

Celem projektu jest ocena wpływu aktywności transporterów ksenobiotyków na efektywność terapii fotodynamicznej (PDT) opartej o wykorzystanie pochodnych chlorofilu jako fotosensybilizatorów. Cel ten realizowany będzie poprzez wielopoziomowe określenie zależności pomiędzy strukturą fotosensybilizatorów, ich rozpoznawaniem przez białka transportowe (BCRP, glikoproteina P, MRP1) oraz siłą efektu fotodynamicznego. Oddziaływania fotosensybilizator-transporter i zależności struktura-aktywność analizowane będą *in vitro* w liniach komórkowych oraz w układzie modelowym, obejmującym izolowany transporter BCRP rekonstruowany w liposomach. Modelowymi substratami będą pochodne chlorofili, specyficznym modyfikowane pod kątem oddziaływań z systemem transportu ksenobiotyków (STK). Realizacja projektu przyczyni się do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów obronnych komórek na stres wywołany obecnością fotocytotoksycznych ksenobiotyków lub metabolitów, w szczególności zaś określenia roli transporterów ksenobiotyków jako czynnika limitującego efektywność terapii fotodynamicznej i innych rodzajów terapii. Przyjęta hipoteza badawcza, że STK jest czynnikiem limitującym efektywność PDT opartej o pochodne chlorofili, wynika z wcześniejszych badań prowadzonych w naszym zespole.

Projekt zakłada porównanie specyficzności substratowej transporterów ksenobiotyków wobec pochodnych chlorofili na różnych poziomach – wnikania fotosensybilizatorów do komórek, ich oddziaływania z transporterem rekonstruowanym w liposomach, oraz efektu fotodynamicznego indukowanego w komórkach. Modelowe substraty otrzymane zostaną na drodze modyfikacji chlorofili, będących związkami o korzystnych z punktu widzenia terapii fotodynamicznej właściwościach. Modyfikacje ukierunkowane będą na zmianę oddziaływań z STK oraz na zwiększenie biodostępności pochodnych. Eksperymenty *in vitro* przeprowadzone zostaną z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych MCF-7 (rak piersi), LoVo (gruczolakorak okrężnicy) oraz MSU1.1 (fibroblasty ludzkie unieśmiertelnione onkogenem *v-myc*). Ekspresja transporterów w komórkach oznaczona zostanie metodami opracowanymi w trakcie badań wstępnych. Analizowana będzie akumulacja fotosensybilizatorów w komórkach przy różnych stężeniach substratów i czasach inkubacji, w obecności i przy braku inhibitorów białek transportujących. Ocena akumulacji barwników wykonana zostanie metodą pomiaru emisji fluorescencji bezpośrednio z warstwy komórek oraz z ich ekstraktów. Specyficzność oddziaływań z komórkami określona będzie metodą cytometrii przepływowej dla komórek oderwanych od podłoża hodowlanego. Efekt fotodynamiczny indukowany będzie poprzez naświetlanie hodowli komórkowych. Frakcja przeżywiająca naświetlanie poddana zostanie cyklowi naświetlań połączonemu z izolacją kolejnych frakcji opornych i oznaczeniami poziomu transporterów na każdym etapie. Równoległe, oddziaływanie pochodnych chlorofili z transporterem BCRP badane będzie w układzie modelowym opartym białko BCRP produkowane w drożdżach *S. cerevisiae*. Z drożdży wyizolowana zostanie frakcja błon komórkowych, które następnie poddane zostaną solubilizacji w łagodnym detergencie. Solubilizowane białko zostanie oczyszczone, a następnie poddane rekonstrukcji w liposomach. Zdolność rekonstruowanego transportera do hydrolizy ATP (aktywność ATPazowa) zostanie oznaczona w obecności fotosensybilizatorów o różnej budowie chemicznej oraz inhibitorów BCRP. Manipulacja składem lipidowym układu rekonstrukcyjnego pozwoli określić wpływ lipidów na aktywność transportera. Porównanie specyficzności substratowej na poziomie wnikania fotosensybilizatorów do komórek, ich oddziaływania z rekonstruowanym transporterem oraz wpływu na siłę efektu fotodynamicznego pozwoli na potwierdzenie roli STK w terapii fotodynamicznej.

Transportery ksenobiotyków należą do głównych elementów ochrony organizmów ssaków przed toksynami. Ich aktywność jest jednocześnie przyczyną niekorzystnego zjawiska oporności wielolekowej u ludzi, natomiast aktywność podobnych transporterów u mikroorganizmów związana jest z ich opornością na antybiotyki i środki przeciwgrzybowe. Bardzo istotne jest więc poznanie mechanizmów działania tych białek. Wyniki planowanych eksperymentów pozwolą na lepsze zrozumienie mechanizmów funkcjonowania transporterów z rodziny ABC, pełniących fundamentalną rolę w przyrodzie oraz wpływających na efektywność terapii farmakologicznych, w tym terapii fotodynamicznej.