

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

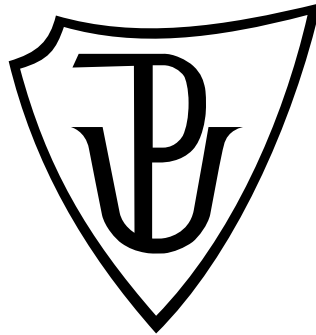


Diplomová práce

Olomouc 2012

Bc. Jana Potočková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Interakce inhibitorů tyrosinových kinas s lékovými
transportéry**

Diplomová práce

Bc. Jana Potočková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce Doc. RNDr. Petra Mlejnk, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Olomouci dne

.....

Souhrn

Tyrosinkinasové inhibitory (TKI) představují skupinu moderních protinádorových léčiv schopných inhibovat receptorové i nerekceptorové tyrosinkinasy. Tyrosinkinasy jsou enzymy zodpovědné za aktivaci kaskády signálních drah prostřednictvím fosforylace celé řady proteinů. V důsledku aberantní aktivace může dojít k maligní transformaci buňky. Modelovým nádorovým onemocněním byla v tomto případě chronická myeloidní leukémie, charakterizovaná přítomností tzv. filadelfského chromozomu spjatého s produkcí konstitutivně aktivované Bcr-Abl tyrosin kinasy.

Při aplikaci TKI však může dojít k rozvoji mnohočetné lékové rezistence. Jedním z mechanismů, které přispívají k tomuto fenoménu, je zvýšená exprese lékových transportérů z ABC rodiny (ATP – binding cassette). Nejčastěji se v této souvislosti uvažuje o P-glykoproteinu (P-gp, ABCB1), MXR (mitoxantrone resistance protein; ABCG2) a MRP1 (multidrug associated protein 1; ABCC1). Ty mají schopnost transportovat molekuly léčiva ven z buňky, čímž přispívají ke vzniku rezistence.

Nejnovější studie ukázaly, že TKI, které se používají k léčbě nádorů, mohou sloužit nejen jako substráty, ale i jako inhibitory výše zmíněných lékových transportérů. Údaje v literatuře však jsou často protichůdné. Proto jsme se touto otázkou zabývali v této práci. Měřili jsme vliv vybraných TKI (imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib) na aktivitu P-gp. Pro srovnání byla rovněž měřena aktivita P-gp po aplikaci klasických inhibitorů P-gp (cyklosporin A, verapamil, valsopodar a zosuquidar). Zjistili jsme, že imatinib působí jako inhibitor P-gp, ale jeho účinek je slabý. Jeho metabolit, N-desmethylimatinib, nevykazuje žádný inhibiční účinek na P-gp stejně jako dasatinib. Nilotinib se jeví jako účinný inhibitor P-gp, srovnatelný s účinky cyklosporinu A nebo verapamilu. Na druhé straně zřejmě nebude možné využít nilotinib v klinické praxi, neboť byla prokázána jeho obecná cytotoxicita v koncentracích, kdy má inhibiční účinek na P-gp.

Dlouhodobým působením mitoxantronu v kombinaci s nilotinibem jsme z buněk K562 vyseletovali rezistentní linii K562/ABCG2, u níž jsme pozorovali zvýšenou expresi ABCG2 transportéru. Exprese transportérů ABCB1 a ABCC1 však nebyla ovlivněna. Selektované buňky vykazovaly největší rezistenci vůči imatinibu, méně potom vůči nilotinibu a nejméně vůči dasatinibu. Pozorovanou rezistenci bylo možné zvrátit selektivním inhibitorem ABCG2 transportéru.

Summary

Tyrosine-kinase inhibitors (TKIs) are a group of modern anticancer drugs capable of inhibiting receptor and non-receptor tyrosine kinases. Tyrosine kinases are enzymes responsible for activation of cascade signaling pathways by means of phosphorylation of a series of proteins. Consequently, aberrant activation can lead to the malignant transformation of cells. A model cancer that was considered was chronic myeloid leukemia, which is characterized by the presence of the so called Philadelphia chromosome, resulting in the production of a constitutively activated Bcr-Abl tyrosine kinase.

The use of TKIs may lead to the development of multiple drug resistances. One of the mechanisms that contribute to this phenomenon is the increased expression of drug transporters from the ABC family (ATP – binding cassette). The most often considered in this context are P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), MXR (mitoxantrone resistance protein; ABCG2) and MRP1 (multidrug associated protein 1; ABCC1). These molecules have the ability to transport drugs out of cells, thereby contributing to the emergence of resistance.

Recent studies have shown that TKIs, which are used in the treatment of tumors, can serve not only as substrates, but also as inhibitors of the above mentioned drug transporters. The data found in the literature, however, is often contradictory, and it is therefore that we address this issue in this thesis. We measured the effect of selected TKIs (imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib) on the activity of P-gp. For comparison, the activity of P-gp was likewise measured after the application of classical P-gp inhibitors (cyclosporin A, verapamil, valspodar a zosuquidar). We found that imatinib acts as an inhibitor of P-gp, but that it has a weak effect. Its metabolite, N-desmethylimatinib, does not exhibit any inhibitory effect on P-gp, similar to dasatinib. Nilotinib appears to be a very potent inhibitor of P-gp, comparable to the effects of cyclosporin A or verapamil. On the other hand, it will not be possible to use nilotinib in clinical practice, since general cytotoxicity was proven at concentrations for which there is an inhibitory effect on P-gp.

Following long-term application of a combination of mitoxantrone with nilotinib on K562 cells, we selected a resistant cell line K562/ABCG2, for which we observed increased expression of ABCG2 transporters. The expression of ABCB1 and ABCC1 transporters was not affected. The selected cells showed the greatest resistance to imatinib, followed by nilotinib, and least to dasatinib. The observed resistance could be reversed with a selective inhibitor of the ABCG2 transporter.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za čas, trpělivost a cenné rady, které mi poskytl během tvorby diplomové práce. Dále mé díky patří také Mgr. Petru Kosztyu a RNDr. Petru Doleželovi, Csc. za ochotu a praktickou pomoc, Ústavu biologie LFUP a vnitřnímu grantu Palackého University LF_2011_011 za to, že jsem diplomovou práci mohla realizovat právě zde.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Současný stav řešené problematiky	10
2.1. Stručná historie leukémií	10
2.2. Chronická myeloidní leukémie	10
2.3. Výskyt chronické myeloidní leukémie	11
2.4. Molekulární podstata chronické myeloidní leukémie	13
2.4.1. Gen ABL a jeho produkt	14
2.4.2. BCR gen a jeho produkt	15
2.4.3. Místa zlomů v genech BCR a ABL	16
2.4.4. Mechanismy maligní transformace spjaté s Bcr-Abl	16
2.5. Léčba chronické myeloidní leukémie	20
2.5.1. Tyrosinkinasy jako cíle protinádorové terapie	22
2.5.2. Tyrosinkinasové inhibitory	23
2.5.2.1. Imatinib (CGP57148B, STI571)	24
2.5.2.2. Nilotinib (AMN107, Tasigna)	25
2.5.2.3. Dasatinib (BMS-354825)	26
2.5.3. Mechanismus účinku Bcr-Abl TKI	26
2.6. Mnohočetná léková rezistence	28
2.6.1. Mechanismy mnohočetné lékové rezistence	28
2.6.2. Rezistence vůči imatinibu	29
2.7. ABC transportéry	30
2.7.1. Charakteristika P-glykoproteinu	30
2.7.1.1. Substráty P-glykoproteinu	31
2.7.1.2. Inhibitory P-glykoproteinu	32
2.7.2. Multidrug associated protein 1	32
2.7.3. Mitoxantrone resistance protein	33
2.7.4. Inhibitory ABC transportérů 1. generace	33
2.7.5. Interakce inhibitorů tyrosinových kinas s lékovými transportéry	34
3. Cíle práce	35
4. Materiál a metodika	36
4.1. Materiál	36

4.1.1. Buněčné linie	36
4.1.2. Chemikálie	36
4.1.3. Přístrojové vybavení	38
4.2. Metodika	38
5. Výsledky	42
5.1. Vliv inhibitorů tyrosinových kinas na aktivitu P-glykoproteinu	42
5.1.1. Klasické inhibitory P-glykoproteinu	43
5.1.2. Tyrosinkinasové inhibitory	46
5.2. Vliv inhibitorů tyrosinových kinas na proliferaci a viabilitu buněk	50
5.2.1. Tyrosinkinasové inhibitory	52
5.2.2. Klasické inhibitory P-glykoproteinu	54
5.3. Indukce exprese ABCG2 genu mitoxantronem	57
5.3.1. Analýza buněčného cyklu	66
5.3.2. Selektce buněk exprimujících ABCG2 transportér	69
5.3.3. Rezistence buněk k vybraným tyrosinkinasovým inhibitorům	72
6. Diskuse	77
7. Závěr	80
8. Seznam použitých zkratk	81
9. Literatura	83

1 Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují v celosvětovém měřítku velký problém. Ve vyspělých zemích bývají jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Z analýz kosterních pozůstatků člověka vyplývá, že sahají již do doby prehistorické. Díky nejrůznějším infekčním onemocněním, které lidstvo v průběhu staletí sužovala, však stála nádorová onemocnění spíše v ústraní zájmu. Velký obrat nastal teprve ve 20. století, kdy se díky neustále se zlepšujícím možnostem vědy a techniky dostalo studium příčin vzniku, výskytu a léčby nádorů do popředí. Zatímco ve 20. letech 20. století byla léčba nádorů omezena prakticky pouze na chirurgickou léčbu, později s objevem röntgenových paprsků byla aplikována rovněž radioterapie. Ve 40. letech 20. století začaly být testovány účinky prvních cytostatik - alkylačních látek. Chemoterapie, která se v průběhu 60. let stala jednou z hlavních léčebných metod, je dodnes pilířem mnoha onkologických léčebných postupů. Jelikož cytostatika patří mezi agresivní látky s celou řadou negativních vedlejších účinků, je snahou mnoha lékařů a vědeckých pracovníků vyvinout nové léčebné strategie, které by tyto negativní dopady co nejvíce minimalizovaly či úplně odstranily.

Jednou z možností, vedle genové terapie či využití chemoterapie enkapsulované do „inteligentních“ nanopartikulí spadajících zatím spíše do budoucnosti, je tzv. cílená léčba. Tímto termínem lze označit všechny látky vyvinuté na základě poznání a pochopení příčin vzniku jednotlivých malignit s cílem zasáhnout pouze nádorovou populaci s minimem nežádoucích toxických vlivů na buňky okolní zdravé tkáně. Na základě poznatků zejména z molekulární biologie se v oblasti cílené léčby můžeme vydat několika směry – např. se můžeme zaměřit na inhibici růstu nádoru, kam lze zařadit procesy inhibice proliferace, sebeobnovy či indukci apoptózy, nebo se můžeme soustředit na inhibici šíření nádoru, čehož lze docílit inhibicí angiogeneze či invazivity a metastazování (Faber, Indrák a kol., Klener, P. a Klener, P. jr., 2010).

Možným přístupem je také studium inhibice tyrosinových kinas (TK). TK patří mezi klasické onkogeny, jejichž aberantní aktivace hraje úlohu při maligní transformaci buňky (Johnson, 2009). Tato práce je zaměřena na studium interakcí inhibitorů TK s lékovými transportéry z ABC (ATP binding cassette) rodiny, zejména ABCB1, ABCC2 a ABCG2. Je známo, že lékové transportéry jsou zapojeny do mechanismu rezistence nádorových buněk na cytostatika. Lékové transportéry snižují intracelulární

hladinu daného léčiva tím, že mají funkci efluxních transportérů. Jejich případná inhibice by vedla k zadržení léčiva v buňce a tím dosažení potřebného cytotoxického efektu.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Stručná historie leukémií

Leukémie obecně byly poprvé popsány koncem 40. let 19. století nezávisle dvěma vědci – Johnem Hughesem Bennettem a Rudolfem Virchowem, kteří v krvi pacientů pozorovali velké množství bílých krvinek. Postupné zdokonalování mikroskopů umožnilo koncem 19. století rozeznat jednotlivé typy bílých krvinek a přispělo ke vzniku vědního oboru hematologie (Protivánková, Vorlíček, 2008). Leukémie byly rozděleny na akutní a chronické. V několika následujících desetiletích se ve výzkumu těchto chorob nedělo nic podstatného. Velký průlom nastal až v polovině 20. století, kdy byla syntetizována a testována první chemoterapeutika – alkylační látka. Tomuto převratnému objevu předcházela náhodná pozorování prováděná během první a druhé světové války, kdy lékaři sledovali vliv bojového plynu yperitu na krevní obraz lidí. Zjistili, že vyvolává změny v počtu bílých krvinek a působí proti dělení buněk. Tak byla odstartována éra protinádorové cytostatické chemoterapie. Prvním cytostatikem byl příbuzný yperitu - hořčičný plyn (nitrogen mustard), poté následovala další chemoterapeutika, z nichž některá se používají dodnes (např. busulfan, cyklofosfamid, melfalan; Faber, Indrák, 2010).

Prvním lidským nádorem, u kterého se podařilo prokázat, že jeho příčinou je genetická abnormalita, byla chronická myeloidní leukémie (CML). Přítomnost patologického, tzv. filadelfského chromozomu, kterým je CML charakterizována, se podařilo prokázat P.Nowellovi a D. Hungerfordovi ve Spojených státech již v roce 1960 (Nowell, 1960).

2.2 Chronická myeloidní leukémie

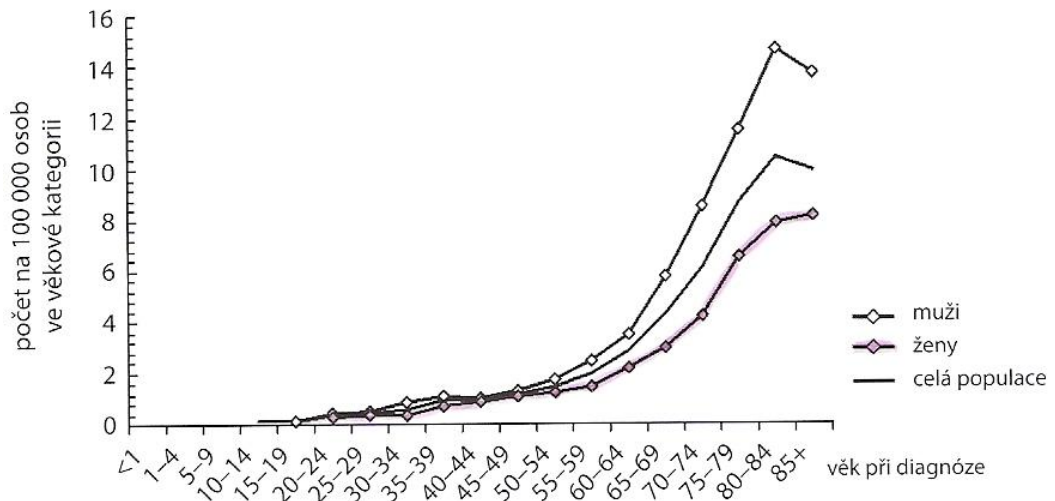
CML je myeloproliferativní onemocnění klonálního charakteru, které je charakterizováno přítomností tzv. filadelfského chromozomu - blíže viz. kapitola Molekulární podstata CML. Vzniká fúzní gen *BCR-ABL*, jehož produkt má tyrosinkinasovou aktivitu a při jeho konstitutivní aktivaci dochází k nekontrolovanému množení krvetvorných buněk (Lugo a kol., 1990). Důsledkem této nemoci je tedy

nekontrolované zmnožení jednoho z typů bílých krvinek – granulocytů (Protivánková, Vorlíček, 2008).

CML má 3 fáze – chronickou, akcelerovanou a blastický zvrát. Fáze chronická trvá řádově měsíce až roky. Jedná se o pomalu postupující fázi s nespecifickými příznaky jako je únava, ztráta chuti k jídlu či zvýšená teplota. V této fázi nemoci pacient nemusí mít subjektivní potíže a běžné aktivity zvládá bez omezení. Snížení počtu leukocytů pomocí běžné léčby je snadné. V akcelerované fázi počet leukocytů narůstá rychleji, trvá většinou 3-6 měsíců. Nutná je intenzivnější chemoterapie, avšak po podání léčby se někteří pacienti mohou dostat zpět do chronické fáze nemoci. Mezi typické příznaky akcelerované fáze patří bolesti kostí, nárůst sleziny, noční pocení či ztráta na váze. Běžné aktivity již pacient nezvládá tak snadno. Pokud pacient zcela přestane reagovat na léčbu, pokročila jeho choroba do fáze blastického zvratu. V kostní dřeni dojde k prudkému nárůstu v počtu vývojově nejmladších buněk – blastů, které jsou následně vyplavovány do periferní krve. Mezi typické příznaky patří intenzivní bolest kostí, infekce, krvácení aj. Možnosti léčby v tomto stadiu jsou značně omezené (Protivánková, Vorlíček, 2008).

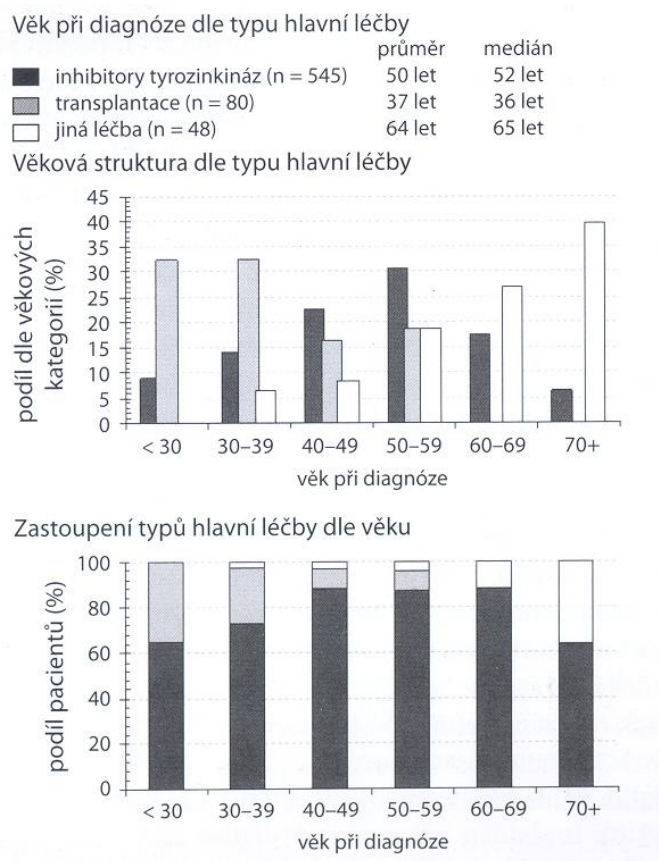
2.3 Výskyt chronické myeloidní leukémie

CML je jednou z nejčastěji se vyskytujících leukémií u dospělých pacientů. Představuje až 25% všech leukémií v dospělosti (Protivánková, Vorlíček, 2008). Údaje o její incidenci se různí a pohybují se v rozmezí 0,6 - 2 nové případy/100 000 obyvatel/rok. Zajímavé je, že zatímco incidence lymfoproliferativních onemocnění roste ve srovnání s předešlými léty, tak incidence CML se výrazně nemění. Co je přesnou příčinou tohoto trendu se s jistotou neví, předpokládá se ale, že CML má pravděpodobně menší souvislost s civilizačními faktory životního prostředí nebo výživy. Jisté ale je, že výskyt CML narůstá s přibývajícím věkem (Obr.1). U dětí je toto onemocnění velmi vzácné – tvoří asi 3% dětských leukémií.



Obr. 1. Věkově specifická incidence CML u bělochů v USA v letech 2000-2006, převzato z Indrák, Faber, 2010

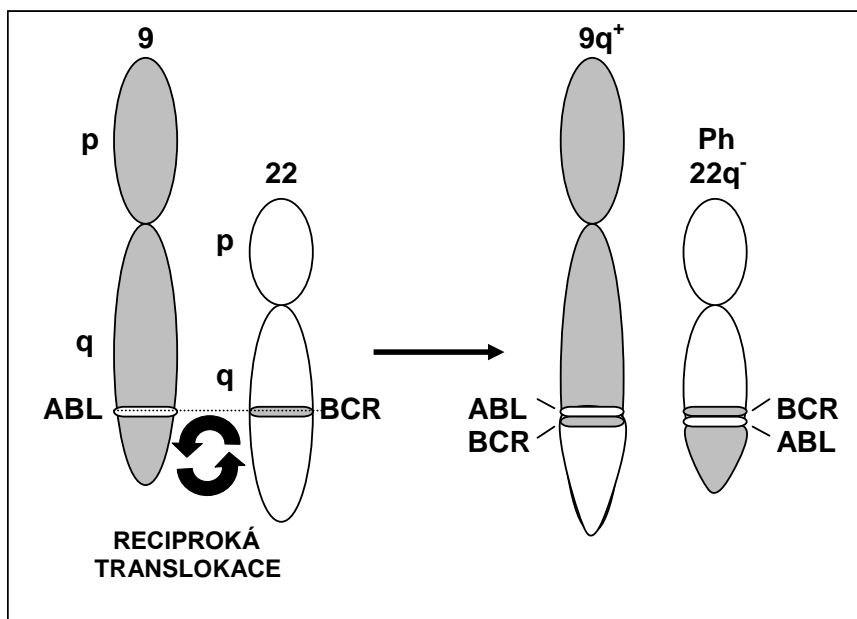
Ze statistik rovněž vyplývá, že výskyt CML je častější u mužů. V České republice není přesný výskyt CML stanovený formou epidemiologické studie k dispozici, avšak na monitoringu výskytu CML v různých regionech ČR pracuje hned několik skupin – zejména Národní onkologický registr České republiky (NOR), Leukemická sekce České hematologické společnosti a Slovenské hematologické společnosti s projektem Camelia, skupina CELL aj. Podle dat NOR ČR vykazují incidence i mortalita sestupný trend. Mortalita je však vzhledem k incidenci vysoká ve srovnání s jinými populačními databázemi (např. ve srovnání s vývojem incidence a mortality CML u bělochů v USA). Data z NOR poté ukazují, že vysoká mortalita vzhledem k incidenci se týká věkové kategorie nad 60 let. Z dalších prováděných analýz bylo zjištěno, že starší pacienti bývají méně často léčeni některými novějšími způsoby cílené léčby (inhibitory tyrosinkinás – viz. dále) ve srovnání s mladšími pacienty (Obr.2), což je zcela neopodstatněné a nesprávné řešení (Faber, Indrák, 2010).



Obr. 2. Věk a hlavní léčba pacientů s CML – údaje klinické databáze projektu CAMELIA- pacienti z ČR a SR diagnostikováni v období 2000-2009, převzato z Indrák, Faber, 2010.

2.4 Molekulární podstata chronické myeloidní leukémie

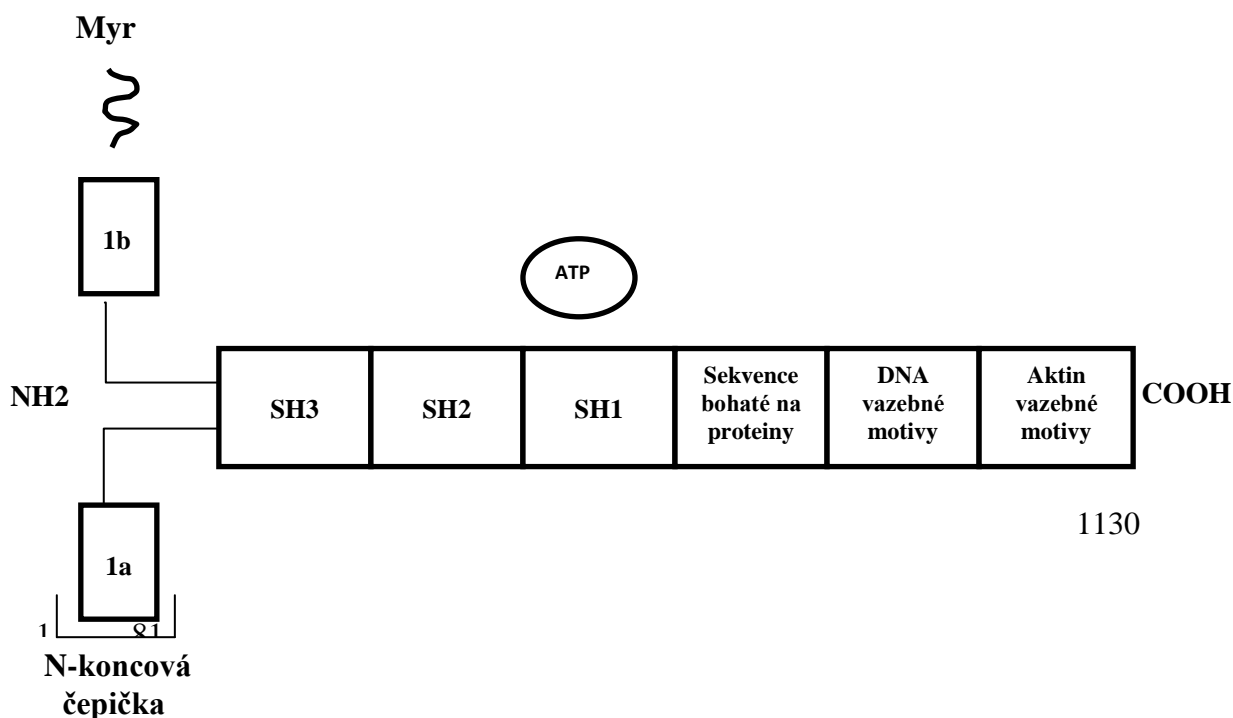
Jak již bylo uvedeno výše, vznik CML je spjat s produktem *BCR-ABL* onkogenu, lokalizovaném na filadelfském chromozomu (Obr. 3). Podstatu vzniku filadelfského chromozomu upřesnila Janet Rowleyová v roce 1973 (Rowley, 1973). Filadelfský chromozom je chromozom 22, který vzniká reciprokou translokací mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22. Chromozomální translokace je iniciována dvouvláknovým zlomem DNA (Richardson, Jasin, 2000). Nejčastějším iniciátorem dvouvláknových zlomů bývá ionizující záření Corso a kol., 1995). Místa zlomu jsou situována v případě genu *ABL* do oblasti 9q34 a v případě *BCR* genu do oblasti 22q11 (Barnes, Melo, 2002).



Obr.3: Reciproká translokace t(9;22) a vznik filadelfského chromozomu (upraveno dle Barnes, Melo, 2002)

2.4.1 Gen *ABL* a jeho produkt

ABL gen je lidský homolog onkogenu *v-ABL* vyskytujícího se u Abelsonova myšího leukemického viru, který kóduje nereceptorovou tyrosinkinasu. *ABL* gen je lokalizován na chromozomu 9, což bylo spolu s objasněním jeho role publikováno Abelsonem v roce 1982 (Abelson, 1982). Produktem tohoto genu je 145 kDa protein *c-Abl* (Obr.4) s 2 izoformami (1a a 1b) vzniklými alternativním sestřihem 1. exonu. Isoforma 1b je myristoylovaná, což umožňuje její vazbu k plazmatické membráně. Ve struktuře tohoto proteinu můžeme rozlišit několik strukturních domén, např. 3 Src (sarcoma) homologní domény (SH1-SH3) umístěné blízko N-konce, z nichž SH1 doména má tyrosinkinasovou funkci a zbylé 2 domény umožňují interakci s jinými proteiny. Uprostřed molekuly se nacházejí sekvence bohaté na prolin, kam se váží SH3 domény jiných proteinů. Blízko C-konce se nacházejí signály jaderné lokalizace, DNA vazebné a aktinvazebné motivy (Barnes, Melo, 2002).



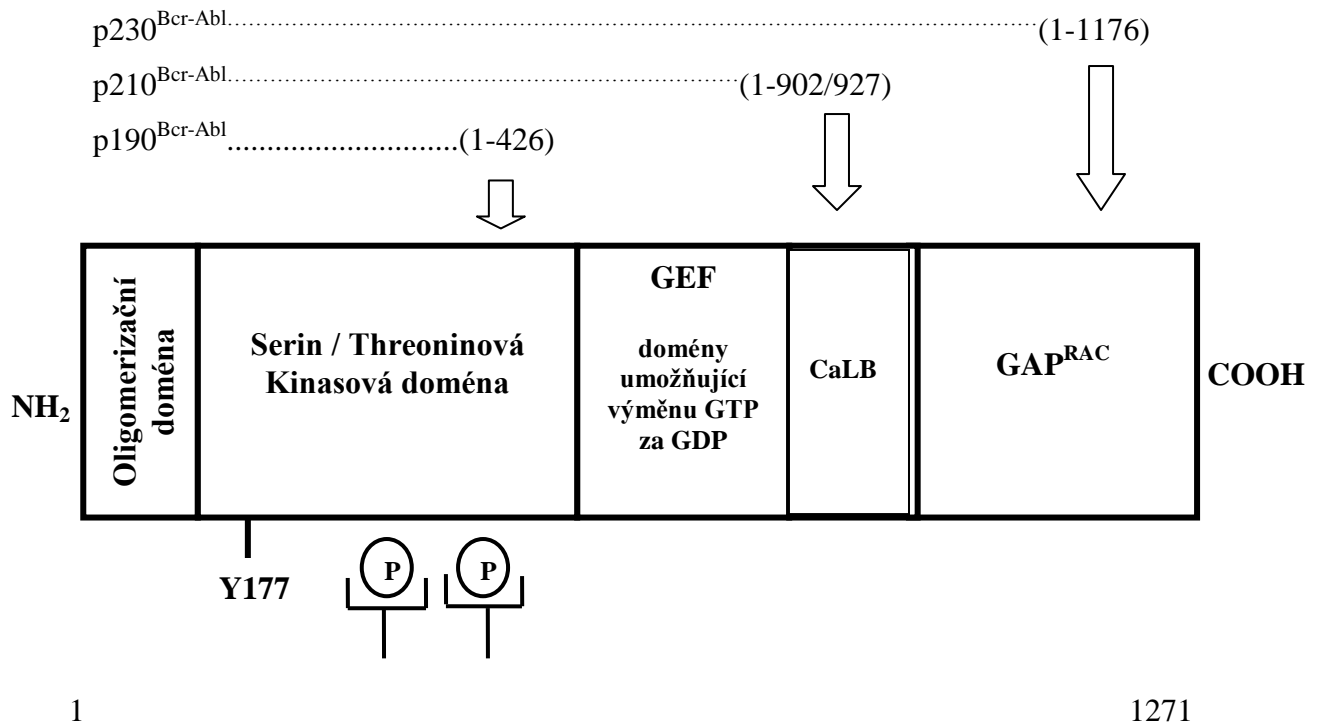
Obr. 4: Struktura p145^{Abl} proteinu (zjednodušeno dle Barnes, Melo, 2002)

C-Abl kinasa je převážně lokalizována v jádře, vázána na DNA a její aktivita je přísně regulována. Co se týká funkce normálního Abl proteinu, je známo, že je zapojen do regulace buněčného cyklu (přechod do S-fáze), do buněčné odpovědi na genotoxický stres a do integrinem zprostředkované adheze. Zdá se, že propojuje signály z vnějšího a vnitřního prostředí buňky a rozhoduje o buněčném osudu ve smyslu pokračování v buněčném cyklu či spuštění apoptózy (Barnes, Melo, 2002).

2.4.2 BCR gen a jeho produkt

V roce 1984 byla definována oblast na 22. chromozomu, v níž dochází ke zlomům – BCR (break-point cluster region; Groffer, 1984). BCR gen exprimuje cytoplazmatický Bcr protein o velikosti 160 kDa s několika funkčními doménami (Obr.5), např. serin-threoninovou kinasovou doménu, jejímž jediným substrátem je Bap-1 (BCR associated protein-1). Přilehlé oblasti bohaté na serin a threonin, pokud jsou fosforylovány, mohou sloužit jako vazebná místa pro SH2 domény jiných proteinů (např. Abl). Na N-konci se rovněž nachází oligomerizační doména umožňující formování dimerů *in vivo*. Vedle této domény se nachází serin/threoninová kinasová

doména. Její některé aminokyseliny, pokud jsou fosforylovány, mohou sloužit jako vazebná místa pro SH2 domény jiných proteinů (Deininger a kol., 2000).



SH2 vazebná místa

Obr. 5: Struktura p160^{Bcr} proteinu (zjednodušeno dle Barnes, Melo, 2002; Deininger a kol., 2000).

V této doméně se nachází mimo jiné tyrosin Y177 schopný autofosforylace, který může sloužit jako vazebné místo pro adaptorový protein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) zapojený do **Ras** signální dráhy. V centrální oblasti se nachází homologní oblast guanin nukleotide exchange factor (GEF), dále homologní domény umožňující výměnu GTP (guanosintriphosphate) za GDP (guanosindiphosphate) na Rho guanidinovém výměnném faktoru - může aktivovat transkripční faktory jako je např. NF- κ B (nuclear factor kappa B). Následuje místo pro CaLB (calcium – dependent lipid binding). C-konec má GTP-asovou aktivitu pro Rac, což je malá GTP-asa z Ras rodiny, která reguluje polymerizaci aktinu a aktivitu NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidasy ve fagocytech. Funkce Bcr proteinu pravděpodobně souvisí s přenosem signálu (Deininger a kol., 2000).

2.4.3 Místa zlomů v genech *BCR* a *ABL*

Oblasti, kde dochází ke zlomům v genech *BCR* a *ABL*, jsou různé. Důsledkem je vznik chimérických molekul mRNA, a tudíž různých produktů těchto genů. U genu *ABL* dochází ke zlomům v oblasti velké asi 300 kb na 5' konci vlákna DNA. Bez ohledu na místo zlomu dochází ke vzniku fúzního *BCR-ABL* transkriptu s chybějícím *ABL* exonem a1. *BCR* exony tedy fúzíjí přímo s exonem 2 *ABL*. U *BCR* genu je bod zlomu lokalizován do jednoho ze tří tzv. breakpoint cluster regionů. Pokud nastane zlom v oblasti hlavního breakpoint cluster regionu (M-bcr), alternativním sestřihem následně vzniká transkript, který je translatován do 210 kDa proteinu p210^{Bcr-Abl}. Zlom může nastat rovněž v menším breakpoint cluster regionu (m-bcr), výsledná mRNA je přeložena do 190-kDa proteinu p190^{Bcr-Abl}. Byl objeven také 3. breakpoint cluster region (μ -bcr) dovolující vznik fúzního proteinu p230^{Bcr-Abl}. S použitím metody nested RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) bylo zjištěno, že u většiny pacientů s CML vzniká protein p210^{Bcr-Abl}. Je zajímavé, že zatímco oblast *ABL* je téměř neměnná, oblast *BCR* je vysoce variabilní. Z toho je možné usuzovat, že *ABL* oblast je zodpovědná za princip maligní transformace buňky, kdežto *BCR* za fenotyp nemoci (Barnes, Melo, 2002).

2.4.4 Mechanismy maligní transformace spjaté s Bcr-Abl

- Deregulace Abl tyrosinkinasy (Obr. 6)

Jak již bylo zmíněno výše, aktivita Abl tyrosinkinasy je za fyziologických podmínek přísně regulována. Klíčovou roli v této regulaci hraje SH3 doména, protože její delece či změna polohy aktivuje kinasu. Pokud jsou na SH3 doménu navázány její substráty - např. Abi-1, Abi-2 (Abelson interacting protein), má SH3 doména inhibiční funkci. Případně se SH3 doména může vázat do oblastí bohatých na prolin uvnitř Abl proteinu, čímž nastanou konformační změny inhibující interakce se substráty. Dalším důležitým prvkem kromě SH3 domény jsou autofosforylované tyrosiny (např. Y393), které vytvářejí vazebná místa pro SH2 doménu ostatních substrátových proteinů (obecně je možné rozdělit substráty Bcr-Abl dle jejich fyziologické role na adaptorové molekuly, proteiny asociované s organizací cytoskeletu a buněčné membrány a proteiny s katalytickou funkcí). Za fyziologických podmínek je hladina fosfotyrosinu udržována

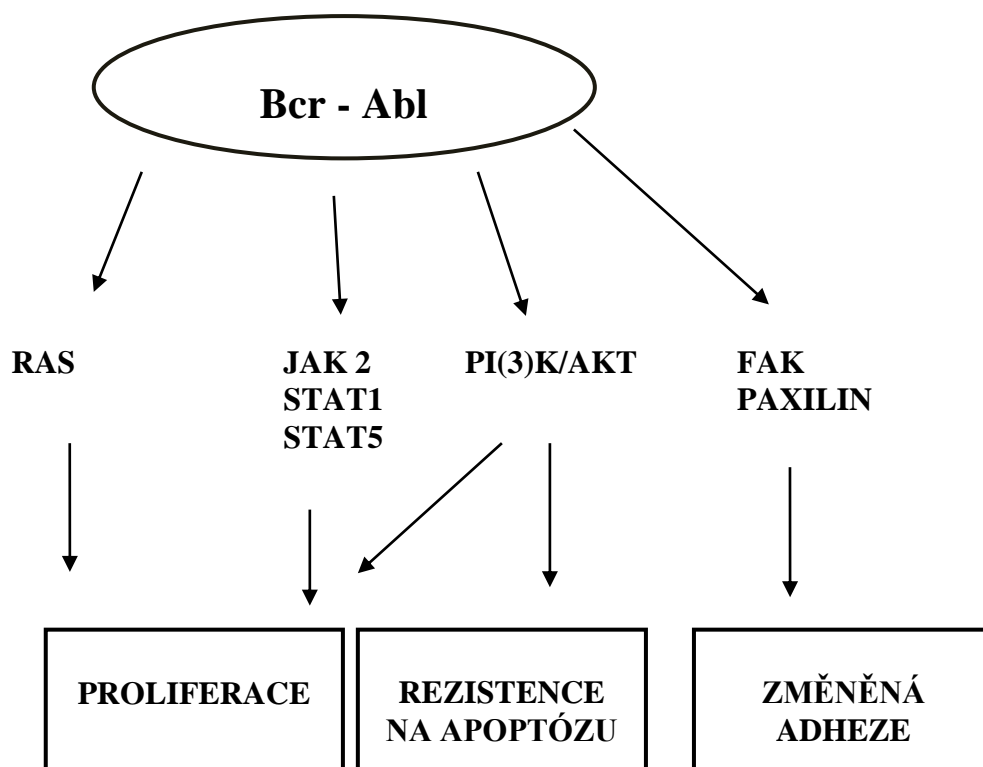
na nízké úrovni, což zabezpečují tyrosinfosfatasy – v případě Bcr-Abl jsou to Syp (synaptophysin) a PTB1B (protein tyrosine phosphatase 1B; Deininger, Goldman, Melo, 2000).

- Změněné vlastnosti adheze buněk (Obr. 6)

Ví se, že progenitorová buňka CML vykazuje sníženou adhezi ke stromatálním buňkám kostní dřeně a extracelulární matrix, což ji umožňuje rychleji se dělit. Adheze ke stromatu totiž zpomaluje proliferaci buněk. CML progenitorová buňka ztrácí regulační signály, které jsou dodávány normálním, adherentním hematopoetickým buňkám. Toto je zapříčiněno změnou integrinových receptorů buněčného povrchu, které jsou zodpovědné za přenos signálu z vnějšího do vnitřního prostředí buněk po vazbě adherentních ligandů (Deininger, Goldman, Melo, 2000). Ke změně adheze buněk přispívá aktivace Fak/Paxilin (Focal adhesion kinase) signální dráhy zprostředkovaná Bcr-Abl kinasou.

- Aktivace signálních mitogenních drah (Obr. 6)

Je známo, že Bcr-Abl aktivuje celou řadu buněčných signálních drah, které mají mitogenní potenciál. Aktivace konkrétní individuální signální dráhy závisí na buněčném typu, ale zdá se, že ústřední roli hrají Ras, Jak/Stat (Janus protein tyrosine kinase /signal transducer and activation of transcription), PI(3)K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) signální dráhy.



Obr.6: Signální dráhy podřízené Bcr-Abl kinase (upraveno dle Shet a kol., 2002)

- Inhibice apoptózy (Obr. 6)

Do antiapoptotického efektu Bcr-Abl je zapojena zejména dráha PI(3)K a jim podřízený NF- κ B. Aktivace NF- κ B fúzním onkoproteinem Bcr-Abl způsobí intenzivnější přesouvání transkripčně aktivní podjednotky p65 do jádra. Fosforylovaný NF- κ B tak stimuluje expresi mnoha antiapoptotických proteinů zahrnujících Flice (FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme) inhibiční protein (FLIP), survivin, Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) a Bcl-X_L aj. Kromě genů, které mají vztah k buněčné smrti, ovlivňuje NF- κ B také expresi genů zapojených do proliferace a diferenciaci. NF- κ B výrazně zvyšuje expresi *MDR1* (multidrug resistance protein 1), jehož produkt P-glykoprotein (P-gp) je zodpovědný za chemorezistenci nádorových buněk (Braun a kol., 2006).

2.5 Léčba chronické myeloidní leukémie

Výběr vhodné léčby pro pacienta s CML je ovlivněn mnoha faktory jako jsou věk pacienta, stadium nemoci, celkový stav pacienta nebo přidružené choroby. Pokud je CML v chronické fázi, je možno zvažovat několik léčebných přístupů (Protivánková, M., Vorlíček, J., 2008):

- konvenční chemoterapie (hydroxymočovina, busulfan apod.)
- transplantace krvetvorných buněk
- radioterapie
- imunoterapie (interferony)
- cílená léčba

Velké naděje jsou vkládány zejména do přístupu zahrnujícího cílenou léčbu. Je tomu tak zejména proto, že cílená léčba zasahuje přímo molekulární mechanismy a patologické signální dráhy, které způsobují nádorovou transformaci buňky, a tudíž nejsou zasahovány buňky okolní zdravé tkáně.

Cílená léčba zahrnuje celou škálu možných léčebných přístupů (Tab.1)

Tabulka 1.: Možné přístupy v cílené terapii (zjednodušeno dle Klener, 2010)

Terapie cílená na nádorové buňky – inhibice růstu nádoru	Inhibice proliferace	Inhibice - receptorových tyrosinkinas(TK) - nereceptorových TK - Ras - Jak/Stat - PI(3)K/Akt - proteasomu aj.
	Inhibice sebeobnovy	Inhibice - telomeráz - signálních drah podílejících se na regulaci sebeobnovy aj.
	Indukce apoptózy	Přímá – smrtící ligandy - kyslíkové radikály Nepřímá - inhibice antiapoptotických Bcl-2 proteinů
Terapie cílená na nádorové mikroprostředí – inhibice šíření nádoru	Inhibice angiogeneze	Inhibice transdukčních kaskád spouštěných VEGF, EGF a integriny
	Inhibice invazivity a metastazování	Blokáda integrinových receptorů aj.

Pozn.: VEGF.... vascular endothelial growth factor
EGF.....epidermal growth factor

Cílená léčba představuje doposud nejúspěšnější přístup k léčbě nádorových malignit, přesto existují případy, kdy dochází k jejímu selhání (Viz. kap. Mnohočetná léková rezistence).

Jak vyplývá z výše uvedené tabulky, jednou z možností cílené terapie je inhibice receptorových nebo nereceptorových tyrosinkinas.

2.5.1 Tyrosinkinasy jako cíle protinádorové terapie

TK jsou enzymy, které katalyzují přenos γ -fosfátu z ATP (adenosine triphosphate) na tyrosinové zbytky v polypeptidech. Lidský genom obsahuje okolo 40 genů pro TK, jejichž produkty regulují buněčnou proliferaci, přežití, diferenciaci, metabolismus a motilitu. Při vývoji léčiv byly TK dlouho opomíjeny kvůli nedostatku důkazů o příčinné souvislosti s lidskými nádory a obavám kvůli lékové specifitě a toxicitě.

TK můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin – na receptorové s transmembránovou doménou - hrají klíčovou roli v přenosu extracelulárních signálů do cytoplazmy, např. PDFGR β (platelet-derived growth factor receptor β) a nerekceptorové (např. c-Abl), které zpracovávají intracelulární signály a jsou lokalizované v cytosolu, jádře a vnitřní straně plasmatické membrány. Enzymatická aktivita obou je přísně regulována – v nedělících se buňkách je velmi nízká hladina tyrosin fosforylovaných proteinů.

Co se týká struktury receptorových tyrosinkinás, mají N-koncovou extracelulární doménu vážící ATP a hořčík a C-koncovou intracelulární doménu obsahující aktivační smyčku (tyrosinkinásové katalytické místo). Mezi nimi se nachází štěrbin (lipofilní transmembránový segment), kam se váží polypeptidové substráty.

TK hrají kritickou roli v modulaci signálních drah růstových faktorů. Aktivované formy těchto enzymů mohou působit pozitivně na proliferaci nádorových buněk a jejich růst, indukovat antiapoptotické efekty a podpořit angiogenezi a metastazování. K aktivaci může dojít buď prostřednictvím růstových faktorů, nebo somatických mutací. U receptorových kinás vazba ligandu indukuje dimerizaci těchto receptorových TK, čímž je umožněna autofosforylace jejich cytoplazmatické domény a aktivace TK aktivity (Krause, Van Etten, 2005; Arora, Scholar, 2005).

TK mohou být inhibovány farmakologicky různými mechanismy. Častou ideou ve vývoji léčiv s aktivitou zaměřenou proti TK je najít malé molekuly, které by přímo inhibovaly katalytickou aktivitu kinasy prostřednictvím interference s vazbou ATP nebo substrátů. Jiné proti - TK léčivo může inhibovat aktivaci fúzování TK blokováním jejich dimerizace. Další možností jsou protilátky proti receptorovým TK nebo jejich ligandům, které přerušují tyrosinkinásové signální dráhy prostřednictvím neutralizace ligandů, blokadou vazby ligandů, receptorovou internalizací a následně protilátkou

zprostředkovanou cytotoxicitou. Stabilita některých TK je řízena vazbou s proteiny tepelného šoku (heat-shock proteiny; Krause, Van Etten, 2005).

2.5.2 Tyrosinkinasové inhibitory

Vývoj tyrosinkinasových inhibitorů (inhibitorů tyrosinových kinas; TKI) na přelomu tisíciletí znamenal revoluční změnu v léčbě CML a dalších, zejména hematologických malignit. Do té doby totiž konvenční chemoterapie, byť cílená proti určitým makromolekulám nebo enzymům, nedokázala rozlišit mezi rychle se dělicími normálními buňkami (např. buňky kostní dřeně nebo gastrointestinálního traktu) a nádorovými buňkami, což vedlo k toxickým vedlejším účinkům (Arora, Scholar, 2005).

TKI můžeme rozdělit do dvou základních skupin:

1) inhibitory receptorových tyrosinkinas

Cílem těchto inhibitorů je vyřadit z funkce aberantně aktivované receptorové TK. Tyto aberantní receptorové TK totiž šíří aberantní proliferální signál nezávisle na přítomnosti růstového faktoru, což hraje klíčovou roli při maligní transformaci a při přežívání/proliferaci nádorových buněk (Klener, 2010). Mohou být zacílené proti mnohým receptorovým TK, např.

- EGFR (epidermal growth factor receptor) - gefitinib, erlotinib, lapatinib aj.
- VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) - semaxinib, vatalanib aj.
- PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) – tandutinib aj.

2) inhibitory nereceptorových proteinů s tyrosinkinasovou aktivitou

Tyto inhibitory mají za cíl inhibovat nereceptorové TK převádějící signály z buněčných receptorů na podřízené efektorové molekuly. Jejich cílem může být celá řada nereceptorových kinas, např.:

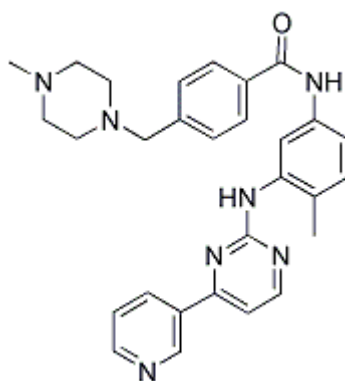
- Src (cellular Rous sarcoma viral oncogene homolog) – dasatinib, bosutinib
- Fak – TAC-544, TAE-226 aj.
- Bcr-Abl – např. imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib aj. (Klener, 2010)

TKI je možno také rozčlenit dle pořadí jejich objevu na TKI 1. generace (imatinib), 2. generace (např. dasatinib, nilotinib, bosutinib aj.) a v současné době již

také 3. generace, kam patří celá skupina blíže nezařazených sloučenin ve fázi experimentální léčby. Jelikož v současné době existuje celá řada preparátů v různých fázích *in vivo* a *in vitro* testů, jejichž popis by byl příliš obsáhlý, níže jsou popsány pouze vybrané TKI mající užší vztah k této práci.

2.5.2.1 Imatinib (CGP57148B, STI571)

Imatinib byl vůbec prvním schváleným TKI pro léčbu chronické fáze CML (Agrawal a kol., 2010). Po chemické stránce se jedná o derivát fenyloaminopyrimidinu (Obr. 7).



Obr. 7: Strukturální vzorec imatinibu

Imatinib je po perorálním podání rychle absorbován, nejvyšší koncentrace v plazmě dosahuje za 2 hodiny (Erp a kol., 2009). Imatinib je intenzivně distribuován do tkání a silně se váže na proteiny, převážně na albumin a $\alpha 1$ – kyselý glykoprotein (AGP).

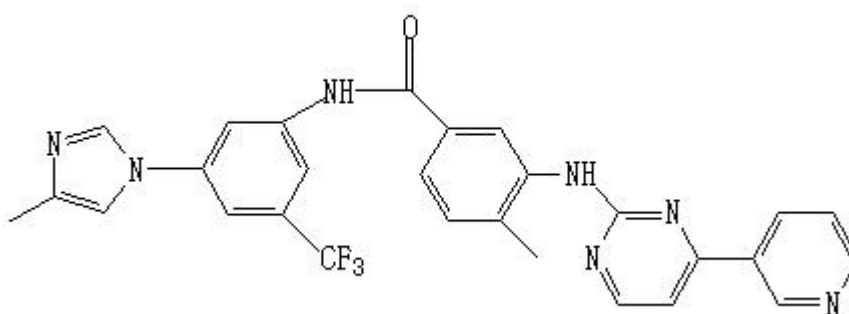
Imatinib je primárně metabolizován prostřednictvím cytochromů P450 CYP3A4 a CYP3A5 (v menší míře CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2). Nedávná studie odhalila 2 mimojáterní enzymy (CYP1A1 a CYP1B1) a flavin-obsahující monooxidasu (FMO-3), které jsou rovněž zodpovědné za metabolismus léčiva. Navíc, imatinib může inhibovat metabolismus CYP3A4 a CYP2D6 – autoinhibiční metabolická dráha (Erp a kol., 2009). Jeho nejvíce zastoupeným metabolitem je N-desmethylimatinib (Bornhauser, M. a kol., 2005).

Imatinib selektivně inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu u buněk, které exprimují Bcr-Abl kinasu. Původně byl vyvinut jako inhibitor Bcr-Abl kinasy, postupně se však zjistilo, že působí jako multikinasový inhibitor a inhibuje také kiny PDGFR, KIT a Arg. Nepůsobí jako inhibitor Src kinas (An a kol., 2010).

Imatinib je indikován k léčbě pacientů s CML v chronické a akcelerované fázi. Ve fázi blastického zvratu se příliš neliší od účinku konvenční chemoterapie. Rovněž je podáván pacientům s jinými hematologickými malignitami, které jsou spjaté s přítomností filadelfského chromozomu nebo mutací PDGFR. Indikován je také u některých nádorů gastrointestinálního traktu (Klener, 2010).

2.5.2.2. Nilotinib (AMN107, Tassigna)

Nilotinib je Bcr-Abl inhibitorem na bázi aminopyrimidinu (Obr. 8).



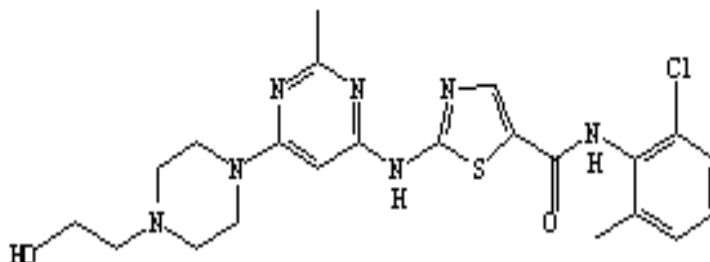
Obr.8: Strukturální vzorec nilotinibu

Maximální koncentrace v plazmě je v případě nilotinibu dosaženo po 3 hodinách od perorálního užití. Nilotinib je metabolizován především prostřednictvím jaterního izoenzymu CYP3A4. Je inhibitorem CYP3A4 a dalších (CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 a UGT1A1). Stejně jako imatinib je tedy inhibitorem enzymu, pomocí kterého je sám primárně metabolizován (Erp a kol., 2009). Jeho účinek je mimo jiné zaměřen na inhibici aktivity Arg, KIT a PDGFR, ale ne Srk (An a kol., 2010).

Nilotinib je indikován k léčbě chronické a akcelerované fáze CML po ztrátě citlivosti k imatinibu. Rovněž se používá k léčbě nádorů gastrointestinálního traktu (Klener, 2010).

2.5.2.3 Dasatinib (BMS-354825)

Dasatinib je derivátem thiazolkarboxamidu (Obr. 9).



Obr. 9: Strukturní vzorec dasatinibu

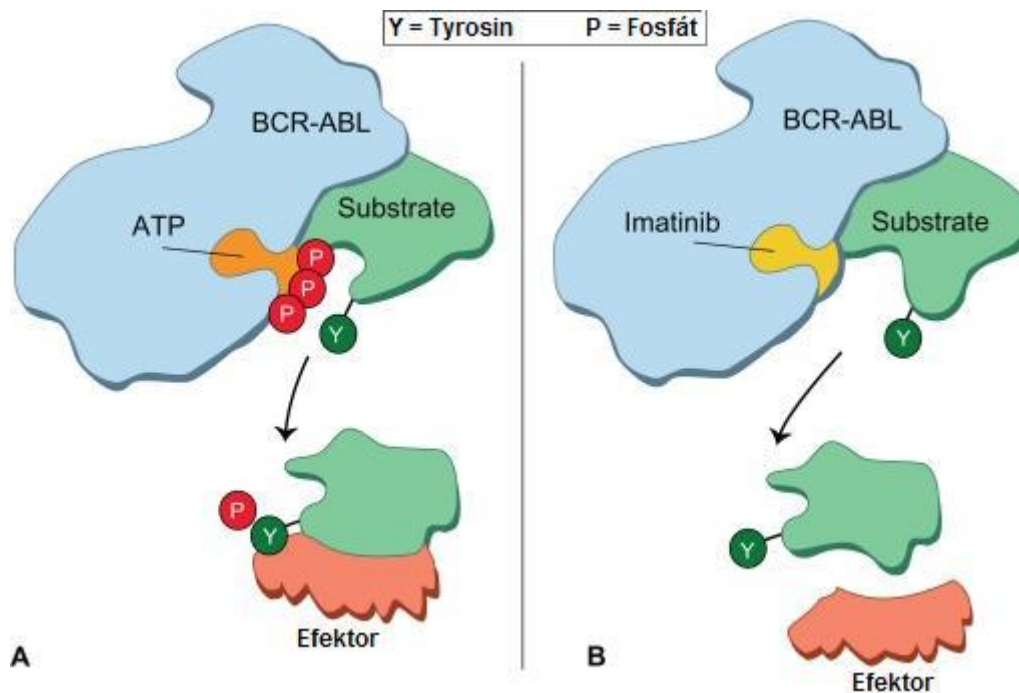
Původně byl vyvinut jako Src-kinasový inhibitor a v současné době je jediným klinicky schváleným Src/Abl inhibitorem (An a kol., 2010). Účinkuje jako selektivní inhibitor TK Abl, Bcr-Abl, c-KIT, PDGFR- α , SFK (Src family kinases) a EPH (kinasy ephrinového receptoru).

Maximální koncentrace v plazmě je dosaženo po 1-3 hodinách, poté je intenzivně distribuován do extravaskulárního prostoru a zde se silně váže k proteinům. Dasatinib je metabolizován primárně prostřednictvím CYP3A4 za vzniku 5 hlavních farmakologicky aktivních metabolitů (Erp a kol., 2009).

Dasatinib je indikován zejména k léčbě pacientů s chronickou, akcelerovanou nebo blastickou fází CML s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě včetně imatinibu (Klener, 2010).

2.5.3 Mechanismus účinku Bcr-Abl TKI

Bcr-Abl TKI mohou inhibovat Bcr-Abl dráhu a významně omezit proliferaci *BCR-ABL* pozitivních CML buněk. Mechanismus účinku je nejlépe prostudovaný u imatinibu, což je ATP nekompetitivní inhibitor odvozený od 2-fenylaminopyridinu. Dříve se předpokládalo, že imatinib se váže k inaktivní konformaci Abl proteinové tyrosinkinasy a kompetitivně blokuje ATP vazebné místo. Touto vazbou zabraňuje jeho konformační změně do aktivní formy (Obr. 10; An a kol., 2010). Následně nedochází k přenosu aktivního fosfátu na tyrosin bílkovin, které patří k substrátům leukemické TK. Inhibicí této fosforylace je zastavena aktivace celé řady signálních drah, které souvisí se vznikem leukemického fenotypu buňky.



Obr. 10: Ilustrace mechanismu účinku imatinibu (Mughal & Schrieber, 2010)

Imatinib nedokáže CML vyléčit, ale velmi úspěšně potlačit růst leukemického klonu (Graham, 2000).

Přesto, že TKI představují jednu z možností léčby s účinkem cíleným přímo proti leukemickému klonu působící na molekulární úrovni, nejsou aplikovatelné pro všechny pacienty. Existují jedinci, kteří jsou vůči TKI intolerantní vlivem specifického metabolismu. Dalším negativním jevem provázejícím podávání TKI, stejně jako u konvenčních cytostatik, je selhání protinádorové léčby. Nejdůležitější příčinou tohoto selhání je získaná rezistence (Nosková a kol., 2000).

Příčiny, které vedou k neúčinnosti léčby TKI, je možné chápat ve dvou rovinách, a to jak na úrovni celého těla, tak na buněčné úrovni. Na úrovni celého těla se jedná zejména o farmakokinetiku daného léčiva (např. odbourávání léčiva pomocí cytochromů), a také o jeho hematologickou toxicitu (v důsledku zvýšené vnímavosti některých jedinců tudíž není možné TKI těmto jedincům podávat). Na buněčné úrovni můžeme uvažovat mechanismy zahrnující Bcr-Abl kinasu (mutace Bcr-Abl kinasu) a mechanismy nezahrnující Bcr-Abl kinasu (sem můžeme zařadit zejména transportní jevy - této problematice bude věnována samostatná kapitola).

2.6 Mnohočetná léková rezistence

Rezistence nádorových buněk představuje v léčbě nádorových onemocnění spolu s negativními vedlejšími účinky konvenční cytostatické léčby závažný problém. Rozlišujeme rezistenci primární, charakterizovanou jako počáteční necitlivost k léčivu, a sekundární, která je získaná. Sekundární rezistence se vyvíjí v době léčby typicky u pacientů, kteří na počátku dosáhli odpovědi. Při ztrátě citlivosti k určitému cytostatiku však může být zachována citlivost k jiným cytostatikům. Pokud dojde ke ztrátě citlivosti i k jinému, strukturálně podobnému cytostatiku, jedná se o tzv. zkříženou rezistenci. Avšak pokud dojde ke zkřížené rezistenci i na ostatní cytostatika, liší se jak strukturně, tak i mechanismem účinku, vzniká tzv. mnohočetná léková rezistence (MDR = multidrug resistance; Nosková a kol.,2000).

2.6.1 Mechanismy mnohočetné lékové rezistence

Mezi obecné mechanismy, které způsobují MDR, patří zejména

- selhání apoptotických mechanismů (např. zvýšená exprese antiapoptotických genů z *Bcl-2* rodiny)
- aktivace detoxikačních drah (např. aktivace glutathion – S – transferasy)

Existuje mnoho dalších mechanismů, které jsou zodpovědné za vznik MDR, ale nejsou společné všem typům buněk. Tyto specifické mechanismy MDR zahrnují zejména:

- změny buněčného cyklu (přechod větší části buněk do G₀ klidové fáze)
- aktivace DNA oprav
- změny vlastností membrán (např. zvýšení vakuolizace spjaté s lysozomy)
- změny pH (většina cytotoxických léčiv jsou slabé báze, vlivem jejich okyselení v nádorové buňce mohou být vyvazovány např. lysozomy)
- změny v akumulaci léčiva uvnitř buňky (např. funkce P-gp)

V uplynulých 40 letech byly mechanismy vzniku rezistence intenzivně studovány. Ze všech těchto mechanismů víme nejvíce o těch, které mění akumulaci léčiva uvnitř buňky. Tato akumulace je výsledkem rovnováhy mezi eflux (výstupem) a influx (vstup do buňky) léčiva. Léčivo je schopno dostat se do buňky rozličnými mechanismy – prostou difúzí (např. vinblastin, doxorubicin aj.), transportními

mechanismy (nukleosidové analogy) nebo endocytózou (imunotoxiny; Gottesman, 2002).

Právě snížená akumulace léčiva se zdá být velmi běžným mechanismem MDR jak *in vitro*, tak *in vivo* podmínkách. Jsou za ni zodpovědné některé lékové transportéry zejména z ABC rodiny, o nichž je pojednáno níže.

2.6.2 Rezistence vůči imatinibu

Jelikož u TKI odpadá problém s negativními vedlejšími účinky na okolní zdravé buňky, zůstává nejzávažnějším problémem provázejícím podávání inhibitorů TK u CML právě rozvoj rezistence na léčbu. Jak bylo naznačeno výše (viz. Kap. Mechanismus účinku Bcr-Abl TKI), na buněčné úrovni je možné rozlišovat Bcr-Abl-závislou a Bcr-Abl-nezávislou rezistenci.

Mezi nejlépe pochopený mechanismus Bcr-Abl závislé rezistence patří získání bodových mutací v kinasové doméně *BCR-ABL* genu vedoucí ke konformačním změnám, které ruší propojení mezi Bcr-Abl a imatinibem (Agrawal a kol., 2010). Mezi nejfrekventovanější mutace patří již zmíněné mutace T315I a mutace P-smyčky. Mutace P-smyčky destabilizují její uspořádání tak, že kinasová doména nemůže zaujmout inaktivní konformaci nutnou pro vazbu imatinibu (An a kol., 2010). Dalším mechanismem Bcr-Abl závislé rezistence je zvýšená exprese *BCR-ABL* genu.

Na Bcr-Abl nezávislé mechanismy rezistence zahrnují zejména nedostatečné hladiny imatinibu v plazmě a farmakokinetické parametry (variace v izoformě CYP3A, interakce 2 léčiv, AGP- α 1 vázící se k imatinibu a zeslabující jeho vstup do buněk). Dalším mechanismem na Bcr-Abl nezávislé rezistence je schopnost buňky pojmout imatinib. Množství imatinibu přítomné v cílových buňkách je určováno rovnováhou mezi proteiny umožňujícími influx/eflux léčiva. Za influx léčiva do buňky jsou zodpovědné především OCT1 (Organic cation transporter-1) transportéry. Pacienti s nízkou expresí, aktivitou nebo polymorfismy OCT1 mají signifikantně nižší intracelulární hladinu imatinibu, a tím i nižší pravděpodobnost dosáhnout remise. Jiným mechanismem je aktivace specifických signálních drah (např. SFK stabilizují aktivní konformaci Bcr-Abl, čímž znemožní vazbu imatinibu; An a kol., 2010).

V případě, že dojde k selhání léčby imatinibem, existuje několik dalších možností léčby. Kromě transplantace kmenových buněk je to zvýšení dávky imatinibu,

kombinovaná terapie založená na imatinibu (nejčastěji v kombinaci s arabinosou - C nebo interferonem – α) nebo volba TKI 2. generace (Agrawal a kol., 2010)

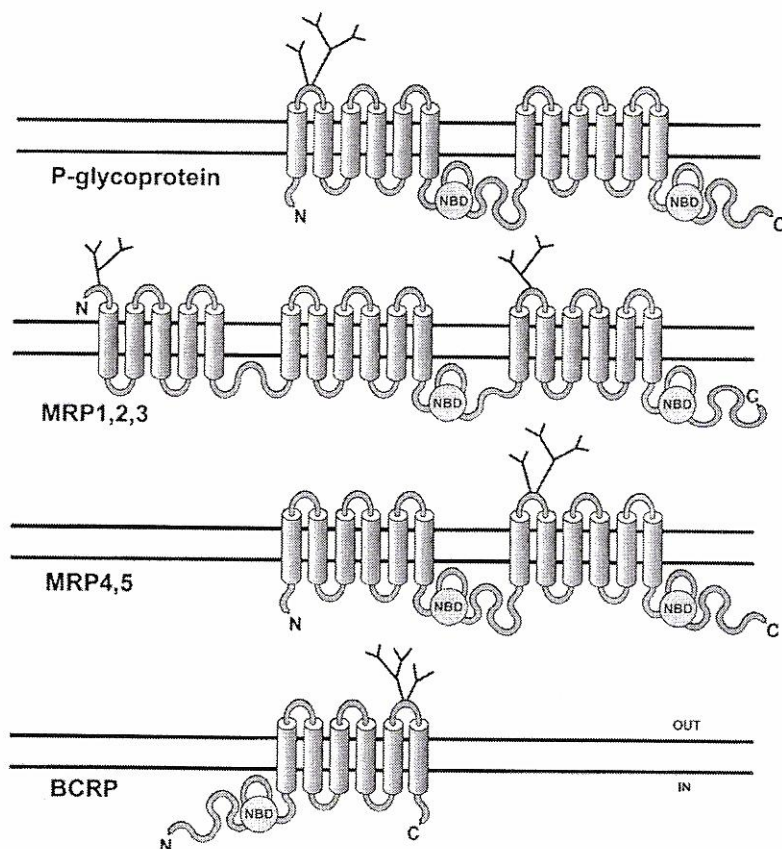
2.7 ABC transportéry

Ačkoli bylo mnoho ABC transportérů objeveno při studiu MDR, ví se, že jsou běžně přítomny i v normálních tkáních. Hrají důležitou roli v buňkách tkání se sekreční a resorpční funkcí jako je žlučník, játra aj., kde je jich využito k exkreci toxinů. Jsou rovněž přítomny v tkáňově – krevních bariérách a buňkách mozku, varlat a placenty, kde zabraňují průniku cytotoxinů. U člověka bylo doposud identifikováno asi 50 ABC genů, rozdělených do 7 tříd (A-G) na základě jejich sekvenční homologie a organizace domén. Geny z rodiny ABC transportérů kódují ATP-dependentní transportéry, které přispívající ke vzniku rezistence tím, že zvyšují eflux léčiva, čímž klesá jeho intracelulární koncentrace (Gottesman a kol., 2002). ABC transportéry jsou primárně lokalizované v plazmatické membráně. Hydrolyza ATP slouží jako zdroj energie – tyto transportéry jsou schopny transportovat metabolity nebo lékové konjugáty ven z buňky i proti koncentračnímu spádu (Schinkel a kol., 2002). Mají široké spektrum substrátů zahrnující ionty, cukry, aminokyseliny, lipidy, toxiny a protinádorová léčiva.

Mezi nejdůležitější a nejlépe prostudované ABC transportéry bezesporu patří P-gp (ABCB1/MDR1). Intenzivně je studován také MRP1 (ABCC1) a nejnověji objevený MXR (mitoxantrone-resistance gene/ABCG2; Gottesman a kol., 2002), mající užší vztah k této práci. Předpokládá se, že tyto tři transportéry jsou zapojeny v rozvoji MDR u nádorových buněk.

2.7.1 Charakteristika P-glykoproteinu

P-gp, kódovaný *MDR1* genem lokalizovaným na 7q21 chromozomu (Juliano, Ling, 1976), je širokospektrá efluxový transportér tvořený dvěma transmembránovými doménami. Každá z nich sestává ze 6 segmentů, mezi nimiž leží intracelulární ATP-vazebné místo. První extracelulární smyčka je bohatě N-glykosylovaná (Obr. 11; Schinkel a kol., 2002).



Obr. 11: Struktura vybraných ABC transportérů (převzato z Schinkel a kol., 2002)

Vysvětlivky:

NBD....nucleotide binding domains

BCRP.....breast cancer resistance protein

Cytoplazmatická (IN) a extracelulární (OUT) orientace naznačená pro BCRP je platná pro všechny zbylé naznačené transportéry.

2.7.1.1 Substráty P-glykoproteinu

Charakteristickou vlastností P-gp je jeho rozmanitost ve struktuře substrátů, které transportuje. Obvykle se jedná o organické molekuly lišící se velikostí od 200 Da do 1900 Da. Mnohé z nich obsahují aromatické skupiny, ale P-gp je schopen rovněž transportovat nearomatické lineární nebo cirkulární molekuly. P-gp transportuje amfipatické molekuly jako je vnitřní membránová komponenta – fosfatidylcholin aj. Jelikož většina substrátů má spíše hydrofobní charakter, jsou schopny pronikat do buněk také pasivní difúzí (Schinkel a kol., 2002). Mezi substráty P-gp patří rovněž celá řada farmakologicky důležitých látek:

- anthracykliny (daunorubicin, doxorubicin)
- *Vinca* alkaloidy (vinblastine, vincristin)

- antibiotika (aktinomycin D, mitomycin C)
- taxany (paclitaxel)
- epipodophyllotoxiny (etoposid, teniposid)
- další (kolchicin, topotecan, puromycin, dioxin, imatinib)
- mnoho dalších hydrofobních amfipatických léčiv a derivátů, nově i TKI (Lage, H., 2008)

2.7.1.2 Inhibitory P-glykoproteinu

Pomocí specifických inhibitorů lze zvrátit lékovou rezistenci u nádorových buněk. Tyto inhibitory se váží k P-gp, čímž inhibují funkci lékového transportéru. Mezi takovéto inhibitory patří např. verapamil, cyklosporin A (CsA; 1. generace inhibitorů P-gp), valspodar (PSC-833; inhibitor P-gp 2. generace), zosuquidar (3. generace inhibitorů P-gp) a mnoho dalších. Jejich původní indikace byla jiná, ale ukázalo se, že jsou schopny působit jako kompetitivní i nekompetitivní inhibitory P-gp. Kompetitivní inhibitory, kam patří inhibitory 1. a 2. generace, se váží do vazebného místa pro substrát na P-gp. Touto vazbou znemožní eflux substrátu (léčiva) do extracelulárního prostředí. Nekompetitivní inhibitory mají sice vysokou afinitu k P-gp, ale neváží se do jeho substrát-vazebného místa. Svoji vazbou k P-gp vyvolají konformační změnu proteinu vedoucí k zabránění hydrolýzy ATP (Thomas, Coley, 2003).

V *in vitro* studiích se ukázalo, že inhibitory 1. a 2. generace umožňují zvrátit rezistenci, v klinické praxi se tento jev neprokázal. Účinné tak zůstávají až inhibitory 3. generace. Jejich nevýhodou však zůstává skutečnost, že inhibují P-gp i ve tkáních, kde má P-gp důležitou funkci při odbourávání chemoterapeutik (Ling, 1997).

2.7.2 Multidrug associated protein 1

MRP-1 (ABCC1) je strukturně podobný P-gp s výjimkou N-terminálního prodloužení tvořeného 5 doménami (Obr. 12). Je exprimován ve většině tkání. MRP je schopen transportovat molekuly jako takové (např. anthracykliny, *Vinca* alkaloidy aj.), jejich konjugáty (např. glutathionové konjugáty) nebo má kotransportní funkci. N-terminální konec je glykosylovaný a orientovaný ven. Postupně bylo objeveno několik

dalších členů ABCC transportérové rodiny (ABCC2, ABCC3 a ABCC6 mají rovněž N-terminální prodloužení; Gottesman a kol., 2002; Schinkel a kol., 2002).

2.7.3 Mitoxantrone resistance protein

MXR transportér (BCR, ABC-P = ABC transportér v placentě, ABCG2) je homodimerem dvou „polovičních“ transportérů obsahujících ATP-vazebnou doménu na N-terminálním konci následovanou 6 transmembránovými segmenty (Obr. 12; Gottesman a kol., 2002). Poslední extracelulární smyčka je glykosylovaná (Schinkel a kol., 2002). Dle *in vitro* studií se zdá, že N-glykosylace těchto transportních proteinů není nezbytná pro základní funkci těchto transportérů, spíše stabilizuje protein v plazmatické membráně.

Expresi *MXR* genu je možno navodit pomocí mitoxantronu, který je jeho substrátem – viz. Experimentální část této práce. Dalšími substráty MXR jsou rovněž anthracykliny, topotecan atd.

2.7.4 Inhibitory ABC transportérů

Inhibitory 1. generace

Verapamil je kompetitivním inhibitorem P-gp, který mimo jiné blokuje vápenaté kanály.

Cyklosporin A je cyklický oligopeptid tvořený 11 aminokyselinami, běžně používaný jako imunosupresivum.

Inhibitory 2. generace

Valspodar (PSC-833) je analogem cyklosporinu A, ale narušuje od něj nemá imunosupresivní účinky. Valspodar je vysoce afinitním, ale pomalu transportovaným substrátem P-gp. Nevýhodou je, že je zároveň substrátem cytochromu p450, kterým je degradován (Schinkel a kol., 2002).

Inhibitory 3. generace

Inhibitory 2. generace fungovaly na úrovni *in vitro*, ale *in vivo* měly katastrofální důsledky. Proto začaly být syntetizovány a testovány inhibitory 3. generace. Ty jsou

více selektivní a účinkují v nižších koncentracích. Patří sem např. zosuquidar (LY335979), což je inhibitor P-gp (WU a kol., 2008)

2.7.5 Interakce inhibitorů tyrosinových kinas s lékovými transportéry

Ke studiu interakcí inhibitorů TK s lékovými transportéry je v současné době využívána celá řada molekulárně biologických či biochemických metod. Ze všech můžeme jmenovat např. preparaci membrán a imunoblotting, měření ATP-asové aktivity založené na kolorimetrickém stanovení, kvantitativní stanovení intracelulárního obsahu TKI metodou HPLC/MS-MS, dále pak cytotoxické studie TKI, testy využívající kalceinu AM jako substrátu MDR1 a MRP1 aj. (Ozvegy-Laczka a kol., 2004). Poslední dvě jmenované metody byly využity v praktické části této diplomové práce, jsou blíže popsány v kap. Materiál a metodika.

Při studiu TKI se ukázalo, že některé z nich mohou být horšími či lepšími substráty lékových transportérů (např. imatinib). Vedle těchto vlastností se ukázalo, že mohou sloužit i jako inhibitory lékových transportér. Na tuto problematiku je zaměřena experimentální část této práce.

3. Cíle práce

- 1) Zjistit, zda imatinib, nilotinib a dasatinib účinně inhibují funkci P-glykoproteinu in vitro.
- 2) Srovnat účinky imatinibu, nilotinibu a dasatinibu s klasickými inhibitory P-glykoproteinu.
- 3) Selektovat rezistentní buňky se zvýšenou expresí ABCG2 transportéru pomocí mitoxantronu.
- 4) Zevrubně charakterizovat selektované rezistentní buňky.
- 5) Změřit citlivost buněk se zvýšenou expresí ABCG2 transportéru k imatinibu, nilotinibu a dasatinibu.

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné linie

Buňky byly uchovány v zamraženém stavu při -80°C . Po rozmražení byly převedeny do kultivačního média RPMI 1640 s 10% obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a přísadkem streptomycinu a penicilinu v koncentracích 0,1 mg/ml. Po rozplnění do kultivačních lahví byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37°C a 5% obsahu CO_2 a pasážovány 3x za týden.

Byly použity buněčné linie: K562 (odvozené od CML), U937 (odvozeny od histiocytického lymfomu), HL-60 (odvozeny od promyelocytární leukémie), ML-1 (odvozeny od akutní lymfoblastické leukémie) - všechny buňky byly zakoupeny z ECACC (European Collection of Cell Cultures).

Rovněž byly použity buňky K562/HHT (odvozeny od K562 dlouhodobou kultivací s homoharringtoninem) a K562/DOX (odvozeny od K562 dlouhodobou kultivací s doxorubicinem). Byly získány darem od prof. J.P. Marie (Francie). Tyto dvě linie mají fenotyp MDR a spolu s K562 exprimují Bcr-Abl.

Dále byly použity buňky K562/ABCG2 selektované pomocí mitoxantronu.

4.1.2 Chemikálie

Zásobní roztoky TKI:

- imatinib
 - nilotinib
 - N-desmethylimatinib
- tři výše jmenované TKI byly získány darem od firmy Novartis, Švýcarsko
- dasatinib (Luminiscence Technology Corporation, Čína)

Zásobní roztoky inhibitorů P-gp:

- valsopodar – získán darem od firmy Novartis, Švýcarsko
- verapamil (Sigma Aldrich, USA)

- zosuquidar (Tocris, USA)
- cyklosporin A (Sigma Aldrich, USA)

Zásobní roztok selektivního inhibitoru ABCG2 transportéru

- Ko143 (Tocris, USA)

Ostatní:

- MTT roztok: 5 mg/ml 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitroimidazoliumbromid (Duchefa, Holandsko)
- Vindalův roztok (100 ml): 20 mg RNasa A
2 mg propidium jodid
100 µl Triton-X (Serva, Německo)
100 µl 1x PBS
- 10x PBS (1 litr): 80 g NaCl
26,8 g NaH₂PO₄ · 7H₂O
2 g KCl
2,4 g KH₂PO₄
pH 7,4
- Růstové médium (0,5 l): RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA)
50 ml FBS (fetální bovinní sérum; Sigma Aldrich, USA)
5 ml penicilin/streptomycin
- 96% etanol
- Protilátka Bcrp/ABCG2 konjugovaná s fykoerytrinem (5D3)
R&D Systems, USA
- Protilátka P-gp/ABCB1 konjugovaná s fykoerytrinem (UIC2)
Beckman Coulter, USA
- Protilátka MRP1/ABCC1 konjugovaná s karboxyfluoresceinem (QCRL-1)
R&D Systems, USA
- Deionizovaná voda
- Kalcein AM Sigma Aldrich, USA
- 4% FA (formic acid) Sigma Aldrich, USA

4.1.3 Přístrojové vybavení:

BOEco M-240:	centrifuga (BioTech, Německo)
BOEco U-32R:	centrifuga (BioTech, Německo)
Vi-CELL™XR:	analyzátor počtu buněk a buněčné viability (Beckman Coulter, USA)
Biocenter:	inkubátor (SalvisLab, Švýcarsko)
Steril VBH:	laminární box (Steril, Itálie)
GENios Plus:	spektrofotometr (Tecan, Rakousko)
Cytomics fc 500:	průtokový cytometr (Beckman Coulter, USA)

4.2 Metodika

Stanovení počtu živých a mrtvých buněk

Ke stanovení počtu živých a mrtvých buněk v buněčné suspenzi bylo použito barvení trypanovou modří, které rozlišuje živé a mrtvé buňky na základě integrity cytoplazmatické membrány. Molekuly trypanové modří mají v roztoku náboj, což má za následek průnik těchto molekul pouze do buněk s poškozenou membránou (mrtvé buňky). Živé buňky, jejichž membrána není poškozená, zůstávají neobarvené. Samotná analýza je prováděna pomocí přístroje Vi-CELL™XR, což je analyzátor počtu buněk (koncentrace buněk/ml média) a buněčné viability (v procentech).

Stanovení buněčné proliferace a viability

Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl použit standardní MTT test. Tato metoda je založena na redukci rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který vytváří fialové krystaly hvězdicovitého tvaru. K této reakci dochází v živých buňkách pomocí produktu dehydrogenas. Formazan je následně rozpuštěn pomocí silného detergentu nebo alkoholu. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu živých buněk (Mosmann, 1983).

Buňky byly inkubovány s testovanými inhibitory po dobu 48 hodin při 37°C a 5% obsahu CO₂. Zároveň byly inkubovány i buňky bez přídavku testované látky, které sloužily jako kontrola. Poté byl proveden MTT test - do každé z jamek bylo přidán příslušný objem roztoku MTT do výsledné koncentrace 0,5 mg/ml. Po 1 hodině inkubace následovala centrifugace (3000 rpm, 5 minut), médium bylo odsáto, vzniklý sediment byl rozpuštěn v příslušném objemu okyseleného EtOH (nejčastěji mezi 0,3-1 ml). Následovala opětovná centrifugace (18 000 rpm, 5 minut) a rozpipetování supernatantu po 200 µl do 96-jamkové mikrotitrační desky. Pomocí spektrofotometrického stanovení byla zjištěna hodnota absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 570 nM.

Analýza buněčného cyklu

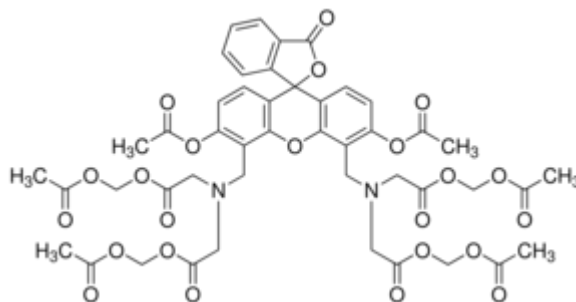
Byla použita metoda vyvinuta Darzynkiewiczem a kol. (1992), která umožňuje stanovit relativní zastoupení buněk jednotlivých fází buněčného cyklu na základě obsahu DNA. Metoda rovněž umožňuje odhadnout počet apoptotických buněk, které jsou charakteristické sníženým obsahem jaderné DNA (tzv. hypoploidní DNA). DNA je nejdříve nabarvena pomocí vhodné fluorescenční sondy (nejčastěji propidium jodid), která se interkaluje do DNA a vytváří komplex, jehož fluorescence je přímo úměrná obsahu DNA. K analýze intenzity fluorescence barvených buněk je použita průtoková cytometrie. Vzorky jsou analyzovány při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 510 nm.

Buněčná suspenze je sedimentována a rozsuspendována v 0,5 ml Vindalova roztoku (1x PBS obsahující 200 µg/ml RNasy A, 20 µg/ml propidium jodidu, 0,1% (v/v) triton X-100) a inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Následně je vzorek změřen na průtokovém cytometru, jehož výsledkem je histogram ukazující relativní zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a subpopulaci apoptotických buněk.

Měření aktivity P-glykoproteinu pomocí acetoxymethylesteru kalceinu

Kalcein AM (acetoxymethylester) je nefluorescenční sloučenina, která díky svým lipofilním vlastnostem proniká do mezimembránového prostoru, odkud je P-gp aktivně transportována z buňky. V závislosti na aktivitě P-gp v membráně proniká část

molekul kalceinu do nitra buňky, kde je štěpena cytoplazmatickými esterasami, což má za následek konverzi této látky na zelenou fluorescenční barvičku, která již není substrátem P-gp (Homolya a kol., 1993). Tohoto poznatku lze využít při studiu interakcí P-gp a léčiv, které mají potenciální inhibiční účinek.



Obr. 12: Strukturální vzorec kalceinu AM

V experimentální části této práce bylo využito kalceinu AM k posouzení inhibičního vlivu studovaných TKI na P-gp. Abychom posoudili kvantitativní míru schopnosti TKI inhibovat P-gp, srovnaly se výsledky s klasickými inhibitory P-gp.

K buňkám K562/DOX byl současně přidán roztok kalceinu AM v koncentraci 0,25 μM a zvolený inhibitor (z inhibitorů P-gp – verapamil, cyklosporin A, zosuquidar, valsopodar; z TKI - imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib). Buňky byly inkubovány po dobu 20 minut a poté změřena fluorescence metodou průtokové cytometrie (při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 525 nm).

Imunohistochemická analýza exprese lékových transportérů

Ke stanovení exprese lékových transportérů bylo využito imunohistochemické metody spočívající v navázání specifické protilátky konjugované s příslušným fluorescenčním barvivem na lékový transportér.

K analýze byl použit 1 ml buněčné suspenze, který byl zcentrifugován (1500 otáček, 5 minut, 21°C). K 50 μl rozsuspendovaného sedimentu bylo následně přidáno 5 μl specifické protilátky konjugované s příslušným fluorescenčním barvivem. Pro analýzu exprese ABCB1 transportéru byla použita specifická protilátka P-gp/ABCB1 konjugovaná s fykoerytrinem (UIC2; Beckman Coulter, USA), pro analýzu exprese ABCG2 transportéru pak protilátka Bcrp/ABCG2 konjugovaná s fykoerytrinem (5D3;

R&D Systems, USA) a pro analýzu exprese ABCC1 protilátka MRP1/ABCC1 konjugovaná s karboxyfluoresceinem (QCRL-1; R&D Systems, USA).

Suspenze byla za stálého otáčení (Biosan) inkubována 1 hodinu při 4°C. Poté následovalo promytí 1,5 ml vychlazeného 1x PBS a centrifugace (1500 otáček, 5 minut, 5°C). Médium bylo odsáto a sediment rozsuspendován v 0,5 ml vychlazeného 1x PBS. Jako kontrola byly použity buňky K562. Takto připravené vzorky byly změřeny na průtokovém cytometru (excitační vlnová délka pro fykoerytrin byla 488 nm, emisní potom 575 nm, pro karboxyfluorescein byla excitační vlnová délka 488 nm, emisní potom 525 nm).

Indukce exprese ABCG2 genu u buněk K562

Buňky K562 byly kultivovány s postupně se zvyšující se koncentrací mitoxantronu. Počáteční koncentrace mitoxantronu byla 10 nM. Průběžně byly sledovány parametry exprese ABCG2 transportéru a viabilita buněk. Na základě těchto parametrů byla následně koncentrace mitoxantronu zdvojnásobena na 20 nM a opětovně sledována exprese ABCG2 a viabilita. Následně bylo přistoupeno k přidavku nilotinibu do konečné koncentrace 10 nM k základní koncentraci 10 nM mitoxantronu.

Selekce rezistentních klonů

K samotné selekci rezistentních buněk byla vybrána linie buněk s nejvyšším procentuálním zastoupením buněk exprimujících ABCG2 transportér s vysokou viabilitou (na základě výsledků imunohistochemického barvení byla zvolena linie kultivovaná v přítomnosti 10 nM mitoxantronu v kombinaci s 10 nM nilotinibem). Buněčná suspenze byla naředěna do výsledné koncentrace 2,5 buňky/ml média a rozpipetována po 200 μ l do 96-jamkového panelu ve čtyřech opakováních. Po třech týdnech inkubace byla v pozitivním případě pozorována bílá kolonie, která byla přenesena do čerstvého média a dále kultivována za účelem získání dostatečného množství ABCG2-exprimujících buněk. U buněk byl zkoumán vliv inhibitorů TK na proliferaci a viabilitu buněk (k tomu bylo využito MTT testu).

5. Výsledky

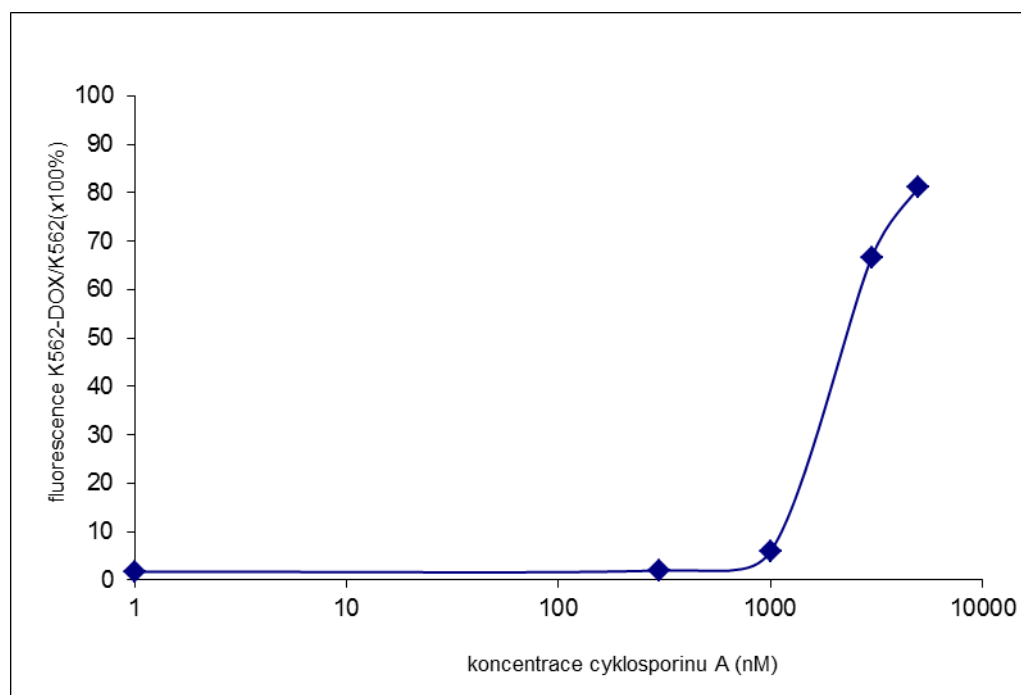
5.1 Vliv inhibitorů tyrosinových kinas na aktivitu P-glykoproteinu

Nejnovější studie ukázaly, že TKI mohou sloužit nejen jako substráty, ale i jako inhibitory některých lékových transportérů (ABCB1, ABCC1 a ABCG2). Údaje v literatuře však jsou často protichůdné. Proto jsme se touto otázkou zabývali v praktické části diplomové práce a snažili jsme se objasnit jejich inhibiční účinky vůči P-gp.

Měřili jsme aktivitu P-gp pomocí acetoxymethylesteru kalceinu. Testu využívajícího kalceinu-AM bylo využito ke kvantitativnímu stanovení aktivity P-gp a následně k určení, zda vybrané TKI mohou sloužit jako inhibitory P-gp. Byly testovány čtyři TKI – imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib. Pro srovnání byly současně testovány vlastní inhibitory P-gp (cyklosporin A, verapamil, valsopodar a zosuquidar). Inhibitory P-gp zamezují přenosu kalceinu z mezimembránového prostoru do extracelulárního prostředí, čímž značně zvyšují akumulaci kalceinu uvnitř buňky. Z toho vyplývá, že naměřená fluorescence kalceinu je přímo úměrná účinnosti daného inhibitoru. Buňky K562/DOX byly inkubovány s testovaným inhibitorem a současně acetoxymethylesterem kalceinu po dobu 20 minut (Viz. Materiál a metodika).

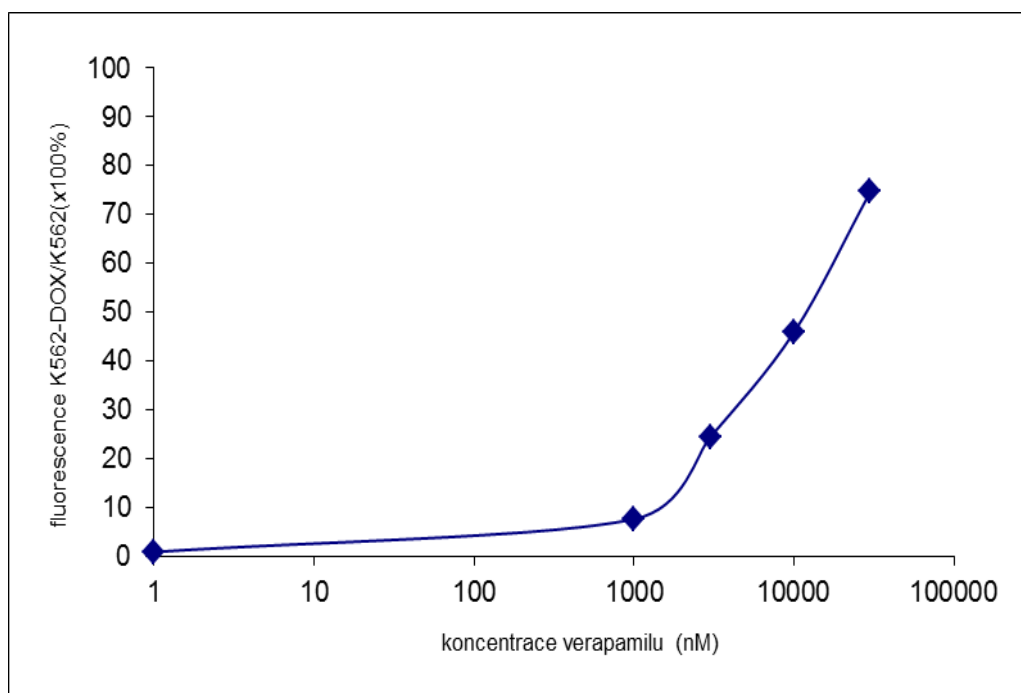
5.1.1 Klasické nhibitory P-glykoproteinu

Z obr. 13 je patrné, že testovaný inhibitor P-gp, CsA, vykazuje dle očekávání výrazné inhibiční účinky vůči P-gp. Účinkuje v mikromolárních koncentracích.



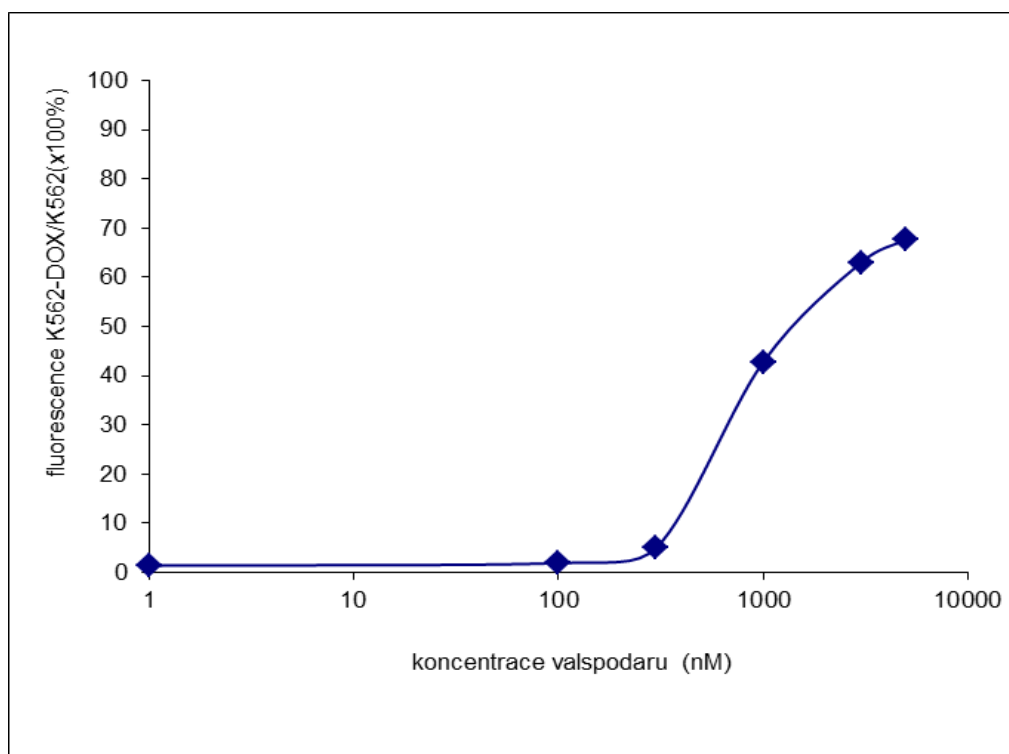
Obr. 13: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci CsA. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace CsA. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti CsA je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti CsA) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+CsA/K562 pak odráží míru inhibice P-gp CsA.

Z obrázku 14 je patrné, že testovaný inhibitor P-gp, verapamil, rovněž vykazuje dle očekávání inhibiční účinky vůči P-gp, ale až v koncentracích desítek mikromol.



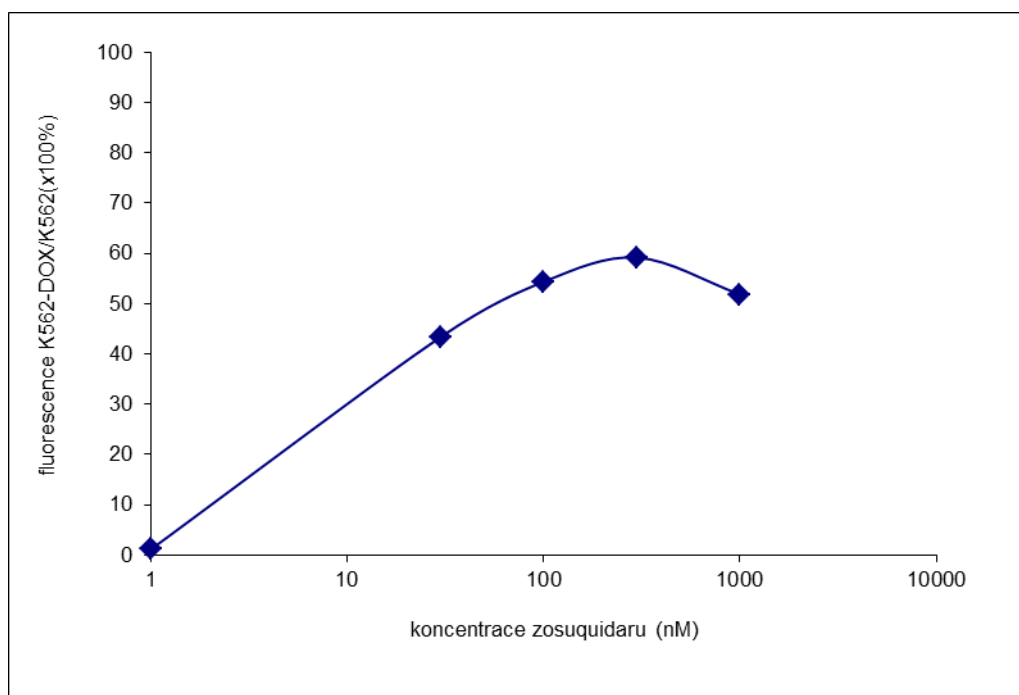
Obr. 14: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci verapamilu. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace verapamilu. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti verapamilu je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti verapamilu) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+verapamil/K562 pak odráží míru inhibice P-gp verapamilem.

Z obrázku 15 vyplývá, že testovaný inhibitor P-gp, verapamil, rovněž účinně inhibuje P-gp, a to již v nízkých mikromolárních koncentracích.



Obr. 15: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci valsopodaru. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace valsopodaru. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti valsopodaru je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti valsopodaru) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+valsopodar/K562 pak odráží míru inhibice P-gp valsopodarem.

Z obrázku 16 je patrné, že testovaný inhibitor P-gp, zosuquidar, vykazuje vynikající inhibiční účinky vůči P-gp, a to již v nanomolárních koncentracích.

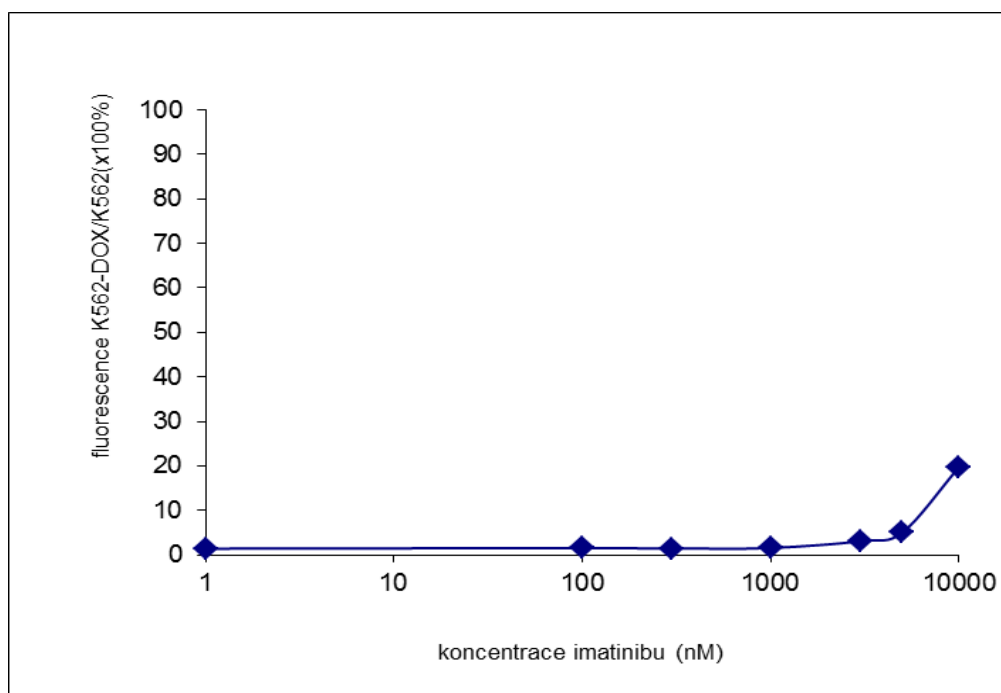


Obr. 16: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci zosuquidaru. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace zosuquidaru. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti zosuquidaru je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti zosuquidaru) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+zosuquidar/K562 pak odráží míru inhibice P-gp zosuquidarem.

5.1.2. Tyrosinkinasové inhibitory

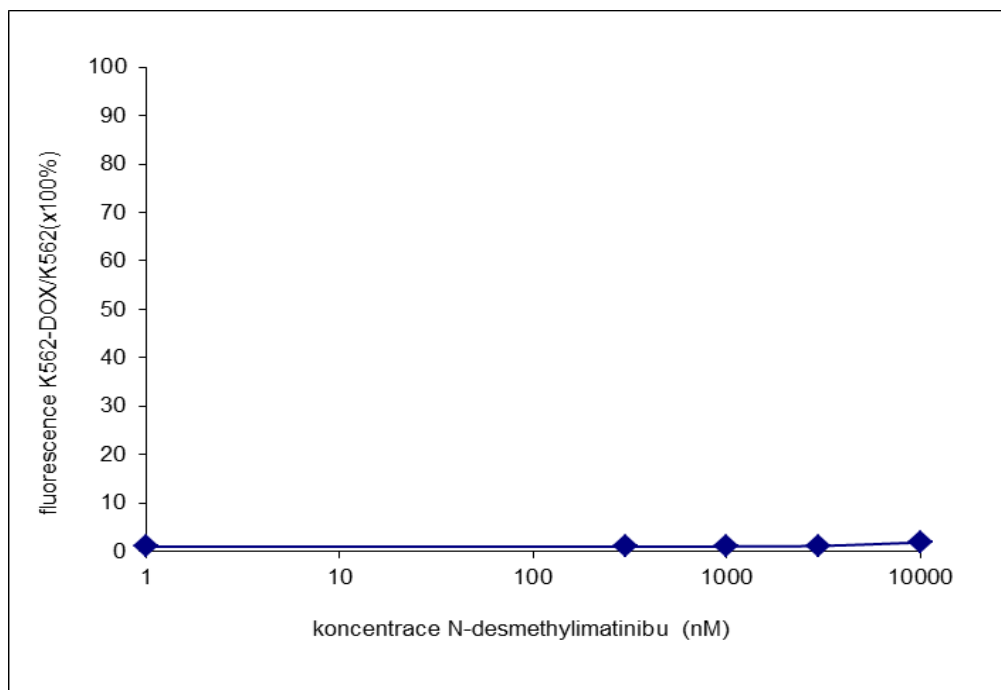
Abychom posoudili vliv TKI na P-gp, zařadili jsme do této studie rovněž vybrané TKI - imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib. V naší laboratoři byly dříve testovány účinky nejznámějšího metabolitu imatinibu, N-desmethylimatinibu, z nichž vyplynulo, že jsou jeho vlastnosti jako substrátu P-gp odlišné od imatinibu (Mlejnek a kol., 2011). Z tohoto důvodu jsme jej zařadili také do těchto inhibičních studií.

Ukázalo se, že imatinib má inhibiční účinky vůči P-gp, ale tyto účinky jsou poměrně slabé (Obr. 17). Výraznějšího inhibičního účinku dosahuje až v nejvyšší testované (10 mikromolární) koncentraci.



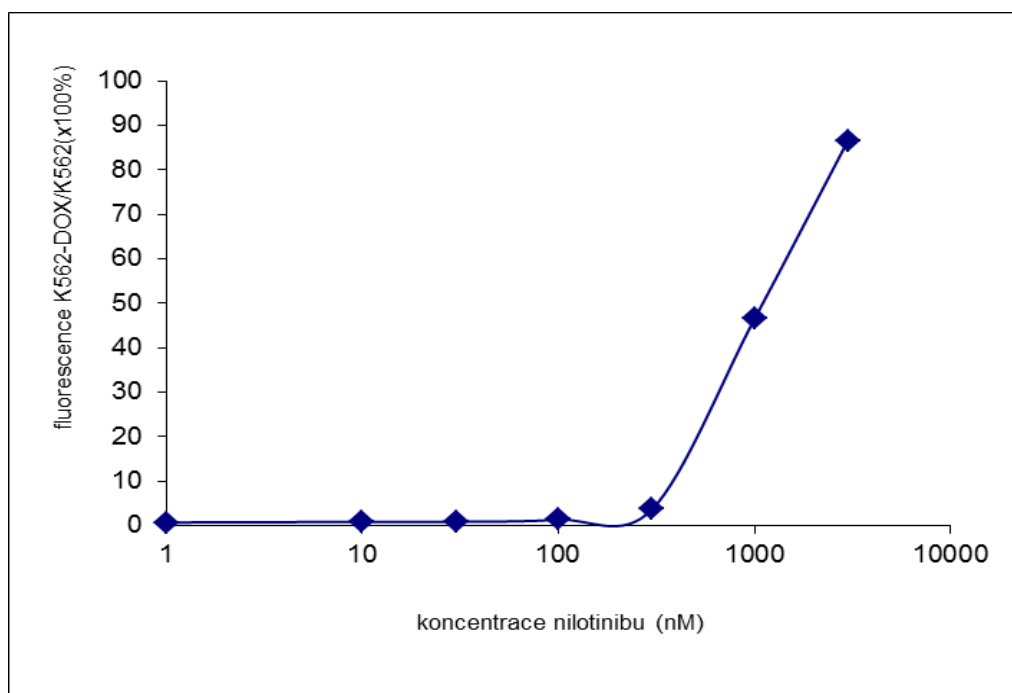
Obr. 17: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci imatinibu. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace imatinibu. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti imatinibu je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti imatinibu) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+ imatinib/K562 pak odráží míru inhibice P-gp imatinibem.

V testovaných koncentracích nebyly zjištěny žádné inhibiční účinky N-desmethylimatinibu vůči P-gp (Obr. 18). Z tohoto důvodu byl z dalších provedených analýz vyřazen (viz. níže).



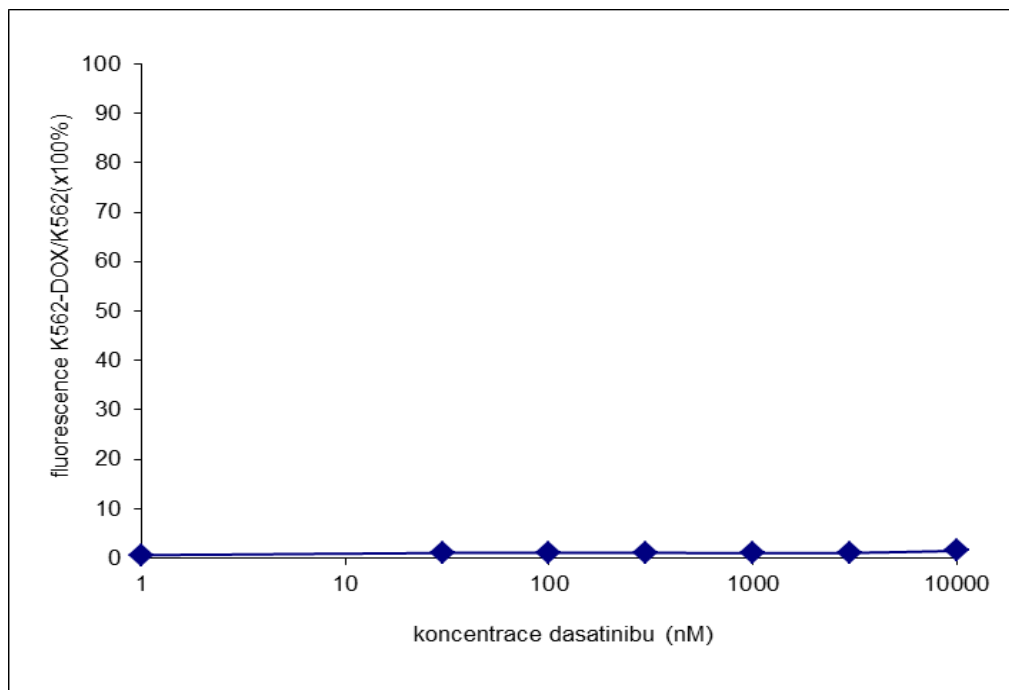
Obr. 18: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci N-desmethylimatinibu. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace N-desmethylimatinibu. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti N-desmethylimatinibu je nejnižší (osa x je v logaritmicím měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti N-desmethylimatinibu) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+N-desmethylimatinib/K562 pak odráží míru inhibice P-gp N-desmethylimatinibem.

Z provedených analýz bylo zjištěno, že nilotinib je velmi slibným inhibítoem P-gp (Obr. 19). Je účinný již v nízkých mikromolárních koncentracích, čímž jsou jeho účinky srovnatelné s klasickými inhibitory P-gp jako jsou CsA, valsopodar, verapamil nebo zosuquidar (viz. Obr. 13, 14, 15,16).



Obr. 19: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci nilotinibu. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace nilotinibu. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti nilotinibu je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti nilotinibu) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+ nilotinib/K562 pak odráží míru inhibice P-gp nilotinibem.

Bylo zjištěno, že dasatinib nemá ani v nejvyšší testované koncentraci žádný inhibiční účinek vůči P-gp (Obr. 20). Proto byl stejně jako N-desmethylimatib vyřazen z cytotoxických studií (viz. níže).



Obr. 20: Graf závislosti intenzity fluorescence kalceinu na koncentraci dasatinibu. Buňky K562/DOX byly barveny kalceinem-AM v přítomnosti postupně se zvyšující se koncentrace dasatinibu. Po 20 minutové inkubaci byla změřena intenzita fluorescence buněk pomocí průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Intenzita fluorescence K562/DOX buněk bez přítomnosti dasatinibu je nejnižší (osa x je v logaritmickém měřítku). Intenzita fluorescence K562 buněk barvených kalceinem-AM (bez přítomnosti dasatinibu) je uvažována jako 100%. Poměr intenzit fluorescence K562/DOX+ dasatinibu/K562 pak odráží míru inhibice P-gp dasatinibem.

Z provedených analýz vyplynulo, že ze skupiny testovaných TKI má inhibiční účinky vůči P-gp pouze imatinib a nilotinib, přičemž nilotinib je ve srovnání s imatinibem výrazně účinnější.

5.2. Vliv inhibitorů tyrosinových kinas na proliferaci a viabilitu buněk

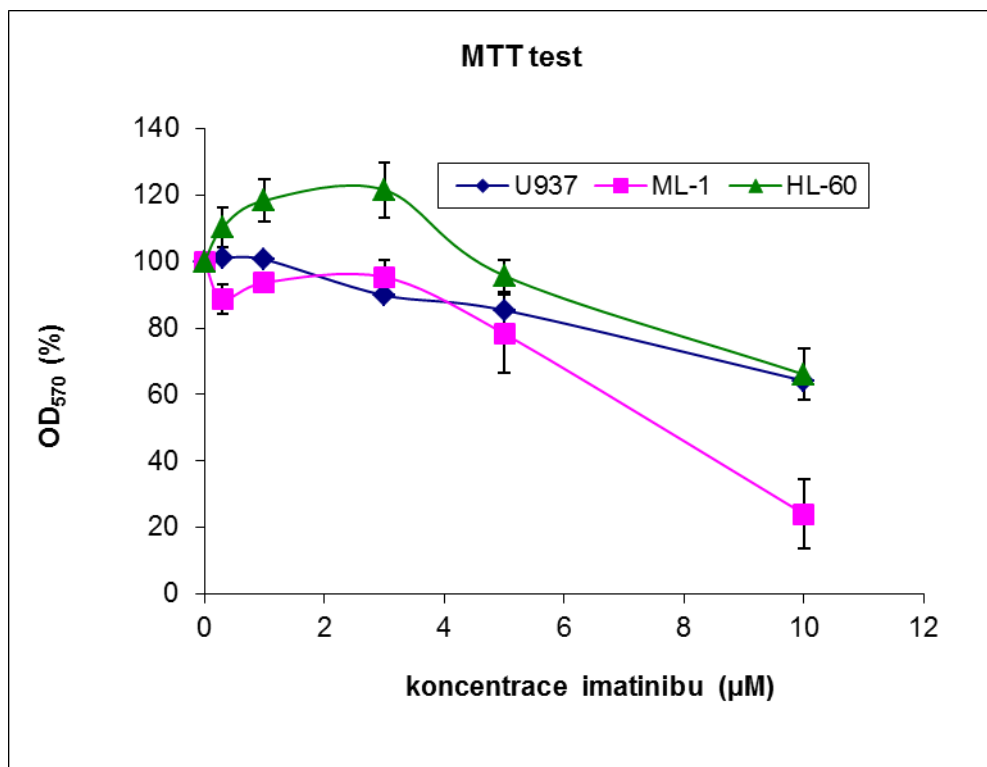
Aby bylo možné uvažovat o terapeutickém využití těchto dvou TKI, je podmínkou, že v daném koncentračním rozmezí nesmí být obecně cytotoxické. K tomuto účelu byly využity buňky neexprimující Bcr-Abl tyrosin kinasu (ML-1, HL-

60 a U937). Rovněž byly sledovány cytotoxické účinky klasických inhibitorů P-gp (CsA, valsopodar, verapamil, zosuquidar) u buněk K562, které exprimují Bcr-Abl kinasu.

5.2.1 Tyrosinkinasové inhibitory

K posouzení vlivu TKI na proliferaci a viabilitu buněk bylo využito MTT testu (viz. Materiál a metodika), jemuž byly buňky podrobeny po 48-hodinové inkubaci se zkoumaným TKI (imatinib a nilotinib). Pro srovnání cytotoxických vlastností byly testovány rovněž klasické inhibitory P-gp (CsA, valsopodar, verapamil a zosuquidar). Z rovnice lineární regrese pak byly vypočítány hodnoty IC_{50} , což jsou koncentrace, při kterých dochází k eliminaci počtu živých buněk na 50 %.

Provedeným MTT testem bylo zjištěno, že imatinib má v daném koncentračním rozmezí nejsilnější cytotoxické účinky vůči buňkám ML-1, slabší potom vůči buňkám U937 a nejméně citlivé jsou vůči imatinibu buňky HL-60 (Obr. 21). V Tab. 2 jsou uvedeny hodnoty IC_{50} u testovaných buněčných linií, z nichž vyplývá, že k dosažení 50% inhibice proliferace buněk U937 a HL-60 imatinibem je třeba zvolit koncentraci vyšší než 10 μ M, zatímco u buněk ML-1 je k dosažení kýženého efektu dostačující koncentrace 7,6 μ M.



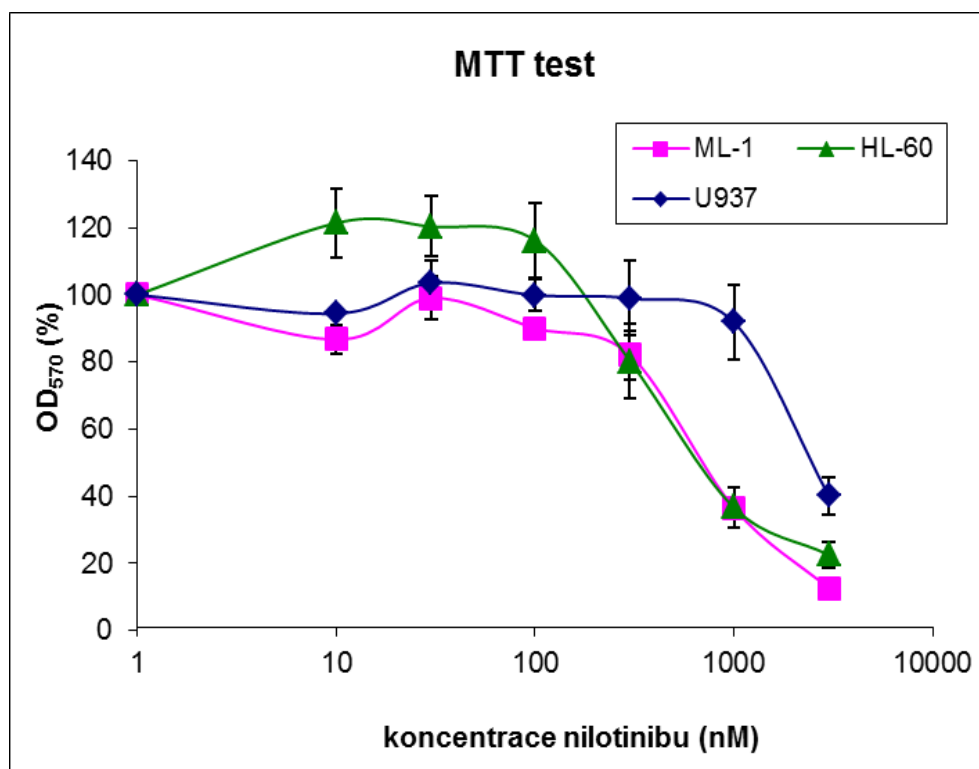
Obr. 21: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci imatinibu. Buňky U937, HL-60 a ML-1 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací imatinibu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti imatinibu byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.

Tabulka 2: Přehled hodnot IC_{50} imatinibu u testovaných buněčných linií U937, ML-1 a HL-60

Buněčná linie	Hodnota IC_{50} (µM)
U937	> 10
ML-1	7,6
HL-60	> 10

Provedeným MTT testem bylo zjištěno, že nilotinib má v daném koncentračním významné cytotoxické účinky, což vylučuje možnost použít jej jako inhibitor P-gp v klinické praxi. Z Obr. 22 je patrné, že nejvýznamnější cytotoxické účinky má vůči buňkám ML-1 a HL-60, slabší potom vůči buňkám U937. V Tab. 3 jsou uvedeny hodnoty IC_{50} u testovaných buněčných linií, z nichž vyplývá, že k dosažení 50%

inhibice proliferace buněk ML-1 a HL-60 nilotinibem dostačuje koncentrace 0,79 μM , zatímco u buněk U937 je k dosažení kýženého efektu potřebná koncentrace 2,61 μM .



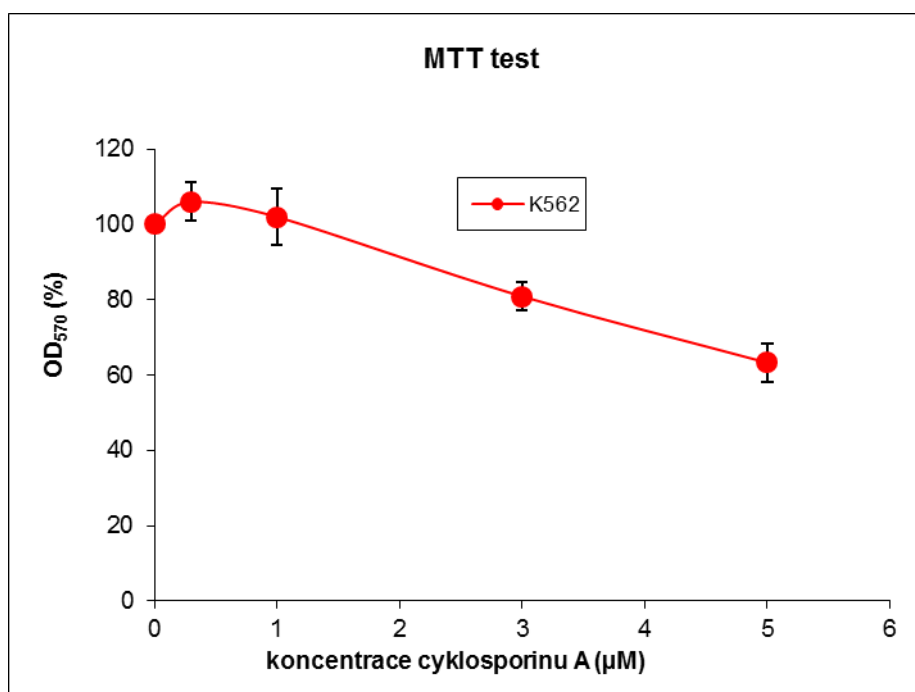
Obr. 22: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci nilotinibu. Buňky ML-1, HL-60, U937 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací nilotinibu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti nilotinibu byly použity jako kontrola (100%), které odpovídá nejnižší koncentrace. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.

Tabulka 3: Přehled hodnot IC₅₀ nilotinibu u testovaných buněčných linií U937, ML-1 a HL-60

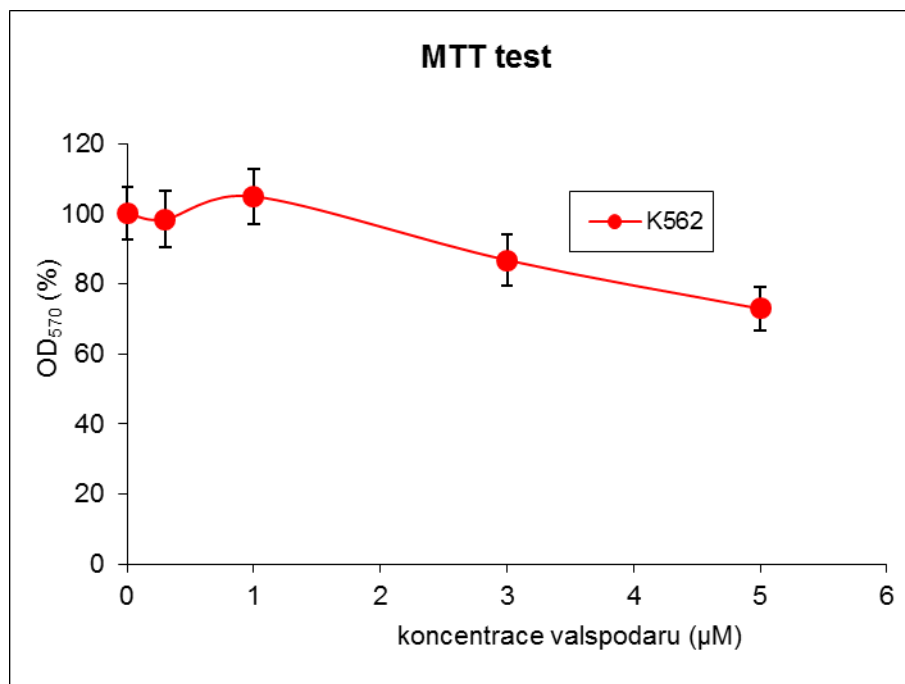
Buněčná linie	Hodnota IC ₅₀ (μM)
U937	2,61
ML-1	0,79
HL-60	0,79

5.2.2 Klasické inhibitory P-glykoproteinu

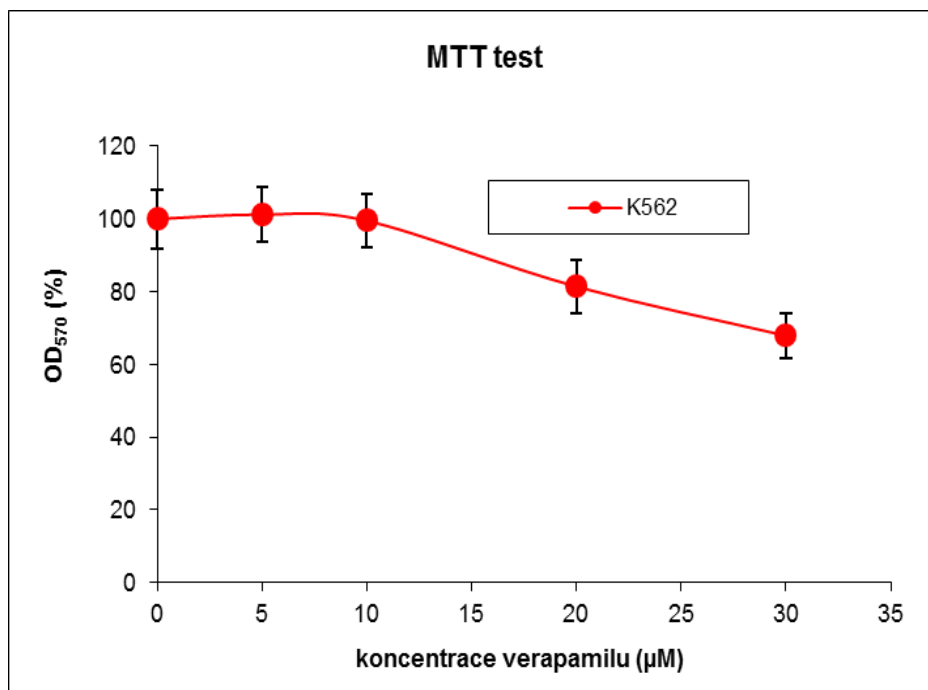
Bylo ověřeno, že klasické inhibitory P-gp 1. a 2. generace (CsA, valspodar, verapamil) vykazují cytotoxické účinky (Obr. 23, 24, 25), zatímco inhibitor P-gp 3. generace, zosuquidar, není v testovaném intervalu cytotoxický (Obr. 26). V Tab. 4 jsou uvedeny příslušné hodnoty IC_{50} pro všechny čtyři testované inhibitory P-gp. Hodnoty IC_{50} se nám nepodařilo přesně stanovit, neboť u všech čtyřech inhibitorů P-gp byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace.



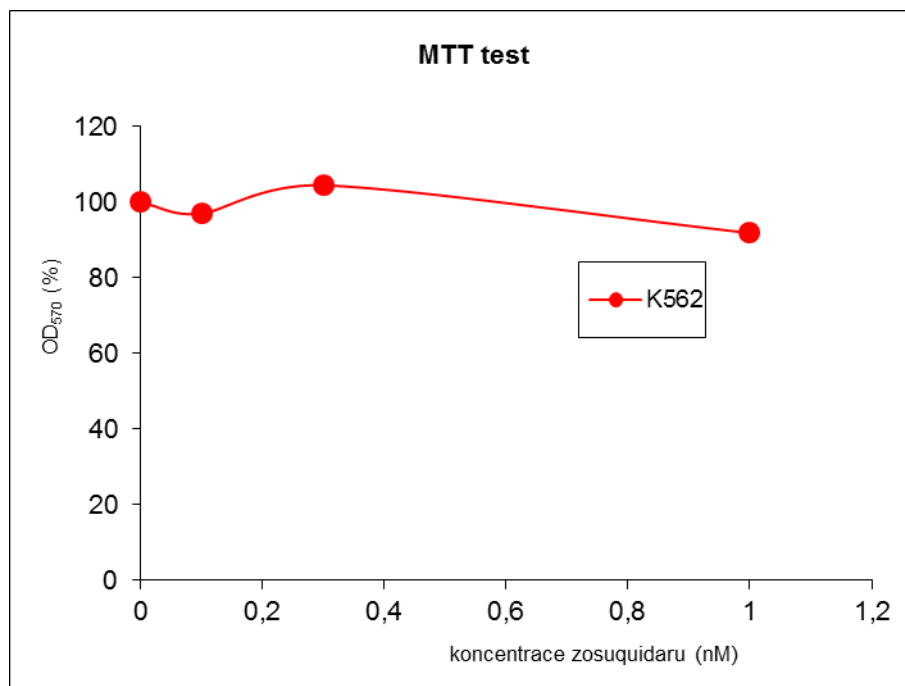
Obr. 23: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci cyklosporinu A. Buňky K562 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací cyklosporinu A po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti cyklosporinu A byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.



Obr. 24: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci valsopodaru. Buňky K562 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací valsopodaru po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz. Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti valsopodaru byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.



Obr. 25: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci verapamilu. Buňky K562 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací verapamilu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti verapamilu byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.



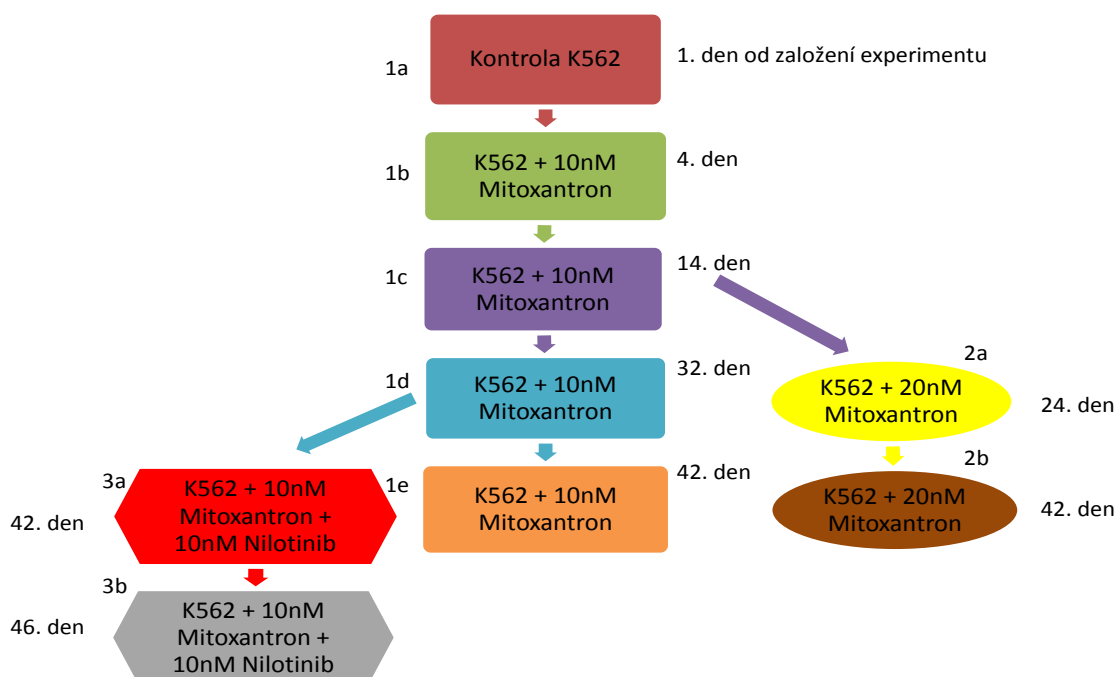
Obr. 26: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci zosuquidaru. Buňky K562 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací zosuquidaru po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti zosuquidaru byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.

Tabulka 4: Přehled hodnot IC_{50} klasických inhibitorů P-gp u testované buněčné linie K562

Inhibitor P-gp	Hodnota IC_{50} (μ M)
cyklosporin A	> 5
valspodar	> 5
verapamil	> 30
zosuquidar	> 1

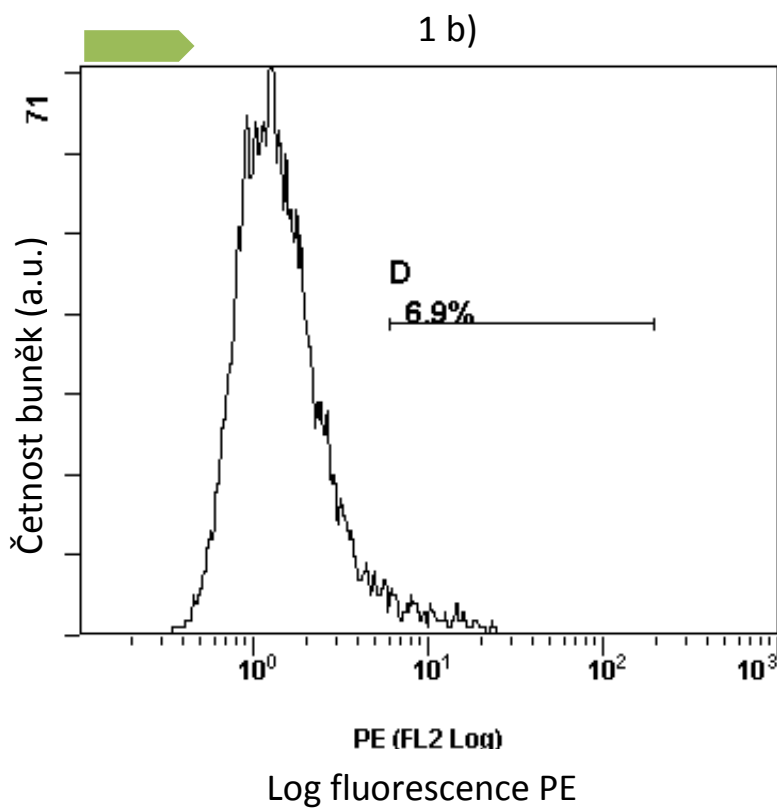
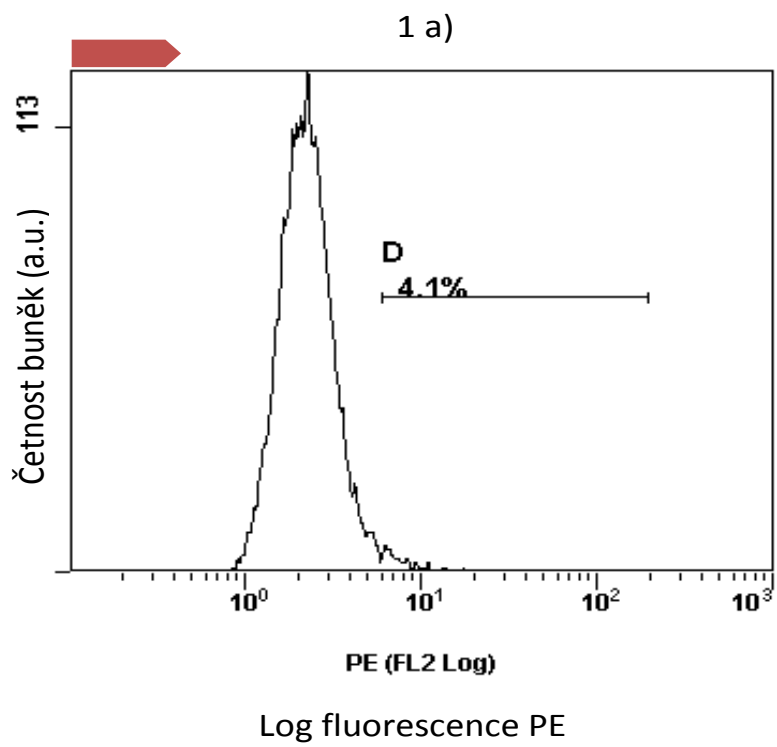
5.3. Indukce exprese ABCG2 genu mitoxantronem

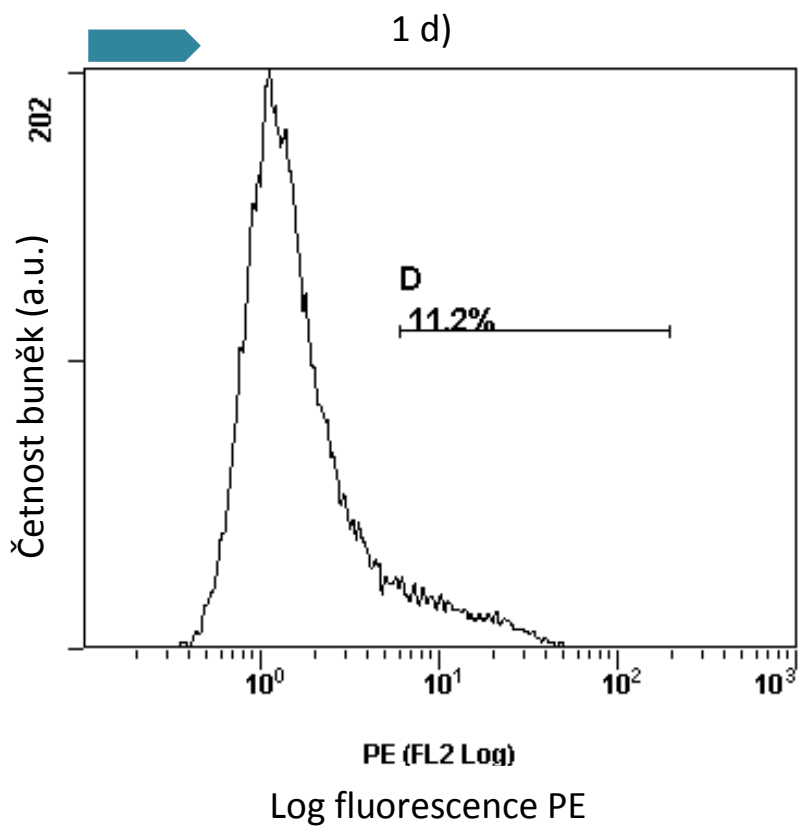
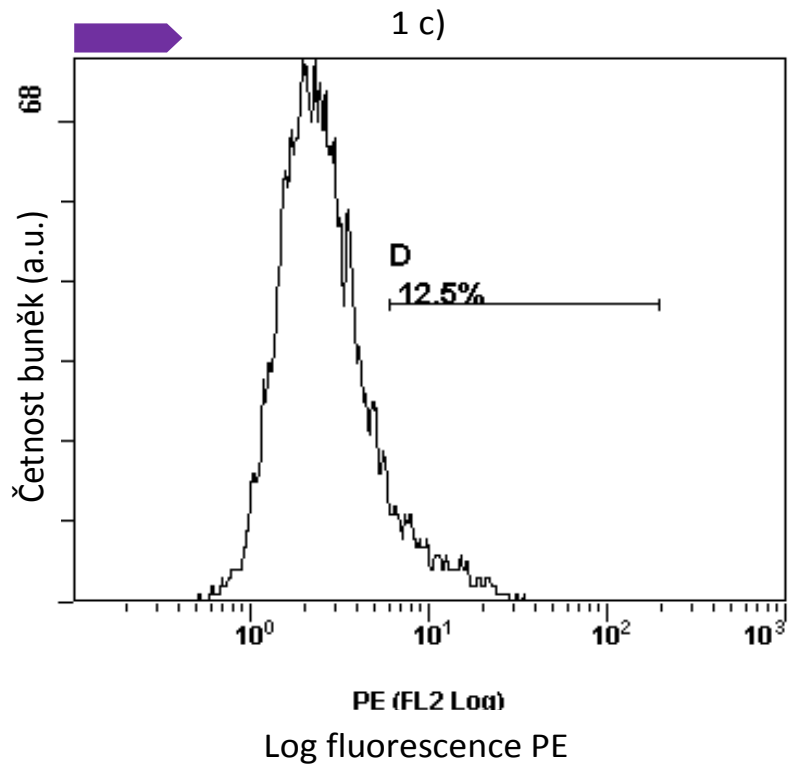
Dalším cílem této diplomové práce byla selekce a charakterizace rezistentních buněk se zvýšenou expesí ABCG2 transportéru pomocí mitoxantronu (nilotinbu). Na obrázku 27 je uvedeno schéma působení mitoxantronu (nilotinibu).

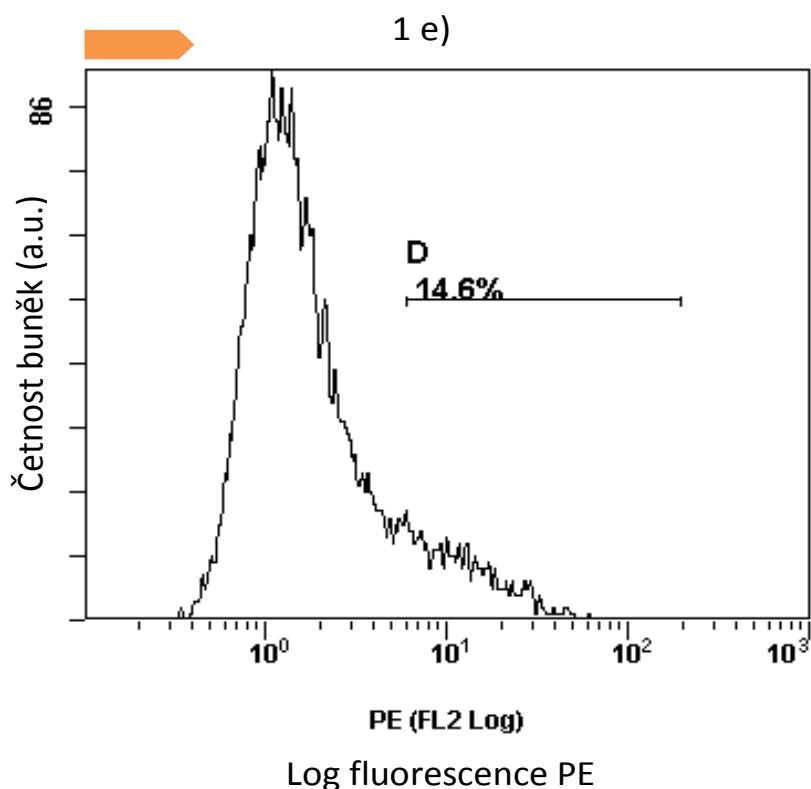


Obr. 27: Schéma selekce rezistentních buněk K562/ABCG2. Jako mateřská linie byly použity buňky K562, které byly inkubovány s výchozí 10nM koncentrací mitoxantronu (viz. Materiál a metodika). Průběžně byla sledována exprese ABCG2 transportéru (Obr. 28) metodou imunohistochemického barvení s využitím protilátky BCRP/ABCG2 konjugované s fykoerytrinem (viz. Materiál a metody). Na základě těchto výsledků byla 14. den od založení experimentu koncentrace mitoxantronu zdvojnásobena na 20 nM a opět prováděna analýza exprese ABCG2 transportéru stejnou metodou (Obr. 29 – viz. níže). V 32. dni začaly být buňky kultivovány v přítomnosti 10nM mitoxantronu s přídavkem 10nM nilotinibu. Opětovně byla prováděna analýza exprese ABCG2 transportéru (Obr. 30 – viz. níže). Inkubace buněk v přítomnosti 10nM mitoxantronu s přídavkem 10nM nilotinibu byla ukončena 46. den od založení experimentu, kdy bylo přistoupeno k samotné selekci buněk K562/ABCG2.

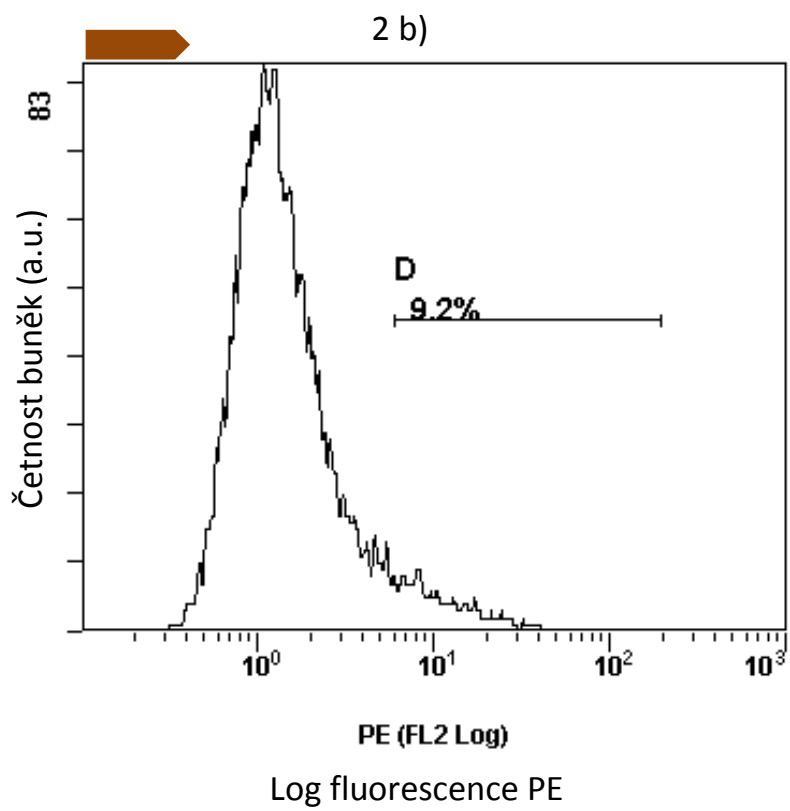
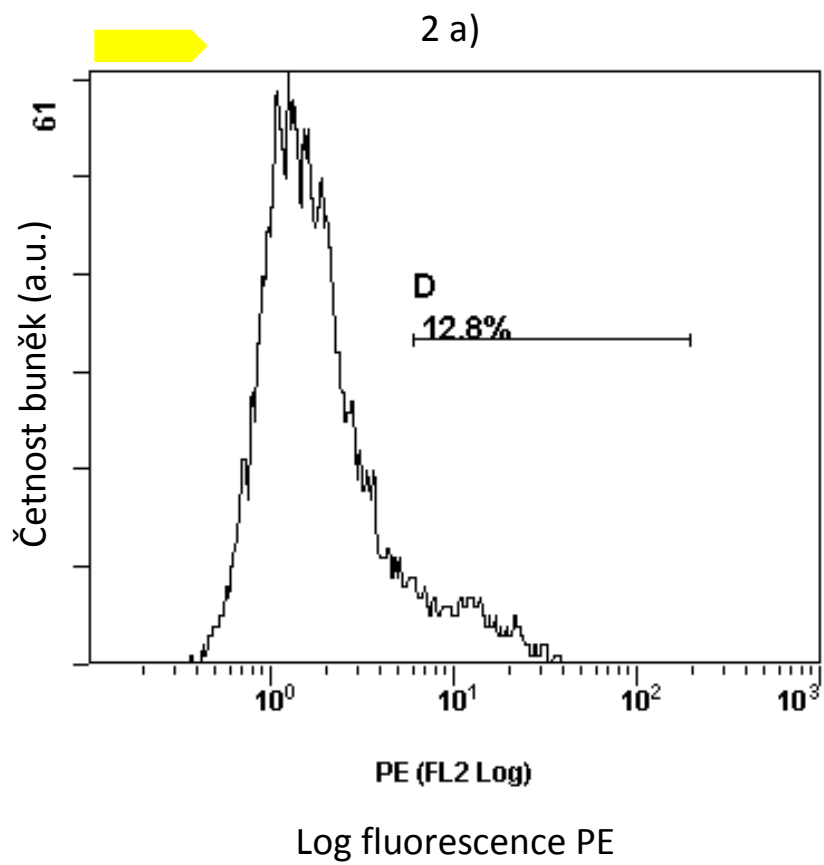
K Obr. 27 se vztahuje legenda v podobě Obr. 28, 29, 30 založená na barevném rozlišení. Na obrázku 28 je ukázána analýza exprese ABCG2 proteinu u buněk K562 po působení 10nM mitoxantronu. Na obrázku 29 je ukázána analýza exprese ABCG2 proteinu u buněk K562, které byly vystaveny 10 a 20nM mitoxantronu. Kombinované působení 10nM mitoxantronu a 10nM nilotinibu je pak na obrázku 30.



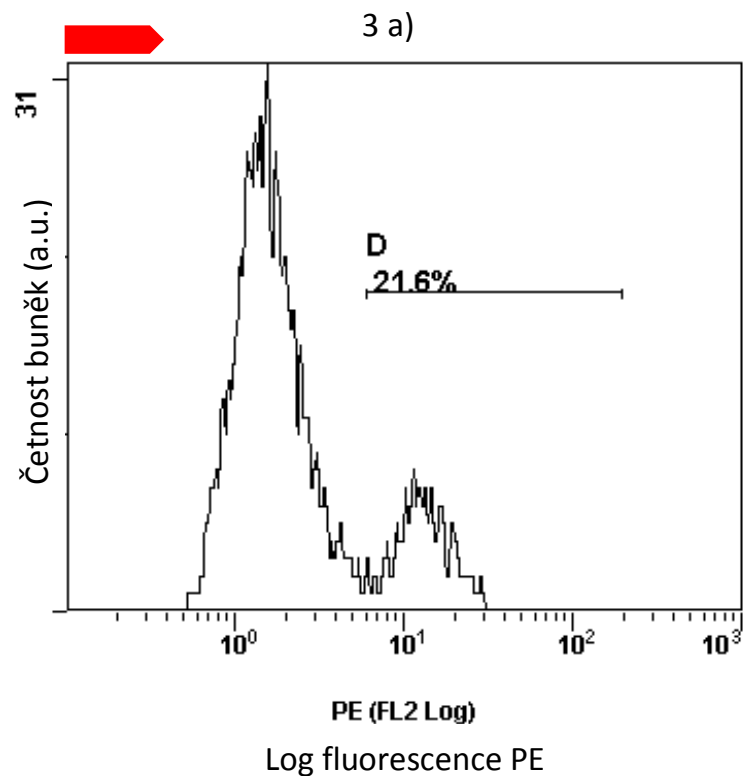


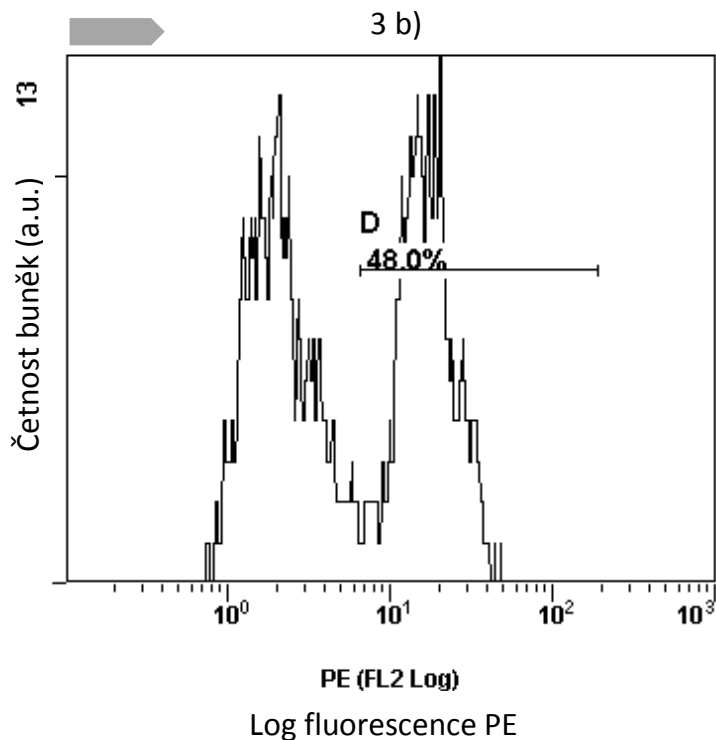


Obr 28. Analýza exprese ABCG2 u buněk K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu (viz. Materiál a metody) s přidavkem 10nM mitoxantronu. V definovaných intervalech pak byla měřena exprese ABCG2 proteinu s využitím specifické protilátky ABCG2 konjugované s fykoerytrinem metodou průtokové cytometrie (viz Materiál a metody). Buňky kultivované 4 dny (b), 14 dní (c), 32 dní (d), 42 dní (e). Mateřská linie K562 byla použita jako kontrola (a). Na ose x těchto histogramů je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCG2, na ose y pak četnost buněk. Graficky i číselně je v histogramu zaznamenána frakce buněk exprimujících ABCG2 transportér. Histogram představuje typický výsledek.



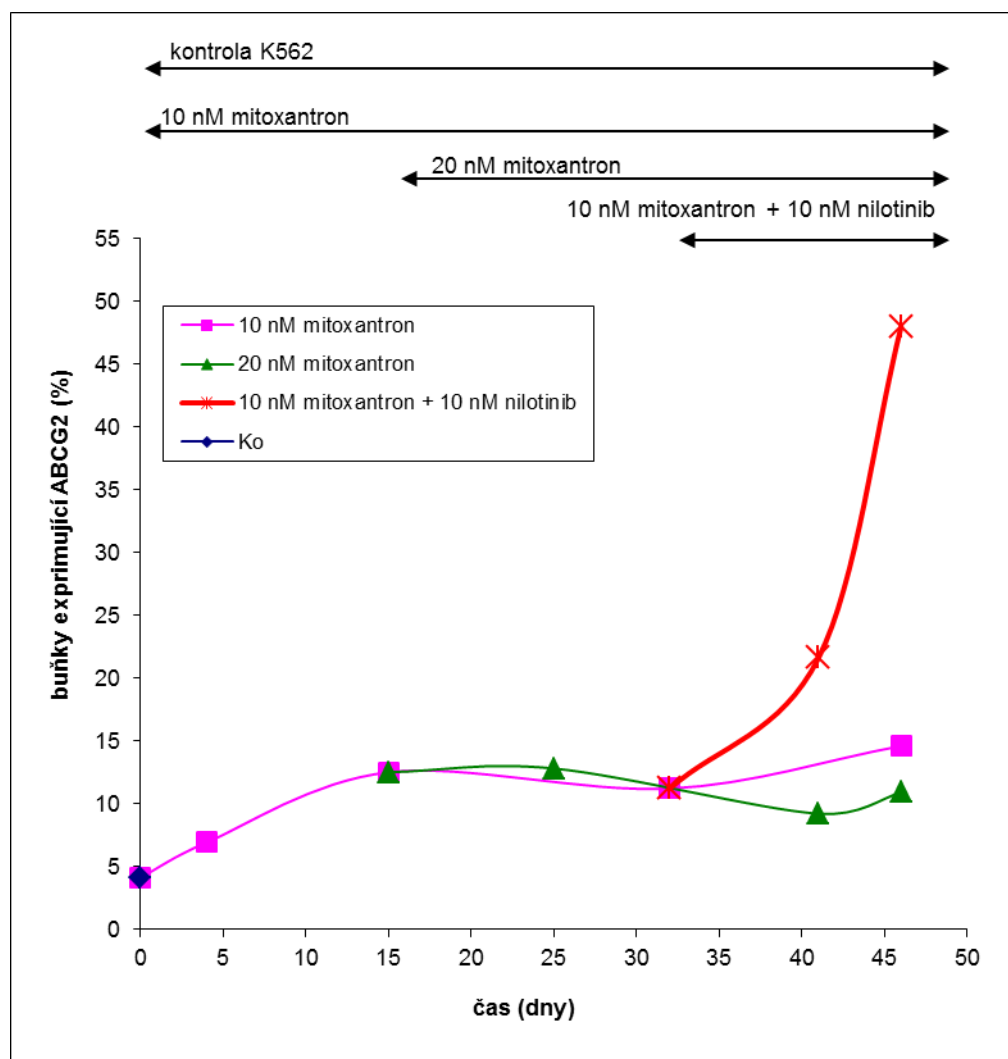
Obr 29. Analýza exprese ABCG2 u buněk K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu (viz Materiál a metody) s přidavkem 20nM mitoxantronu. V definovaných intervalech pak byla měřena exprese ABCG2 proteinu s využitím specifické protilátky konjugované s fykoerytrinem metodou průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Buňky kultivované 24 dní (a), 42 dní (b). Buňky kultivované 14 dní v přítomnosti 10nM mitoxantronu byly použity jako kontrola (viz. Obr. 28 c). Na ose x těchto histogramů je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCG2, na ose y pak četnost buněk. Graficky i číselně je v histogramu zaznamenána frakce buněk exprimujících ABCG2 transportér. Histogram představuje typický výsledek.





Obr 30. Analýza exprese ABCG2 u buněk K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu (viz Materiál a metody) s přidavkem 10nM mitoxantronu v kombinaci s 10nM nilotinibem. V definovaných intervalech pak byla měřena exprese ABCG2 proteinu s využitím specifické protilátky konjugované s fykoerytrinem metodou průtokové cytometrie (viz. Materiál a metody). Buňky kultivované 42 dní (a), 46 dní (b). Buňky kultivované 32 dní v přítomnosti 10nM mitoxantronu byly použity jako kontrola (viz. Obr. 28d). Na ose x těchto histogramů je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCG2, na ose y pak četnost buněk. Graficky i číselně je v histogramu zaznamenána frakce buněk exprimujících ABCG2 transportér. Histogram představuje typický výsledek.

Vliv jednotlivých selekčních působení na indukci exprese ABCG2 proteinu je shrnut na obrázku 31.



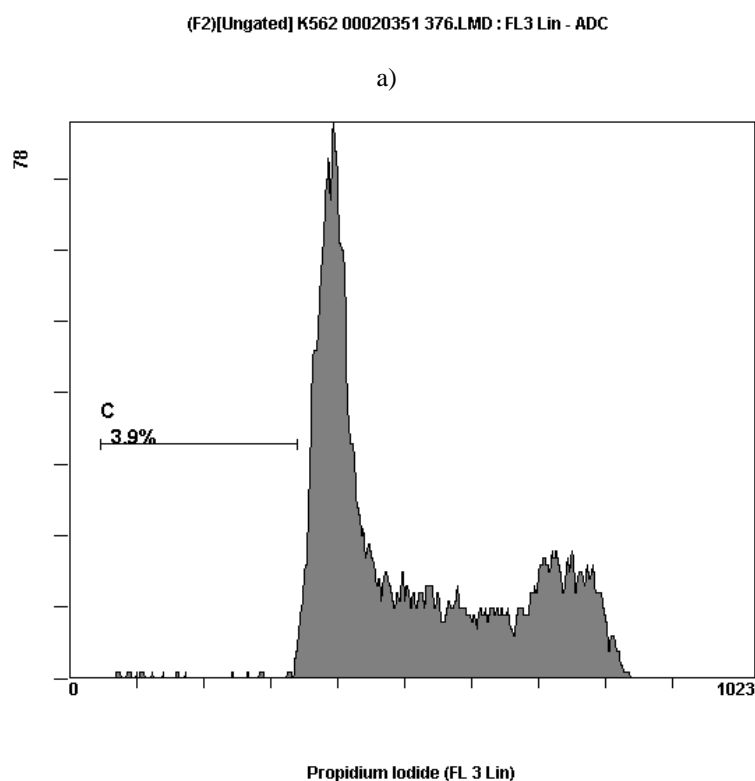
Obr. 31: Vliv jednotlivých selekčních působení na indukci exprese ABCG2 proteinu. Monitorováno prostřednictvím analýzy exprese ABCG2. K tomu použita specifická protilátka BCRP1/ABCG2 konjugovaná s fykoerytrinem, následně změřena intenzita fluorescence metodou průtokové cytometrie (viz. Materiál a metodika). Na ose x je uveden čas od založení experimentu ve dnech a na ose y procentuální frakce buněk exprimujících ABCG2 transportér. Kultivace buněk v přítomnosti 10nM a 20nM mitoxantronu neměla významný efekt na indukci exprese ABCG2. K tomu přispěla až kultivace buněk v přítomnosti 10nM mitoxantronu v kombinaci s 10nM nilotinibem.

Indukce exprese ABCG2 transportéru pomocí mitoxantronu je zřejmě individuální záležitostí, neboť v předchozím opakování experimentu došlo k indukci exprese ABCG2 transportéru velmi rychle. Bohužel došlo ke kontaminaci selektovaných buněk, které tak byly efektivně ztraceny.

Přídavek mitoxantronu do růstového média vede zpočátku ke zpomalení proliferace a indukci buněčné smrti, po určité době se však buněčná proliferace postupně navrácí k normálu. Jakmile buňky začnou znovu proliferovat, je možné zesílit selekční tlak. Proto je nutné průběžně sledovat průběh proliferace buněčné suspenze.

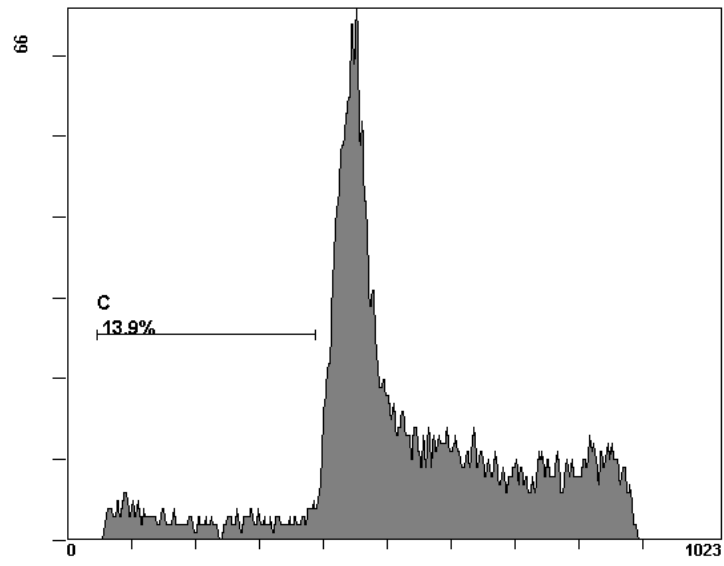
5.3.1 Analýza buněčného cyklu

Průběh proliferace po působení 10nM mitoxantronu byl monitorován prostřednictvím analýzy buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie. Buňky byly obarveny propidium iodidem obsaženým ve Vindalově roztoku (viz. Materiál a metodika). Výsledky analýzy buněčného cyklu jsou shrnuty na Obr. 32, kde jsou graficky a číselně zaznačeny apoptotické buňky, rovněž je možné sledovat distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Hlavní pík představuje G1 fázi, na něj plynule navazuje S-fáze a druhý viditelný pík je charakteristický pro G2/M fázi.



(F2)[Ungated] K562_10 Mitox 00020795 429.LMD : FL3 Lin - ADC

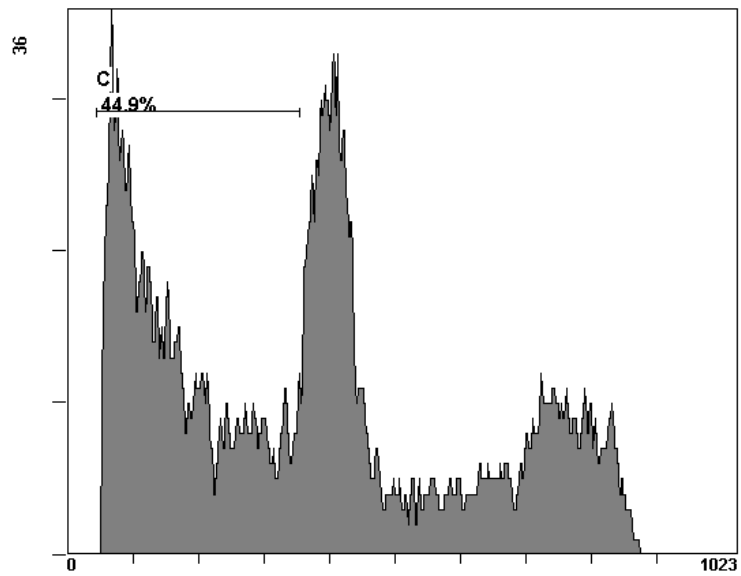
b)



Propidium iodide (FL 3 Lin)

(F2)[Ungated] K562_20Mitox_10Nilo 00020798 432.LMD : FL3 Lin - ADC

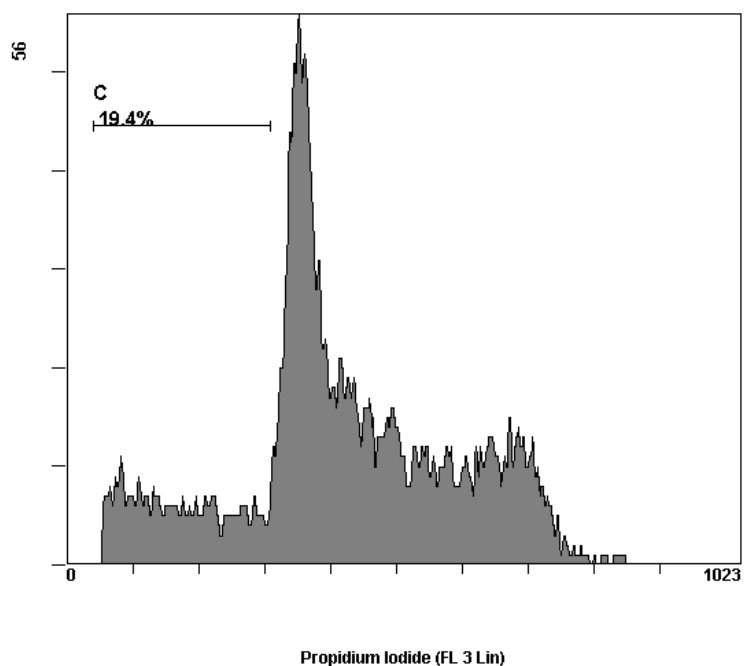
c)



Propidium iodide (FL 3 Lin)

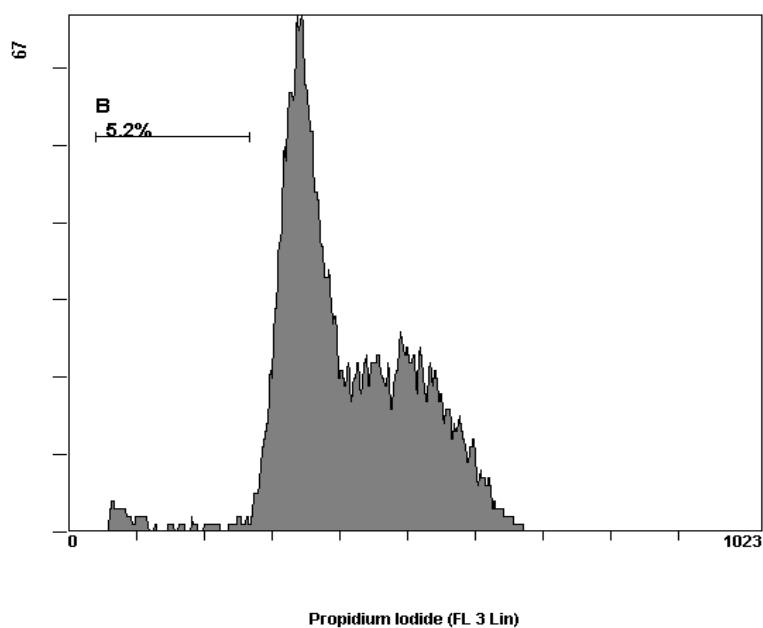
(F2)[Ungated] K562_20Mito 00020551 403.LMD : FL3 Lin - ADC

d)



(F2)[Ungated] K562_ko 00020549 401.LMD : AUX - ADC

e)

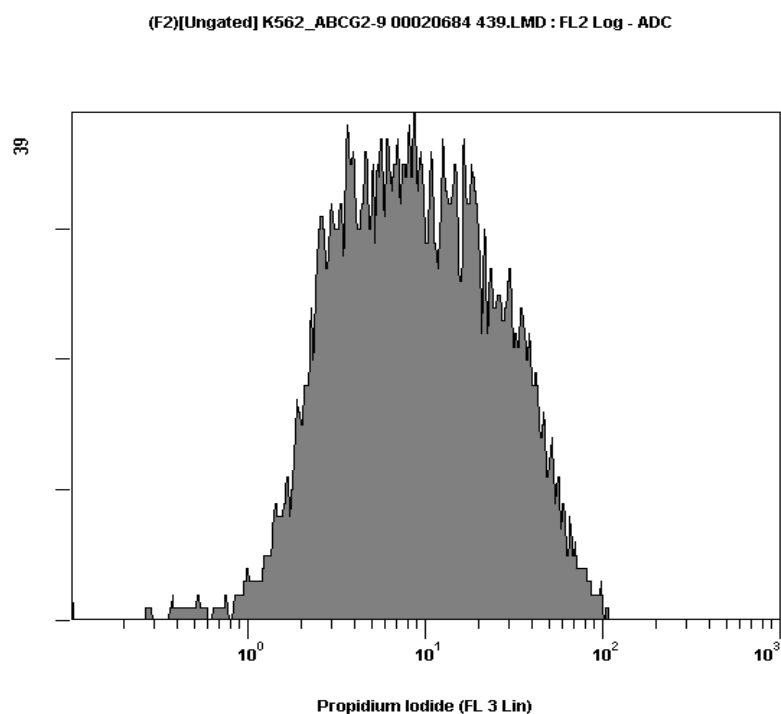


Obr. 32: Analýza buněčného cyklu u buněk K562 ovlivněných mitoxantronem. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu (viz Materiál a metody) s přidavkem 10nM mitoxantronu. V definovaných intervalech pak byly buňky barveny propidium iodidem a prováděna analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie (viz Materiál a metody). Buňky kultivované 14 dní (b), 32 dní (c), 42 dní (d), 46 dní (e). Mateřská linie K562 byla použita jako kontrola (a). Na ose x je zaznamenána intenzita

měřené fluorescence odpovídající množství DNA a na ose y pak relativní četnost buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Histogramy představují typický výsledek.

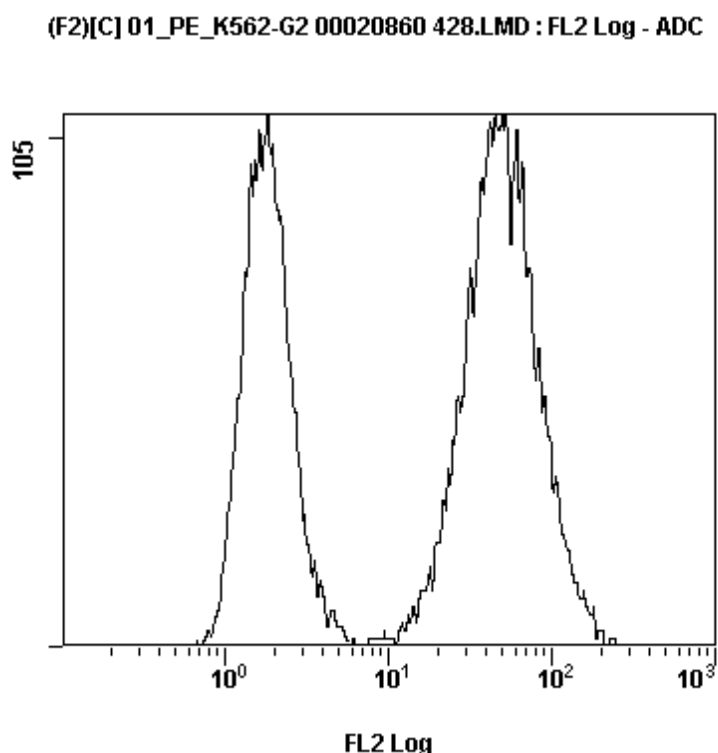
5.3.2 Selekcce buněk exprimujících ABCG2 transportér

Buňky K562/ABCG2 byly rozklonovány do 96-jamkového panelu tak, aby na jednu jamku připadalo asi 0,5 buňky (viz. Materiál a metodika). Úspěšnost provedené selekcce nebyla nijak velká, pozitivita spočívající v nárůstu bílé kolonie byla zaznamenána v jedné z asi padesáti jamek. Ty byly následně podrobeny analýze exprese ABCG2 transportéru pomocí specifické protilátky konjugované s fykoerytrinem metodou průtokové cytometrie (viz. Materiál a metodika). Část vyselektovaných kolonií byla z hlediska míry exprese značně heterogenní, což se projevilo širokým expresním profilem (Obr. 33).



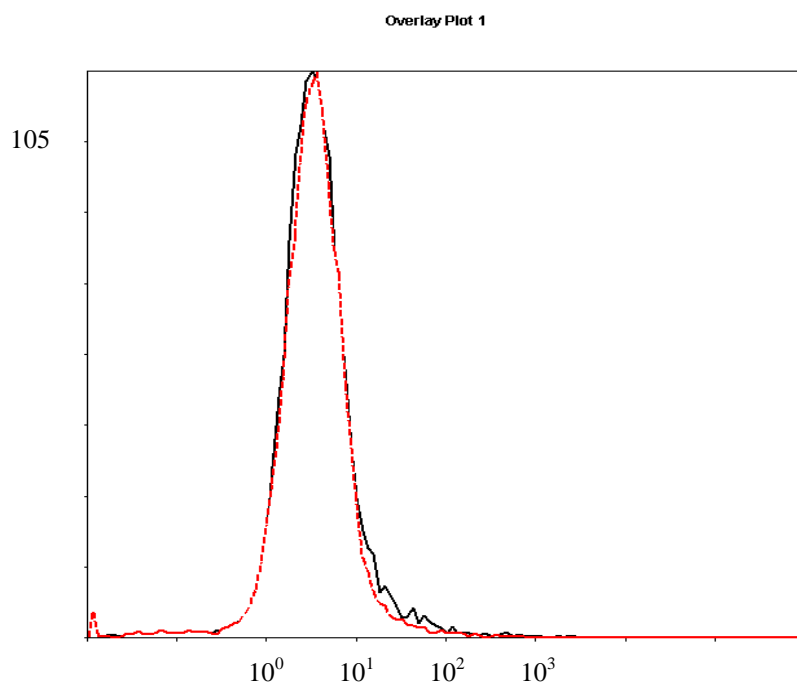
Obr. 33: Analýza exprese ABCG2 transportéru u selektovaných buněk. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány se specifickou protilátkou proti ABCG2 konjugovanou s fykoerytrinem (viz. Materiál a metody). Na ose x tohoto histogramu je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCG2, na ose y pak četnost buněk. Na histogramu je zachycen široký expresní profil. Histogram představuje typický výsledek.

Kromě heterogenní populace se ale rovněž podařilo vyselektovat linii s úzkým expresním profilem, což svědčí o její homogenitě (Obr. 34).



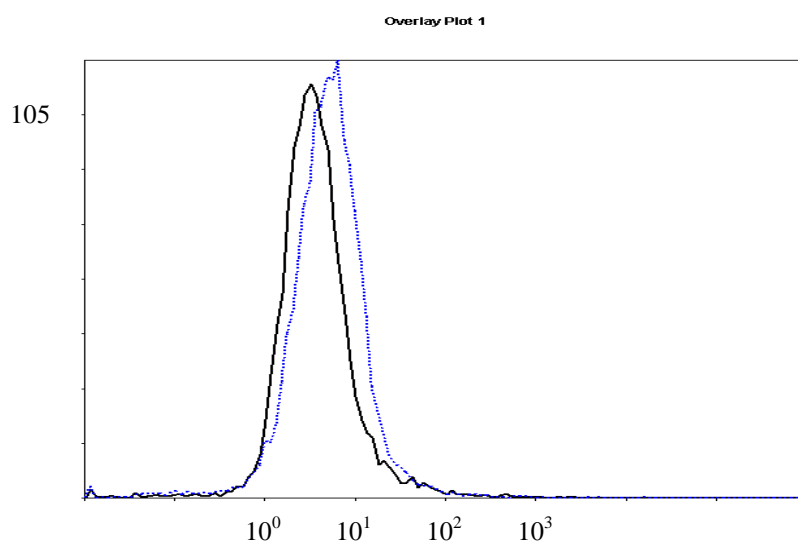
Obr. 34: Analýza exprese ABCG2 transportéru u selektovaných buněk. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány se specifickou protilátkou proti ABCG2 konjugovanou s fykoerytrinem (viz. Materiál a metody). Na ose x těchto histogramů je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCG2, na ose y pak četnost buněk. Pravý pík náleží buňkám K562/ABCG2, zatímco levý pík buňkám K562, které byly použity jako kontrola. Histogram představuje typický výsledek.

Jako důkaz, že navozená rezistence buněk byla zapříčiněna pouze zvýšenou expresí ABCG2 transportéru, nikoli však ABCB1 či ABCC1, bylo provedeno další imunohistochemické barvení pomocí specifických protilátek konjugovaných s fluorescenční barvou. V případě ABCB1 byla použita protilátka UIC2 (Beckman Coulter, USA) konjugovaná s fykoerytrinem. Jako kontrola byly použity buňky K562. Z histogramu (Obr. 35) je možno vyčíst, že exprese ABCB1 (červená linie) se oproti kontrolní (černá linie) nijak zásadně nezměnila.



Obr. 35: Analýza exprese ABCB1 transportéru u selektovaných buněk. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány se specifickou protilátkou proti ABCB1 konjugovanou s fykoerytrinem (viz. Materiál a metody). Na ose x těchto histogramů je zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCB1 transportéru, na ose y pak četnost buněk. Buňky K562/ABCG2 (červená linie), jako kontrola byly použity buňky K562 (černá linie). Histogram představuje typický výsledek.

Z histogramu (Obr. 36) je možno vyčíst, že exprese ABCC1 (modrá linie) se oproti kontrolní (černá linie) nijak nezměnila.



Obr. 36: Analýza exprese ABCC1 transportéru u selektovaných buněk. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány se specifickou protilátkou proti ABCC1 konjugovanou s karboxyfluoresceinem (viz. Materiál a metody). Na ose x těchto histogramů je

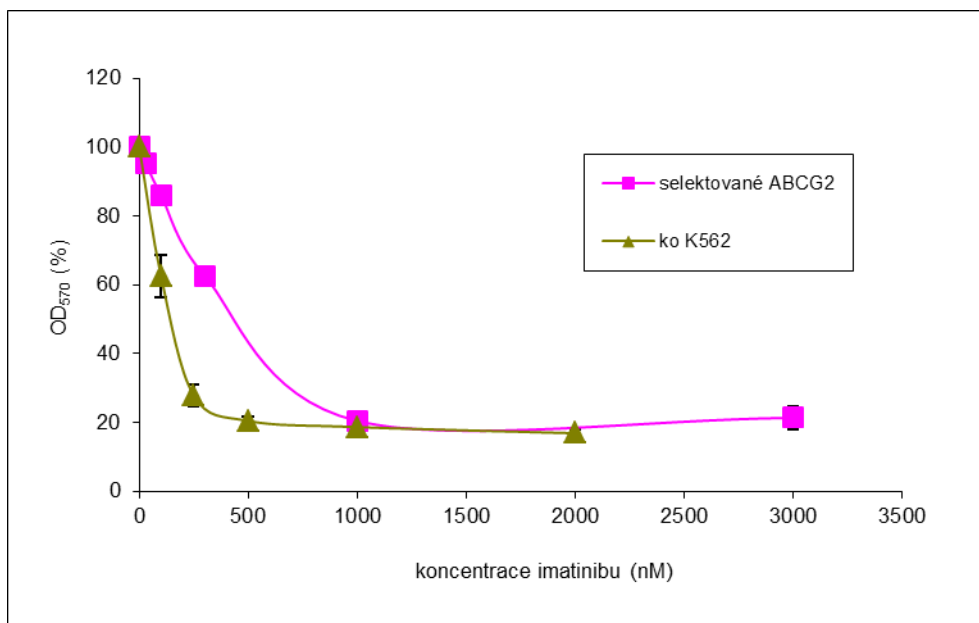
zaznamenána intenzita fluorescence, která odpovídá relativní míře exprese ABCC1 transportéru, na ose y pak četnost buněk. Buňky K562/ABCG2 (modrá linie), jako kontrola byly použity buňky K562 (černá linie). Histogram představuje typický výsledek.

Z výše uvedené analýzy je patrné, že u selektované linie K562/ABCG2 je zvýšená pouze exprese ABCG2 transportéru, exprese dalších transportérů ABCB1 a ABCC1 zůstaly beze změny (Obr. 35-36).

Můžeme konstatovat, že se nám podařilo úspěšně vyselektovat linii exprimující ABCG2 transportér. Ta byla kultivována dále a následně podrobena cytotoxickým studiím za účelem posoudit rezistenci selektovaných buněk k vybraným tyrosinkinasovým inhibitorům.

5.3.3 Rezistence buněk k vybraným tyrosinkinasovým inhibitorům

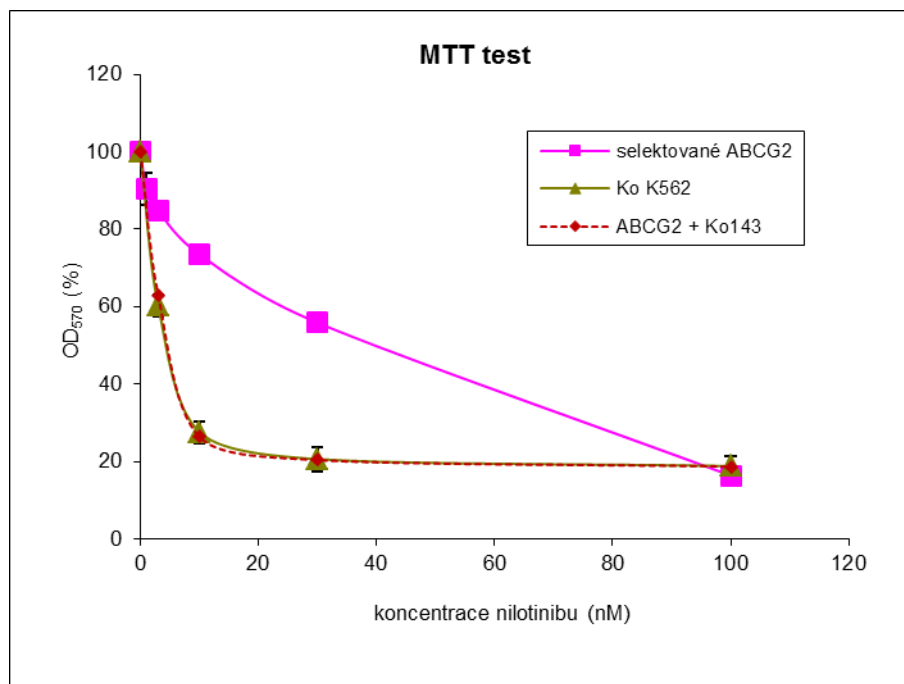
Dále jsme zjišťovali rezistenci selektovaných buněk K562/ABCG2 k vybraným TKI (imatinib, nilotinib a dasatinib) pomocí 48-hodinového MTT testu. Na základě těchto výsledků je možné odhadnout, která z testovaných látek (imatinib, nilotinib, dasatinib) je lepším substrátem ABCG2 transportéru na základě rozdílu hodnot IC₅₀ u selektovaných K562/ABCG2 a K562. Na Obr. 37 je zachycena závislost proliferace a viability na koncentraci imatinibu u buněk K562/ABCG2. Jako kontrolní buňky byly použity buňky K562 kultivované bez přídavku imatinibu. Na Obr. 38 je zachycena závislost proliferace a viability na koncentraci imatinibu u buněk K562/ABCG2. Jako kontrolní buňky byly použity buňky K562 kultivované bez přídavku nilotinibu. Abychom se přesvědčili, že za navozenou rezistenci je zodpovědný právě ABCG2 transportér, zařadili jsme do této cytotoxické studie i selektivní inhibitor ABCG2 transportéru Ko143. Na Obr. 39 je zachycena závislost proliferace a viability na koncentraci imatinibu u buněk K562/ABCG2. Jako kontrolní buňky byly použity buňky K562 kultivované bez přídavku dasatinibu.



Obr. 37: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci imatinibu u buněk K562/ABCG2. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací imatinibu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viabilita pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti imatinibu byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.

Tabulka 5: Přehled hodnot IC_{50} pro imatinib u testovaných buněčných linií

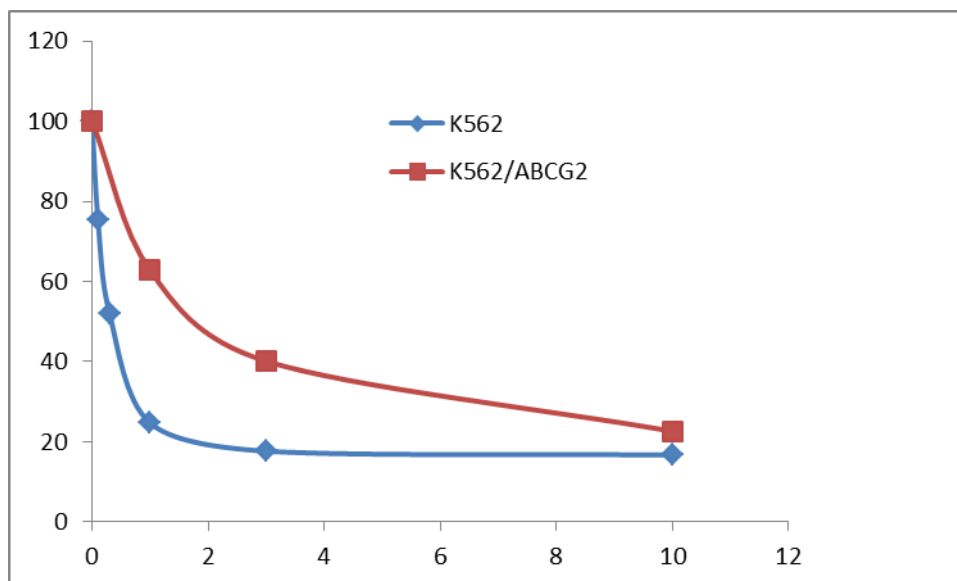
Buněčná linie	Hodnota IC_{50} (μ M)
K562	0,15
K562/ABCG2	0,41



Obr. 38: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci nilotinibu u buněk K562/ABCG2. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací nilotinibu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viability pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti nilotinibu byly použity jako kontrola (100%). Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů se standardní relativní odchylkou.

Tabulka 6: Přehled hodnot IC₅₀ pro nilotinib u testovaných buněčných linií

Buněčná linie	Hodnota IC ₅₀ (nM)
K562	5,12
K562/ABCG2	39,4
K562/ABCG2 + Ko143	5,45



Obr. 39: Graf závislosti proliferace a viability na koncentraci dasatinibu u buněk K562/ABCG2. Buňky K562/ABCG2 byly inkubovány v přítomnosti různých koncentrací dasatinibu po dobu 48h a pak byla měřena jejich proliferace a viability pomocí MTT testu (viz Materiál a metody). Buňky kultivované ve standardním médiu bez přítomnosti dasatinibu byly použity jako kontrola (100%).

Tabulka 7: Přehled hodnot IC_{50} pro dasatinib u testovaných buněčných linií

Buněčná linie	Hodnota IC_{50} (nM)
K562	0,35
K562/ABCG2	2,12

Z provedených MTT testů jsme zjistili, že selektované buňky K562/ABCG2 jsou nejcitlivější vůči působení dasatinibu (hodnoty IC_{50} dosahuje v jednotkách nanomol – viz. Tab. 7), následuje nilotinib, který má také významné cytotoxické účinky vůči buňkám K562/ABCG2 (hodnoty IC_{50} dosahuje v koncentraci asi 40 nM – viz. Tab. 6) a nejméně účinný je vůči buňkám K562/ABCG2 imatinib (dosahuje hodnoty IC_{50} až v koncentraci okolo 400 nM – viz. Tab. 5). Pokud bychom chtěli srovnat rezistenci jednotlivých buněčných linií vůči účinkům testovaných TKI, bude jejich pořadí od nejrezistentnější k nejméně rezistentní buněčné linii přesně obrácené (tedy imatinib, nilotinib a dasatinib). Rovněž se nám podařilo prokázat, že navozenou rezistenci buněk K562/ABCG2 je možno zvrátit pomocí selektivního inhibitoru ABCG2 transportéru Ko143. Usuzujeme tak z hodnot IC_{50} (Tab. 6) a grafu (Obr. 38), ze kterých je zřejmé, že u buněk K562/ABCG2 po přidavku Ko143 byla obnovena citlivost buněk vůči imatinibu na úroveň kontrolních buněk K562. Pokud bychom chtěli posuzovat, jak

dobrým substrátem testované TKI jsou, porovnali bychom jejich hodnoty IC_{50} u buněk K562-ABCG2/kontrolní buňky K562 (viz. Tab. 5, 6, 7). Tímto srovnáním jsme dospěli k závěru, že nejlepším substrátem ABCG2 transportéru je nilotinib, následuje dasatinib a nejhorším substrátem z testovaných derivátů je imatinib.

Diskuse

Interakcemi TKI a lékových transportérů z ABC rodiny se zabývá celá řada výzkumných skupin. První práce, která poukázala možnost, že TKI by mohly být substráty lékových transportérů, se objevila před více jak deseti lety. Mahon a kol., 2000 zde ukázali, že zvýšená exprese P-gp může být příčinou rezistence leukemických buněk k imatinibu. Brzy nato se ukázalo, že celá řada již klinicky zkoušených TKI je substráty lékových transportérů a že terapeutický efekt těchto léčiv může být nepříznivě ovlivněn (Hegedus a kol., 2002). Další studie ukázaly, že TKI mohou být nejen substráty, ale i inhibitory lékových transportérů (Hegedus a kol., 2009). Publikované práce v této oblasti jsou nicméně rozporuplné. Například Davies a kol., 2009 zjistili, že nilotinib je inhibítoem, ale není substrátem ani ABCB1, ani ABCG2. Dohse a kol., 2010 naopak publikovali, že nilotinib a dasatinib jsou substráty ABCB1 a ABCG2, na druhé straně ale potvrdili, že nilotinib inhibuje ABCB1 i ABCG2.

Vzhledem k rozporuplnosti výsledků na toto téma v literatuře jsme se rozhodli některé výsledky ověřit pomocí semi-kvantitativních metod *in vitro*. V první části diplomové práce jsme se soustředili na otázku, zda-li vybrané TKI mohou skutečně působit jako efektivní inhibitory P-gp použitelné v klinické praxi.

Mezi studované TKI jsme zařadili imatinib, N-desmethylimatinib, nilotinib a dasatinib, které se kromě N-desmethylimatinibu používají pro léčbu CML. N-desmethylimatinib, ačkoliv není přímo TKI, byl studován vzhledem k tomu, že se jeho vlastnosti jako substrátu P-gp výrazně liší od imatinibu (Mlejnek a kol., 2011).

Pro posouzení inhibičního efektu testovaných TKI jsme použili metodu barvení buněk acetoxymethylesterem kalceinu, která byla vyvinuta Homolyou a kol., 1993. Acetoxymethylester kalceinu je substrátem P-gp a díky svým vlastnostem (viz. Materiál a metody) umožňuje měřit relativní aktivitu tohoto transportéru. Naše výsledky ukázaly, že nilotinib je mimořádně účinný inhibitor P-gp. (viz. Obr. 19). Jeho účinky jsou zcela srovnatelné se známými specifickými inhibitory P-gp jako je cyklosporin A, verapamil, valsopodar nebo dokonce zosuquidar (viz. Obr. 13, 14, 15, 16). Tyto výsledky jsou ve shodě s ostatními autory (Davies a kol., 2009, Dohse a kol., 2010). Rovněž imatinib významně inhiboval aktivitu P-gp, jeho účinky však jsou neporovnatelné se specifickými inhibitory P-gp (viz. Obr. 17). N-desmethylimatinib a dasatinib neinhibovaly aktivitu P-gp (viz. Obr. 18 a 20). Na základě těchto výsledků se domníváme, že pouze nilotinib, na rozdíl od imatinibu, N-desmethylimatinibu a dasatinibu, by bylo možné použít jako inhibitor P-gp. Ovšem za předpokladu, že

v koncentračním rozmezí, kde nilotinib inhibuje P-gp, není zároveň cytotoxický. Tyto předpoklady se ovšem nepodařilo naplnit, neboť se ukázalo, že koncentrace nilotinibu vyšší než 1 μ M jsou cytotoxické pro buňky, které neexprimují Bcr-Abl tyrosin kinasu (viz. Obr. 22). Rovněž vysoké koncentrace imatinibu silně inhibovaly proliferaci buněk, které neexprimují Bcr-Abl tyrosin kinasu (viz. Obr. 21). Na základě těchto našich výsledků považujeme za málo pravděpodobné využití nilotinibu jako účinného inhibitoru P-gp v klinické praxi. Zde se názorově lišíme od optimistických předpokladů publikovaných v literatuře (např., Davies a kol., 2009). Naše závěry opíráme o fakt, že použitý metodický přístup je vhodný, neboť jednak potvrdil účinky specifických inhibitorů, jednak ukázal, že s výjimkou zosuquidaru jsou ostatní inhibitory P-gp cytotoxické v koncentračním rozmezí, kde dosahují maximálního inhibičního efektu.

V druhé části diplomové práce jsme se zaměřili na otázku, do jaké míry zvyšuje exprese ABCG2 transportéru rezistenci leukemických buněk k imatinibu, nilotinibu a dasatinibu. Součástí tohoto dílčího cíle byla i selekce vlastních rezistentních buněk pomocí mitoxantronu. V prvním případě byla navozena exprese ABCG2 mitoxantronem v poměrně krátkém časovém horizontu, ale bohužel jsme o tuto linii v důsledku kontaminace přišli. Druhý pokus, který je prezentovaný v této práci, se však lišil. Ani 46-denní působení samotného mitoxantronu nevedlo k masivní expresi ABCG2 v populaci selektovaných buněk (viz. Obr. 28). To se podařilo až pomocí kombinovaného účinku mitoxantronu a nilotinibu (viz. Obr. 30). Klonální selekcí jsme pak získali populaci rezistentních buněk se zvýšenou a homogenní expresí ABCG2 transportéru K562/ABCG2 (viz. Obr. 34). Tyto buňky neměly zvýšenou expresi ABCB1 a ABCC1 (viz. Obr. 35 a 36). Interakce nilotinibu a dasatinibu s ABCB1 a ABCG2 transportéry jsou přiblíženy v článku Hegedus a kol., 2009. Zde se píše mimo jiné o testech toxicity těchto TKI vůči buňky K562, K562/ABCB1 a K562/ABCG2. Z nich vyplývá, že u mateřské linie K562 byl zaznamenán cytotoxický efekt při velmi nízkých koncentracích. Dále se dovídáme také to, že přítomnost funkčního ABCG2 transportéru efektivně chrání buňky před cytotoxickými účinky nilotinibu (jsou až 8,8-krát rezistentnější). Tato zjištění jsou ve shodě s měřeními v praktické části této diplomové práce (viz. Obr. 38). Kromě toho jsme také prokázali, že exprese ABCG2 zvyšuje rezistenci buněk vůči dasatinibu asi 6-krát (viz. Obr. 39) a vůči imatinibu asi 2,1-krát (viz. Obr. 37). Rovněž se podařilo navrátit rezistenci buněk K562/ABCG2 k nilotinibu pomocí selektivního inhibitoru Ko143, čímž bylo dokázáno, že rezistence

byla způsobena pouze zvýšenou expresí ABCG2 transportéru (nikoli ABCB1 nebo ABCC1, (viz. Obr. 38).

7. Závěr

1. Bylo zjištěno, že nilotinib je mimořádně účinný inhibitor P-gp. Jeho účinky jsou dokonce zcela srovnatelné se známými specifickými inhibitory P-gp jako je cyklosporin A nebo zosuquidar.
2. Velmi malý, avšak měřitelný inhibiční účinek aktivity P-gp byl nalezen také u imatinibu. N-desmethylimatinib a dasatinib neinhibovaly aktivitu P-gp.
3. Použití nilotinibu jako inhibitoru P-gp v klinické praxi je však málo pravděpodobné, protože v koncentračním rozmezí, kde účinně inhibuje aktivitu P-gp je současně cytotoxický.
4. Bylo ověřeno, že použitý metodický přístup je vhodný, neboť jednak potvrdil účinky specifických inhibitorů, jednak ukázal, že s výjimkou zosuquidaru jsou ostatní inhibitory P-gp cytotoxické v koncentračním rozmezí, kde dosahují maximálního inhibičního efektu.
5. Pomocí kombinovaného účinku mitoxantronu a nilotinibu se podařilo selektovat rezistentní buňky se zvýšenou expresí ABCG2 transportéru K562/ABCG2.
6. Bylo zjištěno, že selektované buňky K562/ABCG2 jsou nejvíce rezistentní vůči imatinibu, méně vůči nilotinibu a nejméně vůči dasatinibu. Zároveň bylo zjištěno, že rezistenci vůči nilotinibu je možné zvrátit selektivním inhibitorem ABCG2 transportéru.
7. Potvrdilo se, že z testovaných TKI je nejlepším substrátem ABCG2 transportéru nilotinib, následuje dasatinib a nejslabším substrátem je pak imatinib.

8. Seznam použitých zkratk

ABC – p	ABC transportér v placentě
ABC	ATP - binding cassette
Abi 1, 2	Abelson interacting protein 1, 2
<i>ABL</i>	homolog ptačího Abelsonova viru – gen
Abl	homolog ptačího Abelsonova viru – protein
AGP	acid glycoprotein
AM	acetoxymethylester
ATP	adenosintrifosfát
Bap-1	Bcr associated protein 1
Bcl - 2	B – cell leukemia/lymphoma 2
<i>BCR</i>	breakpoint cluster region – gen
Bcr	breakpoint cluster region – protein
CaLB	calcium - dependent lipid binding doména
CML	chronická myeloidní leukémie
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPH	kinasy ephrinového receptoru
FADD	FAS-associated death domain protein
Fak	focal adhesion kinase
FBS	fetální bovinní sérum
Flice	FADD - like interleukin – 1 beta converting enzyme
FLIP	Flice inhibiční protein
FMO – 3	flavin – obsahující monooxidasa
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanine nucleotide exchange factor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GST – p	p – isoforma glutathion – S – transferasy
GTP	guanosintrifosfát

HHT	homoharringtonin
Jak	Janus protein tyrosine kinase
MDR	multidrug resistance
MDR1	multidrug resistance protein 1
mRNA	mediátorová RNA
MRP	multidrug associated protein
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MXR	mitoxantrone – resistance protein
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBD	nucleotide binding domain
NF-κB	nuclear factor kappa B
NOR	Národní onkologický registr
OCT1	organic cation transporter 1
OD ₅₇₀	optická hustota při 570 nm
PBS	phosphate buffered saline
PDGFR	platelet – derived growth factor receptor
P-gp	P – glykoprotein
PI(3)K	phosphatidylinositol – 3 – kinase
PTB1B	protein tyrosine phosphatase 1B
RNA	rinonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SFK	Src family kinases
SH1 – SH3	Src (Sarcoma) homologní domény
Src	cellular Rous sarcoma viral oncogene homolog
Stat	signal transducer and activation of transcription
Syp	synaptophysin
TK	tyrosinové kinasy, tyrosinkinasy
TKI	tyrosinkinasové inhibitory
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

9. Literatura

AGRAWAL, Mettu a kol. Tyrosine Kinase Inhibitors: The first Decade. *Curr Hematol Malig Rep.* 2010, vol.5, s. 70-80.

AN, Xin a kol. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research.* 2010, vol.34, s. 1255-1268.

ARORA, Amit a M. SCHOLAR. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE.* 2005, vol.315, no.3, s. 971-979.

BARNES, David J. a Junia V. MELO. Cytogenetic and Molecular Genetic Aspects of Chronic Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol.* 2002.

BORNHÄUSER, Martin a kol. Elimination of Imatinib Mesylate and Its Metabolite N-Desmethylimatinib. *Journal of Clinical Oncology.* 2005, vol.23.

BRAUN, T. a kol. Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. *Nature.* 2006, vol.06.

CORSO, A. a kol. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation - a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol.* 1995.

DARZYŃKIEWITCZ, Z. a kol. Features of apoptotic cells measured by flow-cytometry. *Cytometry* 13. 1992, s. 795-808.

DEININGER, Michael W.N. a kol. The molecular biology of chronic leukemia. *Blood.* 2000, vol.96, no. 10.

DEVIES, A. a kol. Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34+ chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia.* 2009, vol.23.

DOHSE, M. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab. Dispos.* 2010, vol.38, s. 1371-1380.

FABER, Edgar a kol. *Chronická myeloidní leukémie.* Praha: Galén, 2010, 234 s. ISBN 978-80-7262-680-9.

GOTTESMAN, Michael M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Reviews.* 2002, vol.53, s. 615-627.

GOTTESMAN, Michael M. a kol. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transport. *Macmillan Magazines Ltd.* 2002, vol.12.

HEGEDŰS, C. a kol. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British Journal of Pharmacology.* 2009, vol.158, s. 1153-1164.

HEGEDUS, T. a kol. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1587. 2002, s. 318-325.

HEGEDÜS, Tamás a kol. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587. 2002, s. 318-325.

JOHNSON, L.N. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys.* 2009.

KLENER, Pavel a Pavel KLENER JR. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010, 232 s. ISBN 978-80-247-2808-7.

LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2008, vol.65.

LING, V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997, vol.40, s. 3-8.

LUGO, T.G. a kol. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990.

MAHON, F.X. a kol. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanism of resistance. *Blood.* 2000, vol.96.

MLEJNEK, Petr a kol. Interactions of N-desmethylinatinib, an active metabolite of imatinib, with P-glycoprotein in human leukemia cells. *Ann. Hematol.* 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methodes.* 1983, vol.65, s. 55-63.

NOSKOVÁ, V. a kol. Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie.* 2000, č. 2, s. 4-9.

NOWELL, P.C. A minute chromosome in human chronic granulocytic. *Science.* 1960.

ÖVEGY-LACZKA, Csilla a kol.. High-Affinity interaction of Tytosine Kinase Inhibitors with the ABCG2 Multidrug Transporter. *Molecular Pharmacology.* 2004, vol.65, no.6, s. 1485-1495.

PROTIVÁNKOVÁ, Markéta a Jiří VORLÍČEK. Chronická myeloidní leukemie. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 25 s. ISBN 978-80-210-4534-7.

RICHARDSON, C a M JASIN. Frequent chromosomal translocation induced by DNA doublestrand breaks. *Nature.* 2000.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973.

S. KRAUSE, Daniela a kol. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE. 2005, vol.353, s. 172-187.

SHET, A.S. a C.M. VERFAILLIE. Chronical Myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. Leukemia. 2002, vol.16, s. 1402-1411.

SCHINKEL, Alfred H. a Johan W. JONKER. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Elsevir Science B.V. 2002.

THOMAS, H. a H.M. COLEY. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. Cancer Control. 2003, vol.10, s. 159-165.

VAN ERP, Nielka P. a kol. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. Cancer Treatment Reviews. 2009, no.35, s. 692-706.

