

Nagy átteresztőképességű molekulaszűrő rendszer kialakítása az ABCB1-et expresszáló multidrog rezisztens rákos sejtek célzott elpusztítására alkalmas vegyületek azonosítására

Doktori tézisek

Tóth Szilárd

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Antal István
Dr. Bátori Sándor

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Mészáros Tamás
Dr. Szarka András

Budapest
2018

Bevezetés

A rákbetegségek kemoterápiás kezeléseik sikerességét gyakran befolyásolja a tumorok elsődleges vagy másodlagos rezisztenciája. Egyes sejtszintű rezisztencia mechanizmusok képesek az egymástól eltérő szerkezetű, ill. hatásmechanizmusú vegyületekkel szemben is védelmet biztosítani. A multidrog rezisztencia (MDR) egyik leggyakoribb formáját az ABC-transzporterek plazmamembránban történő fokozott kifejeződése okozza. Az ABC transzporterek képesek felismerni, és az ATP energiáját felhasználva kipumpálni a jelenleg használt kemoterapeutikumok széles körét, így a xenobiotikumok intracelluláris koncentrációja nem éri el a toxikus küszöböt. Az ABC-transzporterek közül a legnagyobb figyelem az ABCB1-re (P-glikoprotein, P-gp) irányul. Ennek egyik oka, hogy a rákos sejtvonalak *in vitro* szelekciója során kialakult MDR fő faktora legtöbbször a P-gp. Ezen felül a klinikumban tapasztalt kedvezőtlen terápiás választ is számos malignitás esetében sikerült a tumorsejtek fokozott P-gp expressziójához kötni. Mivel az eddig elvégzett klinikai tanulmányok során az ABCB1 inhibitoroknak nem sikerült fenntartaniuk/visszaállítaniuk a tumorok érzékenységét a P-gp szubsztrát gyógyszerekkel szemben, az MDR tumorok kezelésére vagy kialakulásának megakadályozására újfajta megközelítésekre van szükség.

Az egyik újfajta megközelítés az MDR-re célpontként tekint. Maga az ötlet az 1950-es évekre vezethető vissza, amikor először írták le a kollaterális szenzitivitás jelenségét, és olyan ágenseket fedeztek fel, melyek hatékonyabban pusztították el a rezisztens fenotípussal rendelkező baktériumokat vagy rákos sejtvonalakat.

A kollaterális szenzitivitás olyan sejten belüli változások eredménye, melyek a sejtek citotoxikus szerekkel szemben történő adaptációjával egyidejűleg alakultak ki, és magukban hordozzák az egyéb szerekkel szemben mutatott fokozott érzékenység lehetőségét. Korábbi kutatások sikeresen azonosítottak olyan vegyületeket, amelyek a P-gp-t fokozottan expresszáló sejtek járulékos érzékenységét célozzák. Ezek az ún. MDR-szelektív vegyületek képesek lehetnek kifejezetten az MDR klónokat eliminálni egy heterogén tumor populációból, így – akár a kemoterápiás kezeléssel kombinálva – lehetőség nyílna a P-gp általi MDR leküzdésére.

Az irodalomban számos olyan vegyületet találhatunk, melyek hatékonyabban pusztítják el az MDR tumorsejteket. Ezeknek a nagy részét azonban csak véletlenszerűen, fenotipikus szűrések mellékeredményeként azonosították, és a P-gp funkciójának szerepét nem vizsgálták meg alaposabban, továbbá az alkalmazhatóságukat megerősítő állatkísérletek is hiányoznak. Az MDR-szelektív vegyületek felfedező kutatásában ezért nagy előrelépést jelentenének a tervezett, nagy áteresztőképességű szűrések.

Célkitűzések

Fő célunk egy olyan nagy áteresztőképességű molekulaszűrő platform kialakítása volt, mellyel képesek lehetünk új MDR-szelektív ágenseket azonosítani gyógyszer-szerű vegyületek további optimalizációjának céljából. A szerkezet-aktivitás összefüggések (SAR) megfigyelésével közelebb kerülhetünk az MDR-szelektív toxicitás hatásmechanizmusának a megértéséhez, valamint további potens, farmakológiailag is aktív jelölteket tervezhetünk.

#1. Célkitűzés. Egy standardizált, vegyületkönyvtárak nagy áteresztőképességű citotoxicitási szűrésére alkalmas rendszer felépítése.

#1A. Háromlépcsős molekulaszűrő algoritmus kialakítása, elsődleges, megerősítő és másodlagos tesztekkel.

#1B. Egy reagens-mentes, fluoreszcens protein expresszió alapuló, növekedésgátlást mérő *in vitro* citotoxicitási esszé bevezetése.

#1C. Az áteresztőképesség növelése érdekében a szűrési folyamatban szereplő folyadékmozgatások automatizálása, valamint automatikus adatkiértékelés, mind a 96- és 384-cellás mikrotálcákon végzett kísérletek elvégzésekor.

#2. Célkitűzés. MDR-szelektív vegyületek azonosítása és validálása a szakirodalmi adatokból kiindulva.

#2A. ABCB1-et expresszáló sejteket szelektíven elpusztító, irodalomból ismert vegyületek toxikusságának ellenőrzése.

#2B. MDR-szelektív vegyületek azonosítása az NCI DTP adatbázisából bioinformatikai megközelítéssel.

#2C. Kemo típusok definiálása az ismert, valóban MDR-szelektív vegyületek halmazából.

#3. Célkitűzés. Fókuszált vegyületkönyvtárak szűrése az MDR-szelektív vegyületek kémiai terének vizsgálatára.

Anyagok és módszerek

Az irodalomból ismert, kollaterális szenzitivitást kiváltó vegyületeket kereskedelmi forgalomból vásároltuk meg, illetve más kutatócsoportoktól kaptuk ajándékba. A DTP vegyületkönyvtárából származó molekulákat az NCI-60 Cell Line Screen 2010 decemberében publikált nyilvános adatbázisából, *in silico* adatbányászat során azonosítottuk. A találatokat az egyes vegyületek sejtvonalakra gyakorolt citotoxikus hatásának (pGI₅₀) és az NCI-60 sejtpanel ABCB1 mRNS expressziós mintázatának Pearson korrelációs elemzésével kerestük. A tioszemikarbazonokat (TSC) és analógjaikat tartalmazó könyvtárat Dr. Pape F.S. Veronika állította össze, ill. több vegyületet ő is szintetizált. A főleg flavonoidokat és részben tioszemikarbazonokat tartalmazó vegyületkönyvtárat Dr. Ahcène Boumendjel (Univ. Grenoble Alpes, Département de Pharmacochimie Moléculaire) bocsátotta rendelkezésünkre. A protoflavonokat tartalmazó fókuszált könyvtárat Dr. Hunyadi Attila csoportja (SZTE, GYTK, Szeged) szintetizálta és biztosította számunkra. A 8-hidrokinolinok jelentős részét Dr. Soós Tibor (MTA, TTK, Budapest) és Dr. Fülöp Ferenc (SZTE, Szeged) csoportja szintetizálta, míg a többi analógot cégektől vásároltuk vagy a DTP-től szereztük be.

Az MDR-szelektivitással összefüggésbe hozható kemotípusok meghatározása a PubChem 2 dimenziós kémiai szerkezeteket klaszterező eszközével történt, a távolságokat a Tanimoto hasonlósági indexszel jellemeztük. A tézisben szereplő szerkezeti képleteket Marvin (ChemAxon kft.) rajzoltam.

Sejtvonalak és tenyésztésük

A citotoxicitási tesztek során rákos és immortalizált sejtek parentális és MDR fenotípusaival dolgoztunk. A sejteket vagy DMEM-ben (Mes-Sa, KB-3-1, A431, MDCK II és DMS 114, valamint a belőlük származó sejtvonalak) vagy RPMI-ben (OVC-8 DsRed2, NCI-ADR/RES eGFP, HCT-15, KB és KB-VIN) tenyésztettük. A tápoldatok 10% szérumot, 5 mM glutamint és 50 egység/ml penicillint ill. sztreptomocint tartalmaztak, kivéve a KB és KB-VIN sejtvonalak tápoldata, mely a 10% szérum mellett 100 µg/ml kanamicint és 25 mM HEPES-t tartalmazott. A sejtvonalakat rendszeresen teszteltük mycoplasma fertőzésre, mely mindig negatív eredményt adott.

A fluoreszcens proteint kifejező OVC-8 DsRed2 és NCI-ADR/RES eGFP sejtvonalak esetében a DsRed2 és az eGFP génjét tartalmazó expressziós vektorok transzfekciója Lipofectamin2000 reagenssel történt, a sejtvonalakat Dr. Michael M. Gottesmantól (NIH)

kaptuk. A Mes-Sa és Dx5 sejtvonalak fluoreszcens variánsai az expressziós vektorok lentivirális transzfekciójával készültek Dr. Szepesi Áron, Dr. Német Katalin és Kucsma Nóra munkájaként.

Reagens alapú és fluoreszcens fehérje mérésére támaszkodó citotoxicitási esszék

A citotoxicitási esszéket 96- és 384-cellás mikrotálcákon végeztük. A citotoxicitás mértékének meghatározása MTT (0,5 mg/ml PBS-ben), PrestoBlue (resazurin alapú oldat, PBS-ben 5-10 %-osra hígított) és szulforodamin B (SRB; 0,4 w/v %) reagensekkel történt, melyeket a gyári protokollok kisebb módosításaival végeztünk el. Az MTT konverzióját és az SRB festést abszorbancia alapú méréssel detektáltuk a megfelelő hullámhosszok beállításával, míg a PrestoBlue konverzióját fluoreszcens technikával, a megadott gerjesztési és emissziós hullámhosszokon néztük. A reagens alapú esszéket egy ponton történő méréssel olvastuk le, mivel az oldatok homogének voltak. A kapott, felső olvasási móddal detektált értékeket a kezeletlen (negatív) kontrollhoz és a sejtmentes cellánál kapott értékhez (pozitív kontroll) normalizáltuk, amennyiben MTT és PrestoBlue viabilitási reagenseket alkalmaztunk, az SRB esetében viszont a pozitív kontrollnak olyan cellákat választottunk, ahol a kiültetett sejtek olyan koncentrációban voltak kezelve, hogy biztos elpusztuljanak, így a sejttörmelék megfestését is képesek voltunk figyelembe venni számoláskor. A használt reagensek végpontos citotoxicitási esszének minősülnek, legtöbbször a sejtek és a vegyületek 72 órányi inkubációja után alkalmaztuk őket.

A fluoreszcens fehérje alapú citotoxicitási esszék fejlesztése és használata során több fluoreszcens fehérjével is dolgoztunk (DsRed2, eGFP, mCherry, mOrange). A sejteknek a mikrotálcák celláiban történő egyenetlen eloszlása miatt pásztázó mérési módot állítottunk be a lemezolvasóban. Az alsó olvasási módból származó értékeket a kezeletlen (negatív) kontrollhoz, és az SRB esszéhez hasonló módon olyan cellák értékeihez normalizáltuk, melyeknél minden sejtet sikerült a kezeléssel elpusztítani (pozitív kontroll), mert ezen cellák mért értékei különböztek a csak tápoldatot tartalmazó cellák fluoreszcens jelétől. Mivel a fluoreszcens fehérjén alapuló mérés nem károsítja a sejteket, ugyanazt a mikrotálcát több időpontban is lemértük, jellemzően a kezelést követő 72 óra, 96 óra és 144 óra inkubáció után.

A citotoxicitást (IC_{50} ill. GI_{50}) szigmoidális görbeillesztéssel határoztuk meg, melyhez a GraphPad Prism szoftvert, azon belül az automatikus felső és alsó plató meghatározását elvégző, 4 paraméteres logisztikus egyenletre épülő analízist használtuk. Ezen felül az adatok automatikus kiértékelésére egy saját készítésű programot használtunk, melyet Sessler Judit írt

C# nyelven, és a félmaximális gátló koncentráció értékének meghatározása a logisztikus függvény nemlineáris regressziójával, a legkisebb négyzetek módszerével (nls) történt.

A citotoxicitási esszék működési jellemzőinek követése

A fluoreszcens fehérje expresszióján alapuló mérések robusztusságának követését az esszéfejlesztés és a későbbi molekulaszűrési kampányok alatt egyaránt a Z'-faktoron keresztül követtük, mely az esszé dinamikus tartományának azt a részét adja meg, amely nem lapol át sem a pozitív sem a negatív kontroll variabilitási tartományával. (Ez utóbbi a szórás háromszorosa, vagyis a pozitív és negatív kontrollok összes lehetséges értékeinek 99.7 %-át fedi le, amennyiben normális eloszlást feltételezünk). A Z'-faktort a következő képlettel számoltuk ki:

$$Z' \text{-faktor} = [|\mu_{\text{neg}} - \mu_{\text{poz}}| - 3(\sigma_{\text{neg}} + \sigma_{\text{poz}})] / |\mu_{\text{neg}} - \mu_{\text{poz}}| = 1 - [3(\sigma_{\text{neg}} + \sigma_{\text{poz}}) / |\mu_{\text{neg}} - \mu_{\text{poz}}|],$$

ahol $\mu_{\text{neg}}/\mu_{\text{poz}}$ a negatív/pozitív kontroll átlaga, $\sigma_{\text{neg}}/\sigma_{\text{poz}}$ pedig a kontrollok szórása.

A molekulaszűrő platform elemei

A nagyobb áteresztőképességű vegyülettesztelés elérése céljából kialakítottunk egy szűrőállomást, ami egy Hamilton StarLet automata folyadékkezelő robotból és egy Perkin Elmer EnSpire többfunkciós lemezolvasóból állt. A folyadékkezelés automatizálására írt programok a Venus2 szoftverben készültek.

A beérkező vegyületeket szisztematikus módon regisztráltuk és helyeztük el. Létrehoztunk egy adatbázist, ahova bevittük a vegyületek mennyiségét, a porok/oldatok helyét stb., hogy a tesztelésekhez könnyen el tudjuk érni őket. A molekulákról szerkezeti információt is tároltunk, amit az Instant JChem szoftverrel (ChemAxon kft.) összekötöttünk. Az oldott vegyületkönyvtár tagjait 1,1 ml-es csövekben tároltuk, melyek 96 pozíciós tároló dobozokban foglaltak helyet, így az aktuális kísérlethez szükséges egyes csöveket külön ki tudtuk gyűjteni, míg az elsődleges szűréshez használt anyalemezek (96 cellás polipropilén tálcák) fix leosztással rendelkeztek, mindegyik lemezen 36 előre meghatározott vegyület volt 2 különböző koncentrációban, 100 µl mennyiségben.

Eredmények

1. *Egy standardizált, vegyületkönyvtárak nagy áteresztőképességű citotoxicitási szűrésére alkalmas rendszer felépítése.*

Annak érdekében, hogy képesek legyünk nagyobb mennyiségű vegyület tesztelésére, kialakítottunk egy automatizált, nagy áteresztőképességű szűrésre alkalmas rendszert. A citotoxicitási tesztek 3 egymást követő lépésben valósítottuk meg, és minden lépés elvégzésével egyre részletesebb információt kaptunk a vegyületekről. A három lépés (I-III) során megállapítottuk, hogy mely vegyületek rendelkeztek citotoxikus hatással (I, elsődleges szűrés), dózis-függő toxicitással, ill. kedvezőbb esetben MDR-szelektív toxicitással (II, megerősítő szűrés), és hogy a megfigyelt MDR-szelektivitás robosztusan jelentkezett-e a különböző parentális és MDR *in vitro* modellrendszereken való teszteléskor, ill. eltérő elven működő citotoxicitási esszé alkalmazásakor (III, másodlagos tesztek).

A toxikus molekulák szűréséhez egy minimális folyadékkezelést igénylő, költséghatékony esszét terveztünk kialakítani. Ezért bevezettem és karakterizáltam egy reagensmentes, fluoreszcens fehérje expresszióján alapuló citotoxicitási esszét.

Első lépésként megállapítottam, hogy a kiültetett sejtszám és a sejtek lemezolvasó által detektált fluoreszcens intenzitása között lineáris az összefüggés. Ezt követően sikerült megbízhatóan követnem a sejttömeg növekedését, valamint a tesztvegyületek növekedést gátló hatását, amit GI_{50} értéként számszerűsítettem. A fluoreszcens fehérje expresszióján alapuló citotoxicitási esszé fejlesztését a rendszer robosztusságát kifejező Z' -faktor segítségével végeztem. Magasabb Z' -faktorokat (így robosztusabb esszét) akkor sikerült elérnem, amikor figyelembe vettem a sejtek speciális 2D eloszlását, és az egyponos mérések helyett az EnSpire lemezolvasó pásztázó mérési technikáját alkalmaztam. A Z' -faktorokat az inkubációs idő meghosszabbításával és a magasabb felvillanás számmal (tehát a hosszabb ideig tartó fluoreszcens detektálással) szintén növelni tudtam. További kísérletek során azt tapasztaltam, hogy a lemez szélén levő cellákból jelentős mennyiségű tápoldat párolgott el, ami hatással volt a sejtek növekedésére, így azokat a cellákat kizártam a tesztelésből.

Hatékonyan működő MDR-szelektív ágensek nagyobb elemszámú vegyületkönyvtárból történő azonosítása érdekében elkerülhetetlen volt a folyadékkezelés automatizálása. Ennek érdekében vásároltunk egy Hamilton StarLet automata folyadékkezelő robotot, amit beprogramoztam a sejtek kiültetésére, a sorozathígítások elvégzésére, valamint az elsődleges,

megerősítő és másodlagos tesztek pipettázási lépéseinek végrehajtására. A programok megírásához standardizálni kellett a lemeztérképeket, illetve figyelembe kellett venni, hogy a pipettázó robot csak meghatározott irányú mozgásokat képes végezni.

2. MDR-szelektív vegyületek azonosítása és validálása a szakirodalmi adatokból kiindulva.

A szakirodalomból számos kollaterális szenzitivitást kiváltó vegyületet ismerünk, melyek szelektíven támadják a P-gp-t fokozottan kifejező tumorsejteket. A P-gp kifejeződése és az MDR sejtek hiperérzékenysége közötti ok-okozati összefüggést azonban a legtöbb ilyen vegyület esetében nem vizsgálták mélyrehatóan. Kutatócsoportunk ezért összegyűjtötte a rezisztens sejtek kollaterális érzékenységét kiváltó ismertebb vegyületeket, hogy megvizsgáljuk az MDR-szelektív hatásuk robusztusságát. A vegyületlista a következőkből állt: verapamil, reverzin121, Triton-X-100, desmosdumotin B flavonoidok, rotenon, KP772, Dp44mT és a Pluronic P85 kopolimer. A tesztek során azt tapasztaltuk, hogy a KP772-n kívül egyik vegyület sem rendelkezett robusztus MDR-szelektív aktivitással, mert a kiváltott kollaterális érzékenység a P-gp-től független faktorhoz volt köthető.

Ezzel ellentétben az NCI DTP adatbázisának szisztematikus feldolgozásával sikerült robusztus aktivitással rendelkező, a P-gp funkciójához kötött MDR-szelektív vegyületeket azonosítani. A leghatékonyabb találat mind citotoxicitás mind MDR-szelektivitás szempontjából az NSC297366 volt. Ezt a vegyületet további sejtvonal párokon és más típusú esszéekben is leteszteltünk, ami azt eredményezte, hogy még szélesebb körben sikerült megerősítenünk a robusztus szelektív hatását, és alátámasztanunk az alkalmazott citotoxicitási esszé elvétől való függetlenséget.

Annak érdekében, hogy a megfigyelt MDR-szelektív hatást kemotípusokhoz köthessük, elvégeztük a DTP adatbázisából azonosított vegyületek 2D szerkezeti osztályozását (klaszterezését). A legtöbb vegyület az NSC297366-ot is magában foglaló 8-hidroxikinolinok csoportjához volt köthető. A további MDR-szelektivitással összekapcsolható klaszterek az 1,10-fenatrolin komplexek, a β -diketonok és a tioszemikarbazonok voltak.

3. Fókuszált vegyületkönyvtárak szűrése az MDR-szelektív vegyületek kémiai terének vizsgálatára.

Kutatócsoportunk összeállított egy MDR-szelektív toxicitással összefüggésbe hozható struktúrákat reprezentáló, 2160 elemű vegyülethalmazt. A kismolekulák vizsgálata elsődleges szűréssel kezdődött, ami eredményeként azonosítottuk a citotoxicitással rendelkező vegyületeket. Ezután a fókuszált könyvtárak részletesebb elemzése következett, a kiválasztott találatokkal megerősítő és másodlagos tesztek végeztünk. A doktori munkában a (i) 8-

hidroxikinolinok, (ii) tioszemikarbazonok és analógjaik, (iii) tioszemikarbazonok és flavonoidok, mint pl. azaauronok és (iv) protoflavonok elemzésére került sor.

A 8-hidroxikinolinok tesztelése és iteratív optimalizációja során sikerült jelentősen megnövekedett citotoxicitással és MDR-szelektivitással rendelkező analógokat találni, melyek az “*MDR-reversing 8-hydroxy-quinoline derivatives*” című nemzetközi szabadalmi beadvány alapját képezik. Az alap 8-hidroxikinolin különböző R2-, R5- és R7-szubsztituensi tesztelésével alapvető struktúra-aktivitás összefüggések felfedéséhez járultunk hozzá. A legjobb hatással rendelkező analógok az R7-es pozícióban vagy metoxi-benzilamin vagy tetrahidro-izokinolin különböző derivátumait tartalmazták.

A tioszemikarbazonok, flavonoidok és protoflavonok 3 különböző fókuszált könyvtárban történő tesztelése eredményeként szintén fontos, a kollaterális szenzitivitáshoz köthető struktúra-hatás összefüggéseket figyeltünk meg. A tioszemikarbazonok közül kizárólag a β -izatin-tioszemikarbazonok (pl. NSC73306) rendelkeztek egy gyenge, de szignifikáns P-gp funkciójához kötött MDR-szelektív citotoxicitással, míg a többi tesztelt analóg csak a transzporter expressziójától függetlenül, sejtvonal specifikusan tudott kollaterális szenzitivitást előidézni. A flavonoidok 156 tagú könyvtárából (3-aril-2-kinolonok, flavonok, auronok, azaauronok, kalkonok, xantonok és azaflavonok) citotoxicitás szempontjából az azaauronok és a kalkonok voltak a legkiemelkedőbbek. A kalkonok sajnos nem voltak fokozottan toxikusak a multidrog rezisztens Dx5 sejtvonallal szemben, az azaauronok jelentős része viszont 2-nél magasabb szelektívítási hányadost mutatott, amikor a Mes-Sa (parentális) és a Dx5 (MDR) sejtvonallal szemben mért IC_{50} értékeket összehasonlítottuk. További kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy az MDR sejtek azaauronokkal szemben mutatott érzékenységét összefüggésbe lehet-e hozni a P-gp funkciójával. A kiválasztott vegyületek toxicitását ezért egy ABCB1-el transzfektált sejtvonalon is leteszteltük, ahol mindössze egy esetben sikerült gyenge (1,7-szeres), de szignifikáns MDR-szelektivitást kimutatnunk.

A protoflavonokra fókuszáló vegyületkönyvtár tesztelésekor sikerült olyan entitásokat találnunk, amelyek képesek voltak szelektíven elpusztítani a kemoterápiás szerekkel szelektált MDR sejtvonalakat, azonban az ABCB1-el transzfektált MDR sejtvonalak már nem mutattak megnövekedett érzékenységet a parentális vonalához képest. Mindazonáltal a protoflavonok sikeresen kikerülték a P-gp által biztosított multidrog rezisztenciát és alacsony IC_{50} értékkel rendelkeztek, így általánosan ható rákellenes szerként alkalmazhatóak lehetnek.

Következtetések

A doktori munkám alapvető célja egy nagyobb áteresztőképességgel rendelkező szűrőrendszer bevezetése volt, hogy az eddiginél hatékonyabb MDR-szelektív analógokat azonosítsunk.

1. Bevezettem és karakterizáltam egy fluoreszcens fehérje expresszióján alapuló citotoxicitási esszét, ami alkalmas az MDR-szelektív molekulajelöltek akár nagyobb áteresztőképességű szűrésére.
2. Azt találtam, hogy a szakirodalomban publikált vegyületek nem rendelkeztek univerzális MDR-szelektív hatással, a kollaterális szenzitivitást a P-gp-től eltérő faktorokon keresztül váltották ki.
3. Az NCI DTP adatbázisának szisztematikus analízisével eddig ismeretlen, robosztus aktivitással rendelkező MDR-szelektív ágenseket azonosítottam.
4. Az ismert MDR-szelektív vegyületek szerkezeti klaszterezése alapján sikerült a megfigyelt hatással összefüggésbe hozható alapszerkezeteket (kemotípusokat) meghatározni.
5. Elsődleges szűréssel 2160 vegyület toxikusságát teszteltem, melyeket kifejezetten az MDR-szelektív hatáshoz rendelt kemotípusok alapján állítottunk össze, ezáltal elősegítettem a vezérmolekula (vagy vezérmolekula szerű) vegyületek létrehozását.
6. Hozzájárultam a 8-hidroxikinolinok optimalizációjához, mely során olyan alapvető struktúra-aktivitás összefüggéseket fedtünk fel, ami nagyobb számú, megnövekedett aktivitással rendelkező vegyület fejlesztéséhez vezetett. A leghatásosabb, eddig ismeretlen analógok egy nemzetközi szabadalmi beadvány alapját képezték (“*MDR-reversing 8-hydroxy-quinoline derivatives*”; beadvány száma: pct-hu2017-050009).
7. További 3 fókuszált vegyületkönyvtárat jellemeztem az MDR-szelektív toxicitás szempontjából (tioszemikarbazonok, flavonoidok, protoflavonok), mely során sikerült néhány további, hatásos vegyületet azonosítani.

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

Füredi A, Tóth S, Szabó K, Pape VF, Türk D, Kucsma N, Cervenak L, Tóvári J, Szakács G. *Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity*. *Mol Cancer Ther*; 2017, 16(1):45-56.

Dankó B, Tóth S, Martins A, Vágvolgyi M, Kúsz N, Molnár J, Chang FR, Wu YC, Szakács G, Hunyadi A. *Synthesis and SAR Study of Novel Anticancer Protoflavone Derivatives: Investigation of Cytotoxicity and Interaction with ABCB1 and ABCG2 Multidrug Efflux Transporters*. *ChemMedChem*; 2017, 12(11):850-859.

Pape VF, Tóth S, Füredi A, Szabó K, Lovrics A, Szabó P, Wiese M, Szakács G. *Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance*. *Eur J Med Chem*; 2016, 117:335-54.