

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJA VRČKOVNIK

VPLIV IZRAŽANJA PRENAŠALCA OCT1 NA AKTIVNI PRIVZEM
IMATINIBA V CELICE HEK293

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DEJA VRČKOVNIK

VPLIV IZRAŽANJA PRENAŠALCA OCT1 NA AKTIVNI PRIVZEM
IMATINIBA V CELICE HEK293

Influence of OCT1 expression on active uptake of imatinib in HEK293 cells

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, mag. farm.

Zahvala

Mentorju doc. dr. Simonu Žaklju, mag. farm., somentorju asist. dr. Vidu Mlakarju, mag. farm., delovni mentorici dr. Evi Kralj, mag. farm., asist. dr. Juretu Trontlju, mag. farm, asist. dr. Ireni Prodan Žitnik, mag. farm. in tehnični sodelavki dipl. ing. kem. Nevenki Lilik se zahvaljujem za potrpežljivost, razumevanje, spodbudo in pomoč.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Simona Žaklja, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, mag. farm.

Deja Vrčkovnik

Ljubljana, julij 2015

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Kazalo vsebine

1	UVOD	13
1.1	KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA	13
1.2	ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE	14
1.3	IMATINIB	15
1.4	PRENAŠALEC ORGANSKIH KATIONOV - OCT1	17
1.4.1	Vloga aktivnosti OCT1 pri privzemu imatiniba v tarčne celice	18
1.4.2	Vloga izražanja mRNA OCT1 pri privzemu imatiniba v celice	20
1.4.3	Vpliv polimorfizma na privzem imatiniba preko OCT1	22
1.4.4	Vpliv drugih prenašalcev na IUR IM	23
2	NAMEN DELA	24
3	MATERIALI	25
3.1	BIOLOŠKI MATERIAL	25
3.2	STANDARDI	25
3.3	REAGENTI IN TOPILA	26
3.4	NAPRAVE IN PRIBOR	28
4	METODE	30
4.1	PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN	30
4.1.1	Priprava 4,5 mM vodne raztopine amonijevega formiata	30
4.1.2	Priprava raztopine internega standarda d8-imatiniba	30
4.1.3	Priprava raztopine 0,2 M NaOH	30
4.1.4	Priprava organskega topila za ekstrakcijo	30
4.1.5	Priprava 4,5 mM NH ₄ -formiat:MeOH	30
4.1.6	Priprava 1x pufra PBS	30
4.1.7	Priprava raztopin za inkubacijo	30
4.1.8	Priprava standardov albumina	32
4.1.9	Priprava delovne raztopine za določanje koncentracije proteinov	32

4.1.10	Priprava delovne raztopine za reverzno transkripcijo	33
4.1.11	Priprava delovne raztopine za PCR v realnem času	33
4.2	GOJENJE CELIC	34
4.2.1	Gojenje celic HEK293	34
4.2.2	Gojenje celic K562	34
4.2.3	Gojenje celic CaCo2	34
4.3	NASADITEV CELIC HEK293 NA PLOŠČE S 6 LUKNJAMI	35
4.4	INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM	35
4.5	ŠTETJE CELIC	35
4.6	PRIPRAVA CELIC ZA IZOLACIJO RNA	36
4.7	LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA	36
4.8	ANALIZA Z LC-MS/MS	37
4.9	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	38
4.9.1	Princip določanja koncentracije proteinov	38
4.9.2	Določanje koncentracije proteinov	39
4.10	PRIPRAVA CELIC ZA MERJENJE IZRAŽANJA OCT1	40
4.10.1	Izolacija RNA	40
4.10.2	Meritev absorbance vzorca	41
4.10.3	Prepis RNA v cDNA	41
4.10.4	Priprava vzorcev za merjenje izražanja OCT1	41
4.11	MERJENJE IZRAŽANJA OCT1	43
4.11.1	Analiza s PCR v realnem času	43
4.12	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	44
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1	PRIVZEM IMATINIBA V HEK293 CELICE	45
5.1.1	Ugotavljanje primernih pogojev za gojenje in inkubacijo celic	45
5.1.2	Vpliv kinina na privzem IM v HEK293 celice	46

5.1.3	Vpliv prazosina, prokainamida in atopina na privzem IM v HEK293 celice	48
5.1.4	Vpliv PSC833 in KO134 na privzem IM v HEK293 celice.....	51
5.1.5	Vrednotenje uporabljenih metod	53
5.2	Izražanje mRNA v različnih celičnih linijah	54
6	SKLEPI	56
7	REFERENCE	58

Kazalo slik

Slika 1: Strukturna formula imatiniba	16
Slika 2: Struktura proteina OCT1 (12)	17
Slika 3: Neubauerjevo stekelce.....	36
Slika 4: Princip določanja koncentracije proteinov	38
Slika 5: Vzorec po centrifugiranju	40
Slika 6: Vpliv kinina na privzem imatiniba.....	47
Slika 7: Vpliv prazosina, prokainamida in atropina na privzem IM	50
Slika 8: Vpliv PSC833 in KO134 na privzem IM	53

Kazalo preglednic

Preglednica I: Priprava delovne raztopine za reverzno transkripcijo	33
Preglednica II: Priprava delovnih raztopin za qPCR.....	33
Preglednica III: Program za prepis RNA v cDNA	41
Preglednica IV: Shema pipetiranja standardov	42
Preglednica V: Program za potek PCR reakcije v realnem času	43
Preglednica VI: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s kininom na privzem IM pri normiranju mase IM na število celic	46
Preglednica VII: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s kininom na privzem IM pri normiranju mase IM na maso proteinov	46
Preglednica VIII: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s prazosinom, prokainamidom in atropinom na privzem IM pri normiranju na število celic.....	48
Preglednica IX: Vpliv izražanja in zaviranja OCT1 s prazosinom, prokainamidom in atropinom na privzem IM pri normiranju na maso proteinov	48
Preglednica X: Primerjava koncentracije IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celičnima linijama pri normiranju mase IM na število celic	51
Preglednica XI: Primerjava koncentracije IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celičnima linijama pri normiranju mase IM na maso proteinov.....	51
Preglednica XII: Primerjava metod normiranja rezultatov privzema IM.....	53
Preglednica XIII: Faktorji učinkovitosti.....	55
Preglednica XIV: Povprečno število razlike ciklov med genom OCT1 in GUSB	55

POVZETEK

Za zdravljenje kronične mieloične levkemije se najpogosteje uporablja zaviralec tirozin kinaze, imatinib. Učinkovitost zdravljenja z imatinibom je odvisna od privzema in zadrževanja v celicah, kjer se veže na kinazo Bcr-Abl in jo zavira. Bolniki se na zdravljenje z imatinibom odzivajo različno, za kar vzrok še ni znan.

Podatki o vlogi OCT1 v literaturi so si zelo nasprotujoči, zato je bila za nadaljevanje dela na področju aktivnega transporta imatiniba nujno potrebna ponovitev nekaterih poskusov. V nalogi smo se tako osredotočili na meritve izražanja mRNA OCT1 v različnih celičnih linijah, pomembnih za raziskave transporta imatiniba in meritve aktivnega transporta imatiniba v celični liniji s povečanim izražanjem mRNA OCT1 ter referenčni celični liniji.

Izražanje mRNA OCT1 smo merili v nespremenjeni celični liniji HEK293, HEK293 celični liniji s povečanim izražanjem OCT1 (HEK293-OCT1), HEK293 celični liniji z vstavljenim vektorjem (HEK293-VC), celičnih linijah K562 in CaCo2, celični liniji jetrnih celic HepG2 in v celicah, izoliranih iz krvi bolnikov s KML. Iz vzorcev smo izolirali RNA, jo prepisali v cDNA in z analizo s PCR v realnem času izmerili izražanje gena OCT1 napram hišnemu genu GUSB.

Aktivni privzem imatiniba smo merili v celični liniji s povečanim izražanjem HEK293 (HEK293-OCT1) in celični liniji z vstavljenim praznim vektorjem (HEK293-VC), v odsotnosti in prisotnosti zaviralcev OCT1 kinina, prazosina, prokainamida in atropina ter zaviralca P-gp PSC833 in zaviralca BCRP KO134. Koncentracijo imatiniba v vzorcu smo po ustrezni pripravi vzorcev merili z LC-MS/MS.

Ugotovili smo, da po eni strani, povečano izražanje mRNA OCT1 ne vpliva na privzem imatiniba v celice, po drugi strani pa zaviralci OCT1 zmanjšajo privzem imatiniba v celice. Najverjetnejša razlaga je, da uporabljeni »selektivni« zaviralci OCT1 zavirajo tudi aktivnost še neznanega prenašalca, ki je dejansko odgovoren za aktivni prenos imatiniba skozi biološke membrane. Za nadaljnjo razjasnitev transporta imatiniba so tako potrebne dodatne raziskave drugih možnih aktivnih prenašalcev imatiniba.

Ključne besede: imatinib, kronična mieloična levkemija, izražanje mRNA OCT1, aktivni privzem IM v celice

ABSTRACT

The most commonly used medicine for the treatment of chronic myeloid leukaemia is a tyrosine kinase inhibitor imatinib. Effectiveness of treatment with imatinib depends on uptake and retention in cells, where imatinib interacts with Bcr-Abl kinase and inhibits it. Because of yet partly unknown factors patients may respond differently to imatinib treatment.

There are conflicting reports in literature about role of OCT1. For the work on the mechanism of active transport of imatinib to continue, an independent repetition of some experiments was necessary. We focused on measuring the OCT1 mRNA expression in various cell lines that are important for imatinib transport research and on measurement of active transport of imatinib in cell line with overexpression of OCT1 mRNA and in reference cell line.

We measured expression of OCT1 mRNA in genetically unmodified HEK293 cell line, HEK293 cell line overexpressing OCT1 (HEK293-OCT1), HEK293 cell line with blank vector (HEK293-VC), cell lines K562 and CaCo2, hepatic cell line HepG2 and in cells derived from CML patients' blood. We isolated RNA from samples, converted it to cDNA and measured expression of SLC22A1 gene coding for OCT1 against housekeeping gene GUSB with real-time PCR.

Active uptake of imatinib was measured in HEK293 cell line with OCT1 overexpression (HEK293-OCT1) and HEK293 cell line with blank vector (HEK293-VC) in presence and absence of OCT1 inhibitors quinine, prazosin, procainamide and atropine and P-gp inhibitor PSC833 and BCRP inhibitor KO134. Imatinib concentration in samples was measured with a LC-MS/MS method.

We have confirmed that, on one hand, overexpression of OCT1 mRNA does not have any effect on the uptake of imatinib into cells; but on the other hand also that, OCT1 inhibitors reduce the uptake of imatinib into cells. The most probable interpretation of those results is that the used »selective« OCT1 inhibitors also inhibit activity of yet unknown transporter, which is actually responsible for transport of imatinib through biologic membranes. For further clarification of imatinib transport additional research of other possible active transporters of imatinib will be necessary.

Key words: imatinib, chronic myeloid leukaemia, expression of OCT1 mRNA, active uptake of imatinib into the cells

SEZNAM OKRAJŠAV

IM - imatinib

IUR - privzem imatiniba (angl., imatinib uptake and retention)

KML - kronična mieloična levkemija

OCT1 - prenašalec organskih kationov 1 (angl., organic cation transporter 1)

P-gp - P-glikoprotein (angl., P-glycoprotein)

BCRP - prenašalec povezan z rezistenco raka dojke (angl., breast cancer resistance protein)

HEK293-OCT1 - celice HEK293, transfecirane z genom za OCT1

HEK293-VC - celice HEK293, transfecirane s praznim vektorjem

PBMC - periferne mononuklearne celice (angl., peripheral blood mononuclear cells)

SNP - polimorfizem enega nukleotida (angl., single nucleotide polymorphism)

qPCR - kvantitativni PCR, PCR v realnem času

1 UVOD

1.1 KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA

Kronična mieloična levkemija je maligna bolezen krvotvornega sistema vzdrževana s strani populacije levkemičnih zarodnih celic s pridobljeno fuzijo genov *BCR* in *ABL* (1).

Vzrok za razvoj te bolezni je maligna transformacija ene same matične celice, ki se nato do pojavov znakov bolezni leta nenadzorovano deli. Bolezen se navadno razvija od tri do pet let in se večinoma ugotovi ob rutinskem odvzemu krvi in pregledu krvne slike (2). Za levkemične celice pri KML je značilna citogenetska sprememba »kromosom Philadelphia«. Kromosom Philadelphia z genom *BCR-ABL* nastane zaradi dvojne zamenjave (recipročne translokacije) DNA med kromosomoma 9 in 22. Pri tem pride do spojitve dveh genov (gena *BCR* iz kromosoma 22 in gena *ABL* iz kromosoma 9), ki sta v normalnih celicah ločena. Na molekularnem nivoju se ta translokacija kaže kot nastanek *BCR-ABL* fuzijskega gena, ki se prevede v 210 kDA velik Bcr-Abl protein, tirozinsko kinazo, ki med drugim povzroči tudi slabše nadzorovano delitev celic in nastanek levkemičnega klona (3) (4).

Klinična slika KML je posledica pretirane razrasti tako zrelih kot tudi dozorevajočih, predvsem nevtrofilnih, granulocitov. Zaradi razrasta malignih celic v kostnem mozgu je ovirano normalno nastajanje in dozorevanje ostalih krvnih celic. Zaradi motenega razvoja eritrocitov se pojavi anemija, zaradi motenega nastajanja megakariocitov pa krvavitve. Okrnjeno je tudi delovanje imunskega sistema, saj so maligni granulociti slabše funkcionalni od normalnih ali so celo nefunkcionalni (1).

V prvem obdobju bolezni, imenovanem kronično obdobje, ki traja do 5 let, bolniki običajno nimajo simptomov. Levkociti imajo sposobnost boja proti okužbam in po začetku zdravljenja se tudi število eritrocitov in trombocitov vrne v meje normalnih vrednosti. V tej fazi bolezen še ne vpliva na bolnikov vsakdan in njegove dejavnosti. Če se bolezen v tej fazi ne zdravi, ta napreduje v pospešeno fazo in nato v blastno preobrazbo, ki ju skupaj lahko imenujemo »napredovala faza« ali »napredovalo obdobje«. V pospešeni fazi pride do močnega povečanja števila levkocitov in pojava blastnih celic (mladih levkocitov) v periferni krvi, za to fazo pa ni nujno, da se v poteku bolezni sploh izrazi. Zadnja faza bolezni je blastna preobrazba. Stanje je podobno akutni levkemiji (zmanjšano število eritrocitov in trombocitov, pogoste krvavitve, okužbe itd.) (1).

Preživetje bolnikov je v največji meri odvisno od obdobja bolezni ob postavitvi diagnoze. Pri bolnikih, pri katerih je bolezen odkrita v kroničnem obdobju, je srednje preživetje pomembno daljše kot pri tistih, pri katerih je bolezen odkrita v napredovalem obdobju bolezni. Srednje preživetje bolnikov v kroničnem obdobju je tako 5 let, v pospešenem obdobju 1 do 2 leti, v obdobju blastne preobrazbe pa le 3 do 6 mesecev (4).

Na leto sta diagnosticirana 1-2 nova primera te bolezni na sto tisoč prebivalcev (4) (5). Bolezen se lahko pojavi v kateremkoli življenjskem obdobju in je najpogosteje diagnosticirana pri moških, starih med 50 in 60 let (5). KML predstavlja kar 10 do 20 % vseh levkemij. Pogosteje se pojavljata le še kronična limfocitna in akutna mieloblastna levkemija (4).

1.2 ZDRAVLJENJE KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE

Uspešnost zdravljenja KML se ocenjuje na treh nivojih. S kontroliranjem krvne slike ocenjujemo hematološki odgovor, z določanjem preostalih Ph⁺ metafaz ocenjujemo citogenetski odgovor in z določanjem stopnje prepisa *BCR-ABL* s kvantitativnim PCR v realnem času ocenjujemo molekularni odgovor v vzorcu periferne krvi ali kostnega mozga (5). Zdravljenje je uspešno, ko ni več kliničnih znakov in sprememb v krvni sliki (popoln hematološki odgovor), ko s citogenetsko raziskavo ne ugotovimo več celic Ph⁺ v kostnem mozgu (popoln citogenetski odgovor) in ko se število kopij gena *BCR-ABL1* zmanjša za več kot 1000-krat od začetne standardne vrednosti* (glavni molekularni odgovor) (1).

Zdravljenje KML je bilo pred odkritjem kromosoma Philadelphia leta 1960 predvsem simptomatsko z arzenikom in obsevanjem vranice, nato pa se je za zdravljenje začel uporabljati citostatik busulfan, kasneje pa še hidrokortison. Zdravljenje s kemoterapevtiki, razen izboljšanja kakovosti življenja bolnika, ni ustavilo napredovanja bolezni v blastno fazo. V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so bolezen že zdravili z alogenično presaditvijo matičnih celic, desetletje kasneje pa so lahko popoln citogenetski odgovor in boljše preživetje nekaterih bolnikov dosegli z interferonom alfa. Sledil je razvoj zaviralcev tirozin kinaze – t.i. tarčnih zdravil za zdravljenje KML, ki so v celoti spremenila potek zdravljenja, kakovost življenja bolnikov in njihovo preživetje. Prva učinkovina iz skupine zaviralcev tirozin kinaze na tržišču je bila imatinib (1). V raziskavah so pri

* vrednost določena v raziskavi IRIS. Mediana vrednosti razmerja *BCR-ABL1* in referenčnega gena *BCR 30* nezdavljenih bolnikov v kroničnem obdobju bolezni.

zdravljenju bolnikov v kroničnem obdobju bolezni z IM pri vseh bolnikih ugotovili povrnitev krvne slike v normalno stanje (popoln hematološki odgovor) in pri polovici bolnikov odsotnost Ph⁺ celic v kostnem mozgu (popoln citogenetski odgovor). Pri zdravljenju bolnikov, pri katerih je bolezen že napredovala v blastno fazo pa so povrnitev normalne krvne slike ugotovili pri 22 % bolnikov in odsotnost Ph⁺ celic pri 16 % bolnikov (2). Poleg IM so na trgu že nove generacije zaviralcev tirozin kinaze. Dasatinib in nilotinib se uporabljata kot prva, druga ali tretja linija zdravljenja KML, bosutinib in ponatinib pa se uporabljata pri intoleranci ali rezistenci na predhodno zdravljenje (1).

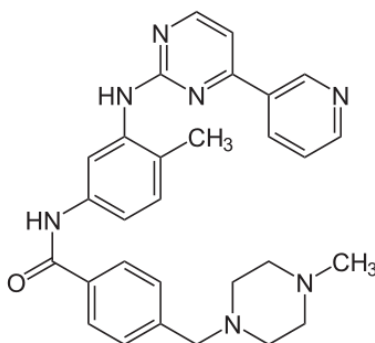
Cilj zdravljenja z zaviralci tirozinske kinaze je zmanjšati število obolelih celic v telesu s stalnim zaviranjem aktivnosti tirozinske kinaze Bcr-Abl. Če terapija z zaviralci tirozinskih kinaz ni učinkovita, je drugo možno zdravljenje KML alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic (6). KML se lahko v celoti pozdravi samo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic, vendar je pri presaditvi smrtnost zaradi zapletov kar 15- do 30-odstotna. Tovrstno zdravljenje prav tako ni primerno za vse bolnike s KML. Večina bolnikov ni primernih zaradi starosti, ostalih prisotnih bolezni ali zato, ker ni na voljo ustreznega darovalca kostnega mozga (4). Presaditev je tako možna le pri bolnikih v kroničnem obdobju bolezni, starih manj kot 55 let, ki imajo ustreznega darovalca kostnega mozga. Prav tako v približno 20 % primerov presaditev pride do ponovitve bolezni (2).

Pri bolnikih, ki niso primerni za alogenično presaditev in pri njih zdravljenje z zaviralci tirozinskih kinaz ni učinkovito, se še vedno uporabljajo zdravila, kot so busulfan, hidroksisečnina in interferon alfa. Z busulfanom in hidroksisečnino lahko dosežemo remisijo bolezni in podaljšamo preživetje bolnikov do 60 mesecev. Z interferonom alfa pa lahko zmanjšamo število celic s prisotnim kromosomom Philadelphia in tako podaljšamo preživetje bolnikov tudi do 9 let. Problem predstavljajo neželeni učinki navedenih zdravil (pri busulfanu pljučna fibroza, pri interferonu glavobol in povišana telesna temperatura) (2).

1.3 IMATINIB

Imatinib (IM) je močan, selektiven zaviralec treh tirozin kinaz - Bcr-Abl1 tirozin kinaze, receptorske tirozinske kinaze za rastni dejavnik trombocitov alfa in beta (PDGFR α/β) in receptorske tirozinske kinaze c-KIT, ki je dejavnik matičnih celic (angl., *stem cell factor*, SCF). Uporablja za zdravljenje bolnikov s kronično mieloično levkemijo (KML), s

prisotnim kromosomom Philadelphia (Ph+), gastrointestinalnega stromalnega tumorja (GIST) in drugih malignih tvorbo (7) (8).



Slika 1: Strukturna formula imatiniba

Večina bolnikov z na novo diagnosticirano KML se zelo dobro odzove na zdravljenje z IM. 95 % jih doseže popoln hematološki odziv, in več kot 80 % popolno citogenetsko remisijo. Kljub temu, pri nekaj bolnikih ni ustreznega odziva na IM in je zato verjetnost za napredovanje bolezni večja (3) (7).

Med bolniki s KML obstajajo velike razlike v farmakokinetičnem profilu, katerih vzrok ni dobro poznan. Čeprav se IM po peroralnem dajanju dobro absorbira in ima povprečno biološko razpoložljivost večjo od 90 %, je podvržen obsežni presnovi v jetrih. V feces se v nespremenjeni obliki ali v obliki metabolitov izloči kar 80 % danega odmerka. Glavni metabolit je N-desmetil imatinib, ki nastane s presnovo prek CYP3A4 v jetrih (7).

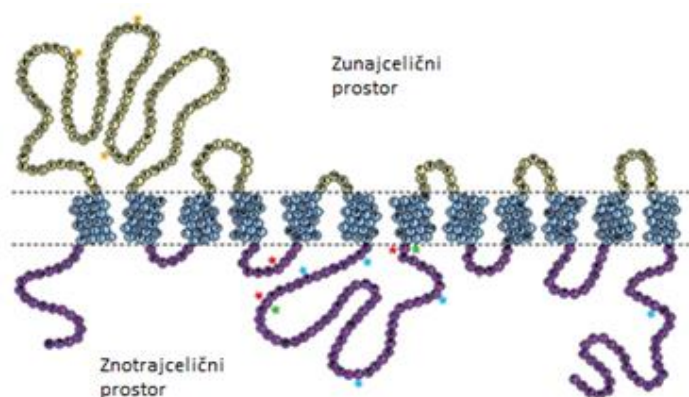
Porazdelitev učinkovine je v veliki meri odvisna od prepleta delovanja jetrnih encimov, ki presnavljajo učinkovino in prenašalcev učinkovine. IM je znan substrat za efluksna prenašalca ABCB1 (P-glikoprotein) in ABCG2 (BCRP). Mehanizem privzema v hepatocite pa je še vedno neznan. Predhodne študije v nekaterih celičnih linijah nakazujejo, da gre za temperaturno odvisen aktivni transport IM v celico. Na podlagi zmožnosti nekaterih snovi, kot sta verapamil in prazosin, ki zmanjšata privzem IM v celice, so kot enega izmed prenašalcev, vključenih v proces privzema, identificirali organski kationski transporter 1 (OCT1). Ker je OCT1 močno izražen v bazolateralni membrani hepatocitov, se predvideva, da ta prenašalec vrši hepatocelularno akumulacijo IM pred presnovo in izločanjem z žolčem in tako igra pomembno vlogo v porazdelitvi učinkovine (7) (9).

1.4 PRENAŠALEC ORGANSKIH KATIONOV - OCT1

OCT1 je pripadnik največje družine prenašalcev topljencev iz družine prenašalcev kodirane z genom *SLC22*. Ti prenašalci na račun razlike v električnem potencialu prenašajo vrsto organskih kationov, vključno z učinkovinami, toksini in ostalimi ksenobiotiki (10).

Obstajajo trije homologe prenašalca OCT, in sicer OCT1, OCT2 in OCT3. Med vrstami obstajajo velike razlike v obsegu izražanja OCT v tkivih, selektivnosti in afiniteti prenašalca do ligandov. Pri ljudeh je OCT1 najbolj izražen v bazolateralni membrani hepatocitov, v manjšem obsegu pa v drugih epitelnih tkivih (enterociti, celice proksimalnih in distalnih tubulov). OCT2 je najbolj izražen v bazolateralni membrani celic ledvičnih proksimalnih tubulov, OCT3 pa je prisoten v več tkivih v manjšem obsegu (srce, skeletne mišice, tanko črevo, glia celice, nevroni, horoidni plexus) in je tako manj tkivno specifičen kot OCT1 in OCT2 (11).

OCT ima 12 transmembranskih domen in vezavne žepe z delno prekrivajočimi se domenami za interakcije z različnimi substrati in zaviralci (Slika 2). Substrati OCT so strukturno različni ksenobiotiki, kot tudi vrsta endogenih snovi. Čeprav prisotnost pozitivnega naboja omogoča interakcijo liganda z OCT, nekateri substrati nimajo naboja pri fiziološkem pH, kar kaže na kompleksnost interakcij ligandov z OCT (11).



Slika 2: Struktura proteina OCT1 (12)

Znano je, da na funkcijo prenašalca vplivajo tudi polimorfizmi. Polimorfizem povzroči drugačno zvitje proteina in zato drugačne interakcije z ligandi (11) (13).

Predvideva se, da je OCT1 glavni znani prenašalec odgovoren za privzem IM v levkemične celice. White in sodelavci so vpeljali termin funkcionalne aktivnosti OCT1 prenašalca, ki je definirana kot razlika v privzemu [14C]-IM brez in v prisotnosti zaviralca OCT1 prazosina (3). Na privzem IM lahko vplivajo tako kvalitativne kot kvantitativne spremembe OCT1, zato je ista skupina raziskovalcev sklepala, da je funkcionalni test privzema IM v celice bolnika najboljši klinični napovednik funkcije OCT1 (10).

1.4.1 Vloga aktivnosti OCT1 pri privzemu imatiniba v tarčne celice

Glede vloge aktivnosti OCT1 pri privzemu IM v celice obstajajo različna mnenja. Nekateri raziskovalci so prepričani, da je aktivnost OCT1 zelo dober napovedni marker za spremljanje zdravljenja z IM, drugi pa temu popolnoma nasprotujejo in dokazujejo, da IM sploh ni substrat za IM.

Rezultati študije Thomasa in sodelavcev (2004) so prvi kazali na to, da je privzem IM aktiven proces in da je IM najverjetneje substrat za OCT1. Poskus privzema IM so izvajali na celični liniji CCRF-CEM (T limfoblastoidne celice bolnika s KML) ob prisotnosti verapamila (zaviralec hOCT1), amantadina, prokainamida (zaviralca hOCT1 in 2), prazosina (zaviralec hOCT1 in 3), kortikosterona (zaviralec hOCT3) in N-metilnikotinamida (zaviralec hOCT2). Pri poskusu s kortikosteronom in N-metilnikotinamidom ni bilo sprememb v privzemu IM, zato so previdevali, da je IM substrat za OCT1 (14).

Leta 2006 so White in sodelavci vpeljali pojem »aktivnosti OCT1« in poskus za določanje aktivnosti OCT1. Poskuse so izvajali na K562 celični liniji, v prisotnosti in odsotnosti zaviralca prazosina. Prazosin je signifikantno zmanjšal privzem IM v celice, ni pa ga izničil. Ugotovili so, da po dodatku zaviralca ni več razlike med privzemom med bolniki in da privzem preko OCT1 predstavlja variabilnost med bolniki (3) (10). Tudi v nadaljnjih študijah so pokazali, da *in vitro* občutljivost na IM sovpada s privzemom IM v mononuklearne celice bolnikov s KML, ki še niso bili zdravljeni z zaviralci tirozinskih kinaz. Večji privzem IM v celice je bil povezan z boljšim doseganjem glavnega in popolnega molekularnega odziva po dveh in petih letih zdravljenja z IM (15) (16).

Giannoudis in Wang (2008) sta ugotovila, da je privzem IM v človeški levkemični liniji KCL22, transfecirani z OCT1, značilno večji (približno za 50 %) kot v celični liniji, transfecirani s praznim vektorjem. Razliko v privzemu IM med celičnima linijama sta

pripisala aktivnosti OCT1, razliko v privzemu med KCL22 in rezultati objavljenimi za HEK293 (9) pa nivoju izražanja drugih prenašalcev za IM (13).

Rezultati študije Englerja in sodelavcev (2010) na mononuklearnih celicah sovpadajo z rezultati White in sodelavcev, ugotovili pa so tudi, da povezava med privzemom IM in odzivom na zdravljenje ne velja za CD34+ celice (17). S terapevtskim odzivom naj bi bila povezana le aktivnost OCT1 v zrelih KML blastih, ne pa tudi v nezrelih CD34+ celicah. Aktivnost OCT1 v CD34+ celicah je bila signifikantno nižja kot v zrelih celicah, kar kaže na to, da je privzem IM v CD34+ celice zelo majhen. Dober molekularni odziv naj bi bil tako povezan s ciljanjem na odraslo populacijo celic in ne z zmanjšanjem števila nezrelih KML celic (18) (19). Prav nezrele CD34+ celice naj bi bile odgovorne za napredovanje bolezni in rezistenco na IM, zato so predvidevali, da bi s ciljanjem terapije na te celice lahko dosegli boljši odziv na zdravljenje z IM. Glede na rezultate so predvidevali, da hitro zmanjšanje števila KML celic zaradi zdravljenja z IM povzroči pomanjkanje esencialnih citokinov (ki jih sproščajo odrasle KML celice), ki so potrebni za rast CD34+ celic. Takšno okolje pa le posredno onemogoči oz. zavira razvoj levkemičnih celic in tako pride do obnovitve nelevkemičnih, zdravih celic (18).

V nasprotju z zgornjimi študijami, je Hu s sodelavci (2008) ugotovil, da je privzem IM v celice, ki prekomerno izražajo OCT1, sicer signifikantno, vendar le minimalno, večji (1,2-krat oz. približno 20 %) kot v kontrolnih celicah in je zato sklepal, da OCT1 ni glavni prenašalec IM. Poskus privzema so izvajali na HEK293-OCT1 in HEK293-VC celicah, brez prisotnosti zaviralcev OCT1. Enak poskus so izvedli tudi na *Xenopus laevis* oocitih, in ugotovili, da razlika v privzemu med oociti, ki izražajo OCT1 in tistimi, ki ne izražajo OCT1, ni signifikantna (približno 14,5 %) (9).

Rezultatom študij Thomasa, White in Wanga s sodelavci nasprotujejo tudi rezultati nedavne, bolj obsežne študije privzema IM. Nies in sodelavci (2014) so aktivnost OCT1 ugotavljali v oocitih *Xenopus laevis*, celičnih linijah sesalcev (HEK293, MDCK, V79) in levkemičnih celičnih linijah (KML celične linije; Meg-01, LAMA-84 in K562). Pri vseh celičnih linijah je bil privzem TEA (amonijevega tetraetila), znanega substata za OCT1, v celice s povečanim izražanjem signifikatno večji kot v kontrolne celice. Razlika v privzemu IM v oocite s povečanim izražanjem in v kontrolne oocite pa je bila nesignifikantna. Prav tako je bila nesignifikantna razlika v privzemu med HEK293, MDCK in V79 celicami, s povečanim izražanjem OCT1 in ustrezno kontrolo. Tudi pri

miših brez gena (»knockout«) za OCT1 in tistimi z genom ni bilo razlike v privzemu IM (7).

Tudi Nies in sodelavci so izvedli podoben poskus kot White s sodelavci in dobili rezultate, ki nasprotujejo njihovim ugotovitvam. Po 10 minutni inkubaciji IM (začetna faza privzema) je bil privzem IM v vse celice (KML, HEK293-OCT1 in tudi HEK293-VC) enak. Po dodatku prazosina se je privzem IM v KML celicah po 10 minutah močno zmanjšal, zaradi česar so najverjetneje White in sodelavci privzem v K562 celice pripisali aktivnosti OCT1, privzem v HEK293 celice pa je ostal nespremenjen. Enak poskus, kot s prazosinom, so izvedli tudi z decinijem22, znanim zaviralcem prenašalca OCT1, ki po 10 minutah ni zmanjšal privzema v nobeni vrsti celic. Po 120 minutah se je privzem IM po dodatku prazosina oz. decinija22 zmanjšal, vendar ne glede na izražanje OCT1 (enako v HEK293-OCT1 in HEK293-VC celicah). Glede na zgornje ugotovitve so sklepali, da so v privzem IM vključeni še drugi proteini in da poskus zaviranja OCT1 s prazosinom ne kaže dejanske aktivnosti OCT1 (7).

Burger s sodelavci (2013) je pokazal, da tudi amantadin, ki je prav tako zaviralec OCT1, zmanjša privzem IM v HEK293 celicah, ki niso transfecirane z OCT1, in imajo 4-log nižji nivo izražanja OCT1 od HEK293-OCT1 celic. Podobne rezultate je dal tudi poskus s prazosinom. Podobni zaviralni učinki so se pokazali tudi v K562 celicah, pri katerih je nivo izražanja OCT1 nizek. Amantadin in prazosin zmanjšata privzem IM ne glede na nivo izražanja OCT1, zato so tudi Burger in sodelavci zaključili, da ti zaviralci niso OCT1 specifični in da poskus ne daje točnih rezultatov o aktivnosti OCT1 (20).

1.4.2 Vloga izražanja mRNA OCT1 pri privzemu imatiniba v celice

Medtem ko nekateri znanstveniki menijo, da ima aktivnost OCT1 boljšo napovedno vrednost glede zdravljenja z IM, so drugi mnenja, da je stopnja transkripta Bcr-Abl boljši napovedni marker. Poleg raziskav, ki kažejo na dobro napovedno vrednost izražanja mRNA OCT1, obstajajo tudi nasprotujoči podatki, ki kažejo, da izražanje mRNA OCT1 ni povezano s klinično učinkovitostjo IM.

Ugotovitve Crossmanove (2005) in Wang (2008) kažejo na to, da je izražanje gena *SLC22A1* dober napovednik kliničnega odziva pri bolnikih, zdravljenih z IM. Crossmanova je prva objavila ugotovitev, da je pri bolnikih s KML, ki so v 12 mesecih dosegli popoln citogenetski odgovor, izražanje mRNA OCT1 značilno višja, kot pri

bolnikih, ki takega odgovora niso dosegli. Nivo izražanja OCT1 je bil pri bolnikih, ki so se dobro odzvali na zdravljenje z IM, pred zdravljenjem osemkrat višji kot pri bolnikih, ki so se na zdravljenje odzvali slabo (21). Wang s sodelavci je potrdil, da je visok začetni nivo izražanja OCT1 povezan z boljšim citogenetskim odzivom in daljšim preživetjem bolnikov (22). Prav tako je Marin s sodelavci ugotovil, da je visoka raven mRNA OCT1 ob diagnozi povezana z boljšim doseganjem glavnega molekularnega odgovora po 6 letih zdravljenja z IM (23). Z ugotovitvami Crossmanove, Wang in Marina, se skladajo tudi rezultati kasnejših študij (24) (25) (26).

V nasprotju z zgornjimi študijami sta Wang in Giannuoudis ugotovila, da je privzem v KCL22 celice neodvisen od izražanja mRNA OCT1 v teh celicah (13). Tudi White in sodelavci niso ugotovili povezave med klinično učinkovitostjo in nivojem izražanja mRNA OCT1 v mononuklearnih celicah izoliranih iz krvi bolnikov. Med skupinama z nizkim in visokim nivojem izražanja mRNA ob diagnozi niso ugotovili signifikantne razlike v molekularnem odzivu (10) (15). Razlog za različne ugotovitve je lahko, da sta Crossman in Wang študije izvedla na bolnikih, ki so bili že prej zdravljeni z drugimi zdravili za KML, White in sodelavci pa so študijo izvedli na predhodno nezdravljenih bolnikih s KML. Možno je, da ima izražanje mRNA OCT1 napovedno vrednost le pri bolnikih v pozni kronični fazi, pri še nezdravljenih bolnikih pa ne (10). Ugotovitvam Crossmana in Wang nasprotujejo tudi rezultati študije Zhanga in sodelavcev, ki niso zaznali razlik v izražanju mRNA OCT1 ob diagnozi med bolniki z dobrim in slabim odzivom na zdravljenje z IM (27).

Hu je v svoji študiji primerjal izražanje v HEK293-OCT1 in K562 celicah. Ugotovil je, da je izražanje mRNA OCT1 v HEK293-OCT1 celicah signifikantno večje kot v K562 celicah, na katerih so poskus privzema izvedli White in sodelavci. Prav tako je ugotovil, da je izražanje *SLC22A1* gena (OCT1) tesno povezano z ekspresijo genov *ABCB1* (P-glikoprotein) in *ABCG2* (BCRP). Zaključil je, da bi lahko bilo izražanje *SLC22A1* označevalec za izražanje in aktivnost drugih prenašalcev, ki so vpleteni v prenos IM (9).

Tudi Nies in sodelavci so merili izražanje mRNA v celičnih linijah. mRNA OCT1 in izražanje proteinov so merili pri levkemičnih celicah bolnikov in v celični liniji CD34+. Povečano izražanje proteina OCT1 ni vodilo v povišano celično akumulacijo IM niti pri oocitih, niti v sesalskih celičnih linijah (HEK293, MDCK, V79). Prav tako KML celične

linije (K562, Meg-01, LAMA-84) in levkemične celice bolnikov niso izražale mRNA ali proteina OCT1. Visoki nivoji mRNA so bili opaženi samo pri HEK293 celicah, ki so izražale OCT1, pri ostalih celicah je bila količina transkriptov komaj zaznavna (vsaj 50,000-krat nižja kot v HEK293-OCT1). Nivo proteinov je bil, skladno s podatki o mRNA, največji pri HEK293-OCT1 celicah, prav tako je bila funkcionalnost proteinov visoka samo pri HEK293-OCT1 celicah, pri ostalih celičnih linijah pa zelo nizka (7).

Izražanje v CD34+ KML celicah je bilo v primerjavi s KML celičnimi linijami[†] in HEK293, zelo nizko, prav tako so ugotovili, da CD34+ celice nimajo funkcionalnega proteina OCT1 (7). Te ugotovitve se skladajo z rezultati študije McWeeney-a, ki kažejo da je izražanje mRNA v CD34+ celicah komaj zaznavno in ugotovitvami Engler-ja s sodelavci, da je izražanje OCT1 (kot tudi aktivnost) v CD34+ celicah signifikantno nižje kot v zrelih celicah (18) (28).

Študija Nies in sodelavcev prav tako potrjuje, da KML celične linije in KML CD34+ celice ne izražajo proteina in da s prazosinom inhibiran privzem IM najverjetneje ni odvisen od OCT1 (7).

Rezultati študije Nies in sodelavcev navidezno nasprotujejo rezultatom dvema drugima študijama, ki kažeta majhno povišanje privzema IM za 1,5-krat v HEK-OCT-1 (Hu) oz. za 1,2-krat v KCL22 (Wang), v primerjavi s kontrolnimi celicami. Izražanje OCT1 je bilo v obeh študijah ocenjena samo na nivoju mRNA, ne pa tudi na nivoju proteinov. Prav tako privzem IM ni bil merjen v prisotnosti zaviralca OCT1. Zato je nejasno ali je nekoliko povišan privzem posledica funkcije OCT1 ali kakšnega drugega prenašalca (7).

1.4.3 Vpliv polimorfizma na privzem imatiniba preko OCT1

Znano je, da polimorfizem lahko vpliva na strukturo proteina in njegovo delovanje. Privzem IM se tako pri nekaterih SNP (polimorfizem enega nukleotida, angl., *single nucleotide polymorphism*) spremeni. Giannoudis in sodelavci so v študiji dokazali, da imajo bolniki z M420del večjo verjetnost neuspeha terapije z IM. Če je poleg M420del prisoten tudi M408V, pa se negativen učinek izniči. Pokazali so, da je pri merjenju izražanja mRNA ključna izbira pravega oligonukleotidnega začetnika. Izmerili so izražanje z oligonukleotidnimi začetniki, ki pokrivajo M420del in tistimi, ki ne, in ugotovili, da je

[†] KML celične linije: K562, LAMA-84, Meg01

izražanje različno. Ta ugotovitev lahko razloži neskladje med objavljenimi rezultati o napovedni pomembnosti izražanja mRNA. hOCT1 SNP so verjetnejši razlog za variabilnost med pacienti kot pa samo izražanje gena. Pomembno vlogo pri privzemu IM imajo tako posttranskripcijske spremembe, ki vplivajo na zvitje proteina. Izražanje mRNA je pri vseh testiranih SNP zelo podobno, izražanje proteinov (merjeno s pretočno citometrijo in denzitometrijo) pa je zelo različno, kar kaže na to, da izražanje mRNA ni dober napovednik odziva (13).

White in sodelavci so ugotovili, da najpogostejša polimorfizma M408V in M420del ne spremenita transporta IM in da SNP niso povezani z aktivnostjo OCT1. Prav tako niso ugotovili razlike med pogostostjo SNP med skupinama z nizko in visoko aktivnostjo OCT1 (29).

1.4.4 Vpliv drugih prenašalcev na IUR IM

Znano je, da je IM substrat za efluksna prenašalca ABCB1 (P-glikoprotein) in ABCG2 (BCRP) (3) (9). Burger in sodelavci so ugotovili, da je privzem IM v prisotnosti zaviralca BCRP povečan (30). White in sodelavci so v svoji študiji ugotovili, da sprememba IUR IM ni signifikantna niti po dodatku PSC833, zaviralca P-gp, niti po dodatku FTC (glivični toksin fumitremorgin, angl. *fungus toxin fumitremorgin*), ki je zaviralec BCRP (3).

ABCG2 se prekomerno izraža pri bolnikih s primarno rezistenco na IM. Pri bolnikih, ki se odzovejo na IM, so našli visok nivo mRNA *SLC22A1*, ki je odgovoren za privzem v celico. Povečano izražanje *ABCG2* bi tako lahko bilo povezano z rezistenco na IM, povečano izražanje *SLC22A1* pa z uspešno terapijo z IM (31). Wang in Giannouodis s sodelavci v svojih študijah niso uspeli dokazati povezave med izražanjem mRNA *ABCG2* in neuspešnostjo zdravljenja z IM, rezultati študije De Lime in sodelavcev pa kažejo na to, da je povečano izražanje *ABCG2* lahko vzrok za rezistenco na IM in da je povečano izražanje *SLC22A1* povezano z večjo uspešnostjo terapije z IM (22) (31).

2 NAMEN DELA

Podatki o vlogi OCT1 pri privzemu IM v celice so si v literaturi zelo nasprotujoči. V tej situaciji je za načrtovanje nadaljnjega dela na področju aktivnega transporta IM nujno potrebna ponovitev nekaterih poskusov. Na Fakulteti za farmacijo smo nedavno že potrdili ugotovitve White in sodelavcev, da nekateri zaviralci prenašalca OCT1 ustavijo aktivni privzem IM v celice K562 in v levkocite. Žal pa specifičnost takšnega zaviranja OCT1 ni definirana, še posebej napram neznanim prenašalnim proteinom, ki bi po mnenju Nies in sodelavcev lahko prenašali IM. V okviru te naloge torej želimo kritično ponoviti nekatere poskuse, ki so jih izvedli Nies in sodelavci in primerjati naše rezultate z rezultati njihove študije.

Ključne meritve, ki jih potrebujemo, so:

- izražanje mRNA OCT1 v različnih celičnih linijah, pomembnih za raziskave transporta IM ter
- meritve aktivnega transporta IM v celični liniji s povečanim izražanjem mRNA OCT1 in v referenčni celični liniji.

Ugotoviti želimo, v kolikšni meri se mRNA OCT1 izraža v različnih celičnih linijah, ki se uporabljajo za preučevanje privzema IM in kako izražanje vpliva na privzem IM v celice. Se privzem pri povečanem izražanju poveča ali povečano izražanje nima vpliva na privzem IM? Poleg meritev izražanja bomo izvedli še meritve aktivnega transporta IM v celični liniji HEK293 s povečanim izražanjem mRNA OCT1 in referenčni celični liniji. Ugotavljali bomo vpliv povečanega izražanja mRNA OCT1 ter vpliv zaviranja OCT1 na privzem IM v celice. Pri meritvah aktivnega privzema v celice bomo uporabili dva načina normiranja rezultatov, in sicer, normiranje mase IM na število celic in normiranje mase IM na maso proteinov. Skušali bomo ugotoviti, katera metoda je, bolj primerna, uporabna in natančna.

3 MATERIALI

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Poskuse privzema IM v celice smo izvajali na celični liniji HEK293. Ta celična linija je nastala v zgodnjih 70-letih s transformacijo kultur normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z adenovirusom. Celično linijo z vstavljenim genom za OCT1 in celično linijo z vstavljenim praznim vektorjem smo pridobili od raziskovalca Mladena V. Tzvetkova iz Inštituta za klinično farmakologijo, Univerza v Göttingenu, Nemčija.

Izražanje mRNA smo merili v celičnih linijah HEK293, K562, CaCo2, celični liniji jetrnih celic HepG2 in v celicah, izoliranih iz krvi bolnikov s KML. Celična linija K562 je prva linija nesmrtnih mielogenih levkemičnih celic. Pridobljena je bila iz krvi 53-letne bolnice s KML v blastni fazi. CaCo2 celična linija izvira iz celic humanega epiteljskega kolorektalnega adenokarcinoma, HepG2 celična linija pa iz celic humanega hepatoceličnega karcinoma. Celice, izolirane iz krvi bolnikov s KML (bolniki zdravljeni na Kliničnem oddelku za hematologijo, Interne klinike na UKC), so predstavljali granulociti in mononuklearne celice (PBMC).

3.2 STANDARDI

Imatinib, $C_{29}H_{31}N_7O$, $M = 493,6$ g/mol (imatinib mezilat) (Sequoia Research Products, Oxford, Velika Britanija)

Imatinib-D8, $C_{29}H_{23}N_7O_4$, $M = 501,66$ g/mol (AlsaChim, Strasbourg, Francija)

Kinin, $C_{20}H_{24}N_2O_2$, $M = 324,42$ g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Prazosin, $C_{19}H_{21}N_5O_4$, $M = 383,40$ g/mol (prazosin hidroklorid, 99 %) (AK Scientific Inc., Union City, Kalifornija, ZDA)

Prokainamid, $C_{13}H_{21}N_3O$, $M = 235,33$ g/mol (prokainamid hidroklorid) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

Atropin, $C_{17}H_{23}NO_3$, $M = 289,37$ g/mol (atropine, minimum 99% TLC) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

KO134, $C_{26}H_{35}N_3O_5$, $M = 469,57$ g/mol (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija)

PSC833, $C_{26}H_{35}N_3O_5$, $M = 1214,62$ g/mol (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija)

3.3 REAGENTI IN TOPILA

Medij za CaCo2 celice: Dulbecco's Minimal Essential Medium z dodatki: 20 % fetalni bovini serum, 1 % penicilin/streptomycin, 1 % L-glutamin, 1 % neesencialne aminokisljine

Medij za HEK293 celice: Dulbecco's Minimal Essential Medium z dodatki: 10 % fetalni bovini serum, 1 % penicilin/streptomycin, 1 % L-glutamin

Medij za K562 celice: Iscovec's Modified Dulbecco's Medium z dodatki: 10 % fetalni bovini serum, 1 % penicilin/streptomycin

ultračista voda, specifična prevodnost 18,2 M Ω cm, celokupni organski ogljik ≤ 5 ppb (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)

etanol 96 %, C_2H_5OH , $M = 46,07$ g/mol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)

10 x PBS (fosfatni pufer) (Invitrogen Life Science Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)

DMSO, C_2H_6OS , $M = 78,13$ g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

n-heksan 95%, C_6H_{14} , $M = 86,18$ g/mol (Panreac Quimica, Barcelona, Španija)

etilacetat, $C_4H_8O_2$, $M = 88,10$ g/mol (Panreac Quimica, Barcelona, Španija)

tripansko modriilo, $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$, $M = 872,88$ g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

RPMI medij 1640 (1x) (Gibco Life Technologies, Velika Britanija)

Komplet za določanje proteinov - Pierce BCA Protein Assay Kit: BCA Reagent A, BCA Reagent B, Albumin standard ampules, 2 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, ZDA)

TRIzol[®] reagent (Ambion by Life Technologies, ZDA)

kloroform, $CHCl_3$, $M = 119,38$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

izopropanol, C_3H_8O , $M = 60,10$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Komplet za reverzno transkripcijo - High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit: 10X RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X dNTP Mix (100 mM), MultiScribe[®] Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ZDA)

natrijev hidroksid, NaOH, M = 40 g/mol (1M raztopina) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

amonijev formiat, NH_4HCO_2 , M = 63,06 g/mol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

metanol, CH_3OH , 32,04 g/mol (brezvodni 99,8 %) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Nemčija)

0,25 % tripsin-EDTA (1x) (Gibco, Life Technologies, ZDA)

Komplet za PCR v realnem času - SYBR[®] Select Master Mix: SYBR[®] GreenER[™] barvilo, AmpliTaq[®] DNA Polymerase, dNTPs, heat-labile UDG, ROX passive reference dye and optimized buffer components (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ZDA)

3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

Viale z zataljenim insertom 350 μ l (Cronus, Gloucester, Velika Britanija)

Polavtomatska pipeta Eppendorf 20-200 μ l (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Polavtomatska pipeta Eppendorf 100-1000 μ l (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Bullet Blender homogenizator (Next Advance, New York, ZDA)

Termostat Vortemp 56EVC (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Mikrotitrne plošče NUNC TM 96 polj (Termo Fisher Scientific, ZDA)

Stripete Corning Costar 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning Incorporated, New York, ZDA)

Inkubacijske plošče Corning Costar (Corning Incorporated, New York, ZDA)

Plošče za gojenje (TPP, Trasadingen, Švica)

Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Nemčija)

Neubauerjeva komora z objektnim stekelcem (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Nemčija)

Steklene kroglice (Next advance, New York, ZDA)

Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Sušilnik TurboVap LV (Caliper, Massachusetts, ZDA)

Centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Inkubator Sanyo MCO-15AC (Sanyo, Osaka, Japonska)

Centrifugirke TPP, 15 ml in 50 ml (TPP, Švica)

Plastične epruvete ali mikrocentrifugirke, 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

Sušilnik SpeedVac (Savant SC110A, Hicksville, ZDA)

Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Tecan Safire (Tecan Group Ltd., Švica)

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, ZDA)

LightCycler 480 plošča s 384 vdolbinicami in pokivalna folija (Roche Applied Science, Indiana, ZDA)

LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Indiana, ZDA)

C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Kalifornija, ZDA)

LC-MS/MS, sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke zmogljivosti (UHPLC) Agilent Infinity 1290 in masnega detektorja Agilent 6460 Triple quadrupole (Agilent, Palo Alto, ZDA), kolona Kinetex 50x2,1 mm C18 z 2,6 µm delci (Phenomenex, Torrance, ZDA), ionski izvor ESI JetStream v pozitivnem načinu ionizacije

Hladilnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

Zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik -70 °C (Sanyo Electric Biomedical, Japonska)

Ostali pribor: čaše, bučke, erlenmajerice, spatule, tehtiči, nastavki za pipete.

4 METODE

4.1 PRIPRAVA DELOVNIH RAZTOPIN

4.1.1 Priprava 4,5 mM vodne raztopine amonijevega formiata

14,19 mg amonijevega formiata smo raztopili v 50 ml prečiščene vode.

4.1.2 Priprava raztopine internega standarda d8-imatiniba

Raztopino internega standarda s koncentracijo 12 mg/ml smo 6-krat razredčili, da smo dobili raztopino s koncentracijo 2 mg/ml. 2 ml koncentrata smo dodali 10 ml prečiščene vode in dobili 12 ml raztopine s koncentracijo 2 mg/ml.

4.1.3 Priprava raztopine 0,2 M NaOH

Pripravili smo 100 ml 0,2 M NaOH. 20 ml 1 M NaOH smo v 100 ml bučki razredčili do oznake in dobili 0,2 M NaOH.

4.1.4 Priprava organskega topila za ekstrakcijo

Heksan in etilacetat smo zmešali v razmerju 30:70. Za vsak poskus smo si pripravili 30 ml te raztopine.

4.1.5 Priprava 4,5 mM NH₄-formiat:MeOH

Pripravili smo si 30 ml mešanice z razmerjem 50:50 in 10 ml mešanice z razmerjem 80:20.

4.1.6 Priprava 1x pufra PBS

100 ml 10x PBS smo v bučki s prečiščeno vodo razredčili do 1000 ml. Puffer smo do uporabe hranili v hladilniku.

4.1.7 Priprava raztopin za inkubacijo

Poskuse smo izvajali v treh ponovitvah. Celicam smo dodajali po 50 µl raztopin učinkovin, tako imatiniba kot kinina, prazosina, prokainamida, PSC833 in KO134. Končna koncentracija imatiniba v inkubacijski raztopini je bila 2 µM, kinina 300 µM, prazosina 100 µM, prokainamida 1000 µM, atropina 200 µM, PSC833 10 µM in KO134 10 µM.

Priprava raztopine imatiniba

Za pripravo osnovne raztopine (10 mM) IM smo zatehtali 29,485 mg imatinib mezilata in ga raztopili v 5 ml etanola. 100 μ l 10 mM raztopine IM smo prenesli v drugo 5 ml bučko in dodali 20 % etanol do oznake. Koncentracija IM v pripravljene raztopini je bila 200 μ M. 50 μ l te raztopine smo dodali v 5 ml inkubacijske raztopine. Koncentracija IM v inkubacijski raztopini je bila tako 2 μ M.

Priprava raztopine kinina

Na precizni tehtnici smo natehtali 59,50 mg kinina in ga kvantitativno prenesli v 5 ml bučko in razredčili s 50 % etanolom do oznake. 50 μ l te raztopine smo dodali v 5 ml inkubacijske raztopine. Koncentracija kinina v inkubacijski raztopini je bila 300 μ M.

Priprava raztopine prazosina

Natehtali smo 4,19 mg prazosina in ga raztopili v 1 ml 50 % etanola s pomočjo ultrazvoka. Koncentracija prazosina v inkubacijski raztopini je bila 100 μ M.

Priprava raztopine prokainamida

Natehtali smo 27,18 mg prokainamida in ga raztopili v 1 ml 50 % etanola. 50 μ l te raztopine smo dodali v 5 ml inkubacijske raztopine. Koncentracija prokainamida v inkubacijski raztopini je bila 1000 μ M.

Priprava raztopine atropina

Natehtali smo 14,42 mg atropina in ga raztopili v 1 ml 20 % etanola s pomočjo ultrazvoka. Tudi tu smo 50 μ l pripravljene raztopine dodali v 5 ml inkubacijske zmesi. Koncentracija atropina v inkubacijski raztopini je bila 200 μ M.

Priprava raztopine PSC 883

1 mg PSC833 smo raztopili v 0,823 ml DMSO. Koncentracija PSC833 v inkubacijski raztopini je bila 10 μ M.

Priprava raztopine KO134

Natehtali smo 5 mg KO134 in raztopili v 10,65 ml DMSO ($c = 1 \text{ mM}$). 50 μl te raztopine smo dodali v 5 ml inkubacijske raztopine. Končna koncentracija KO134 v inkubacijski raztopini je bila 10 μM .

4.1.8 Priprava standardov albumina

Standard albumina BSA (goveji serumski albumin; angl. *bovine serum albumine*) s koncentracijo 2 mg/ml smo redčili po navodilih, priloženih kompletu za določanje koncentracije proteinov, da smo dobili standarde s koncentracijami 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 in 2000 $\mu\text{g BSA/ml}$.

4.1.9 Priprava delovne raztopine za določanje koncentracije proteinov

Delovno raztopino smo pripravili iz BCA reagenta A in B po navodilih v kompletu. Po enačbi 1 smo izračunali količino potrebno za vsak poskus.

$$V_{DR} = (S + M) \times r \times V_1 \quad (\text{Enačba 1})$$

V_{DR} – potreben volumen delovne raztopine

S – število standardov

M – število vzorcev

r – število replikatov

V_1 – volumen delovne raztopine na vzorec

Standardov BSA je bilo 9, vzorce smo na ploščo nanašali v dveh ponovitvah, volumen delovne raztopine, potreben za en vzorec, pa je bil 200 μl .

Reagent A in reagent B smo zmešali v razmerju 50:1 v 50 ml falkonko.

BCA reagent A vsebuje natrijev karbonat in bikarbonat, bicinhonično kislino, natrijev tartrat in natrijev hidroksid. BCA reagent B je 4 % raztopina bakrovega sulfata.

4.1.10 Priprava delovne raztopine za reverzno transkripcijo

Raztopine kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit smo odtalili in pripravili 10 µl delovne raztopine za vsak vzorec RNA (Preglednica I).

Preglednica I: Priprava delovne raztopine za reverzno transkripcijo

Komponenta kompleta	Volumen [µl]/vzorec
10x RT pufer	2,0
25x dNTP mešanica	0,8
10x RT naključni oligonukleotidni začetniki	2,0
MultiScribe reverzna transkriptaza	1,0
RNAzni inhibitor	1,0
ultračista voda	3,2
Skupni volumen delovne raztopine/vzorec	10,0

4.1.11 Priprava delovne raztopine za PCR v realnem času

S pomočjo raztopine SYBR[®] Select Master Mix smo pripravili dve delovni raztopini za qPCR reakcijo, eno za gen OCT1 in eno za gen GUSB (Preglednica II).

Preglednica II: Priprava delovnih raztopin za qPCR

Komponenta raztopine	Priprava raztopine za OCT1	Priprava raztopine za GUSB
	V [µl]/vzorec	V [µl]/vzorec
ultračista voda	2,35	2,35
začetni oligonukleotidni začetnik (angl. <i>forward primer</i>) za OCT1 oz. GUSB	0,075	0,075
reverzni oligonukleotidni začetnik (angl. <i>reverse primer</i>) za OCT1 oz. GUSB	0,075	0,075
SYBR Select Master Mix	7,5	7,5
Skupni volumen/vzorec	10,0	10,0

4.2 GOJENJE CELIC

4.2.1 Gojenje celic HEK293

Celice smo nasadili na plošče za gojenje celic s površino 75 cm² (T75), ki smo jih predhodno obdelali s poli-D-lizinom in jih dali v inkubator (pogoji inkubacije so bili pri vseh poskusih naslednji: 95 % O₂ in 5 % CO₂, 37 °C), da so se razrastle. Po enem dnevu in pol smo jih vzeli iz inkubatorja in jih odlepili z dna posodice, kamor so se prijele, s počasnim pipetiranjem. Suspenzijo celic smo prenesli v 15 ml falkonko in centrifugirali na 1300 rpm, 5 min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 2 ml svežega medija ter previdno premešali s pipetiranjem. Prešteli smo celice v alikvotu suspenzije. V primeru, da je bilo celic premalo za izvajanje poskusa, smo jih ponovno nasadili na plošče T75 in dodali toliko medija, da je pokrilo dno plošče. Ko je bilo celic dovolj za izvedbo poskusa, smo jih nasadili na plošče s 6 oz. 12 luknjami. Plošče smo predhodno obdelali s poli-D-lizinom. V vsako luknjo smo odpipetirali 0,5 ml poli-D-lizina in plošče inkubirali 15 minut pri 37 °C. Po 15 minutah smo poli-D-lizin odstranili iz lukenj in ploščo posušili na zraku. Nato smo na ploščo nasadili celice. V primeru, da je bilo celic veliko več kot smo jih potrebovali za poskus, smo presežek po štetju zamrznili na -80 °C in shranili.

4.2.2 Gojenje celic K562

Celice smo vzeli iz zamrzovalnika (-80 °C) in jih prenesli iz epice v falkonko in dodali 10 ml medija za K562 celice. Suspenzijo smo centrifugirali na 800 rpm, 8 min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 13 ml svežega medija ter previdno premešali s pipetiranjem. Prešteli smo alikvot celic. Vzgojili smo 45 milijonov celic, ki smo jih nasadili na T75 plošče. Na 5 plošč smo nasadili po 5 milijonov celic z gostoto 200.000 celic/ml in plošče dali v inkubator. Te celice smo nato uporabili za izolacijo RNA.

4.2.3 Gojenje celic CaCo2

Celice smo nasadili na plošče za gojenje celic (T75) in jih dali v inkubator, da so se razrastle. Po enem tednu smo jih vzeli iz inkubatorja in odstranili medij. Celice smo dvakrat sprali z raztopino PBS, nato smo dodali 5 ml tripsina in jih dali za 2 min v inkubator, da so se celice odlepili od plošče. Suspenzijo celic smo prenesli v 15 ml falkonko in dodali medij za CaCo2 celice. Suspenzijo smo centrifugirali na 800 rpm, 8 min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 2 ml svežega medija ter previdno

premešali s pipetiranjem. Prešteli smo alikvot celic. Ko smo vzgojili 3 milijone celic, smo jih zamrznili za nadaljnjo izolacijo RNA.

4.3 NASADITEV CELIC HEK293 NA PLOŠČE S 6 LUKNJAMI

Celice smo po gojenju prešteli in izračunali število, ki smo ga potrebovali za nasaditev na plošče za poskus. V vsako luknjo plošče smo dali 5 ml suspenzije s celicami. Gostota celic je bila 300.000 celic/ml. V vsaki luknji je bilo tako 1.500.000 celic. Na ploščo smo v tri luknje nasadili celice HEK293-OCT1 in v ostale tri celice HEK293-VC. Plošče smo nato dali v inkubator in jih čez dva dni, ko je nastal enakomeren film celic, uporabili za poskus. Pred inkubacijo z IM smo pod mikroskopom preverili, če so celice enakomerno razraščene, nato pa smo izvedli poskus.

4.4 INKUBACIJA CELIC Z IMATINIBOM

V vseh 6 lukenj na eni plošči smo 5 ml suspenzije celic HEK293 dodali 50 μ l IM (koncentracija 200 μ M, končna koncentracija IM v zmesi = 2 μ M). Na drugo ploščo smo poleg 50 μ l IM, dodali še 50 μ l enega od zaviralcev OCT1 oz. P-gp. Plošče smo dali v inkubator in inkubirali 2 uri. Po inkubaciji smo previdno odstranili medij (ob robu, da nismo poškodovali oz. odlepili celic) in dvakrat sprali s 4 ml hladnega PBS-a. Po spiranju smo v vsako luknjo dodali 0,4 ml tripsina in inkubirali 3 min v inkubatorju. Takoj po inkubaciji smo dodali 1,5 ml medija in celice prenesli v 2 ml epice. Epice smo centrifugirali na 7800 rpm, 5 min, pri 4 °C, odstranili supernatant in dodali 300 μ l PBS-a. Alikvot celic (10 μ l) smo prešteli, ostalo pa zamrznili za nadaljnjo ekstrakcijo IM.

4.5 ŠTETJE CELIC

V 1,5 ml epico smo dali 40 μ l tripsanskega modrila in dodali 10 μ l celic resuspendiranih v PBS-u. 10 μ l dobljene suspenzije smo aplicirali na Neubauerjevo stekelce (Slika 3) in celice prešteli pod mikroskopom. Prešteli smo celice v vseh 4 kvadrantih v dveh paralelah in izračunali povprečno število celic obeh paralel. Število celic v suspenziji smo izračunali po enačbi 2.

$$N = n \times 5 \times 10^4 \times V_{susp} \quad (\text{Enačba 2})$$

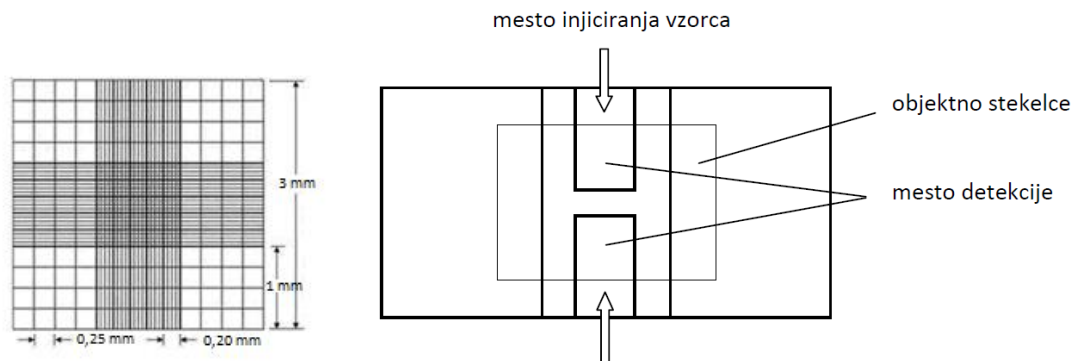
N – število celic v suspenziji

n – povprečno število celic v enem kvadrantu

5 – faktor redčenja raztopine, 10 μ l celic smo dodali 40 μ l tripanskega modrila

10^4 – volumen merilne komore je 100 nl, za preračun na 1 ml moramo pomnožiti z 10.000

V_{susp} – volumen celotnega vzorca (pri inkubaciji z IM je ta 300 μ l)



Slika 3: Neubauerjevo stekelce

4.6 PRIPRAVA CELIC ZA IZOLACIJO RNA

Za izolacijo RNA iz celic smo potrebovali približno 3.000.000 vsakih celic. Celice, ki smo jih gojili in zamrznili, smo vzeli iz zamrzovalnika in jih ponovno prešteli. K562 celic je bilo 21.900.000, zato smo naredili 3 paralele po 4.500.000 celic, centrifugirali, odstranili supernatant, da so ostale samo celice in dodali 1 ml TRIzol reagenta. CaCo2 celic je bilo 4.000.000, zato smo naredili 2 paralele po 2.000.000 celic, centrifugirali, odstranili supernatant in dodali 1 ml TRIzol reagenta. Celice HEK293-OCT1 in HEK293-VC smo vzeli iz inkubatorja in jih prešteli. Pripravili smo 2 paralele po 3.900.000 HEK293-VC celic in 2 paralele po 3.500.000 celic HEK293-OCT1 in jih suspendirali v 1 ml TRIzol reagenta. Po dodatku TRIzola smo celice resuspendirali z večkratnim vlekom v injekcijsko brizgo. Celice v TRIzol reagentu smo zamrznili do izolacije RNA.

4.7 LIZA CELIC IN EKSTRAKCIJA IMATINIBA

V epice, ki smo jih pripravili po inkubaciji celic z učinkovinami, in jih do ekstrakcije IM shranili v zamrzovalniku, smo dodali po 1 merilno žličko steklenih kroglic (žlička je priložena kroglicam). Epice smo dobro zaprli in jih zložili v stresalnik (Bullet Blender) in stresali 5 min na jakosti 8. S tem smo celice lizirali in sledila je ekstrakcija IM iz raztopine. V vsako epico smo dodali 50 μ l internega standarda, 200 μ l 0,2 M NaOH in 1 ml organskega topila heksan:etilacetat = 30:70. Epice smo ponovni stresali na stresalniku

10 min (2 x 5 min), na jakosti 8. Nato smo epice centrifugirali 5 min pri 10.000 obratih/min pri 5 °C. V čiste epice smo nato odpipetirali 800 µL organske faze in sušili na Turbo Vap-u 15 min pri temperaturi 40 °C, pritisk 4 psi (27,5 kPa). Posušen ostanek smo rekonstituirali v 250 µl mešanice NH₄-formiata in MeOH (50:50). Epice smo ponovno stresali na stresalniku 5 min, jakost 8. 200 µl rekonstituiranega ekstrakta smo prenesli v inserte, jih dali v 1,5 ml epice in ekstrakt sušili na Speed Vac-u 2 uri, pri 40 °C. Posušen ostanek smo rekonstituirali v 40 µl mešanice NH₄-formiata in MeOH (80:20) in vsako epico na rotacijskem stresalniku stresali 1 min. Inserte smo vložili v steklene vial, vial označili in shranili v hladilniku do analize z LC-MS/MS.

4.8 ANALIZA Z LC-MS/MS

Vsebnost IM v ekstraktih smo določali z LC-MS/MS aparatom. LC-MS/MS aparat je sestavljen iz tekočinskega kromatografa ultra visoke ločljivosti in tandemskega masnega detektorja. Volumen injiciranega vzorca je bil 1 µl. Kolono smo gradientno spirali pri 50 °C z mobilno fazo, sestavljeno iz 0,1 % metanojske kisline in 98 % acetonitrila z gradientom od 10 % do 50 % v eni minuti. Za ionski izvor smo uporabili JetStream v pozitivnem načinu ionizacije. Za kvantifikacijo IM in d8-IM smo uporabili multirezidualno analizo s spremljanjem masnih prehodov m/z 494 - 394 in 502 - 394. Retencijski čas analitov je bil 1,25 min. Kot interni standard smo uporabili devteriran imatinib (d8-IM), ki ima zelo podobne lastnosti kot IM in so zato pogoji ekstrakcije in kromatografske ločbe zanj enaki kot za IM.

Podatki v literaturi navajajo vsebnost IM v ng/200.000 celic, zato smo tudi mi rezultate podali na enak način. Najprej smo s pomočjo standardov IM izdelali umeritveno krivuljo in določili enačbo umeritvene premice: $y = 0,0053 \times c$ (ng/ml); $R^2 = 0,9938$.

Iz umeritvene premice smo izračunali koncentracijo IM (enačba 3). Iz koncentracije smo izračunali maso IM v vzorcu (volumen vzorca je bil 300 µl), dobljeno delili s številom vseh celic v vzorcu in pomnožili z 200.000 (enačba 4). Tako smo dobili maso IM v ng na 200.000 celic.

$$c_{IM} = \frac{y}{0,0053} \quad (\text{Enačba 3})$$

$$m_{IM} = c_{IM} \times V_{vz} \times \frac{200.000}{N} \quad (\text{Enačba 4})$$

c_{IM} – koncentracija imatiniba

y – razmerje odzivov za imatinib in imatinib-d8 (IM/IM-d8)

m_{IM} – masa IM v ng na 200.000 celic

V_{vz} – volumen vzorca (0,3 ml)

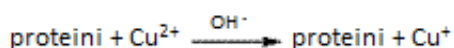
N – število vseh celic v vzorcu (izračunanih po enačbi 2)

4.9 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

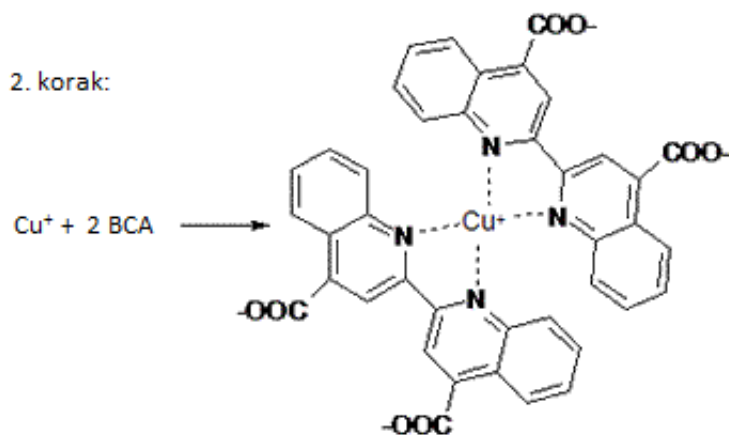
4.9.1 Princip določanja koncentracije proteinov

Določanje koncentracije proteinov temelji na kolorimetrični detekciji s pomočjo bicinhonične kisline (BCA). V alkalnem okolju pride v prisotnosti proteinov do redukcije bakra iz 2+ v 1+ stanje (Biuretska reakcija, Slika 4). Redukcijo zaznamo z bicinhonično kislino. 2 molekuli BCA in kation Cu^{1+} tvorijo vijoličen produkt, katerega absorbanco merimo pri 562 nm.

1. korak:



2. korak:



Slika 4: Princip določanja koncentracije proteinov

4.9.2 Določanje koncentracije proteinov

Najprej smo si pripravili standarde BSA in delovno raztopino za določanje koncentracije proteinov (priprava je opisana v poglavju Metode, *Priprava delovnih raztopin*). Po lizi celic in pred začetkom postopka ekstrakcije IM smo iz epic odvzeli po 10 μl vzorcev za določitev koncentracije proteinov. Na ploščo s 96 luknjami smo najprej nanесли 25 μl vsakega standarda BSA. Nato smo v vse luknje, kamor smo kasneje dali vzorce, odpipetirali po 15 μl PBS-a (s tem smo vzorec razredčili). Sledilo je pipetiranje 10 μl vzorca v luknje s PBS-om. Nato smo v vse luknje odpipetirali po 200 μl delovne raztopine in pokrili ploščo s plastičnim pokrovom. Ploščo smo postavili v termostat in inkubirali 30 min pri 37 °C ob rahlem mešanju. Na aparatu Tecan Safire smo izmerili absorbanco vzorcev pri 595 nm. Iz odzivov standardov smo naredili umeritveno krivuljo in določili enačbo umeritvene premice: $a = 0,3938 \times b \text{ (ng/ml)} + 0,1746$; $R^2 = 0,9900$. Vsebnost IM smo podali v ng IM/10 μg proteinov. Maso proteinov v vzorcu smo tako izračunali s pomočjo enačb 5 in 6.

$$c_{prot} = \frac{a-0,1746}{0,3938} \times 1000 \times 2,5 \quad (\text{Enačba 5})$$

a – odziv (absorbanca) vzorca

c_{prot} – koncentracija proteinov v $\mu\text{g/ml}$

1000 – faktor pretvorbe iz ng v μg

2,5 – faktor redčenja (10 μl vzorca smo redčili s 15 μl PBS-a)

$$m_{prot} = c_{prot} \times V_p \times 30 \quad (\text{Enačba 6})$$

m_{prot} – masa proteinov v μg

c_{prot} – koncentracija proteinov v $\mu\text{g/ml}$

V_p – volumen vzorca za določanje proteinov, 10 μl

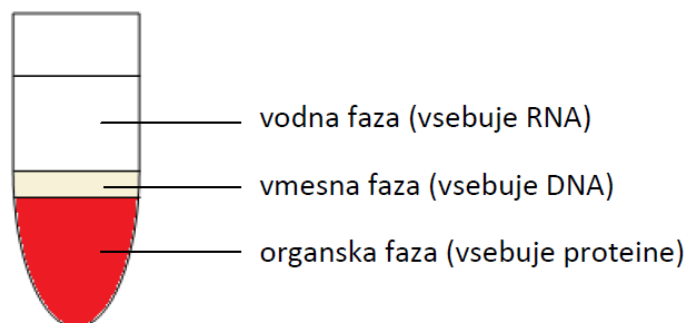
30 – faktor redčenja (iz 300 μl vzorca smo vzeli 10 μl za določitev proteinov)

4.10 PRIPRAVA CELIC ZA MERJENJE IZRAŽANJA OCT1

4.10.1 Izolacija RNA

RNA smo izolirali iz 3 paralel HEK293 celic brez vstavljenega vektorja, 2 paralel HEK293-VC (celice HEK293 z vstavljenim praznim vektorjem), 2 paralel HEK293-OCT1 (celice HEK293 z vstavljenim genom za OCT-1), 3 paralel K562 celic (celična linija, ki izhaja iz celic bolnice s KML in vsebuje kromosom Philadelphia in Bcr-Abl1 fuzijsko tirozinsko kinazo), 2 paralel CaCo2 celic (celična linija, ki izhaja iz raka debelega črevesa ljudi) in dveh paralel HepG2 celic (celična linija razvita iz celic hepatoceličnega karcinoma pri ljudeh).

Celice smo odmrznili v inkubatorju na 37 °C in pripravili komoro za izolacijo RNA. Komoro smo najprej prebrisali z etanolom in raztopino RnazeZap. Prav tako smo s to raztopino prebrisali pipete, nastavke, posodico z epicami. S tem smo uničili RNAze, ki bi zmanjšale količino izolirane RNA. Celicam smo dodali 0,2 ml kloroforma in vzorce premešali na Vibromix-u. Vzorce smo nato centrifugirali pri $12.000 \times g$, 15 min pri 4 °C. Po centrifugiranju se je vzorec razplastil v tri faze: spodnjo, organsko fazo, ki je vsebovala proteine, srednjo fazo, ki je vsebovala DNA in zgornjo, vodno fazo, ki je vsebovala RNA (Slika 5).



Slika 5: Vzorec po centrifugiranju

Zgornjo fazo smo odpipetirali v novo epico, in pri tem pazili, da se z nastavkom pipete nismo dotaknili faze z DNA. V epice smo dodali 0,5 ml izopropanola, ki je odtegnil vodo, zmešali na Vibromix-u in dali za 30 min v zamrzovalnik na -20 °C, da je prišlo do izobarjanja RNA. Sledilo je centrifugiranje pri $12.000 \times g$, 10 min pri 4 °C. Po centrifugiranju smo odpipetirali supernatant in na dnu epice je ostala samo peleta RNA.

Peleti smo dodali 1 ml 75 % etanola, premešali na Vibromix-u, centrifugirali in odstranili supernatant. Postopek smo ponovili še enkrat. S tem smo odstranili ostanke proteinov v vzorcu. Dobljeno peleto smo posušili v inkubatorju pri 37 °C, 5 min. Peleti smo nazadnje dodali 50 µl vode brez RNAz in premešali s pipetiranjem.

4.10.2 Meritev absorbance vzorca

Absorbanco smo merili na kontinuirnem spektrofotometru NanoDrop. Spektrofotometer smo najprej umerili z vodo in nato posneli absorbance topila, tj. vode. Nato smo izmerili absorbance vzorcev z RNA.

S program NanoDrop 1000 smo izračunali koncentracije vzorcev, razmerje absorbanc pri 260 in 280 nm ter 260 in 230 nm. Razmerje med koncentracijo RNA in proteinov (A_{260}/A_{280}) je bilo pri vseh meritvah okoli 1,9, kar je kazalo na čistost RNA v vzorcu. Razmerje med koncentracijo RNA in nečistotami (organskimi topili) A_{260}/A_{230} je bilo v vseh vzorcih od 1,8 do 2,0, kar je kazalo na nizko vsebnost organskih topil v vzorcu.

4.10.3 Prepis RNA v cDNA

Za vsak vzorec smo pripravili raztopino s koncentracijo RNA 200 ng/µl (2 ng v 10 µl). Nato smo s pomočjo High-Capacity cDNA Reverse Transcription kompleta pripravili mešanico za reakcijo in k vsakem vzorcu RNA dodali 10 µl te reakcijske zmesi. Tako smo dobili 20 µl reakcijske zmesi s koncentracijo RNA 100 ng/µl. Vzorce smo nato zložili v aparat C1000 Thermal Cycler in nastavili program za transkripcijo (prepis RNA v cDNA) (Preglednica III).

Preglednica III: Program za prepis RNA v cDNA

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura [°C]	25	37	85	4
Čas [min]	10	120	5	∞

Po končanem prepisu RNA v cDNA smo vzorce shranili v hladilniku, pri 4 °C.

4.10.4 Priprava vzorcev za merjenje izražanja OCT1

Po končani transkripciji smo dobili 20 µl raztopine cDNA s koncentracijo 100 ng/µl. Vzorce vseh paralel iste vrste celic smo združili v eno epico in iz teh vzorcev z redčitvijo

pripravili standarde. Pri celicah, pri katerih smo imeli 3 paralele, smo vse prenesli v eno epico, zmešali in odvzeli 40 μ l, 20 μ l pa zavrgli. Za vsako vrsto celic smo pripravili 7 standardov cDNA s koncentracijami 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 12,5 ng/ μ l, 6,25 ng/ μ l, 3,125 ng/ μ l, 1,56 ng/ μ l in 0,78 ng/ μ l. Nato smo s pomočjo kompleta SYBR[®] Select Master Mix pripravili dve raztopini za reakcijo: eno z oligonukleotidnimi začetniki («primerji») za OCT1 in eno z oligonukleotidnimi začetniki za GUSB. Na mikrotitrsko ploščico s 384 luknjicami smo odpipetirali po 10 μ l reakcijske zmesi za OCT1 oz. za GUSB, h kateri smo dodali po 5 μ l standarda cDNA. Vsak standard smo za vsak gen nanesli trikrat (Preglednica IV).

Preglednica IV: Shema pipetiranja standardov

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OCT1	HEK	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HEK-VC	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HEK-OCT1	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	K562	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	CaCo2	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HepG2	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	Bolniki s KML	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
GUSB	HEK	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HEK-VC	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HEK-OCT1	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	K562	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	CaCo2	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	HepG2	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K
	Bolniki s KML	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6	S7	S7	S7	K	K	K

S: standard, K: kontrola (voda)

Po končanem pipetiranju smo ploščo pokrili in premešali na stresalniku. Nato smo ploščo dali v aparat LightCycler 480 za qPCR in nastavili program, prilagojen za uporabo označevalca MMSybrSelect (Preglednica V).

Preglednica V: Program za potek PCR reakcije v realnem času

Korak	T (°C)	čas	št. ciklov
UDG aktivacija	50	2 min	1
Začetna denaturacija	95	2 min	1
Denaturacija	95	15 s	50 x (kvantifikacija)
Prileganje in podaljševanje	60	60 s	
Taljenje (»melting«)	65-97		1

4.11 MERJENJE IZRAŽANJA OCT1**4.11.1 Analiza s PCR v realnem času**

PCR v realnem času je najbolj občuljiva in zanesljiva metoda za detekcijo in kvantifikacijo nukleinskih kislin (DNA, cDNA, RNA). Temelji na detekciji in kvantifikaciji fluorescence molekule barvila v realnem času. Detekcija poteka med akumulacijo PCR produkta z vsakim ciklom pomnoževanja, kar omogoča spremljanje reakcije v zgodnji in eksponencialni fazi, kjer prvi večji porast produkta PCR korelira z začetno količino DNA v vzorcu.

Za kvantifikacijo cDNA v vzorcu smo uporabili SYBR Green barvilo, ki se veže na dvovijačno DNA, ne pa tudi na enovijačno DNA. Po denaturaciji dvojne vijačnice fluorescence v vzorcu ne zaznamo, po prileganju oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanju pa nastaja dvojna vijačnica, na katero se veže barvilo in v vzorcu zaznamo fluorescenco. Intenziteta fluorescence korelira s količino nastale DNA in tako tudi z začetno koncentracijo v vzorcu. V programu nastavimo prag fluorescence. Za kvantifikacijo je pomemben cikel, v katerem fluorescenca v vzorcu doseže prag, C_t .

Pred pregledom rezultatov izražanja je potrebno preveriti specifičnost pomnoževanja. To preverimo z analizo krivulje taljenja DNA in temperaturo taljenja T_m . Na grafu fluorescence v odvisnosti od temperature mora biti samo en vrh, pri T_m .

Iz vsakega vzorca smo z redčitvijo pripravili 7 standardov vzorca, ki smo jih v treh paralelah nanegli na mikrotitrsko ploščico. S qPCR smo zaznali, v katerem ciklu je fluorescenca presegla prag in za vsak vzorec dobili premico C_t v odvisnosti od log c standarda in faktor učinkovitosti. Iz premice smo izračunali, v katerem ciklu se je pojavila fluorescenca standardov.

Za primerjavo izražanja OCT1 gena smo uporabili izražanje hišnega gena GUSB, katerega izražanje je v vseh celičnih linijah enaka in nam služi za normalizacijo rezultatov.

Rezultate qPCR smo obdelali z $\Delta\Delta C_t$ metodo s primerjavo OCT1 gena z genom GUSB in s primerjavo med celičnimi linijami glede na referenčno celično linijo HEK293, po enačbi 7.

$$R = 2^{(povp \Delta C_{t_1} - povp \Delta C_{t_{HEK293}})} \quad (\text{Enačba 7})$$

R – razmerje izražanja gena za OCT1 v primerjavi z genom za GUSB

povp ΔC_{t_1} – povprečna razlika ciklov OCT1 in GUSB za celično linijo

povp $\Delta C_{t_{HEK293}}$ – povprečna razlika ciklov med koncentracijo OCT1 in GUSB za referenčno celično linijo HEK293

4.12 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Poskuse smo izvajali v treh paralelah. Rezultate poskusov smo zato statistično ovrednotili s pomočjo programa Microsoft Excel 2007. Rezultati so podani kot povprečna vrednost \pm SD (standardna deviacija). Med sabo smo primerjali po 2 skupini vzorcev (ki so bili v treh ponovitvah). Z F-testom smo ugotavljali, ali sta varianci statistično različni ($p < 0,05$) ali ne ($p > 0,05$). Glede na rezultat F-testa smo se odločili, kateri Studentov t-test bomo uporabili. V primeru različnih varianc ($f < 0,05$) smo uporabili dvovzorčni t-test z neenako varianco in dvostransko porazdelitvijo. V primeru enakih varianc ($f > 0,05$) pa smo uporabili dvovzorčni t-test z enako varianco in dvostransko porazdelitvijo.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 PRIVZEM IMATINIBA V HEK293 CELICE

5.1.1 Ugotavljanje primernih pogojev za gojenje in inkubacijo celic

Pred začetkom izvajanja poskusov z različnimi zaviralci OCT1 smo morali določiti najbolj optimalne pogoje za poskus: čas rasti celic, čas inkubacije celic z IM, površino za inkubacijo (plošča s 6 ali 12 luknjami) ter čas inkubacije s tripsinom.

Po nasaditvi celic smo na približno 12 ur pod mikroskopom preverjali gostoto celic. Optimalno gostoto so celice dosegle po približno 36 urah, zato smo pri vseh naslednjih poskusih, celice gojili približno 36 ur.

Za določitev, katere plošče bomo uporabili pri nadaljnjih poskusih, smo izvedli enak poskus na plošči s 6 luknjami in na plošči z 12 luknjami. Na plošči z 12 luknjami je bilo število celic po namnožitvi za poskus premajhno. Na tej plošči je bila površina lukenj manjša (površina luknje na plošči z 12 luknjami je $3,87 \text{ cm}^2$, na plošči s 6 luknjami pa $9,34 \text{ cm}^2$) in je bilo zato v eni luknji le 2 ml suspenzije celic z gostoto 300.000 celic/ml, kar pomeni 600.000 celic na luknjo, za poskus pa smo želeli vsaj 1.500.000 celic na luknjo.

Na plošči z 12 luknjami smo prav tako preverjali, kako čas inkubacije vpliva na število celic in privzem IM. Celice smo z IM inkubirali 2h, 1h, 30 min in 10 min. Ugotovili smo, da je privzem IM največji po 2h inkubacije in da čas inkubacije ne vpliva pomembno na število celic, zato smo nadaljnje poskuse izvajali z 2-urno inkubacijo.

Med izvajanjem prvih poskusov smo opazili, da veliko celic ostane pritrjenih na ploščo, zato smo pri nadaljnjih poskusih po inkubaciji celicam dodali po 0,4 ml tripsina na luknjo (t.j. toliko, da pokrije dno luknje). Določiti smo morali tudi najkrajši čas inkubacije s tripsinom, da bi se celice še odlepili, inkubacija pa istočasno ne bi povzročila bistvenega izgubljanja učinkovine iz celic. Celice smo s tripsinom inkubirali 5 min in 3 min in ugotovili, da 3-minutna inkubacija dobro odlepi celice s površine in smo zato pri nadaljnjih poskusih izvajali 3-minutno inkubacijo s tripsinom.

Privzem IM smo normirali na število celic (po postopkih opisanih v poglavjih Metode, *Štetje celic* in *Analiza z LC-MS/MS*) in na koncentracijo proteinov (po postopku opisanem v poglavju Metode, *Določanje koncentracije proteinov*) v vzorcu.

Privzem IM smo preverjali na celicah transficiranih z OCT1 (HEK293-OCT1) in na celicah z vstavljenim praznim vektorjem (HEK293-VC).

5.1.2 Vpliv kinina na privzem IM v HEK293 celice

Preglednica VI: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s kininom na privzem IM pri normiranju mase IM na število celic

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice	Privzem v HEK293-VC celice	vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na število celic [ng IM/200.000 celic]	brez	9,93 ± 1,33	9,75 ± 1,90	0,82
	kinin	2,13 ± 0,36	1,64 ± 0,42	0,06
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		3,53 × 10⁻⁹	2,90 × 10⁻⁷	

Preglednica VII: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s kininom na privzem IM pri normiranju mase IM na maso proteinov

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice	Privzem v HEK293-VC celice	vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na maso proteinov [ng IM/10 µg proteinov]	brez	1,92 ± 0,35	1,97 ± 0,42	0,75
	kinin	0,37 ± 0,13	0,36 ± 0,08	0,84
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		1,23 × 10⁻⁷	3,15 × 10⁻⁷	

Vpliv izražanja OCT1 na privzem IM

Hu s sodelavci (9) je v svoji študiji ugotovil, da je privzem IM v HEK293-OCT1 signifikantno večji od privzema v HEK293-VC celice. Naši rezultati kažejo ravno nasprotno (Preglednici VI in VII ter Slika 7). Privzem IM v HEK293-OCT1 celice ni značilno večji od privzema v HEK293-VC celice niti brez niti v prisotnosti kinina. Privzem je tako v obeh celičnih linijah enak, ne glede na izražanje OCT1.

Razlika med tema dvema celičnima linijama torej po dodatku kinina ni signifikantna. White in sodelavci so na celični liniji K562 ugotovili, da po dodatku zaviralca OCT1 razlika v privzemu IM v celice bolnikov, ki se različno odzivajo na zdravljenje, ni več prisotna, iz česar so sklepali, da je za uspešnost zdravljenja z IM odgovoren privzem učinkovine z OCT1 prenašalcem. Naši rezultati se le delno skladajo s to ugotovitvijo. White in sodelavci so ugotovili, da je pred dodatkom zaviralca razlika v privzemu, med bolniki, ki se dobro odzivajo na zdravljenje in tistimi, ki se odzivajo slabše, signifikantna

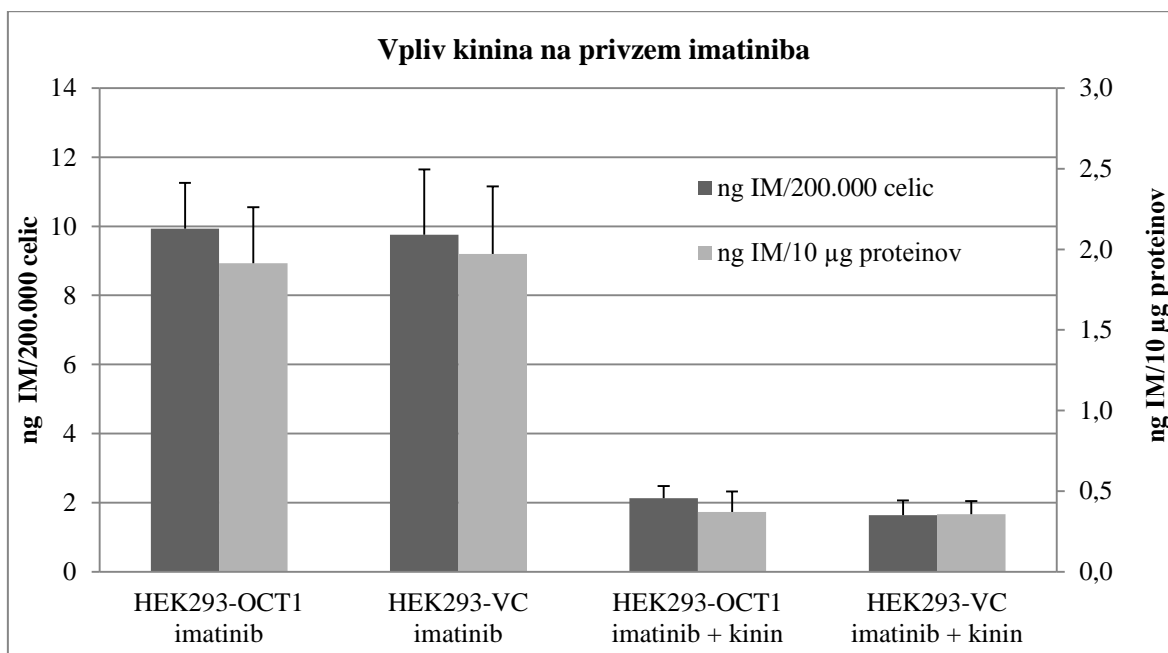
in da ta razlika izgine šele po dodatku zaviralca OCT1. Mi smo ugotovili, da razlika med celičnima linijama HEK293 ni signifikantna ne brez in ne po dodatku kinina.

Vpliv zaviranja OCT1 s kininom na privzem IM

Naši rezultati kažejo, da je privzem v prisotnosti in odsotnosti kinina v celicah HEK293-OCT1 značilno različen (zmanjša se za približno 80 %). Privzem IM je značilno različen tudi v celicah, transfeciranih s praznim vektorjem, kjer se ob dodatku kinina zmanjša prav tako za približno 80 %. Rezultati so enaki pri normiranju mase IM na število celic in normiranju mase IM na maso proteinov.

Čeprav je izražanje OCT1 v HEK293-VC 1000-krat manjše kot v HEK293-OCT1 (celična linija s povečanim izražanjem), je zmanjšanje privzema v obeh celičnih linijah zelo podobno, kar kaže na to, da privzem ni odvisen od OCT1. Dodatek kinina prav tako ni izničil privzema IM, kar se sklada z ugotovitvami White in sodelavcev na celični liniji K562, da je za privzem IM verjetno odgovoren še nek drug pasivni ali aktivni transport.

Kinin torej signifikantno zmanjša privzem IM v obe celični liniji, in to za približno enak odstotek, čeprav HEK293-VC celice nimajo povečanega izražanja OCT1 prenašalca. Po dodatku kinina je privzem IM enak v obeh celičnih linijah, kot so pokazale tudi študije White in sodelavcev s prazosinom.



Slika 6: Vpliv kinina na privzem imatiniba

5.1.3 Vpliv prazosina, prokainamida in atopina na privzem IM v HEK293 celice

Preglednica VIII: Vpliv izražanja OCT1 in zaviranja OCT1 s prazosinom, prokainamidom in atropinom na privzem IM pri normiranju na število celic

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice			Privzem v HEK293-VC celice			vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na število celic [ng IM/200.000 celic]	brez	17,48 ± 1,18			15,90 ± 0,76			0,25
	prazosin	9,13 ± 0,80			9,99 ± 1,26			0,38
	prokainamid		6,91 ± 0,26			11,03 ± 1,58		0,01
	atropin			10,54 ± 1,85			12,53 ± 1,77	0,26
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		2,36 × 10⁻³	5,14 × 10⁻⁴	0,01	0,01	0,03	0,04	

Preglednica IX: Vpliv izražanja in zaviranja OCT1 s prazosinom, prokainamidom in atropinom na privzem IM pri normiranju na maso proteinov

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice			Privzem v HEK293-VC celice			vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na maso proteinov [ng IM/10 µg proteinov]	brez	2,67 ± 0,40			2,87 ± 0,20			0,47
	prazosin	1,81 ± 0,29			1,69 ± 0,04			0,53
	prokainamid		1,53 ± 0,09			1,68 ± 0,13		0,19
	atropin			1,82 ± 0,11			1,71 ± 0,12	0,30
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		0,04	8,40 × 10⁻³	0,02	5,23 × 10⁻⁴	9,30 × 10⁻⁴	9,64 × 10⁻⁴	

Vpliv izražanja OCT1 na privzem IM

Razlika v privzemu IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celicami brez prisotnosti zaviralcev ni signifikatna (Preglednica VIII in IX). Enako smo ugotovili tudi pri poskusu s kininom. Prav tako razlika v privzemu med HEK293-OCT1 in HEK293-VC ni signifikatna v prisotnosti prazosina in atropina. Razlika je signifikatna samo v prisotnosti prokainamida pri normiranju mase IM na število celic, kjer je privzem v HEK293-VC celice večji za približno 60 % (Preglednica VIII).

Ker so uporabljene spojine zaviralci OCT1, smo pričakovali, da bo ob njihovem dodatku privzem IM v obe celični liniji približno enak (zaviralci izničijo vpliv prenosa preko OCT1). Ob dodatku prazosina in atropina je bila razlika v privzemu IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celicami nesignifikantna, kot pričakovano. Pri prokainamidu je bila razlika pri normiranju mase IM na število celic signifikantna in privzem v HEK293-OCT1 celice manjši kot v HEK293-VC celice.

Vpliv zaviranja OCT1 s prazosinom, prokainamidom in atropinom na privzem IM

Tako kot pri kininu, je tudi pri teh zaviralcih OCT1, razlika v privzemu IM med celičnima linijama HEK293-OCT1 in HEK293-VC v odsotnosti in prisotnosti zaviralca signifikantna.

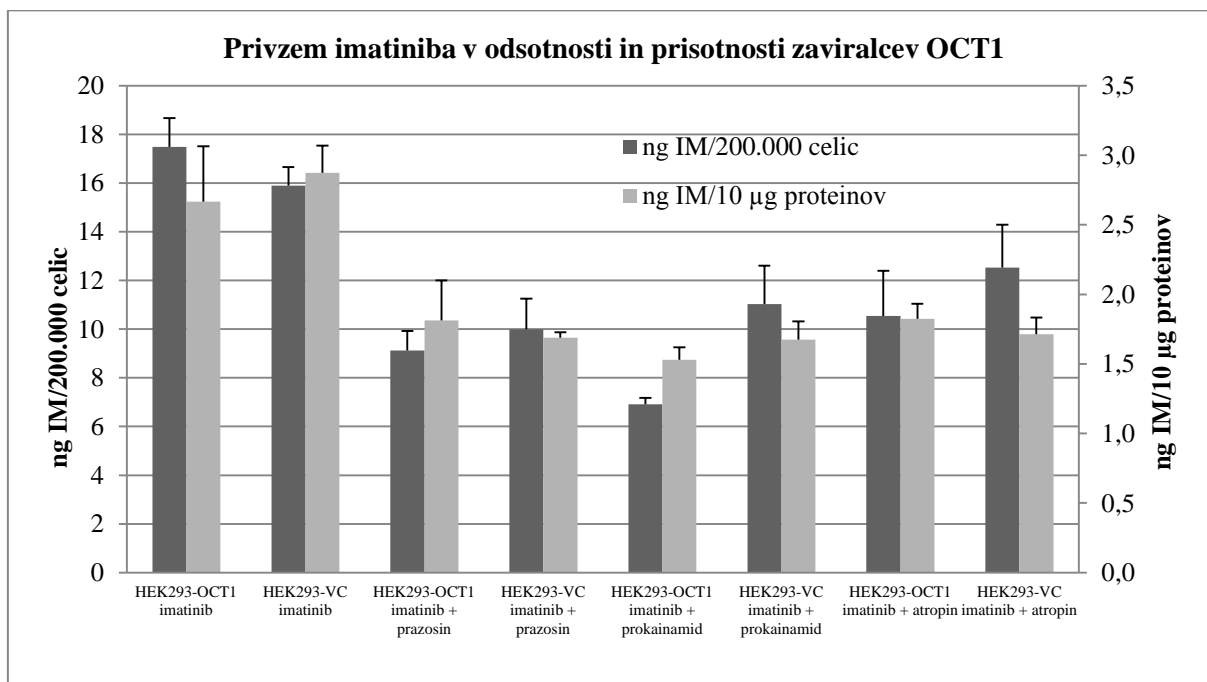
Privzem IM v HEK293-OCT1 celice se je v prisotnosti prazosina zmanjšal za približno 50 %, pri normiranju mase IM na število celic oz. za približno 30 %, pri normiranju mase IM na maso proteinov. Privzem v HEK293-VC pa se je v prisotnosti prazosina zmanjšal za približno 40 % v obeh primerih. Zmanjšanje privzema IM je bilo tako podobno pri obeh celičnih linijah, privzem pa se zmanjšal ne glede na nivo izražanja OCT1.

Ob dodatku prokainamida se je privzem v HEK293-OCT1 celice zmanjšal za približno 60 % pri normiranju mase IM na število celic oz. 40 % pri normiranju mase IM na maso proteinov, v HEK293-VC pa za približno 30 oz. 40 %. Zmanjšanje privzema v obe celični liniji po dodatku prokainamida je bilo signifikantno, vendar enako kot pri prazosinu, približno enako v obeh celičnih linijah.

Privzem IM v HEK293-OCT1 celice se je v prisotnosti atropina zmanjšal za 40 oz. 30 %, privzem v HEK293-VC pa za 20 oz. 40 %. Zmanjšanje privzema po dodatku atropina je

bilo signifikantno, vendar tudi pri tem zaviralcu ni razlike v zmanjšanju privzema IM med celičnima linijama.

Podobno, kot je bilo ugotovljeno že pri kininu, tudi ti zaviralci ne izničijo privzema IM v celice in v obeh celičnih linijah v enaki meri zmanjšajo privzem IM.



Slika 7: Vpliv prazosina, prokainamida in atropina na privzem IM

Slika 8 zelo dobro povzema problematiko mehanizma aktivnega privzema IM v celice. Po eni strani je očitno, da povečanje izražanja OCT1 prenašalca nima vpliva na aktivni privzem IM, po drugi strani pa da privzem zmanjšajo vsi zaviralci, ki naj bi »specifično« zavirali delovanje OCT1. To si v grobem lahko razlagamo na dva načina. Morda je že zelo majhno izražanje zadostno za maksimalno hitrost privzema IM s tem prenašalcem in tako povečanje izražanja nima dodatnega prispevka k procesu privzema. Regulacija aktivnosti prenašalca OCT1 na celičnem nivoju žal še ni ustrezno raziskana. Šibkost te razlage se kaže v rezultatih Nies in sodelavcev, ki so z drugim substratom (TEA) pokazali značilno razliko v privzemu glede na izražanje prenašalca OCT1. Po drugi strani je možno tudi, da vsi uporabljeni »selektivni« zaviralci aktivnosti OCT1 prenašalca zavirajo tudi aktivnost še neznanega prenašalca, ki je dejansko odgovoren za aktivni transport IM skozi biološke membrane.

5.1.4 Vpliv PSC833 in KO134 na privzem IM v HEK293 celice

Preglednica X: Primerjava koncentracije IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celičnima linijama pri normiranju mase IM na število celic

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice		Privzem v HEK293-VC celice		vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na število celic [ng IM/200.000 celic]	brez	9,75 ± 1,23		10,23 ± 1,44		0,53
	PSC833	8,31 ± 0,38		8,70 ± 0,87		0,52
	KO134		7,98 ± 1,02		6,09 ± 0,50	0,04
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		0,10	0,07	0,13	1,51 × 10⁻³	

Preglednica XI: Primerjava koncentracije IM med HEK293-OCT1 in HEK293-VC celičnima linijama pri normiranju mase IM na maso proteinov

	Zaviralec	Privzem v HEK293-OCT1 celice		Privzem v HEK293-VC celice		vpliv izražanja OCT1 (p vrednost)
Normiranje mase IM na maso proteinov [ng IM/10 µg proteinov]	brez	2,12 ± 0,12		2,03 ± 0,40		0,52
	PSC833	1,56 ± 0,05		1,68 ± 0,05		0,05
	KO134		1,61 ± 0,12		1,36 ± 0,04	0,03
vpliv zaviranja OCT1 (p vrednost)		1,00 × 10⁻⁴	4,58 × 10⁻⁴	0,03	1,05 × 10⁻³	

Vpliv izražanja OCT1 na privzem IM

Razlika v privzemu IM v HEK293-OCT1 celice in HEK293-VC celice brez dodatka drugih spojin ni bila signifikantna v nobenem primeru (niti pri normiranju mase IM na število celic niti na maso proteinov) (Preglednica X in XI ter Slika 9). Ti rezultati se skladajo z rezultati drugih poskusov, ki smo jih izvedli.

Razlika v privzemu IM v prisotnosti PSC833 je bila signifikantna pri normiranju na maso proteinov (privzem je bil za približno 7 % večji v HEK293-VC celicah), pri normiranju na število celic pa ne. Privzem IM v HEK293-OCT1 in HEK293-VC celice je bil v prisotnosti KO134 signifikatno različen (približno 25 % oz. 15 % manjši privzem v HEK293-VC celicah).

Vpliv PSC833 na privzem IM

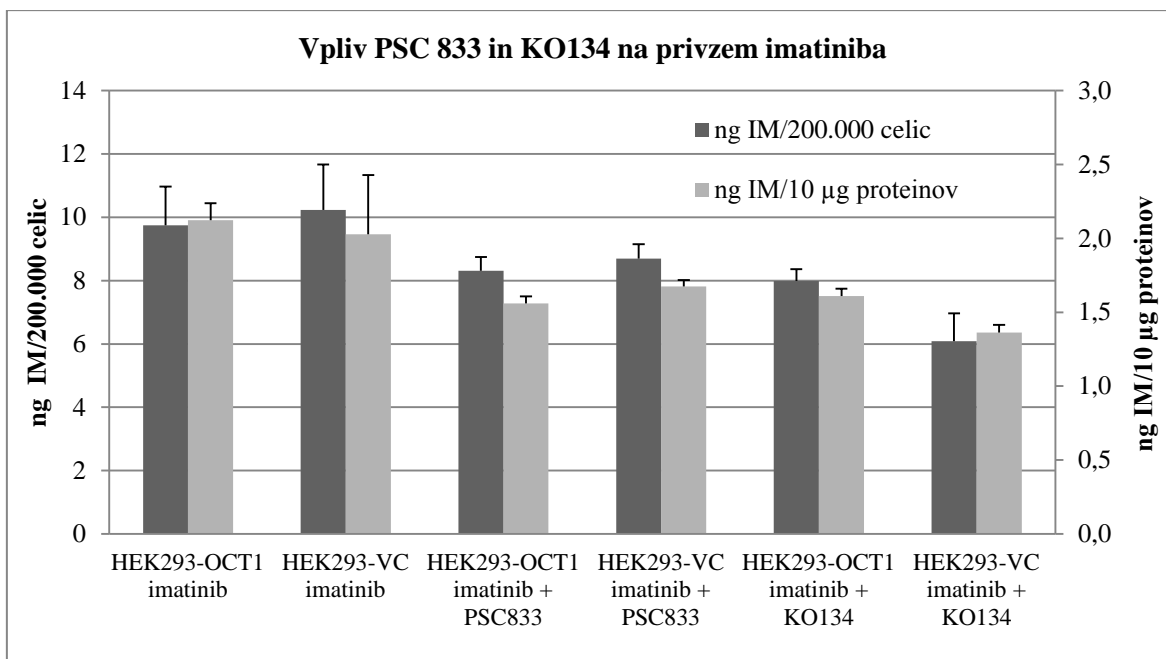
Razlika v privzemu IM v HEK293-OCT1 oz. HEK293-VC celice brez PSC833 in v prisotnosti PSC833 je bila signifikantna samo v primeru normiranja mase IM na maso proteinov (približno 20 % manjši privzem v prisotnosti PSC833).

PSC833 je zaviralec P-glikoproteina (P-gp), efluksnega prenašalca, ki zmanjšuje znotrajcelično koncentracijo IM. Tako bi bile v primeru pomembnega transporta IM s P-gp koncentracije IM v celicah, po dodatku PSC833, večje kot pred dodatkom le-tega, iz naših rezultatov pa je razvidno, da so koncentracije IM manjše. Podobno ugotovitev najdemo tudi v literaturi. White in sodelavci so preverjali vpliv PSC833 na privzem IM in ugotovili, da PSC833 ne vpliva signifikantno na privzem v celice K562 (3).

Vpliv KO134 na privzem IM

Razlika v privzemu IM v HEK293-OCT1 celice brez in v prisotnosti KO134 je statistično značilna samo pri normiranju mase IM na maso proteinov (približno 25 % manjši privzem v prisotnosti KO134), pri HEK293-VC celicah pa je signifikantna v obeh primerih (približno 40 % manjši privzem v prisotnosti KO134).

KO134 je zaviralec prenašalca BCRP, ki naj bi bil odgovoren za izločanje IM iz celic. V prisotnosti KO134 naj bi bila tako znotrajcelična koncentracija IM večja, rezultati pa kažejo, da so koncentracije IM nižje. De Lima in sodelavci so v svojem članku dokazali, da je zmanjšano izražanje prenašalca BCRP in povečano izražanje OCT1 povezano z uspešnostjo zdravljenja z IM (31). Drugi dve študiji pa tega nista uspeli dokazati (13) (22). Tudi nam ni uspelo dokazati, da lahko z zaviranjem BCRP povečamo privzem in zadrževanje IM.



Slika 8: Vpliv PSC833 in KO134 na privzem IM

5.1.5 Vrednotenje uporabljenih metod

Pri merjenju privzema IM v celice smo rezultate privzema normirali na število celic in maso proteinov.

Preglednica XII: Primerjava metod normiranja rezultatov privzema IM

	metoda normiranja mase IM na število celic	metoda normiranja mase IM na maso proteinov
material	mikroskop, Neubauerjevo stekelce, tripansko modrilo, fotoaparar	Pierce BCA Protein Assay Kit - komplet za določevanje proteinov v vzorcu, aparat za merjenje absorbance
slabosti	<ul style="list-style-type: none"> – štetje je treba izvesti med poskusom, ko so celice še žive – obstaja možnost napak pri štetju (celic ne šteje računalnik, ampak raziskovalec) 	<ul style="list-style-type: none"> – zamudna metoda, potrebna priprava standardov, delovne raztopine, potrebno natančno pipetiranje
prednosti	<ul style="list-style-type: none"> – dokaj hitra metoda, štetje je 	<ul style="list-style-type: none"> – koncentracijo proteinov

	sicer zamudno, vendar ga lahko zaradi fotografiranja slik pod mikroskopom izvedemo postopno na ekranu računalnika, po končanem poskusu	izmerimo z aparaturo – proteine lahko določimo po opravljenem poskusu privzema (vzorci lahko zamrznemo in proteine določamo naslednji dan)
ključna razlika med metodama	– preštejemo le žive celice	– zajamemo tako žive kot mrtve celice (tudi mrtve celice vsebujejo preiskovano spojino, ki jo na koncu izmerimo, ne zmorejo pa aktivnega transporta)

Preglednica XII prikazuje razlike med uporabljenima metodama dela. Rezultati, dobljeni po obeh metodah so podobni in medsebojno primerljivi, vendar ne moremo reči, katera metoda daje bolj pravilne rezultate, ker te reference nimamo. Kljub v preglednici opisanimi prednostmi in slabostmi obeh metod sta obe metodi dobri in bi lahko bili uporabljeni samostojno. Služita pa lahko tudi kot kontrola ena drugi, zato ju je, tako kot v našem primeru, lahko uporabljamo tudi skupaj.

5.2 Izražanje mRNA v različnih celičnih linijah

Po koncu programa podvojevanja DNA smo najprej preverili krivuljo T_m . T_m je temperatura, pri kateri se verigi DNA ločita, pri čemer pade fluorescenca, ker se barvilo veže le v dvojno vijačnico. Krivulja je imela samo en vrh, kar pomeni, da smo imeli v vzorcu samo eno DNA. Nato smo preverili faktorje učinkovitosti (Preglednica XIII), ki morajo biti okoli vrednosti 2 in linearnost grafov fluorescence v odvisnosti od koncentracije v vzorcu. Vsi faktorji učinkovitosti so bili okoli 2 in vsi grafi so bili linearni, kar pomeni, da se OCT1 izraža pri vseh vrstah celic.

Preglednica XIII: Faktorji učinkovitosti

Celice	OCT1 gen	GUSB gen
K562	2,014	2,091
HEK293	2,099	2,026
HEK293-OCT1	2,088	2,091
HEK293-VC	2,086	2,081
CaCo2	2,103	2,063
HepG2	2,125	2,046
celice, izolirane iz krvi bolnikov	2,069	2,022

Rezultate smo nato obdelali z metodo primerjave ciklov, imenovano delta-delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metoda. S to metodo smo primerjali, v katerem ciklu pomnoževanja s PCR reakcijo se pojavi OCT1 in v katerem GUSB. Vsak cikel razlike predstavlja 2^n več kopij DNA. Izračunali smo povprečno število razlike ciklov (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Povprečno število razlike ciklov med genom OCT1 in GUSB

	HEK293	HEK293-VC	HEK293-OCT1	K562	CaCo2	HepG2	celice, izolirane iz krvi bolnikov
povpr. ΔC_t	-6,64	-3,30	6,64	-9,52	-5,59	-4,48	-2,94
razmerje izražanja (glede na HEK293)	/	10,14	9899,99	0,14 (7,36)	2,06	4,48	12,93

Razmerje izražanja OCT1 smo izračunali po enačbi 7, podrobneje opisani v poglavju Metode, *Merjenje izražanja OCT1*.

Stopnjo izražanja OCT1 v celičnih linijah smo primerjali z izražanjem v HEK293 celični liniji brez vstavljenega vektorja (celična linija, ki je pri merjenju privzema IM nismo uporabljali). Najslabše se OCT1 izraža v celični liniji K562 in sicer 7-krat slabše kot v HEK293 celični liniji. V ostalih celičnih linijah, v katerih smo ugotovljali izražanje, se OCT1 izraža bolje kot v HEK293 celični liniji. V CaCo2 celični liniji se izraža 2,06-krat bolje, v celični liniji jetrnih celic 4,48-krat bolje, v krvnih celicah bolnikov (PBMC, granulociti) 12,93-krat bolje, v HEK293-VC celicah 10-krat bolje, v HEK293-OCT1 celicah pa skoraj 10.000-krat bolje.

6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da privzem IM v HEK293-OCT1 in HEK293-VC ni značilno različen. S tem smo zavrnili ugotovitve Hu in sodelavcev in potrdili ugotovitve Nies s sodelavci. S to ugotovitvijo lahko potrdimo ugotovitve Nies, da OCT1 ni prenašalec za IM.
- Privzem IM po dodatku zaviralcev OCT1 se zmanjša za podobno vrednost pri obeh celičnih linijah, se pravi, ne glede na izražanje mRNA OCT1. Ta ugotovitev se sklada z ugotovitvami Giannoudis in Wanga ter Nies s sodelavci.
- Z merjenjem privzema IM v prisotnosti zaviralcev OCT1 - kinina, prazosina, prokainamida in atropina, ne merimo zgolj aktivnosti OCT1, saj ti zaviralci OCT1 ne izničijo privzema IM. Možno je, da zaviralci OCT1 dodatno zavirajo še aktivnost neznanega prenašalca, ki je vpleten v proces privzema IM v celice.
- Ugotovili smo tudi, da samo izražanje mRNA OCT1 ne more biti zadosten pokazatelj privzema IM in posledično uspešnosti zdravljenja KML. Privzem IM namreč opazimo tudi v celicah, pri katerih je nivo izražanja mRNA OCT1 zelo nizek.
- Eden od ciljev naloge, je bil tudi kritična presoja uporabe metod normiranja mase IM na število celic in normiranja mase IM na maso proteinov. Obe metodi dajeta zelo podobne rezultate, vendar daje metoda normiranja mase IM na maso proteinov verjetno bolj zanesljive rezultate kot normiranje na število celic, kjer težavo predstavlja ročno štetje celic.

Ugotovili smo torej, da povečanje izražanja OCT1 nima vpliva na privzem IM v celice in da se v prisotnosti zaviralcev OCT1 privzem IM v celice zmanjša. Ena možna razlaga dobljenih rezultatov je, da je IM zelo dober substrat za prenašalec OCT1 in je tako za največjo hitrost privzema IM v celice pri uporabljeni donorski koncentraciji dovolj že zelo nizek nivo izražanja OCT1. Pri tem povečano izražanje OCT1 ne bi imelo opaznega vpliva na privzem IM. Vendar je ta razlaga zelo malo verjetna, saj so Nies in sodelavci pokazali značilno razliko v privzemu substrata TEA glede na izražanje OCT1. Druga, bolj verjetna

možnost pa je, da vsi uporabljeni »selektivni« zaviralci aktivnosti OCT1 prenašalca zavirajo tudi aktivnost še neznanega prenašalca, ki je dejansko odgovoren za aktivni transport IM skozi biološke membrane. Naslednji možen korak v raziskovanju privzema IM je tako lahko iskanje drugih prenašalcev, ki bi lahko bili odgovorni za privzem IM v celice.

7 REFERENCE

1. Pajič T, Marc J, Preložnik Zupan I. Kronična mieloična levkemija. Farmaceutski vestnik. 2013; 64: p. 343-53.
2. Glaser M, Grmek-Zemljč T, Borin P. Naše izkušnje pri zdravljenju kronične mieloične levkemije z imatinib mesilatom. Zdravniški vestnik. 2004; 73: p. 207-10.
3. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino AC, Cambareri AC, et al. OCT-1 - mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. Blood. 2006; 108(2): p. 679-704.
4. Bokal U, Južnič Šetina T. Kronična mieloična levkemija. Onkologija/pregledi. 2012; XVI(1): p. 10-3.
5. Pajič T, Preložnik Zupan I. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. Zdravniški vestnik. 2008; 77: p. supp I 5-10.
6. Vodnik za bolnike s kronično mieloično levkemijo. http://www.drustvo-bkb.si/upload/moddoc_50_c9d2c95c964ebb4b3638.pdf; oktober 2012.
7. Nies AT, Schaeffeler E, van der Kuip H, Cascorbi I, Bruhn O, Kneba M, et al. Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (OCT1). Clin Cancer Res. 2014; 20(4): p. 985-94.
8. SmPC imatiniba; Centralna baza zdravil: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/14ED6DB3BC278BF3C1257BAC0083429A/\\$File/s-013172.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/14ED6DB3BC278BF3C1257BAC0083429A/$File/s-013172.pdf), dostop 20.11.2014.
9. Hu S, Franke RM, Filipski KK, Hu C, Orwick SJ, De Bruijn EA, et al. Interacion of imatinib with human organic ion carriers. Clin Cancer Res. 2008; 14(10): p. 3141-7.
10. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. Blood. 2007; 110(12): p. 4064-72.
11. Pelis RM WS. SLC22, SLC44, and SLC47 transporters - organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. Current topics in membranes. 2014; 73: p. 233-8.
12. Struktura proteina OCT1: <http://www.nature.com/clpt/journal/v89/n4/images/clpt201112f1.gif>, dostop

23.11.2014.

13. Giannoudis A, Wang L, Jorgensen AL, Xinarinos G, Davies A, Pushpakom S, et al. The hOCT SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 121(4): p. 628-37.
14. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of the cells: implication of drug resistance. *Blood*. 2004; 104(12): p. 3739-45.
15. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, et al. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*. 2010; 28(16): p. 2381-8.
16. White DL, Radich J, Soverini S, Saunders VA, Frede AK, Dang P, et al. Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomized to high-dose imatinib achieve better responses and have lower failure rates than those randomized to standard-dose imatinib. *Haematologica*. 2012; 97(6): p. 907-14.
17. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(8): p. 513-26.
18. Engler JR, Frede A, Saunders V, Zannettino A, White DL. The poor response to imatinib observed in CML patients with low OCT1 activity is not attributable to lower uptake of imatinib into their CD34+ cells. *Blood*. 2010; 116(15): p. 2776-8.
19. Engler JR, Hughes TP, White DL. OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89(4): p. 608-11.
20. Burger H, Sparreboom A, Mathijssen RHJ. Can »specific« OCT1 inhibitors be used to determine OCT1 transporter activity toward imatinib?. *Blood*. 2013; 121(24): p. 4965-66.
21. Crossman L, Druker B, Deninger M. hOCT1 and resistance to imatinib. *Blood*. 2005; 106(3): p. 1133-4.
22. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83(2): p. 258-64.
23. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*.

- 2010; 28(14): p. 2381-8.
24. Zhong JS, Meng FY, Xu D, Zhou HS, Dai M. Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. *Acta Haematol.* 2012; 127(4): p. 221-7.
 25. Nardinelli L, Sanabani SS, Didone A, Ferreira PB, Serpa M, Novaes MM, et al. Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2012; 127(4): p. 228-34.
 26. Gromicho M, Magalhaes M, Torres F, Dinis J, Fernandes AR, Rendeiro P, et al. Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncol Rep.* 2013; 29(2): p. 741-50.
 27. Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zhang L, Reddy NG, Jabbour E, et al. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol.* 2009; 27(22): p. 3642-49.
 28. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, Vartanian K, Willis SG, Yochum G, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood.* 2010; 115(2): p. 315-25.
 29. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia.* 2010; 24(11): p. 1962-5.
 30. Burger H, van Hol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood.* 2004; 104(9): p. 2940-2.
 31. De Lima LT, Vivona D, Bueno CT, Hirata RD, Luchessi AD, De Castro FA, et al. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol.* 2014; 31(3): p. 851.