

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A GYÓGYSZER METABOLIZMUSBAN SZEREPET JÁTSZÓ
KÉT FONTOS FAKTOR, A CITOKRÓM P450 2D6
ÉS A P-GLYCOPROTEIN VIZSGÁLATA**

DR. BODOR MIKLÓS

Témavezetők:

**Dr. Nagy Endre
Prof. Dr. Paragh György**

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI
CENTRUM
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET**

I. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA

2005

1. BEVEZETÉS

Miközben egyre több és hatásos készítmény jelenik meg napról napra a gyógyszerpiacon, a nem kívánt mellékhatások (Adverse Drug reaction, ADR) száma kiemelkedően magas: a rendelkezésre álló irodalmi adatok szerint 1994-ben több mint 100.000 hospitalizált személy vesztette életét gyógyszer mellékhatások miatt. További, több mint 2 millió gyógykezelés alatt álló beteg szenvedett el súlyos, nem fatális gyógyszer mellékhatást ugyanabban az évben. Az ADR-eket a statisztikák a halálozási listák 4. - 6. helyére helyezik. A legvisszafogottabb becslések szerint is az ADR-ek a tüdőgyulladás és a diabetes mellitus előtt helyezkednek el a halálok számát illetően. Annak érdekében, hogy megelőzni vagy csökkenteni lehessen a gyógyszerek okozta nemkívánatos hatásokat, elengedhetetlen az ADR-ekhez vezető mechanizmusok teljesebb megismerése. Bár a pontos százalékos arány nem ismert, a genetikai faktorok jelentős szerepet játszanak a mellékhatások kialakulásában. Mindezek figyelembevételével az egyes betegek gyógyszer metabolizmusában lévő különbségek háttérében álló okok pontosabb megismerése döntő fontosságú lehet. Egyebek mellett a különböző gyógyszerek metabolizmusában fontos szerepet játszik a citokróm P450 enzimrendszer, valamint a P-glycoprotein.

Az egyes gyógyszerkészítmények biotranszformációja hagyományosan két különböző enzimatis folyamatra, I. és II. fázisra bontható. Az I. fázis reakcióknak döntő szerepük van a gyógyszer detoxifikálásban. Az I. fázis reakciók jelentős része a citokróm P450 (CYP450) enzim szupercsalád közreműködésével történnek. Négy humán CYP450 enzimcsalád ismert. A gyógyszerek lebontásának nagy százaléka a CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 és CYP2C19 alegységeken történik. Régóta ismeretes, hogy az egyes egyének rendkívül változatos, esetenként előre megjósolhatatlan variabilitást mutatnak mind az I.,

mind a II. fázisú gyógyszer metabolizmust illetően. A különbségek okai számosak és változatosak, és döntően három csoportra oszthatók: környezeti, fiziológiai és genetikai tényezőkre. A CYP2D al csoport mindössze 2%-át alkotja a humán hepatikus CYP450-nek, de az I. fázisú gyógyszer lebontás jelentős részéért felelős. A citokróm P450 2D6 (CYP2D6) alegység a napjainkban felírt gyógyszerek metabolizmusának mintegy 25%-át végzi. Ezek a gyógyszerek különböző hatástani csoportokban tartoznak, így ide sorolhatók többek között antiarrhythmiaszerek, triciklikus antidepresszánsok, szerotonin-szelektív reuptake gátlók és opioid analgetikumok. A citokróm P450 enzimek közül a CYP2D6 mutatja a legnagyobb genetikai polimorfizmust, és ezáltal a legszélesebb individuális variabilitást mind az expressziót, mind a funkciót illetően. Ezidáig több mint 75 allél variánst írtak le, ugyanakkor ezen variánsoknak csupán töredéke jár teljes enzimaktivitás hiánnyal. A kaukázusi populáció mintegy 3-10%-a rendelkezik csökkent CYP2D6 aktivitással, ezen egyéneket „csökkent metabolizálók”-nak („poor metabolizer”, PM) nevezik. Ezek ismeretében fontos lehet a PM kategóriába tartozó egyének azonosítása a számukra potenciálisan toxikus gyógyszerek adását megelőzően. A PM fenotípus genetikai hátterének tisztázása érdekében számos vizsgálat történt, melynek során több mint 50 különböző génmutációt találtak. Ugyanakkor az is világossá vált, hogy a PM fenotípusért az esetek 98%-ában mindössze öt pontmutáció, valamint a gén teljes deléciója tehető felelőssé. Mivel az eddigi vizsgálatok szerint a genotípus önmagában nem minden esetben határozza meg a CYP2D6 fenotípust, a messenger RNS (mRNS) kópiaszámát vizsgálták, mint az enzimaktivitás további lehetséges markerét. Egy megfelelő érzékenységgel bíró CYP2D6 mRNS enzim assay alkalmas lehet a funkcionális enzim transzlációjában részt vevő intracelluláris mRNS koncentráció becslésére. Egy ilyen típusú módszer a - humán populációban nagymértékben polimorf - CYP2D6 enzim expressziójának vizsgálatát nagyban segítené. Ahhoz, hogy a CYP2D6 genotípus, mRNS

kópiaszám és enzim aktivitás közötti összefüggéseket megfelelően vizsgálhassuk, mindhárom paramétert egyazon májszövetben szükséges vizsgálni. Míg a kifinomult laboratóriumi módszerek a PCR-alapú genotipizálás és mRNS szám meghatározását már egy miligramm szövetből is lehetővé teszik, az enzim aktivitás méréséhez rendszerint ez a mennyiség kevésnek bizonyult. Az ismert és gyakran alkalmazott CYP2D6 szubsztrátok, mint a dextrometorphan, bufuralol vagy metoprolol az enzim aktivitás meghatározásához relatíve nagy mennyiségű szövetmintát igényelnek. Egy gyorsan lebontható szubsztrát alkalmas lehet a CYP2D6 aktivitás megfelelő érzékenységű méréséhez néhány mg-os májbiopsziás szövetmintákban is. Az R-568, egy első generációs kalcimimetikum rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal a vizsgálataink alapján. Ha emellett egy megfelelő mRNS becslésre alkalmas módszer is rendelkezésre áll, lehetővé válhat a CYP2D6 mRNS és enzimaktivitás közötti kapcsolat minőségi és mennyiségi vizsgálata. Vizsgálataink során a CYP2D6 genotípus, teljes-hosszúságú mRNS szám és in vitro R-568 demetiláció közötti összefüggést vizsgáltuk különböző körülmények között gyűjtött humán májszövet minták segítségével.

Egy másik – a gyógyszer metabolizmusban fontos szerepet játszó – faktor, a P-glikoprotein (Pgp) az ATP-kötő membrántranszporterek családjába tartozik, és emberben az *MDR1* (Multidrug-resistance, MDR1, ABCB1) gén kódolja. Ez a teljes egészében a sejtmembránban elhelyezkedő protein egy energia-dependens efflux-protein pumpaként csökkenti egy széles spektrumú gyógyszercsoport intracelluláris koncentrációját, melyek közé tartoznak a vinca alkaloidák, anthraciklinek, taxolok, aktinomicin D, kardiális glikozidok, immunosuppresszív ágensek, glukokortikoidok és HIV-ellenes proteáz gátlók. Mivel számos gyógyszer szubsztrátuma a Pgp-nek, az utóbbi expressziója és funkcionalitása közvetlenül befolyásolja ezen ágensek terápiás hatását. Az *MDR1* gén a 7-es kromoszóma hosszú karján foglal helyet, és egy „core” promoter régióból és 29

exonból áll. Bár régóta vizsgálat tárgyát képezi, a gén tényleges hossza továbbra is bizonytalan volt az elmúlt 16 év során. Az online elérhető adatbázisok 6.3 és 210 kb közötti nagyságot jelölnek meg. A rendelkezésre álló adatok a gén struktúráját illetően limitált számú vizsgált szövetmintákon alapulnak. Összehasonlító és bizonyító erejű vizsgálatok különböző humán szövet- és sejtenyészetekkel nem állnak rendelkezésre az irodalomban. A tényleges *MDR1* gén hossz meghatározása alapvető fontossággal bírhat, ezáltal lehetőség nyílna különböző további, a Pgp-hatás okozta gyógyszer rezisztencia hátterében álló gén strukturális vizsgálatok elvégzésére.

A jelen munka középpontjában a gyógyszermetabolizmusban szerepet játszó két fontos faktor, a CYP450 2D6 és a P-glikoprotein állt. Célja részben a különböző gyógyszerek metabolizmusában kulcsszerepet játszó CYP2D6 interindividuális variabilitásának hátterében álló mechanizmusok és befolyásoló tényezők, valamint a Pgp-t kódoló *MDR1* gén strukturális vizsgálata volt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A CYP450 2D6 és a Pgp vizsgálata során a következő vizsgálatokat végeztük:

1. Egy új, könnyen kivitelezhető módszert fejlesztettünk ki, melynek során teljes hosszúságú CYP2D6 messenger RNS kópia számot tudunk meghatározni
2. A fenti módszerrel meghatározott teljes-hosszú mRNS számot töredék-hosszúság meghatározására alkalmas „real-time” PCR-ral kapott eredményekkel vetettük össze
3. Különböző körülmények között nyert máj szövetminták esetében CYP2D6 genotipizálást végeztünk, melyeket az irodalmi adatokkal vetettünk össze
4. Az így megismert genotípusú minták CYP2D6 enzim aktivitását mértük egy új, érzékeny szubsztráton alapuló módszerrel

5. A genotípus, messenger RNS és enzimaktivitás közötti összefüggéseket vizsgáltuk
6. A humán MDR1 gén tényleges hosszát vizsgáltuk különböző szövet- és sejtenyészet minták segítségével

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A minták gyűjtéséhez minden esetben a szükséges Etikai Bizottság engedélyét kértük és kaptuk meg. A májszövet mintákat négy különböző módon gyűjtöttük és csoportosítottuk az alábbiaknak megfelelően: kontroll csoport (I. csoport), májbiopsziás csoport (II. csoport), máj transzplantációs csoport (III. csoport), és máj bank csoport (IV. csoport). A májbiopsziás csoport esetén a genotipizáláshoz a rendelkezésre álló minta korlátozottsága miatt humán limfocitákat használtunk, melyet a vérbank bocsátotta rendelkezésünkre. A különböző humán sejtenyészeteket [Messa Dox (ovárium karcinóma), CaCo2 (kolon karcinóma) és UW 228 (medulloblasztoma)] az Amerikai Sejtenyészeti Gyűjteményből (American Type Culture Collection) szereztük be.

Az R-568-al és dextrometorphannal végzett inkubációk után a nyert mintákat folyadék-kromatográfiás tömeg spektrográf (LC-MS) segítségével analizáltuk. Az *in vitro* enzim aktivitások eredményeit két mintás T-próbának vetettük alá. A 0.05, vagy annál kisebb P- értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A májszövetekből (kontroll, máj bank és transzplantációs csoportok), valamint a limfocitákból (májbiopsziás csoport) történő DNS extrakcióját a Qiagen DNeasy Tissue Kit-tel (Qiagen Inc., Valencia, CA) végeztük az alkalmazási előírás szerint. A leggyakoribb CYP2D6 variáns allélek genotipizálását PCR módszerrel végeztük. Az általunk vizsgált allélek a *3, *4, *5, *6, *7 és *8 voltak.

A májszövetmintákból történő RNS szeparálását a Totally RNA Isolation Kit-tel (Ambion Inc., Austin, TX) végeztük és fluorometriásan kvantitáltuk. A reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) kísérletekhez szükséges CYP2D6 standard előállításához pUC19 plazmidot használtunk, mely a teljes hosszúságú humán CYP2D6 cDNS-t tartalmazta. A CYP2D6 cDNS-ből StuI (Promega, Madison, WI) restrikciós enzim segítségével végzett hasítás során egy 475 bázispár hosszúságú részt vágunk ki. A megmaradt lineáris DNS szálakat ezt követően ismételtelen cirkuláris plazmiddá ligáltuk. Az így nyert - delécióval bíró - gén fragmentumot további amplifikációnak vetettük alá PCR segítségével, majd tisztítás után egy új, pSP73 (Promega, Madison, WI) vektorba klónoztuk. Ez a vektor tartalmazta az *in vitro* transzkripcióhoz szükséges T7 promotert. A CYP2D6 gén és a delécióval rendelkező (korábban részletezett, Δ 2D6-nak nevezett) gént linearizáltuk, majd *in vitro* RNS transzkripciónak vetettük alá. Ahhoz, hogy az egyes máj mintákban lévő CYP2D6 koncentrációt becsülni tudjunk, a mintákból származó RNS-t (rendszerint 0.5-2 μ g-ot) Δ 2D6 kompetitor jelenlétében vetettük alá ismételt RT-PCR-nek, mely után a produktumokat 1%-os agaróz gélen futtattuk és ethidium bromiddal festettük és így határoztuk meg a mintánkban lévő CYP2D6 kópiaszámot. A mintákat rövid-fragmens real-time kvantitatív RT-PCR módszerrel is meghatároztuk TaqMan PCR (ABI 7900, Foster City, CA) segítségével.

A Southern Blot kísérletekhez 10 μ g genomiális DNS-t BamHI/PacI és BamHI/KpnI restrikciós endonukleáz párok (New England Biolabs, Beverly, MA) segítségével hasítottuk. A DNS-t 0,8%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd nitrocellulóz membránra helyeztük át és 32 P- al jelölt próbákkal hibridizáltuk.

4. EREDMÉNYEK

A humán májszövetből izolált totál RNS vizsgálatát kompetitív szemikvantitatív RT-PCR segítségével végeztük egy ismert kópiaszámú belső standard használata mellett. A natív CYP2D6 és Δ 2D6 belső standarddal ekvivalens szignált adó hígított RNS mintákat használtuk az eredeti májmintában lévő CYP2D6 mRNS transzkriptumok számának meghatározásához. Az eredményeink szerint a detektálhatóság alsó határa májban lévő teljes RNS-re vonatkoztatva kb. 2500 másolat/ μ g.

Ezt követően az mRNS másolatok és a CYP2D6 enzim aktivitás közötti összefüggést vizsgáltuk. Az RNS transzkriptum és enzim aktivitás kapcsolatának meghatározása céljából először összehasonlítottuk a 2D6 teljes hosszúságú mRNS-ek számát az *in vitro* mért enzim aktivitással. Eredményeink azt tükrözik, hogy az arány viszonylag konstans (0.59 ± 0.09) a vizsgált CYP2D6 vad genotípusú májszövet mintákban. Ezzel szemben, ugyanazon típusokra vonatkozóan a CYP2D6 rövid fragmentumok vizsgálata Q-RT-PCR-rel nagy eltérést mutattak (2.79 ± 1.75). Minden egyes humán májszövet minta CYP2D6 genotipizálását végeztük PCR módszer segítségével. A mintákat a mintavétel körülményeinek és genotípusuknak megfelelően csoportosítottuk.

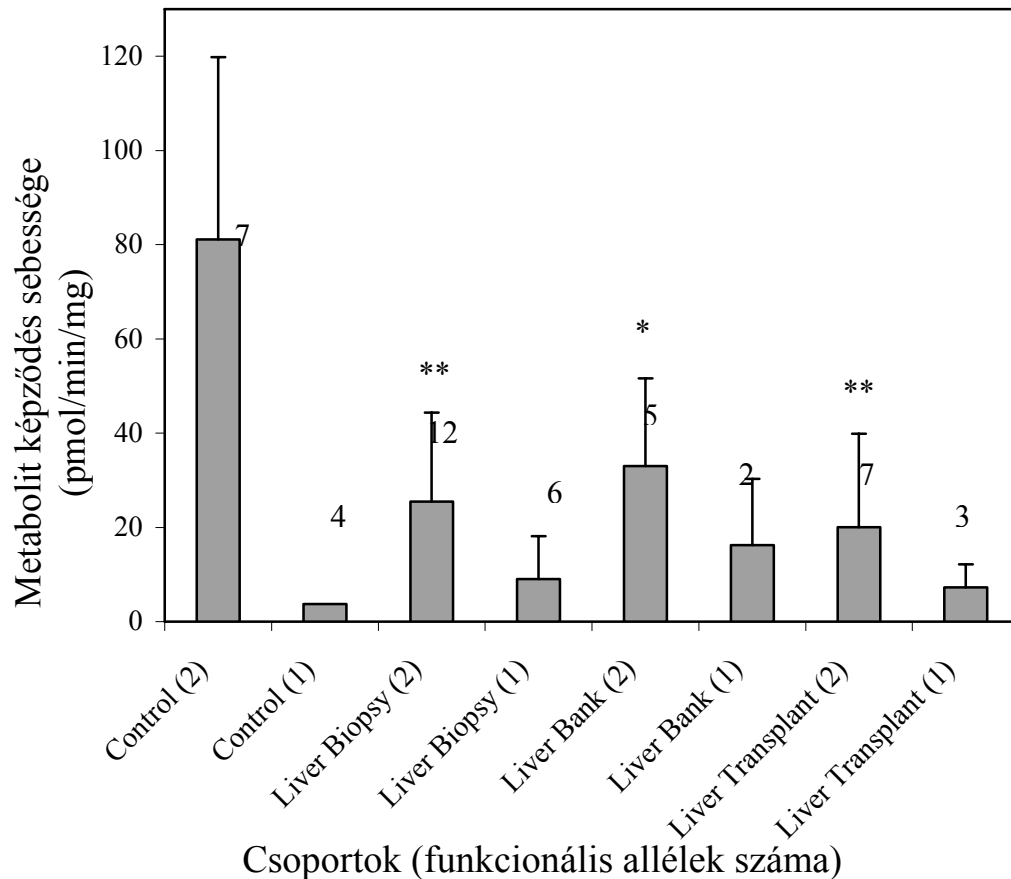
Összességében a négy különböző betegcsoportban lévő egyének életkora 7-76 év között változott. A betegek zömében fehérek voltak és a nemek eloszlása hasonló volt. A kontroll csoportba (n=11) hasi tumor miatt kezelt, májérintettség nélküli betegek kerültek, a májszövettan mindegyikük esetében negatív volt. Ezen májszövet mintákat a betegek előzetes beleegyezésével laparoszko-pos műtétek során nyerték. A máj biopsziás csoportba tartozó minták döntően krónikus hepatitis C fertőzött betegekből származtak, és mindegyik beteg esetén a szövettani mintavétel a klinikai diagnosztika és kezelés része volt (n=21). Megjegyzendő, hogy az így nyert szövettani minta igen kevés volt, átlagosan 6 mg, és ennek

igen kis része, mindössze 1-2 mg állt rendelkezésünkre a kísérletek kivitelezéséhez. A májtranszplantált csoportban a mintát közvetlenül az implantált máj reperfúzióját követően vették (n=11). A máj bank csoportba tartozó minták olyan donor májából származtak, amelyeket különböző okok miatt nem voltak alkalmasak transzplantációra (n=9). Figyelembe véve az általunk észlelt genotípusokat, a *4 variáns 32.7% frekvenciával fordult elő, amely jól egyezik a korábban nagyobb betegpopulációban észlelt, és az irodalomban rendelkezésre álló adatokkal.

A teljes-hosszúságú CYP2D6 transzkriptumok számát a májban minden egyes beteg esetén meghatároztuk. Azon minták között, ahol mRNS-t detektáltunk, két nagyságrendbeli különbséget észleltünk a mérhető mRNS szintekben. A CYP2D6 enzim aktivitást májszövet homogenizátumban határoztuk meg. Az inkubációkat és az LC-MS vizsgálatokat tirplikátumban végeztük, és az RNS meghatározáshoz is maradt még elegendő mintánk. Öszehasonlítottuk az R-568 és dextrometphorphan metabolizmust a humán máj homogenizátumokban és a két módszer között kitűnő korrelációt tapasztaltunk ($r^2=0.94$). Az átlagos CYP2D6 aktivitásokat az egyes csoportok esetében az 1.ábrán tüntettük fel. A máj biopsziás csoportban tapasztalt csökkent CYP2D6 aktivitást - úgy tűnik - a májbetegségek befolyásolják, bár nem találtunk korrelációt az érintettség súlyosságát jelző Batts & Ludwig skála és az enzimaktivitás között. A fenti csoportban tapasztalt enzim aktivitás szignifikánsan különbözött a kontroll csoportnál tapasztalttól ($p<0.005$). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a súlyos májbetegségek befolyásolják a CYP2D6 aktivitást ezekben a mintákban. Ezt követően összefüggést kerestünk a CYP2D6 mRNS másolatok száma és az *in vitro* mért enzimaktivitás között mind a négy csoport esetében.

Az mRNS másolat szám-enzim aktivitás arány állandónak bizonyult az egyes csoportokon belül, viszont a csoportok között körülbelül 10-szeres eltéréseket tapasztaltunk. A kontroll csoportban mért átlag figyelemre méltóan alacsonyabb volt a többi csoporthoz képest. A

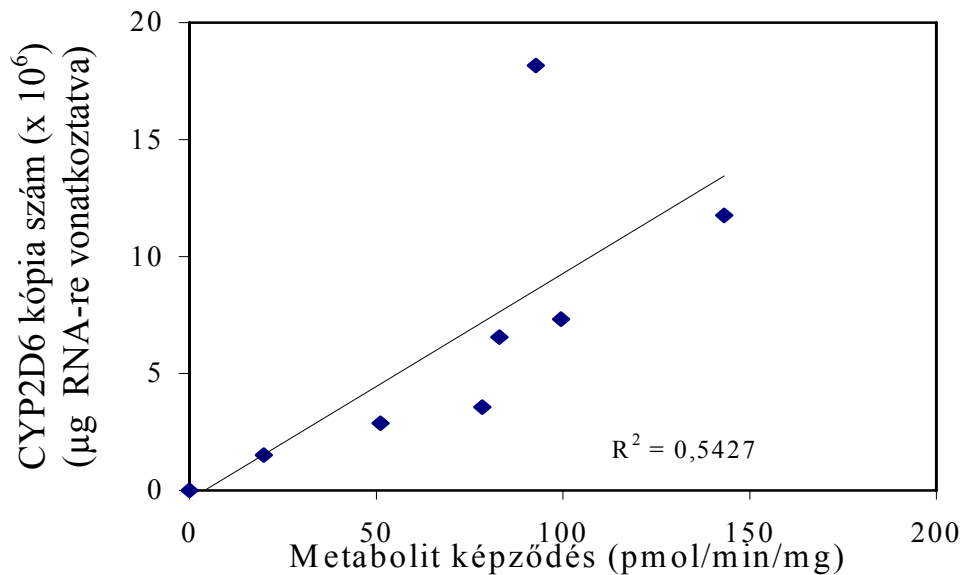
kontroll csoport adataival regresszió analízist végeztünk, kapcsolatot keresve az mRNS másolatok száma és az enzim aktivitás között. Ehhez a vizsgálathoz csak a két funkcionális alléllal rendelkezőket használtuk fel (2. ábra, $p=0.032$). Érdekes módon egyedül a kontroll csoportban találtunk megfelelő korrelációt ($r^2=0.54$). Ha az egyetlen kívül eső adatot figyelmen kívül hagyjuk, a korrelációs koefficiens $r^2=0.93$ lesz.



1. ábra. A máj homogenizátumokban mért CYP2D6 aktivitások összehasonlítása a négy vizsgálat beteg populációban genotípus szerint. Az egyes oszlophoz tartozó beteg számot feltüntettük az ábrán. * $p<0,05$, ** $p<0,005$

Az *MDR1* gén PCR analíziséhez egy kritikus régiót választottunk (8-21 exont lefedő génhossz, 43 kb), amelynek vizsgálatával a P-glikoproteint kódoló *MDR1* tényleges génhosszát kívántuk meghatározni az irodalomban fellelhető 6.3 és 209 kb közötti értékek közül. Ehhez a DNS-t májszövet mintákból, illetve egyéb, Pgp-t expresszáló sejtekből (Messa-Dox-petefészekrák, CaCo2-vastagbél rák, és UW228-primer humán

medulloblasztoma sejtek), valamint humán lymphocitákból izoláltunk. A DNS mintákat az *MDR1* gén 3 régiójának megfelelően vizsgáltuk és 3 különböző primer párt használtunk, majd a vizsgálni kívánt gén szakaszt PCR módszerrel amplifikáltuk annak érdekében, hogy megállapítsuk az *MDR1* gén tényleges hosszát.



2. ábra. CYP2D6 mRNS szintek és enzimaktivitás közötti összefüggés. Az adatok 2 funkcionális alléllal rendelkező egyedektől származnak a kontroll csoportból. A korrelációs koefficiens 0.93-ra nő, ha az egy kirívó értéket kihagyjuk

A 6.3 kb hosszúnak megfelelő *MDR1* gén produktumot nem tudtuk kimutatni. Ezzel szemben, minden máj szövet, limfocita tenyészet és sejtvonal esetében a 209 kb *MDR1* gén hosszúnak megfelelő amplikont találtunk. A PCR-ral kapott eredményeket később Southern blot analízissel vizsgáltuk a 8-21. intronok közötti terjedelemben. A sávok megfelelnek a több mint 200 kb hosszúságú gén hosszúnak. Ugyanúgy, mint a PCR esetében, nem találtunk olyan DNS produktumot, amely megfeleltethető lett volna a 6.3 kb teljes gén hosszúságnak.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk egyik célja az volt, hogy egy olyan analitikai módszert dolgozzunk ki, mely alkalmas a citokróm P450 2D6 teljes hosszúságú mRNS szint meghatározására. Számos módszert írtak le a CYP2D6 mRNS rövid szakaszainak meghatározására, beleértve a Q-RT-PCR-t, de a teljes hosszúságú transzkriptumok számszerű meghatározására ezidáig nem volt mód. Nekünk sikerült először kidolgozni olyan módszert, amely lehetővé tette a teljes hosszúságú CYP2D6 mRNS transcriptum számszerű meghatározását. Az emberi májszövetben általunk észlelt CYP2D6 RNS eredmények hasonlóak voltak az irodalmi adatokban szereplőkkel. Érdekes, hogy a rövid szakaszú CYP2D6 RNS transzkriptek ugyanazon máj esetén real-time quantitativ RT-PCR (Q-RT-PCR) módszerrel történt meghatározása három nagyságrenddel alacsonyabb értékeket mutatott. A rövid és hosszú CYP2D6 mRNS közötti eltérés további vizsgálatokat igényel. Jelentős előnye az alkalmazott módszernek, hogy a teljes hosszúságú CYP2D6 mRNS-t mutatja ki. Míg a kisebb szakaszok detektálhatóak, korábbi tanulmányoknak megfelelően a teljes hosszúságú mRNS kimutatása és kvantifikálása a funkcionális CYP2D6 enzim jobb mutatója. Megjegyzendő, hogy míg mi a teljes hosszúságú CYP2D6 mRNS kimutatására és mérésére fejlesztettük ki a módszert, ez a metodika alkalmazható más mRNS transzkriptumok kimutatására is. Fontos lehet, hogy ez a módszer nem csak a gyógyszert metabolizáló enzimek (mint a CYP) esetén alkalmazható. A továbbiakban egy új CYP2D6 szubsztrátot használva (R-568) amely magas intrinsic clearance-cel rendelkezik (és 20-szor szenzitívebb mint az eddigi dextromethorphan-t szubsztrátként használó módszer) és a fent említett RT-PCR módszer segítségével, amellyel a teljes hosszúságú mRNS kópiaszám becsülhető, meghatároztuk a sejten belüli mRNS szintet,

a genotípust és CYP2D6 aktivitását humán májszövetben négy különböző minta csoportban. A vizsgálataink során használt új szubsztrát, az R-568 segítségével lehetővé vált a CYP2D6 mRNA szám és az *in vitro* enzim aktivitás közötti összefüggések vizsgálata a különböző körülmények között gyűjtött máj szövetminták esetében. Eredményeink azt igazolják, hogy fiziológias körülmények között az R-568 szenzitív és szelektív CYP2D6 enzim szubsztrátnak bizonyult.

Ha a CYP2D6 aktivitást a négy különböző vizsgált csoportban hasonlítjuk össze, szignifikáns különbség mutatkozott a máj bank, a májtranszplantációs és a májbiopsziás csoportokban észlelt eredmények és a kontroll csoportban kapott adatok között (azon egyedek esetében, akik két funkcionális allélt hordoznak). Erre magyarázatot adhat, hogy a májbank csoportban lévő minták olyan agyhalott donoroktól származtak, akiknek a máját transzplantációra alkalmatlannak ítélték, így a májenzimeik alulszabályozott állapotban lehettek az agykárosodás, a zsírinfiltráció és a különböző beavatkozások miatt. Az átültetett máj jobb állapotban lehet mint a májbank minták, bár a zsír infiltráció kivételével a fenti különböző behatások itt is érvényesülhettek. Ha a májbetegségek jelenlétét vizsgáljuk a májbiopsziás csoportban, még a súlyosabb májérintettség esetén sem láttunk a CYP2D6 mRNA számok szintjében megnyilvánuló hatást. Ennek ellenére ezen esetekben 4-szer kisebb CYP2D6 aktivitást tapasztaltunk a kontrollhoz viszonyítva. Ez a megfigyelés megfelel a rendelkezésre álló irodalmi adatoknak. Összehasonlítva a CYP2D6 aktivitást és az mRNA transzkriptumok szintjét, azt tapasztaltuk, hogy azon májszövetekben, ahol csak egy funkcionális allél található, alacsonyabb mRNA szinttel és enzim aktivitással bírnak a két funkcionális alléllal rendelkezőkhöz képest. Az általunk vizsgált esetekben a CYP2D6 mRNA szöveti koncentrációja megegyezett a más vizsgálatokban észleltekkel. Összehasonlítva a két funkcionális alléllal rendelkezőket, csak a májtranszplantált csoportban észleltünk alacsonyabb CYP2D6 mRNA transcriptum szinteket a kontrollokéhoz képest. A CYP2D6

mRNS szint és az *in vitro* enzimaktivitás hányadosa indirekt jele a messenger RNS CYP2D6 proteinné történő átírásának, amely enzimaktivásban mutatkozik meg.

Amennyiben a CYP2D6 mRNS transzlációja megfelelően szabályozott, a két mérés aránya konstans minden minta esetében. A vizsgálataink azt mutatják, hogy az egyes csoportokon belül ez az arány relatíve állandó. Ha az aktivitás-mRNS arányát az egyes csoportok között vizsgáljuk, azt találjuk, hogy ez az arány magasabb a kontroll csoportban a többi háromhoz viszonyítva. A magasabb enzim aktivitás effektívebb CYP2D6 mRNS proteinné történő transzlációra és/vagy lassabb fehérje turnover-re utalhat. Az arány eltéréseinek hátterében többféle ok állhat. Lehetséges, hogy ezen minták a többi csoportban szereplő egyénekhez képest egészségesebbektől származnak, továbbá mentesek a mintagyűjtésből fakadó szennyeződésektől vagy behatásoktól, mint a zsírinfiltráció, májbetegség, ischaemia, és így ezekben a kontrollcsoportba tartozó májszövetekben a CYP2D6 magasabb katalitikus aktivitása illetve a fehérje csökkent lebontása figyelhető meg. A relatíve konstans aktivitás-mRNS transzkriptum arány mind az *in vivo*, mind az *in vitro* CYP2D6 funkció jellemzésére alkalmas, főként azon máj mintákban, amelyek gyűjtése során az enzim aktivitás és RNS integritás intakt marad. Megjegyzendő, hogy a fenti állítások két funkcionális allél jelenléte esetén igazak, és a mindössze egy funkcionális gén jelenléte esetén kevéssé érvényesülnek.

Munkánkban a CYP2D6 genotípus, mRNS transzkriptum és *in vitro* májenzim aktivitás közötti kapcsolatot vizsgáltuk. A teljes hosszúságú CYP2D6 transzkriptum kimutatása és kvantifikálása egy tökéletesített módszer a mRNS monitorizálására, mivel az egyéb – így real-time módszerrel kimutatható - csonka fragmentumok nem íródnak át CYP2D6 proteinné. Adataink bizonyítják, hogy a mRNS szint jól korrelál az *in vitro* enzim aktivitással olyan májmintákban, amelyek egészséges, 2 funkcionális allállal rendelkező egyénekből származnak.

Munkánk másik célja az *MDR1* gén hosszúságának meghatározása volt PCR módszerrel és Southern blot technika segítségével különböző humán szövet- és sejtkultúrák felhasználásával. Mivel a génbank adatai sokszor kis számú DNS minta adatain alapulnak, ezért különféle humán sejtvonalat, így limfocita- és májsejteket használtunk, hogy az *MDR1* gén lokuszát vizsgáljuk. Mindkét kísérlet sorozat azt igazolta, hogy az *MDR1* gén hosszabb, mint 6,3 kb, és 209 kb hosszal bír, az adatbázisok adatainak megfelelően. Eredményeink hasonlóknak bizonyultak különböző humán szövet kultúrákon, sejtvonalakon és limfocitákon, ezzel alátámasztva azt, hogy az interindividualis különbségek – ha egyáltalán léteznek az *MDR1* génhosszt illetően - minimálisak. Eredményeink segítséget nyújthatnak a gyógyszer rezisztencia háttérmechanizmusának további genetikai vizsgálataihoz. Az intron-exon struktúrális és a tényleges gén hosszúságára vonatkozó adatok hasznosak lehetnek az aberráns mRNS, „splicing” és gendelációk vizsgálatakor a gyógyszerek metabolizmusában és a „multidrug rezisztenciában” jelentős szerepet játszó P-glikoprotein esetében.

6. Összefoglalás

Kifejlesztettünk egy hatékony és reprodukálható módszert a teljes hosszúságú 1,5 kb CYP2D6 mRNS transzkriptumok kimutatására és kvantifikálására, mely bármely szövetminta és sejtkultúrán alkalmazható. A CYP2D6 aktivitás szorosabb összefüggést mutatott a teljes hosszúságú CYP2D6 mRNS koncentrációval mint a rövid szakasz mRNS meghatározással nyert eredménnyel, amelyet real-time PCR segítségével határoztunk meg. Ez a hatékony szemikvantitatív módszer hasznos lehet egyéb mRNS transzkriptumok kimutatására is.

A különböző körülmények között nyert májszöveteket, így a kontroll (májbetegséggel nem rendelkező egyének), májbiopszián átesett, máj transzplantált, és máj bankból származó máj homogenizátumok CYP2D6 aktivitását egy új szubsztrát, az R-568 segítségével vizsgáltuk,

mely 20-szor szenzitívebbnek bizonyult mint a CYP2D6 enzim aktivitás jellemzésére korábban használt dextromethorphan. Az új módszer segítségével lehetővé válik néhány milligrammnyi szövet mennyiségből is az enzim aktivitás meghatározása.

A négy csoportba sorolt májmintákat a 6 leggyakoribb genetikai variánsnak megfelelően genotipizáltuk (*3, *4, *5, *6, *7 és *8). Az allélok előfordulása az irodalmi adatokkal megegyező volt. Az eredményeink alapján a genotípus és a mRNS szint együttes meghatározása a CYP2D6 aktivitás kvantitatív becslésére biztonsággal alkalmazható egészséges májszövetminták esetén.

Humán sejtvonalakból származó DNS felhasználásával PCR és Southern blot alkalmazásával jellemeztük az *MDR1* gén szekvenciát és igazoltuk, hogy a gén nagy valószínűséggel 209 kb hosszú.

A Ph.D. ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

McConnachie L, Bodor M, Kowdley K, Levy A, Tung B, Thummel K, Phillips B, Bajpai M, Chi V, Esmay JD, Shen DD, Ho RJ. Human liver cytochrome P450 2D6 genotype, full-length messenger ribonucleic acid, and activity assessed with a novel cytochrome P450 2D6 substrate. Clin Pharmacol Ther. 2004;75:282-97.

IF: 6,825

Bodor M, McConnachie L, Phillips B, Kelly EJ, Shen DD, Ho RJ. An RT-PCR-based Strategy to Estimate Full-Length CYP2D6 mRNA Copy Number. Gen Test 2004;8:313-18.

IF: 0,972

Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. AAPS Journal 2005;2.

IF: 1,938

Bodor M, Nagy VE, Paragh G. A citokróm rendszer szerepe a kardiovaszkuláris gyógyszerek metabolizmusában. Metabolizmus 2005 (in press)

Paragh G, Bodor M. A dyslipidaemia jelentősége és terápiás megközelítése (submitted)

Összesített Impact Factors: 9,735

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS KÖNYVFEJEZETEK

Homoródi N, Páll D, Jenei Z, Polgár P, Katona É, Bodor M, Kakuk Gy: Hypertoniás fiatalok ambuláns vérnyomás méréses vizsgálata. Hypertonia és Nephrologia 1997;1:31

Bodor M, Páll D, Jenei Z, Polgár P, Katona É, Homoródi N, Kakuk Gy: Establishing the diagnosis of hypertension in youth performing screening examination and ABPM. Am J Kidney Dis 1998;3 (Abstract)

Jenei Z, Páll D, Polgár P, Karányi Zs., Katona É, Bodor M, Kakuk Gy: Dohányosok kardiovaszkuláris kockázata Debrecen városában – CARD'96 study. Cardiologia Hungarica Suppl. 1998/1:25.(Abstract)

Páll D, Homoródi N, Jenei Z, Polgár P, Katona É, Bodor M, Kakuk Gy: Konzekvensen emelkedett fiatalok ambuláns vérnyomás méréses (ABPM) vizsgálata. Cardiologia Hungarica Suppl. 1998/1:25. (Abstract)

Bodor M. Az alcohol és dohányzás, mint a vesebetegségek kockázati tényezői. In: Kakuk Gy, Kárpáti I, eds. Nephrologia 1998, Debrecen, Hungary, I. Belgyógyászati klinika; 1998:151-154.

Bodor M. Akut veseelégtelenség kialakulása az Intenzív Osztályon. In: Kárpáti I, Kakuk Gy, eds. Nephrologia 1999, Debrecen, Hungary, I. Belgyógyászati klinika; 1999:183-188.

Jenei Z, Páll D, Katona É, Polgár P, Karányi Zs, Bodor M, Kakuk Gy: Prevalence of cardiovascular risk factors of the smokers and non-smokers in the city of Debrecen, Hungary. *Public Health* 2000;114:295-299.

Jenei Z, Páll D, Katona É, Polgár P, Karányi Zs, Bodor M, Kakuk Gy. Cardiovascular risk factors of smokers and non-smokers in the city of Debrecen, Hungary. *Hun Arch Int Med* 2000;53:29-34.

Bodor M. Non-steriod gyulladáscsökkentők és analgetikumok okozta akut interstitialis nephritis. In: Kárpáti I, Kakuk Gy, eds. *Nephrologia* 2000, Debrecen, I. Belgyógyászati klinika; 2000:221-226.

Bodor M. A kardiovaszkuláris rendszer és a vese. In: Kakuk Gy., Mátyus J., Kárpáti I., eds. *Nephrologia, Medicina*, Budapest, 2004.

Bodor M, McConnachie L, Levy A, Tung B, Thummel K, Ho RJ. Human liver cytochrome P450 2D6 genotype, mRNA, and activity assessed with a novel cytochrome P450 2D6 substrate. Seventh International ISSX Meeting, Vancouver, Canada, 2004 (Poster).

Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. AAPS Annual Meeting, Baltimore, MD, USA (Poster), 2004.

Bodor M, McConnachie L, Phillips B, Bajpai Shen DD, Nagy VE, Paragh G, Ho RJ. Human liver cytochrome 450 2D6 genotype, full-length messenger ribonucleic acid, and activity assessed with a novel cytochrome 450 2D6 substrate. 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Tokyo, Japan, May 8-11, 2005 (Poster).