

Pro gradu -tutkielma

MXR-mekanismien toiminta vesikirpulla *Daphnia magna*

Sari Kakko



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

2014

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede ja -teknologia

Sari Kakko: MXR-mekanismien toiminta vesikirpulla *Daphnia magna*
Pro gradu -tutkielma: 48 s.
Työn ohjaajat: FT Eeva-Riikka Vehniäinen, Professori Jussi Kukkonen
Tarkastajat: FT Eeva-Riikka Vehniäinen, FT Anssi Vähätalo
Joulukuu 2014

Hakusanat: Multiksenobioottinen resistenssi, MXR, ABC-proteiini, P-glykoproteiini, P-gp, Monilääkeresistenssi proteiini, MDR, vesikirppu, *Daphnia magna*, nikkeli, kadmium

TIIVISTELMÄ

Ympäristössä esiintyy laajalti erilaisia eliöille haitallisia sekä luonnollisia että ihmisperäisiä aineita ja kemikaaleja. Haitallisten aineiden määrä ympäristössä tulee lisääntymään kasvavan kemikaalien käytön myötä. Eliöiden selviytymisen kannalta mekanismit, joilla haitallisia aineita voidaan poistaa soluista ja kudoksista ovat elintärkeitä. Tunnetuimpina mekanismeina haitallisia vierasaineita sekä solujen omien aineenvaihdunnan tuotteita vastaan pidetään erilaisia detoksifikaatioprosessia. Näissä detoksifikaatioprosesseissa solun sisälle kertyneitä aineita pyritään poistamaan soluista entsyymaattisen muutunnan avulla.

Eräs solutasoinen mekanismi, jolla haitallisten aineiden pääsyä ja kertymistä soluihin sekä kudoksiin voidaan estää, on multiksenobioottinen resistenssi MXR. MXR-mekanismi perustuu solukalvolla sijaitseviin ATP:tä sitoviin ja hydrolysoiviin ABC-proteiineihin. ABC-proteiinit ovat yksi laajimpia proteiiniiryhmiä. Niitä on todettu esiintyvän kaikilla tutkituilla eliöillä. MXR-mekanismia hoitavat ABC-proteiinit omaavat laajan substraattispesifisyyden ja pystyvät siten poistamaan soluista myös monia haitallisia yhdisteitä. ABC-proteiinien toiminta voi kuitenkin estyä erilaisten ympäristöön joutuneiden kemikaalien vaikutuksesta, jolloin haitallisia aineita pääsee kertymään eliöiden soluihin. ABC-proteiinien esiintymistä voidaan helposti tutkia proteiinien substraatteina toimivien fluoresoivien väriaineiden tai radioaktiivisten aineiden sekä proteiinien toimintaa estävien tietyille ABC-proteiiniiryhmille spesifisten inhibiittoreiden avulla.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin MXR-mekanismien toimintaa sekä ABC-proteiinien esiintymistä täysikasvuisella vesikirpulla (*Daphnia magna*) proteiinien substraatteina ja inhibiittoreina toimivien aineiden avulla. Työssä tutkittiin myös nikkelin ja kadmiumin vaikutusta MXR-mekanismien toimintaan. Tuloksissa ainoastaan ABCB-proteiini-ryhmän esiintymisestä saatiin selvyys *D. magna* kyseistä proteiini-ryhmän toimintaa inhiboivan reversiini 205:n vaikutuksesta pitoisuuksilla 5 µM ja 20 µM. Vielä tiedetään ainoastaan vähän siitä, millaiset yhdisteet voivat toimia ABC-proteiinien toimesta poistettavina substraatteina ja niiden toimintaa estävinä inhibiittoreina. MXR-mekanismien ollessa keskeisessä asemassa estämässä haitallisten aineiden kertymistä eliöihin, tarvitaan lisää tutkimusta kyseistä mekanismeista haittaavien aineiden selvittämiseen.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science and Technology

Sari Kakko Multixenobiotic resistance mechanism in *Daphnia magna*
Master thesis: 48 p.
Supervisors: PhD Eeva-Riikka Vehniäinen and Professor Jussi Kukkonen
Inspectors: PhD Eeva-Riikka and PhD Anssi Vähätalo
December 2014

Key words: Multixenobiotic resistance, MXR, ABC protein, P-glycoprotein, P-gp, multidrug associated protein, MDR, *Daphnia magna*, nickel, cadmium

ABSTRACT

There exist various harmful chemicals in the environment. The amount of chemical will increase in the environment when the using of different chemical increases. So mechanisms that can help organisms to survive in polluted environments and to efflux harmful chemicals are vital. Xenobiotic toxicants and endogenous metabolites are usually efflux by detoxification processes which metabolize toxins to be more easily excreted from the cytoplasm.

Organisms can also avoid natural toxins and anthropogenic chemicals via so called multixenobiotic resistance mechanism MXR. MXR mechanism is expression of transmembrane transporter proteins which can efflux both endogenous compounds and environmental toxins from cells. All multixenobiotic resistance proteins belong to the ATP-binding cassette superfamily ABC. These proteins use energy from ATP hydrolysis to transport molecules across cell membranes. ABC proteins are one of the largest protein classes known and they are present in all organism and living cells. ABC proteins possess very large substrate specificity. They can efflux many physically and chemically different chemicals from the cells. The effective xenobiotic transport by ABC proteins can be however inhibited by many chemicals. Inhibition of the transporter activity allows harmful chemicals enter to the cytoplasm. Presence of these proteins can be measured with fluorescent dyes or radioactive compounds which act as substrates of the transporter proteins and specific protein inhibitors. When effective transporter proteins exist in the cellular membrane, only a few dye molecules enter the cytoplasm.

The aim of this study was to determine the function of MXR mechanism and the presence of ABC proteins with water flea *Daphnia magna* by using specific protein substrates and inhibitors. We also studied the effect of cadmium and nickel metals to the MXR mechanism. According to the results there exist only effective ABC-family proteins in *D. magna*. Concentrations 5 μM and 20 μM of specific ABC inhibitor reversin 205 caused more substrate accumulation in the *D. magna* cells than in the control.

There is only limited information about what kind of chemicals can act as ABC protein inhibitors or substrates. More study is needed for the characterization of these compounds.

LYHENNELUETTELO

ABC ATP:tä sitova kasetti (ATP-binding cassette)

Ca-AM kalseiini AM

CdCl₂ kadmiumkloridi

KTM keinotekoinen makeavesi

MDR monilääkeresistenssi (multidrug resistance)

MRP monilääkeresistenssiin liittyvä proteiini (multidrug associated protein)

MXR multiksenobioottinen resistenssi (multixenobiotic resistance)

NBD nukleotidejä sitova domeeni (nucleotide binding domain)

NiCl₂ nikkelikloridi

P-gp P-glykoproteiini (P-glycoprotein)

REV205 reversiini 205

RhB rodamiini B

SBP substraatteja sitova domeeni (substrate binding domain)

TMD transmembraaninen domeeni (transmembrane domain)

VER verapamil

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
1.1 Multiksenobioottinen resistenssi MXR eliöiden suojamekanismina	1
1.2 MXR-mekanismin proteiinit ja proteiinirakenne	3
1.3 MXR-mekanismin toimintaperiaate	6
1.4 MXR-mekanismin inhiboituminen, inhibiittorit sekä substraattit.....	8
1.5MXR-mekanismin toiminnan testaaminen.....	11
1.6 MXR-mekanismin toiminta ja ABC-proteiinien esiintyminen vesieläimillä sekä vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	14
1.7 Työn tavoite	17
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	17
2.1 Koe-eläinten ylläpito	17
2.2 Koeasetelmat	18
2.3 ABC-proteiinien inhibiittoreina ja substraatteina käytetyt aineet	19
2.4 Tulosten laskeminen ja tilastollinen testaus	21
3 TULOKSET	21
3.1 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina käytetyn kalseiini-AM:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	21
3.2 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina käytetyn rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	22
3.3 Reversin 205:n vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	23
3.4 MK571 vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	24
3.5 Nikkelikloridin (NiCl ₂) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan Ca-AM:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	25
3.6 Nikkelikloridin (NiCl ₂) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	25
3.7 Kadmiumkloridin (CdCl ₂) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan Ca-AM:n kertymiseen vesikirpulla <i>Daphnia magna</i>	26
4 TULOSTEN TARKASTELU	27
4.1 MXR-mekanismin toimivuuden tarkastelu täysikasvuisella <i>Daphnia magnalla</i> . 27	
4.2 Koeolosuhteiden arviointi	30
4.3 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen <i>D. magnalla</i> sekä muilla vesieläimillä	32
4.3.1 Verapamilin toksinen vaikutus vesikirppuun (<i>D. magna</i>) ja muihin vesieläimiin	34
4.4 Reversin 205 vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen <i>D. magnalla</i> sekä muilla vesieläimillä	35
4.5 MK571 vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen <i>D. magnalla</i> sekä muilla vesieläimillä	35
4.6 Raskasmetallien vaikutus vesieläimiin sekä MXR-mekanismiin	38
4.7 Nikkelikloridialtistuksen vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen <i>D. magnalla</i> sekä muilla vesieläimillä	39
4.8 Kadmiumkloridialtistuksen vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen <i>D. magnalla</i> sekä muilla vesieläimillä	40
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	42
Kiitokset	43
Kirjallisuus	43

1 JOHDANTO

1.1 Multiksenobioottinen resistenssi MXR eliöiden suojamekanismina

Eliöt altistuvat jatkuvasti erilaisille ympäristössä esiintyville haitallisille vierasaineille. Ympäristössä esiintyy monia ihmisperäisiä aineita ja kemikaaleja, kuten raskasmetalleja, dioksiineja, PCB-yhdisteitä, palonestoaineita sekä torjunta-aineita, joiden vaikutusta eliöihin ei vielä tunneta. Useat tutkimukset kuitenkin viittaavat näiden aineiden ja kemikaalien olevan monin tavoin haitallisia eliöille. Erilaisilta haitallisilta vierasaineilta suojautuminen on siten eliöiden selviytymisen kannalta tärkeää. Eliöille on kehittänyt monia puolustusmekanismeja, joilla voidaan estää haitallisten aineiden vaikutusta eliöissä. Eliöiden elimistöön, kudoksiin ja solujen sisälle kertyneitä haitallisia vierasaineita voidaan metaboloida sekä erittää monin tavoin. Esimerkiksi immuunipuolustuksen tai entsyymaattisen muutunnan avulla, jolla haitallisia aineita pyritään muokkaamaan aineita helpommin eritettävään muotoon (Timbrell 2001). Eliöiden altistuminen ympäristössä esiintyville vierasaineille tapahtuu esimerkiksi ravinnon, hengitysilman sekä veden välityksellä (Bain ym. 1997).

Eräs merkittävä solutasoinen suojautumiskeino haitallisia aineita vastaan on moniksenobioottinen-/monilääkeresistenssi MXR/MDR (multixenobiotic resistance/multidrug resistance). MXR on solukalvolla esiintyvien ATP:tä sitovien ja hydrolysoivien ABC-proteiinien (ATP-binding cassette) toimintaan perustuva mekanismi, joka estää monien erilaisten proteiinien substraatteina toimivien vierasaineiden sekä solujen omien haitallisten aineenvaihdunnantuotteiden pääsyä ja kertymistä soluihin. MXR toimii ikään kuin ensimmäisenä sekä viimeisenä puolustusmekanismina haitallisia aineita vastaan, estämällä aineiden pääsyä soluihin ja poistamalla jo kertyneitä aineita tai solun haitallisia aineenvaihdunnan tuotteita soluista (Bard 2000, Epel ym. 2008). Kyseinen puolustusjärjestelmä on kuitenkin herkkä erilaisille ympäristön ja ihmisen tuottamille aineille, jotka estävät MXR-mekanismia hoitavien ABC-proteiinien tehokasta toimintaa. Näiden proteiinien toiminnan estyessä myrkyllisiä aineita pääsee kertymään soluihin ja vaikuttamaan haitallisesti eliöön (Smital ym. 2004). MXR-mekanismi ja sen proteiinien toiminta on myös yhteydessä yleisesti tunnettuun aineiden metaboliaan I ja II vaiheiden, kuten CYP450- ja GST-detoksifikaatio-entsyymien toimintaan. Tällöin MXR-mekanismiin ABC-proteiinit auttavat poistamaan soluista aineita, joita on muokattu CYP450-

järjestelmän entsyymien toimesta. Yhdessä CYP450-entsyymien kanssa MXR-mekanismi muodostaa solunsisäisen haitallisia aineita muokkaavan ja poistavan detoksifikaatiojärjestelmän (Bard 2000, Yuan ym. 2014).

Ensimmäisen kerran MXR-mekanismiin toimivuus havaittiin, kun huomattiin syöpäkasvainten olevan vastustuskykyisiä syöpälääkkeille. Syöpäsolujen vastustuskyvyn todettiin tuolloin liittyvän solukalvolla esiintyviin ABCB1-proteiiniryhmään kuuluviin P-glykoproteiineihin (P-gp1), jotka estävät erilaisten syöpälääkkeiden pääsyä syöpäsoluihin. Toiminnaltaan MXR-mekanismi onkin todettu olevan samanlainen kuin syöpäsolulinjoissa syöpälääkkeitä vastaan toimiva nk. monilääkeresistenssi (MDR) (Juliano & Ling 1976, Bard 2000). MXR-mekanismiin ja P-glykoproteiinien toimintaa on tutkittu paljon syöpälääkkeille vastustuskykyisten solulinjojen ja kemoterapeuttisten aineiden osalta, mutta vain vähän tiedetään vielä MXR:n toimintamekanismeista esimerkiksi ympäristömyrkyjen erityksen osalta (Epel ym. 2008).

ABC-proteiiniperheeseen kuuluvia MXR-mekanismia hoitavia solukalvon siirtäjäproteiineja on löydetty laajalti kaikista eliöryhmistä, aina kasveista mikro-organismeihin, sekä kaikista elävistä soluista. ABC-proteiinit ovatkin yksi laajimpia eliöillä esiintyviä proteiiniryhmiä (Van Veen & Konings 1998, Bard 2000, Dean ym. 2001). MXR-mekanismiin siirtäjäproteiineja on löydetty eläimillä erityisesti aineiden erityksestä ja metaboliasta huolehtivien elinten epiteelisoluista, kuten suoliston, maksan ja munuaisten epiteelisistä sekä endoteelisista soluista, kuten kapillaarisista verisuonista ja veri-aivoesteestä. Haitallisten aineiden poistoa hoitavien ABC-proteiinien laaja esiintyminen eri eliöryhmien välillä viittaa MXR-mekanismiin olevan evolutiivisesti hyvin vanhaa alkuperää. MXR on myös luultavasti kehittynyt suojautumismekanismitoksi eliöille toisistaan riippumattomana (Dassa & Bouige 2001, Sturm ym. 2009).

MXR-mekanismiin yksi keskeisimpiä ominaisuuksia on sen proteiinien laaja substraattispefisyys. ABC-proteiinien tiedetään poistavan soluista monia erilaisia ympäristömyrkyjä sekä solun omia aineenvaihduntatuotteita (Bamdad ym. 1999). MXR-mekanismiin on todettu myös monissa tutkimuksissa induoituvan ja sitä hoitavien ABC-proteiinin transkription lisääntyvän erilaisten vierasainealtistusten sekä stressitekijöiden johdosta, kuten soluvaurioiden tai lämpötilan nousun vaikutuksesta (Smital & Kurelec 1998 b, Bard 2000, Eufemia & Epel 2000, Navarro ym. 2012). Saastuneilla alueilla

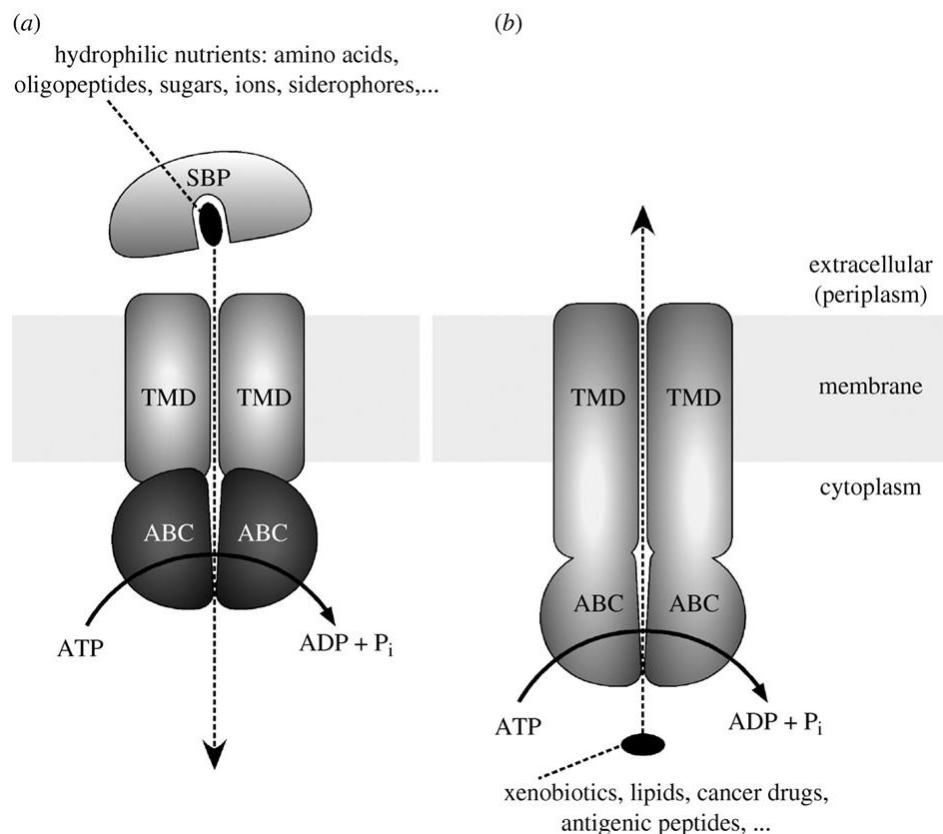
esiintyvillä eläimillä on todettu esiintyvän korkeampaa MXR-mekanismien aktiivisuutta ja sitä hoitavien ABC-proteiinien esiintymistä verrattuna puhtaammilla alueilla esiintyviin eläimiin (Minier & Moore 1996, Kurelec ym. 2000, Smital ym. 2000). MXR-mekanismien ja P-g-proteiinien transkription on todettu myös voimistuvan siirrettäessä populaatio ei-saastuneesta alueesta saastuneelle (Smital & Kurelec 1998 a, b). Moreau ym. (2008) mukaan MXR-mekanismien toiminta eliöissä voi olla yksi keskeinen biomarkkeri tutkittaessa eliöiden altistumista vierasaineille. Täysin pätevää menetelmää sen tutkimiseen biomarkkerina ei vielä ole kuitenkaan kehitelty. Eliöiden selviytymisen kannalta soluissa tapahtuva haitallisten vierasaineiden sisäänoton estäminen ja erityisesti ovat elintärkeitä mekanismeja. Näiden mekanismien ymmärtäminen ja tutkiminen lisää tietoa eri aineiden metaboliasta ja solujen puolustusmekanismeista haitallisia aineita vastaan (Einicker-Lamas ym. 2003). MXR-mekanismi ja aktiivisesti toimivat ABC-proteiinit auttavat monia eliöitä selviytymään sekä lisääntymään ympäristössä, jossa esiintyy ihmisperäisiä tai luonnollisia myrkyjä (Bard 2000, Smital ym. 2004). ABC-proteiinien tarkkaa toimintamekanismia tai spesifisyyttä substraateina toimiville poistettaville aineille ei ole vielä tarkoin määritetty (Smital ym. 2004). Lisää tutkimusta tarvitaan MXR-mekanismien toiminnan ymmärtämiseen sekä erityisesti siihen, millaiset yhdisteet kykenevät estämään MXR-mekanismien ABC-proteiinien toimintaa (Moreau ym. 2008).

1.2 MXR-mekanismien proteiinit ja proteiinin rakenne

MXR-mekanismien proteiinit luokitellaan kuuluvaksi ATP:tä sitovaan ja ATP:n hydrolysoitumisesta energiaa saavaan ABC-superperheeseen (ATP-binding cassette), joihin tiedetään tällä hetkellä kuuluvan kahdeksan toiminnallisesti erilaista proteiiniyhmää/-perhettä (ABCA – ABCH). Näistä B-, C- ja G-ryhmän proteiinit hoitavat haitallisten aineiden kuljetusta solukalvon lävitse ulos solusta (Dean ym. 2005, Sheps ym. 2004). ABC-proteiinien jako alaperheisiin/proteiiniiniryhmiin tapahtuu esimerkiksi niiden proteiinin aminohappotähteen nukleotideja sitovan domeenin, proteiinin rakenteen ja substraattispesifisyyden sekä geenisekvensien eroavaisuuksien perusteella (Van Veen & Konings 1998, Homolya ym. 2003). ABC-proteiinit voidaan jakaa kahteen ryhmään, riippuen mihin suuntaan ne kuljettavat substraattejaan solukalvon lävitse, eli tuoja/importiini- (import) - ja viejä/eksportiini- (export) proteiineiksi. ABC-eksportiinit kuljettavat aineita solun sytoplasmasta tai lipidikalvolta ulos. Importiinit hoitavat eri aineiden, kuten ravinteiden kuljetusta soluihin (Hollenstein ym. 2007 a). Importiini-proteiineja tiedetään esiintyvän vain prokaryooteilla, kun taas solusta aineita

ulosvieviä eksportiiniproteiineja esiintyy kaikilla eliöryhmillä (Hollenstein ym. 2007 b, Locher 2009).

ABC-proteiinien rakennetta on määritetty röntgenkristallografian avulla saatujen kuvien perusteella. Rakeenteellisesti ABC-proteiinit omaavat samankaltaisen neljästä proteiindomeenista koostuvan rakenteen. Toimiva ABC-proteiini koostuu kahdesta transmembraanidomeenista (TMD), jotka muodostavat käytävän kuljettavalle aineelle sekä kahdesta sytosolisesta nukleotideja sitovasta domeenista (NBD/ATP-binding cassette ABC), joissa ATP:n sitoutuminen ja hydrolyysi tapahtuvat (kuva 1) (Hollenstein ym. 2007 a, Locher 2009). Importiineissa TMD:t ja NBD:t koostuvat erillisistä polypeptiiketjuista, kun taas eksportiineissa neljä eri domeenia muodostuu samasta polypeptidiketjusta. Importiiniproteiinit omaavat myös erillisen substraatteja sitovan domeenin (SBP), joka sitoo liuenneita aineita ja kuljettaa niitä proteiinin ulkopinnalle (Locher 2009).



Kuva 1. A) ABC-importiiniproteiini. Proteiinissa esiintyy substraatteja sitova domeeni (SBP), joka tuo hydrofiilisiä substraatteja solukalvon domeeneille (TMD). Substraatti kulkeutuu TMD-domeenien välistä ”translokaatiopolkua” pitkin soluun. Domeenit koostuvat erillisistä osista tuojaproteiineissa.

B) ABC-viejäproteiini, jossa TMD:t ovat liittyneinä ABC-domeeneihin. Poistettava vierasaineena toimivat esim. syöpälääkkeet (Locher 2009).

Hydrofobiset TMD:t ylittävät solukalvon useita kertoja α -kierteiden avulla. TMD:n primäärisekvenssit sekä rakenteet ovat suhteellisen vaihtelevia eri proteiinien välillä, jopa niiden solukalvon heliksien lukumäärä vaihtelee. Ne voivat sisältää jopa 10 – 20 solukalvon heliksiä, riippuen niiden siirrettävien substraattien massasta sekä kemiallisista ominaisuuksista (Hollenstein ym. 2007 a). TMD:t määrittävät siirtäjäproteiinien substraattispesifisyyden niiden substraatteja sitovien geenialueiden kautta, jotka vaihtelevat paljon eri proteiinien välillä (Hollenstein ym. 2007 b, Jones & George 2004).

ABC-proteiinit eivät pelkästään vaikuta eri aineiden siirtoon ja poistoon solukalvon lävitse, niillä on soluissa myös monia muita tehtäviä. ABC-proteiinit osallistuvat moniin solutasoisiin prosesseihin ja niiden säätelyyn (Dassa & Bouige 2001, Homolya ym. 2003). ABC-proteiinit toimivat mm. ionikanavina ja niiden säätelijöinä, solukalvon reseptoreina, ribosomien kokoamisessa sekä translaatiossa. Esimerkiksi ABCB1-ryhmä toimii myös nisäkkäiden soluissa sappisuolojen ja rasvahappojen sekä hiivoilla feromonien kuljetuksessa (Dean ym. 2001, Sheps ym. 2004). Monet sairaudet voivat johtua puutteellisen ABC-proteiinien toiminnan seurauksena. Esimerkiksi ihmisellä esiintyvä kystinen fibroosi johtuu mutaatiosta, jossa ABC-proteiinin tehtävä on toimia kloridikanavana (Dean ym. 2001, Higgins 2007).

Yleisimpiä ja eniten tutkittuja MXR-mekanismia hoitavia ABC-proteiineja ovat kahden pääluokan proteiinit: 170 kDa P-glykoproteiinit (P-Gp1/ABCB1/MDR1) sekä monilääkeresistenssiin liitännäiset proteiinit (multidrug resistance-associated proteins) (MRP/ABCC) (Van Veen & Konings 1998, Homolya ym. 2003, Deeley ym. 2006, Sturm ym. 2009). P-glykoproteiinit (ABCB1) omaavat laajan substraattispesifisyyden ja pystyvät tunnistamaan laajasti rakenteellisesti ja toiminnaltaan erilaisia substraatteina toimivia aineita, kuten erilaisia lääkkeitä ja ympäristömyrkyjä. Ne estävät myös esimerkiksi solun omien aineenvaihdunnan tuotteiden sekä fosfolipidien kertymistä soluihin. P-gp:n substraatteina toimivat yhdisteet ovat yleensä hydrofobisia ja rakenteeltaan tasomaisia luonnollisia tuotteita, jotka toimivat usein myös detoksifikaatioprosessien entsyymien, kuten sytokromi P450:n, substraatteina (Bard 2000, Smital ym. 2004). P-gp:n substraattit ovat varaukseltaan positiivisia tai neutraaleita (Homolya ym. 2003). P-glykoproteiineja on todettu esiintyvän pääosin maksan ja veri-aivo-esteen endoteelisissa soluissa, eli soluissa, joissa niillä uskotaan olevan erityisen merkittävä rooli estämässä myrkyllisten aineiden pääsyä sisälle soluihin (Dean ym. 2001).

MR-proteiinit (MRP, ABCC) (190-kDa) koostuvat 1531 aminohaposta ja omaavat geenisekvenssiltään vain 15 % samankaltaisuuden P-gp:ihin. MR-proteiinien substraatteina toimivat usein orgaaniset anionit tai negatiivisesti varautuneet molekyylit (Litman ym. 2001). Osa MR-proteiineista toimii samoin kuin P-gp:t estämällä vierasaineiden pääsyä soluihin tai poistamalla soluihin päässeitä vierasaineita, joita ei ole muokattu detoksifikaatioprosesseissa (Deeley ym. 2006). Merkittävin rooli MR-proteiineilla on kuitenkin solun omien endogeenisten aineenvaihdunnan tuotteiden ja solun sisälle päässeiden lipofiilisten vierasaineiden poistossa. Kyseiset aineet on ennen MRP-välitteistä poistoa muokattu vierasaineiden metaboliasta huolehtivan CYP450-järjestelmän I ja II. vaiheen detoksifikaatioprosesseissa (Bard 2000, Homolya ym. 2003, Deeley ym. 2006).

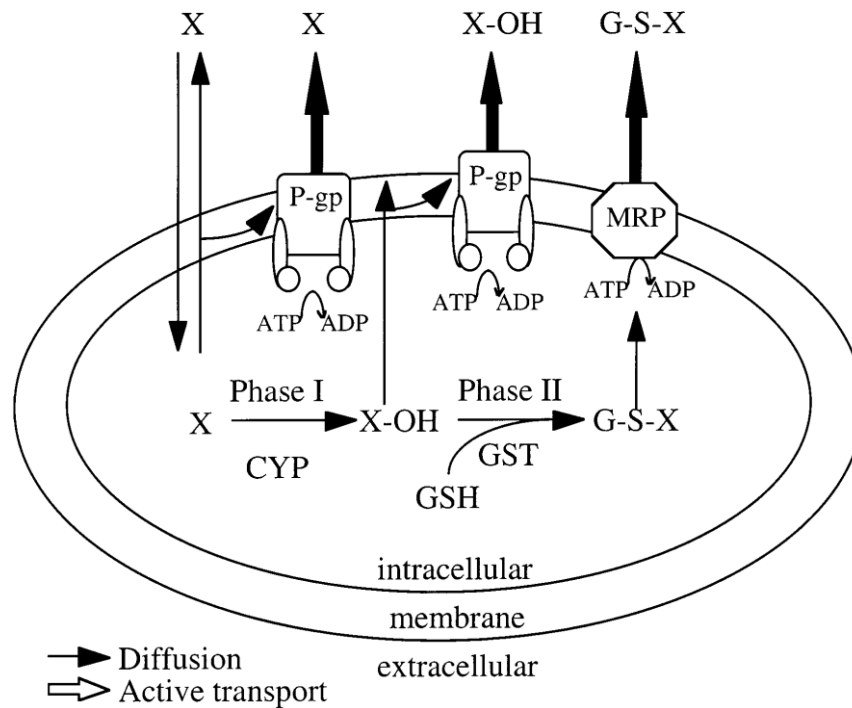
1.3 MXR-mekanismin toimintaperiaate

MXR-mekanismin toimiessa tehokkaasti ainoastaan muutamat toksiset aineet pääsevät soluun. ABC-proteiinien on todettu pystyvän poistamaan rakenteellisesti ja toiminnallisesti hyvin erilaisia substraatteina toimivia aineita solukalvon läpi konsentraatiogradienttia vastaan ulos solusta perustuen ATP:n hydrolysoinnista saatavaan energiaan (Bard 2000). ABC-proteiinien toiminnan energiariippuvaisuus on todistettu sen kyvystä toimia vain riittävän korkeassa lämpötilassa (21 °C). Matalammassa (4 °C) lämpötilassa proteiinit eivät kykene poistamaan substraattina toimivaa ainetta soluista. Einicker-Lamas (2003) on tutkinut MXR-mekanismin energiariippuvaisuutta yksisoluisessa alkueläimellä (*Euglena gracilis*).

Litmanin ym. (2001) ja Locherin ym. (2009) mukaan aineiden ulosvirran tiedetään aiheutuvan röntgenkristallografin avulla saatujen kiderakennekuvien perusteella proteiinien rakenteen konformaatiomuutoksesta, jolloin substraatin sitoutuessa solukalvolle proteiinin aineita sitovan domeenin ja nukleotideja sitovan domeenin välinen vuorovaikutus lisääntyy. Nukleotideja sitovassa domeenissa sytoplasman puolella, tapahtuu ATP:n sitoutuminen ja hydrolysoituminen, joka aiheuttaa hetkellisen konformaation muutoksen TMD:n rakenteissa. Hollesteinen ym. (2007 a) mukaan NBD:issä tapahtuu tällöin 10 – 15 Å:n mittaista sulkeutumista verrattuna niiden normaaliin tilaan. Toisiaan lähestyvät helikaasit kääntävät tällöin TMD:itä sisäänpäin olevasta konformaatiosta ulospäin suuntautuvaan konformaatioon. ABC-importiinit voivat tällöin

ottaa vastaan substraatteja niitä sitovilta proteiineidomeiineilta. ABC-eksportiinit taas poistavat soluihin kertyneitä aineita ulos soluista (Rees ym. 2009). ATP:n epäorgaanista fosfaattia (P_i) vapautettuaan siirtäjäproteiinit voivat palata takaisin sisäänpäin kääntyneeseen konformaatioon. Importiinit voivat siten vapauttaa substraatin sytoplasmaan ja eksportiinit voivat ottaa uuden substraatin niiden korkean affiniteetin omaaviin sitoutumiskohtiin (Hollestein ym. 2007 a). Importiini- sekä eksportiiniproteiinien substraattien kuljetusmekanismien on todettu olevan samanlainen johtuen niiden samankaltaisesta proteiinirakenteesta (Rees ym. 2009).

Vaikka MXR-mekanismien pääasiallinen tehtävä on estää haitallisten aineiden pääsyä soluihin, on se myös yhteydessä vierasaineiden ja solun omien haitallisten aineenvaihdunnan/metabolian tuotteiden poistoon soluista entsymaattisesti toimivan sytokromi P450-järjestelmän avustuksella. Solun sisältäpäin tapahtuvaan vierasaineiden tai solun omien aineenvaihdunnan tuotteiden poistoon liittyy tällöin usein aineiden entsymaattinen muutos tai nk. detoksifikaatio, jotka muuttavat aineita vähemmän myrkyllisiksi ja helpommin poistettaviksi hydrofiilisemmiksi yhdisteiksi. Vierasaineita muokataan tällöin I-vaiheen tai II-vaiheen detoksifikaatio-entsyymien avulla (Bard 2000, Timbrell 2001, Epel ym. 2008). Solun sisälle kertynyt aine tai solun oma endogeeninen substraatti voidaan poistaa solusta I-vaiheen avulla, sytokromi P450-järjestelmässä tapahtuvassa hydroksylaatioissa ja II-vaiheen avulla, kuten glutationin konjugaatiolla, jolloin detoksifikaatio entsyymien vaikutuksesta aine muutetaan hydrofiilisempaan muotoon (kuva 2). II-vaiheen konjugoidut aineet poistetaan usein MRP-välitteisesti. MR-proteiinit tunnistavat ja poistavat tällöin aineita, jotka ovat konjugoituneita II-vaiheen entsymaattisen muutoksen avulla, kuten glutationeilla, glukoronideilla tai sulfaattiestereillä (Van Veen & Konings 1998, Homolya ym. 2003.) P-gp-välitteinen vierasaineiden poistaminen soluista ei taas ole riippuvaista solun entsymaattisesta detoksifikaatiosta. Muokkaamaton vierasaine toimii tällöin proteiinin substraattina, jolloin solukalvolla tapahtuva transformaatio ei ole edellytys aineen poistolle solusta, toisinkuin MRP-välitteisessä aineen poistossa (Bard 2000).



Kuva 2. Vierasaineen (X) poistaminen solusta solukalvon aktiivisten MXR-roteiinien, MRP ja P-gp, sekä I- ja II-vaiheen detoksifikaatio-entsyymien avulla. Kuvassa vähäinen määrä hydrofobista ainetta (X) liikkuu solukalvon läpi ja pääsee kertymään soluun vain vähän, kun taas suurempi konsentraatio ainetta (X) kertyy soluun. Aineen poistamiseksi solusta, se metaboloidaan yhden tai useamman CYP-entsyymin toimesta. Hydrolysoitu aineenvaihdunnantuote (X) poistetaan joko P-gp-välitteisesti tai muokataan edelleen GST:n katalysoimalla glutationikonjugaatiolla (GSH). Glutationikonjugoitu aine (G-S-X) poistetaan solusta MRP-välitteisesti (Bard 2000).

1.4 MXR-mekanismien inhiboiminen, inhibiittorit sekä substraatit

MXR-mekanismien aineiden ulosvirtaa hoitavien ABC-proteiinien toiminta voi inhiboitua erilaisten sekä luonnollisten että ihmisperäisten yhdisteiden toimesta, jolloin toksisia aineita pääsee kertymään sisälle soluihin (Epel ym. 2008). Kaksi merkittävintä syytä näiden ABC-proteiinien tehokkaan toiminnan estymiseen on myrkyllisen aineen suuri konsentraatio, joka ylittää proteiinien toimintakapasiteetin, jolloin proteiinit eivät pysty enää estämään kaikkien molekyylien sisäänkäyntiä sekä vierasaineiden molekyyli rakenne, jota ABC-proteiinipumput eivät pysty tunnistamaan. Esimerkiksi monet ihmisperäiset kemikaalit, kuten diklooridifenyylitrikloorietaani (DDT) ja polyklooratut bifenyylit (PCB) pystyvät kulkeutumaan vapaasti solukalvon lävitse, koska ne ovat molekyyli rakenteeltaan lipofiilisiä (Timbrell 2001, Epel ym. 2008).

Aineita ja yhdisteitä, joiden tiedetään häiritsevän ja estävän MXR:ää hoitavien ABC-proteiinien toimintaa sekä mahdollistavan substraatteina toimivien yhdisteiden pääsyä

soluihin, kutsutaan inhibiittoreiksi tai ns. kemiallisiksi herkistäjiksi (chemosensitizers). Nämä aineet toimivat usein epäsuorasti toksisina yhdisteinä mahdollistaen haitallisten substraatteina toimivien aineiden pääsyä soluihin. Kemiallinen herkistäminen (kemosensitaatio) onkin keskeinen ominaisuus MXR-mekanismia haittaavien ympäristökemikaalien osalta. Kemiallisten herkistäjien toiminnan tutkiminen on kuitenkin vielä melko varhaisessa vaiheessa (Luckenbach ym. 2004, Epel ym. 2008). MXR:n toimintaa estävät aineet voidaan luokitella kilpaileviksi ja ei-kilpaileviksi inhibiittoreiksi. Kilpailevat inhibiittorit haittaavat ABC-proteiinien kykyä tarttua substraatteihin sitoutumalla itse niiden sitoutumiskohtiin. Ne voivat myös haitata proteiinipumppujen toimintaa saturoimalla niitä. Tällöin poistettavaksi tarkoitettujen substraattina toimivan haitallisen aineen sitoutuminen ja aktiivinen kuljetus solukalvon läpi estyy. Tyypillinen esimerkki kilpailevasta inhibiittorista on verapamil, jota usein käytetäänkin laboratorioskokeissa malli-inhibiittorina tutkittaessa ABCB1-proteiiniryhmän esiintymistä. Ei-kilpailevat inhibiittorit estävät taas esimerkiksi proteiinipumppujen ATPaasientsyymien aktiivisuutta, jolloin proteiinien ATP:n energiasta riippuvainen aineiden kuljetus solukalvon lävitse estyy. Esimerkiksi usein käytetty testi-inhibiittori syklosporiini A toimii ei-kilpailevana inhibiittorina (Epel ym. 2008, Faria ym. 2011). Myös proteiinikinaasi C:n säätelyyn vaikuttavien inhibiittoreiden, kuten staurosporiinin, on todettu vähentävän P-gp-aktiivisuutta (Kurelec 1995).

Litmanin ym. (2001) mukaan usein ongelmana tutkittaessa MXR-mekanismien toimintaa on erottaa toimiiko aine ABC-proteiinien substraattina vai ABC-proteiinien toimintaa estävänä inhibiittorina. Yleisesti substraatiksi luokitellaan aine, joka poistetaan solusta ABC-proteiinipumppujen avulla tai aine, joka toimii katalyyttinä proteiinien ATPaasin aktiivisuudelle. Substraattina toimivat aineet voivat kuitenkin vaikuttaa P-gp:n ATPaasien aktiivisuuteen stimuloiden niitä alhaisissa pitoisuuksissa, mutta inhiboiden suuremmissa pitoisuuksissa. Esimerkiksi usein MXR-mekanismien aktiivisuutta mittaavissa testeissä inhibiittorina käytetyn verapamilin on todettu aktivoivan P-gp:n ATPaaseja alhaisissa pitoisuuksissa, mutta inhiboivan korkeissa pitoisuuksissa (Ambudkar ym. 1999, Litman ym. 2001). Zajan ym. (2011) mukaan solukalvolta siirrettävän substraatin läsnäolo kiihdyttää proteiinin ATPaasin aktiivisuutta. Inhibiittorina toimivan aineen läsnäolo taas vähentää ATPaasien aktiivisuutta, joko estämällä ATP:n hydrolysoitumista tai sitoutumalla itse siirtäjäproteiinin aktiivisiin kohtiin suurella affiniteetillä. Litmanin ym. (2001) mukaan verapamilin toiminta ABC-proteiinien inhibiittorina perustuu osaksi myös sen vahvaan

lipofiilisyyteen, jolloin se pystyy läpäisemään solukalvon helposti ja diffunsoitumaan takaisin solukalvolle, vaikka olisikin poistettu P-gp-välitteisesti. Tällöin P-gp:n ATPaasien aktiivisuus on tarpeetonta verapamilin liikkua jatkuvasti edestakaisin solukalvolla.

ABC-proteiinien inhibiittoreina toimiviksi aineiksi on tunnistettu hyvin laaja määrä kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisia ihmisperäisiä sekä luonnollisia aineita ja yhdisteitä, kuten torjunta-aineita, pestisidejä, raskasmetalleja, hajusteita, perfluoroyhdisteitä, lääkeaineita, polyaromaattisia hiilivetyjä ja jopa nanopartikkeleita (Altenburger ym. 2003, Luckenbach ym. 2004, Smital ym. 2004, Epel ym. 2008, Anselmo ym. 2012). Smitalin ym. (2004) mukaan mikäli ympäristöön pääsee vaikka yksikin ABC-proteiinien inhibiittorina toimiva muutoin myrkytön aine, voi se aiheuttaa saastuneessa ympäristössä huomattavan suurta toksista vaikutusta eliöihin ympäristössä ennestään esiintyvien toksisten aineiden päästessä kertymään eliön soluihin. Tiedetään, ettei ympäristössä voi esiintyä pelkästään vain yksittäisiä eliöille toksisia aineita tai yhdisteitä. Ympäristössä esiintyvien luonnollisten sekä ihmisperäisten aineiden yhteisvaikutus voi usein olla eliölle monin kerroin haitallisempaa ja usein myös vaikeasti etukäteen arvioitavissa (Altenburger ym. 2003, Epel ym. 2008, Vandenbrouck 2009). Eräs syy MXR-mekanismia hoitavien ABC-proteiinien suureen määrään voi olla niiden kyky tunnistaa vain tietynlaisia substraatteina toimivia aineita tai se, että eri proteiinit voivat vaikuttaa eri tavoin samaan substraattiin (Epel ym. 2008, Lee ym. 2004).

Litmanin ym. (2001) ja Epelin (1998) mukaan P-glykoproteiinien yksi keskeisimpiä ominaisuuksia on niiden laaja substraattispefisyyys. P-glykoproteiinien substraattispefisyyttä ei ole vielä kuitenkaan pystytty tarkoin määrittämään. Substraatit eroavat mm. niiden vaikutuskohteiden sekä kemiallisten rakenteiden ja ominaisuuksien perusteella (Endicott & Ling 1989, Bard 2000). P-gp:n substraateille yhteisiä ominaisuuksia on hydrofobisuus tai amfipaattisuus, korkea molekyylipaino (massa enemmän kuin 800 Da) sekä kationisuus tai neutraali varaus, mutta ei koskaan anionisuus (Endicott & Ling 1989, Litman ym. 2001, Higgins 2007). Bainin ym. (1997) mukaan substraatit, jotka voidaan P-glykoproteiinien toimesta poistaa soluista omaavat myös alemman lipofiilisyyttä määrittävän $\log K_{ow}$ -arvon sekä vetysidospotentiaalin kuin substraatit, joita P-gp:t eivät pysty poistamaan. Kyseiset ominaisuudet ovat yhteydessä molekyylien vesiliukoisuutta lisäävään hydroksylaatioon. Viimeisen vuosisadan aikana tieto P-gp:n vastustuskyvystä on laajentunut syöpälääkkeinä käytetyistä vinka-alkaloideista

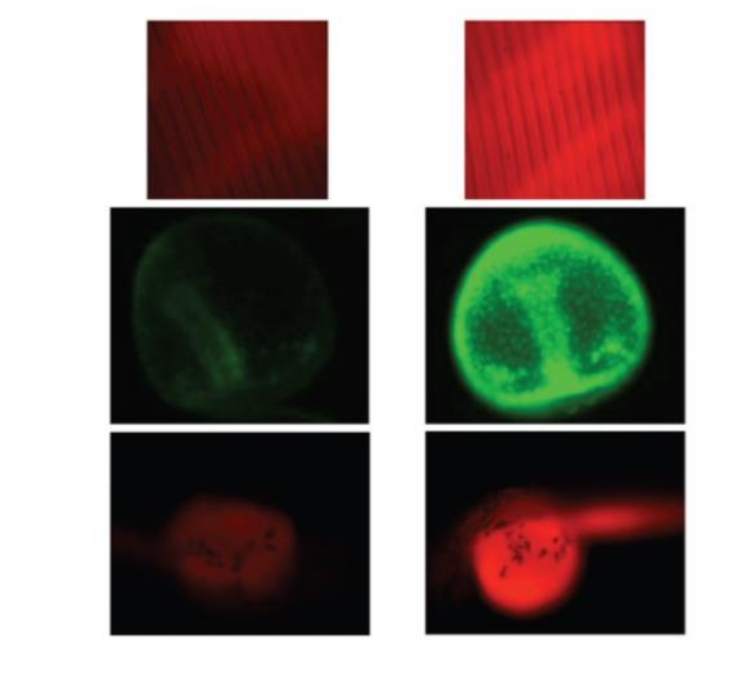
ja antrasykleeneistä moniin muihin kemiallisiin yhdisteisiin. P-glyko-proteiinit pystyvät estämään mm. sytotoksisten molekyylien lisäksi, esim. antibioottien, malarialääkkeiden ja herbisidien kertymistä soluihin (Higgins 2007). Eufemian & Epelin (2000) mukaan altistumisen DDE:lle, nautriumarseniitille ja kadmiummetallille on taas todettu lisäävän P-gp:n aktiivisuutta ja substraattien ulosvirtausta soluista, vaikka näiden aineiden ei tiedetä toimivan varsinaisesti P-gp:n substraatteina. Lisäksi myös epäorgaanisen elohopean, pentokloorifenolin (PCP) sekä herbisidinä käytetyn DCPA:n (Dacthal) tiedetään lisäävän MXR-mekanismien ABC-proteiinien indusoitumista (Navarro ym. 2012, Campos 2014). Kingtong ym. (2007) ja Costan ym. (2012) mukaan myös vesiympäristöissä usein esiintyvät myrkylliset tributyylitina (TBT) sekä benzo[a]pyreeni (BaP) indusoivat ABC-proteiinien indusoitumista niiden konsentraatiosta riippuen testatuilla vesieläimillä Niilin tilapialla (*Oreochromis niloticus*) sekä osterilla (*Saccostrea forskali*). Usein ympäristömyrkkujen haitallisuus tulee ilmi vasta riittävän korkeissa pitoisuuksissa, jotka ylittävät ABC-proteiinien toimintakapasiteetin. Esimerkiksi Xu ym. (2014) tutkineet P-gp-inhibiittorina toimivan verapamilin vaikutusta yhdessä eri biosidien kanssa merisiilin (*Strongylocentrotus intermedius*) 0 – 50 h ikäisillä alkioilla mitattuna *S. intermedius*in alkion kehitystä 50 % haittaavana EC₅₀-arvona. He ovat huomanneet samanaikaisen verapamil- ja biosidialtistuksen aiheuttaman toksisen vaikutuksen olevan tapauskohtaista, riippuen siitä toimiiko biosidi P-gp:n substraattina. Mikäli biosidi toimii P-g-proteiinin substraattina ja poistuu normaalisti P-g-proteiinin toiminnan vaikutuksesta, sen toksinen vaikutus eläimeen myös on huomattavasti suurempi P-gp:n inhiboituessa.

MXR-mekanismien toiminnan voimistumisen on todettu lisääntyvän myös erilaisten stressitekijöiden, kuten soluvaurion tai lämpötilan nousun seurauksena (Smital & Kurelec 1998 b, Bard 2000, Eufemia & Epel 2000, Minier ym. 2000). Eufemian & Epelin (2000) mukaan MXR-mekanismien ja P-gp:n aktivoitumista ei siten voida aina pitää indikaattorina sille, että eläin olisi altistunut jollekin kemikaalille.

1.5 MXR-mekanismien toiminnan testaaminen

MXR-mekanismien toimintaa ja eri ABC-proteiiniryhmien toiminnan aktiivisuutta voidaan mitata kokeellisesti kahdella tapaa, määrittämällä erilaisten aineiden biokertyvyyttä soluihin tai ABC-proteiinien toiminnasta johtuvaa aineiden ulosvirtausta soluista. Aineiden biokertyvyyden sekä ulosvirtauksen mittausta tapahtuu yleensä proteiinien substraatteina toimivien fluoresoivien väriaineiden, kuten rodamiinien tai kalseiini-AM:n, aiheuttaman

solunsisäisen fluoresenssin tai radioaktiivisten aineiden, kuten ^{14}C vinblastiinin avulla. Biokertyvyyden määrittäminen voidaan tehdä väriainealtistuksen jälkeen elävistä ja läpikuultavista soluista tai kudoksista (*in vivo*), kuten kidusten soluista, verisoluista tai alkioista, tarkastelemalla solunsisäistä fluoresenssia fluoresenssimikroskoopilla tai eläimen kudosten homogenaatista fluorometrilaitteen avulla (Smital & Kurelec 1998 a, Bard 2000, Epel 2008). Tällöin MXR:n toimintaa ja aktiivisuutta voidaan tarkastella solujen fluoresenssin voimakkuuden avulla. Mikäli solukalvon ABC-proteiinit toimivat tehokkaasti, vain vähän substraattina toimivaa fluoresoivaa väriainetta kertyy soluihin ja solujen fluoresenssi on heikkoa. ABC-proteiinien toiminnan inhiboitua taas soluihin pääsee kertymään substraattina toimivaa väriainetta ja solujen fluoresenssi on voimakkaampaa (kuva 3) (Epel ym. 2008).



Kuva 3. Esimerkki fluoresenssimikroskoopilla otetuista kuvista, joissa substraattina käytettyä fluoresoivaa väriainetta rodamiini B:tä (punainen väri) sekä kalseiini-Am:aa (vihreä väri) kertyy simpukan kidusten sekä merisiilin ja seeprakalan alkioiden soluihin. Vasemman puoleisissa kuvissa näkyy MXR-proteiinien tehokas toiminta, jolloin solun sisälle on päässyt kertymään vain vähän fluoresoivaa väriainetta. Oikeanpuoleisissa kuvissa taas MXR-proteiinien toiminta on inhiboitunutta, jolloin solujen sisälle on kertynyt enemmän fluoresoivaa väriainetta (Epel ym. 2008).

Aineen ulosvirtauksen määrittämisessä aiemmin eliöiden solujen ja kudosten sisälle kertyneen fluoresoivan väriainesubstraatin ulosvirtauksen määrää määritetään eliön kasvatusliuoksesta. Fluoresoivan väriaineen ulosvirtauksen määrä on suoraan verrannollinen P-g-proteiinien ja muiden ABC-proteiinien aktiivisuuteen. Aktiivisesti

toimivien ABC-proteiinien vaikutuksesta kasvatusliuokseen erittyy enemmän fluoresoivaa väriainetta. Tämän tekniikan avulla koe-eläimiä ei tarvitse vahingoittaa kokeen aikana ja eläimet ovat uudelleen käytettävissä myös seuraaviin testeihin (Smital & Kurelec 1998 a, Bard 2000).

Kummassakin tapauksessa fluoresoivan väriaineen biokertyvyyttä voidaan mitata myös ABC-proteiinin inhibiittorina toimivien aineiden kanssa. Käytetyn inhibiittorina toimivan aineen tulisi estää ABC-proteiinien toimintaa, jolloin substraattina toimivaa väriainetta pääsee kertymään eläimen soluihin tai kudoksiin ja sitä esiintyy myös vähemmän altistusliuoksessa (Essodaigui ym. 1998, Smital & Kurelec 1998 a, Bard 2000). Käytetyt inhibiittorit ovat usein spesifisiä vain tietyille ABC-proteiiniryhmille. Esimerkiksi ABCB1-ryhmän osalta inhibiittorina käytetään yleisesti syklosporiinia ja sen johdannaista PSC833:a, reversiini 205:a tai verapamilia, ABCC-ryhmän osalta esim. MK571:ta (Epel 2007, Luckenbach ym. 2008). Mahdollista on kuitenkin, että inhibiittorit vaikuttavan samanaikaisesti moniin eri ABC-proteiiniryhmiin. Tarpeeksi suuret inhibiittoripitoisuudet pystyvät siten inhiboimaan useita ABC-proteiiniryhmiä. Esimerkiksi verapamilin on todettu estävän myös MR-proteiinien toimintaa suuremmilla pitoisuuksilla (Litman 2001, Epel 2007, Faria ym. 2011).

ABC-proteiinien esiintymistä eliöillä voidaan tutkia myös etsimällä kyseisiä proteiineja koodaavia geenisekvenssejä eliöiden perimästä esim. PCR-menetelmien avulla. Tällöin luodaan lähilajin sekvenssien perusteella alukkeet, jotka tunnistavat PCR:ssä halutun geenisekvenssin ja saavat aikaan PCR-reaktion etenemisen. Moreay ym. (2008) mukaan vielä tiedetään vain vähän MRP:n geenisekvenssien esiintymisen osalta vesieläimillä. Tämän vuoksi mallialukkeina on jouduttu käyttämään geenisekvenssejä taksonomisesti hyvinkin erilaisilta lajeilta. Käytetyt mallialukkeet ovat otettu mallipankeista. Suuri yhdenmukaisuus aminohappojen ja nukleotidien osalta osoittaa kuitenkin selvästi esimerkiksi MR-proteiineja esiintyvän myös vesieläimillä, kuten esimerkiksi heidän työssään tutkitulla keltajuovamullolla (*Mullus surmuletus*) (Sauerborn ym. 2004).

ABC-proteiinien ilmenemistä eliöillä tutkitaan western blot-menetelmillä ja sekä entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä eli ELISA-menetelmillä. Tällöin tutkitaan proteiinien esiintymistä eliössä spesifien vasta-aineiden avulla, jotka tunnistavat kyseiset proteiinit (Smital & Kurelec 1998 a, Smital ym. 2000, Moreay ym. 2008). Myös

selkärangattomilla vesieläinlajeilla on tunnistettu monia nisäkkäiden ABC-proteiinin kanssa vastaavia proteiineja (Smital & Kurelec 1998 a). Usein on kuitenkin mahdollista, ettei proteiineja pystytä ilmentämään tutkittavalla eliöllä johtuen sopimattoman, kuten toisella lajilla esiintyvän vasta-aineen käytöstä (Smital ym. 2000).

1.6 MXR-mekanismien toiminta ja ABC-proteiinien esiintyminen vesieläimillä sekä vesikirpulla *Daphnia magna*

MXR-mekanismien ja sitä hoitavien ABC-proteiinien tutkiminen on tarpeellista erityisesti vesieliöiden suhteen, sillä myrkyllisiä aineita kertyy usein paljolti vesistöihin ja vesieliöt ovat siten erityisen alttiita altistumaan haitallisille aineille. Useat vesi- ja sedimenttinäytteet kertovat vesistöjen sisältävän monia MXR-mekanismiin haitallisesti vaikuttavia aineita, eli ns. kemiallisia herkistäjiä ja ABC-proteiinien inhibiittoreita, jotka lisäävät sekä solujen omien haitallisten endogeenisten että ulkopuolisten vierasaineiden akkumulaatiota soluihin (Smital & Kurelec 1997, Kurelec ym. 2000, Smital ym. 2004). Vesistöjen saastuneisuudesta huolimatta vesieliöt pystyvät monesti kuitenkin elämään sekä lisääntymään elinympäristössään, jossa esiintyy toksisia yhdisteitä. Yhtenä merkittävänä syynä eliöiden selviytymiseen saastuneessa ympäristössä on toimiva MXR-mekanismi. Vesieläinten kudoksista on usein löydetty merkittävästi vähemmän epäpuhtauksia kuin niiden elinympäristön näytteissä (Toomey & Epel 1993, Smital & Kurelec 1998 b, Smital ym. 2004). Bardin (2000) mukaan useat laboratorio- ja kenttäkokeet ovat osoittaneet MXR-mekanismien aktiivisuuden voimistumista sekä korkeampien P-g-proteiinipitoisuuksien esiintymistä erityisesti saastuneilla alueilla elävillä vesieläinpopulaatiolla. Myös Smital ja Kurelec (1998 b) ovat todenneet saastuneelle vedelle altistumisen lisäävän MXR-mekanismien aktiivisuutta. He ovat todenneet MXR-mekanismien toimivan tehokkaammin saastuneella alueella elävällä merietanapopulaatiolla (*Monodonta turbinata*) tutkimalla säilyketehtaan jätevedelle altistuneen *M. turbinata* populaation MXR-mekanismien ilmentymistä ja voimistumista verrattuna saastumattomalla alueella elävään saman lajin populaatioon. Saastumattomalla alueella eläneeseen *M. turbinata* populaatioon kertyi tällöin altistuskokeessa 281 % enemmän ABC-proteiinien substraattina käytettyä vinkristiiniä ($^3\text{H-VCR}$) kuin saastuneella alueella eläneeseen populaatioon.

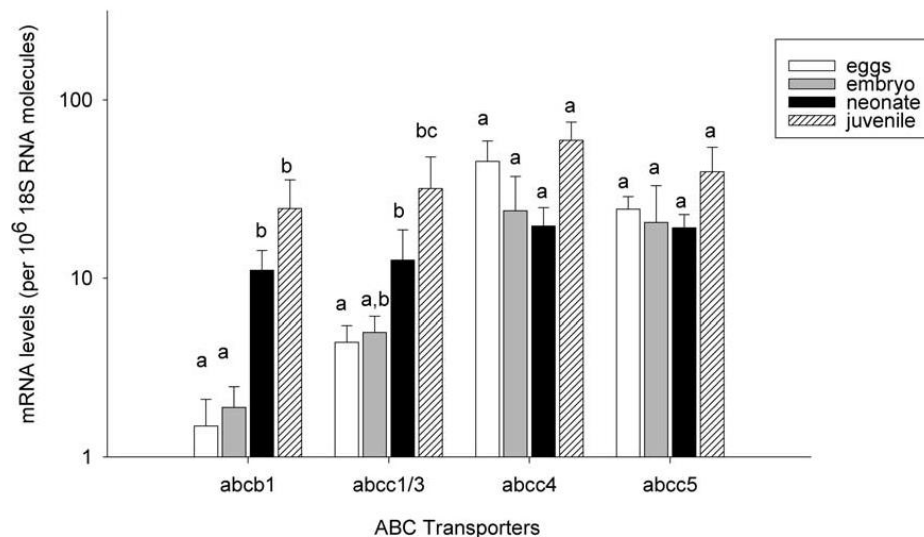
Eräs luonnollinen esimerkki ABC-proteiinien inhibiittorina toimivasta aineesta vesistöissä on luonnon orgaanisen aines (NOM), jonka on todettu haittaavan MXR-mekanismien

aktiivisuutta, jopa NOM:in luonnossa esiintyvissä pitoisuuksissa 0,6 ja 1,2 mmol/L tehdyissä 24 h altistuksissa. Syytä miksi NOM toimii ABC-proteiinien inhibiittorina, ei vielä kuitenkaan tiedetä. Mahdollisesti sen kyky toimia proteiinien inhibiittorina voi johtua sen sisältämistä funktionaalisista ryhmistä (Timofeyev ym. 2007). Vastaavasti taas makeanveden yksisoluisen ripsieläimen (*Tetrahymena tyripormis*) on todettu olevan vastustuskykyinen PAH-aineille johtuen P-g-proteiinien esiintymisestä ja aktiivisesta toiminnasta (Bamdad ym. 1999).

Bardin (2000) mukaan tunnetuimman ABC-proteiiniryhmän, ABCB1/P-gp:n kaltaisia geenejä, proteiineja sekä vierasaineiden poistamisen aktiivisuutta on löydetty melkein 40 makean ja suolaisen veden lajilla. Myös tehdyt kokeelliset testit monilla selkärangattomilla sekä meriveden että makeanveden vesieläimillä ovat osoittaneet P-gp-inhibiittoreiden aiheuttavan pitoisuuden kasvusta riippuvaista substraatteina käytettyjen rodamiinien, kalseiini Am:n ja vinkristiinien kertymistä vesieläinten soluihin, mikä todistaa vesieläimillä esiintyvän aktiivista siirtäjäproteiinien toimintaa. MXR-mekanismen toiminnan testauksessa käytetyt inhibiittorit ovat olleet tyypillisiä nisäkkäillä käytettyjä eri ABC-proteiiniryhmien inhibiittoreita kuten verapamil, syklosporiini A, starurosporiini (Smital & Kurelec 1998 a, Bard 2000, Smital ym. 2004). Vesieläinten kudoksista löydettyjen ABC-proteiinien on todettu myös olevan western blot-menetelmillä tehtyjen tutkimusten perusteella usein homologisia nisäkkäiden soluissa esiintyvien P-g-proteiinien kanssa (Bard 2000). Myös ABCC/MR-proteiinien osalta tehdyissä tutkimuksissa on löydetty MP-proteiinien geenejä esiintyvän ja toimivan sekä makeanveden että meriveden vesieläimillä, kuten simpukoilla sekä kaloilla (Sauerborn ym. 2004).

Monilla makeanveden selkärangattomilla eläinlajeilla, kuten vesikirpulla, on tehty vasta vähän tutkimusta MXR-mekanismien ja ABC-proteiinien toiminnasta. Sturm ym. (2009) ovat tutkineet MXR-mekanismien kuuluvien ABC-proteiiniryhmien esiintymistä vesikirpulla *Daphnia pulex* tutkimalla proteiineja koodaavien geenisekvenssien esiintymistä *D. pulexin* genomissa. Sturm ym. (2009) ovat todenneet *D. pulexin* genomissa esiintyvän 64 ABC-proteiinia kaikista alaryhmistä A – H. *D. pulexilla* löytyy heidän mukaansa kaksi homologista P-glykoproteiinia (ABCB1) sekä kuusi MR-proteiinia (ABCC). Campos ym. (2014) ovat julkaisseet ensimmäisenä tutkimuksen liittyen MXR-mekanismien toimintaan sekä ABC-proteiinien esiintymiseen vesikirpulla *Daphnia magna* sen elämän varhaisemmissa vaiheissa; munista neljän vuorokauden ikäisiin juveniileihin

poikasiin. Tutkimus on perustunut substraatteina toimivien fluoresoivan väriaineiden RhB, Rh123 ja Ca-AM kertymiseen *D. magna* soluihin tunnettujen ABCB1- ja ABCC-proteiiniryhmien inhibiittoreiden; syklosporiini A, REV205 ja MK571 vaikutuksesta. Heidän tekemän tutkimusten mukaan fluoresoivien väriaineiden kertyminen soluihin lisääntyy tunnettujen inhibiittoreiden pitoisuuden kasvun vaikutuksesta *D. magna*lla. Tulokset kertovat *D. magna*lla esiintyvän siten toimivia ABC-proteiineja sekä ABCB- että ABCC-ryhmistä. He ovat myös selvittäneet qPCR-tekniikalla sekä ABCB- että ABCC-proteiiniryhmien geenien esiintymistä sekä ilmentymistä *D. magna* eri elämänvaiheissa. Lisäksi he ovat tutkineet tapahtuuko ABC-proteiineissa niiden geenien transkription muutosta ABC-proteiineja indusoivien aineiden vaikutuksesta. Heidän saamien qPCR:llä tehtyjen testitulosten mukaan *D. magna*lla esiintyy vähäisempää ABCB1 (P-gp) ja ABCC1/3 (MRP) transkriptiota *D. magna* munilla kuin neonaateilla poikasilla (alle 12 h) sekä 4 vrk juveniileilla vaiheilla. ABCC4- sekä ABCC5-proteiiniryhmien geenien transkriptiota esiintyy kaikissa elämän vaiheissa. Yleisesti eniten ABC-proteiinien transkriptiota ilmenee juveniileilla (4 vrk) *D. magna* poikasilla (kuva 4). Kuvasta 4 näkee myös ABCC-ryhmän proteiineja esiintyvän enemmän kuin ABCB-ryhmän proteiineja *D. magna* kaikissa sen elämän varhaisemmissa vaiheissa. Täysikasvuissa *D. magna* yksilöillä he eivät ole tutkineet ABC-proteiinien transkriptiota tai esiintymistä.



Kuva 4. ABC-proteiiniryhmien esiintyminen vesikirpun *Daphnia magna* eri elämän vaiheissa, munista 4 vrk ikäisiin juveniileihin poikasiin. Eniten ABC-proteiinien transkriptiota esiintyy juveniileilla 4 vrk ikäisillä poikasilla sekä ABCB- että ABCC-ryhmän proteiinien osalta (Campos ym. 2014).

1.7 Työn tavoite

Tämän tutkielman tavoitteena on tutkia MXR-mekanismia ja ABC-proteiiniryhmien (ABCB/P-gp ja ABCC/MRP) esiintymistä ja toimintaa täysikasvuisilla 12 - 14 vuorokauden ikäisillä vesikirpuilla *Daphnia magna*. ABC-proteiinien toiminnan ja esiintymisen testaus tapahtuu altistamalla vesikirppuja tunnetuille ABC-proteiini-inhibiittoreille (VER, REV205 ja MK571) sekä ABC-proteiinien substraatteina toimiville fluoresoiville väriaineille (Ca-AM ja RhB). Työssä selvitetään myös kadmiumkloridin (CdCl_2) ja nikkelikloridin (NiCl_2) vaikutusta MXR-mekanismiin ja ABC-proteiinien inhiboitumiseen. Mikäli *D. magna* soluissa tapahtuu MXR-mekanismin ABC-proteiinien toiminnan estymistä inhibiittoreina käytettyjen aineiden vaikutuksesta, solujen erittämä fluoresenssi on voimakkaampaa kuin positiivisessa kontrollissa: pelkkä kalseiini-Am- tai rodamiini B-altistus. Tällöin voidaan olettaa täysikasvuisilla 12 - 14 vrk ikäisillä vesikirpulla (*D. magna*) esiintyvän toimivia MXR:n ABC-proteiineja, jotka inhiboituvat käytettyjen inhibiittoreiden vaikutuksessa. Työssä selvitetään myös käytettyjen metallien, kadmiumin (CdCl_2) ja nikkelin (NiCl_2), vaikutusta MXR-mekanismin toimintaan sekä toksisuutta vesikirppuun ja muihin vesieläimiin. Työssä koe-eläimenä käytettävä vesikirppu *Daphnia magna* on maailman laajuisesti levinnyt planktonäyriäinen, jota usein käytetään indikaattorilajina tutkittaessa eläinten altistumista erilaisille toksisille aineille. *D. magna* on todettu olevan muun muassa keskeinen ekologinen vaikutus järvien ja lampien ravintoverkon toimivuuteen (Poynton ym. 2007, Sturm ym. 2009).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Koe-eläinten ylläpito

Altistuskokeissa käytetyt vesikirput *D. magna* oli kasvatettu Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laboratoriossa erillisessä kasvatushuoneessa. Vesikirput oli siirretty tilavuudeltaan n. kahden litran kokosiin lasisiin kasvatusvuokiin niiden kuoriuduttua. Vesikirput olivat tällöin samanikäisiä samoissa kasvatusvuoloissa. Myös vesikirppujen sukupolvet oli kirjoitettu ylös. Kasvatusliuoksena käytettiin OECD 202 standardin mukaan valmistettua M7-vettä, johon oli lisätty 100 µl B-vitamiinia yhtä vesilitraa kohden (OECD 2004). Altistuksissa käytettäväksi tarkoitetut vesikirput kerättiin syntyneistä poikasista uusiin vuokiin 100 kpl/vuoka kolmesti viikossa. Osasta syntyneistä poikasista tehtiin uusia emoja keräämällä niitä 50 kpl/vuoka. Vesikirppuja ruokittiin päivittäin, paitsi

viikonlopun aikana, kasvatuslevällä 50 ml/vuoka. Kasvatuhuoneen lämpötila oli säädetty 20 °C ja valorytmi 8/16 h.

2.2 Koeasetelmat

Tehdyissä kokeissa altistettiin vesikirppuja (*Daphnia magna*) MXR-mekanismiin eri proteiiniiryhmiä inhiboiville aineille (verapamil, reversin 205 ja MK571) sekä nikkeli- ja kadmiummetalleille (NiCl_2 ja CdCl_2) sekä proteiinien substraatteina toimiville fluoresoiville väriaineille (Kalseiini-Am ja rodamiini B) (taulukko 1). MXR-mekanismiin inhibitiota tarkastellaan työssä solunsisäisen fluoresenssin kasvun avulla, jolloin substraattina käytettyä fluoresoivaa väriainetta on päässyt kertymään inhibiittorin vaikutuksesta *D. magnan* soluihin suhteutettuna märkäpainoon. Työssä käytetyt vesikirput (*Daphnia magna*) olivat 10 - 12 päivän ikäisiä ja syntyneet samasta sukupolvesta. Vesikirppujen (8 kpl) altistus inhiittoreille ja väriaineelle tapahtui 8 ml tilavuudessa pimeässä kahden tunnin ajan. Altistuksen jälkeen vesikirppujen solujen homogenaatin fluoresenssi mitattiin fluorometrilaitteella (Labsystems Fluoroskan Ascent).

Työ aloitettiin ilmastamalla lasipullossa n. 1 litra 30 - 60 min. OECD 202 standardin mukaan valmistettua keinotekoista makeaa vettä (KTM) (OECD 2004). Ilmastuksen jälkeen KTM:n pH säädettiin 1 molaarisen suolahapon (HCl) avulla n. 6,50, jotta inhibiittorina käytetty verapamil ei olisi sakkaantunut altistusten aikana. Ilmastettu KTM kaadettiin lasivuokaan, johon työssä käytetyt vesikirput pipetoitiin muovisella pipetillä niiden kasvatusliuoksesta.

Jokaisesta altistuksesta tehtiin 20 ml tuikepulloihin kolme rinnakkaista 8 ml käsittelyä (a,b ja c), joihin lisättiin jokaiseen mikropipetin avulla 200 µl tilavuudessa 8 vesikirppua, sekä yksi 8 ml altistus ilman vesikirppuja (d). Työssä otettiin huomioon vesikirppujen pipetoinnin mukana tulevan KTM:n määrä (n. 200 µL/vesikirppu), joka vaihteli aina eri päivinä tehtyjen altistuskokeiden välillä riippuen käytetystä pipetin kärjestä.

Työssä valmistettiin ensin negatiivinen kontrolli (8 ml KTM tai 8 ml 0,1 % DMSO) sekä pienemmästä pitoisuudesta suurempaan altistukset inhibiittoreista tai metalleista tuikepulloihin. Vesikirput pipetoitiin tuikepulloihin mikropipetillä 200 µl tilavuudessa aloittaen aina negatiivisesta kontrollista (pelkkä KTM- tai 0,1 DMSO-altistus) ja edeten pienemmästä inhibiittori- tai metallipitoisuudesta suurempaan. Pipetoinnin aikana tuikepullot pyrittiin pitämään pimeässä folion avulla. Vesikirppuja pidettiin pimeässä

altistuksessa 2 h ajan, jonka jälkeen niiden märkápaino punnittiin. Punnitusta varten pyrittiin poistamaan vesikirppujen mukana tuleva altistusliuos tai KTM kaatamalla liuokset havaksella vuorattuun lasisuppiloon ja antamalla liuoksen imeytyä havaksen läpi myös talouspaperiin. Altistuksen aikana kuolleet vesikirput poistettiin eikä niiden märkápainoa mitattu. Punnituksen jälkeen kunkin rinnakkaisen toiston vesikirput siirrettiin pinsettien avulla 1,5 ml Eppendorf-putkiin. Eppendorf-putkiin pipetoitiin 200 μ L tislattua vettä ja vesikirput homogenoitiin muovisella sauvalla. Eppendorf-putkia sentrifugoitiin 5 min. 1300 rpm 21 °C lämpötilassa (Hitachi Himac CT15RE). Sentrifuugiputkiin muodostunut supernatantti pipetoitiin 200 μ L tilavuudessa toisiin 1,5 ml sentrifuugiputkiin. 96-kuoppalevyille pipetoitiin jokaisesta sentrifuugiputkesta 90 μ L supernatanttia kahtena rinnakkaisena pienemmästä pitoisuudesta suurempaan. Altistuksissa, joissa käytettiin fluoresoivana väriaineena rodamiini B:tä, käytettiin mustaa kuoppalevyä. Sekä värjäysliuosten että vesikirppujen homogenaatin fluoresenssi mitattiin fluorometrilaitteella, Ca-AM: 485 nm/538 nm ja RhB: 584 nm/612 nm. Työssä pyrittiin myös pitämään kuoppalevyt pimeässä folion avulla.

2.3 ABC-proteiinien inhibiittoreina ja substraatteina käytetyt aineet

Työssä käytettiin MXR-mekanismia hoitavien ABC-proteiinien inhibiittoreina (\pm)verapamil hydrokloridia (VER) (Sigma V4629) ja reversiini 205 (REV205) (Sigma R1401-10MG), jotka on todettu toimivan nisäkkäillä P-gp1/ABCB-proteiiniryhmän inhibiittorina sekä MK571:a (Sigma M7571-5MG), joka toimii nisäkkäillä MRP/ABCC-proteiiniryhmän inhibiittorina (Luckenbach & Epel 2005). Työssä tutkittiin myös nikkelikloridin (NiCl_2) sekä kadmiumkloridin (CdCl_2) eri pitoisuuksien vaikutusta MXR:n proteiinien inhiboitumiseen. Fluoresoivina väriaineina ja proteiinien substraatteina käytettiin 0,5 μ M ja 1 μ M kalseiini-AM:aa (Ca-AM) (Sigma 56496-20X50UG) tai 10 μ M rodamiini B:tä (RhB) (Sigma R6626-25G). Käytetyistä inhibiittoreista verapamil ja MK571 oli liuotettu steriiliin veteen, reversiini 205 DMSO:hon. Käytetyistä substraateista Ca-AM oli liuotettu DMSO:hon ja RhB steriiliin veteen.

Mikäli työssä huomattiin inhibiittoreiden aiheuttavan alhaisempaa fluoresenssia kontrolliin verrattuna, inhibiittorin pitoisuutta laimennettiin seuraavia kokeita varten. Erityisesti verapamilista tehtiin testejä varten monia välilaimennoksia. Välilaimennukset tapahtuivat laimentamalla inhibiittorin kantaliuosta steriilillä vedellä tai DMSO:lla.

Negatiivisena kontrollina käytettiin 8 ml 0,1 % dimetyylisulfoksidia (DMSO) tai keinotekoisista makeaa vettä (KTM), joilla ei esiinny fluoresenssia. Sekä kalseiini-AM:n että rodamiini B:n tiedetään toimivan sekä MR- että P-glykoproteiinien substraattina (Essodaīgui ym. 1998, Litman ym. 2001, Hamdoun ym. 2004). Taulukossa 1 on esitetty työssä käytettyjen inhibiittorit, niiden vaikutuskohteina olevat ABC-proteiiniryhmät sekä pitoisuusalueet.

Taulukko 1. Testeissä käytetyt ABC-proteiinien inhibiittorit ja niiden pitoisuusalueet, ABC-proteiinien substraatteina käytetyt fluoresoivat väriaineet sekä negatiivisina kontrolleina käytetyt aineet.

Inhibiittori	Vaikutuskohde	Pitoisuusalue	Fluoresoiva väriaine/substraatti	Negatiivinen kontrolli
Verapamil	P-gp1/ABCB1	0,0001- 0,02 μ M	(0,5, 1 μ M Kalseiini AM), 10 μ M Rodamiini B	0,1 % DMSO/ KTM
MK571	MRP/ABCC	0,1 - 30 μ M	10 μ M Rodamiini B	KTM
Reversin 205	P-gp1/ABCB1	1- 20 μ M	10 μ M Rodamiini B	KTM
Kadmiumkloridi (CdCl ₂)		0,001 - 0,1 mg/l	10 μ M Rodamiini B	KTM
Nikkelikloridi (NiCl ₂)		0,1 - 1 mg/l	10 μ M Rodamiini B	KTM

Fluoresoivana väriaineena käytetty kalseiini-AM on tavallisesti ei-fluoresoiva P-gp:n ja MRP:n substraatti. Mikäli kalseiini-AM päätyy MXR-mekanismiin ABC-proteiinien inhiboitumisen johdosta solun sytoplasmaan, se muuttuu esteraasin hydrolysoitaessa kalseiini-AM:n esterisidoksen fluoresoivaksi kalseiiniksi (Homolya 1993, Kurelec ym. 2000, Luchenbach ym. 2008). Proteiinien substraatteja ja inhibiittoreita sekä CdCl₂ ja NiCl₂ säilytettiin jääkaapissa/kylmähuoneessa. +4 °C (VER, Ca-AM, CdCl₂, NiCl₂) tai pakastimessa -20 °C (RhB, REV205, MK571) kokeiden välillä.

2.4 Tulosten laskeminen ja tilastollinen testaus

Fluorometrilaitteella saadut tehtyjen testien fluoresenssit siirrettiin Microsoft Exceliin. Myös jokaisen rinnakkaisen altistuksen (a,b,c) 8 vesikirpun märkápaino kirjattiin Exceliin. Altistuksen aikana kuolleita vesikirppuja, kuoriutuneita poikasia tai munia ei otettu huomioon punnituksessa. Jokaisesta rinnakkaisen altistuksen nesteen sekä vesikirppujen homogenaatin fluoresenssien voimakkuuksista laskettiin niiden keskiarvo sekä keskihajonta. Varsinainen tutkielmassa käytetty tulos laskettiin suhteuttamalla saatu homogenaatin fluoresenssi vesikirppujen märkápainoon.

Työssä yhdistettiin eri päivänä tehdyistä testeistä samoista pitoisuuksista ja kontroleista saadut fluoresenssien voimakkuudet. Saadut fluoresenssin voimakkuudet inhibiittoreista sekä kontrollista normalisoitiin 10 μ M rodamiini B:n suhteen. Normalisointi tapahtui jakamalla kontrollin sekä jokaisen inhibiittorin pitoisuuden fluoresenssien mittaustulokset mittauspäivän kontrollin fluoresenssin keskiarvolla. Tällöin saatiin kontrollin fluoresenssin arvoksi 1,00, johon eri aineiden normalisoitua fluoresenssia pystyttiin vertaamaan. Mikäli inhibiittoreiden aiheuttama *D. magnan* solunsisäinen fluoresenssi oli voimakkaampaa kuin kontrollissa, se sai suuremman arvon kuin 1,00.

Normalisoitujen fluoresenssien eroavaisuutta suhteessa kontrolliin tarkasteltiin myös IBM SPSS Statistics 19-ohjelman ja riippumattoman Kruskal-Wallis testin avulla. Merkitsevyytensä oli p-arvo 0,05; mikäli saatu p-arvo on pienempi kuin 0,05 se poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi kontrollista. Kontrollista merkitsevästi poikkeavia inhibiittoripitoisuuksia merkitään kuvissa kirjaimella B. Kontrollia ja siitä poikkeamattomia tuloksia merkitään kuvissa kirjaimella A (kuvat 5 – 8).

Tuloksissa tarkistettiin myös SPSS:n Shapiro-Wilkin sekä Kolmogorov-Smirnovin testien avulla fluoresenssien arvojen normaalijakautuneisuus. Mikäli aineisto on normaalijakautunut, kyseisten testien p-arvot saavat suuremman arvon kuin 0,05.

3 TULOKSET

3.1 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina käytetyn kalseiini-AM:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

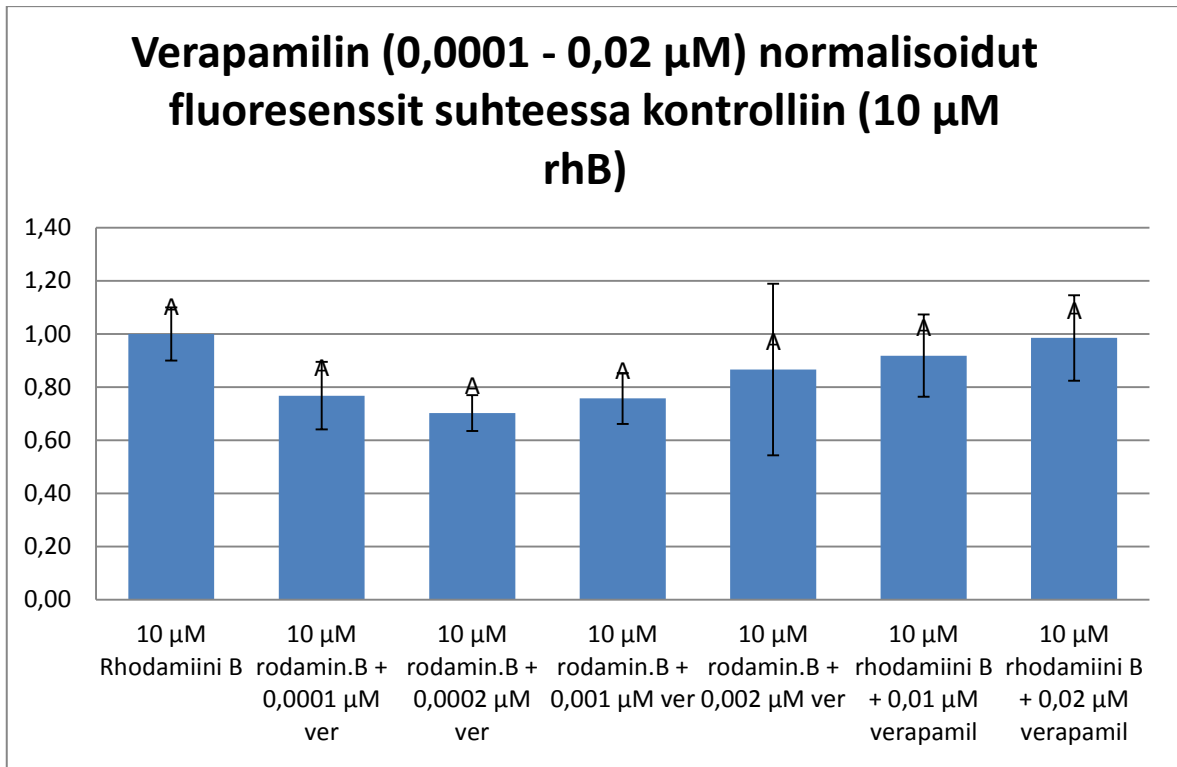
Vesikirppuja (*D. magna*) altistettiin ABC-proteiinien substraattina toimivalle kalseiini AM:lle sekä ABCB1/P-gp-ryhmän inhibiittorina toimivalle verapamilille. Ca-AM

pitoisuudet olivat tehdyissä kokeissa joko 1 μM tai 0,5 μM . Verapamilin pitoisuudet vaihtelivat 1 – 50 μM . Saaduissa tuloksissa esiintyi suurta vaihtelua *D. magna* märkäpainoon suhteutetuissa eri inhibiittoripitoisuuksien fluoresenssien voimakkuuksien keskiarvoissa sekä keskihajonnoissa. Suurta eroa esiintyi myös pelkästä altistusluoksesta mitatuissa fluoresensseissa. Tulosten suuren keskihajonnan vaihtelun vuoksi ABC-proteiinien substraattina siirryttiin käyttämään seuraavissa testeissä 10 μM rodamiini B:tä.

3.2 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina käytetyn rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

P-gp/ABCB1-ryhmän inhibiittorina toimivan verapamilin vaikutusta MXR-mekanismiin inhiboitumiseen tutkittiin *D. magna*lla yhdessä substraattina käytetyn 10 μM rodamiini B:n kanssa. Verapamilin pitoisuudet vaihtelivat 0,0001 μM – 0,02 μM . Kontrollina käytettiin 10 μM RhB-altistusta. Pääsääntöisesti verapamililla ei ollut vaikutusta MXR-mekanismiin ja sitä hoitavien ABCB1-proteiinien inhiboitumiseen. Korkeampaa fluoresenssia esiintyi yksittäisissä testeissä pitoisuudella 0,02 μM ja 0,002 μM , joka todennäköisesti johtuivat sattumasta.

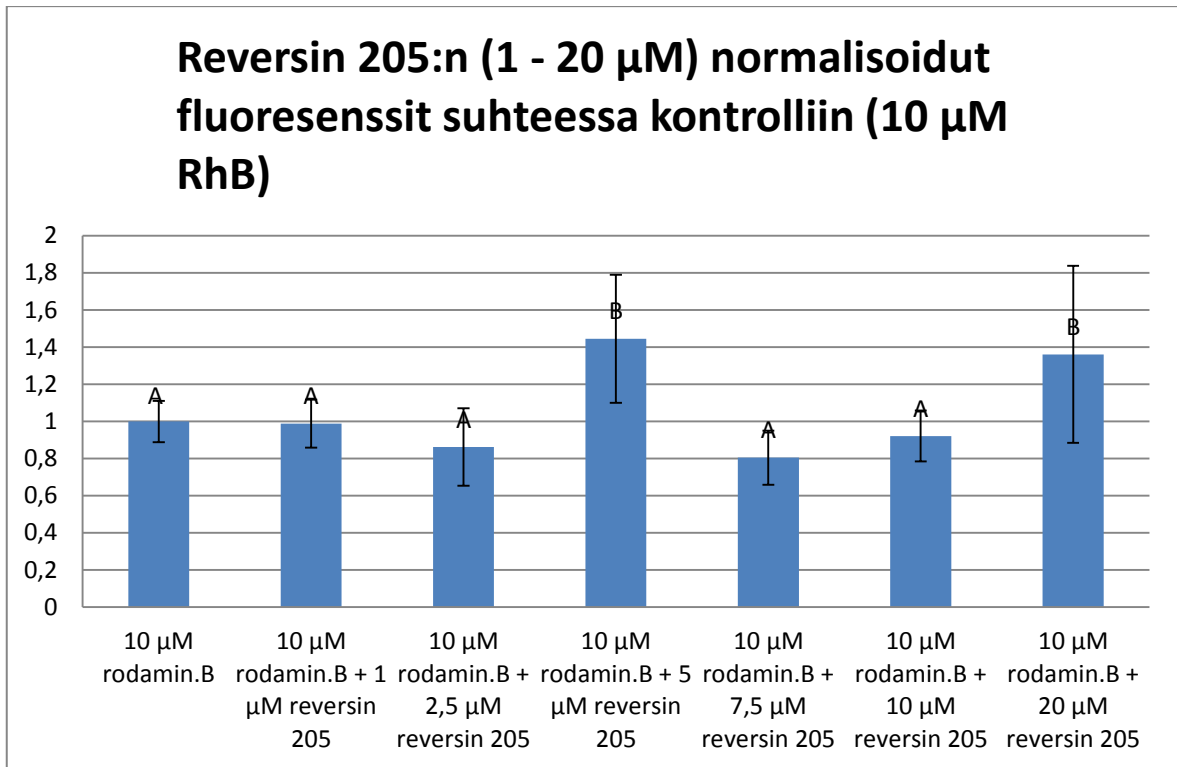
Normalisoiduissa tuloksissa yhdelläkään testatuista verapamilin pitoisuuksista ei esiintynyt korkeampaa fluoresenssia verrattuna kontrollina käytettyyn 10 μM rodamiini B-altistukseen. Kaikkien normalisoitujen VER:n pitoisuuksien fluoresenssien voimakkuudet saivat pienemmän arvon kuin kontrollille määritetyn arvon 1,00 (kuva 5). Parametrittoman testin (Riippumaton Kruskal-Wallis) mukaan fluoresenssit poikkesivat toisistaan (p-arvo $0,013 < 0,05$). Saatujen tulosten perusteella nolla-hypoteesi, eli se ettei verapamil aiheuta ABC-proteiinien inhiboitumista, säilytettiin. Shapiro-Wilkin sekä Kolmogorov-Smirnovin testien mukaan fluoresenssien voimakkuuksien arvot eivät olleet aineistossa normaalisti jakautuneita (p-arvo $< 0,001$).



Kuva 5. Verapamilin eri pitoisuuksien aiheuttama normalisoitu fluoresenssin kasvu vesikirpulla (*D. magna*) fluoresoivana väriaineena ja substraattina käytetyn 10 μM rodamiinin B:n kanssa verrattuna kontrolliin (\pm keskihajonta).

3.3 Reversin 205:n vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

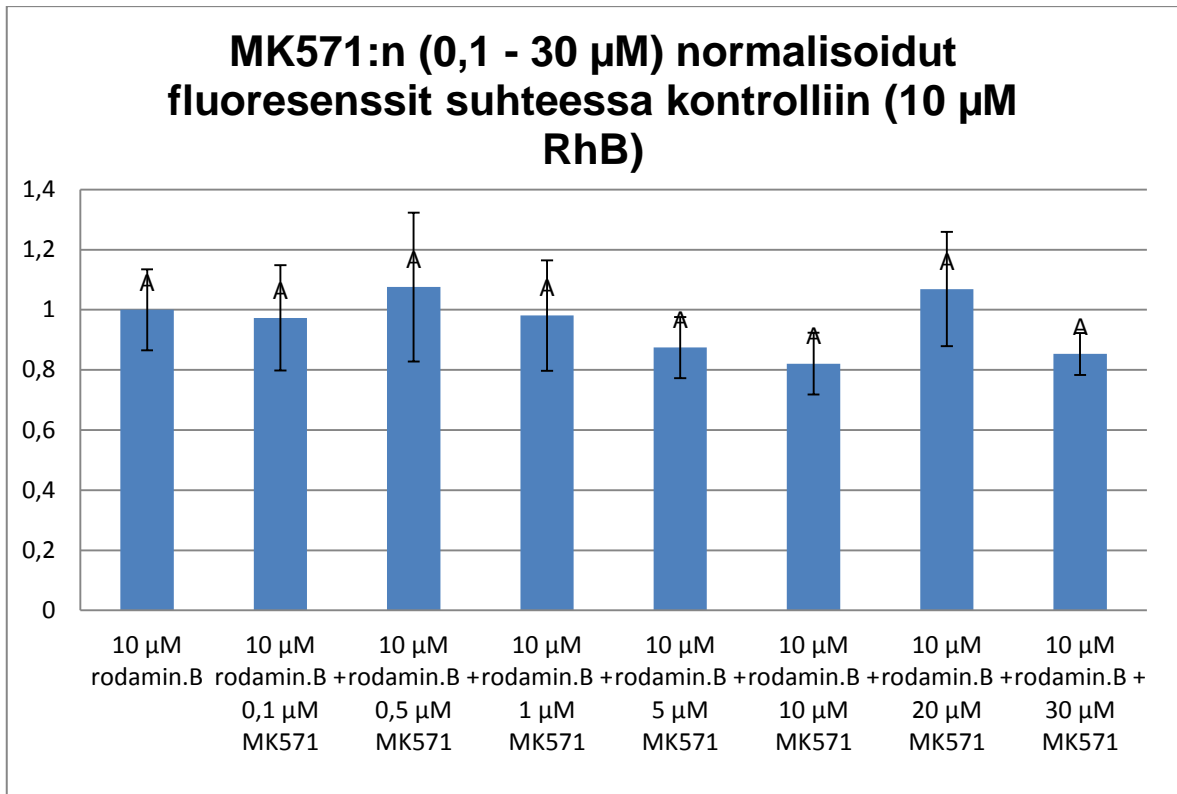
ABC1/P-gp-ryhmän inhibiittorina toimivan reversin 205:n vaikutusta MXR-mekanismiin toimivuuteen tutkittiin *D. magna*llä altistuskokeissa yhdessä substraattina toimivan 10 μM RhB:n kanssa. REV205:n pitoisuudet vaihtelivat 1 – 20 μM . Saaduissa normalisoiduissa tuloksissa reversiini 205:n pitoisuudet 5 μM ja 20 μM ylittivät kontrollina käytetyn 10 μM rodamiini B:n pitoisuuden normalisoidun arvon 1,00 (kuva 6). Myös tilastollisesti erot kontrolliin olivat näiden pitoisuuksien osalta merkitseviä riippumattoman Kruskal-Wallis-testin perusteella (p -arvo = 0,001 < 0,05). Saatu tulos osoittaa *D. magna*lla esiintyvän toimivia ABC1-ryhmän proteiineja, joiden toimintaa voidaan inhiboida REV205:n vaikutuksesta. Normalisoiduissa fluoresensseissa esiintyi testattujen pitoisuuksien osalta kuitenkin myös suurta vaihtelua. Reversiinin pitoisuudet 2,5 μM ja 7,5 μM aiheuttivat alhaisempaa fluoresenssin voimakkuutta kuin kontrollissa. Erot fluoresenssien voimakkuuden vaihtelussa eivät kuitenkaan olleet näiden pitoisuuksien osalta tilastollisesti merkitseviä, p -arvo > 0,05. Shapiro-Wilkin sekä Kolmogorov-Smirnovin testien mukaan fluoresenssien arvot eivät olleet aineistossa normaalisti jakautuneita (p -arvo < 0,001).



Kuva 6. Reversin 205:n eri pitoisuuksien aiheuttama normalisoitu fluoresenssin kasvu vesikirpulla (*D. magna*) fluoresoivana väriaineena ja substraattina käytetyn rodamiinin B:n kanssa verrattuna kontrolliin (\pm keskihajonta).

3.4 MK571 vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

ABCC-ryhmän inhibiittorina toimivan MK571:n vaikutusta MXR-mekanismiin inhiboitumiseen tutkittiin *D. magna*lla altistuskokeissa yhdessä substraattina käytetyn 10 μM Rh-B:n kanssa. MK571:n pitoisuudet vaihtelivat 0,1 – 30 μM . Normalisoiduissa tuloksissa esiintyi MK571:n 0,5 μM ja 20 μM pitoisuuksilla voimakkaampaa fluoresenssia kuin kontrollissa (10 μM RhB) (kuva 7). Tilastollisesti ero ei kuitenkaan ollut merkitsevää riippumattoman Kruskal-Wallis testin mukaan (p-arvo > 0,05). Shapiro-Wilkin sekä Kolmogorov-Smirnovin testien mukaan fluoresenssien arvot eivät olleet aineistossa normaalisti jakautuneita (p-arvo < 0,001).



Kuva 7. MK571:n eri pitoisuuksien aiheuttama normalisoitu fluoresenssin kasvu vesikirpulla (*D. magna*) fluoresoivana väriaineena ja substraattina käytetyn 10 μ M rodamiinin B:n kanssa verrattuna kontrolliin (\pm keskihajonta).

3.5 Nikkelikloridin (NiCl_2) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan Ca-AM:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

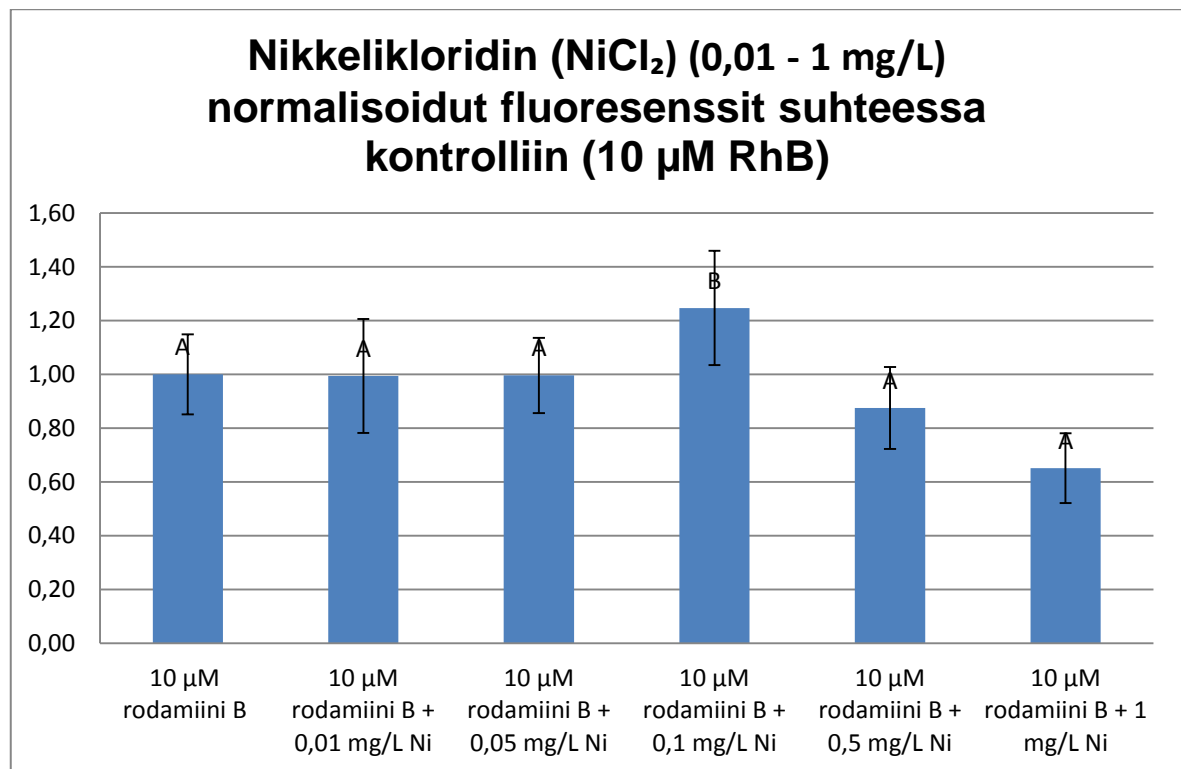
Nikkelikloridin (NiCl_2) vaikutusta MXR-mekanismiin toimivuuteen ja ABC-proteiinien esiintymiseen tutkittiin *D. magna*lla altistuskokeissa yhdessä substraattina käytetyn 0,5 μ M kalseiini AM:n kanssa. NiCl_2 :n pitoisuudet vaihtelivat 0,05 - 1 mg/L. Saaduissa tuloksissa esiintyi suurta vaihtelua altistusliuoksen, *D. magnan* homogenaatin sekä märkämpainoon suhteutettujen fluoresenssien voimakkuuksien suhteen saaduissa keskiarvoissa ja keskihajonnoissa. Tulosten suuren keskihajonnan vaihtelun vuoksi proteiinien substraattina siirryttiin käyttämään seuraavissa testeissä 10 μ M rodamiini B:tä

3.6 Nikkelikloridin (NiCl_2) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan rodamiini B:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

Nikkelikloridin (NiCl_2) vaikutusta MXR-mekanismiin toimivuuteen ja ABC-proteiinien esiintymiseen tutkittiin yhdessä substraattina käytetyn 10 μ M rodamiini B:n kanssa. Kontrollina käytettiin 10 μ M rhB-altistusta. NiCl_2 :n pitoisuudet vaihtelivat 0,01 - 1 mg/L. Tuloksissa esiintyi voimakkaampaa fluoresenssia joissakin yksittäisissä testeissä NiCl_2 :n

pitoisuuksilla 0,01 mg/L ja 0,1 mg/L. Normalisoiduissa tuloksissa vain NiCl₂:n pitoisuus 0,1 mg/L aiheutti suuremman fluoresenssin voimakkuuden kontrolliin verrattuna (kuva 8). Tilastollisesti ero ei kuitenkaan ollut merkitsevää riippumattoman Kruskal-Wallis testin mukaan (p-arvo 0,095 > 0,05). Tukey HSD:n sekä Dunnett T3:n testien mukaan kuitenkin NiCl₂:n pitoisuus 0,1 mg/L aiheutti tilastollisesti merkitsevän eron kontrolliin verrattuna (p-arvot 0,03 ja 0,043 < 0,05).

Shapiro-Wilkin sekä Kolmogorov-Smirnovin testien mukaan fluoresenssien arvot eivät olleet aineistossa normaalisti jakautuneita (p-arvo < 0,001).



Kuva 8. Nikkelikloridin eri pitoisuuksien aiheuttama normalisoitu fluoresenssin kasvu vesikirpulla (*D. magna*) fluoresoivana väriaineena ja substraattina käytetyn 10 μM rodamiinin B:n kanssa verrattuna kontrolliin (± keskihajonta).

3.7 Kadmiumkloridin (CdCl₂) vaikutus ABC-proteiinien inhiboitumiseen ja substraattina toimivan Ca-AM:n kertymiseen vesikirpulla *Daphnia magna*

Kadmiumikloridin (CdCl₂) vaikutusta MXR-mekanismiin toimivuuteen ja ABC-proteiinien esiintymiseen tutkittiin pitoisuuksilla 0,01 mg/L, 0,04 mg/L sekä 0,1 mg/L yhdessä substraattina käytetyn 1 μM Ca-AM kanssa. Kontrollina käytettiin 1 μM Ca-AM-altistusta. Normalisoiduissa tuloksissa ei esiintynyt yhdelläkään CdCl₂:n pitoisuudella korkeampaa fluoresenssia kontrolliin verrattuna. Kadmiumikloridin aiheuttamaa MXR-mekanismin ja

ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumista testattiin myös pitoisuuksilla 0,005, 0,01, 0,04 ja 0,1 mg/L yhdessä substaattina käytetyn 0,5 μ M Ca-AM-pitoisuuden kanssa. Saaduissa tuloksissa esiintyi suurta vaihtelua sekä fluoresenssin keskiarvoissa että keskihajonnoissa. Saatuja tuloksia ei siten otettu huomioon tehdyssä tutkimuksessa.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 MXR-mekanismien toimivuuden tarkastelu täysikasvuisella *Daphnia magna*

Saatujen tulosten perusteella täysikasvuisella 12 – 14 vrk ikäisellä vesikirpulla *Daphnia magna* ei esiintynyt yhtäläistä käytettyjen MXR-mekanismien eri ABC-proteiiniryhmien inhibiittoreiden, verapamil, reversin 205 ja MK571, pitoisuuksien kasvusta riippuvaista solunsisäisen fluoresenssin voimakkuuden kasvua kuin mitä on todettu tapahtuvan vastaavissa altistuskokeissa muilla vesieläimillä tai aiemmin Campos ym. (2014) testaamalla 4 vrk ikäisellä *D. magna* (Bard 2000, Smital ym. 2004). Taulukossa 2. on esitelty esimerkkejä vesieläimillä tehdyistä testeistä liittyen eri inhibiittoreiden (VER, REV205 sekä MK571) vaikutuksesta tapahtuvaan MXR:n sekä ABC-proteiinien inhiboitumiseen.

Taulukko 2. Esimerkkejä vesieläimillä saaduista tuloksista liittyen MXR-mekanismiin inhiboitumiseen käytettyjen inhibiittoreiden vaikutuksesta yhdessä substraattina toimivan rodamiini B:n kanssa.

Inhibiittori	rodamiini B:n pitoisuus	eläin	P-arvo/LOEC	viite
VER 10 µM	2,5 µM	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	P < 0,001	Smital ym. 2000
VER 10 µM	2,5 µM	<i>Monodonta turbinata</i>	P < 0,05	Smital ym. 2000
VER 10 µM	2,5 µM	<i>Dreissena polymorpha</i>	P < 0,01	Smital ym. 2000
VER 10 µM	2,5 µM	<i>Viviparus viviparus</i>	P < 0,05	Smital ym. 2000
VER 5 µM	5 µM	<i>Dreissena polymorpha</i>	P < 0,01	Faria ym. 2011
REV205 5 µM	5 µM	<i>Daphnia magna</i>	P < 0,05 (LOEC)	Campos ym. 2014
REV205 5 µM	5 µM	<i>Dreissena polymorpha</i>	P < 0,01 (LOEC)	Faria ym.2011
REV205 5 µM	5 µM	<i>Dreissena polymorpha</i>	P < 0,01 (LOEC)	Faria ym.2011
MK571 5 µM	5 µM	<i>Dreissena polymorpha</i>	P < 0,01 (LOEC)	Faria ym.2011
MK571 5 µM	5 µM	<i>Daphnia magna</i>	P < 0,05 (LOEC)	Campos ym. 2014
CdCl ₂ 100 p.p.b ja 500 p.p.b	1 µM	<i>Mytilus californianus</i>	P ≤ 0,005	Eufemia & Epel 2000
Cd 3 µM	rodamiini123 5 µg/ml	<i>Euglena crasilis</i>	P = 0,002	Einicker-Lamas ym. 2003

Tuloksissa ainoastaan ABCB1-ryhmän/P-glykoproteiinien esiintymisestä *D. magnalla* saatiin tehtyjen testien perusteella todiste. ABCB1-ryhmän inhibiittorina toimivan reversiini 205:n pitoisuudet 5 μM ja 20 μM aiheuttivat tehdyissä testeissä suuremman ja tilastollisesti merkitsevän (p-arvo < 0,05) eron fluoresenssin voimakkuudessa kuin positiivisessa kontrollissa (pelkkä 10 μM rhB altistus). Myös verapamil on usein käytetty P-gp/ABCB1-proteiiniryhmän inhibiittori, mutta sen ei todettu aiheuttavan tehdyissä kokeissa testatuilla pitoisuuksilla proteiinien inhiboitumista johtuvaa substraattina toimivan (10 μM RhB) kertymistä *D. magnan* soluihin. Campos ym. (2014) ja Sturm ym. (2009) ovat aiemmin todenneet ABCC-proteiiniryhmän toimivan yleisimpänä ABC-proteiiniryhmänä 4 vrk ikäisellä vesikirpulla *Daphnia magna* sekä *Daphnia pulexilla*.

Mahdollista on, etteivät tutkitut proteiinit inhiboituneet käytettyjen inhibiittoreiden vaikutuksesta, esimerkiksi inhibiittoripitoisuuksien ollessa liian alhaisia tai korkeita, jolloin niiden toksiset ominaisuudet olisivat vaikuttaneet haitallisesti vesikirpun solujen kuntoon. Tehdyissä kokeissa huomattiin eri inhibiittoripitoisuuksille altistettujen *D. magnan* homogenaattien fluoresenssien olevan jopa alhaisempia kuin kontrollissa, mikä kertoo, ettei substraattina käytettyä väriainetta ollut päässyt sisälle soluihin tai se on jostain syystä virrannut ulos soluista, esimerkiksi solujen hajotessa käsittelyn aikana.

Kadmium- ja nikkelikloridin osalta tehdyissä testeissä huomattiin pitoisuuksien 0,005 mg/l CdCl_2 :n osalta ja 0,1 mg/l NiCl_2 :n osalta aiheuttavan suurempaa fluoresenssia kontrolliin (10 μM RhB-altistus) verrattuna. Tilastollisesti erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä parametrittoman Kruskal-Wallis testin perusteella p-arvojen ollessa suurempia kuin 0,05. Muiden tilastollisten testien perusteella kuitenkin NiCl_2 :n pitoisuus 0,1 mg/L aiheutti kontrolliin verrattuna tilastollisesti merkitsevästi korkeampaa fluoresenssia. Kadmiumilla ja nikkellillä tiedetään olevan toksinen vaikutus eliöihin, mutta kummankin metallin osalta altistuspitoisuudet ovat olleet alemmat kuin mitä on todettu olevan toksisia nikkelin osalta vesikirpulle ja kadmiumin osalta muille vesieläimille (Ferreira ym. 2010, Eufemia & Epel 2000). Myös käytetyillä MXR:n ABC-proteiinien inhibiittoreilla, kuten verapamililla sekä MK571:llä, on todettu olevan toksista vaikutusta eliöihin, joka voi aiheuttaa esimerkiksi solukalvon eheyden menetystä ja siten fluoresoivan väriaineen ulosvirtausta soluista (Anselmo ym. 2010).

Luckenbach ym. (2008) mukaan vaikka samankaltaisia MXR-mekanismia hoitavia ABC-proteiineja on löydetty kaikilla lajeilla sekä eliöryhmillä, ei ole kuitenkaan varmaa, että proteiinien toiminta olisi samankaltaista tai yhtä tehokasta eri lajien välillä. Ympäristössä esiintyvien haitallisten vierasaineiden tai tutkimuksissa käytettävien MXR-mekanismien ABC-proteiinien inhibiittoreiden vaikutusta MXR-mekanismien toimivuuteen ei voida siten yleistää yhtä voimakkaaksi tai edes toimiviksi eri lajien välillä. Vierasaine tai malli-inhibiittori voi myös häiritä vain tietynlaisia siirtäjäproteiiniryhmiä, jotka voivat esiintyä vain tietyillä eliölajeilla tai eläimillä vain tietyssä elämänvaiheessa (Anselmo 2012, Campos ym. 2014). Eliölajit voivat olla myös luonnostaan herkempiä ympäristössä esiintyville myrkyllisille aineille, johtuen alhaisemmasta MXR-mekanismien ABC-proteiinien esiintymisestä tai niiden toiminnan aktiivisuudesta (Bard 2000, Smital ym. 2000). Myös vesieläimillä on todettu esiintyvän merkittävää eroa MXR-mekanismien aktiivisuudessa. Eroavaisuus johtuu todennäköisesti eri lajien elinympäristön saastuneisuuden vaihtelusta ja lajien sopeutumisesta elämään saastuneessa ympäristössä. Monissa tutkimuksissa MXR-mekanismien ja ABC-proteiinien ilmentymisen on todettu olevan voimakkaampaa saastuneilla alueille esiintyvillä lajeilla ja jopa saman lajin eri populaatioilla. Myös yksilönläisiä eroja on todettu esiintyvän (Smital & Kurelec 1998 b, Bard 2000, Smital 2000, Whalen ym. 2010).

4.2 Koeolosuhteiden arviointi

Koeolosuhteet pyrittiin pitämään eri päivinä tehdyissä kokeissa mahdollisimman samankaltaisina, mutta esimerkiksi altistuksen kestossa saattoi olla vaihtelua riippuen kuinka nopeasti vesikirput oli siirretty tuikepulloihin ja kauanko niiden punnitsemisessa oli kestänyt. Työssä pyrittiin siihen, että altistusaika olisi ollut jokaisessa testissä 2 tuntia, mutta se saattoi vaihdella jopa 30 min. verran. Myös mikrovaaran epätarkkuus saattoi hieman vaikuttaa punnitustuloksiin.

Nesteen fluoresenssin voimakkuudessa esiintyi myös eri altistuspitoisuuksien välillä vaihtelua, vaikka fluoresoivana väriaineina käytettyjä rodamiini B:tä ja kalseiini AM:aa oli pipetoitu sama määrä tuikepulloihin, eli 8 µL 10 µM rodamiini B:tä tai 8 µL 0,5 tai 1,0 µM Ca-AM:aa 8 ml kokonaistilavuutta kohden. Fluoresenssien voimakkuuden vaihtelu saattoi mahdollisesti johtua proteiinien substraattina käytettyjen väriaineiden rodamiini B:n tai kalseiini AM:n kertymisestä altistuksen aikana vesikirppujen soluihin tai väriaineen pitoisuuden vaihtelusta eri altistuksissa. Tällöin väriainetta oli saattanut jäädä pipetin

kärjen sisälle tai KTM:n määrässä oli vaihtelua johtuen käytetystä 10 ml pipetistä. Inhibiittorialtistuksen värjäysliuoksen fluoresenssi saattoi olla voimakkaampaa tai alhaisempaa kontrolliin verrattuna. Tämä saattoi vaikuttaa siten myös siihen, että fluoresenssi oli *D. magnan* homogenaatissa myös korkeampaa tai alhaisempaa kuin kontrollissa. Osaan tehdyistä kokeista väriaineena käytetty RhB pipetoitiin yhdessä KTM:n kanssa, jolloin väriainetta päätyi varmasti sama määrä sekä kontrollialtistukseen että jokaiseen inhibiittorin altistuspitoisuuteen. Tämä vaikutti saatujen tulosten luotettavuuteen, kun jokaisessa altistuksessa oli varmasti sama määrä fluoresoivaa väriainetta. Vesikirppujen mukana tuli usein altistusliuoksiin munia, joista kuoriutui 2 h altistuksen aikana joissakin kokeissa poikasia. Kuoriutuneita poikasia tai munia ei otettu testeihin mukaan. Työssä pyrittiin valikoimaan vesikirpuista hyväkuntoiset ja isoimmat yksilöt testeihin.

Työssä käytettiin proteiinien substraattina korkeaa 10 μM rodamiini B:n pitoisuutta, joka saattoi aiheuttaa ABC-proteiinien saturoitumista. Muissa vastaavissa vesieläimillä tehdyissä kokeissa on käytetty pienempiä pitoisuuksia rodamiini B:tä, kuten 5 μM seeprasimpukalla (*Dreissena polymorpha*) (Faria ym. 2011) 1 μM merimadon toukilla *Urechis caupo* (Toomey & Epel 1993) sekä 0,25 μM 15 min. altistuksessa 20 μM verapamilin kanssa merisimpukan (*Mytilus edulis*) toukilla (McFadzen 2000). Myös Campos ym. (2014) altistivat *D. magnan* 4 vrk ikäisiä juveniileja poikasia yksittäisesti huomattavasti alhaisemmilla RhB:n pitoisuuksilla 2,5 μM , 1,5 μM sekä 0,5 μM altistusajan ollessa vain 1 h.

Työssä käytetyt vesikirput (*D. magna*) oli kasvatettu kontrolloiduissa olosuhteissa, eivätkä ne siten olleet altistuneet aiemmin MXR-mekanismia mahdollisesti aktivoiville tai inhiboiville aineille. Luonnonvaraisia eläimiä käytettäessä on taas mahdollista, että eläimet ovat aiemmin altistuneet ABC-proteiiniryhmiä inhiboiville tai indusoiville aineille tai muille stressitekijöille, jotka vaikuttaisivat tulosten luotettavuuteen (Kurelec 1997, Smital 2000, Navarro ym. 2012). Työssä ei otettu huomioon myöskään eri inhibiittoreiden yhteisvaikutusta ABC-proteiinien inhiboitumiseen, kuten esim. metallin ja malli-inhibiittorin yhteisvaikutusta.

Aiempaan Campos ym. (2014) tekemään vastaavanlaiseen kokeeseen verrattuna, jossa MXR-mekanismia hoitavien ABC-proteiinien esiintymistä oli tutkittu *D. magna* työssä käytettyjen samojen inhibiittoreiden: MK571 sekä REV205 vaikutuksesta tapahtuvan solun

sisäisen fluoresenssin kasvun avulla, poikkesi monin tavoin tehdyistä testeistä. Campos ym. (2014) olivat tutkineet eri ABC-proteiiniryhmien ilmentymistä vesikirpun *D. magnan* munista 4 vrk ikäisiin juveniileihin yksilöihin. Substraatteina käytetyt fluoresoivat väriaineet (Rh123, RhB ja Ca-AM) olivat liuotettu DMSO:hon ja niiden pitoisuudet olivat 1,5 μM sekä 0,5 μM . Altistusaikana oli 1 – 2,5 h. Käytettyjen inhibiittoreiden MK571 ja reversiini 205 pitoisuudet olivat heidän kokeissa 1 – 10 μM , kun taas tehdyissä kokeissa inhibiittoripitoisuudet vaihtelivat 0,1 μM – 30 μM . Käytetyt vesikirput oli Camposin ym. (2014) tekemissä kokeissa immobilisoitu heti ennen altistuskokeita pistämällä neulalla vesikirpun sydämeen. Immobilisoinnin ansiosta solut ja kudokset ovat vielä eheitä ja substraattien poisto soluista vielä toimivaa. Campos ym. (2014) *D. magnan* 4 vrk ikäisillä poikasilla tekemien testien perusteella ABC-proteiinit pystyvät poistamaan tehokkaammin kalseiinia kuin rodamiineja ulos soluista. Siten myös ABC-proteiinien toiminnan estyessä Ca-AM:aa kertyy soluihin suhteessa enemmän kuin rodamiineja. Kontrolliin verrattuna rodamiini aiheutti *D. magnalla* 1,4 – 1,9-kertaisen fluoresenssin kasvun kun taas Ca-AM aiheutti suuremman 1,9 – 2,2-kertaisen fluoresenssin kasvun saman inhibiittorin vaikutuksesta.

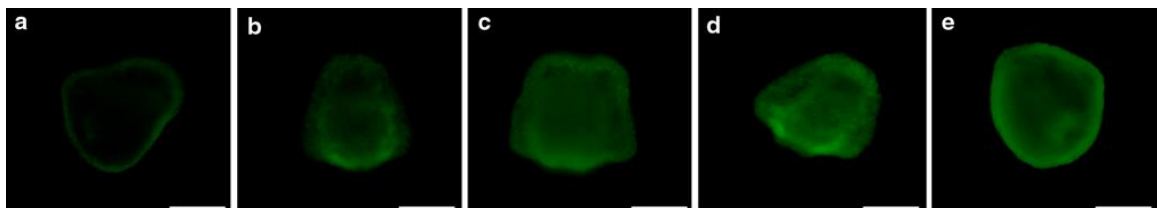
4.3 Verapamilin vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen *D. magnalla* sekä muilla vesieläimillä

Normalisoiduissa tuloksista testatut verapamilin pitoisuudet (pitoisuusalue: 0,0001 – 50 μM) eivät aiheuttaneet MXR-mekanismien proteiiniryhmien, P-gp1/ABCB1 ja mahdollisesti myös ABCC/MDR, toiminnan inhiboitumista tehdyissä kokeissa vesikirpulla *D. magna*. Substraatteina käytettyjen kalseiini-Am:n (1 μM ja 0,5 μM) tai rodamiini B:n (10 μM) fluoresenssit eivät olleet verapamilin aiheuttaman ABCB1- tai ABCC-proteiiniryhmien inhiboitumisen vaikutuksesta pääsääntöisesti korkeampaa *D. magnan* soluissa kuin positiivisena kontrolleina käytettyjen pelkän pelkän Ca-AM- tai rodamiini B-altistusten solunsisäiset fluoresenssit olivat. *D. magnan* märkäpainoon suhteutetut fluoresenssit olivat jopa alhaisempia testatuilla inhibiittoripitoisuuksilla kuin kontrollissa.

Tutkimuksessa käytetyt suurimmat verapamilin pitoisuudet olivat 10 μM , 20 μM ja 50 μM 1 μM Ca-AM:aa kohden 8 ml tilavuudessa. Tällöin muutama (1 – 3) vesikirpuista kuoli kahden tunnin mittaisen altistuksen aikana, joka saattoi johtua vesikirppujen vahingoittumisesta pipetoinnin aikana tai verapamilin toksisesta vaikutuksesta *D. magna*n. Suuremmilla pitoisuuksilla (10 μM , 20 μM ja 50 μM) tehty testi toistettiin vain

kerran. Saatuja tuloksia ei otettu huomioon tutkielmassa johtuen tuloksissa esiintyvistä suurista keskihajonnoista. Mahdollista on, että verapamil olisi vaikuttanut Ca-AM:n esteraasiaktiivisuuteen, jolloin Ca-AM ei olisi hajonnutkaan fluoresoivaksi kalseiiniiksi kokeiden aikana. Vaikka verapamilia pidetään spesifinä ABCB1/P-gp-inhibiittorina Haimeurin ym. (2004) mukaan suuremmat verapamilin konsentraatiot inhiboisivat myös MR-proteiineja (ABCC-ryhmä).

Verapamilin vaikutuksesta *D. magnan* MXR-aktiivisuuteen estymiseen ei löydy kirjallisuudesta tietoa. Campos ym. (2014) eivät käyttäneet verapamilia ABC-proteiinien inhibiittorina *D. magnalla* tekemässään tutkimuksessa. On mahdollista, ettei VER ei vaikuta *D. magnalla* lainkaan MXR:n ABC-proteiineihin. Monissa muilla vesieläimillä, kuten simpukoilla ja merisiilin toukilla, tehdyissä testeissä verapamilin on kuitenkin todettu aiheuttavan suoraan sen pitoisuuden kasvusta johtuvaa substraatin (Ca-AM ja rodamiinien) kertymistä koe-eläimen soluihin ja kudoksiin (Smital ym. 2000, Faria ym. 2011, Anselmo ym. 2012). Testatut VER-pitoisuudet ovat olleet muiden tekemissä vesieläimillä tehdyissä vastaavissa kokeissa pääosin korkeampia. Tehdyissä testeissä on huomattu esiintyvän myös lajikohtaisia eroja substraattien kertymiseen, joka kertoo MXR:n aktiivisuuden ja ABCB1-proteiiniryhmän esiintymisen vaihtelusta lajien välillä. Esimerkiksi Faria ym. (2011) ovat todenneet vasta yli 5 μM verapamilin pitoisuuden aiheuttavan Ca-AM:n sekä RhB:n ulosvirtauksen estymistä seeprasimpukalla (*Dreissena polymorpha*). Anselmon ym. (2012) mukaan taas verapamilin pitoisuuden kasvu (1 μM – 100 μM) 45 min. altistuksessa aiheuttaa kasvavaa Ca-AM:n kertymistä merisiilin toukan (*Psammochinus miliaris*) soluihin sen blastula-vaiheessa suhteessa kasvavaan VER-pitoisuuteen (kuva 9).



Kuva 9. 2,5 μM Ca-AM:n kertyminen merisiilin toukan (*P. miliaris*) blastulavaiheen soluihin kasvavan VER-pitoisuuden vaikutuksesta. Verapamilin pitoisuudet ovat a) 1 μM , b) 10 μM , c) 25 μM , d) 50 μM ja e) 100 μM (Anselmo ym. 2012).

Smital ym. (2000) mukaan 10 μM VER-pitoisuus aiheuttaa kontrolliin (2,5 μM RhB- tai 5 μM Rh123-altistus) verrattuna melkein kaksinkertaista rodamiini b:n kuin rodamiini 123:n fluoresenssien kasvua seeprasimpukan (*D. polymorpha*) sekä makeanveden merietanan (*Viviparus Viviparus*) kidusten soluihin. Tehdyssä testissä on huomatta myös *D. polymorphaan* kertyvän suhteessa enemmän substraattina toimivaa 2,5 μM rodamiini B:tä kuin *V. viviparukseen* tutkitun 10 μM VER:n vaikutuksesta. Kokeessa testattuun joutsensimpukkaan (*Anodonta cygnea*) kertyi taas vain ainoastaan hyvin vähän 2,5 μM RhB:tä kontrolliin verrattuna 20 μM VER-pitoisuudella. Tilastollisesti fluoresenssi ei ollut tällöin edes merkitsevästi korkeampaa kuin kontrollissa. Myöskään Zaján ym. (2008) mukaan kalan maksasolulinjojen MXR-aktiivisuuden estymiseen verapamililla ei ole suurta vaikutusta. Todennäköistä on, että eri lajien välillä esiintyy lajikohtaista sekä kudostyyppien välistä vaihtelua P-gp:n esiintymisen laajuudessa ja siten myös MXR-mekanismien aktiivisuudessa (Smital 2000, Faria ym. 2011).

Ambudkar ym. (1999) mukaan verapamilin tiedetään estävän P-gp:n ATPaasien aktiivisuutta korkeissa pitoisuuksissa, mutta aktivoivan ATPaasien aktiivisuutta alhaisissa konsentraatioissa, jopa 100 - 500 %, K_m -arvon ollessa 0,5 - 2,0 μM . Siten voidaan olettaa, että P-gp:n ATPaasien aktivoituminen työssä testattujen verapamilin pienten pitoisuuksien vaikutuksesta on aiheuttanut alhaisempaa RhB:n solunsisäistä fluoresenssia kontrolliin verrattuna *D. magna* soluissa.

4.3.1 Verapamilin toksinen vaikutus vesikirppuun (*D. magna*) ja muihin vesieläimiin

MXR-mekanismien inhibiittoreina toimivilla aineilla on todettu olevan monia toksisia vaikutuksia eliöihin sekä myös tutkimuksessa käytettyyn vesikirppuun *D. magna*. Verapamilin toksinen vaikutus eläimiin johtuu mahdollisesti sen kyvystä häiritä eliöiden solukalvon kalsiumkanavia (Einicker-Lamas 2003). Villegas-Navarron ym. (2003) mukaan verapamil vaikuttaa eläimillä myös niiden sydämen aktiivisuuteen. Verapamil aiheuttaa tällöin annoksesta riippuvaista sydämen sykkeen kiihtyvyyttä *D. magnalla* 10^{-7} – 10^{-5} M pitoisuuksissa. 10^{-4} M pitoisuudessa sydämen syke alkasi laskea. Villegas-Navarro ym. (2003) ovat määrittäneet *Daphnia magnalle* verapamilin LC_{50} -arvon 48 h altistuksessa pitoisuudessa 7,04 mg/L, eli n. 14 $\mu\text{M/L}$. Anselmo ym. (2012) ovat todenneet verapamilin olevan akuutisti toksista rantamerisiiliin (*Psammochins. miliaris*) toukille yli 100 μM pitoisuudessa 45 min altistuksessa. Tällöin toukka alkaa menettää sen ruumiin sekä solukalvojen eheyttä. Vastaava ilmiö on voinut tapahtua myös tehdyissä kokeissa

vesikirpulla, jolloin fluoresoiva väriaine on päässyt virtaamaan ulos soluista solukalvon rikkoutuessa. Suurin käytetty verapamilin pitoisuus oli kuitenkin vain 50 μM 2 h altistuksessa.

4.4 Reversiini 205 vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen *D. magnalla* sekä muilla vesieläimillä

Normalisoitujen tulosten perusteella reversiini 205:n pitoisuudet 5 μM ja 20 μM aiheuttivat tilastollisesti korkeamman fluoresenssin kontrolliin (10 μM rhB) verrattuna. Reversiini 205:n on todettu toimivan ABCB1/P-gp-ryhmän inhibiittorina. Tilastollisesti merkitsevä ero fluoresenssin voimakkuudessa kontrollin ja inhibiittorialtistuksen välillä tarkoittaa, että vesikirpulla (*D. magna*) esiintyy toimivia ABCB1-ryhmän proteiineja. Reversiinin 205 vaikutuksesta näiden proteiinien toiminta inhiboituu, jolloin proteiinien substraattina toimivaa rodamiini B:tä kertyy soluihin sisälle. Saaduissa tuloksissa kuitenkin reversiinin 205:n pitoisuuksilla 7,5 μM ja 10 μM , eikä myöskään pienemmillä pitoisuuksilla: 1 μM ja 2,5 μM , ollut tilastollisesti merkitsevää poikkeamaa verrattuna kontrolliin (p-arvot > 0,05). Reversiini 205:n ABCB-proteiineja inhiboiva vaikutus toimisi siten *D. magnan* osalta mahdollisesti vain tietyllä pitoisuusalueella.

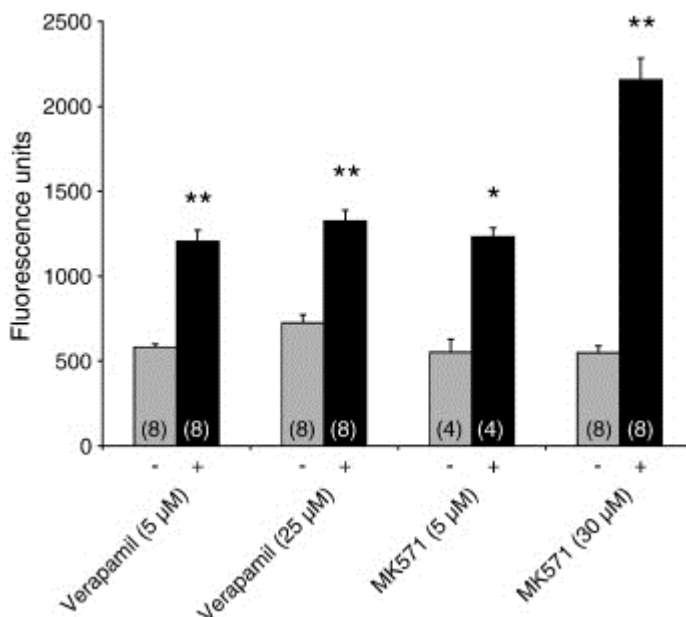
Muilla vesieläimillä on myös, kuten seeprasimpukoiden (*Dreissena polymorpha*) toukilla, on todettu esiintyvän toimivia ABCB1-ryhmän proteiineja, jotka inhiboituvat REV205:n pitoisuuden kasvun (0,05 – 10 μM) vaikutuksesta. REV205:n on todettu olevan myös kaikkein potentiaalisin ABCB1-ryhmän inhibiittori *D. polymorphalla* alhaisimmalla IC_{50} -arvolla. *D. polymorphan* alkioiden osalta reversiini 205:n on todettu olevan 48 h altistuksessa myös vain vähän toksista pitoisuuksien 10 μM ja 20 μM alapuolella (Faria ym. 2011).

4.5 MK571 vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen *D. magnalla* sekä muilla vesieläimillä

Normalisoitujen tulosten perusteella testatut MK571:n pitoisuudet (0,1 μM – 30 μM) eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevästi korkeampaa fluoresenssin kasvua kontrolliin (10 μM rhB) verrattuna *D. magnalla*. Normalisoiduissa tuloksissa esiintyi ainoastaan hieman korkeampaa fluoresenssia vain MK571:n pitoisuuksilla 0,5 μM ja 20 μM . Tilastollisesti fluoresenssin erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä (p-arvo > 0,05). Tehtyjen testien perusteella täysikasvuisella *D. magnalla* ei siten esiintyisi aktiivista ABCC/MR-proteiinien toimintaa, joka inhiboituisi MK571:n vaikutuksesta. Vaikka MK571 pidetään spesifinä

ABCC-proteiiniryhmän inhibiittorina Farian ym. (2011) mukaan MK571 pystyy mahdollisesti inhiboimaan suuremmilla pitoisuuksilla myös ABCB1-ryhmän proteiineja.

Muilla vesieläinlajeilla on kuitenkin huomattu MK571:n vaikutuksesta johtuvaa ABCC-proteiinien inhiboitumista ja substraattina toimivien fluoresoivien väriaineiden, sekä kalseiinien ja rodamiinien, kertymistä vesieläinten soluihin (Hamdoun ym. 2004, Smital ym. 2004, Luckenbach ym. 2008, Whalen ym. 2010, Faria ym. 2011). Luckenbach ym. (2008) ovat todenneet MK571:n pitoisuuden kasvuun 0,1 – 50 μM verrannollista kalseiini-AM:n kertymistä täysikasvuisten Kalifornian simpukoiden (*Mytilus californianus*) kudosten kudoksiin ja soluihin. Pienet MK571:n 0 – 2 μM pitoisuudet aiheuttivat vain vähäistä kalseiinin kertymistä kudosten soluihin. Yli 10 μM :n MK571:n pitoisuudet aiheuttavat taas eksponentaalisesti kasvavaa kalseiinin kertymistä *M. californianusen* kudoksiin. Hamdounin ym. 2004 ja Smitalin ym. 2004 tekemien testien perusteella myös merisiilin (*Strongylocentrotus purpuratus*) alkioilla tapahtuu 10 μM MK571:n 90 min altistuksen vaikutuksesta kalseiini-AM:n huomattavan suurta kertymistä merisiilin (*S. purpuratus*) kudosten soluihin. Hamdounin ym. (2004) mukaan MK571:n vaikutuksesta fluoresenssin voimakkuus kasvoi 80-kertaisesti verrattuna pelkkään Ca-AM-altistukseen. Merisiilin *S. purpuratus* osalta myös MK571 toimii voimakkaimpana inhibiittorina (kuva 11).



Kuva 12. ABCB-ryhmän inhibiittorina toimivan verapamilin ja ABCC-ryhmän inhibiittorina toimivan MK571:n vaikutus fluoresoivana väriaineena käytetyn 500 nM Ca-AM:n kertymiseen *Tritonia hamnerorum*in soluihin. Harmaat pylväät kuvassa esittävät kontrollia (DMSO ja 500 nm Ca-AM-altistus) (Whalen ym. 2010).

4.6 Raskasmetallien vaikutus vesieläimiin sekä MXR-mekanismiin

Metalleja tiedetään esiintyvän laajalti kaikissa vesiympäristöissä ja niiden pitoisuus ympäristössä tulee kasvamaan esimerkiksi kaivosteollisuuden kasvun myötä. Metallien kasvava määrä ympäristössä lisää todennäköisesti myös metallien sisäänottoa sekä biokertyvyyttä eliöihin. Erilaiset toimivat mekanismit, joiden avulla metalleja voidaan erittää elimistössä, ovat siten eliöiden selviytymisen kannalta tärkeitä (Offermann 2009). Roesijadin mukaan (1996) metallien biokertymisessä eri eliöryhmien kudoksiin tiedetään esiintyvän hyvinkin suurta vaihtelua eri eliöryhmien välillä. Erityisesti pehmytkudoksiin eläimiin, kuten ostereihin, on todettu kertyvän paljon metalleja. Pandey & Madhurin (2014) mukaan myös esimerkiksi eläimen kehitysvaihe vaikuttaa metallien biokertymiseen ja erityisesti varhaisemmat kehitysvaiheet ovat herkkiä metallialtistukselle.

Ensisijaisesti metalleja poistetaan elimistöstä detoksifikaatio-prosesseissa avulla, kuten tioli-ryhmiä sisältävien molekyylien, kuten metallotioneien (MT) kelaation avulla (Timbrell 2001, Offermann 2009). Metallialtistusten, kuten työssä tutkitun kadmiumin, tiedetään myös indusoivan aineiden 2. vaiheen detoksifikaation GST-entsyymien sekä ns. stressientsyyminä toimivan lämpöshokkiproteiinien HSP70:n geeniekspressiota. Myös MXR-mekanismiin ABC-proteiinien indusoitumista on havaittu nisäkkäillä sekä

vesieläimillä. Näiden entsyymien ja proteiinien ilmentymisen lisääntymistä voidaan pitää eräänä biomarkkerina arvioitaessa eliön altistumista metalleille (Homolya 2003, Achard ym. 2004, Lauritano 2012). Della Torren ym. (2012) mukaan vielä ei ole kuitenkaan tehty paljoakaan tutkimusta sen osalta kuinka merkittävästi MXR-mekanismi ja ABC-proteiinien toiminta indusoituu metallialtistusten seurauksena vesieläimillä. Achardin ym. (2004) mukaan on kuitenkin myös useilla vesieläimillä huomattu tapahtuvan metallien poistoa soluista myös MXR:n ABC-proteiinien vaikutuksesta. Esimerkiksi MXR-proteiinien titterin on todettu kasvavan sinkin, epäorgaanisen elohopean sekä kuparin vaikutuksesta makean veden simpukan (*Corbicula fluminea*) kidusten soluissa. Della Torren ym. (2012) kalan solulinjoilla tekemien *in vitro*-testien perusteella MRP1/ABCC1-proteiinien geenit indusoituvat taas vain vähän metallialtistuksen seurauksena.

4.7 Nikkelikloridialtistuksen vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen *D. magnalla* sekä muilla vesieläimillä

Normalisoitujen tulosten perusteella ainoastaan nikkelikloridin (NiCl_2) pitoisuus (0,1 mg/L) aiheutti *Daphnia magnalla* MXR-mekanismiin ja ABC-proteiinien inhiboitumisesta johtuvaa voimakkaampaa solunsisäistä fluoresenssia kuin kontrollissa (10 μM RhB-altistus). Tilastollisesti ero ei ollut kuitenkaan merkitsevää riippumattoman Kruskal-Wallis testin mukaan (p-arvo > 0,05). Muilla tilastollisilla testeillä saatiin kuitenkin tilastollisesti merkitsevä ero, siten on mahdollista nikkelin aiheuttavan MXR-mekanismiin ABC-proteiinien inhiboitumista.

Suuremmilla nikkelikloridin pitoisuuksilla 0,5 mg/l ja 1 mg/l solunsisäinen fluoresenssi oli alhaisempaa kuin kontrollissa. Fluoresenssin aleneminen aiheutui mahdollisesti NiCl_2 :n toksisesta vaikutuksesta *D. magnan* soluihin, jolloin substraattina toimivaa väriainetta oli päässyt virtaamaan ulos soluista, vaikka sekä altistusaika että tutkitut pitoisuudet olivat huomattavasti pienemmät kuin mitä on todettu olevan toksisia *D. magnalle* (Ferreira ym. 2010). Altistusnesteen fluoresenssissa esiintyi myös kontrolliin verrattuna alhaisempaa fluoresenssia pitoisuuksilla 0, 5 ja 1 mg/l yhdessä yksittäisessä testissä.

Nikkeli on yleisesti käytetty metalli, jota vapautuu mm. kaivosteollisuudesta ja jätteiden poltosta korkeitakin pitoisuuksia sekä maa- että vesiympäristöön (Vandenbrouck ym. 2009). Nikkeli toimii yhtenä eläimille välttämättömänä hivenaineena ja sen toksisuus tulee ilmi eliöillä vasta korkeissa pitoisuuksissa (Achard 2004). Nikkelin vaikutuksesta tai sen metaboliasta vesikirpulla (*D. magna*) tai muilla vesieläimillä tiedetään vielä hyvin vähän

(Muysen ym. 2004, Ferraira ym. 2010). Kirjallisuudesta ei löydy aiempaa tutkimusta, jossa NiCl_2 :n vaikutusta MXR-mekanismiin inhiboitumiseen tai voimistumiseen olisi tutkittu aiemmin vesikirpulla tai muilla vesieläimillä.

Ferrairan ym. (2010) mukaan puolet koe-eläimistä tappava nikkelin LC_{50} -arvo 48 h altistuksessa on vesikirpulla (*D. magna*) 7,36 mg/L. Työssä käytetyt nikkelpitoisuudet olivat huomattavasti tätä pitoisuutta alhaisemmat altistusajan ollessa myös huomattavasti lyhyempi (n. 2 h), joten nikkelillä tuskin oli toksista vaikutusta *D. magna*n tehtyjen altistuskokeiden aikana. Myöskään Kszos ym. (1992) mukaan *D. magna* ei ole kovinkaan herkkä nikkelin vaikutukselle. *D. magna* pystyy selviytymään korkeissakin nikkelpitoisuuksissa, mutta sen lisääntymiseen riittävän suuri nikkelpitoisuus vaikuttaa kuitenkin alentavasti. Vandenbrouck ym. (2009) mukaan kroonisen 96 h nikkeli-altistuksen (Ni^{2+}) tiedetään aiheuttavan sekä merkittävää hapenkulutuksen että kehon hemoglobiinin alenemista *D. magna*lla. Vandenbrouck ym. (2009) testatut Ni^{2+} :n pitoisuudet olivat 0,125, 0,5, 1 sekä 2 mg/L. Pienin testattu pitoisuus 0,125 mg/L aiheutti solujen energian jakamassa (CEA) 96 h aikavälillä merkittävää lisääntymistä. Suuremmat pitoisuudet 0,5, 1 ja 2 mg/L aiheuttivat taas merkittävää laskua CEA:ssa. Kolmipäiväisessä (72 h) altistuskokeessa huomattiin myös Ni^{2+} :n pitoisuuksien 1 ja 2 mg/L aiheuttavan *D. magna*n kasvussa tilastollisesti merkitsevää kasvun alenemista kontrolliin verrattuna 96 h altistuksen jälkeen. Myös 0,5 mg/L pitoisuus aiheutti merkitsevää kasvun hidastumista *D. magna*lla.

4.8 Kadmiumkloridialtistuksen vaikutus ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumiseen *D. magna*lla sekä muilla vesieläimillä

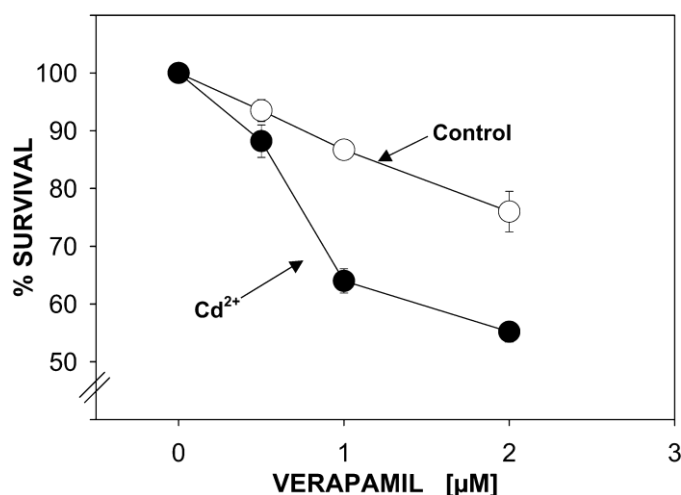
Normalisoitujen tulosten perusteella yksikään testattu kadmiumkloridin (CdCl_2) pitoisuus (0,0005 – 0,1 mg/L) ei aiheuttanut *Daphnia magna*lla MXR:n ABC-proteiinien inhiboitumisesta johtuvaa voimakkaampaa solunsisäistä fluoresenssia kuin kontrollissa (0,5 μM ja 1,0 Ca-AM tai 10 μM RhB-altistus). Ainoastaan CdCl_2 :n pitoisuus 0,0005 mg/L aiheutti mahdollisesti MXR-mekanismiin inhiboitumisesta johtuvaa solunsisäisen fluoresenssin kasvua kontrolliin verrattuna. Tilastollisesti ero ei ollut kuitenkaan merkitsevää (p-arvo > 0,05).

Kadmium on raskasmetalli, jolla on ainoastaan toksinen vaikutus eliöihin (Pandey & Madhuri 2014). Kirjallisuudesta ei löydy tutkimusta, jossa olisi tutkittu kadmiumin tai

kadmiumkloridin vaikutusta MXR-mekanismiin *D. magnalla*. Muilla vesieläimillä Cd:n tai CdCl₂:n vaikutusta MXR-mekanismiin ilmenemiseen on kuitenkin hieman tutkittu.

Eufemian & Epelin (2000) tekemän tutkimuksen mukaan kahden päivän (48 h) akuutti altistus merivedelle yhdistettynä 100 p.p.b. ja 500 p.p.b. CdCl₂:n pitoisuuksiin aiheuttaa korkeampaa 1 µM rodamiinin kertymistä simpukan (*Mytilus californianus*) kidusten soluihin verrattuna altistukseen pelkälle merivedelle sekä 1 µM rodamiinille. Tilastollisesti erot ovat myös merkitseviä kummankin pitoisuuden osalta p-arvojen ollessa 100 p.p.b:n osalta 0,001 ja 500 p.p.b:n osalta 0,005. Tehty tutkimus toimii Achardin ym. (2004) mukaan ensimmäisenä todisteena MXR-mekanismiin sekä P-glykoproteiinien toiminnan ilmentymisen lisääntymisenä metallialtistuksen vaikutuksesta selkärangattomilla vesieläimillä.

Einicker-Lamas ym. (2003) ovat tutkineet ABC-proteiinien esiintymistä sekä verapamilin vaikutusta kadmiumin sietokykyyn yksisoluisella *Euglena gracilisilla*. He ovat tutkimuksessaan altistaneet 30 min. *E. gracilista* 3 µM verapamilille sekä substraattina toimivalle rodamiini 123:lle (5 µg/ml). 3 µM verapamil-altistus sai aikaan tehdyissä kokeissa selvää rodamiini 123:n kertymistä *E. gracilisin* soluihin. Saatujen tulosten perusteella *E. gracilisilla* esiintyisi siten substraattien ulosvirtaa hoitavia MRP- ja P-g-proteiinien kaltaisia proteiineja. Tehdyssä tutkimuksessa saatiin selville myös Cd²⁺:n pitoisuuden kasvun estävän fluoresoivana väriaineena käytetyn Rodamiini 123:n ulosvirtaa soluista. Myös tilastollisesti esiintyy merkitsevä ero (P-arvo 0,002) verrattuna kontrolliin, jossa *E. gracilisin* soluja on altistettu pelkälle rodamiini 123:lle. Saatu tulos vahvistaa siten käsitystä kadmiumin toiminnasta MXR-mekanismiin inhiboijana. Einicker-Lamas ym. (2003) mukaan verapamilin aiheuttaman MXR:n ABC-proteiinien toiminnan inhiboitumisen johdosta kadmiumin toksinen vaikutus soluihin pääsee myös voimistumaan. Kolmipäiväisessä (72 h) altistuksessa 1 µM verapamilin pitoisuus aiheutti yhdessä 1,36 µM kadmiumin kanssa 40 % laskun yksisoluisen *E. gracilisin* selviytymisessä, kun taas pelkässä kadmiumaltistuksessa selviytyminen laski 13 % (kuva 13).



Kuva 13. Verapamilin (0 – 2 µM) vaikutus yhdessä 1,36 µM kadmiumin (Cd²⁺) kanssa sekä pelkän kadmiumin (control) vaikutus yksisoluisen *E. gracilis* soluviiljelmän (1×10⁴ solua/ml) eloonjäämiseen kolmen päivän aikana. Kuvassa olevat arvot on normalisoitu 100 % kontrollina käytetyn pelkälle kadmiumille altistettujen solujen suhteen. Kadmiumaltistus yhdessä verapamilin kanssa aiheuttaa suuremman kuolemisprosentin kuin pelkkä verapamil-altistus (Einicker-Lamas ym. 2003).

Myös McFadcen ym. (2000) mukaan kadmiumkloridialtistus yhdessä 20 µM verapamilin kanssa aiheuttaa sekä kehityksen että kasvun alenemista sinisimpukalla (*Mytilus edulis*). Cornwallin ym. (1995) mukaan taas CdCl₂ ei toimisi P-gp:n tai muiden MXR-mekanismia hoitavien ABC-proteiinien substraattina Kalifornian simpukalla (*Mytilus californianus*). CdCl₂:a ei siten poisteta soluista ABC-proteiinien vaikutuksesta.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä tutkittiin MXR-mekanismien toimivuutta ja sitä hoitavien ABC-proteiiniryhmien (ABCB1 ja ABCC) esiintymistä täysikasvuisella *Daphnia magna*. Tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella ainoastaan ABCB-proteiiniryhmän esiintymisestä ja MXR-mekanismien toimivuudesta täysikasvuisella vesikirpulla *D. magna* saatiin todiste. Työssä tutkituilla kadmiumkloridilla tai nikkelikloridilla ei testattujen NiCl₂ ja CdCl₂ pitoisuuksien perusteella ei ollut vaikutusta MXR:ää hoitaviin ABC-proteiiniryhmiin.

MXR-mekanismia hoitavia ABC-proteiineja on kuitenkin todettu esiintyvän kaikilla eliöillä. Lisää tutkimusta tarvitaan *D. magna* osalta MXR-mekanismien ja ABC-proteiinien toiminnan ja esiintymisen kartoittamiseen.

KIITOKSET

Kiitokset ohjaajilleni FT Eeva-Riikka Vehniäiselle avustuksesta kokeiden tekoon ja lähdemateriaalin kartoitukseen sekä professori Jussi Kukkoselle mielenkiintoisesta pro gradutyön aiheesta.

KIRJALLISUUS

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., & Bourdineaud, J. P. 2004: Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. –*Aquatic toxicology* 67: 347 – 357.
- Altenburger, R., Nendza, M., Schüürmann, G. 2003: Mixture toxicity and its modelling by quantitative structure –activity relationships. –*Environmental Toxicology & Chemistry* 22: 1900 – 1925.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. 1999: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter 1. –*Annual review of pharmacology and toxicology* 39: 361 – 398.
- Anselmo, H. M., van den Berg, J. H., Rietjens, I. M., & Murk, A. J. 2012: Resistance (MXR) in echinoid larvae as a possible mode of action for increased ecotoxicological risk of mixtures. –*Ecotoxicology* 21: 2276 – 2287.
- Bain, L. J., McLachlan, J. B., & LeBlanc, G. A. 1997: Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. –*Environmental health perspectives* 105: 812 – 818.
- Bamdad, M., Brousseau, P., & Denizau, F. 1999: Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. –*FEBS letters* 456: 389–393.
- Bard, S. M. 2000: Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. –*Aquatic Toxicology* 48: 357 – 389.
- Campos, B., Altenburger, R., Gómez, C., Lacorte, S., Piña, B., Barata, C., & Luckenbach, T. 2014: First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. –*Aquatic Toxicology*: 148: 139 – 151
- Cornwall, R., Toomey, B. H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W. M., Epel, D. 1995: Characterization of multixenobiotic: multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. –*Aquatic Toxicology* 31: 277 – 296.
- Costa, J., Reis-Henriques M. A., Castro, L.F.C., Ferreira, M. 2012: Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. –*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155: 469 – 482.
- Dassa, E. & Bouige, P. 2001: The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. –*Research in Microbiology* 152: 211 – 229.
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. 2001: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. –*Journal of lipid research* 42: 1007 – 1017.

- Dean, M. 2005: The genetics of ATP-binding cassette transporters. –Methods in enzymology 400: 409 – 429.
- Deeley, R.G., Westlake, C. & Cole, S. P. 2006: Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. –Physiological Reviews 86: 849 – 899.
- Della Torre, C., Zaja, R., Loncar, J., Smital, T., Focardi, S., & Corsi, I. 2012: Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. –Chemico-biological interactions 198: 9 – 17.
- Einicker-Lamas, M., Morales, M., Miranda, K., Garcia-Abreu, J., Oliveira, A, J. F., Silva, F. L. S. & Oliveira M. M. 2003: P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. –Journal of Comparative Physiology B 173: 559 – 564.
- Endicott, J. A. & Ling, V. 1989: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. –Annual review of biochemistry 58: 137 – 171.
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson C., N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A. & Smital, T. 2008: Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. –Environmental Science & Technology 42: 3914 – 3920.
- Essouf, M., Broxterman H-J. & Garnier-Suillerot, A. 1998: Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethyl ester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. –Biochemistry 37: 2243 – 2250.
- Eufemia, N. A. & Epel, D. 2000: Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. –Aquatic toxicology 49: 89 – 100.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piñna, B. & Barata, C. 2011: Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. –Aquatic Toxicology 101: 78–87.
- Ferreira, A. L., Serra, P., Soares, A. M. & Loureiro, S. 2010: The influence of natural stressors on the toxicity of nickel to *Daphnia magna*. –Environmental Science and Pollution Research 17: 1217 – 1229.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R.G. & Cole, S. P. C. 2004: The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. –Current Drug Metabolism 5: 21 – 53.
- Hamdoun, A. M., Cherr, G. N., Roepke, T. A. & Epel, D. 2004: Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos *Strongylocentrotus purpuratus*. –Developmental biology 276: 452 – 462.
- Higgins, C. F. 2007: Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. –Nature 446: 749 – 757.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. & Locher, K. P. 2007 a: Structure and mechanism of ABC transporter proteins. –Current opinion in structural biology 17: 412 – 418.
- Hollenstein, K., Frei, D. C. & Locher, K. P. 2007 b: Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. –Nature 446: 213 – 216.

- Homolya, L., Holló, Z., Germann, U, A., Pastan, I., Gottesman, M. M. & Sarkadi, B. 1993: Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. –*Biology & Chemistry* 268: 493 – 496.
- Homolya, L., Váradi, A. & Sarkadi, B. 2003: Multidrug resistance-associated proteins: export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. –*Biofactors* 17: 103 – 114.
- Jones, P. M. & George, A. M. 2004: The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. –*Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 682 – 699.
- Juliano, R. L. & Ling, V. A. 1976: Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. – *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 455: 152 – 162.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y. & Janvilisri, T. 2007: ATP-binding cassette multidrug transporters in indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. –*Aquatic toxicology* 85: 124 – 132.
- Kszos, L. A., Stewart, A. J. & Taylor, P. A. 1992: An evaluation of nickel toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* in a contaminated stream and in laboratory tests. –*Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 1001 – 1012.
- Kurelec, B. 1995: Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. –*Science of the total environment* 171: 197 – 204.
- Kurelec, B., Britvić, S., Pivčević, B. & Smital, T. 1998: Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment. –*Marine environmental research* 46: 415 – 419.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivčević, B., Eufemia, N. & Epel, D. 2000: Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. –*Ecotoxicology* 9: 307 – 327.
- Lauritano, C., Procaccini, G. & Ianora, A. 2012: Gene expression patterns and stress response in marine copepods. –*Marine environmental research* 76: 22 – 31.
- Lee, Y. M. A., Cui, Y., König, J., Risch, A., Jäger, B., Drings, P., Bartsch, H., Keppler, D. & Nies, A. T. 2004: Identification and functional characterization of the natural variant MRP3-Arg1297His of human multidrug resistance protein 3 (MRP3/ABCC3). –*Pharmacogenetics and Genomics*. 14: 213 – 223.
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. & Bates, S. E. 2001: From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. –*Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 931 – 959.
- Locher, K. P. 2009: Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical transactions of the Royal Society B. –Biological Sciences* 364: 239 – 245.
- Luckenbach, T., Corsi, I. & Epel, D. 2004: Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. –*Marine environmental research* 58: 215 – 219.
- Luckenbach, T. & Epel, D. 2005: Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. –*Environmental Health Perspectives* 113: 17 – 24.

- Luckenbach, T., Altenburger, R. & David, E. 2008: Teasing apart activities of different types of ABC efflux pumps in bivalve gills using the concepts of independent action and concentration addition. –*Marine Environmental Research* 66: 75 – 76.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M. & Lowe, D. 2000: Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. –*Marine environmental research*, 50: 319 – 323.
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M. N. & Porte, C. 2000: Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. –*Aquatic toxicology* 50: 167 – 176.
- Minier, C. & Moore, M. N. 1996: Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. –*Marine ecology progress series* 142: 165 – 173.
- Moreau, X., Saez, G., Thiéry, A., Clot-Faybesse, O., Guiraudie-Capraz, G., Bienboire-Frosini, C. & De Jong, L. 2008: ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): A biomarker calibration step for *in situ* monitoring of xenobiotic exposure. – *Environmental pollution* 153: 574 – 581.
- Muysen, B. T., Brix, K. V., DeForest, D. K. & Janssen, C. R. 2004: Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. –*Environmental reviews* 12: 113 – 131.
- Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B. & Luckenbach, T. 2012: Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. –*Aquatic Toxicology* 122: 144 – 152.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Number 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation.
- Offermann, K., Matthäi, A. & Ahlf, W. 2009: Assessing the importance of dietborne cadmium and particle characteristics on bioavailability and bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. –*Environmental toxicology and chemistry* 28: 1149 – 1158.
- Pandey, G. & Madhuri, S. 2014: Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. –*Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* 2: 17 – 23.
- Poynton, H. C., Varshavsky, J. R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P. S. & Vulpe, C. D. 2007: *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. –*Environmental science & technology* 41: 1044 – 1050.
- Rees, D. C., Johnson, E. & Lewinson, O. 2009: ABC transporters: the power to change. – *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 218 – 227.
- Roesijadi, G. 1996: Metallothionein and its role in toxic metal regulation. –*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113: 117 – 123.
- Sauerborn, R., Polancec, D. S., Zaja, R. & Smital, T. 2004: Identification of the multidrug resistance-associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). – *Marine environmental research* 58: 199 – 204.
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L. & Ling, V. 2004: The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. –*Genome Biology*. 5: R15 – R15.

- Smital, T. & Kurelec, B. 1997: Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: *in vivo* demonstration of their effects. –Environmental toxicology & chemistry 16: 2164 – 2170.
- Smital, T. & Kurelec, B. 1998 a: The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. –Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 399: 43 – 53.
- Smital, T. & Kurelec, B. 1998 b: The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. –Marine environmental research 46: 443 – 447.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S. & Kurelec, B. 2000: Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. –Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 126: 175 –186.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L. & Epel, D. 2004: Emerging contaminants -pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. –Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552: 101 – 117.
- Sturm, A., Cunningham, P. & Dean, M. 2009: The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. –BMC genomics 10: 170.
- Timbrell, J. 2001: Introduction to toxicology. –CRC Press.
- Timofeyev, M. A., Shatilina, Z. M., Bedulina, D. S., Menzel, R. & Steinberg, C. E. W. 2007: Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*. –Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 146: 496 – 503.
- Toomey, B. H. & Epel, D. 1993: Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins. –The Biological Bulletin 185: 355 – 364.
- Vandenbrouck, T., Soetaert, A., Van der Ven, K., Blust, R. & De Coen, W. 2009: Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular fingerprints and (sub) organismal effects. –Aquatic Toxicology 92: 18 – 29.
- Van Veen, H. W. & Konings, W. N. 1998: The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. –Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Bioenergetics: 1365: 31 – 36.
- Whalen, K. E., Sotka, E. E., Goldstone, J. V. & Hahn, M. E. 2010: The role of multixenobiotic transporters in predatory marine molluscs as counter-defense mechanisms against dietary allelochemicals. –Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 152: 288 – 300.
- Villegas-Navarro, A., Rosas-L, E. & Reyes, J. L. 2003: The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. –Comparative Biochemistry and Physiology 136: 127 – 134.
- Xu, X., Fu, J., Wang, H., Zhang, B., Wang, X. & Wang, Y. 2011: Influence of P-glycoprotein on embryotoxicity of the antifouling biocides to sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*). –Ecotoxicology: 20: 419 – 428.

- Zaja, R., Caminada, D., Lončar, J., Fent, K. & Smital, T. 2008: Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. –*Toxicology and Applied Pharmacology* 227: 207 – 218.
- Zaja, R., Lončar, J., Popovic, M. & Smital, T. 2011: First characterization of fish P-glycoprotein (abcb1) substrate specificity using determinations of its ATPase activity and calcein-AM assay with PLHC-1/dox cell line. –*Aquatic toxicology* 103: 53 – 62.
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, W. & Wang Z. 2014: Basal and benzo[a]pyrene-induced expression profile of phase I and II enzymes and ABC transporter mRNA in the early life stage of Chinese rareminnows (*Gobiocypris rarus*). –*Ecotoxicology and Environmental Safety* 106: 86 – 94.