

---

PhD THESIS SUMMARY

# Study of Transmembrane Transporters Involved in Chemotherapy Resistance

---

PhD Candidate: **Elisabeta Elena Comşa**

---

PhD Supervisors: **Prof.Dr. Felicia Loghin**

**Dr. Pierre Falson**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	7
<b>STATE OF ART</b>	9
<b>1. ABC Transporters</b>	11
1.1. Drug Transport across Membranes and Cellular Barriers	11
1.2. ABC Transport Proteins	12
1.3. ABCC2 Protein	13
1.3.1. Distribution	13
1.3.2. Topology	13
1.3.3. Transport Mechanism	14
1.3.4. Clinical Relevance	15
1.3.4.1. Substrates	15
1.3.4.2. Anticancer drugs and other therapeutics as ABCC2 substrates	16
1.3.5. ABCC2 Modulators	17
1.3.5.1. Modulators from natural sources	18
<b>2. Cisplatin Resistance</b>	30
2.1. Cisplatin as an Anticancer Drug	30
2.2. Cisplatin Resistance Mechanisms	31
<b>ORIGINAL CONTRIBUTION</b>	33
<b>1. Hypothesis / Objectives</b>	35
<b>2. 1<sup>st</sup> Study: High-throughput Flow-cytometry Optimization for the Screening of ABCC2 Inhibitors</b>	36
2.1. Introduction	36
2.2. Materials & Methods	37
2.2.1. Reagents	37
2.2.2. Biological Evaluation	38
2.2.2.1. Cell lines	38
2.2.2.2. Cell culture	38
2.2.3. ABC Transporters Protein Expression – Western Blot	38
2.2.4. Flow cytometry for the evaluation of ABCC2-mediated transport	38
2.2.4.1. High-throughput screening in flow cytometry for ABCC2 inhibitors identification	39
2.2.5. Kinetic Analysis	39
2.2.5.1. Regression analyses	40
2.2.6. Statistical Analysis	41
2.3. Results and Discussion	42
2.3.1. ABC Transporters Protein Expression in MDCKII cells	42
2.3.2. Choosing the Right Substrate for ABCC2 Transport Evaluation in MDCKII WT and ABCC2 cells	43

2.3.3. ABCC2-mediated Calcein Transport Mechanism in MDCKII Wt and ABCC2 cells	49
2.3.4. High-throughput Flow Cytometry Method for the Evaluation of ABCC2-mediated transport	51
2.4. Conclusions	56
<b>3. 2<sup>nd</sup> Study: Indolaurones as Original Scaffolds of Efficient ABCC2 Inhibitors</b>	<b>57</b>
3.1. Introduction	57
3.2. Material & methods	57
3.2.1. Chemistry	57
3.2.2. Biology	64
3.2.2.1. Reagents	64
3.2.2.2. Cell lines	64
3.2.2.3. Cell culture	64
3.2.3. ABCC2-mediated Calcein Transport	65
3.2.3.1. High-throughput flow cytometry analysis for ABCC2 inhibitors screening	65
3.2.3.2. Selectivity of inhibitor candidates towards ABCB1 and ABCC1	65
3.2.4. Cytotoxicity	66
3.2.5. Statistical Analysis	66
3.3. Results and Discussion	66
3.3.1. Chemistry	66
3.3.1.1. Indolaurones synthesis	66
3.3.2. Biological Evaluation	67
3.3.2.1. ABCC2-mediated Calcein Efflux Inhibition	67
3.3.2.2. Experimental Libraries Screen	68
3.3.2.3. Inhibition Efficacy of Indolaurone Derivatives	71
3.3.2.4. Selectivity of the ABCC2 Inhibitors	74
3.3.2.4.1. Selectivity of indolaurones towards ABCB1 and ABCC1	74
3.3.2.4.2. Exploring the effects of powerful ABCC1 inhibitors responsible for collateral sensitivity as potential ABCC2 inhibitor candidates	75
3.3.2.5. Innocuity of ABCC2 Inhibitors on Cell Survival	78
3.4. Conclusions	80
<b>4. 3<sup>rd</sup> Study: New ABCC2 Inhibitors Question the Implication of the Pump in Ovarian Cancer Cisplatin Resistance</b>	<b>81</b>
4.1. Introduction	81
4.2. Material & Methods	85
4.2.1. Reagents	85
4.2.2. Biological Evaluation	85
4.2.2.1. Cell lines	85
4.2.2.2. Cell culture	86
4.2.3. High-throughput flow cytometry analysis for ABCC2 inhibitors screening	86
4.2.4. Evaluation of Cisplatin Uptake in Single Cells by Mass Cytometry	86

4.2.4.1. Cisplatin Uptake	86
4.2.4.2. Further explorations and new approaches to fight cancer resistance by using ruthenium derivatives	86
4.2.5. Effect of compounds on cisplatin accumulation	87
4.2.6. Cytotoxicity and Chemosensitization	88
4.2.7. Statistical Analysis	88
4.3. Results and Discussion	88
4.3.1. Platinum uptake	88
4.3.2. Effect of the compounds on platinum accumulation	92
4.3.3. Is there a correlation with ABCC2 inhibition efficiency?	93
4.3.4. Reversal of cisplatin resistance and cytotoxicity	95
4.3.5. New ruthenium derivatives as promising anticancer drug candidates unaffected by resistance	98
4.4. Conclusions	106
<b>5. General Conclusions</b>	109
<b>6. Originality and Innovative Aspects of This Thesis</b>	112
<b>REFERENCES</b>	115

## KEYWORDS

ABC (ATP-binding cassette) transporters, multidrug resistance (MDR), MRP (multidrug resistance proteins), MRP2, ABCC2, MRP1, ABCC1, P-gp (P-glycoprotein), ABCB1, modulators, inhibitors, natural compounds, indolaurones, flow cytometry, mass cytometry, cell culture, enzymology, transport mechanism, cisplatin, cisplatin resistance, ovarian cancer, cisplatin resistant ovarian cancer

## INTRODUCTION

ATP Binding Cassette subfamily C member 2 (ABCC2) is an ABC transporter, expressed in the membrane of important metabolic organs and suspected to have an implication in multidrug resistance. It is an intrinsic membrane protein and is essential in the regulation and control of many biochemical functions. Endogenous and exogenous compounds can modulate its function. The main aim of this thesis was to identify novel modulators of ABCC2, to characterize their mechanism of action, and to evaluate the implication of ABCC2 in cisplatin-resistant ovarian cancer. To reach these goals, we used high-throughput screening methods, chemoinformatics, and cytometry approaches (including mass cytometry).

# PERSONAL CONTRIBUTION

## 1. 1<sup>st</sup> Study: High-throughput flow-cytometry optimization for the screening of ABCC2 inhibitors

### 1.1. Introduction

Recent research show that ABCC2 is one of the ABC proteins with the highest expression in organs important for endo- and xenobiotics metabolism, such as in the liver, kidneys, intestine. Finding a specific ABCC2 inhibitor opens the possibility to assess the actual role of ABCC2 in drug resistance and its role in drug pharmacokinetics at different barrier levels in the organism. For example, up-regulation of ABCC2 is present in many cisplatin resistant cell lines and tumour tissues. An inhibitor with high specificity for ABCC2 could help elucidate what is the link between ABCC2 overexpression and cisplatin resistance. Furthermore, given the high expression of ABCC2 in liver, intestine and kidney, and its importance in drug trafficking across membranes, these inhibitors would allow to build reliable *in vitro* experiments to predict the pharmacokinetics of different drugs in the organism.

There are several different experimental approaches available for the identification of ABCC2 substrates and inhibitors: transport analysis of compounds into bile of normal rats, but not of ABCC2(-) mutant rats; uptake differences of compounds into inside-out bile canaliculi membrane vesicles isolated from normal and ABCC2(-) mutant rats; transfection or transduction of human ABCC2 cDNA into cell lines followed by analysis of drug resistance; accumulation of compounds into cells or isolated inside-out membrane vesicles, and transepithelial transport of compounds.

So far, no single-cell measurement method is available for the evaluation of ABCC2-mediated transport. In this chapter, we show the optimization of a cell-based method adapted for the high-throughput screening of ABCC2 inhibitors using flow-cytometry. We used this technique to rapidly identify the first series of efficient ABCC2 inhibitors.

### 1.2. Materials and Methods

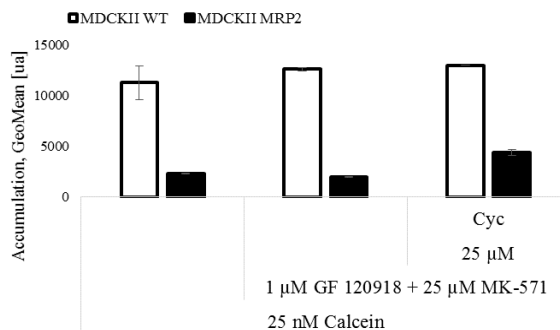
For this study, we used a cell-based transport evaluation assay using MDCKII Wt and MDCKII ABCC2-transfected cell lines. Using a Western Blot, we confirmed that ABCC2 is expressed in the transfected cell lines and we proceeded to the optimization of the assay for flow-cytometry. After finding the perfect conditions for ABCC2 transport evaluation, we set up a high-throughput screening protocol using a flow-cytometer equipped with a microplate reader and an autosampler.

### 1.3. Results and discussion

Our goal was to set-up a model for *in vitro* evaluation of ABCC2 transport and inhibition using mammalian cells. So far, flow cytometry was successfully used to research the activity of other ABC transporters such as ABCB1, ABCC1 and ABCG2. Using these examples, we decided to investigate the potential of the technique for the study of ABCC2.

We used MDCKII cells transfected with ABCC2 and started by looking for a suitable fluorescent substrate. We concluded that calcein-AM suits our criteria for the use in flow-cytometry, so we chose it for further tests. Further, we tested for efficient ABCC2 inhibitors. Our protein expression assays showed that the cell lines used also express other ABC transporters, so we first had to find a solution to fully inhibit these transporters. In our experiments, this could be done with previously known specific inhibitors. We also observed that the only efficient ABCC2 inhibitor that

could be used as a standard reference was cyclosporine and we could observe the highest inhibition efficacy at 25  $\mu\text{M}$  (fig. 1).



**Fig.1. Calcein accumulation in MDCKII WT (white columns) and ABCC2 cells (black columns):** first two columns are control (25 nMcalcein only); second set of columns is calcein accumulation in the presence of 1  $\mu\text{M}$  GF 120918 (1  $\mu\text{M}$ ) and MK-571 (25  $\mu\text{M}$ ); last set of columns is calcein accumulation in the presence of GF 120918 (1  $\mu\text{M}$ ), MK-571 (25  $\mu\text{M}$ ) and 25  $\mu\text{M}$  cyclosporine A (25  $\mu\text{M}$ ).

Using a cocktail of inhibitors for each of the present ABC transporters and calceinAM as a substrate we could show that flow cytometry can be successfully used to screen for ABCC2 inhibitors. Furthermore, we also showed that it can be optimized for high-throughput screening using a flow-cytometer equipped with plate reader. This way, we could screen up to 40 potential inhibitors per hour.

## 2. 2<sup>nd</sup> Study: Indolaurones as Original Scaffolds of Efficient ABCC2 Inhibitors

### 2.1. Introduction

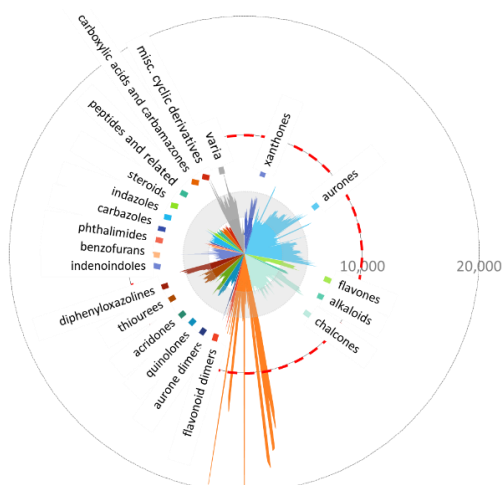
The high ABCC2 expression suggests that it plays a major role in drug pharmacokinetics and pharmacodynamics and it is essential to understand its function. This could be achieved by using efficient inhibitors as recommended by FDA and EMA. Unfortunately, the quest for ABCC2 inhibitors did not deliver results as readily as for ABCB1, making that there are only few ABCC2 modulators, poorly efficient and non-specific. Indeed, so far, the most efficient ABCC2 inhibitor is cyclosporine A with an  $\text{IC}_{50}$  of 20  $\mu\text{M}$ , a much more efficient ABCB1 and ABCC1 inhibitor. It is therefore mandatory to explore new ways to get much better compounds and improve their efficiency and specificity.

### 2.2. Materials and Methods

For this study, we used the cell-based transport evaluation assay using MDCKII Wt and MDCKII ABCC2 in flow cytometry described previously. We organized a large chemolibrary of more than 500 compounds coming from more than 20 different structural chemical families. We launched a fast high-throughput screening campaign in order to identify new ABCC2 inhibitors.

### 2.3. Results and discussion

Our strategy in the conception of our chemolibraries of potential ABCC2 inhibitors had the goal of having a large chemodiversity, while still targeted towards ABC proteins. With the help of our collaborators, we grouped a valuable collection of more than 500 compounds and did an initial screening campaign to identify ABCC2 inhibitors (fig. 2).



**Fig.2. ABCC2 inhibitors screening.** Calcein accumulation in MDCKII-ABCC2 cells incubated with 5  $\mu\text{M}$  of compounds belonging to different chemical families and compared to the reference inhibitor, cyclosporine A added at 25  $\mu\text{M}$  (red dotted circle). The average basal ABCC2 accumulation is indicated by the light grey circle.

Surprisingly, ABCC2 proved to have a narrow specificity for inhibitors and only indolaurones were found to be efficient ABCC2 inhibitors, that we further characterized in our study. This is the first series of structurally related molecules that act as ABCC2 inhibitors in the micromolar range. Further QSAR studies will lead to improved inhibitors in terms of specificity and efficiency.

### 3. 3<sup>rd</sup>Study: New ABCC2 inhibitors question the implication of the pump in ovarian cancer cisplatin resistance

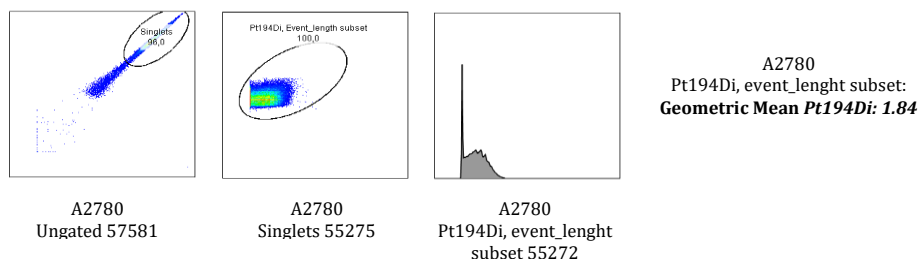
#### 3.1. Introduction

Cancer is one of the main causes of mortality in developed countries and medicine currently has three main approaches to fight it: surgical resection, radiotherapy and chemotherapy. Chemotherapy is the only option to eliminate metastasis cells or certain types of cancer such as leukemia and lymphomas. Certain cells can present either intrinsic resistance, or acquired resistance to multiple drugs during chemotherapy. Multidrug resistance is characterized by a decrease of the sensibility of cancer cells not only to the already used chemotherapy drugs, but also to a range of structurally unrelated cytotoxic drugs to which they were never exposed. Cisplatin (CDDP) is a platinum-based chemotherapy drug used to treat various types of aggressive cancers, such as sarcomas, carcinomas like small cell lung cancer and ovarian cancer. Unfortunately, despite an initial reduction in size, tumours frequently return to a highly resistant form.

The last two decades of research revealed that ABCB1 is the main, but not the only, human ABC transporter that confers resistance to clinically important cancer treatment agents. ABCC2 induces resistance in cultured cancer cells to methotrexate, paclitaxel, docetaxel, epipodophyllotoxins, vincristine, vinblastine, doxorubicin, but also to glutathione-derived alkylating agents and it has a specific role in cisplatin resistance of ovarian, hepatocarcinoma and oesophageal cancers.

### 3.2. Materials and Methods

Our cells of choice for this study were cisplatin resistant ovarian cancer cells, A2780 and A2780cis. We verified ABCC2 expression to confirm overexpression of ABCC2 in the resistant cell line. Using mass cytometry, we set up a method to determine intracellular platinum uptake and transport in cells (fig. 3) and tested the effect of previously identified ABCC2 inhibitors and their impact on cisplatin accumulation.



**Fig.3. Analysis of cell populations for platinum uptake in ovarian cancer cells A2780 and A2780cis, sensitive and resistant to cisplatin in mass cytometry, in FlowJo**

### 3.3. Results and discussion

In this study, we build up an original experimental approach to exploring the relationship between ABCC2 and cisplatin resistance in ovarian cancer cells. We showed, for the first time, the potential of mass cytometry as a tool for clinical investigation of platinum accumulation in cancer cells and showed a direct correlation between accumulation and resistance in human ovarian cancer.

By testing previously identified ABCC2 inhibitors as potential modulators of cisplatin resistance, we learned that cisplatin resistance is, indeed, at the crossroads of complex pathways and only inhibiting one resistance protein is not enough to reverse resistance.

## GENERAL CONCLUSIONS

The emergence of MDR phenotype in cancer cells is often correlated with an overexpression of membrane proteins from the ABC superfamily. ABCC2 is an ABC transporter involved in the export of glutathione, glucuronate or sulfate conjugated-end biotics and xenobiotics and it recognizes and transports many antineoplastic agents. Little is known about this physiologically relevant transporter due to a lack of study systems and it is suspected that it has a greater impact on the pharmacokinetics of drugs than previously assessed.

We set up new experimental strategies that include a flow cytometry high-throughput screening method for ABCC2 inhibitors and a mass cytometry technique for the evaluation of cisplatin accumulation in cancer tumours at single-cell level. We organized a large chemolibrary of compounds resembling more than 500 compounds, from more than 20 different structural families and identified the first series of efficient ABCC2 inhibitors.

We investigated the role of ABCC2 in cisplatin-resistant ovarian cancer and set up an original method for cisplatin accumulation monitoring in cancer cells using a state-of-art technology, mass cytometry. We evaluated the effect of ABCC2 inhibitors on cisplatin accumulation in ovarian cancer cells and attempted to distinguish a pattern of modulation.



## SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

1. Baiceanu E, Crisan G, Loghin F, Falson P. Modulators of the human ABCC2: hope from natural sources? *Future Medicinal Chemistry*. 2015;7(15):2041-63
2. Baiceanu E, Nguyen KA, Gonzalez-Lobato L, Nasr R, Baubichon-Cortay H, Loghin F, et al. 2-Indolylmethylenbenzofuranones as first effective inhibitors of ABCC2. *European journal of medicinal chemistry*. 2016;122:408-18.
3. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(3):215-36.
4. Szakacs G, Hall MD, Gottesman MM, Boumendjel A, Kachadourian R, Day BJ, et al. Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance. *Chemical reviews*. 2014.
5. Gottesman MM, Lavi O, Hall MD, Gillet JP. Towards a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Studiul transportorilor transmembranari implicați în rezistența la chimioterapice

---

Student doctorant: **Elisabeta Elena Comşa**

---

Conducător doctorat: **Prof.Dr. Felicia Loghin**

**Dr. Pierre Falson**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	7
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	9
<b>1. Transportorii ABC</b>	11
1.1. Transportul medicamentelor prin membrane și bariere celulare	11
1.2. Proteine de transport ABC	12
1.3. Proteina ABCC2	13
1.3.1. Distribuție	13
1.3.2. Topologie	13
1.3.3. Mecanism de transport	14
1.3.4. Relevanța clinică	15
1.3.4.1. <i>Substraturi</i>	15
1.3.4.2. <i>Medicamente antitumorale și alte substanțe terapeutice ca substraturi ale ABCC2</i>	16
1.3.5. Modulatori ABCC2	17
1.3.5.1. <i>Modulatori din surse naturale</i>	18
<b>2. Rezistența la cisplatina</b>	30
2.1. Cisplatina ca medicament antitumoral	30
2.2. Mecanisme ale rezistenței la cisplatina	31
<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	33
<b>1. Ipoteza / Obiective</b>	35
<b>2. Studiul I: Optimizarea unei metode rapide de citometrie în flux pentru identificarea inhibitorilor ABCC2</b>	36
2.1. Introducere	36
2.2. Materiale & Metode	37
2.2.1. Reactivi	37
2.2.2. Evaluarea biologică	38
2.2.2.1. <i>Linii celulare</i>	38
2.2.2.2. <i>Culturi celulare</i>	38
2.2.3. Expresia proteinelor transportoare ABC – Western Blot	38
2.2.4. Citometria în flux pentru evaluarea transportului mediat de ABCC2	38
2.2.4.1. <i>Metoda rapidă de screening prin citometrie în flux pentru identificarea inhibitorilor ABCC2</i>	39

2.2.5. Analiza cinetică	39
2.2.5.1. Analiza regresiiilor	40
2.2.6. Analiza statistică	41
2.3. Rezultate și discuții	42
2.3.1. Expresia proteică a transportorilor ABC în celulele MDCKII	42
2.3.2. Alegerea substratului potrivit pentru evaluarea transportului ABCC2 în celulele MDCKII WT și ABCC2	43
2.3.3. Transportul calceinei mediat de ABCC2 în celulele MDCKII Wt și ABCC2	49
2.3.4. Metoda de citometrie în flux pentru evaluarea rapidă a transportului mediat de ABCC2	51
2.4. Concluzii	56
<b>3. Studiul II: Indolauronele - structuri originale pentru inhibitori ABCC2 eficienți</b>	57
3.1. Introducere	57
3.2. Materiale & metode	57
3.2.1. Chimie	57
3.2.2. Biologie	64
3.2.2.1. Reactivi	64
3.2.2.2. Linii celulare	64
3.2.2.3. Culturi celulare	64
3.2.3. Transportul calceinei mediat de ABCC2	65
3.2.3.1. Analiza prin citometrie în flux rapidă pentru screeningul inhibitorilor ABCC2	65
3.2.3.2. Afinitatea inhibitorilor selecționați pentru ABCB1 și ABCC1	65
3.2.4. Citotoxicitate	66
3.2.5. Analiza statistică	66
3.3. Rezultate și discuții	66
3.3.1. Chimie	66
3.3.1.1. Sinteza indolauronelor	66
3.3.2. Evaluarea biologică	67
3.3.2.1. Inhibarea efluxului calceinei via ABCC2	67
3.3.2.2. Screeningul experimental al bibliotecilor de substanțe chimice	68
3.3.2.3. Eficacitatea inhibitoare a derivaților de indolaurone	71
3.3.2.4. Selectivitatea inhibitorilor ABCC2	74
3.3.2.4.1. Afinitatea indolauronelor pentru ABCB1 și ABCC1	74
3.3.2.4.2. Explorarea efectelor unor inhibitori ABCC1 puternici responsabili de sensibilitatea colaterală ca potențiali candidați inhibitori ai ABCC2	75
3.3.2.5. Innocuitatea inhibitorilor ABCC2 față de celule	78
3.4. Concluzii	80
<b>4. Studiul III: Noii inhibitori ABCC2 pun sub semnul întrebării implicarea proteinei în rezistența la cisplatină în cancerul ovarian</b>	81
4.1. Introducere	81

4.2. Materiale & metode	85
4.2.1. Reactivi	85
4.2.2. Evaluarea biologică	85
4.2.2.1. Linii celulare	85
4.2.2.2. Culturi celulare	86
4.2.3. Analiza rapidă prin citometrie în flux a inhibitorilor ABCC2	86
4.2.4. Evaluarea acumulării cisplatinei la nivel celular utilizând citometria de masa	86
4.2.4.1. Acumularea intracelulară a cisplatinei	86
4.2.4.2. Noi abordări pentru a combate rezistența la chimioterapie cu ajutorul derivaților de ruteniu	86
4.2.5. Efectul compușilor asupra acumulării cisplatinei	87
4.2.6. Citotoxicitatea și chemosensibilizarea	88
4.2.7. Analiza statistică	88
4.3. Rezulte și discuții	88
4.3.1. Acumularea platinei	88
4.3.2. Efectul compușilor asupra acumulării intracelulare a platinei	92
4.3.3. Există corelație între inhibiția ABCC2 și acumularea cisplatinei în celule?	93
4.3.4. Reversia rezistenței la cisplatină și citotoxicitatea	95
4.3.5. Noi derivați de ruteniu ca și candidați antitumorali promițători, neafecțați de rezistență	98
4.4. Concluzii	106
<b>5. Concluzii generale</b>	109
<b>6. Originalitatea și aspectele inovatoare ale tezei</b>	112
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	115

## CUVINTE CHEIE

Transportori ABC, rezistența la medicamente (MDR), MRP (proteine de rezistență la medicamente), MRP2, ABCC2, MRP1, ABCC1, P-gp (P-glicoproteina), ABCB1, modulatori, inhibitori, compuși naturali, indolaurone, citometrie în flux, citometrie de masa, cultură celulară, enzimologie, mecanism de transport, cisplatină, rezistența la cisplatină, , cancer ovarian rezistent la cisplatină

## INTRODUCERE

ABCC2 este al 2 lea membru al subfamiliei C a transportorilor ABC, exprimat în membranele celulare ale organelor importante din punct de vedere metabolic, cu un rol suspectat în multi-rezistența la medicamente. Este o proteina membranară intrinsecă, esențială pentru reglarea și controlul a numeroase funcții biochimice. Compuși endogeni și exogeni îi pot modula funcția. Principalul scop al acestei teze de doctorat a fost identificarea de noi inhibitori ai ABCC2, caracterizarea lor, și evaluarea implicării ABCC2 în rezistența la cisplatină în cazul cancerului ovarian. Pentru a atinge aceste obiective, am folosit metode de studiu de biochimie, biologie celulară, teste de screening rapid, metode de bioinformatică, tehnici de citometrie (inclusiv de masă).

ABCC2 a fost considerat multă vreme un factor cheie în rezistența la cisplatină, fie ca un marker predictiv al instalării rezistenței, fie ca posibilă țintă pentru reversia rezistenței și resensibilizare la chimioterapie. Am studiat implicarea ABCC2 în rezistența la cisplatină în cazul cancerului ovarian prin utilizarea primei serii de inhibitori ABCC2 pe care i-am descoperit și evaluarea impactului acestora asupra acumulării cisplatinei în celule umane de cancer ovarian. Pentru aceste cercetări, am pus la punct o metodă originală de cuantificare a platinei la nivel celular, utilizând o tehnică modernă de citometrie de masă.

Cercetările prezentate în această teză au permis găsirea răspunsului pentru anume întrebări critice legate de funcționarea ABCC2. Am descoperit o primă serie de inhibitori ABCC2 eficienți în concentrații micromolare și am explorat rolul pompei în cancerul ovarian pe linii celulare de cancer uman. Ca și rezultat colateral, am arătat potențialul tehnicilor de citometrie și aplicabilitatea acestora în studiul proteinei ABCC2.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### 1. Studiul I: Optimizarea unei metode rapide de citometrie în flux pentru screening-ul inhibitorilor ABCC2

#### 1.1. Introducere

Cercetări recente arată că ABCC2 este una dintre proteinele ABC cele mai abundente în organe importante pentru metabolismul substanțelor endo- și xenobiotice, precum ficatul, rinichii, intestinul. Găsirea unui inhibitor ABCC2 specific ar deschide posibilitatea evaluării impactului ABCC2 în rezistența la medicamente și a rolului său în farmacocinetica medicamentelor la nivelul diferitelor bariere ale organismului. De exemplu, ABCC2 este supraexprimat în anumite linii celulare rezistente la cisplatină și în țesuturi tumorale. Un inhibitor cu o specificitate crescută ar putea ajuta la elucidarea legăturii între supraexpresia ABCC2 și rezistența la cisplatină. De asemenea, ținând cont de abundența proteinei la nivelul ficatului, intestinului și rinichilor, precum și de importanța sa în transportul transmembranar, acești inhibitori ar putea permite construirea unor modele experimentale *in vitro* care să poată prevedea farmacocinetica medicamentelor în organism.

Până acum nu a fost disponibilă nici o metodă de evaluare a transportului mediat de ABCC2 la nivelul unei celule unice. În acest studiu, prezentăm optimizarea unei metode experimentale bazate pe citometrie în flux pentru screening-ul rapid al inhibitorilor ABCC2 și monitorizarea transportului mediat de proteină.

#### 1.2. Materiale și metode

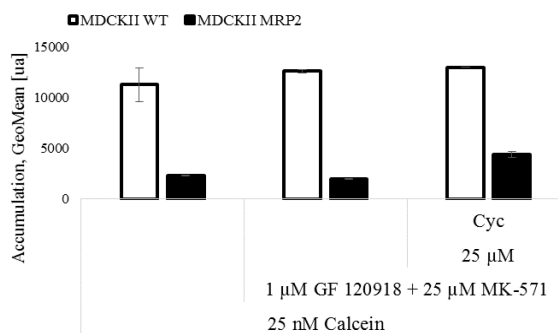
Pentru acest studiu am folosit un test de transport la nivel celular folosind liniile celulare MDCKII Wt și MDCKII transfectate cu ABCC2. Cu ajutorul tehnicii Western Blot, am confirmat expresia proteică a ABCC2 în celulele transfectate și am continuat optimizarea metodei pentru citometrie în flux. După găsirea substratului potrivit, am adaptat tehnica pentru screeningul rapid al candidaților inhibitori ABCC2 folosind un citometru în flux echipat cu un cititor de plăci și autosampler.

#### 1.3. Rezultate și discuții

Scopul nostru a fost să stabilim condițiile pentru evaluarea transportului mediat de ABCC2 *in vitro*, folosind celule de mamifere. Până acum, citometria în flux a fost folosită cu succes pentru

cercetarea activității altor transportori ABC, precum ABCB1, ABCC1 și ABCG2. Folosind aceste modele, am decis să investigăm potențialul acestei tehnici pentru studiul ABCC2.

Am folosit celulele MDCKII transfectate cu ABCC2 și am început prin a căuta un substrat fluorescent potrivit. Am concluzionat că, calceina-AM corespunde criteriilor noastre pentru folosirea în citometrie în flux. Mai departe, am căutat inhibitori ABCC2 eficienți ca reper de inhibiție. Testele noastre de expresie proteică ne-au aratat că liniile celulare folosite exprimă și alți transportori ABC, așa încât una dintre priorități a fost găsirea unei soluții pentru a inhiba complet activitatea celorlalți transportori. În cazul nostru experimental, am reușit să realizăm acest lucru folosind inhibitori deja descriși în literatură. Am observat, în schimb, că singurul inhibitor ABCC2 eficient pe care îl putem utiliza ca referință este ciclosporina A, cu o eficacitate maximă când este folosită la o concentrație de 25  $\mu\text{M}$  (fig. 1).



**Fig.1. Acumularea calceinei în celulele MDCKII WT (coloanele albe) și ABCC2 (coloanele negre):** primele două colone sunt control (doar 25 nM calceina); al 2-lea set de coloane reprezintă acumularea calceinei în prezența a 1  $\mu\text{M}$  GF 120918 și 25  $\mu\text{M}$  MK-571; ultimul set de coloane reprezintă acumularea calceinei în prezența GF 120918 (1  $\mu\text{M}$ ), MK-571 (25  $\mu\text{M}$ ) și 25  $\mu\text{M}$  de ciclosporină A.

Folosind un cocktail de inhibitori pentru fiecare dintre transportorii ABC identificați și calceina AM ca și substrat, am putut utiliza citometria în flux pentru screeningul inhibitorilor ABCC2. Mai mult, am arătat că poate fi adaptată pentru screening rapid folosind un citometru echipat cu lector de microplăci. În acest fel, am putut analiza până la 40 de posibil candidați per oră.

## 2. Studiul II: Indolauronele – structuri originale pentru inhibitori ABCC2 eficienți

### 2.1. Introducere

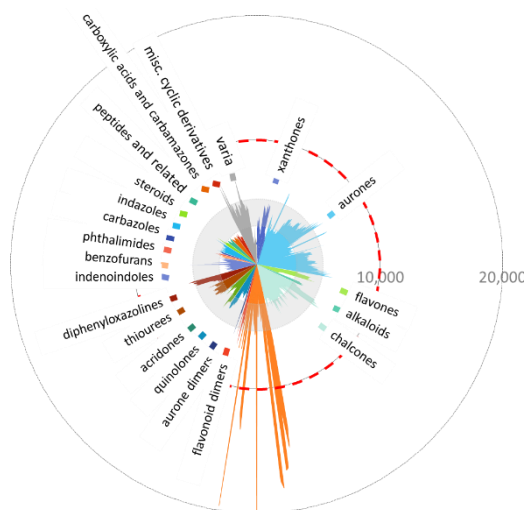
Abundența crescută a proteinei ABCC2 sugerează că aceasta joacă un rol major în farmacocinetica și farmacodinamica medicamentelor și că este esențial să înțelegem mai bine contribuția sa. FDA și EMA sugerează că acest obiectiv este realizabil cu ajutorul unor inhibitori eficienți. Din păcate, cercetările pentru identificarea unor inhibitori ABCC2 nu au fost la fel de fructuoase ca cele pentru ABCB1, ceea ce face că, în prezent, există puțini modulatori ABCC2 cunoscuți, cu eficacitate de inhibiție modestă și non-specifici. Cel mai eficient inhibitor ABCC2 cunoscut este ciclosporina A, cu un  $\text{IC}_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$ , mult mai eficientă ca inhibitor ABCB1 și ABCC1. În acest context, găsirea de noi inhibitori ABCC2 rămâne prioritară.

## 2.2. Materiale și metode

Pentru acest studiu am folosit condițiile experimentale descrise în detaliu în capitolul anterior. Am organizat o bogată bibliotecă de compuși potențiali inhibitori ABCC2 care cuprinde peste 500 de molecule diferite, din peste 20 de clase structurale. Am lansat o campanie rapidă de screening pentru identificarea de noi inhibitori ABCC2.

## 2.3. Rezultate și discuții

Strategia noastră pentru conceperea bibliotecii de compuși a ținut cont de faptul ca avem nevoie de o mare chemodiversitate, dar în același timp orientată spre potențiali inhibitori ai proteinelor ABC. Cu ajutorul colaboratorilor noștri, am organizat o bibliotecă valoroasă de peste 500 de compuși și am realizat un screening inițial pentru a identifica compușii cu potențial inhibitor ABCC2 (fig. 2).



**Fig.2. Screeningul inițial al inhibitorilor ABCC2.** Acumularea calceinei în celule MDCKII-ABCC2 incubate cu 5  $\mu\text{M}$  de compuși proveniți din diferite clase structurale și comparația cu inhibitorul de referință, ciclosporina A la 25  $\mu\text{M}$  (cercul punctat roșu). Acumularea bazală este indicată de cercul gri deschis.

În mod surprinzător, ABCC2 a dovedit a avea o fereastră îngustă pentru inhibitori specifici, și am găsit că doar indolauronele sunt eficiente. În continuare, am caracterizat în detaliu această clasă de noi inhibitori ABCC2, prima serie de molecule înrudite structural care inhibă ABCC2 în concentrații micromolare. Studiile QSAR vor ajuta la ameliorarea acestor inhibitori pentru găsirea unor compuși cu specificitate și eficacitate superioare.

## 3. Studiul III: Noii inhibitori ABCC2 pun sub semnul întrebării implicarea proteinei în rezistența la cisplatină în cancerul ovarian

### 3.1. Introducere

Cancerul este una dintre principalele cauze de mortalitate în țările dezvoltate și, în prezent, medicina propune trei abordări pentru a lupta împotriva lui: rezecție chirurgicală, radioterapie și chimioterapie. Chimioterapia este singura opțiune de eliminare a celulelor metastazate și a unor tipuri de cancer precum leucemiile și limfoamele. Anumite celule canceroase prezintă rezistență

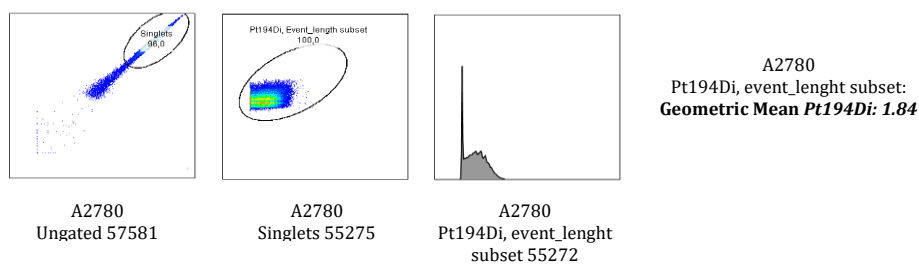


încrucișată la chimioterapice, fie intrinsecă, fie dobândită. Multirezistanța încrucișată la medicamente este caracterizată de o sensibilitate scăzută a celulelor canceroase tratate, nu doar la medicamentele antitumorale deja folosite, ci și la alte medicamente citotoxice neînrudite structural cu cele la care au fost deja expuse. Cisplatina (CDDP) este un medicament antitumoral derivat de platină, folosită pentru tratarea unor forme de cancer agresive, precum sarcoamele, carcinoamele precum cancerul pulmonar, și cancerul ovarian. Din păcate, în ciuda succesul inițial de reducere a mărimii tumorilor, acestea revin adesea sub o formă foarte rezistentă.

Ultimele două decenii de cercetare au arătat că ABCB1 este principala proteină de rezistență, dar nu este singura proteină ABC care poate conferi rezistență încrucișată la medicamentele antitumorale importante în practica clinică. ABCC2 induce rezistență în culturi celulare la metotrexat, paclitaxel, docetaxel, epipodofilotoxine, vincristina, vinblastina, doxorubicina, și are un rol specific în rezistența la cisplatină în cancerul ovarian, în hepatocarcinom și cancerul esofagian.

### 3.2. Materiale și metode

Celulele alese pentru acest studiu sunt celule umane de cancer ovarian sensibile și rezistente la tratamentul cu cisplatină, A2780 și A2780cis. Am verificat expresia ABCC2 pentru a confirma prezența sa în liniile celulare rezistente la cisplatină folosind citometria de masă, am pus la punct o nouă metodă de evaluare a acumulării intracelulare a platinei (fig. 3), apoi am testat efectul inhibitorilor ABCC2 identificați anterior asupra acumulării cisplatinei în celulele canceroase.



**Fig.3. Analiza populațiilor celulare pentru evaluarea acumulării platinei în celule de cancer ovarian, A2780 și A2780cis, sensibile și rezistente la tratament**

### 3.3. Rezultate și discuții

În acest studiu, am conceput o abordare experimentală originală pentru a cerceta legătura dintre ABCC2 și rezistența la cisplatină în cancerul ovarian. Am arătat pentru prima dată posibilitatea utilizării citometriei de masă ca tehnică adaptată pentru investigarea clinică a acumulării platinei în celulele canceroase și am arătat o corelație directă între nivelul de acumulare și rezistența în cancerul ovarian.

Am testat dacă inhibitorii ABCC2 identificați anterior pot modula rezistența la cisplatină și am arătat că, într-adevăr, rezistența la cisplatină este complexă și țintirea unei singure proteine de rezistență nu este suficient pentru a resensibiliza complet celulele la tratament.

## CONCLUZII GENERALE

Emergența fenotipului MDR multirezistent la medicamente în cazul celulelor canceroase este adesea corelată cu o supraexpresie a proteinelor membranare din superfamilia ABC. ABCC2 este un transportor ABC implicat în efluxul metabolitelor glutation-, glucurono- sau sulfo-conjugate ai substanțelor endo- și xeno-biotice și recunoaște și transportă numeroase medicamente antitumorale. Se cunosc foarte puține despre acest transportor relevant din punct de vedere

fiziologic și se crede că are un impact mai mare decât s-a estimat inițial asupra farmacocineticii și farmacodinamicii medicamentelor.

Pe parcursul cercetărilor doctorale prezentate în această teză, am conceput noi strategii experimentale pentru screening-ul potențialilor inhibitori ABCC2 și am folosit citometria de masă pentru evaluarea acumulării cisplatinei la nivel celular în tumori canceroase. Am organizat o vastă bibliotecă de compuși chimici cu peste 500 de molecule, din mai mult de 20 de clase structurale diferite, și am identificat prima serie de inhibitori ABCC2 eficienți.

Am investigat rolul ABCC2 în rezistența la cisplatină în cazul cancerului ovarian și am conceput o metodă originală de monitorizare a acumulării platinei în celule canceroase folosind o tehnică recentă de citometrie în masă. Am evaluat efectul inhibitorilor ABCC2 asupra acumulării cisplatinei în celulele tumorale de cancer ovarian și am încercat să deslușim strategii de modulare a rezistenței.

### SUGESTII BIBLIOGRAFICE

1. Baiceanu E, Crisan G, Loghin F, Falson P. Modulators of the human ABCC2: hope from natural sources? *Future Medicinal Chemistry*. 2015;7(15):2041-63
2. Baiceanu E, Nguyen KA, Gonzalez-Lobato L, Nasr R, Baubichon-Cortay H, Loghin F, et al. 2-Indolylmethylenbenzofuranones as first effective inhibitors of ABCC2. *European journal of medicinal chemistry*. 2016;122:408-18.
3. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(3):215-36.
4. Szakacs G, Hall MD, Gottesman MM, Boumendjel A, Kachadourian R, Day BJ, et al. Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance. *Chemical reviews*. 2014.
5. Gottesman MM, Lavi O, Hall MD, Gillet JP. Towards a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015