloroquine,” *Pharmacogenomics Pers. Med.*, vol. 13, pp. 531–542, 2020, doi: 10.2147/PGPM.S275964.
- [247] K. P. Z. Rajić, Z. Mlinarić, L. Uzelac, M. Kralj, and B. Zorc, “Chloroquine Urea Derivatives: Synthesis and Antitumor Activity in Vitro,” *Acta Pharm.*, vol. 68, no. 4, pp. 471–483, 2018, doi: 10.2478/acph-2018-0039.
- [248] A. Das, “Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds,” *Ann. Med. Health*

Sci. Res., vol. 5, no. 2, p. 93, 2015, doi: 10.4103/2141-9248.153609.

- [249] S. Pushpakom *et al.*, “Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 18, no. 1, pp. 41–58, 2018, doi: 10.1038/nrd.2018.168.
- [250] J. Wang *et al.*, “Reversal Effect of ALK Inhibitor NVP-TAE684 on ABCG2-Overexpressing Cancer Cells,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. February, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00228.

8. SAŽETAK

Obitelj transportera ABC (od eng. *ATP-binding cassette*) velika su i evolucijski dobro očuvana obitelj proteina, čija je fiziološka uloga aktivni prijenos ksenobiotika iz stanice, te time služe kao sustav obrane stanica. Međutim, njihova povećana ekspresija na površini tumorskih stanica uzrokuje višestruku otpornost tumora na terapiju, jer su mnogi kemoterapeutici njihovi supstrati. To je fenomen koji označava neosjetljivost tumora na jedan kemoterapeutik ili čitavu funkcionalno i strukturno nepovezanu grupu lijekova. Premda je pokazano da je više različitih transportera ABC uključeno u otpornost tumorskih stanica na terapiju, ABCB1 (P-glikoprotein), ABCC1 (MRP-1, od eng. *multidrug resistance associated - protein 1*) i ABCG2 (BCRP, od eng. *breast cancer resistance protein*) su prvi otkriveni u tom kontekstu, najviše se povezuju sa višestrukom otpornošću na terapiju i klinički su najrelevantniji.

Mogućnost moduliranja ekspresije proteina ABC ili blokiranja njihove funkcije ima veliku kliničku važnost, kako bi se postigla učinkovitija protutumorska terapija, ali i poboljšala apsorpcija i dostupnost drugih lijekova, koji su supstrati ovih transportera, u organizmu. Do danas je otkriveno mnogo farmakoloških agensa koji moduliraju aktivnost transportera ABC, ali niti jedan još nije u kliničkoj upotrebi zbog toksičnosti, interakcije s drugim lijekovima ili nedovoljnog kliničkog učinka.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost modulacije aktivnosti transportera ABCB1 i ABCG2 pomoću dvije skupine spojeva te odgovor stanica na njihovo djelovanje. Radi se o adamantanom supstituiranim monoaza- i diaza-krunastim eterima, koji se kao modeli prirodnih ionofora istražuju u različitim biološkim kontekstima, te skupini fumardiamida i *bis*-urea primakina i halogenanilina, koji su dizajnirani radi poboljšanja antimalarijskog djelovanja primakina, ali i kao novi potencijalni protutumorski i antimikrobni spojevi.

Ispitivanja smo radili na staničnim linijama A2780/Adr, MDCK-II/ABCG2 i PLB/ABCG2, koje imaju prekomjernu ekspresiju transportera ABCB1 i ABCG2, te njihovim roditeljskim parovima A2780, MDCK-II i PLB-985. Antiproliferativnu aktivnost spojeva ispitali smo pomoću testa MTT, dok smo utjecaj spojeva na aktivnost transportera ABCB1 ispitali pomoću testova nakupljanja fluorescentnih supstrata u stanicama (rodamin 123 i kalcein-AM) te mjerenjem ATP-azne aktivnosti. Utjecaj na aktivnost transportera ABCG2 ispitali smo pomoću testova nakupljanja fluorescentnih supstrata u stanicama (feoforbid A, hoechst 33342) te u izvrnutim membranskim vezikulama (*lucifer yellow*), testom vezanja konformacijski osjetljivog protutijela 5D3 i mjerenjem aktivnosti ATP-aze. Rezultate smo usporedili s učinkom referentnih inhibitora transportera ABCB1 (verapamil) i ABCG2 (Ko143).

Spojeve koji su pokazali najjači inhibitorni potencijal prema transporteru ABCG2 u prethodnim testovima ispitali smo u testu citotoksičnosti u kombinaciji s kemoterapeutikom mitoksantronom, kako bismo odredili njihovu sposobnost povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapeutik. Potvrdili smo također i povećanje učinka mitoksantrona na stanični ciklus uslijed djelovanja spojeva. Eksperimentalne rezultate dobivene ispitivanjem učinka derivata krunastih etera na ABCG2 potvrdili smo i metodom molekuskog uklapanja na protein ABCG2.

Pokazali smo da diaza-krunasti eteri koji imaju amidnu vezu u poveznici između prstena krune i bočnog ogranka adamantana imaju značajno jači inhibitorni učinak na oba transportera ali i manju citotoksičnost spram diaza-krunastih etera koji imaju aminske veze. Među njima su najaktivniji DAC-2Amid i DAC-3Amid, pri čemu je DAC-2Amid pokazao jači inhibitorni potencijal prema ABCB1, dok DAC-3Amid ima snažniju inhibitornu aktivnost prema ABCG2. Spoj DAC-3Amid je značajno povećao osjetljivost tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na mitoksantron.

Fumardiamidi primakina i halogenanilina su pokazali značajno jači inhibitorni učinak na transporter ABCG2 spram *bis*-urea primakina i halogenanilina, koji su imali jači citotoksični učinak. Spojevi 1786, 1787 i 1789 značajno su povećali osjetljivost tumorske stanične linije PLB/ABCG2 na mitoksantron, a pokazali smo i da su supstrati transportera ABCB1.

Ispitani spojevi nisu pokazali dodatni mehanizam utjecaja na transporter ABCG2 u vidu smanjenja njegove ekspresije, poremećaja lokalizacije ili narušavanja oksidativne ravnoteže u stanicama, te smo na temelju toga zaključili da su spojevi DAC-3Amid, 1786, 1787 i 1789 kompetitivni inhibitori transportera ABCG2, pri čemu su derivati primakina selektivni za transporter ABCG2, dok je DAC-3Amid inhibitor oba transportera.

Rezultati ovog rada pokazuju da je struktura molekule inhibitora vrlo važna za njegovu aktivnost i da se modifikacijom strukture može utjecati na snagu inhibicije. Ovo istraživanje je dalo doprinos za dizajn i sintezu novih spojeva s još boljim sposobnostima modulacije aktivnosti transportera.

9. SUMMARY

The ABC transporter family (from ATP-binding cassette) is a large and evolutionarily well conserved family of proteins whose physiological role is the active transfer of xenobiotics out of the cell, thus serving as a cell protection system. However, their increased expression on the surface of tumor cells leads to multiple therapy resistance of tumors, as many chemotherapeutic agents are their substrates. This is a phenomenon that indicates the insensitivity of a tumor to a chemotherapeutic agent or to an entire functionally and structurally unrelated group of drugs. Although several different ABC transporters have been shown to be involved in tumor cell therapy resistance, ABCB1 (P-glycoprotein), ABCC1 (MRP-1, from multidrug resistance-associated protein 1) and ABCG2 (BCRP, from breast cancer resistance protein) were the first to be discovered in this context, are most commonly associated with multiple therapy resistance, and are the most clinically relevant.

The ability to modulate the expression of ABC proteins or block their function is of great clinical importance to achieve more effective antitumor therapy, but also to improve the absorption and availability in the body of other drugs that are substrates of these transporters. To date, many pharmacological agents have been discovered that modulate the activity of the ABC transporters, but none of them is yet in clinical use due to toxicity, drug interactions, or insufficient clinical efficacy.

The aim of this research was to investigate the possibility of modulating the activity of ABCB1 and ABCG2 transporters by two groups of compounds and the response of cells to their action. These are adamantane-substituted monoaza and diaza crown ethers, which are studied as models of natural ionophores in various biological contexts, and a group of primaquine and halogenaniline fumardiamide and *bis*-urea, which were developed to improve the antimalarial activity of primaquine, but also as new potential antitumor and antimicrobial compounds. We performed the assays on the cell lines A2780/Adr, MDCK-II /ABCG2, and PLB/ABCG2, which overexpress the transporters ABCB1 and ABCG2, and on their parent pairs A2780, MDCK-II, and PLB-985. The antiproliferative activity of the compounds was tested using the MTT assay, whereas the influence of the compounds on the activity of the ABCB1 transporter was examined using fluorescent substrate accumulation assays in the cells (rhodamine 123 and calcein-AM) and by measuring ATPase activity. We investigated the effect on the activity of the ABCG2 transporter using fluorescent substrate accumulation assays in cells (phosphoribide A, Hoechst 33342) and in inverted membrane vesicles (*lucifer yellow*), by binding the conformation-sensitive antibody 5D3, and by measuring ATPase activity. We compared the

results with the effect of the reference inhibitors of transporters ABCB1 (verapamil) and ABCG2 (Ko143).

The compounds that showed the strongest inhibitory potential toward the ABCG2 transporter in the previous assays were tested in a cytotoxicity assay in combination with the chemotherapeutic agent mitoxantrone to determine whether they could increase the sensitivity of tumor cells to the chemotherapeutic agent. Enhancement of the effect of mitoxantrone on the cell cycle by the action of the compounds was also confirmed. The experimental results obtained by studying the effect of crown ether derivatives on ABCG2 were also confirmed by the method of molecular docking to the ABCG2 protein.

We have shown that diaza crown ethers that have an amide bond in the junction between the crown ring and the adamantane side branch have a significantly stronger inhibitory effect on both transporters, but also lower cytotoxicity compared with diaza crown ethers that have an amine bond. Among them, DAC-2Amide and DAC-3Amide are the most active, with DAC-2Amide showing stronger inhibitory potential against ABCB1, while DAC-3Amide showed stronger inhibitory activity against ABCG2. The compound DAC-3Amide significantly increased the sensitivity of the PLB/ABCG2 tumor cell line to mitoxantrone. Primaquine and halogenaniline fumardiamides showed significantly stronger inhibitory activity against ABCG2 transporter compared with primaquine and halogenaniline *bis*-ureas, which had stronger cytotoxic activity. Compounds 1786, 1787, and 1789 significantly increased the sensitivity of the PLB/ABCG2 tumor cell line to mitoxantrone, and we also demonstrated that they were substrates of the ABCB1 transporter.

The tested compounds did not show any additional mechanism of interference with the ABCG2 transporter in the form of reduction of its expression, disruption of its localization, or disruption of oxidative balance in cells, from which we concluded that the compounds DAC-3Amide, 1786, 1787, and 1789 are competitive inhibitors of the ABCG2 transporter, primaquine derivatives being selective for the ABCG2 transporter, whereas DAC-3Amide is an inhibitor of both transporters.

The results of this work show that the structure of the inhibitor molecule is very important for its activity and that the strength of inhibition can be influenced by modifying the structure. This research contributed to the design and synthesis of new compounds with even better abilities to modulate transporter activity.

10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Rođena sam 1990. godine u Vinkovcima, a osnovnu školu i opću gimnaziju sam završila u Županji. Godine 2009. upisala sam studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam diplomirala 2014. godine i stekla titulu magistre molekularne biologije. Završnu godinu diplomskog studija provela sam na Sveučilištu u Orleansu u Francuskoj, u sklopu međunarodne suradnje dvaju sveučilišta, te stekla dodatnu titulu magistre bioindustrijske tehnologije. Diplomski rad pod nazivom: „*Development of innovative methods for genetic engineering in Poplar*“ izradila sam na francuskom nacionalnom Institutu za agronomska istraživanja u Orleansu, pod mentorstvom dr.sc. Annabelle De Jardin. Godine 2014. zaposlena sam na istom institutu kao inženjer na projektu GENIUS, čija je zadaća razvoj novih tehnika za genetički inženjering biljaka među kojima je najistaknutija tehnologija CRISPR-Cas9. Godine 2017. zaposlena sam kao doktorand na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, te sam iste godine upisala i poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti u Osijeku. Doktorsku disertaciju izradila sam u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju na Institutu Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr.sc. Marijete Kralj, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju, u sklopu projekta „*A multidisciplinary approach to discover selective drugs targeting cancer stem cells: The role of potassium transport – MultiCaST*“ Hrvatske zaklade za znanost. Tijekom izrade doktorske disertacije boravila sam mjesec dana u Istraživačkom centru za prirodne znanosti pri mađarskoj Akademiji znanosti u Budimpešti u okviru kratkoročnih studijskih boravaka mladih istraživača u europskim laboratorijima, gdje sam u laboratoriju dr.sc. Balazsa Sarkadija radila na tematici membranskih transportera ABC. Aktivno sam sudjelovala na jednoj domaćoj i dvije međunarodne konferencije na kojima sam izlagala svoj rad u obliku poster prezentacija, te sam koautor na radovima koji su izloženi na jednoj domaćoj i tri međunarodne konferencije. Objavila sam sedam izvornih znanstvenih radova koji su citirani u bazi publikacija WoS, a na jednom od njih sam i prvi autor.

Popis publikacija:

Guberović, Iva; Marjanović, Marko; **Mioč, Marija**; Ester, Katja; Martin-Kleiner, Irena; Šumanovac Ramljak, Tatjana; Mlinarić-Majerski, Kata; Kralj, Marijeta. Crown ethers reverse P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Scientific Reports*, 8 (2018), 1; 14467, 14; doi:10.1038/s41598-018-32770-y

Cindrić, Maja; Sović, Irena; **Mioč, Marija**; Hok, Lucija; Boček, Ida; Roškarić, Petra; Butković, Kristina; Martin-Kleiner, Irena; Starčević, Kristina; Vianello, Robert; Kralj, Marijeta; Hranjec, Marijana. Experimental and Computational Study of the Antioxidative Potential of Novel Nitro and Amino Substituted Benzimidazole/Benzothiazole- 2- Carboxamides with Antiproliferative Activity. *Antioxidants*, 8 (2019) 10; 477, 22; doi:10.3390/antiox8100477

Meščić Macan, Andrijana; Perin, Nataša; Jakopec, Silvio; **Mioč, Marija**; Radić Stojković, Marijana; Kralj, Marijeta; Hranjec, Marijana; Raić- Malić, Silvana. Synthesis, antiproliferative activity and DNA/RNA-binding properties of mono- and bis-(1, 2, 3-triazolyl)-appended benzimidazo[1, 2-a]quinoline derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 185 (2020): 111845, 11; doi:10.1016/j.ejmech.2019.111845

Lončar, Borka; Perin, Nataša; **Mioč, Marija**; Boček, Ida; Grgić, Lea; Kralj, Marijeta; Tomić, Sanja; Radić Stojković, Marijana; Hranjec, Marijana. Novel amino substituted tetracyclic imidazo[4,5- b]pyridine derivatives: Design, synthesis, antiproliferative activity and DNA/RNA binding study. *European journal of medicinal chemistry*, 217 (2021): 113342-113342; doi:10.1016/j.ejmech.2021.113342

Mioč, Marija; Telbisz, Ágnes; Radman, Katarina; Bertoša, Branimir; Šumanovac, Tatjana; Sarkadi, Balázs; Kralj, Marijeta. Interaction of crown ethers with the ABCG2 transporter and their implication for multidrug resistance reversal. *Histochemistry and cell biology*, 158 (2022), 261-277; doi:10.1007/s00418-022-02106-z

Beč, Anja; **Mioč, Marija**; Bertoša, Branimir; Kos, Marija; Debogović, Patricia; Kralj, Marijeta; Starčević, Kristina; Hranjec, Marijana. Design, synthesis, biological evaluation and QSAR analysis of novel N-substituted benzimidazole derived carboxamides. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 37 (2022), 1: 1327-1339
doi:10.1080/14756366.2022.2070910

Poje, Goran; Marinović, Marina; Pavić, Kristina; **Mioč, Marija**; Kralj, Marijeta; Pessanha de Carvalho, Lais; Held, Jana; Perković, Ivana; Rajić, Zrinka. Harmicens, Novel Harmine and Ferrocene Hybrids: Design, Synthesis and Biological Activity. *International journal of molecular sciences*, 23 (2022), 9315, 20 doi:10.3390/ijms23169315