

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav biologie



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Exprese ABCB1 a rezistence leukemických buněk

Mgr. Petr Kosztyu

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 20. 10. 2014

Rád bych zde poděkoval především svému školiteli Doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi v průběhu celého doktorského studia poskytl. Dále bych rád poděkoval také všem kolegům z Ústavu biologie LF UP, především RNDr. Petru Doleželovi, CSc. V neposlední řadě chci poděkovat Báře Kosztyu (rozené Dvořákové) a celé své rodině.

Obsah

1. Obecný úvod	1 -
2. Chronická myeloidní leukemie	3 -
2.1. Obecná charakteristika	3 -
2.2. Vývoj nemoci	4 -
2.3. Molekulární podstata chronické myeloidní leukemie	6 -
2.3.1. <i>c-ABL</i> gen a protein.....	6 -
2.3.2. <i>BCR</i> gen a protein	8 -
2.3.3. <i>BCR-ABL1</i> gen	9 -
2.3.4. Struktura proteinu Bcr-Abl	10 -
2.3.5. Signální dráhy	11 -
2.3.5.1. Bcr-Abl a Ras	12 -
2.3.5.2. Bcr-Abl a PI-3K	12 -
2.3.5.3. Bcr-Abl a JAK/STAT	13 -
2.3.5.4. Bcr-Abl a změna adheze	14 -
2.4. Léčba chronické myeloidní leukemie.....	14 -
2.4.1. Inhibitory tyrosinových kinas	16 -
2.4.1.1. První generace TKI	17 -
2.4.1.1.1. Imatinib	17 -
2.4.1.1.2. Rezistence na imatinib	19 -
2.4.1.1.2.1. Bcr-Abl-závislé mechanismy rezistence	20 -
2.4.1.1.2.1.1. Mutace Bcr-Abl.....	20 -
2.4.1.1.2.1.2. Amplifikace <i>BCR-ABL1</i> a zvýšená exprese Bcr-Abl.....	22 -
2.4.1.1.2.2. Bcr-Abl nezávislé mechanismy rezistence.....	22 -
2.4.1.1.2.2.1. Lékové transportéry	22 -
2.4.1.2. Druhá generace TKI.....	23 -
2.4.1.2.1. Nilotinib	23 -
2.4.1.2.2. Dasatinib	25 -
2.4.1.3. Třetí generace TKI	27 -
3. Mnohočetná léková rezistence	29 -
3.1. Mechanismy vzniku MDR	29 -
3.1.1. ABC transportéry	32 -

3.1.1.1.	ABCB1	- 36 -
3.1.1.1.1.	Mechanismus transportu	- 39 -
3.1.1.1.2.	Substráty ABCB1	- 42 -
3.1.1.1.3.	Inhibitory ABCB1	- 44 -
3.1.1.1.3.1.	První generace inhibitorů ABCB1	- 45 -
3.1.1.1.3.2.	Druhá generace inhibitorů ABCB1	- 46 -
3.1.1.1.3.3.	Třetí generace inhibitorů ABCB1	- 47 -
3.1.1.1.3.4.	Inhibitory tyrosinových kinas inhibující ABCB1	- 49 -
3.1.1.2.	ABCG2.....	- 49 -
3.1.1.3.	ABCC1	- 51 -
4.	Cíle dizertační práce	- 53 -
5.	Metodické postupy	- 54 -
6.	Výsledky	- 60 -
6.1.	Vztah mezi expresí ABCB1 a pozorovanou rezistencí leukemických buněk	- 60 -
6.2.	Stanovení exprese genu ABCB1 a odhad funkce in vitro.....	- 91 -
6.3.	Inhibice ABCB1 vybranými tyrosin kinasovými inhibitory.....	- 100 -
7.	Shrnutí.....	- 113 -
8.	Summary	- 116 -
9.	Seznam použité literatury.....	- 119 -
10.	Seznam použitých zkratk.....	- 134 -
11.	Seznam publikací a posterů	- 137 -
11.1.	Práce související s dizertační prací	- 137 -
11.2.	Ostatní publikace.....	- 138 -

1. Obecný úvod

Chemoterapie představuje v onkologii jednu z léčebných metod, jejíž hlavním cílem je zasáhnout a zničit nádorové buňky bez výrazného poškození okolní zdravé tkáně. Konvenční cytostatika používaná již několik desetiletí nejsou specifická vůči nádorovým buňkám, tzn., že nerozlišují mezi nádorovými buňkami a rychle se dělícími zdravými buňkami. To vede u pacientů k vážným vedlejším účinkům. Navíc jsou nádorové buňky schopny odolat jejich cytotoxickému působení. Snížení citlivosti nádorových buněk a vznik rezistence představuje stále významnou překážku k úspěšnému vyléčení celé řady nádorových onemocnění. Při ztrátě citlivosti na jedno cytostatikum může být stále zachována citlivost nádorové buňky na cytostatikum s jinou strukturou nebo mechanismem působení. Často ovšem není účinná ani aplikace léčiva, které se od původně použitého léčiva liší strukturou a mechanismem působení. V tomto případě tak mluvíme o mnohočetné lékové rezistenci. Výzkum molekulárních mechanismů zodpovědných za vznik mnohočetné lékové rezistence šel dopředu ruku v ruce s vývojem metod buněčné a molekulární biologie, biochemie či genetiky.

Vzhledem k výše uvedeným nedostatkům konvenčních cytostatik byla snaha vyvinout cílená léčiva, která by specificky zasahovala pouze nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně, s minimálními vedlejšími účinky. Vývoj cílených léčiv šel dopředu spolu s poznáním, jak probíhá transformace normální buňky v nádorovou. Mezi dva hlavní typy cílené léčby můžeme zařadit monoklonální protilátky proti povrchovým receptorům a nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas. Oba dva typy cílené léčby se v posledních dvou až třech dekádách dostávají do klinické praxe jako léčiva proti mnoha typům nádorových onemocnění, ačkoliv konvenční chemoterapie stále představuje u řady malignit jedinou možnost léčby.

Vývoj jak monoklonálních protilátek, tak inhibitorů tyrosinových kinas neprobíhal hladce a musel se vypořádat s řadou překážek. U inhibitorů tyrosinových kinas zpočátku vyvstala otázka, zda bude možné selektivně inhibovat různé kinasy, vzhledem k tomu, že se při inhibici využívalo vazby inhibitoru do určité konzervované domény těchto kinas. Tento problém byl brzy překonán a dnes je již k dispozici velké množství inhibitorů proti řadě tyrosinových kinas, které představují vysoce selektivní léčiva. V porovnání s konvenční chemoterapií přinesla aplikace

tyrosinových kinas významné prodloužení života pacientů s určitými typy nádorů. Jsou také méně toxická a obecně lépe snášena, což má pozitivní vliv také na kvalitu života. Navíc poskytují možnost léčby pro pacienty, u kterých by konvenční chemoterapie nemohla být nasazena.

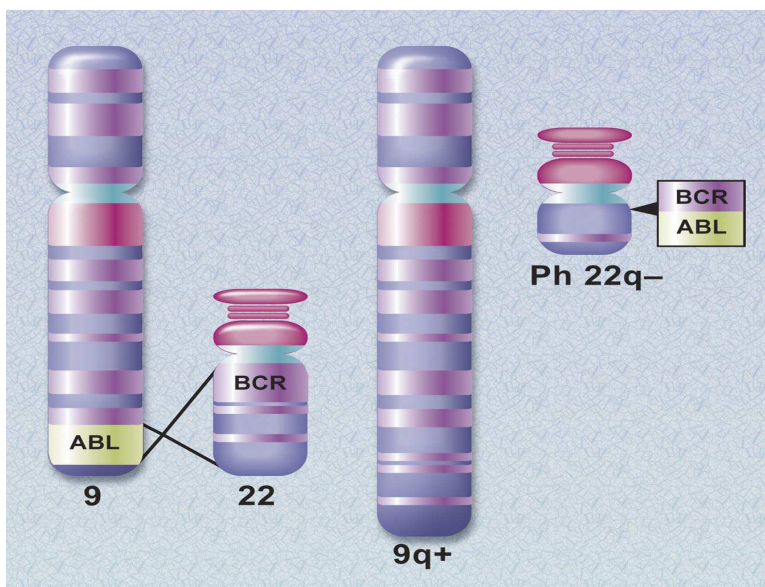
Nicméně ani cílená léčiva nejsou bez nedostatků. Přestože jsou dobře snášena, část pacientů je není schopna tolerovat a musí se zvolit jiná možnost léčby. Vzhledem k tomu, že jsou cílená léčiva specifická vůči molekulárním cílům charakteristických pro určitý nádor, bez jeho přítomnosti v daném nádoru nejsou účinná. Je proto nutné zjistit, zda se daný molekulární cíl v nádoru vyskytuje. Oproti konvenční chemoterapii se u cílených léčiv musí nově řešit také otázka dávkování a hodnocení efektivity. Důležitým aspektem aplikace cílených léčiv je jejich cena, která je v porovnání s konvenční chemoterapií mnohonásobně vyšší a dosahuje i několika desítek tisíc dolarů za měsíc léčby.

Významným problémem cílených léčiv je také schopnost nádorových buněk vůči nim vyvinout rezistenci a obejít tak jejich cytotoxické působení. Proto je potřeba stále vyvíjet nová léčiva s lepšími vlastnostmi, u kterých by nádorová buňka měla jen minimální možnost vyvinout rezistenci. Jsou proto vyvíjeny stále nové sloučeniny ať již modifikací stávajících léčiv nebo s novou strukturou, která by výše popsané problémy překonala.

2. Chronická myeloidní leukemie

2.1. Obecná charakteristika

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění hematopoetických kmenových buněk. Poprvé byla popsána v roce 1845 dvěma na sobě nezávislými patology: Rudolfem Virchowem a Johnem Hughesem Bennettem. Sám Virchow ale uznal, že první případ leukemie byl pozorován právě dr. Bennettem (Bennett, 1845; Virchow, 1845). Od té doby se CML stala jednou z nejvíce studovaných lidských malignit. Byla prvním nádorovým onemocněním, u kterého bylo dokázáno, že je jeho vznik spojen s určitou chromozomální abnormalitou. Tu v roce 1960 popsali Peter Nowell a David Hungerford ve Filadelfii. Zjistili, že pro pacienty s CML je charakteristický akrocentrický chromozom, tzv. Filadelfský chromozom (Ph chromozom), který považovali za chromozomální delecii (Nowell a Hungerford, 1960). Později s rozvojem cytologických technik bylo dokázáno, že jde o balancovanou chromozomální reciprokou translokaci mezi dlouhými raménky chromozomu 9 a 22 $t(9:22)(q39;q11)$ (Rowley, 1973), následkem čehož dojde na molekulární úrovni ke spojení genu *BCR* lokalizovaného na chromozomu 22 a genu *ABL1* na chromozomu 9 a následně ke vzniku fúzního onkogenu *BCR-ABL1* (obr. 1; Shtivelman et al., 1985). Produktem fúzního genu je pak onkogenní kinasa Bcr-Abl, jejíž deregulovaná aktivita je zodpovědná za vznik a rozvoj onemocnění (Lugo et al., 1990). Bcr-Abl kinasa se proto stala ideálním cílem pro léčiva specificky inhibující její aktivitu a potlačující tak její transformační účinky (Druker et al., 1996).



Obr. 1: Vznik Ph chromozomu. Translokací mezi chromozomy 9 a 22 dojde ke spojení genů *ABL1* a *BCR* a ke vzniku fúzního onkogenu *BCR-ABL1*, který dává vznik fúzní kinase Bcr-Abl (převzato z Druker, 2008).

2.2. Vývoj nemoci

Vzhledem k tomu, že počáteční fáze CML je často asymptomatická, je až polovina pacientů diagnostikována náhodou na základě změn v krevním obrazu, kdy je pozorován zvýšený počet bílých krvinek a krevních destiček a snížený počet červených krvinek. Většina typických příznaků je následkem anémie a splenomegalie. Patří sem zejména únava, úbytek váhy, nevolnost či malátnost (Sawyers, 1999).

Onemocnění prochází 3 fázemi – chronickou, ekcelerovanou a blastickou. Chronická fáze je počáteční a zpravidla nejdelší fází trvající několik měsíců až let. V této fázi pacienti většinou dobře reagují na léčbu, mají stabilní klinický obraz s počtem blastů (nezralé myeloidní buňky) v periferní krvi nebo dřeni pod 10 %. Akcelerovaná fáze trvá 1 až 1,5 roku a dochází ke zhoršení odpovědi pacienta na léčbu, je proto nutné zvýšit dávky. Počet blastů se pohybuje v rozmezí 10-30 %. V blastické fázi se vyvíjí rezistence na léčbu, klinický obraz je podobný akutní myeloidní leukemii. Počet blastů přesahuje 30 %. Prognóza v této fázi je extrémně špatná, přežití pacientů je v řádech měsíců (Cortes et al., 2006).

Progres nemoci z chronické fáze do blastické je velmi složitý proces, který není do dnešních dnů ještě zcela pochopen. Je spojen s akumulací genetických abnormalit, které zahrnují přítomnost dodatečných chromozomů, genové delece,

inzerce nebo bodové mutace. Na molekulární úrovni dochází k inaktivaci nádorových supresorů, aktivaci onkogenů, zvýšení exprese Bcr-Abl nebo změnám opravy DNA. Jelikož se žádná z genetických abnormalit nevyskytuje u většiny pacientů, ač jsou některé relativně časté, je pravděpodobné, že progresse do blastické fáze je následkem kritického množství a určité kombinace genetických změn (Perrotti et al., 2010).

Blastická fáze je charakteristická blokem diferenciací hematopoetických buněk, který je způsoben abnormalitami transkripčních faktorů účastnících se tohoto procesu. Transkripční faktor *C/EBP α* (CCAAT/enhancer-binding protein α) je protein nepostradatelný v procesu diferenciací granulocytů. Přímým sekvenováním DNA leukemických buněk pacientů v chronické a blastické fázi nebyla objevena žádná mutace kódující oblasti genu *C/EBP α* (Pabst et al., 2006). Hladina mRNA genu *C/EBP α* zůstala v blastické fázi nezměněna v porovnání s chronickou fází. Byl ale zaznamenán významný rozdíl v hladině proteinu *C/EBP α* . V porovnání s chronickou fází byla exprese proteinu v blastické fázi sotva detekovatelná. Příčinou potlačené exprese *C/EBP α* je inhibice translace způsobená stabilizací jaderného ribonukleoproteinu hnRNP-E2, která je závislá na Bcr-Abl-zprostředkované aktivaci mitogenem-aktivované protein kinasové dráhy (MAPK; Chang et al., 2007).

Genomová nestabilita charakteristická pro blastickou fázi CML vychází obvykle z deregulovaného procesu odpovědi buňky na poškození DNA, který může být závislý či nezávislý na Bcr-Abl.

Klíčovou roli, nejen při vzniku ale také progresi nemoci, hraje neregulovaná exprese a aktivita Bcr-Abl. Blastická fáze je spojována se zvýšenou hladinou jak mRNA, tak proteinu Bcr-Abl (Barnes et al., 2005a; Guo et al., 1991). Zvýšená exprese Bcr-Abl vede k nadměrné produkci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS), které způsobují poškození DNA zahrnující dvouvláknové zlomy. Přesný mechanismus zvýšené hladiny ROS není jasný, předpokládá se vliv NADPH oxidasy (nikotinamid dinukleotid fosfát) nebo zvýšeného příjmu glukózy (Nowicki et al., 2004). V buňkách CML jsou dráhy opravující dvouvláknové zlomy (homologní rekombinace a nehomologní spojení konců) poškozeny. Kinasa Bcr-Abl ovlivňuje expresi a aktivitu proteinů, které jsou nezbytné pro tyto procesy. Tímto se kinasa podílí nejen na přímém poškození DNA, ale také na narušené opravě. Exprese Bcr-Abl má za následek snížení hladiny DNA-PK (DNA-dependentní protein kinas), klíčového proteinu v procesu

nehomologního spojení konců. Toto snížení hladiny je závislé na tyrosinkinasové aktivitě Bcr-Abl a proteosomální degradaci (Deutsch et al., 2001). Homologní rekombinace je narušena snížením hladiny proteinu BRCA1 (breast cancer 1), který je kritickým proteinem v procesu homologní rekombinace (Deutsch et al., 2003). Další protein důležitý pro opravu DNA, který je ovlivněný Bcr-Abl, je ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). Následkem poškození DNA se Bcr-Abl rychle translokuje do jádra, kde interaguje s ATR a inhibuje tak fosforylaci Chk1 (checkpoint kinase 1), čímž je narušen S-fázový kontrolní bod (Dierov et al., 2004).

Genomová nestabilita vede ke vzniku řady cytogenetických a molekulárních změn vyskytujících se u většiny pacientů procházejících blastickou fází. Chromozomální aberace zahrnují trisomii 8 chromozomu, vznik dalšího Ph chromozomu, isochromozom 17, trisomii 19 chromozomu, ztrátu Y chromozomu, trisomii 21 chromozomu nebo monosomii 7 chromozomu (Mitelman, 1993). Na molekulární úrovni dochází k inaktivaci nádorových supresorů a aktivaci onkogenů. Z nádorových supresorů je často postižen protein p53. Mechanismy ztráty jeho funkce zahrnují jak změny DNA (bodové mutace, delece), tak také proces tvorby proteinu (potlačení exprese, posttranslační modifikace; Slingerland et al., 1991). Dalším nádorovým supresorem, mutovaným během blastické fáze, je retinoblastomový protein (pRb), který hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu (Towatari et al., 1991). Z onkogenů vykazuje zvýšenou expresi např. c-myc (Handa et al., 1997).

2.3. Molekulární podstata chronické myeloidní leukemie

2.3.1. *c-ABL* gen a protein

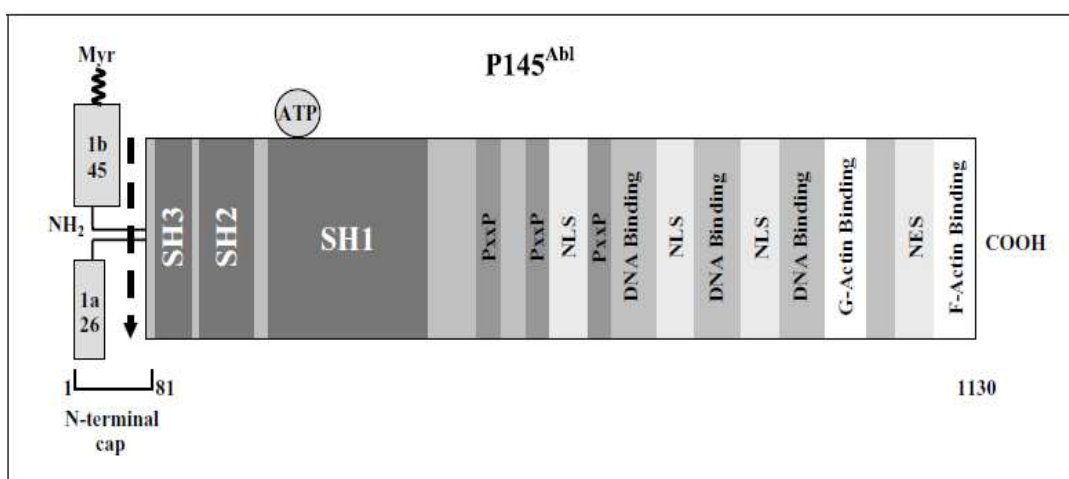
Lidský *c-ABL* gen se nachází na chromozomu 9 v oblasti 9q34 a zaujímá velikost 300 kb. Jeho jméno je odvozeno od Abelsonova viru obsahujícího virový onkogen *v-ABL*, který je zodpovědný za vznik leukemie u myší, a se kterým vykazuje nukleotidovou sekvenční homologii (Abelson a Rabstein, 1970). Gen obsahuje 2 alternativní první exony, 1a a 1b, a dále exony 2 až 11. Alternativní splicing využívající exony 1a nebo 1b má za následek vznik 2 transkriptů o velikosti 6 kb a 7 kb, jejichž proteinové produkty dosahují velikosti 145 kDa (Chisoe et al., 1995).

Protein Abl patří do rodiny nerekceptorových tyrosinových kinas. Je lokalizován jak v cytoplazmě, tak v jádře, kde se váže na chromatin (van Etten et al., 1989). Na obou isoformách proteinu bylo identifikováno několik odlišných domén (obr. 2). Na N-koncové části se nacházejí 3 src homologní domény (SH domény)-SH1, SH2 a SH3. SH1 doména je zodpovědná za tyrosinkinasovou aktivitu proteinu, a je tak klíčovou doménou pro onkogenní transformaci (Konopka et al., 1984). Sousední SH2 a SH3 domény se účastní protein-proteinových interakcí a regulují kinasovou aktivitu proteinu. SH2 doména se váže na fosforylované tyrosiny proteinových partnerů, SH3 na prolin-bohaté oblasti (Mayer a Baltimore, 1994). Pokud je při transkripci proteinu přepsán alternativní exon 1b, pak má výsledný protein na N-terminálním konci zařazen myristoylovaný glycin, který asociuje s plazmatickou membránou (Jackson a Baltimore, 1989) a má důležitou regulační funkci (Nagar et al., 2003). V centrální části proteinu se nachází 3 oblasti bohaté na prolin, které zajišťují interakci Abl s SH3 doménami vazebných partnerů, např. proteiny Crk (CT10 regulator of kinase) či Crkl (crk-like), což jsou adaptorové proteiny přenášející signál z Bcr-Abl (Sattler et al., 1996). Na C-terminálním konci proteinu se nacházejí 3 jaderné lokalizační signály, jaderný exportní signál, DNA-vazebná doména a aktin-vázající doména (Taagepera et al., 1998; Miao a Wang, 1996; McWhirter a Wang, 1993).

Kinasa Abl hraje důležitou roli v signálních drahách aktivovaných poškozením DNA, regulaci buněčného cyklu nebo adhezi. V neproliferujících buňkách zastavených v G₀ fázi je jaderný Abl inaktivován vazbou na pRb. Fosforylací pRb v G₁/S fázi buněčného cyklu se vazba s Abl rozruší, což vede k uvolnění Abl v jádře v průběhu S fáze, během které Abl stimuluje transkripční aktivitu řady faktorů a podporuje aktivitu RNA polymerasy II (Welch a Wang, 1995). Vedle aktivace buněčného cyklu může mít Abl také negativní vliv na buněčný cyklus. Následkem poškození DNA dochází k aktivaci Abl, který následně aktivuje p53 (Shafman et al., 1997).

Kinasová aktivita Abl je za normálních okolností přísně regulována celou řadou intramolekulárních interakcí mezi kinasovou doménou, SH2 a SH3 doménami. SH3 doména vytváří interakci se spojníkem mezi SH2 a kinasovou doménou, přičemž rozrušení této interakce aktivuje kinasovou aktivitu Abl (Barilá a Superti-Furga, 1998). SH2 doména interaguje s C-terminální smyčkou kinasové domény, čímž také inhibuje kinasovou aktivitu Abl. Pro tuto interakci je nezbytně

nutná kooperace další důležité regulační části proteinu Abl – myristoylované N-terminální čepičky, která se musí vázat do hydrofóbní kapsy C-smyčky, čímž se tato smyčka ohne a umožní interakci s SH2 doménou. Tím se protein dostává do autoinhibované konformace (Nagar et al., 2003). Aktivita proteinu je dále ovlivněna fosforylací a interakcí s vazebnými partnery. Fosforylace na tyrosinech v aktivační smyčce i mimo ni přispívá k aktivaci proteinu, pravděpodobně rozrušením negativních intramolekulárních interakcí (Barilá a Superti-Furga, 1998).



Obr. 2: Struktura proteinu Abl. Na N-terminálním konci se nacházejí tři Src homologní domény (SH1, SH2 a SH3), v centrální části oblasti bohaté na prolin (PxxP) a na C-terminálním konci DNA-vazebné a aktin-vázající domény, jaderná lokalizační (NLS) a jaderný exportní signál (NES ; převzato z Barnes a Melo, 2002).

2.3.2. BCR gen a protein

Gen *BCR* (breakpoint cluster region) nacházející se na chromozomu 22 v oblasti 22q11 zaujímá velikost 130 kb a obsahuje 25 exonů, přičemž jak exon 1, tak exon 2 mají každý jeden alternativní exon e1' a e2' (Chisoe et al., 1995). Na proteinu Bcr o velikost 160 kDa bylo identifikováno několik významných domén (obr. 3). Na N-terminálním konci proteinu se nachází oligomerizační doména složená z jednoho delšího a jednoho kratšího α -helixu a smyčky, která oba helixy spojuje (McWhirter et al., 1993), doména se serin/threonin kinasovou aktivitou (Muller et al., 1991) a doména vázající se na SH2 doménu proteinových partnerů, např. proteinu Abl (Pendergast et al., 1991). Na pozici 177 se nachází tyrosin, který může být fosforylovaný, a protein tak získává afinitu k adaptorovému proteinu Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), který spojuje Bcr protein s Ras

(rat sarcoma) signální drahou (Ma et al., 1997). Centrální část proteinu obsahuje oblast homologie s Rho guanine-nucleotide exchange factor (Chuang et al., 1995), oblast účastnící se Ca-dependentní vazby na lipidy (Hart et al., 1991). Na C-terminálním konci byl identifikován region s GTPasovou aktivitou pro protein Rac (Diekmann et al., 1991).



Obr. 3: Struktura proteinu Bcr. Protein obsahuje oligomerizační a SH2 vázající domény, doménu s Ser/Thr kinasovou aktivitou a oblast homologie s Rho guanine-nucleotide exchange factor (Rho-GEF), oblast účastnící se Ca-dependentní vazby na lipidy (CaLB) a oblast s GTPasovou aktivitou pro protein Rac (Rac-GAP; převzato ze Smith et al., 2003).

2.3.3. *BCR-ABL1* gen

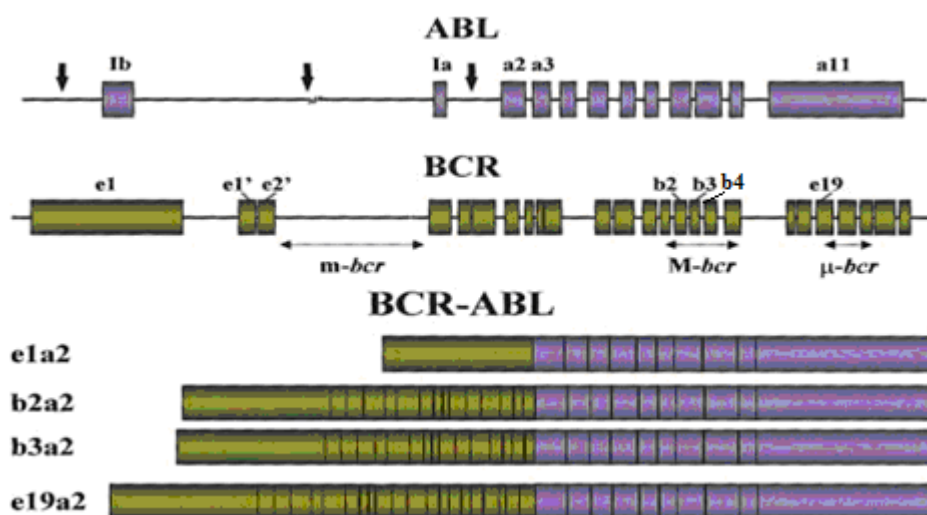
Fúzní gen *BCR-ABL1* vzniká chromozomální balancovanou reciprokou translokací mezi chromozomem 9, kde se nachází gen *ABL1*, a chromozomem 22 s genem *BCR*. Ke zlomu na genu *ABL1* může dojít kdekoliv v úseku o velikosti 300 kb na 5' konci. Nejčastějšími místy zlomů jsou introny před 1b exonem, mezi exony 1a a 1b a dále mezi exony 1a a 2 (obr. 4) Výsledný fúzní gen poté může obsahovat exony 1a i 1b, pouze 1a nebo ani jeden z těchto exonů. Bez ohledu na místo zlomu je primární mRNA sestřížena tak, že se k exonu a2 genu *ABL1* fúzuje gen *BCR* (Melo et al., 1993).

U genu *BCR* může dojít ke zlomu ve třech oblastech (obr. 4). Nejčastěji jsou zlomy soustředěny do střední (centrální) části genu, na místo zvané major breakpoint cluster region (M-bcr) o velikosti 5,8 kb, kde se nachází 5 exonů (e12-e16, původním značením b1-b5). Dojde-li ke zlomu mezi exony b2 a b3 nebo b3 a b4, pak se tato místa spojí s exonem 2 genu *ABL1*, a mohou tak vznikat 2 varianty fúzního genu - b2a2 nebo b3a2. Obě dávají vznik fúznímu proteinu o velikosti 210 kDa nazvaného p210^{Bcr-Abl} (Chisoe et al., 1995).

Druhá oblast postižena zlomy se nachází mezi exony e2 a e2' (minor breakpoint cluster region – m-bcr) a zaujímá velikost 54,4 kb. Výsledný fúzní gen obsahuje exony e1, e1' a e2. Primární transkript vznikající z tohoto fúzního genu ale podléhá sestřihu, při kterém je z mRNA odštěpen exon e1' a e2. Exon e1 genu *BCR*

je připojen k exonu 2 genu *ABL1*, čímž vzniká varianta e1a2. Výsledný proteinový produkt má velikost 190 kDa a je označen p190^{Bcr-Abl} (Hermans et al., 1987).

Třetí region, kde může docházet ke zlomům, je tzv. micro breakpoint cluster region (μ -bcr) nacházející se na 3' konci genu mezi exony e19 a e20. Transkripce pak vzniká transkript e19a2, ze kterého je syntetizován protein o velikosti 230 kDa – p230^{Bcr-Abl} (Saglio et al., 1990).



Obr. 4: Místa zlomů na genech *BCR* a *ABL1* a výsledná forma fúzního genu. Na genu *ABL1* může dojít ke zlomu před exonem 1b, mezi exony 1b a 1a nebo mezi exony 1a a a2. Na genu *BCR* se může zlom nacházet ve 3 oblastech – mezi exony b2 a b3 nebo b3 a b4 (M-bcr oblast), mezi exony e2 a 2' (m-bcr oblast) nebo mezi exony e19 a e20 (μ -bcr oblast; převzato z Deininger et al., 2000).

2.3.4. Struktura proteinu Bcr-Abl

Velikost proteinu a přítomnost různých domén proteinu závisí na tom, zda se místo zlomu genu *BCR* nachází v regionu M-bcr, m-bcr nebo μ -bcr.

p190^{Bcr-Abl} je nejmenší variantou proteinu Bcr-Abl. Protein je charakteristický pro akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), u chronické myeloidní leukemie je vzácný. Jelikož z genu *BCR* je v tomto fúzním genu zastoupen pouze exon 1, protein Bcr je tvořen jen oligomerizační doménou, serin/threonin kinásovou doménou, SH2 doménou a Gbr2 vazebním místem na fosfoTyr177 (Kurzrock et al., 1987).

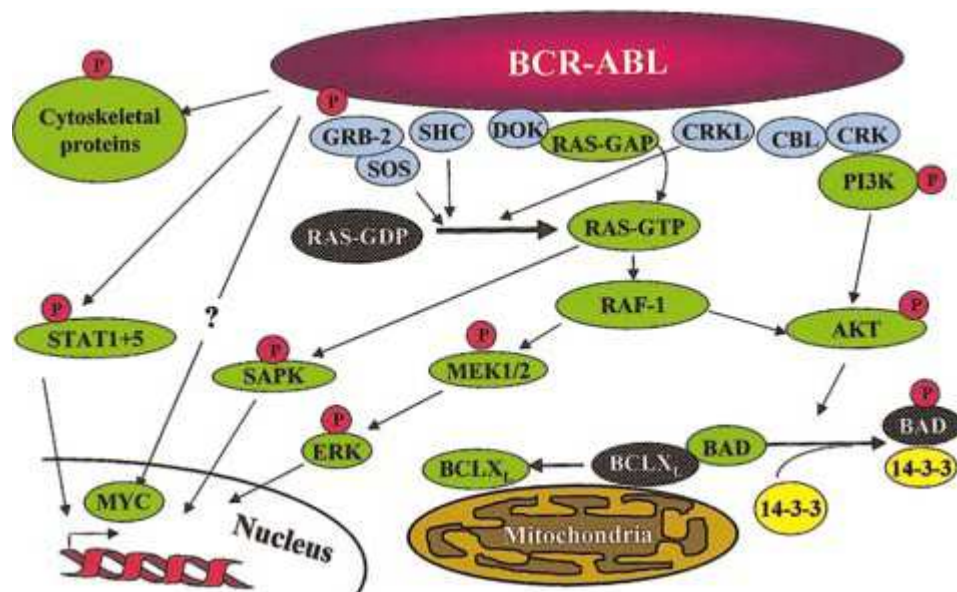
Nejčastější verze proteinu Bcr-Abl, p210^{Bcr-Abl}, je spojena s klasickou chronickou myeloidní leukémií. Fúzní gen vzniká ze zlomu genu *BCR* v regionu M-bcr. Jak již bylo zmíněno výše, fúzní onkoprotein p210 může být kódován dvěma variantami fúzního genu – b2a2 nebo b3a2. Protein kódovaný variantou b3a2 je o 25 aminokyselin větší. Kromě domén kódovaných exonem 1 obsahuje p210 také doménu GEF-Rho (Hart et al., 1991).

Největší protein kódovaný fúzním genem *BCR-ABL1* je p230^{Bcr-Abl}. Struktura je téměř identická s p210, obsahuje navíc ještě CaLB doménu a jednu třetinu domény Rac-GAP. Tato verze proteinu se vyskytuje převážně u chronické neutrofilní leukemie a trombocytosy (Pane et al., 1996).

2.3.5. Signální dráhy

Bcr-Abl kinasa je lokalizována v cytoplazmě, kde interaguje s celou řadou vazebných partnerů a substrátů. Její onkoogenní účinek není způsoben deregulací jen jedné signální dráhy, ale celé řady signálních drah, které jsou zapojeny v nejrůznějších procesech (obr. 5). Byly identifikovány tři hlavní mechanismy, kterými Bcr-Abl způsobuje maligní transformaci. Patří sem trvale aktivní mitogenní signalizace, deregulace apoptózy a změněná adheze ke stromálním buňkám a extracelulární matrix (Melo et al., 2003).

Mezi celou řadou funkčních domén nacházejících se na Bcr-Abl kinase byly identifikovány dvě na Bcr části, které jsou klíčové pro transformační účinek celého proteinu. První je oligomerizační doména na N-terminálním konci proteinu (obr. 3), která zprostředkovává heterodimerizaci, intermolekulární fosforylaci a aktivaci fúzního proteinu (McWhirter et al., 1993). Druhým klíčovým motivem je Tyr177 (obr. 3), který je v leukemických buňkách fosforylován a slouží jako vazebné místo pro adaptorový protein Grb2 (Pendergast et al., 1993).



Obr. 5: Signální dráhy aktivované Bcr-Abl (převzato z Deininger et al., 2000).

2.3.5.1. Bcr-Abl a Ras

Bcr-Abl kinasa přímo asociuje s proteiny, které aktivují signální dráhu Ras. Byly popsány 3 mechanismy aktivace Ras zahrnující 3 odlišné adaptorové proteiny. Prvním je protein Grb2. Jak již bylo zmíněno výše, fosforylovaný Tyr177 představuje vazebné místo pro protein Grb2, který se váže s proteinem Sos (son of sevenless), který přeměňuje protein Ras z neaktivní formy vázané s GDP do aktivní s GTP (Puil et al., 1994). Druhým adaptorovým proteinem je protein Shc (Src homology 2 domain containing protein), který je u leukemických buněk obsahujících Ph chromozom (Ph⁺ leukemické buňky) fosforylovaný a vázaný s Bcr-Abl, což představuje spojení mezi Bcr-Abl a Grb2 (Puil et al., 1994). Třetím je protein Crkl, který patří mezi nejdůležitější substráty Bcr-Abl kinasy a ve fosforylované formě také vytváří s Bcr-Abl komplex. Fosforylovaný Crkl se váže s proteinem Sos aktivujícím Ras (Feller et al., 1995).

Aktivovaný protein Ras aktivuje serin/threoninovou kinasu Raf-1 (rapidly accelerated fibrosarcoma) a spouští tak signální kaskádu dráhy MAPK. Aktivovaný Raf-1 fosforyluje kinasu MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) na serinových a threoninových reziduích, což aktivuje její serin/threonin a tyrosin kinasovou aktivitu. MEK dále fosforyluje a aktivuje ERK (extracellular signal-regulated kinase, mitogen-activated protein kinase), který fosforylací reguluje aktivitu transkripčních faktorů c-Jun a c-Fos (Chang a Karin, 2001).

2.3.5.2. Bcr-Abl a PI-3K

Fosfatidylinositol-3 kinasa (PI-3K) může být aktivována pomocí Bcr-Abl dvěma mechanismy. Prvním mechanismem je dráha vedoucí přes Grb2, který se váže přes svou SH3 doménu s doménou bohatou na prolin proteinu Gab2 (Grb2-associated-binding protein 2), který je následně fosforylován kinasou Bcr-Abl, a přes který je aktivována PI-3 kinasa (Sattler et al., 2002).

Druhou dráhou vedoucí k aktivaci PI-3K je dráha zahrnující protein Crkl. SH3 doména proteinu Crkl interaguje s na prolin bohatou oblastí kinyasy Bcr-Abl. Na Crkl se následně váže svojí SH2 doménou protein Cbl (casitas b-lineage lymphoma). Protein Cbl může s Bcr-Abl interagovat nepřímo přes Crkl nebo také přímou vazbou na SH2 doménu Abl. S proteinem Cbl interaguje protein Crk, který následně aktivuje PI-3 kinasu (Sattler et al., 1996).

PI-3K nepřímo aktivuje kinasu Akt (protein kinasa B, PKB), dráha vede přes tvorbu fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu. Akt následně vykonává svoji antiapoptotickou funkci přes několik substrátů, které fosforyluje. Klíčovým substrátem kinasy Akt je proapoptotický protein Bad (Bcl-2-associated death promoter), který je fosforylací inaktivován (del Peso et al., 1997). Dalším substrátem Akt je protein GSK3 β (glykogen synthasa kinasa 3 β), který se fosforylací také inaktivuje (Pap a Cooper, 1998). GSK3 β v aktivovaném stavu fosforyluje cyklin D a β -catenin, které jsou následně degradovány proteasomem (Diehl et al., 1998).

Členové rodiny transkripčních faktorů FoxO (Forkhead box O) patří mezi dalšími proteiny, které jsou fosforylovány kinasou Akt. Hrají důležitou roli v hematopoéze a regulují celou řadu fyziologických procesů, jako je zástava buněčného cyklu, apoptóza, diferenciaci nebo oprava DNA (Tothova et al., 2007). Po fosforylaci se proteiny FoxO váží s proteinem 14-3-3, který brání jejich vazbě na DNA, a jsou relokalizovány do cytoplazmy (Brunet et al., 1999). Lokalizace do cytoplazmy tak efektivně inhibuje transkripční aktivaci proapoptotických proteinů (Stahl et al., 2002).

2.3.5.3. Bcr-Abl a JAK/STAT

Bcr-Abl fúzní kinasa fosforyluje členy rodiny transkripčních faktorů STAT (signal transducer and activator of transcription). Za normálních fyziologických podmínek je STAT fosforylován kinasou JAK (Janusova kinasa), proteiny STAT následně dimerizují a migrují do jádra, kde regulují transkripci genů zapojených do procesu proliferace a přežití, jako jsou cyklin D nebo c-Myc (Horvath, 2000).

Bcr-Abl může regulovat signální dráhu JAK/STAT dvěma způsoby. Prvním je fosforylace JAK2, která byla pozorována v Bcr-Abl pozitivních buňkách, ale již ne v Bcr-Abl negativních kontrolních buňkách. Aktivace JAK2 ovšem nevede k aktivaci STAT5, ale ke zvýšení exprese transkripčního faktoru c-Myc (Xie et al., 2001). Druhým způsobem je fosforylace a tím aktivace proteinů STAT přímo, bez aktivace JAK. Bcr-Abl aktivuje především STAT5, méně potom STAT1 a STAT3 (Ilaria a Van Etten, 1996). Aktivace STAT5 přispívá ke zvýšené expresi antiapoptotických proteinů Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1) a Bcl-X_L (B cell lymphoma-extra large), a cyklinu D, který stimuluje proliferaci (de Groot et al., 2000).

Nedávno bylo zjištěno, že JAK2 je schopen aktivovat Bcr-Abl. Inhibice JAK2 v Bcr-Abl pozitivních buňkách vedla k poklesu fosforylace Tyr177 na Bcr-Abl, ke snížení hladiny Bcr-Abl a indukci apoptózy v buňkách rezistentních na imatinib nesoucí mutaci Bcr-Abl T315I (Samanta et al., 2011).

2.3.5.4. Bcr-Abl a změna adheze

Při normální hematopoéze je adheze hematopoetických kmenových buněk a progenitorových buněk k stromálním buňkám kostní dřeně a extracelulární matrix regulována interakcí integrinů a dalších povrchových receptorů. To zajišťuje, že tyto buňky neopustí prostředí kostní dřeně před dozráním. U buněk CML je adheze k extracelulární matrix deregulována, což způsobuje uvolnění nezralých krevních buněk do periferní krve. Povrchové receptory z rodiny adhezivních molekul integrinů se u buněk CML chovají odlišně než u normálních buněk.

Integriny jsou heterodimery složené z α a β podjednotky spojené nekovalentními interakcemi. Mají intracelulární, transmembránovou a extracelulární doménu, která rozpoznává a váže se k adhezivním ligandům nacházející se na povrchu stromálních buněk a k extracelulární matrix. Vazba integrinu na ligand iniciuje přenos signálu z integrinu do buňky. U buněk CML indukuje Bcr-Abl abnormální asociaci mezi integriny a cytoskeletem. To brání podjednotce $\beta 1$ integrinů správné distribuci na povrchu buňky, snižuje její mobilitu a zvyšuje agregaci receptorů v abnormálních shlucích, což negativně ovlivňuje adhezi buněk (Bhatia et al., 1999).

Další mechanismus přispívající ke změně adhezi vede přes protein Crkl, který interaguje s proteiny zapojenými do signální dráhy zprostředkované integriny, jako je paxillin. Paxillin dále interaguje s proteiny FAK (focal adhesion kinase) a vinculinem, což jsou proteiny účastníci se integrinové signalizace (Uemura et al., 1999).

2.4. Léčba chronické myeloidní leukemie

Léčba CML ušla od svých počátků velmi dlouhou cestu, nicméně její vývoj byl dosti pomalý. První účinnou léčbou bylo v 19. století podávání tzv. Fowlerova roztoku vyvinutého v 18. století Thomasem Fowlerem, jehož aktivní složkou

byl arsenik (oxid arsenitý). V 21. století se opět účinky arseniku začínají zkoumat v *in vitro* studiích (Konig et al., 2007). V první polovině 20. století byl s nástupem radioterapie Fowlerův roztok nahrazen ozařováním, což mělo zmírnit symptomy způsobené zvětšenou slezinou, ale k prodloužení života to pravděpodobně nevedlo (Deininger, 2008).

První syntetickou sloučeninou používanou při léčbě CML se v 50. letech 20. století stal busulfan, který patří mezi alkylační činidla. Přestože je busulfan velmi toxický, byl schopen mírně prodloužit střední dobu přežití (Djaldetti et al., 1966). Po 10 letech byl busulfan nahrazen méně toxickou, ale účinnější hydroxymočovinou patřící do skupiny antimetabolitů. Hydroxymočovina byla schopna dále prodloužit střední dobu přežití (Hehlmann et al., 1993).

V 80. letech 20. století byla stávající léčiva nahrazena rekombinantním interferonem- α (rIFN). V té době byl již INF používán k léčbě jiných malignit. Mechanismus účinku u CML není stále zcela objasněn. V porovnání s busulfanem nebo hydroxymočovinou vykazoval rIFN lepší léčebné výsledky. Došlo k dalšímu prodloužení střední doby přežití, většina pacientů byla schopna dosáhnout kompletní hematologické odpovědi, ale pouze menší část kompletní cytogenetické odpovědi (Bonifazi et al., 2001; Allan et al., 1995). V jiné studii byla střední doba přežití u pacientů léčených rINF delší než u pacientů léčených hydroxymočovinou nebo busulfanem. Nebyl ale pozorován signifikantní rozdíl mezi rINF a hydroxymočovinou (Hehlmann et al., 1994).

V 80. letech byla další možností léčby alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Tato možnost léčby byla ale vhodná pouze pro malou část pacientů, pro které se našel vhodný dárce a kteří byli v relativně dobrém zdravotním stavu, protože museli projít chemoterapií a ozařováním (Hansen et al., 1998).

Na konci 20. století došlo k revoluci v léčbě nejen chronické myeloidní leukemie, ale také dalších hematologických i nehematologických malignit uvedením tzv. cílené léčby, která zasahuje konkrétní signální dráhy podílející se na nádorové transformaci.

Vzhledem k širokému rozmezí léčebných možností a strategií je nezbytné průběh léčby monitorovat, aby bylo možné v případě nepříznivého průběhu léčbu upravit. K tomu slouží množství pokročilých genetických a molekulárně-biologických technik, kterými se hodnotí odpověď pacienta na léčbu

(Baccarani et al., 2009). Rozlišujeme odpověď hematologickou (HR), cytologickou (CR) a molekulární (MR; tab. 1).

Tab. 1: Definice hematologické, cytogenetické a molekulární odpovědi pacienta na léčbu (převzato a upraveno podle Baccarani et al., 2009).

Kompletní hematologická odpověď	Počet bílých krvinek $< 10 \times 10^9/L$ Počet destiček $< 450 \times 10^9/L$ Žádné vyplavené nezralé granulocyty Normální velikost sleziny
Cytogenetická odpověď	
Kompletní	0 % Ph ⁺ buněk
Částečná	1-35 % Ph ⁺ buněk
Malá	35-65 % Ph ⁺ buněk
Minimální	65-95 % Ph ⁺ buněk
Žádná	>96 % Ph ⁺ buněk
Molekulární odpověď	
Kompletní	Nedetekovatelná mRNA genu <i>BCR-ABL1</i> pomocí real-time kvantitativní nebo nested PCR
Velká	Poměr mRNA genu <i>BCR-ABL1</i> ku kontrolnímu genu $\leq 0,1$ %

2.4.1. Inhibitory tyrosinových kinas

Zjištění, že tyrosinové kinas (TK) s deregulovanou aktivitou hrají důležitou roli při vzniku řady nádorových onemocnění, vedlo k vývoji nízkomolekulárních inhibitorů tyrosinových kinas (TKI) v naději, že je bude možné použít při léčbě nádorů. Fúzní protein Bcr-Abl tak představuje ideální cíl pro TKI, protože je charakteristický pro většinu pacientů s CML a jeho deregulovaná tyrosinkinasová aktivita je zodpovědná za rozvoj CML (Lugo et al., 1990). Bylo však otázkou, zda bude možné vyvinout specifické TKI. Problém spočíval v tom, že tyrosinové kinas využívají ATP jako donor fosfátu a mají konzervované ATP-vazebné místo, tudíž nebylo jasné, zda různé TKI budou schopny selektivně inhibovat ATP-vazebná místa různých tyrosinových kinas. Brzy ovšem začaly vycházet články popisující přírodní látky schopné inhibovat různé tyrosinové kinas. V roce 1993 byl objeven tyrphostin (tyrosine phosphorylation inhibitors) inhibující aktivitu Bcr-Abl a začalo být jasné, že bude možné nalézt specifické inhibitory pro léčbu leukemií spojených s Abl (Anafi et al., 1993).

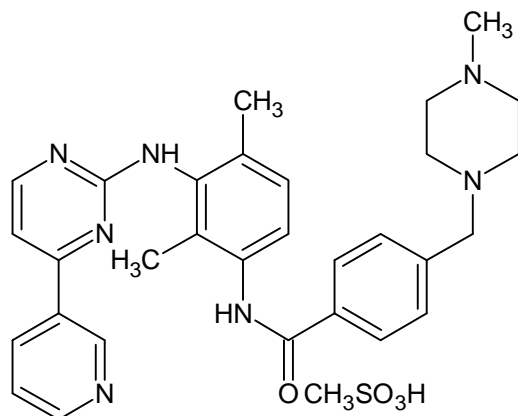
V 90. letech vyvinuli v laboratoři Ciba-Geigy (nyní Novartis Pharmaceuticals) skupinu inhibitorů proteinových kinas, 2-fenylaminopyrimidiny,

z nichž vzešel první komerčně dostupný inhibitor Bcr-Abl, imatinib (Gleevec, STI571, CGP57148, Novartis Pharmaceuticals, Basilej, Švýcarsko), který v *in vitro* experimentech selektivně zabíjel buňky CML (Druker et al., 1996). Imatinib byl jako první generace inhibitorů Bcr-Abl uveden rychle do klinické praxe v roce 2002 a způsobil revoluci v léčbě CML.

2.4.1.1. První generace TKI

2.4.1.1.1. Imatinib

Imatinib je derivátem 2-fenylaminopyrimidinu (obr. 6), chemicky se jedná o 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-*N*-(4-methyl-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]benzamid methansulfonát.



Obr. 6: Chemická struktura imatinibu.

Imatinib byl původně vyvinut jako specifický inhibitor receptoru PDGF (platelet derived growth factor). Studie poté odhalily, že to není jediný jeho cíl. Jedná se také o relativně selektivní inhibitor proteinových kinas Abl, Bcr-Abl o velikosti 190 kDa a 210 kDa (Buchdunger et al., 1996), c-Kit (Heinrich et al., 2000) a Arg (Abl-related gene; Okuda et al., 2001).

Imatinib funguje jako kompetitivní inhibitor, který se váže do ATP-vazebného místa Abl, a brání tak vazbě ATP. Krystalová struktura komplexu kinasové domény Abl a imatinibu odhalila, že imatinib při inhibici vytváří s 21 hydrofóbními rezidui vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce, které jej pomáhají přesně orientovat na místě (Nagar et al., 2002). Mutace vedoucí ke změnám některých z těchto reziduí výrazně ovlivňují vazbu imatinibu a způsobují rezistenci buněk CML nesoucí tyto mutace (von Bubnoff et al., 2002).

V aktivační smyčce kinasy je důležitým reziduem Tyr393, který je v krystalu Abl s imatinibem nefosforylovaný. To znamená, že imatinib je schopen inhibovat Abl pouze v inaktivní konformaci. Abl s fosforylovaným Tyr393 je mnohem méně citlivý na imatinib. V buňkách CML je Bcr-Abl na Tyr393 konstitutivně fosforylován, a nachází se tedy v aktivní konformaci, která brání vazbě imatinibu. Z experimentů je ale známo, že imatinib je schopen v buňkách CML inhibovat Bcr-Abl. To znamená, že Bcr-Abl v buňkách rychle přechází mezi aktivní (fosforylovanou) a inaktivní (nefosforylovanou) konformací, která je následně inhibována imatinibem. Další možností může být, že se imatinib váže na nově syntetizovaný Bcr-Abl, který ještě nestihl být fosforylován (Schindler et al., 2000; Nagar et al., 2002).

Studie ukázaly, že imatinib byl schopen selektivně inhibovat růst Bcr-Abl pozitivních buněk. Inkubace mnoha Bcr-Abl pozitivních buněčných linií získaných z pacientů s CML s imatinibem v submikromolárních koncentracích vedlo k zástavě růstu a indukci apoptózy (Druker et al., 1996). Inhibice kinasové aktivity Bcr-Abl vede ke snížení fosforylace proteinu Crkl, jednoho z nejdůležitějších substrátů Bcr-Abl, což inhibuje signální dráhy důležité pro přežití a inhibici apoptózy. Navíc dochází ke snížení exprese antiapoptotických proteinů Bcl-X_L, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) nebo IAP1 (inhibitor of apoptosis), aktivaci proapoptotického proteinu Bid (BH-3 interacting domain death agonist) a aktivaci kaspasy 3, 8 a 9 (Fang et al., 2000; Jacquelin et al., 2003). Vedle indukce apoptózy dochází působením imatinibu také ke spuštění erytroidní diferenciaci u buněk CML. Mechanismus diferenciaci není znám, ale předpokládá se, že důležitou roli hraje kinasa ERK (Jacquelin et al., 2007).

Na druhou stranu nebyl pozorován žádný inhibiční efekt na normální buňky hematopoetických progenitorů v koncentracích použitých u Ph⁺ buněk (Druker et al., 1996). Imatinib nevykazoval významný inhibiční efekt ani na leukemické progenitorové buňky. Dokáže tedy obnovit normální hematopoézu u pacientů s CML potlačením proliferace leukemických buněk, ale nedokáže odstranit leukemické progenitory (Graham et al., 2002). Přítomnost leukemických progenitorů i u pacientů s kompletní cytogenetickou odpovědí tak může představovat rizikový faktor relapsu (Bhatia et al., 2003).

Imatinib je metabolizován cytochromem P450 (CYP), převážně tedy pomocí CYP3A4 a CYP3A5. Hlavní metabolický proces fáze 1 zahrnuje demethylaci za

vzniku nejvíce zastoupeného metabolitu - N-desmethyl imatinibu (CGP 74588). Mezi další metabolické procesy můžeme zařadit oxidaci piperazinového kruhu za vzniku laktamu, N-oxidaci piperazinu nebo N-oxidaci pyridinu. Ve fázi 2 je imatinib nebo jeho metabolit konjugován s glukuronovou kyselinou (Gschwind et al., 2005).

Imatinib byl uveden do klinických zkoušek v roce 1998 a byl testován na vzorku pacientů s CML v chronické fázi, u kterých selhala léčba rINF. Ve fázi 1 klinických zkoušek bylo pacientům podáváno 300 a více mg imatinibu denně, přičemž 98 % pacientů dosáhlo kompletní hematologické odpovědi, 31 % dosáhlo hlavní cytogenetické odpovědi a 13 % kompletní cytogenetické odpovědi. Vedlejší efekty byly mírné a zahrnovali průjem, žaludeční nevolnost nebo kožní vyrážku (Druker et al., 2001).

Velmi příznivé výsledky imatinibu v první fázi klinických zkoušek jej rychle posunuly do druhé fáze, kde byl testován jak na pacientech v chronické fázi CML, u kterých selhala léčba rINF, tak také na pacientech v akcelерованé fázi a blastické fázi CML a pacientech s ALL. 95 % pacientů v chronické fázi dosáhlo kompletní hematologické odpovědi, 60 % hlavní a 41 % kompletní cytogenetické odpovědi (Kantarjian et al., 2002).

Třetí fáze klinických zkoušek, IRIS, porovnávala úspěšnost léčby pacientů v chronické fázi CML léčených imatinibem (400 mg denně) s pacienty léčenými rINF a cytarabinem. Po 19 měsících sledování byly výsledky dosažené u pacientů léčených imatinibem lepší než u pacientů léčených rINF a cytarabinem. Hlavní cytogenetická odpověď byla dosažena u 87 % pacientů léčených imatinibem vs. 35 % pacientů léčených rINF, kompletní cytogenetická odpověď byla 75 % u imatinibu vs. 15 % u rINF (O'Brien et al., 2003). Na základě těchto výsledků byl imatinib v prosinci roku 2002 schválen FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu pacientů s CML.

2.4.1.1.2. Rezistence na imatinib

Pacienti s CML vykazují různou citlivost na imatinib. Velká část pacientů na léčbu imatinibem dobře odpovídá, u části se ale vyvine rezistence, která představuje velký problém doprovázející nejen léčbu CML. Pokud se rezistence objeví hned v počátcích léčby, mluvíme o tzv. primární rezistenci. Pokud se rezistence vyvine až v průběhu léčby, mluvíme o tzv. sekundární nebo získané rezistenci. Nejnižší

pravděpodobnost vzniku rezistence mají pacienti v časně chronické fázi (O'Brien et al., 2003).

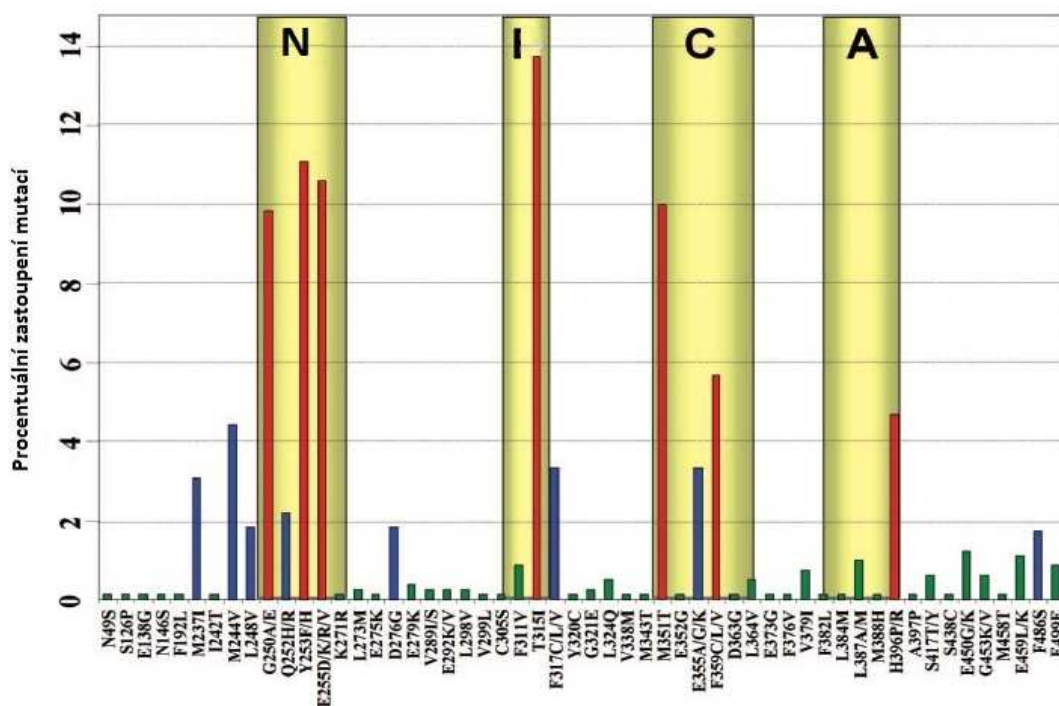
Rezistence na imatinib může být způsobena celou řadou mechanismů, které mohou být rozděleny do dvou skupin – rezistence na Bcr-Abl závislá a nezávislá.

2.4.1.1.2.1. Bcr-Abl-závislé mechanismy rezistence

2.4.1.1.2.1.1. Mutace Bcr-Abl

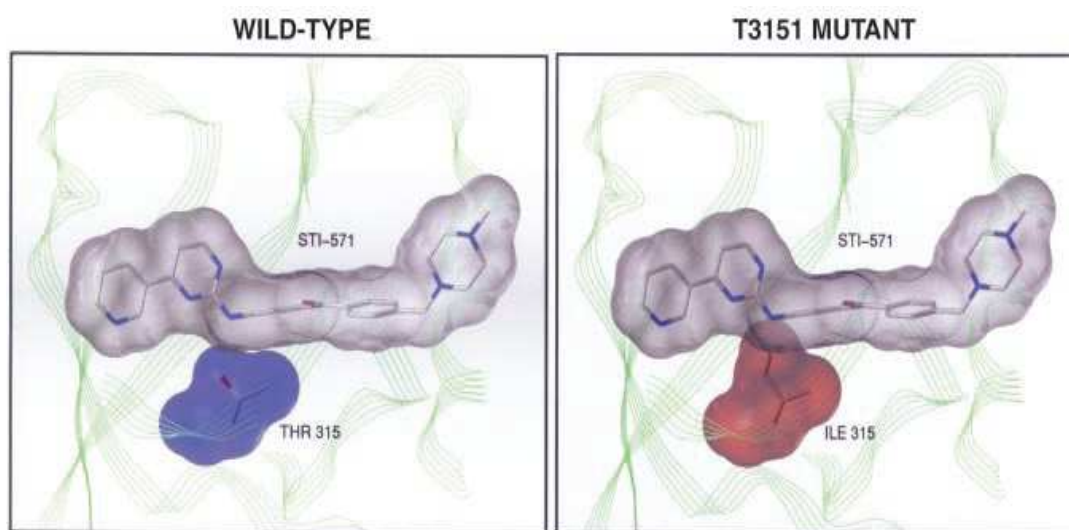
Imatinib sám o sobě neindukuje mutace, ale spíše jako v případě rezistence bakterií na antibiotika selektuje vzácný již existující klon rezistentní na imatinib, která nese mutaci. Tento rezistentní klon poté postupně přeroste citlivé klony (Luzzatto a Melo, 2002).

Mutace postihující protein Bcr-Abl zasahují různé části a mohou být rozděleny do 4 skupin: mutace, které přímo narušují vazbu imatinibu; mutace v ATP-vázajícím místě; mutace v aktivační smyčce; mutace v katalytické doméně (obr. 7).



Obr. 7: Procentuální zastoupení mutací Bcr-Abl spojených s klinickou rezistencí na imatinib. Nejčastější mutace jsou znázorněny červeně. Mutace mohou být rozděleny do 4 skupin: mutace, které přímo narušují vazbu imatinibu (I); mutace v ATP-vázajícím místě (N); mutace v aktivační smyčce (A); mutace v katalytické doméně (C) (převzato a upraveno z Diamond a Melo, 2011).

První detekovanou mutací u rezistentních pacientů, která ovlivňuje vazbu imatinibu, byla substituce threoninu na pozici 315 za isoleucin (T315I). Imatinib vytváří s Abl celou řadu interakcí, které jej pomáhají přesně orientovat na místě. Substituce T315I ovlivňuje vazbu imatinibu dvěma způsoby. Za prvé, isoleucin s delším uhlíkovým řetězcem stéricky brání vstupu a vazbě imatinibu do ATP-vazebného místa (obr. 8). Za druhé, odstraněním threoninu mizí atom kyslíku, což brání vytvoření vodíkové vazby se sekundární aminoskupinou imatinibu (Gorre et al., 2001).



Obr. 8: Substituce T315I a ovlivnění vazby imatinibu. Záměna threoninu na pozici 315 za isoleucin stéricky brání vstupu imatinibu do vazebného místa a vytvoření vodíkové vazby mezi sekundární aminoskupinou imatinibu s atomem kyslíku na threoninu, což vede k rezistenci pacientů na imatinib nesoucí tuto substituci (převzato z Gorre et al., 2001).

Mutace v ATP-vazebné doméně postihují často tyrosin 253 a glutamát 255. Tyrosin 253 vytváří vodíkovou vazbu s asparaginem 322, glutamátem 255, threoninem 273, lysinem 247 a tyrosinem 257. Substituce tyrosinu 253 za histidin a glutamátu 255 za lysin nebo valin vedou ke konformačním změnám, které mají za následek poškození vazby imatinibu (von Bubnoff et al., 2002). Mutace v aktivační smyčce, která je tvořena aminokyselinami 381 až 402, neovlivňují přímo vazbu imatinibu, ale spíše brání dosažení inaktivní konformace. Příkladem mutace v této oblasti je substituce histidinu 396 za prolin (von Bubnoff et al., 2002).

2.4.1.1.2.1.2. Amplifikace *BCR-ABL1* a zvýšená exprese Bcr-Abl

Rezistence na imatinib způsobená amplifikací genu *BCR-ABL1* a následnou zvýšenou hladinou proteinu byla nejdříve pozorována v *in vitro* studiích, kdy byly z citlivých buněčných linií vytvářeny rezistentní kultivací s postupně se zvyšující koncentrací imatinibu (Mahon et al., 2000). Amplifikace genu byla zjištěna také u pacientů s CML v blastické fázi a s ALL, kteří zpočátku na imatinib odpovídali, ale poté u nich došlo k relapsu. Zdá se ale, že bodové mutace jsou častější příčinou vzniku rezistence (Gorre et al., 2001). Mezi zvýšenou hladinou Bcr-Abl a mutacemi může existovat vztah. U progenitorových buněk CD34⁺ se zvýšenou hladinou Bcr-Abl byla pozorována nižší citlivost na imatinib a vyšší rychlost rozvoje mutací. Hladina Bcr-Abl může tedy alespoň částečně ovlivňovat rychlost, s jakou se rezistentní klon objeví a stane se dominantním (Barnes et al., 2005b).

2.4.1.1.2.2. Bcr-Abl nezávislé mechanismy rezistence

2.4.1.1.2.2.1. Lékové transportéry

Intracelulární hladina imatinibu v cílové buňce závisí na jeho transportu jak dovnitř buňky, tak také z buňky ven. V klinické praxi se předpokládá vliv dvou transportérů z rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů (ABCB1 a ABCG2) transportujících léčiva ven z buňky. Je stále kontroverzní, zda se výše zmíněné transportéry skutečně podílejí na vzniku rezistence leukemických buněk na imatinib jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách vzhledem k počtu rozporupných prací. Nejnovější typ mechanismu rezistence zahrnuje OCT-1 transportér (organic cation transporter), který transportuje imatinib dovnitř buňky.

Prvním objeveným transportérem souvisejícím s rezistencí buněk CML na imatinib byl protein ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, multidrug resistance protein, MDR1), produkt genu *ABCB1*. Vzhledem k tomu, že o vlivu ABCB1 na rezistenci leukemických buněk budou pojednávat kapitoly níže, následující řádky budou věnovány dalším lékovým transportérům

Dalším možným ABC transportérem podílejícím se na vzniku rezistence na imatinib u pacientů s CML je ABCG2. Nutno ale podotknout, že příspěvek ABCG2 je značně kontroverzní a nepanuje v této otázce shoda. Rezistence na imatinib byla pozorována u buněk se zvýšenou expresí ABCG2 (Dohse et al., 2010; Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007). V dalších pracech se ovšem vyskytla opačná tvrzení.

Zvýšená exprese ABCG2 nevedla ke snížené citlivosti buněk na imatinib (Houghton et al., 2004). Zvýšená exprese ABCG2 byla pozorována u buněk CD34⁺ získaných z pacientů s CML v chronické fázi. Inhibice ABCG2 ale nevedla ke zvýšení intracelulární akumulace imatinibu u těchto buněk (Jordanides et al., 2006).

Imatinib je transportován do buňky aktivně pomocí organického kationtového transportéru OCT-1 (Thomas et al., 2004; White et al., 2006). Snížený transport imatinibu do buňky byl proto navržen jako další mechanismus vzniku rezistence u CML pacientů. Byl pozorován vztah mezi expresí OCT-1 a odpovědí pacientů na imatinib. Pacienti s nižší expresí OCT-1 měli suboptimální odpověď, kterou bylo možné překonat vyšší dávkou imatinibu (White et al., 2007). Pacienti s nižší aktivitou OCT-1 navíc vykazovali vyšší míru mutací Bcr-Abl a rychlejší vývoj nemoci. Naopak vyšší aktivita OCT-1 korelovala s lepší odpovědí a celkově delší dobou přežití (White et al., 2010a). Na druhou stranu bylo také publikováno, že transport imatinibu do buňky je nezávislý na OCT-1 (Nies et al., 2014). Proto mohli i pacienti s nižší hladinou OCT-1 dosahovat optimální odpovědi (Razga et al., 2011).

Dalším faktorem, který může mít vliv na výsledek léčby, je genetická variabilita OCT-1 (tzv. polymorfismy). Nicméně i toto téma je značně kontroverzní. Byly publikovány práce ukazující vztah mezi polymorfismy a selháním léčby (Giannoudis et al., 2013; Bazeos et al., 2010). Vedle toho jsou práce, ve kterých k podobným závěrům nedošli (White et al., 2010b).

2.4.1.2. Druhá generace TKI

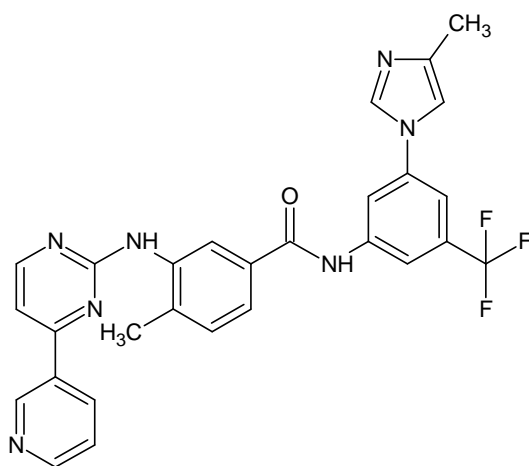
Pochopení mechanismu rezistence vedlo k vývoji dalších inhibitorů Bcr-Abl, které byly *in vitro* i *in vivo* experimentech schopny inhibovat růst buněk s nemutovanou i mutovanou formou Bcr-Abl. Dvě z těchto sloučenin – nilotinib a dasatinib – jsou v současné době již schváleny pro léčbu pacientů s CML v různých fázích. Tito pacienti jsou rezistentní na imatinib nebo imatinib netolerující.

2.4.1.2.1. Nilotinib

Nilotinib (Tasigna, AMN107, Novartis Pharmaceuticals, Basilej, Švýcarsko) je derivátem 2-fenylaminopyrimidinu, strukturně podobný imatinibu a vyvinutý na základě krystalové struktury komplexu imatinib-Abl. Chemicky jde o 4-methyl-N-[3-

(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)fenyl]-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]benzamid (obr. 9). Nilotinib na rozdíl od imatinibu postrádá methylypiperazinový motiv a je obohacen o triflouromethylovou a methylimidazolovou skupinu.

Nilotinib představuje specifický ATP-kompetitivní inhibitor kinas Bcr-Abl, c-Kit a PDGFR (Weisberg et al., 2005). Stejně jako imatinib se i nilotinib váže na Abl v inaktivní konformaci. Rozdíly ve struktuře nilotinibu a imatinibu vedou ke změnám v interakci nilotinibu se specifickými aminokyselinami ve vazebném místě Abl, což má za následek zvýšení účinnosti nilotinibu v porovnání s imatinibem (Weisberg et al., 2005).



Obr. 9: Chemická struktura nilotinibu.

Nilotinib účinně inhibuje kinasovou aktivitu Bcr-Abl jak nemutovaného proteinu citlivého na imatinib, tak také většiny mutantních na imatinib rezistentních forem. Jedinou výjimku tvoří mutace T315I, která zůstává rezistentní také vůči nilotinibu (Weisberg et al., 2005). Nilotinib efektivně inhibuje proliferaci jak Bcr-Abl exprimujících na imatinib citlivých buněk, tak také buněk s mutovanou na imatinib rezistentní formou Bcr-Abl, kromě T315I mutace (O'Hare et al., 2005). Podobně jako imatinib ani nilotinib nevykazoval významný inhibiční efekt vůči normálním myeloidním progenitorům v koncentracích použitých u Bcr-Abl exprimujících buněk (Weisberg et al., 2005).

Vedle mutace T315I mohou k rezistenci na nilotinib přispívat další mechanismy, jako je zvýšená exprese ABC transportérů, nicméně ani v této oblasti nejsou publikovaná data konzistentní. Bylo ukázáno, že je nilotinib transportován jak P-gp, tak také ABCG2, a zvýšená exprese těchto transportérů může tedy snižovat

intracelulární koncentraci nilotinibu v buňkách, a přispívat tak ke vzniku rezistence (Mahon et al., 2008; Brendel et al., 2007). Nicméně v další práci bylo ukázáno, že zvýšená exprese P-gp nepřispívá k rezistenci na nilotinib (Davies et al., 2009).

Nilotinib je metabolizován převážně CYP3A4. Současné podávání silných inhibitorů nebo aktivátorů CYP3A4 může zvýšit nebo snížit koncentraci nilotinibu. Nilotinib navíc působí také jako kompetitivní inhibitor nejen CYP3A4, ale také CYP2C8, CYP2C9 a CYP2D6 (Hazarika et al., 2008).

Po slibných výsledcích získaných v *in vitro* experimentech byl nilotinib zařazen do klinických zkoušek na léčbu CML u pacientů v různých fázích, kteří byli rezistentní na imatinib, a Ph⁺ pacientů s ALL. Hematologické/cytogenetické odpovědi bylo dosaženo u pacientů v chronické, akcelerované a blastické fázi v 92/53 %, 72/48 % a 39/27 %. Odpovědi bylo dosaženo u všech pacientů napříč různými fenotypy Bcr-Abl, kromě mutace T315I. Nilotinib byl obecně velice dobře tolerován (Kantarjian et al., 2006).

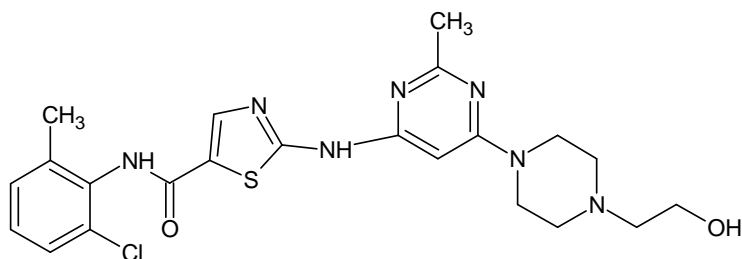
Ve fázi 2 klinických zkoušek byl nilotinib testován nejdříve na pacientech s CML v chronické fázi rezistentních na imatinib nebo imatinib netolerujících. Byl podáván dvakrát denně po 400 mg. Kompletní hematologickou odpověď mělo 74 % pacientů, kompletní cytogenetickou 34 % (Kantarjian et al., 2007). V dalších fázích byli testováni pacienti s CML rezistentní na imatinib nebo imatinib netolerující v akcelerované fázi. Pacientům bylo podáváno 400 mg dvakrát denně s možností navýšení dávky na 600 mg dvakrát denně, pokud nedošlo k adekvátní léčebné odpovědi. Kompletní hematologická odpověď byla dosažena u 26 % pacientů a kompletní cytogenetická u 16 %. Vážné vedlejší efekty se vyskytovaly pouze zřídka. Nejčastější nehematologické nežádoucí účinky byly kožní alergické reakce nebo nevolnost (le Coutre et al., 2008).

Na základě klinických zkoušek byl nilotinib v roce 2007 schválen FDA na léčbu pacientů s CML.

2.4.1.2.2. Dasatinib

Dasatinib (Sprycel, BMS-354825, Bristol-Myers Squibb, New York, USA) je derivátem thiazolkarboxamidu (obr. 10). Chemicky se jedná o N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]ami-

no]-5-thiazolkarboxamid. Strukturně je odlišný od imatinibu i nilotinibu, z čehož vyplývají některé jeho odlišné vlastnosti.



Obr. 10: Chemická struktura dasatinibu.

Dasatinib působí jako ATP-kompetitivní inhibitor kinas Abl, Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR- α a kinas rodiny Src. Váže se do ATP-vazebného místa kinasy Abl a to jak v inaktivní, tak také v aktivní konformaci. Na rozdíl od imatinibu vytváří dasatinib ve svém vazebném místě méně interakcí a má vyšší afinitu k Abl. Je schopen účinně inhibovat Bcr-Abl jak v nemutované, tak mutované formě. Jelikož threonin 315 představuje důležitou kontaktní aminokyselinu, je T315I jedinou z 16 klinicky významných mutantních forem Bcr-Abl, kterou není dasatinib schopen inhibovat (Tokarski et al., 2006). Dasatinib inhibuje Bcr-Abl exprimující buňky jak s nemutovanou, tak také s mutovanou formou Bcr-Abl v koncentracích nepřevyšujících 2 nmol/l. V *in vitro* experimentech inhiboval růst Bcr-Abl exprimujících buněk s nemutovanou formou Bcr-Abl 325krát účinněji než imatinib a 16krát účinněji než nilotinib. Také v inhibici růstu buněk s mutovanou formou Bcr-Abl (kromě mutace T315I) byl dasatinib mnohem účinnější než imatinib nebo nilotinib (O'Hare et al., 2005).

Dasatinib je ve velké míře metabolizován cytochromem P450, převážně CYP3A4 na několik farmakologicky aktivních metabolitů. Mezi důležité metabolické cesty patří N-oxidace piperazinového kruhu, oxidace alkoholu nebo hydroxylace chloromethylfenylové skupiny (Christopher et al., 2008).

Ve fázi 1 klinických zkoušek byl dasatinib testován na pacientech s Ph⁺ CML v různých fázích, kteří byli rezistentní na imatinib nebo imatinib netolerující, a Ph⁺ ALL. Bez ohledu na fázi, ve které se pacienti nacházeli, dosáhlo kompletní hematologickou odpověď 68 % a kompletní cytogenetickou odpověď 30 % pacientů (Talpaž et al., 2006). V další fázi klinických zkoušek byly porovnávány výsledky pacientů v chronické fázi CML rezistentních na imatinib dostávajících 70 mg

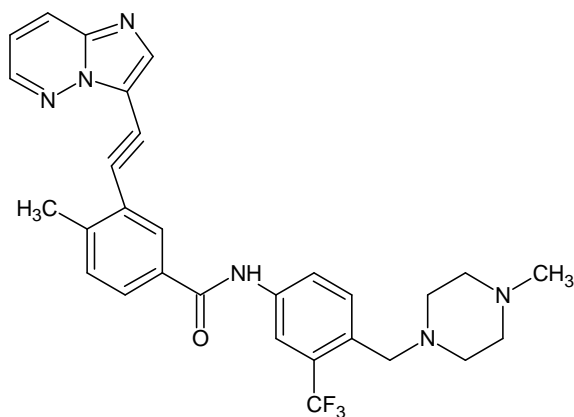
dasatinibu dvakrát denně s pacienty dostávajícími vysoké dávky imatinibu (400-600 mg imatinibu denně). Po 2 letech sledování dosáhlo kompletní hematologické odpovědi 93 % pacientů dostávajících dasatinib vs 82 % pacientů dostávajících imatinib a kompletní hematologické odpovědi 44 % pacientů dostávajících dasatinib vs 19 % pacientů dostávajících imatinib (Kantarjian et al., 2009).

Na základě klinických zkoušek byl dasatinib schválen FDA na léčbu pacientů s CML v chronické, akcelerované i blastické fázi.

2.4.1.3. Třetí generace TKI

Ačkoliv druhá generace TKI přinesla zlepšení v léčbě CML, stále se mezi pacienty vyskytovala část, která neodpovídá na tyto nové TKI, jelikož nesou formu Bcr-Abl s mutací T315I, která způsobuje rezistenci jak na první, tak na druhou generaci TKI. Bylo proto nutné vyvinout další generaci TKI schopných překonat tuto mutaci. V současné době je řada takových TKI jak v klinických zkouškách, tak také schválených pro léčbu CML.

Jedním z nových TKI je ponatinib (AP24534, Iclusig, ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, USA), který byl vyvinut modifikací purinové kostry (Huang et al., 2010). Chemicky se jedná o 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)fenyl}benzamid (obr. 11). Vzhledem k tomu, že obsahuje trojnou vazbu, je schopen se vyhnout stericke překážce u T315I mutanta Bcr-Abl (Huang et al., 2010).



Obr. 11: Chemická struktura ponatinibu.

Ponatinib působí jako selektivní inhibitor jak nemutované formy Bcr-Abl, tak Bcr-Abl nesoucí různé mutace. Vedle toho inhibuje také kinasy Src, Lyn, c-Kit, PDGFR, VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) nebo FGFR (fibroblast growth factor receptor). Vzhledem k faktu, že některé z inhibovaných kinas představují potenciální cíle u různých malignit, může být ponatinib testován jako léčivo proti širokému spektru nádorových onemocnění (O'Hare et al., 2009).

Ponatinib byl rychle zahrnut do klinických zkoušek. Ve fázi 1 byl testován u pacientů s různými mutacemi, u kterých předešlá léčba selhala, u pacientů s mutací T315I a pacientů se žádnou mutací, u kterých ale selhala léčba několika TKI. Většina pacientů v chronické fázi bez mutace dosáhla kompletní hematologické a hlavní cytogenetické odpovědi. Také u skupiny pacientů s detekovanou mutací dosáhla většina z nich kompletní hematologické i cytogenetické odpovědi (Cortes et al., 2012).

V prosinci 2012 byl ponatinib schválen FDA pro léčbu pacientů s rezistentní formou CML nebo Ph⁺ ALL.

3. Mnohočetná léková rezistence

Nádorová buňka má vlastnost přizpůsobovat se neustále se měnícím podmínkám a překonávat cytotoxické působení protinádorových léčiv díky zvýšené frekvenci mutací, nestabilitě genomu a modulaci signálních a biochemických drah. K překonání toxického efektu chemoterapie upravuje nebo rozšiřuje nádorová buňka normální fyziologické funkce nebo vyvíjí nové mechanismy rezistence. Rezistence může vzniknout pouze na použité léčivo, ale k dalším léčivům s odlišnou strukturou a mechanismem působení zůstává buňka citlivá. V extrémním případě vyvine buňka rezistenci proti celé řadě léčiv, která se obvykle značně liší jak ve struktuře, tak i mechanismu působení. Tento fenomén je nazýván mnohočetná léková rezistence (MDR) a představuje problém limitující účinnost chemoterapie použité k léčbě řady nádorových onemocnění. Poprvé byl pojem mnohočetná léková rezistence použit při rezistenci bakterií na antibiotika, brzy byl ale rozšířen i na nádorové buňky.

3.1. Mechanismy vzniku MDR

Ke vzniku MDR přispívá celá řada mechanismů, které jsou výsledkem postupného, mnohakrokového procesu genetických, epigenetických a biochemických změn. Tyto mechanismy mohou být rozděleny na úroveň buňky a organismu. Mechanismy na úrovni buňky zahrnují:

- a) deregulace signálních drah buněčné smrti
- b) deregulace signálních drah proliferace
- c) deregulace buněčného cyklu
- d) mutace nebo změna exprese cílového proteinu
- e) snížený transport léčiva do buňky
- f) zvýšený transport léčiva z buňky
- g) lokalizace léčiva uvnitř buňky

Mechanismy na úrovni organismu zahrnují:

- a) metabolismus léčiva a detoxikace
- b) mikroprostředí nádoru

Vzhledem k tomu, že v další kapitole budou podrobně popsány mechanismy zvýšeného transportu léčiva z buňky díky expresi ABC transportérů, na následujících řádcích budou shrnuty ostatní mechanismy.

Jedním z významných mechanismů, jak rezistentní nádorové buňky překonávají cytotoxické působení protinádorových léčiv, je blok apoptózy zvýšením exprese anti-apoptotických proteinů nebo snížením exprese nebo mutací pro-apoptotických proteinů.

Změny ovlivňující apoptózu se mohou týkat jak vnější receptorové dráhy, tak i vnitřní mitochondriální dráhy. Poruchy receptorových drah zahrnují sníženou expresi receptorů smrti, mutace narušující správnou funkci nebo expresi decoy receptorů, které vážou ligand, a brání tak vazbě na správný receptor nebo aktivují dráhy, které nevedou k apoptóze, ale k aktivaci NFκB a přežití.

Změny ve vnitřní mitochondriální dráze zahrnují zvýšenou expresi anti-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2, jako jsou Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 nebo A1, nebo inaktivující mutace pro-apoptotických proteinů, např. Bax (Bcl-2-associated X protein).

Defekty v mitochondriální dráze se mohou vyskytovat také na post-mitochondriální úrovni. U některých nádorů byla pozorována snížená exprese proteinu Apaf-1 (apoptotic protease activating protein 1), což bránilo vzniku apoptozómu.

Apoptóza může být deregulována také inhibicí kaspaz. Není tedy překvapující, že je u řady nádorů detekována zvýšená exprese proteinů IAP (inhibitors of apoptosis), např. XIAP nebo survivin (Fulda, 2009).

Vedle bloku apoptózy můžeme zařadit změny pro-proliferačních drah nebo drah podporující přežití, které jsou regulovány velkým množstvím jak receptorových, tak nereceptorových TK. Důležitými signálními drahami, které přispívají k rezistenci a bývají v rezistentních buňkách deregulovány, jsou PI-3K/Akt a Ras/Raf/MEK/ERK (Page et al., 2000; Normanno et al., 2006). Signální dráha PI-3K/Akt vede mimo jiné také k aktivaci NFκB, který je spojen s regulací apoptózy a buněčného cyklu (Baldwin, 2001).

Celá řada protinádorových léčiv poškozují DNA přímo nebo nepřímo, což následně vede podle stupně poškození k zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze. Schopnost nádorových buněk opravit toto poškození proto může významně ovlivnit účinnost léčby. Aktivace drah vedoucích k zástavě buněčného cyklu a opravě DNA tak představuje mechanismus přispívající ke vzniku rezistence. Na různé typy poškození si buňky vyvinuly specifické opravné mechanismy zahrnující opravu bazí a nukleotidů, opravu chybného párování nebo opravu dvouvláknových zlomů a další. (Schmitt et al., 2007).

Mutace nebo změna exprese cílového proteinu mohou mít dramatický vliv na účinnost léčby a mohou tak významně přispívat k rezistenci nádorových buněk. Jak již bylo popsáno v předcházející části, mutace genu *BCR-ABL1* vedoucí k substituci aminokyselin v různých částech proteinu mají negativní vliv na vazbu imatinibu a mají za následek selhání léčby pacientů s CML (von Bubnoff et al., 2002). U rezistentních buněk CML byla také pozorována amplifikace genu *BCR-ABL1* a zvýšená exprese proteinu (Mahon et al., 2000).

Změna lokalizace léčiva představuje mechanismus, jak mohou nádorové buňky zabránit léčivu dosažení cílového místa a přispět tak ke vzniku rezistence. Významnou organelou, která se podílí na abnormální akumulaci léčiva, jsou lysozomy. Bylo ukázáno, že u některých rezistentních nádorových linií dochází k akumulaci mírně bazických léčiv uvnitř lysozomů na rozdíl od citlivých linií (Gong et al., 2003; Hurwitz et al., 1997). Vysvětlením tohoto jevu může být nižší pH v lumen lysozomů a tedy větší pH gradient mezi cytosolem a lysozomy v porovnání s citlivou linií (Belhoussine et al., 1999) nebo zvýšená exprese P-glykoproteinu na povrchu lysozomů (Meschini et al., 2000; Shapiro et al., 1998).

Metabolizace a inaktivace léčiva může výrazným způsobem snížit množství, které je schopno zasáhnout cíl, a tím přispět ke vzniku rezistence. Jedním z nejvýznamnějších enzymů podílejících se na první fázi metabolizace jak protinádorových léčiv, tak také řady endogenních substrátů je komplex cytochromu P450. Je exprimován jak v játrech, tak také v dalších normálních i nádorových

tkáních. Pro inaktivaci drtivé většiny protinádorových léčiv jsou nejdůležitější zejména CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2 a CYP2D6 (Wrighton et al., 1996).

Další fází inaktivace léčiva je vazba na glutathion (GSH), glukuronovou kyselinu nebo sulfát. V případě léčiv, jejichž základem je platina, představuje vazba na GSH klíčový krok jejich inaktivace. Proces vzniku vazby s GSH je katalyzován glutathion-S-transferasou, jejíž množství bylo zvýšené u nádorových buněk karcinomu vaječníků, které byly rezistentní na cisplatinu (Green et al., 1993).

Specifické prostředí nádoru může mít významný vliv na účinnost léčby a celá řada faktorů může přispívat ke vzniku rezistence. Nádorové buňky mívají pozměněný metabolismus. Dokonce i při aerobních podmínkách upřednostňují glykolýzu jako primární zdroj ATP před oxidativní fosforylací (Warburg, 1956). Vzhledem k tomu, že glykolýza je méně efektivní při tvorbě energie, mají nádorové buňky potřebu zvýšeného příjmu glukózy, což je zajištěno zvýšenou expresí transportéru pro glukózu (Smith, 1999) a klíčových enzymů glykolýzy (DeBerardinis et al., 2008). Intenzivní glykolýza vede k produkci velkého množství laktátu (Warburgův efekt; Warburg, 1956), což činí prostředí nádorů kyselé. Vzhledem ke sníženému pH extracelulárního prostředí jsou mírně bazická léčiva (většina protinádorových léčiv) protonována a jejich transport do buňky je snížen (Mahoney et al., 2003).

Prostředí nádoru je značně heterogenní a obsahuje kromě nádorových buněk také buňky stromální (fibroblasty, buňky imunitního systému), extracelulární matrix a cévy. K rezistenci může přispívat jak interakce nádorových buněk s extracelulární matrix a stromálními buňkami, tak i interakce s různými cytokiny či růstovými faktory uvolňovanými stromálními buňkami.

Hypoxie, charakteristická pro nádorové buňky, snižuje efektivitu léčiv, jejichž aktivita je zprostředkována reaktivními kyslíkovými radikály. Vedle toho vede hypoxie k aktivaci transkripčních faktorů HIF (hypoxia-inducible factor), které indukují expresi některých ABC transportérů (Trédan et al., 2007).

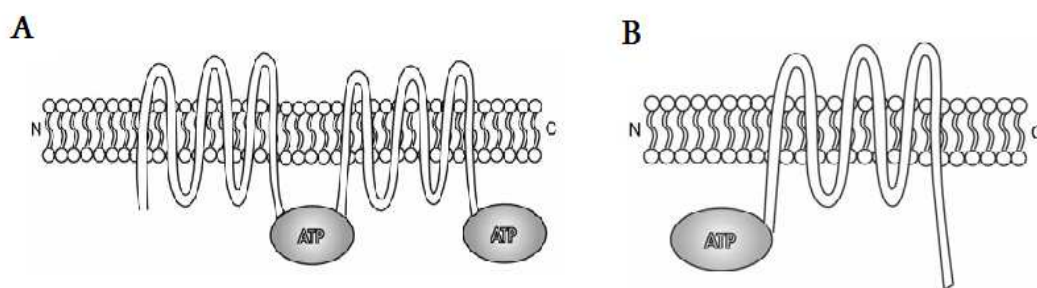
3.1.1. ABC transportéry

ABC (ATP-binding cassette) transportéry představují jednu z největších rodin transmembránových transportních proteinů nacházejících se jak v prokaryotických,

tak i eukaryotických buňkách, počínaje bakteriemi a konče člověkem. Hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech zahrnujících detoxifikaci, absorpci a sekreční procesy nebo prezentaci antigenu. U bakterií mají významnou roli při transportu esenciálních sloučenin, jako jsou ionty, cukry nebo aminokyseliny, dovnitř buňky, na druhou stranu transportují z buňky ven odpadní látky nebo antibiotika, čímž přispívají k rezistenci (Higgins, 2001).

V lidském genomu bylo na základě sekvenční analýzy a organizace ATP-vázající domény identifikováno 48 členů rozdělených do 7 skupin (ABCA-ABCG). Nacházejí se jak v cytoplazmatické membráně, tak také membránách různých organel, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum. Většinou fungují jako jednosměrné transportéry pumpující své substráty přes fosfolipidovou membránu. Nejčastěji jde o transport z intracelulárního prostředí buňky do extracelulárního, méně často pak z organel do cytoplazmy nebo z cytoplazmy do organel (Dean et al., 2001).

Celá molekula ABC transportéru obsahuje 4 domény – 2 transmembránové domény (TMD) a 2 ATP nebo nukleotid-vázající domény (NBD). Tyto 4 domény mohou být kódovány v jednom polypeptidovém řetězci (kompletní transportér) nebo mohou být rozděleny do 2 polypeptidových řetězců (poloviční transportér), přičemž je každý složen z jedné TMD a jedné NBD (obr. 12). V druhém případě musí dojít ke specifické homodimerizaci, aby se vytvořil funkční transportér (Hyde et al., 1990).



Obr. 12: Celá molekula ABC transportéru obsahuje 4 domény, 2 TMD a 2 NBD. A) Všechny 4 domény jsou kódovány v jednom polypeptidovém řetězci. B) Celý transportér je složen ze 2 polypeptidových řetězců (převzato a upraveno z Sharom, 2008).

NBD může být považována za motor připojený k různým TMD. Je zodpovědná za vazbu a hydrolýzu ATP, kterou je generována energie k transportu. Jelikož je ATP univerzální zdroj energie využívaný ABC transportéry, jsou pro NBD charakteristické určité vysoce konzervované motivy společné většině členů rodiny. NBD je tvořena dvěma subdoménami. Větší subdoména je podobná RecA

(rekombinasa A) proteinům (RecA-like subdoména). Menší subdoména je pojmenována jako helikální subdoména. Nejdůležitější části domény zahrnují Walker A (P-smyčka), Walker B motiv a region ležící mezi těmito motivy, C region neboli LSSGQ motiv. V kompletním transportéru dochází ke spojení dvou NBD a vytvoření dimeru, ve kterém Walker A jedné NBD a LSSGQ motiv druhé NBD vytváří dvě vazebná místa pro ATP (Chen et al., 2003).

TMD je sekvenčně mnohem rozmanitější než NBD vzhledem k rozdílnosti substrátů, které transportuje. Je většinou složena z 6 α -helixů (vyskytují se ale také výjimky s méně nebo více helixy) procházejícími membránou, čímž vytváří cestu pro transportované substráty. TMD navíc určuje specifitu transportéru. Podobně jako NBD také TMD vytváří dimer, který je složen ze 12 helixů (Linton, 2007).

Rodina ABC transportérů představuje rozmanitou skupinu proteinů, které plní převážně funkci transportérů. ABC transportéry transportují široké spektrum sloučenin zahrnující jak nízkomolekulární, tak vysokomolekulární látky, např. ionty, cukry, aminokyseliny, peptidy nebo lipidy (Higgins, 2001). Důležitou funkcí je ochrana tkání před cytotoxickým působením různých léků, toxinů či metabolitů. V souvislosti s transportem léků je významná zvýšená exprese některých ABC transportérů (klinicky nejdůležitější jsou ABCB1, ABCC1 a ABCG2) na povrchu nádorových buněk, které se vyznačují fenotypem MDR. U těchto buněk ABC transportéry transportují celou řadu protinádorových léčiv ven z buňky, a snižují tak jejich intracelulární akumulaci (Sharom, 2008).

ABCA podrodinu tvoří 12 transportérů, které jsou dále rozděleny do dvou skupin podle fylogenetické analýzy a struktury intronů. Intenzivně studovány byly zejména dva transportéry – ABCA1 a ABCA4. ABCA1 transportuje cholesterol a fosfolipidy (zvláště fosfatidylcholin) přes membránu do vysokodenzitních lipoproteinových částic (Oram a Heinecke, 2005). ABCA4 je exprimován v buňkách fotoreceptorů, kde pravděpodobně transportuje deriváty vitamínu A (Beharry et al., 2004).

ABCB podrodinu tvoří 11 členů a jedná se zřejmě o nejrozmanitější podrodinu ABC transportérů, která zahrnuje jak poloviční, tak kompletní transportéry transportující léčiva, specifické peptidy, lipidy nebo ionty. Jsou exprimovány v cytoplazmatické membráně, na povrchu endoplazmatického retikula i mitochondrií. ABCB1 byl první identifikovaný transportér, u kterého bylo ukázáno, že transportuje celou škálu léčiv ven z buňky a přispívá ke vzniku mnohočetné

lékové rezistence u nádorových buněk (Juliano a Ling, 1976). ABCB2 a ABCB3 jsou poloviční transportéry lokalizované v membráně endoplazmatického retikula, které transportují cytoplazmatické peptidy do lumen endoplazmatického retikula (Abele a Tampé, 1999).

ABCC podrodina zahrnuje kompletní transportéry, jejichž funkce se mezi jednotlivými členy výrazně liší. ABCC1 je jedním z transportérů, které přispívají ke vzniku rezistence u nádorových buněk. Transportuje endogenní i exogenní substráty konjugované s GSH, kyselinou glukuronovou nebo sulfátem (Sharom, 2008). ABCC7 funguje jako chloridový kanál hrající důležitou roli v exokrinní sekreci (Aleksandrov et al., 2000). ABCC8 reguluje expresi a funkci draselných kanálů slinivky břišní a tím ovlivňuje sekreci insulinu (Aguilar-Bryan et al., 1995).

ABCD podrodina zahrnuje 4 poloviční transportéry, které jsou exprimovány v membráně peroxizomů, kde fungují jako homo- nebo heterodimery regulující transport velmi dlouhých mastných kyselin (Shani a Valle, 1998).

ABCE a ABCF podrodiny představují atypické transportéry, které mají NBD podobné ostatním ABC transportérům, ale postrádají TMD. Tyto proteiny netransportují substráty přes membránu. ABCE1 se váže na specifický protein aktivovaný během infekce a tím jej inhibuje (Martinand et al., 1999). ABCF1 se váže na ribozomy a hraje pozitivní roli při iniciaci translace (Tyzack et al., 2000).

ABCG podrodinu tvoří poloviční transportéry s unikátním uspořádáním domén. NBD se nachází na N-terminálním konci a TMD na C-terminálním konci transportéru. ABCG2 je jedním z klinicky významných transportérů, které přispívají ke vzniku mnohočetné lékové rezistence u nádorových buněk tím, že transportuje protinádorová léčiva ven z buňky (Doyle et al., 1998). ABCG5 a ABCG8 hrají důležitou roli při exkreci cholesterolu a dalších sterolů z těla (Berge et al., 2000).

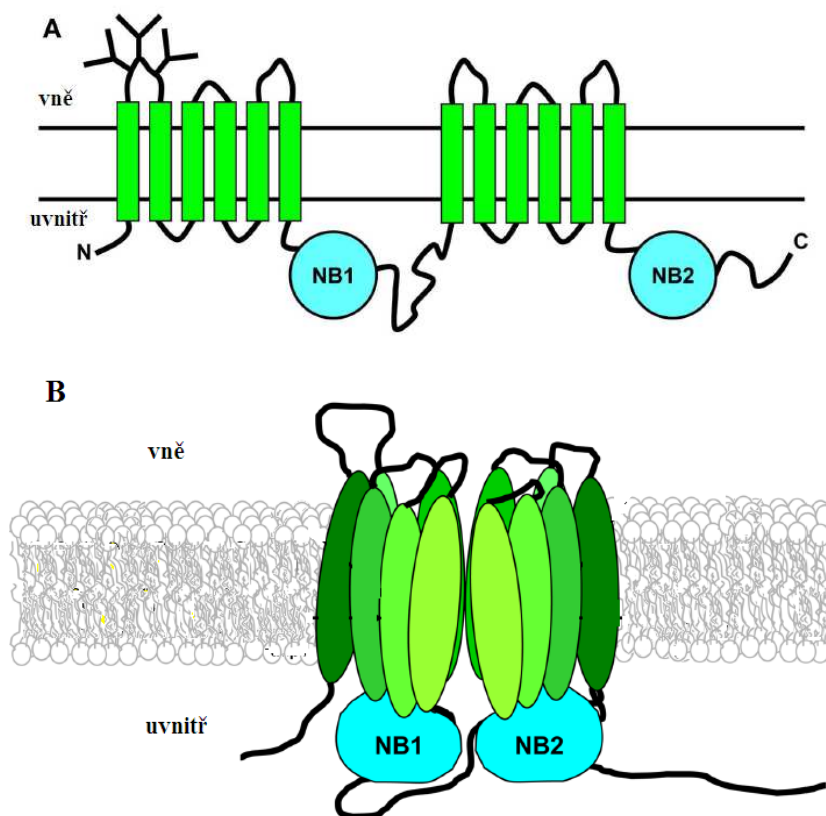
Jak již bylo zmíněno výše, některé z ABC transportérů se nemusejí přímo účastnit transportu, ale mohou mít spíše regulační úlohu. V těchto případech vede hydrolýza ATP k pohybu proteinu samotného nebo jiných proteinů, čímž dochází k regulaci iontových kanálů nebo receptorů. Vedle ABC transportérů se v eukaryotických i prokaryotických buňkách vyskytují tzv. ABC-proteiny, které se funkčně liší od ABC transportérů. Jsou to proteiny využívající energii získanou hydrolýzou ATP k procesům, které nezahrnují transport přes membránu. Tyto proteiny jsou zahrnuty v opravě DNA nebo regulaci genové exprese (Hopfner et al., 2000).

Mutace genů kodujících ABC transportéry bývají často spojeny s různými genetickými nemocemi. Vzhledem k širokému spektru fyziologických funkcí ABC transportérů bývají také nemoci spojené s poruchou funkce ABC transportérů různorodé. Mutace genu *ABCA1* je příčinou tzv. Tangierovy nemoci, která je charakterizována nedostatkem nebo absencí vysokodenzitního lipoproteinu (HDL) v plazmě a akumulací cholesterolu v makrofázích a retikulo-endotheliálních buňkách různých tkání (Brooks-Wilson et al., 1999). Dalším příkladem může být gen *ABCC7*, jehož mutace je spojena s cystickou fibrózou (Riordar et al., 1989).

3.1.1.1. ABCB1

ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, MDR1) je ATP-dependentní transmembránová pumpa. Tento 170 kDa velký protein byl poprvé objeven v roce 1976 v cytoplazmatické membráně rezistentních ovariálních nádorových buněk čínské křečka selektovaných kolchicinem, které ale vykazovaly rezistenci na několik dalších strukturně odlišných sloučenin (Juliano a Ling, 1976). Tento fenomén byl popsán jako MDR. Později bylo v celé řadě studií potvrzeno, že zvýšená exprese P-gp přispívá k rezistenci nádorových buněk na spektrum protinádorových léčiv tím, že snižuje jejich intracelulární koncentraci. P-gp se stal jedním z nejméně studovaných proteinů přispívajících k fenotypu MDR.

P-gp je členem ABCB podskupiny, která má 11 členů. Je kódovaný genem *ABCB1*, který se nachází na chromozomu 7q21. Je to typický ABC transportér složený z 1280 aminokyselin tvořících dvě homologní poloviny, které vznikly duplikací genu. Každá polovina obsahuje TMD, která je tvořena 6 transmembránovými α -helixovými šroubovicemi oddělenými hydrofilními smyčkami, a hydrofilní NBD, která se nachází na cytosolové straně membrány (obr. 13; Rosenberg et al., 2005). Spojení mezi oběma homologními polovinami je zprostředkováno pomocí spojovacího regionu (75 aminokyselin), který je nezbytný pro správnou funkci transportéru (Hrycyna et al., 1998).



Obr. 13: Struktura P-glykoproteinu. A) Schematický model P-gp, který je tvořen 2 homologními polovinami, každá složená ze 6 transmembránových segmentů a jedné NBD. B) Organizace transmembránových segmentů v cytoplazmatické membráně (převzato z Sharom, 2014).

Využitím cílených mutací bylo odhaleno, že interakce se substráty tvoří především helixy 4, 5 a 6 v N-terminální a 9, 10, 11 a 12 v C-terminální polovině domény (Loo a Clarke, 2000). Substráty se mohou v TMD vázat na různá vazebná místa (Pascaud et al., 1998; Shapiro a Ling, 1998; Shapiro et al. 1999; Martin et al., 2000). Bylo ukázáno, že jeden substrát je schopen vázat se na více vazebných míst (Chufan et al., 2013) a může být transportován více cestami (Parveen et al., 2011).

NBD P-gp vykazuje vysokou sekvenční homologii s NBD všech ABC transportérů. Pro NBD nejen P-gp jsou charakteristické určité konzervované motivy zahrnující Walker A, Walker B, C motiv (LSGGQ motiv, spojovací peptid) a smyčky A, D, H a Q. Motiv Walker A a B a motiv C jsou kriticky důležité pro hydrolyzu ATP a komunikaci mezi NBD a TMD (Vandevuer et al., 2006).

Ačkoliv je P-gp intenzivně studován již několik desetiletí, zůstávají posttranslační modifikace relativně neprobádanou oblastí. Posttranslační modifikace P-gp zahrnují N-glykosylaci a fosforylaci. Primární struktura P-gp naznačuje 10 možných míst pro N-glykosylaci. Ve skutečnosti se jedná pouze o 3 místa

nacházející se na první extracelulární smyčce spojující první a druhý transmembránový helix (Asn91, Asn94 a Asn99; obr. 13). Mutace P-gp bránící N-glykosylaci neměly vliv na transportní funkci proteinu. Byla ale pozorována snížená hladina P-gp na povrchu buněk. Proto se předpokládá, že N-glykosylace jsou nezbytné pro správné složení proteinu, stabilizaci a jeho transport na povrch buňky (Schinkel et al., 1993; Gribar et al., 2000).

Fosforylace představuje jednu z nejčastějších posttranslačních modifikací, kterou je regulována aktivita celé řady proteinů. P-gp je fosforylován protein kinasou A (PKA) a protein kinasou C (PKC). Místa, kde k fosforylaci dochází, se nacházejí na spojovacím regionu mezi oběma polovinami proteinu a zahrnují 4 serinová rezidua (Ser661, Ser667, Ser671 a Ser683; Chambers et al., 1994). Fyziologická role fosforylace ovšem zůstává značně nejasná vzhledem k množství rozcházejících se výsledků. Substituce fosforylovatelných serinů za alanin, který není fosforylován PKC ani PKA, nevedla ke změně aktivity proteinů. Fosforylace či defosforylace není tedy mechanismus vzniku rezistence (Germann et al., 1996; Goodfellow et al., 1996). Na druhé straně jsou ale publikovány práce, ve kterých defosforylace měla negativní vliv na funkci P-gp. Inhibicí PKC došlo k inhibici fosforylace P-gp, snížení aktivity P-gp a zvýšení akumulace léčiva (Gupta et al., 1996). Inhibitory PKC mohou ale přímo interagovat s P-gp. Jejich účinek může být tedy částečně připisován kompetici s transportovaným léčivem (Castro et al., 1999).

Gen *ABCB1* má velikost přes 120 kb a je tvořen 29 exony a 28 introny. Kódující oblast zaujímá méně než 5 % celkové velikosti genu (Chen et al., 1990). V genu bylo identifikováno velké množství jednonukleotidových polymorfismů, což jsou záměny jedné báze na specifickém místě v sekvenci DNA za jinou (single nucleotide polymorphism, SNP). Polymorfismy mohou ovlivnit míru exprese, konformaci nebo funkci P-gp. Některé SNP se mohou projevit změnou v sekvenci aminokyselin (nesynonymní), zatímco jiné nikoliv (synonymní).

V kódující oblasti bylo objeveno více než 50 SNP, z nichž většina se nachází v intracelulárních regionech, pouze malá část v první extracelulární smyčce a transmembránových helixech. Mezi často se vyskytující polymorfismy patří A61G, T307C, G1199A, G2677T a G2995A (Fung a Gottesman, 2009). Studie zkoumající vliv různých polymorfismů na expresi P-gp a schopnost transportu P-gp jsou ale často protichůdné. Byla hodnocena spojitost mezi C3435T na expresi P-gp. Byla pozorována jak zvýšená exprese (Nakamura et al., 2002), tak také snížená exprese

(Fellay et al., 2002). Data týkající se vlivu určitého polymorfismu na transport léčiv pomocí P-gp se také často liší (Woodahl et al., 2004; Crouthamel et al., 2006). Navíc bylo ukázáno, že určitá mutace může mít rozdílný vliv na transport různých léčiv. Substituce Phe335 za Ala vede ke zvýšení resistance buněk na kolchicin a adriamycin a snížení resistance na vinblastin a aktinomycin D v porovnání s běžnou variantou (Loo a Clarke, 1993).

P-gp je ve většině tkání exprimován na velmi nízké úrovni, proto je obtížné protein detekovat. Vzhledem k tomu, že hraje důležitou roli v ochraně tkání proti vstupu xenobiotik a při jejich vylučování, je exprimován ve větším množství na povrchu buněk hematoencefalické, testikulární a placentární bariéry, ale také v tkáních s exkretční funkcí, jako jsou ledviny nebo játra (Thiebaut et al., 1987). Kromě xenobiotik transportuje P-gp také endogenní sloučeniny. Je silně exprimován v kůře nadledvinek, kde transportuje kortikosteroidní hormony kortisol, kortikosteron a aldosteron (Ueda et al., 1992). Exprese P-gp je také detekována u hematopoetických progenitorových buněk CD34⁺, kde slouží jako ochrana proti vstupu xenobiotik do buňky a genetickému poškození. Diferenciace progenitorových buněk vede ke snížení exprese P-gp (Chaudhary a Roninson, 1991). Zvýšená exprese P-gp je pozorována na povrchu nádorových buněk s fenotypem MDR (Sharom, 2008).

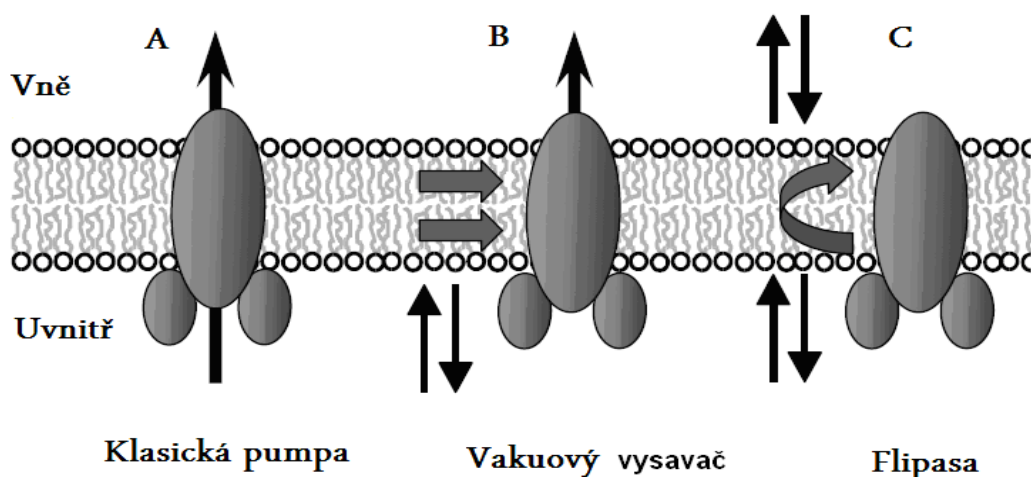
3.1.1.1.1. Mechanismus transportu

Ačkoliv je P-gp studován již řadu let, stále není detailně znám přesný mechanismus transportu. Byly však navrženy 3 modely popisující transport substrátů přes cytoplazmatickou membránu (obr. 14). Prvním je model klasické pumpy (obr. 14), podle které vytváří P-gp v membráně transportní dráhu, kterou jsou substráty čerpány z cytoplazmy do extracelulárního prostoru (Altenberg et al., 1994).

Vzhledem k faktu, že velká část sloučenin interagujících s P-gp jsou relativně nepolární, hydrofóbní a mají schopnost interkalovat do lipidové membrány, byly navrženy další dva modely transportu substrátů P-gp – model vakuového vysavače a model tzv. flipasy. Oba modely předpokládají, že transportované sloučeniny vstupují do P-gp z lipidové membrány. Podle modelu vakuového vysavače jsou substráty P-gp pumpovány z cytoplazmatické membrány přímo do extracelulárního prostoru (Higgins a Gottesman, 1992). Substráty vstupující do buňky z extracelulárního

prostředí jsou zadrženy v cytoplazmatické membráně, odkud se dostávají do vazebného místa P-gp skrz „bránu“, která se vytváří mezi transmembránovými helixy 5-8 a 2-11 (Loo a Clarke, 2005). Model byl podpořen daty ukazujícími, že fluorescenční sondy, Hoechst33342 a LDS-751, jsou transportovány z membrány přímo do extracelulárního prostředí (Shapiro a Ling, 1997; Shapiro a Ling, 1998).

Třetí model předpokládá, že P-gp pracuje jako tzv. flipasa, která transportuje hydrofóbní sloučeniny z vnitřního listu membrány do vnějšího, odkud difundují do extracelulárního prostředí (Higgins a Gottesman, 1992). Tento model vychází ze schopnosti P-gp transportovat fluorescenční lipidy (např. fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin nebo sfingomyelin) z vnitřního listu membrány do vnějšího listu (Romsicki a Sharom, 2001).



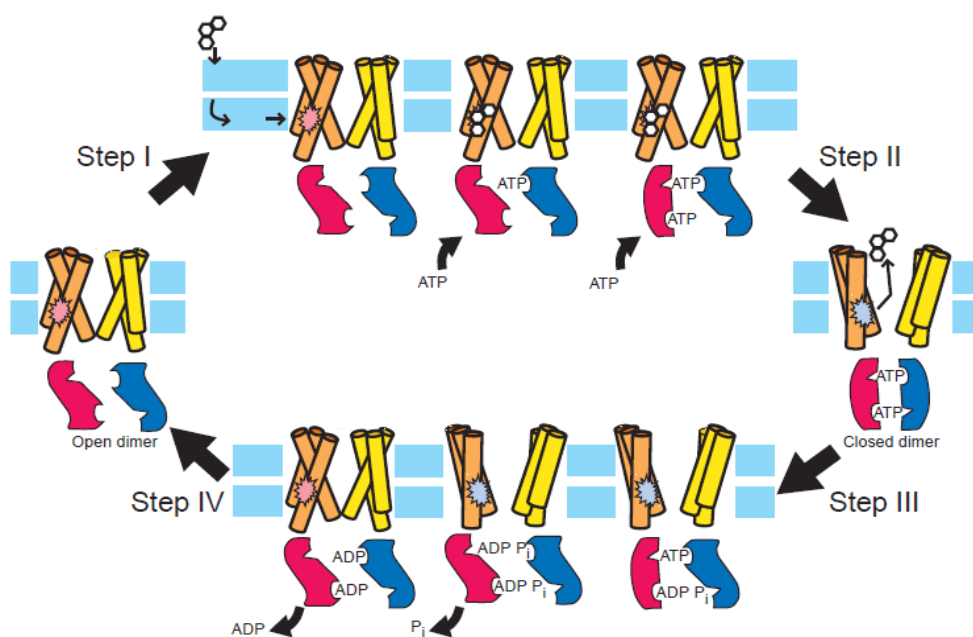
Obr. 14: Navržené modely popisující mechanismus transportu substrátů P-gp. A) Model klasické pumpy, která transportuje polární sloučeniny z cytoplazmy přímo do extracelulárního prostoru. B) Model vakuového vysavače, který transportuje hydrofóbní sloučeniny z membrány do extracelulárního prostoru. C) Model flipasy, která transportuje hydrofóbní sloučeniny z vnitřního listu membrány do vnějšího listu (převzato a upraveno z Sharom, 2008).

Přesný mechanismus, jakým probíhá transportní cyklus P-gp, ještě není do detailu znám. Je možné jej ale shrnout v několika bodech:

- a) iniciace transportu vazbou substrátu a ATP
- b) konformační změna v NBD následkem vazby/hydrolýzy ATP
- c) konformační změna TMD, která se projeví změnou vazebného místa pro substrát z vysoké afinity na nízkou
- d) obnovení původního stavu

Byly navrženy dva modely popisující sled událostí, které při transportu substrátu probíhají. Prvním modelem je tzv. ATP switch model (Higgins a Linton, 2004) a druhým je model pumpy poháněné hydrolýzou ATP (ATP hydrolysis-driven efflux pump; Sauna a Ambudkar, 2001).

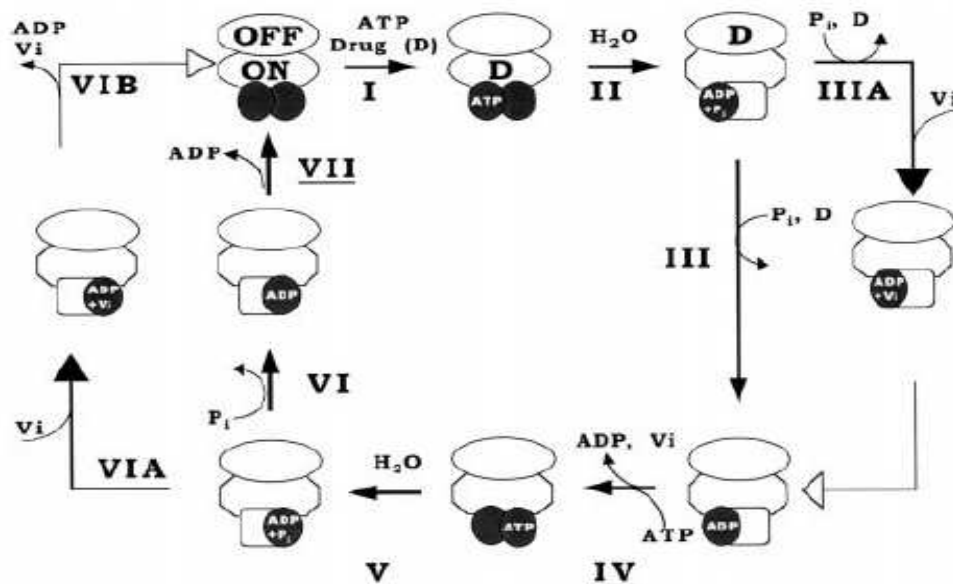
ATP switch model popisuje transport substrátu jako vícestupňový proces zahrnující komunikaci TMD a NBD přes sérii konformačních změn. Transport je zahájen vazbou substrátu do substrát-vázací domény, která má k substrátu vysokou afinitu. Poté následuje vazba dvou molekul ATP do dvou vazebných míst, která jsou vytvořena na rozhraní dvou NBD tvořící dimer. Vazbou ATP dojde k přechodu dimeru NBD z otevřeného stavu do uzavřeného. Vznik uzavřeného dimeru NBD indukují konformační změny v TMD, které vedou ke změně afinity k substrátu, jeho vystavení extracelulárnímu prostředí a následnému uvolnění. Postupná hydrolýza obou molekul ATP destabilizuje uzavřený dimer NBD a započiná obnovení původního stavu, který je dosažen po uvolnění fosfátu a následně ADP (obr. 15; Higgins a Linton, 2004).



Obr. 15: ATP switch model transportního cyklu P-gp. Cyklus je zahájen vazbou substrátu do TMD a 2 molekul ATP do NBD, po které dojde k uzavření dimeru NBD a konformačním změnám v TMD vedoucí k uvolnění substrátu. Po hydrolýze obou molekul ATP, uvolnění fosfátu a ADP se obnoví původní stav P-gp (převzato z Higgins a Linton, 2004).

Druhý model navržený Ambudkarem (ATP hydrolysis-driven efflux pump) je podobný prvnímu modelu, liší se tím, kdy dochází k hydrolýze ATP a čím je poháněn transport substrátu. Transportní cyklus začíná vazbou substrátu do TMD

s vysokou afinitou a ATP do dimeru NBD. Poté je ATP hydrolyzován, což vede ke konformační změně v TMD, snížení afinity k substrátu a jeho uvolnění. Uvolnění fosfátu a ADP je následováno vazbou druhé molekuly ATP do druhého vazebného místa v dimeru NBD. Po hydrolýze ATP a uvolnění fosfátu a ADP se P-gp vrací do původního stavu (obr. 16; Sauna a Ambudkar, 2001).



Obr. 16: Model transportního cyklu navržený Ambudkarem. Po vazbě substrátu do TMD s vysokou afinitou a ATP do NBD následuje hydrolýza ATP, konformační změny TMD a snížení afinity pro substrát, uvolnění substrátu, fosfátu a ADP. Následuje vazba druhé molekuly ATP do NBD, hydrolýza, uvolnění fosfátu a ADP a návrat P-gp do původního stavu (převzato z Sauna a Ambudkar, 2001).

3.1.1.1.2. Substráty ABCB1

P-gp transportuje široké spektrum látek, které se značně liší svojí strukturou. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 200 Da až po 1900 Da. Jedná se o organické molekuly obsahující aromatické jádro (ale jsou transportovány i nearomatické, lineární nebo cyklické molekuly), které jsou slabými bázemi s kladným nábojem (méně účinně jsou transportovány i záporně nabitě molekuly). Vzhledem ke schopnosti substrátů P-gp interkalovat do cytoplazmatické membrány, odkud jsou následně transportovány, je jejich důležitou charakteristikou hydrofóbní nebo amfipatických charakter. Transportované substráty zahrnují jak endogenní látky, kam můžeme zařadit fosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidylserin), steroidy, glykosfingolipidy, tak exogenní látky, kam patří přírodní látky, fluorescenční

barviva, antibiotika, imunosupresiva, cyklické peptidy nebo protinádorová léčiva (tab. 2; Sharom, 2008).

V posledních letech se postupně dostávají do klinické praxe nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas jako účinná a specifická léčiva proti řadě nádorových onemocnění (Arora a Scholar, 2005). Vzhledem k široké substrátové specifičtě P-gp není překvapující, že také řada těchto inhibitorů patří mezi substráty P-gp (Ozvegy-Laczka et al., 2005). P-gp tak může přispívat ke vzniku rezistence vůči těmto inhibitorům snížením jejich intracelulární koncentrace.

Mnohdy jsou ale publikovaná data rozporuplná. Bylo ukázáno, že řada inhibitorů Bcr-Abl používaných k léčbě pacientů s CML jsou transportovány P-gp. Zvýšená exprese P-gp přispívá k rezistenci leukemických buněk na imatinib (Mahon et al., 2003; Peng et al., 2012; Illmer et al., 2004), nilotinib (Mahon et al., 2008; Dohse et al., 2010) nebo dasatinib (Hegedus et al., 2009). Kromě inhibitorů Bcr-Abl je také řada dalších TKI transportováno P-gp, např. erlotinib, gefitinib, lapatinib a mnoho dalších (Mandery et al., 2011).

Na druhou stranu se objevila některá protichůdná data. Zvýšená exprese P-gp nevedla k rezistenci leukemických buněk na imatinib (Ferraro et al., 2003). V další studii nedošlo po utlumení exprese P-gp ke zvýšení citlivosti na imatinib (Zong et al., 2005). Podobné výsledky byly publikovány také pro nilotinib. Bylo ukázáno, že nilotinib není transportovaný P-gp (Davies et al., 2009). Zvýšená exprese P-gp nevedla k rezistenci na nilotinib (Hegedus et al., 2009).

Tab. 2: Substráty p-glykoproteinu (převzato ze Sharom, 2008)

Protinádorová léčiva	<i>Vinca</i> alkaloidy: vincristin, vinblastin
	Anthracykliny: daunorubicin
	Taxany: paclitaxel
	Tyrosin kinasové inhibitory
Antibiotika	Erythromycin
	Valinomycin
Steroidy	Aldosteron
Fluorescenční barviva	Calcein AM (calcein acetoxymethylester)
	Rhodamin 123
Imunosupresiva	Cyklosporin A
Přírodní produkty	Kolchicin
	Flavonoidy
Fosfolipidy	Fosfatidylcholin, fosfatidylserin
Glykosfingolipidy	Glukosylceramid

3.1.1.1.3. Inhibitory ABCB1

Zjištění, že zvýšená exprese P-gp u nádorových buněk přispívá ke vzniku MDR fenotypu vedlo k objevu nízkomolekulárních sloučenin schopných blokovat transportní aktivitu P-gp a zvýšit tak intracelulární akumulaci protinádorového léčiva. Takové sloučeniny, které jsou schopné obnovit citlivost rezistentních nádorových buněk, nazýváme inhibitory nebo modulátory P-gp. Zprvu byly testovány látky, které se již v klinické praxi hojně využívaly pro jiné farmakologické vlastnosti. Zjistilo se, že řada z nich má schopnost inhibovat aktivitu P-gp v *in vitro* podmínkách. Některé se rychle dostaly do klinického testování. Později již byly inhibitory P-gp syntetizovány a také se po rychlém *in vitro* testování dostaly do klinických zkoušek. Naneštěstí nebyl doposud nalezen žádný inhibitor, který by úspěšně prošel všemi fázemi klinických zkoušek a byl dnes používán v klinické praxi. Pro tento neúspěch může být nalezeno množství důvodů. MDR fenotyp je komplexní fenomén, na kterém se podílí řada mechanismů a inhibice pouze P-gp není dostatečná k obnovení citlivosti. Vedle P-gp se na snížené akumulaci léčiva v buňce podílí další faktory, jako je komplexnost tkáně, pH nebo intersticiální tlak (Yang et al., 2008; Amiri-Kordestani, 2012). První testované inhibitory byly málo účinné a značně toxické, což bránilo jejich aplikaci v koncentraci dostatečné k efektivní inhibici P-gp. Navíc byly málo specifické a inhibovaly také další proteiny. Ani později testované inhibitory, ač účinnější a specifitější, ale v klinických zkouškách neuspěly. Do klinických zkoušek vybírání pacienti nebyli testování, zda je u nich fenotyp MDR způsoben zvýšenou expresí P-gp, což ovšem vyžaduje spolehlivý test na stanovování míry exprese a funkce P-gp (Amiri-Kordestani et al., 2012).

Po selhání všech dosavadních klinických zkoušek se nabízí otázka, zda ABC transportéry a P-gp hrají roli při vzniku MDR fenotypu v *in vivo* podmínkách nebo nejsme jen schopni P-gp efektivně inhibovat. Aby bylo možné klinické zkoušky testující inhibitory P-gp objektivně hodnotit, je potřeba vybírat pacienty, u kterých je detekována zvýšená exprese P-gp. K tomu je nutno ovšem vyvinout kvalitní testy detekující míru exprese P-gp (Amiri-Kordestani et al., 2012).

3 generace doposud identifikovaných nízkomolekulárních inhibitorů P-gp můžeme podle inhibičního mechanismu klasifikovat jako kompetitivní nebo nekompetitivní. Kompetitivní inhibitory (první a druhá generace) soutěží

s cytotoxickým léčivem o vazebné místo v molekule P-gp stejně jako substráty. Nekompetitivní inhibitory (třetí generace) na rozdíl od kompetitivních nesoutěží o aktivní vazebné místo P-gp se substrátem, ale váží se na jiná místa P-gp a indukují konformační změny, což brání transportu substrátu a hydrolýze ATP. Vzhledem k faktu, že klinické zkoušky tří generací nízkomolekulárních inhibitorů P-gp selhaly, jsou vymyšleny další mechanismy, jak obnovit citlivost rezistentních nádorových buněk exprimujících P-gp. Jedním z možných směrů je ovlivnění mRNA použitím antisense oligonukleotidů, hammerhead ribozymů nebo siRNA. Další možností je aplikace specifických peptidů nebo protilátek inhibujících funkci P-gp či vývoj protinádorových léčiv, která nejsou transportována P-gp, nebo dokonce zabíjejí rezistentní nádorové buňky (Wu et al., 2008). Další skupinou sloučenin, která inhibuje P-gp a je v posledních letech intenzivně zkoumána, jsou nízkomolekulární TKI (Hegedus et al., 2009).

3.1.1.1.3.1. První generace inhibitorů ABCB1

První generace inhibitorů P-gp zahrnuje léčiva, která se používala již v klinické praxi pro jiné farmakologické vlastnosti. Mezi zástupce první generace můžeme zařadit blokátor Ca^{2+} kanálů verapamil, imunosupresivum cyklosporin A nebo antagonistu estrogenových receptorů tamoxifen (obr. 17). Všechny tyto látky jsou zároveň substráty P-gp a k inhibici funkce P-gp dochází tedy kompetitivním způsobem (Robert a Jarry, 2003).

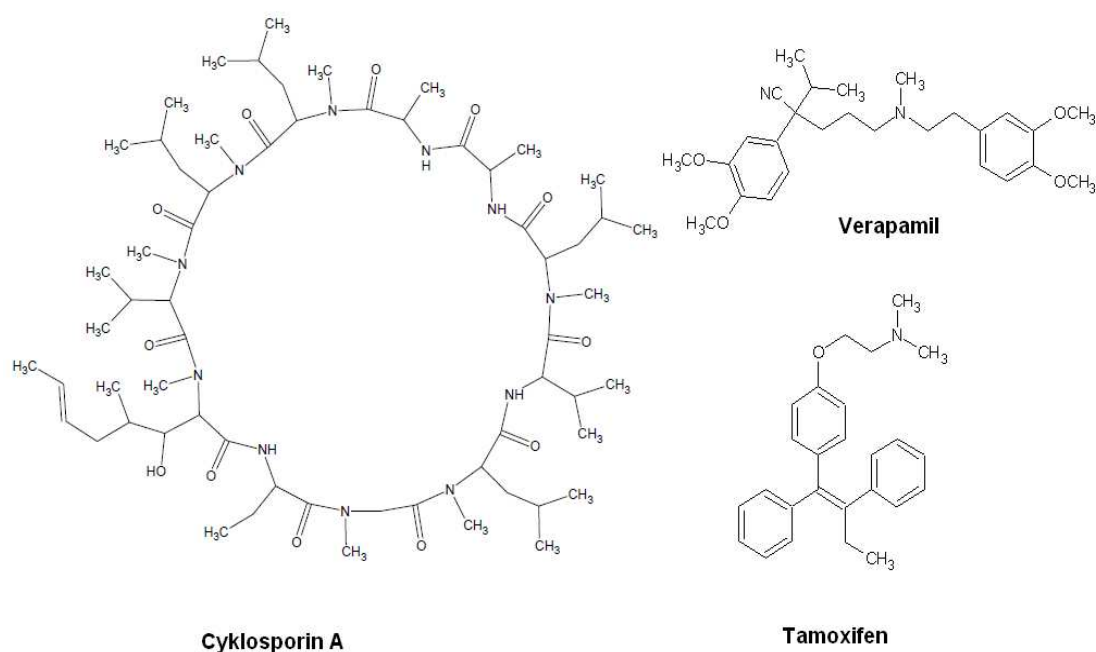
Řada inhibitorů první generace vykazovala uspokojivé výsledky v *in vitro* experimentech. Verapamil byl schopen obnovit citlivost rezistentních nádorových buněk na různá protinádorová léčiva (Tsuruo et al., 1982; Durie a Dalton, 1988). Také cyklosporin A byl schopen v *in vitro* experimentech zvrátit rezistenci nádorových buněk se zvýšenou expresí P-gp (Twentyman et al., 1987).

Klinické zkoušky neukázaly ve většině případů žádný pozitivní vliv jak cyklosporinu A, tak i verapamilu na přežití pacientů s hematologickými či solidními malignitami (Verweij et al., 1991; Sonnenveld et al., 2001; Dalton et al., 1995; Mross et al., 1993). Na druhou stranu se objevily studie ukazující pozitivní vliv těchto dvou inhibitorů na přežití pacientů. Verapamil byl schopen prodloužit celkovou dobu přežití u pacientů s karcinomem prsu rezistentních na antracyklin (Belpomme et al., 2000). Také aplikace cyklosporinu A měla pozitivní vliv na celkové přežití pacientů

s akutní myeloidní leukemií rezistentních na daunorubicin (List et al., 2001) nebo pacientů s retinoblastomem (Chan et al., 1996).

Vzhledem k faktu, že jde o kompetitivní inhibitory, bylo nutné v klinických zkouškách dosáhnout vysoké sérové koncentrace k účinné inhibici P-gp a dosažení dostatečné intracelulární koncentrace protinádorových léčiv. To vedlo k vysoké toxicitě těchto inhibitorů a vážným vedlejším účinkům.

Inhibitory první generace navíc interagují s řadou proteinů. Kromě P-gp inhibuje cyklosporin A také další lékové transportéry, např. ABCC1 nebo ABCG2 (Qadir et al., 2005). Verapamil navíc integruje s enzymy cytochromu P450, což může vést ke zpomalení biotransformace léčiv a k nepředvídatelnému zvýšení toxicity těchto léčiv (Ma et al., 2000).



Obr. 17: Strukturální vzorce cyklosporinu A, verapamilu a tamoxifenu.

3.1.1.1.3.2. Druhá generace inhibitorů ABCB1

Druhá generace inhibitorů P-gp zahrnuje deriváty inhibitorů první generace, jako jsou valspodar (analog cyklosporinu A) nebo dexverapamil (R-enantiomer verapamilu), a sloučeniny s novou strukturou, jako biricodar. V porovnání s první generací je druhá generace inhibitorů účinnější a méně toxická.

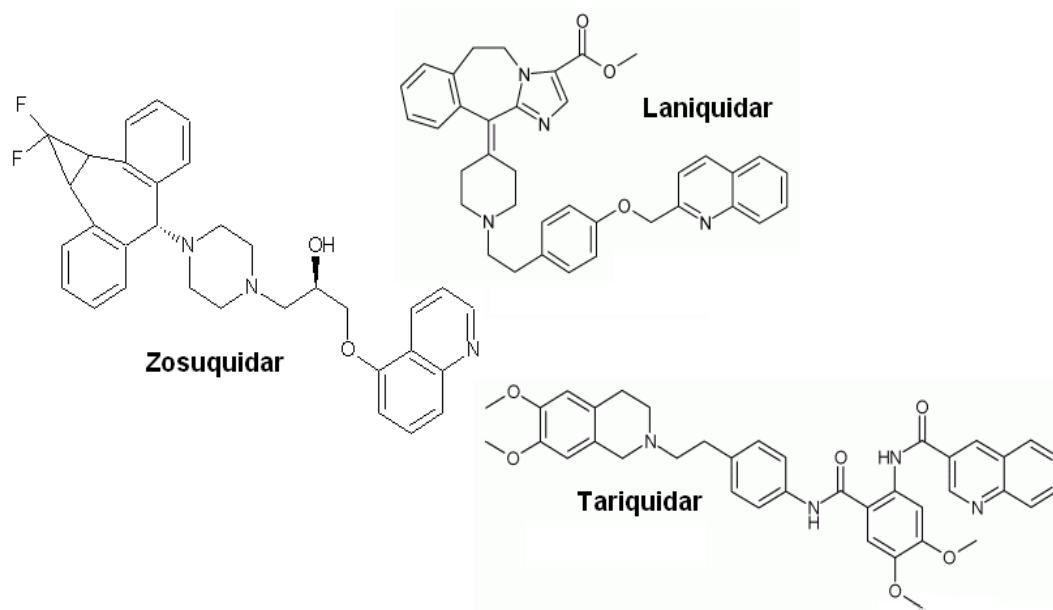
Nejstudovanějším zástupcem byl valspodar (PSC833), který v *in vitro* experimentech vykazoval 10-20krát vyšší účinnost než cyklosporin A (Boesch et al., 1991; te Boekhorst et al., 1992). V klinických zkouškách byl valspodar testován

v kombinaci s řadou protinádorových léčiv u pacientů jak se solidními, tak hematologickými malignitami. Nedosahoval nicméně uspokojivých výsledků, ačkoliv byl pro pacienty méně toxický a nebyl imunosupresivní ani nefrotoxický. Vyžadoval ale snížení dávek protinádorových léčiv. Aplikace valsopodaru v kombinaci s protinádorovým léčivem neměla ovšem pozitivní vliv na prodloužení délky přežití pacientů (Friedenberg et al., 2006; Lhommé et al., 2008; Kolitz et al., 2010).

Inhibitory druhé generace interagují kromě P-gp také s řadou dalších proteinů. Biricodar představuje nejen inhibitor P-gp, ale také MRP1 (Germann et al., 1997). Některé z inhibitorů druhé generace, jako např. valsopodar nebo biricodar, jsou substráty cytochromu P450. Kompetice mezi inhibitorem P-gp a protinádorovým léčivem o vazebné místo cytochromu P450 tak může mít nepředvídatelné farmakokinetické interakce. Valsopodar inhibuje aktivitu cytochromu P450 3A4, což má za následek zvýšení sérové koncentrace cytotoxického léčiva. To může následně vést k vážným vedlejším účinkům a ohrozit pacienta (Fischer et al., 1998). V klinických zkouškách proto bylo nutné snížit dávky léčiva (Advani et al., 2001; Minami et al., 2001).

3.1.1.1.3.3. Třetí generace inhibitorů ABCB1

Vzhledem k nevýhodám první a druhé generace inhibitorů P-gp, jako je nízká selektivita, nežádoucí toxicita nebo farmakokinetické interakce, byla potřeba vyvinout další inhibitory, které budou specificky inhibovat P-gp. Specifické techniky počítačové chemie, chemoinformatiky nebo molekulární farmakologie vedly k vývoji třetí generace inhibitorů P-gp, kam můžeme zařadit zosuquidar, elacridar, tariquidar nebo laniquidar (obr. 18).



Obr. 18: Strukturální vzorce zosuquidaru, laniquidaru a tariquidaru.

Zosuquidar je vysoce účinný nekompetitivní inhibitor P-gp, který *in vitro* obnovuje citlivost rezistentních nádorových buněk, které exprimují zvýšené množství P-gp (Danzig et al., 1996). Na rozdíl od první a druhé generace inhibitorů P-gp zosuquidar neinhibuje transportní funkci dalších členů rodiny ABC transportérů, jako jsou ABCC1 nebo ABCG2 (Shepard et al., 2003). Zosuquidar neinteraguje ani se třemi členy rodiny cytochromu P450 (CYP3A, CYP2C9 a CYP2D6), které jsou zodpovědné za metabolismus léčiv, a v koncentracích nutných k inhibici P-gp neovlivňuje jejich katalytickou aktivitu (Danzig et al., 1999).

V prvních fázích klinických zkoušek vykazoval zosuquidar slibné výsledky. Zosuquidar byl testován v kombinaci s řadou protinádorových léčiv proti solidním i hematologickým malignitám. Při léčbě solidních nádorů byl zosuquidar bezpečný, dobře snášený a neovlivňoval farmakokinetiku daunorubicinu, doxorubicinu ani paclitaxelu (Rubin et al., 2002; Sandler et al., 2004; Ruff et al., 2009). Ani při léčbě hematologických malignit, jako např. akutní myeloidní leukemie nebo nehodgkinova lymfomu, nebylo zaznamenáno ovlivnění farmakokinetiky doxorubicinu a daunorubicinu a jen mírné ovlivnění farmakokinetiky vincristinu (Lancet et al., 2009; Morschhauser et al., 2007). Třetí fáze klinických zkoušek ovšem nepotvrdila, že by podávání zosuquidaru současně se standardními chemoterapeutiky zlepšilo přežití pacientů s akutní myeloidní leukémií (Cripe et al., 2010).

3.1.1.1.3.4. Inhibitory tyrosinových kinas inhibující ABCB1

Nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas představují skupinu sloučenin, jejichž mnoho zástupců má schopnost interagovat s P-gp. V posledních letech vychází najevo, že mohou plnit i funkci inhibitorů P-gp (Shukla et al., 2012). Imatinib je schopen při vyšších koncentracích inhibovat funkci P-gp, což bylo ukázáno na nárůstu akumulace calceinu a rhodaminu 123 uvnitř buněk se zvýšenou expresí P-gp (Hamada et al., 2003). Aplikace imatinibu dokázala částečně zvrátit rezistenci na etoposid, vincristin nebo actinomycin D u epidermálního karcinomu se zvýšenou expresí P-gp (Mukai et al., 2003). Také další inhibitor Bcr-Abl, nilotinib, může při vyšších koncentracích inhibovat transportní funkci P-gp (Tiwari et al., 2009). Bylo ukázáno, že o tom, jestli imatinib či nilotinib budou schopny inhibovat P-gp, rozhoduje jejich použitá koncentrace. Při vyšších koncentracích mají imatinib a nilotinib schopnost inhibovat transportní funkci P-gp a plní tak roli inhibitorů, při nízkých se chovají jako substráty P-gp (Dohse et al., 2010; Hegedus et al., 2009).

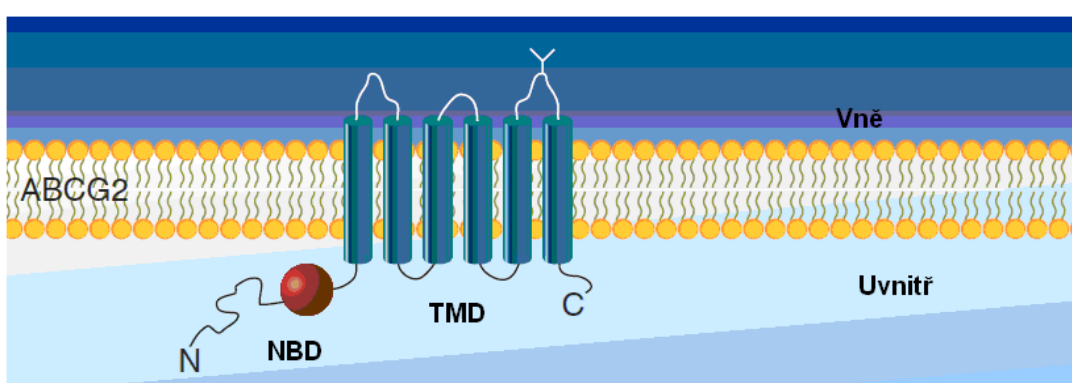
Další tyrosin kinasové inhibitory, erlotinib a gefitinib, inhibitory receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), používané na léčbu pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, také interagují s P-gp. Gefitinib i erlotinib byly schopny inhibovat funkci P-gp a obnovit tak citlivost rezistentních buněk exprimujících zvýšené množství P-gp (Yang et al., 2005; Shi et al., 2007).

3.1.1.2. ABCG2

ABCG2 transportér je členem podrodiny ABCG. Jeho účinek u nádorových buněk byl objeven v 90. letech 20. století, kdy byla u buněk karcinomu prsu selektovaných mitoxantronem (MTX) pozorována rezistence jak na MTX, tak také adriamycin a etoposid. Tyto buňky ovšem nevykazovaly zvýšenou expresi P-gp (Nakagawa et al., 1992). Později byl objeven i samotný protein, jehož gen byl naklonován nezávisle třemi skupinami, proto se v literatuře mohou objevovat jeho tři jména. První skupina získala rezistentní linii buněk karcinomu prsu selektivním působením adriamycinu a pojmenovala protein BCRP (Doyle et al., 1998). Druhá skupina objevila identický protein, který je vysoce exprimovaný v placentě, a pojmenovali jej ABCP (placenta-specific ATP binding cassette; Allikmets et al., 1998). Třetí skupina vyselekovala rezistentní linii z buněk tlustého střeva působením

MTX, proto protein pojmenovali MXR (mitoxantrone resistance protein; Miyake et al., 1999).

Gen *ABCG2* je vysoce konzervovaný a nachází se u všech obratlovců (Annilo et al., 2006). Lidský gen *ABCG2* o velikosti 66 kb se nachází na chromosomu 4q22, obsahuje 16 exonů, 15 intronů a kóduje 72 kDa veliký protein složený z 655 aminokyselin. Je tvořen jednou N-terminální NBD a jednou C-terminální TMD složenou z 6 transmembránových segmentů (obr. 19). *ABCG2* protein představuje tzv. poloviční transportér, který musí vytvořit dimer nebo tetramer, aby vznikl funkční transportér (Xu et al., 2004).



Obr. 19: Struktura transportéru *ABCG2*. Protein je tvořen jednou ATP-vázající doménou a jednou transmembránovou doménou (převzato a upraveno z Sharom, 2008).

Zvýšená exprese *ABCG2* byla detekována v celé řadě tkání, např. v placentě, játrech, prostatě, varlatech, vaječnicích, hematoencefalické bariéře nebo hematopoetických kmenových buňkách. Nižší exprese pak byla nalezena v buňkách centrální nervové soustavy, ledvinách, plicích nebo slinivce břišní (Fetsch et al., 2006).

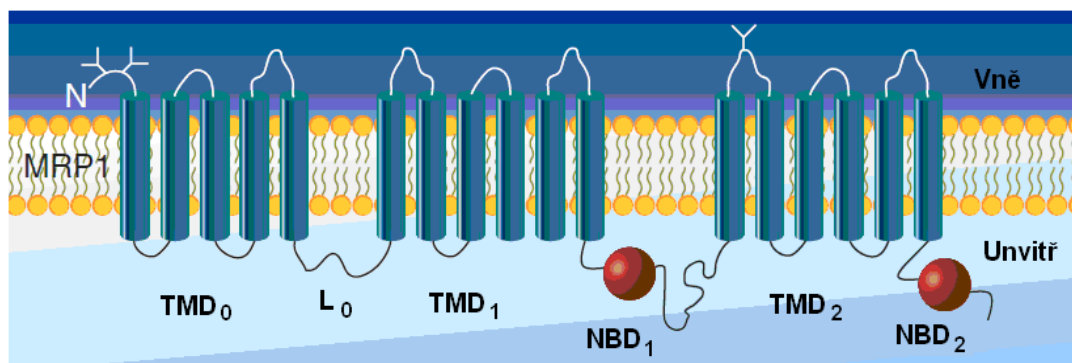
ABCG2 transportuje spektrum různých substrátů zahrnujících jak endogenní látky (riboflavin, folát, porfiriny), tak exogenní látky jako jsou antibiotika, antivirotika či protinádorová léčiva. Jednu z nejvýznamnějších studovaných skupin látek interagujících s *ABCG2* tvoří TKI, jako např. imatinib, nilotinib, dasatinib, gefitinib nebo erlotinib (Robey et al., 2009). Imatinib, nilotinib a dasatinib byly ukázány jako substráty *ABCG2* (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Hiwase et al., 2008). Navíc mohou imatinib a nilotinib působit jako inhibitory *ABCG2* (Ozvegy-Laczka et al., 2004; Tiwari et al., 2009). V případě substituce R482T nebo R482G je transport MTX mnohem efektivnější a *ABCG2* je navíc schopen transportovat i rhodamin 123 nebo doxorubicin (Robey et al., 2003).

Zvýšená exprese ABCG2 byla nalezena u velkého množství buněčných linií získaných selekcí na různých protinádorových léčivech, u kterých byl pozorován fenotyp MDR (Doyle et al., 1998; Miyake et al., 1999). U klinických vzorků je situace komplikovanější. Byla pozorována zvýšená exprese ABCG2 v blastických buňkách u části pacientů s akutní leukémií (Ross et al., 2000). Na druhou stranu byly publikovány práce, ve kterých zvýšená exprese ABCG2 u pacientů s AML pozorována nebyla (Abbott et al., 2002). U klinických vzorků solidních nádorů byla pozorována jak nízká exprese ABCG2 (karcinom prsu), tak zvýšená exprese (karcinom vaječníku nebo endometria; Diestra et al., 2002).

3.1.1.3. ABCC1

ABCC1 (multidrug resistance protein 1, MRP1) transportér patří do ABCC podrodiny, kam byl zařazen na základě primární sekvence. Byl objeven na počátku 90. let 20. století, kdy buňky malobuněčného karcinomu plic selektované doxorubicinem vykazovaly fenotyp MDR, ale neexprimovaly P-gp, ale jiný ATP-závislý transportér, který byl posléze identifikován jako ABCC1 (Cole et al., 1992; Cole et al., 1994).

Gen *ABCC1* se nachází na chromozomu 16p13.1 a kóduje glykofosfoprotein o velikosti 190 kDa tvořený 1531 aminokyselinami (Almquist et al., 1995). Protein ABCC1 má v porovnání s P-gp mírně odlišnou strukturu. Je složen ze tří TMD a dvou NBD. TMD₀ je tvořena pěti transmembránovými helixy spojenými s TMD₁ smyčkou L₀. TMD₁ a TMD₂ jsou tvořeny každá šesti transmembránovými helixy (obr. 20). Zdá se, že TMD₀ je pro funkci transportéru postradatelná. Důkazem je, že ABCC1 s deletovanou TMD₀ byl správně složen, dopraven do membrány a plně funkční (Bakos et al., 1998).



Obr. 20: Struktura transportéru ABCC1. Protein je složen ze tří TMD označených TMD₀, TMD₁ a TMD₂, spojovací smyčky L₀ a dvou NBD (převzato a upraveno z Sharom, 2008).

ABCC1 transportuje celé spektrum jak endogenních, tak exogenních substrátů, které mají hydrofobní nebo amfipatický charakter. Mohou být konjugovány s GSH, glukuronovou kyselinou nebo sulfátem. Některé ze substrátů mohou být ko-transportovány s volným GSH. Mezi substráty ABCC1 můžeme zařadit prostaglandiny nebo leukotrien C₄ jako zástupce endogenních substrátů a peptidy, pesticidy, antibiotika, fluorescenční sondy, inhibitory HIV proteas, toxiny nebo protinádorová léčiva jako zástupce exogenních substrátů (Sharom, 2008).

ABCC1 je exprimován v řadě tkání. Nejvyšší exprese se nachází v plicích, srdci, placentě, zatímco nižší v tenkém a tlustém střevě nebo mozku (Flens et al., 1996). Vedle exprese v normálních tkáních byl protein ABCC1 detekován také u různých hematologických malignit a solidních nádorů, kde přispívá ke vzniku MDR fenotypu. Zvýšená exprese byla nalezena jak v řadě rezistentních nádorových linií získaných selekcí různými protinádorovými léčivy (Cole et al., 1992), tak i v klinických vzorcích, např. v buňkách chronické lymfoblastické leukémie nebo nemalobuněčného karcinomu plic (Juszczynski et al., 2002; Chen et al., 2011). Bylo také pozorováno spojení mezi expresí ABCC1 a sníženou dobou přežití u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Chen et al., 2011) nebo karcinomem prsu (Filipitz et al., 2005).

4. Cíle dizertační práce

Připravit buňky chronické myeloidní leukemie exprimující Bcr-Abl s různou expresí *ABCB1*.

Zjistit kvantitativní vztah mezi expresí *ABCB1* a pozorovanou rezistencí leukemických buněk.

Zjistit, do jaké míry lze použít imatinib a nilotinib jako inhibitory *ABCB1*.

Zjistit, jak exprese *ABCB1* stanovovaná rutinně používanými metodami odpovídá funkci transportéru.

5. Metodické postupy

Buněčné kultury

V experimentech dizertační práce byla použita buněčna linie K562 (odvozena od chronické myeloidní leukemie) charakteristická přítomností Ph chromozomu, který způsobuje expresi fúzního onkoproteinu p210^{Bcr-Abl}. Buňky byly zakoupeny od ECACC (European Collection of Cell Cultures).

Buněčná linie K562/Dox (laskavě poskytnuta prof. J.P. Marie, University of Paris 6, Francie) je charakteristická fenotypem MDR díky zvýšené expresi P-gp. Buňky K562/Dox byly získány dlouhodobou kultivací buněk K562 v médiu se zvyšující se koncentrací doxorubicinu (detailnější charakteristika v Tang et al., 2008).

Buněčná linie K562/HHT (laskavě poskytnuta prof. J.P. Marie, University of Paris 6, Francie) je charakteristická fenotypem MDR díky zvýšené expresi P-gp. Buněčná linie K562/HHT byla získána dlouhodobou kultivací buněk K562 při zvyšující se koncentraci homoharringtoninu (HHT; Zhou et al., 1996).

Buňky K562, K562/Dox a K562/HHT byly kultivovány v médiu DMEM v poměru 1:1 obsahující 10% fetální hovězí sérum (FBS) a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml) v atmosféře obsahující 5% CO₂ při teplotě 37°C.

Buněčné linie U937 (odvozené od histiocytického lymfomu) a HL-60 (odvozené od promyelocytární leukemie) byly použity jako negativní kontrola bez přítomnosti Ph chromozomu a MDR fenotypu.

Buňky U937 a HL-60 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 obsahující 10% fetální hovězí sérum (FBS) a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml) v atmosféře obsahující 5% CO₂ při teplotě 37°C.

Stanovení počtu a viability buněk

Stanovení počtu buněk a monitorování jejich viability bylo prováděno pomocí přístroje Vi-CELLTMXR (Beckman Coulter, USA) za využití trypanové modři jako indikátoru permeability cytoplazmatické membrány při stanovování zastoupení živých a mrtvých buněk v kultuře.

Analýza exprese ABCB1 průtokovým cytometrem

Ke stanovení míry exprese P-gp v používaných buňkách bylo využito myší monoklonální protilátky UIC2 (Beckman Coulter, USA) konjugované s fykoerythrinem (UIC2-PE). Postup probíhal dle návodu výrobce. Fluorescence byla změřena na průtokovém cytometru (Cytomics FC500, Beckman Coulter, USA). Jako isotypová kontrola byl použit IgG2a konjugovaný s PE. Expese P-gp byla kvantifikována jako poměr střední hodnoty intenzity fluorescence UIC2-PE vůči isotypové kontrole (UIC2-PE/IgG2-PE). Pro každý vzorek bylo počítáno 10000 buněk.

Analýza exprese ABCB1 pomocí SDS-PAGE a Western blottingu

5×10^6 buněk bylo promyto vychlazeným roztokem PBS a lyzováno 100 μ L lyzačního pufru (50 mM Tris/HCl pufr pH 8,1, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA a 5 mM difosfát sodný) doplněného o inhibitory proteas (Roche, Německo) a fosfatas (Sigma Aldrich, USA)) po dobu půl hodiny na ledu. Extrakt byl přečištěn centrifugací (12000 rpm, 10min., 4°C) a následně byla změřena koncentrace proteinů metodou Bradfordové (Bradford, 1976). Extrakt byl naředěn vodou na koncentraci proteinů 6 μ g/ μ L, byl přidán 5 \times vzorkovací pufr (0,3 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 M dithiothreitol, 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromphenolová modř) a proteinový extrakt byl denaturován po dobu 5 minut při teplotě 95°C.

Vzorek obsahující 30 μ g proteinu byl rozdělen elektroforézou, která probíhala v 10% SDS-polyakrylamidovém dělicím gelu (pH 8,8) a 5% SDS-polyakrylamidovém zaostřovacím gelu (pH 6,8). Poté byly proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu metodou western blot. Membrány byly blokovány v 5% nízkotučném mléce v PBS s 0,1% Tween. Množství P-gp bylo detekováno pomocí primární myší monoklonální protilátky anti-P-glycoprotein, klon F4 (Sigma Aldrich, USA), která byla ředěna 1:1000. Jako referenční protein byl použit β -aktin (myší monoklonální protilátka anti- β -aktin ředěna 1:1000, Cell Signaling Technology, USA). Signál byl detekován pomocí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou (ředění 1:10000, Dako, Dánsko). Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (enhanced chmiluminesence; Amersham, Velká Británie).

Měření funkce ABCB1

Calcein acetoxymethylester (calcein AM) byl použit na ověření funkce P-gp (Holló et al., 1994). Calcein AM je substrát P-gp, který je pumpován ven z buňky. Calcein AM, který vstoupí do buňky je esterasy rychle deesterifikován na fluorescenční calcein, který již ale není substrátem P-gp. Akumulace calceinu tak nepřímo odráží aktivitu P-gp. Buněčná suspenze o hustotě 1×10^5 byla inkubována v růstovém médiu po dobu 20 min. při 37°C s 0,25 μ M calceinem AM (Molecular Probes, USA). Obsah calceinu byl kvantifikován na průtokovém cytometru (Cytomics FC500, Beckman Coulter, USA) změřením fluorescence (podmínky: λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 525 nm). Akumulace calceinu je vyjádřena jako střední hodnota fluorescence.

Stanovení buněčné proliferace a viability

Proliferace a viabilita buněk byla stanovena MTT testem již dříve popsaným Mosmannem (Mosmann, 1983).

Příprava buněk se sníženou expresí ABCB1

Buňky K562/Dox a K562/HHT se vyznačují extrémně vysokou hladinou P-gp. Aby bylo možné studovat vztah mezi expresí P-gp a rezistencí, bylo potřeba u těchto buněk snížit hladinu P-gp. K tomu byla využita technika RNA interference. Pomocí komerčně dostupného kitu byla po stabilní transfekci selektivně inhibována exprese genu *ABCB1*. Tím byly získány buňky se snižující se expresí P-gp.

Transfekce buněk byla provedena metodou elektroporace. 3×10^6 buněk (K562/Dox a K562/HHT) v exponenciální růstové fázi bylo centrifugováno (5 min., 1500 rpm, laboratorní teplota) a sediment buněk byl rozsuspendován v 200 μ L média RPMI-1640 obsahující 10% pluronic, následně bylo přidáno 10 μ g komerčně dostupného plazmidového vektoru pGeneClip (SABiosciences, USA) exprimujícího shRNA proti genu *ABCB1*. Po 10 min. inkubace buněk při 0°C v elektroporačních kyvetách (velikost štěrby 4 mm) byla provedena elektroporace (podmínky: 200 V, 800 μ F, 50 ms). Po elektroporaci byly buňky inkubovány po dobu 15 min. při 37°C a následně naředěny 1:20 čerstvým médiem bez selekčního antibiotika. Po 48 hod. inkubace byl k buněčné suspenzi přidán geneticin (G418) jako selekční antibiotikum na výslednou koncentraci 0,4 mg/ml. Jako negativní kontrola byl použit vektor s nesmyslnou sekvencí, která nebyla zaměřena na žádný lidský gen.

První selekce pomocí G418 dala vznik nehomogenní populaci buněk označených K562/Dox-SH a K562/HHT-SH. Tyto buněčné populace se vyznačovaly širokým rozpětím míry exprese P-gp. Proto jsme přistoupili k druhému selekčnímu kroku. Buňky byly rozklonovány naředěním na cca 3 buňky/ml růstového média a rozpipetovány po 200 μ l do 96-jamkové desky. Následně byly vyselektované transfektanty charakterizovány (analýza exprese P-gp a ověření funkce). Takto jsme získali velké množství klonů se sníženou expresí a funkcí P-gp získaných jak z buněčné populace K562/Dox-SH, tak K562/HHT-SH. V experimentech byly použity buňky získané z buněčné populace K562/Dox-SH označené K562/DoxDR05, K562/DoxDR1, K562/DoxDR2 a K562/DoxDR3. Z buněčné populace K562/HHT-SH získané buňky použité v experimentech byly označeny K562/HHT1, K562/HHT2 a K562/HHT3.

Izolace celkové RNA

Celková RNA byla z buněk vyizolována pomocí kitu GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma Aldrich, USA) podle návodu výrobce.

Kvantitativní real-time PCR

Celková RNA byla zbavena kontaminující DNA pomocí Dnasy za použití DNA-free™ kitu (Ambion, USA). 1 μ g RNA byl poté využit na syntézu cDNA reverzní transkriptasou se směsí náhodných hexamerů a oligo dT primerů pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kitu (Roche, Německo) podle instrukcí výrobce. cDNA následně sloužila jako templát pro kvantitativní stanovení relativní exprese genu *ABCB1* pomocí real-time PCR (qPCR) s využitím LightCycler 480 SYBR Green I Master kitu (Roche, Německo). Reakce probíhala v 10 μ l reakční směsi podle následujícího protokolu: 95°C po dobu 10 minut, 55°C po dobu 10 sekund, 72°C po dobu 20 sekund. Následovalo 45 cyklů: 95°C po dobu 10 sekund, 55°C po dobu 10 sekund, 72°C po dobu 20 sekund. Podmínky melting cycle byly od 55°C do 97°C. Byly použity následující primery: ABCB1+ 5'-GTC TGG ACA AGC ACT GAA A-3', ABCB1- 5'-AAC AAC GGT TCG GAA GTT T-3', GAPDH+ 5'-ACC TCA ACT ACA TGG TTT AC-3', GAPDH- 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' (primery syntetizovány firmou East Port, Česká republika). Gen *GAPDH* sloužil jako interní kontrola.

K výpočtu relativní genové exprese genu *ABCB1* v různých buněčných liniích byla použita metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak a Schmittgen, 2001).

Stanovení intracelulární koncentrace vybraných léčiv

Pro stanovení intracelulární koncentrace léčiva byl použit protokol vyvinutý Harrisem a van Damem (Harris a van Dam, 1968), který byl modifikován Andreassenem a spolupracovníky (Andreassen et al., 1974). Principem metody je centrifugace buněk, které byly inkubovány v médiu s léčivem, přes silikonový olej. Tím dojde k odseparování buněk a média během jednoho kroku. Je tak nahrazeno několikakrokové promývání, v jehož průběhu může dojít k úniku léčiva z buňky ven.

Buněčná suspenze o objemu 10 ml a hustotě $450-500 \times 10^3$ buněk/ml byla inkubována v růstovém médiu s různými koncentracemi vybraného protinádorového léčiva. Vybranými protinádorovými léčivy byly kolchicin (Col), daunorubicin (DNR), imatinib (STI), nilotinib (Nilo), dasatinib (Das) bez nebo s inhibitorem P-gp po dobu 5 hodin (k dosažení rovnovážné koncentrace) při teplotě 37°C. Poté byla buněčná suspenze opatrně nanášena na vrstvu silikonového oleje (AR 20 (hustota 1,01 g/ml) a AP 100 (hustota 1,06 g/ml) v poměru 1:1, Sigma Aldrich, USA) do centrifugační zkumavky a centrifugována (5000 rpm, 10 min., laboratorní teplota). Médium s olejem bylo odsáto a stěny zkumavky důkladně otřeny do sucha. Sediment buněk byl rozsuspendován ledovým extrakčním činidlem, jehož složení se lišilo podle použitého léčiva (tab. 3), a centrifugován (12000 rpm, 10 min., 4°C). Extrakt byl následně zředěn 1:10 0,2% kyselinou mravenčí (FA) (w/v) v 50% methanolu (MeOH)/voda (v/v) a koncentrace léčiva byla kvantifikována pomocí HPLC/MS/MS.

Tab. 3: Složení extrakčních činidel a jejich objemy používané při extrakci vybraných léčiv

Extrahovaná látka	Extrakční činidlo	Objem extrakčního činidla
Daunorubicin	1% FA (w/v) + 50% MeOH (v/v) ve vodě	800 μ l
Kolchicin	1% FA (w/v) + 50% MeOH (v/v) ve vodě	600 μ l
Imatinib	4% FA (w/v)	400 μ l
Nilotinib	1% FA (w/v) + 50% MeOH (v/v) ve vodě	600 μ l
Dasatinib	4% FA	600 μ l

Stanovení akumulace DNR metodou průtokové cytometrie

Ověření míry inhibice P-gp bylo provedeno pomocí akumulace daunorubicinu, který byl použit jako známý fluorescenční substrát P-gp a referenční léčivo. Byla testována schopnost vybraných inhibitorů tyrosinových kinas inhibovat transportní funkci P-gp. Zvoleny byly imatinib a nilotinib, jejichž inhibiční schopnost byla srovnávána s klasickými inhibitory P-gp (cyklosporin A a zosuquidar). K testu byly využity buněčné linie K562/Dox, K562/DoxDR3 a K562/DoxDR2. Jako kontrola sloužily buňky K562.

Buněčná suspenze o hustotě 1×10^5 byla inkubována v růstovém médiu po dobu 4 hodin při 37°C s $0,5 \mu\text{M}$ DNR a nebo $0,5 \mu\text{M}$ DNR s různými koncentracemi inhibitoru ABCB1. Poté byla na průtokovém cytometru změřena fluorescence (podmínky: λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 575 nm).

Statistická analýza

Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. Statistická významnost odchylek od průměrné hodnoty byla zjištěna Studentovým *t*-testem. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

6. Výsledky

6.1. Vztah mezi expresí *ABCB1* a pozorovanou rezistencí leukemických buněk

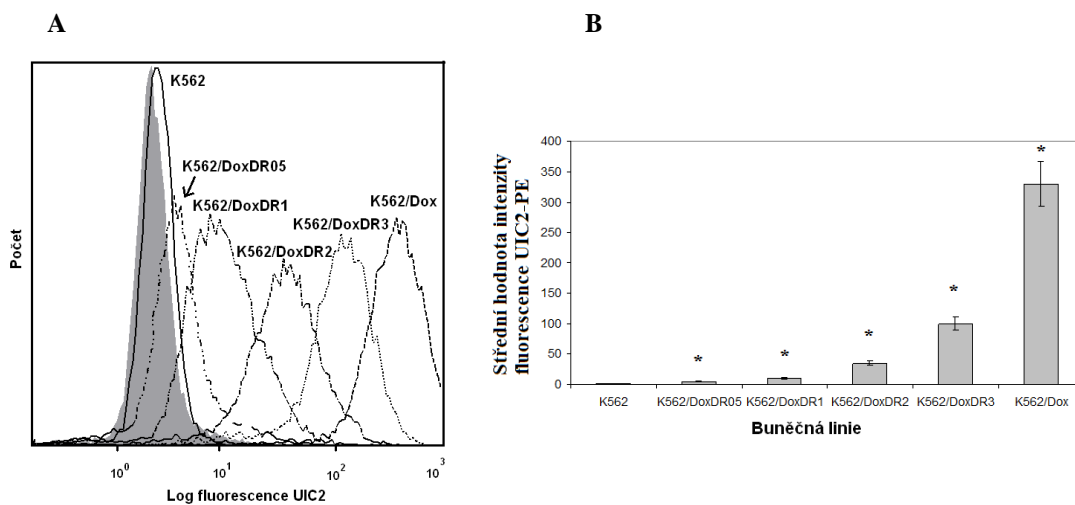
Kosztyu P, Dolezel P, Mlejnek P. 2013. Can P-glycoprotein mediate resistance to nilotinib in human leukaemia cells? *Pharmacol Res* **67**: 79-83.

Kosztyu P, Bukvova R, Dolezel P, Mlejnek P. 2014. Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Chem Biol Interact* **219C**: 203-210.

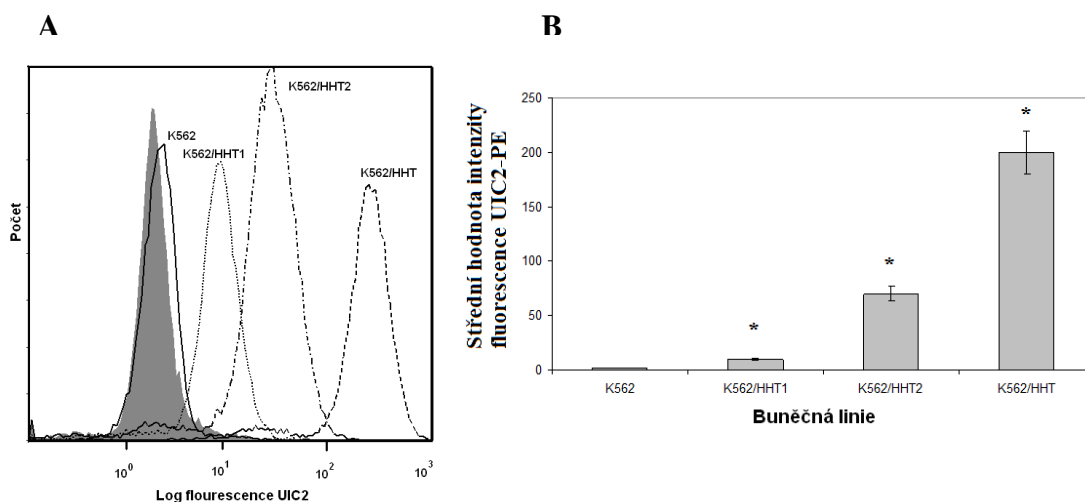
Mlejnek P., Dolezel P., Faber E., **Kosztyu P.** 2011. Interactions of N-desmethyl imatinib, an active metabolite of imatinib, with P-glycoprotein in human leukemia cells. *Ann Hematol* **90**: 837-842.

Nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas se v posledních letech začínají aplikovat jako vysoce specifická a účinná léčiva proti řadě nádorových onemocnění. Zároveň se studují jejich interakce s lékovými transportéry, zejména s P-gp. Vzhledem k široké substrátové specifitě P-gp není překvapující, že řada TKI patří k substrátům P-gp. V literatuře ovšem nepanuje v této otázce shoda a publikovaná data jsou často protichůdná. Zvýšená exprese P-gp vedla ke snížené intracelulární akumulaci imatinibu a k rezistenci buněk na imatinib. Aplikace inhibitoru P-gp pak obnovila citlivost (Mahon et al., 2004; Illmer et al., 2004). Naproti tomu bylo ovšem také publikováno, že zvýšená exprese P-gp nezpůsobuje rezistenci na imatinib (Ferraro et al., 2003; Zong et al., 2005). Podobně protichůdná data byla publikována i v případě dalšího TKI – nilotinibu. Bylo ukázáno, že zvýšená exprese P-gp je mechanismem rezistence buněk na nilotinib (Mahon et al., 2008). Další publikace ovšem ukázala, že P-gp není zodpovědný za transport nilotinibu a tím snížení jeho intracelulární akumulace (Davies et al., 2009).

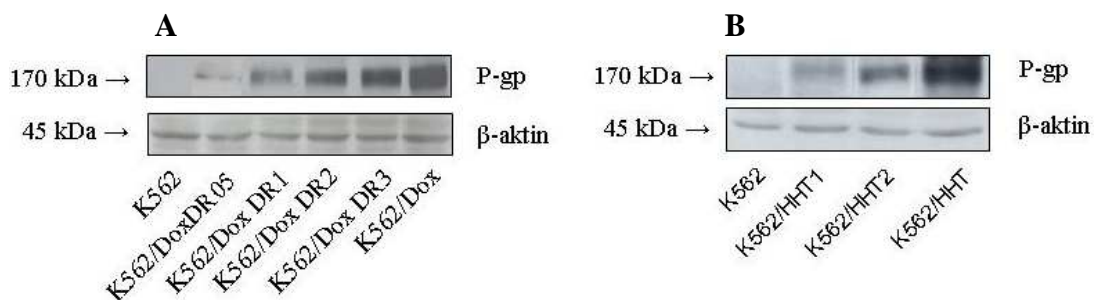
Rozporuplné výsledky v oblasti rezistence vůči TKI zprostředkované P-gp nás přiměly znovu tuto otázku otevřít. K pochopení vztahu mezi expresí P-gp a rezistencí na vybrané TKI jsme využili rezistentní leukemické buňky K562/Dox a K562/HHT, které se vyznačovaly fenotypem MDR díky zvýšené expresi P-gp (Tang et al., 2008; Zhou et al., 1996). U těchto buněk jsme cíleně potlačili expresi genu *ABCB1* technikou RNA interference. Obě buněčné linie byly stabilně transfekovány plazmidovým vektorem exprimující shRNA zaměřenou proti genu *ABCB1*. Získali jsme tak nehomogenní populace buněk K562/Dox-SH a K562/HHT-SH se sníženou expresí P-gp. Obě buněčné populace jsme následně podrobili klonální selekci a založili tak velké množství buněčných klonů se snižující se expresí P-gp. K následujícím experimentům, jejichž výsledky jsou prezentovány v této kapitole, jsme využili klony, jejichž exprese P-gp odpovídala funkci. Klony odvozené z buněk K562/Dox-SH jsme označili K562/DoxDR05, K562/DoxDR1, K562/DoxDR2 a K562/DoxDR3. Klony odvozené z K562/HHT-SH byly označeny K562/HHT1 a K562/HHT2. Snížená exprese P-gp byla ověřena jak analýzou na průtokovém cytometru (obr. 21 a obr. 22), tak také metodou western blot (obr. 23).



Obr. 21: Analýza exprese P-gp u buněčných klonů odvozených z K562/Dox-SH. Míra exprese P-gp byla detekovaná pomocí protilátky UIC2-PE a následně analyzovaná průtokovou cytometrií. A) Typický histogram. Isotypová kontrola (šedý pík), K562 (-), K562/DoxDR05 (-.-), K562/DoxDR1 (-...-), K562/DoxDR2 (-.-.), K562/DoxDR3 (...) a K562/Dox (---). B) Kvantitativní analýza exprese P-gp. Exprese P-gp byla kvantifikována jako poměr střední hodnoty intenzity fluorescence UIC2-PE vůči isotypové kontrole. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * označuje signifikantní změnu exprese P-gp mezi buňkami K562 a buňkami s různou expresí P-gp ($P < 0,05$).

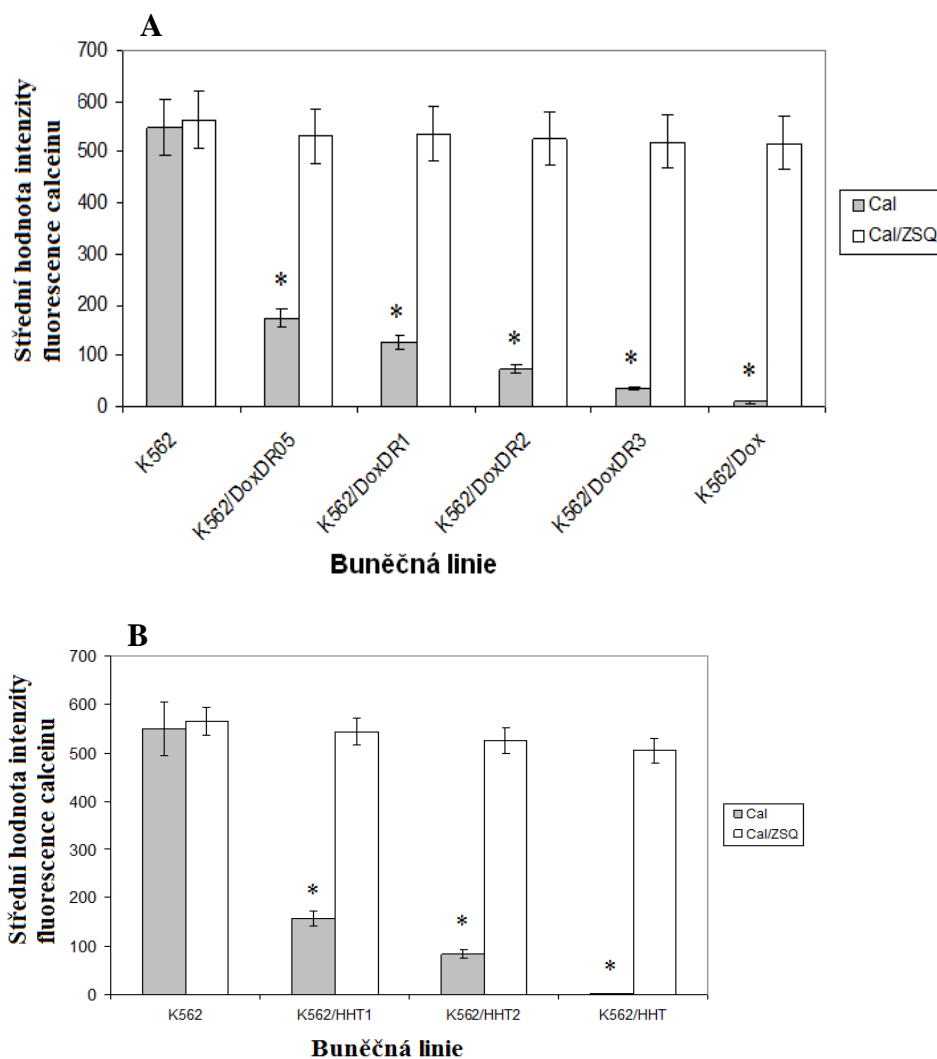


Obr. 22: Analýza exprese P-gp u buněčných klonů odvozených z K562/HHT-SH. Míra exprese P-gp byla detekována pomocí protilátky UIC2 a následně analyzována průtokovou cytometrií. A) Typický histogram. Isotypová kontrola (šedý pík), K562 (-), K562/HHT1 (...), K562/HHT2 (-.-.) a K562/HHT (---). B) Kvantitativní analýza exprese P-gp. Exprese P-gp byla kvantifikována jako poměr střední hodnoty intenzity fluorescence UIC2-PE vůči isotypové kontrole. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * označuje signifikantní změnu exprese P-gp mezi buňkami K562 a buňkami s různou expresí P-gp ($P < 0,05$).



Obr. 23: Analýza exprese P-gp metodou western blot u buněk odvozených z K562/Dox-SH (A) a z K562/HHT-SH (B). Zobrazeny typické výsledky. Referenční protein β -aktin.

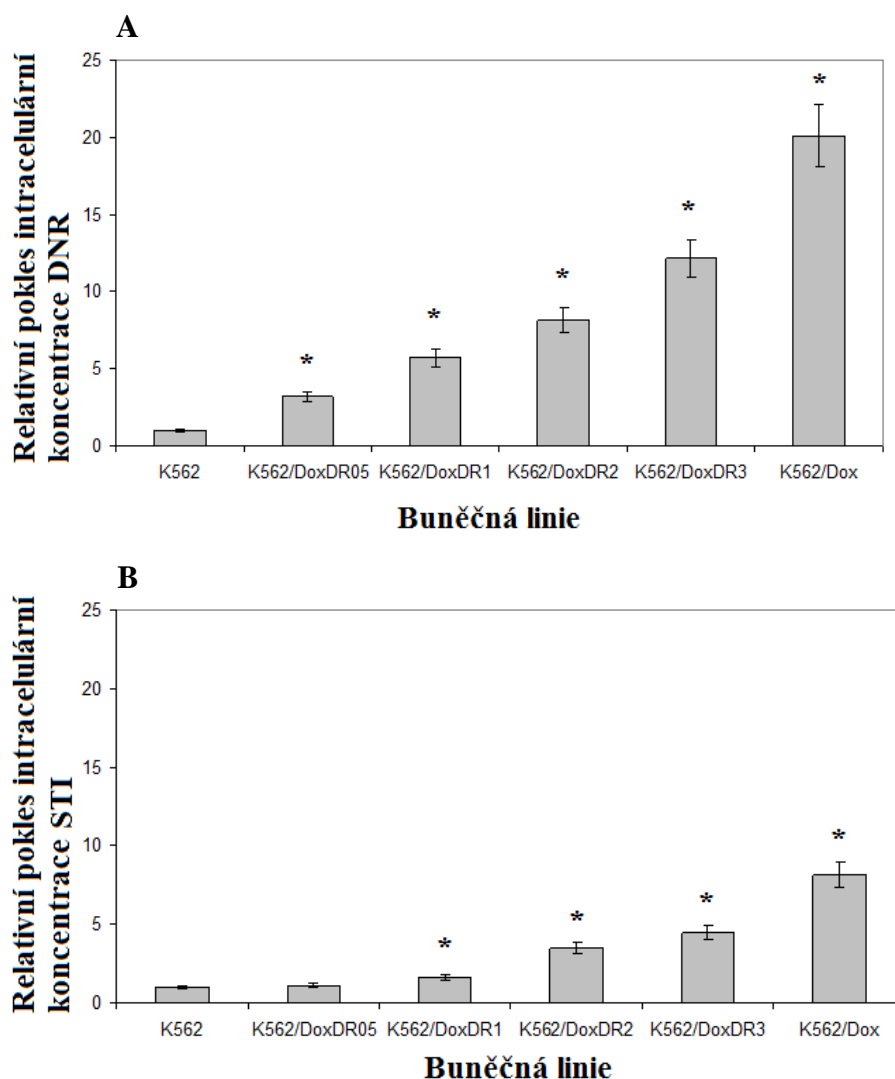
Funkce P-gp u všech použitých buněk byla ověřena na základě akumulace calceinu a následné analýzy na průtokovém cytometru. S postupným zvyšováním exprese P-gp docházelo ke snižování fluorescence a tedy nižší akumulaci calceinu uvnitř buněk. Funkce P-gp byla inhibována inhibitorem P-gp (zosuquidar (ZSQ)). U všech buněk se zvýšenou expresí P-gp (a to i u těch s nejnižší expresí) byla akumulace calceinu signifikantně snížena v porovnání s citlivou linií K562 bez měřitelné exprese P-gp (obr. 24).

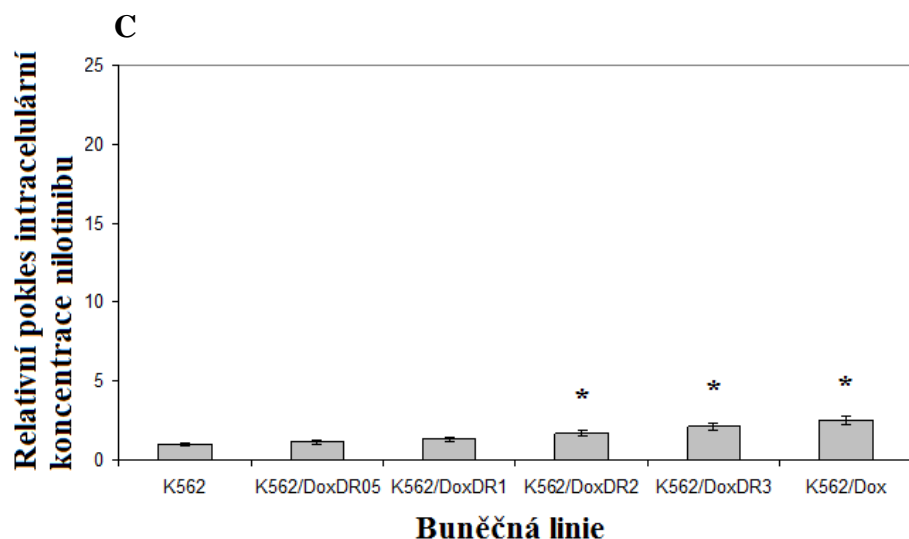


Obr. 24: Ověření funkce P-gp pomocí calceinového testu u buněčných klonů odvozených z buněk K562/Dox-SH (A) a K562/HHT-SH (B). Buňky inkubovány po dobu 20 min při 37°C s 0,2 μ M calceinem AM (šedé sloupce) nebo s 0,2 μ M calceinem AM a 0,1 μ M zosuquidarem (bílé sloupce). Množství akumulovaného calceinu je vyjádřeno jako střední hodnota intenzity fluorescence. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * označuje signifikantní změnu intenzity fluorescence calceinu mezi buňkami K562 a buňkami exprimujícími různé množství P-gp ($P < 0,05$).

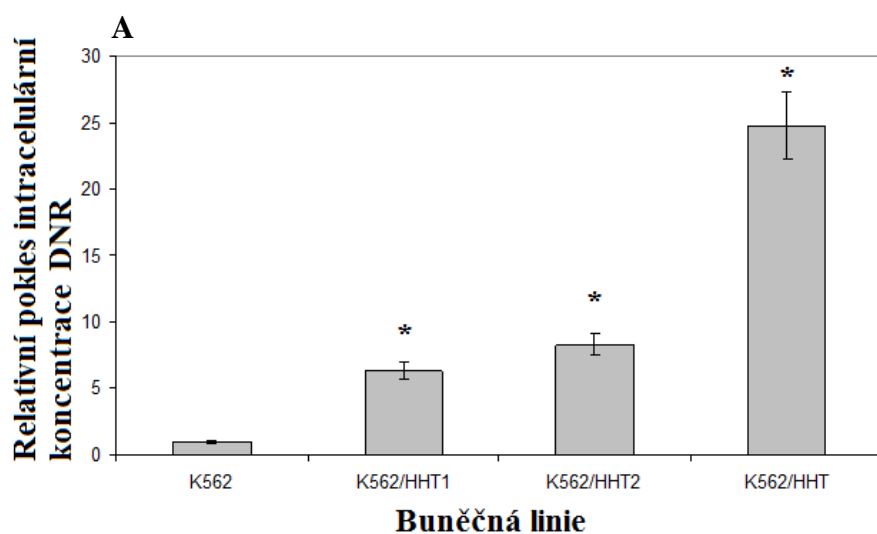
Abychom zjistili, jak souvisí míra exprese P-gp s intracelulární akumulací vybraných TKI, analyzovali jsme extrakty z buněk vystavených daunorubicinu (DNR), nilotinibu (Nilo) a imatinibu (STI). DNR patří ke známým substrátům P-gp a byl použit jako referenční léčivo. Nebylo překvapující, že jak u linie K562/Dox, tak K562/HHT došlo k dramatickému poklesu intracelulární akumulace DNR. U buněk se sníženou expresí P-gp odvozených jak z K562/Dox-SH, tak z K562/HHT-SH docházelo k nárustu intracelulární koncentrace DNR. Nicméně i buňky s nejnižší expresí P-gp K562/DoxDR05 a K562/HHT1 vykazovaly signifikantně nižší intracelulární koncentrace DNR v porovnání s citlivou linií K562. Intracelulární

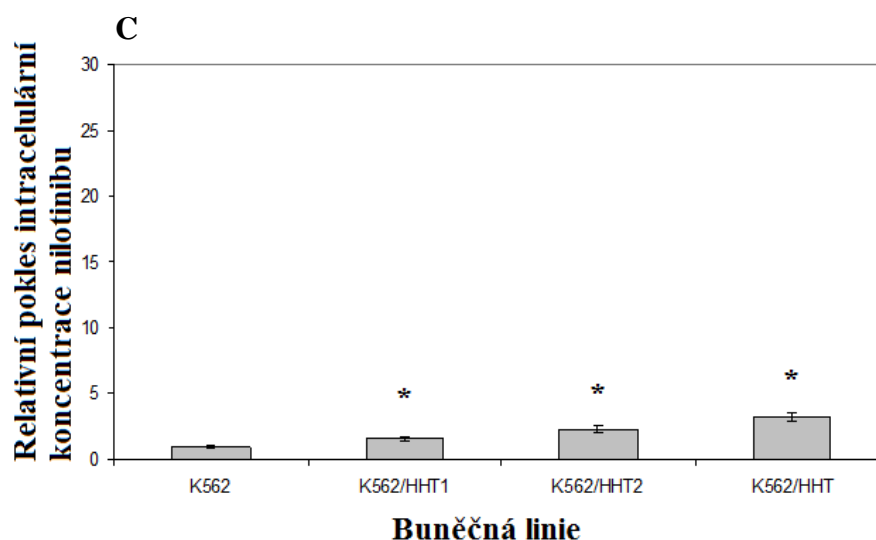
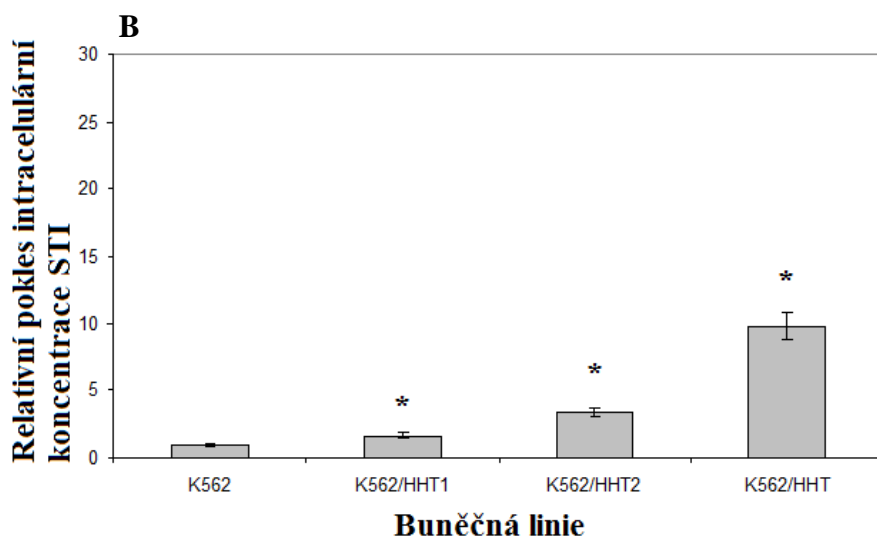
akumulace STI a nilotinibu je u rezistentních linií K562/Dox a K562/HHT také signifikantně nižší (obr. 25 a obr. 26). Podobně jako u DNR dochází se snižující se expresí P-gp k nárůstu intracelulární koncentrace. Zajímavý je ovšem fakt, že buňky s nejnižší expresí P-gp K562/DoxDR05 akumulovaly podobné množství nilotinibu a STI jako citlivá linie K562 (obr. 25). U transfekovaných buněk odvozených z buněčné populace K562/HHT-SH se nám bohužel nepodařilo vyselektovat buňky s dostatečně nízkou expresí P-gp, aby u nich intracelulární koncentrace STI a nilotinibu byly podobné jako u citlivé linie K562. Trend je nicméně podobný jako u klonů odvozených z buněk K562/Dox-SH (obr. 26).





Obr. 25: Vliv exprese P-gp na intracelulární akumulaci vybraných léčiv u klonů odvozených z K562/Dox-SH. Jako kontrola byly použity buňky K562 bez měřitelné exprese P-gp. Buňky byly inkubovány po dobu 5 hodin s DNR (A), STI (B) a nilotinibem (C). Poté byly buňky centrifugovány přes silikonový olej a buněčný sediment byl extrahován. Koncentrace léčiva byla kvantifikována pomocí HPLC/MS/MS. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu v intracelulární koncentraci daného léčiva v porovnání s buňkami K562 ($P < 0,05$).





Obr. 26: Vliv exprese P-gp na intracelulární akumulaci vybraných léčiv u linií odvozených z K562/HHT-SH. Jako kontrola byly použity buňky K562 bez měřitelné exprese P-gp. Buňky byly inkubovány po dobu 5 hodin s DNR (A), STI (B) a nilotinibem (C). Poté byly buňky centrifugovány přes silikonový olej a buněčný sediment byl extrahován. Koncentrace léčiva byla kvantifikována pomocí HPLC/MS/MS. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu intracelulární koncentrace daného léčiva v porovnání s buňkami K562 ($P < 0,05$).

Vedle vlivu exprese P-gp na intracelulární akumulaci léčiv jsme také testovali souvislost mezi expresí P-gp a cytotoxickým působením léčiv. Buněčné klony odvozené jak z K562/Dox-SH (tab. 4), tak K562/HHT-SH (tab. 5) se snižující se expresí P-gp vykazovaly snižující se rezistenci na DNR. Nicméně i buňky s nejnižší expresí K562/DoxDR05 a K562/HHT1 byly stále signifikantně rezistentní v porovnání s linií K562. Aplikace zosuquidararu zvrátila rezistenci u všech testovaných buněčných linií, což naznačuje, že rezistence byla způsobena zvýšenou

expresí P-gp. Rezistence na STI a nilotinib se také se snižující se expresí P-gp snižovala. Ovšem na rozdíl od rezistence na DNR byla u buněk s nejnižší expresí P-gp K562/DoxDR05 rezistence na nilotinib a STI srovnatelná s kontrolními buňkami K562 (tab. 4). U buněk K562/HHT1 byla rezistence na nilotinib a STI téměř srovnatelná s buňkami K562 (tab. 5).

Tab. 4: Vliv vybraných léčiv na přežití a proliferaci buněk odvozených z buněk K562/Dox-SH. A) DNR. B) STI. C) Nilotinib.

A

Buněčná linie	IC50 DNR (nM)	Faktor rezistence	DNR+ZSQ IC50 (nM)
K562	22,1 ± 3,1	1	21,0 ± 2,6
K562/DoxDR05	180 ± 30,8	8,1	20,2 ± 2,2
K562/DoxDR1	475 ± 45,8	21,6	19,4 ± 2,5
K562/DoxDR2	491,4 ± 51,7	22,3	24,1 ± 3,5
K562/DoxDR3	926,3 ± 95,2	42,1	26,8 ± 3,9
K562/Dox	3898,5 ± 436,6	177,2	30,4 ± 6,1

B

Buněčná linie	IC50 STI (nM)	Faktor rezistence	STI+ZSQ IC50 (nM)
K562	175 ± 12,2	1	170 ± 10,5
K562/DoxDR05	179 ± 10,8	1	168 ± 9,9
K562/DoxDR1	230 ± 18,5	1,3	177 ± 11,2
K562/DoxDR2	264 ± 24,7	1,5	185 ± 13,2
K562/DoxDR3	629 ± 66,6	3,6	196 ± 12,9
K562/Dox	2050 ± 169	11,7	201 ± 15,5

C

Buněčná linie	IC50 nilotinib (nM)	Faktor rezistence	Nilotinib + ZSQ IC 50 (nM)
K562	6,2 ± 0,9	1	6,1 ± 1,1
K562/DoxDR05	6,3 ± 0,8	1	6,0 ± 1,1
K562/DoxDR1	6,7 ± 1,1	1,1	5,9 ± 1,0
K562/DoxDR2	9,4 ± 1,5	1,5	5,9 ± 0,9
K562/DoxDR3	19,8 ± 3,5	3,2	6,3 ± 1,1
K562/Dox	42,5 ± 4,8	6,8	7,0 ± 1,2

Tab. 5: Vliv vybraných léčiv na přežití a proliferaci buněk odvozených z buněk K562/HHT-SH. A) DNR. B) STI. C) Nilotinib.

A

Buněčná linie	IC50 DNR (nM)	Faktor rezistence	DNR+ZSQ IC50 (nM)
K562	22,1 ± 3,1	1	21,5 ± 1,9
K562/HHT1	458 ± 35,5	20,7	23,5 ± 2,2
K562/HHT2	587 ± 5,8	26,6	23,9 ± 2,6
K562HHT	2568 ± 20,8	116,2	26,0 ± 4,1

B

Buněčná linie	IC50 STI (nM)	Faktor rezistence	STI+ZSQ IC50 (nM)
K562	175 ± 12,2	1	171 ± 11,1
K562/HHT1	258 ± 15,7	1,5	169 ± 12,5
K562/HHT2	415 ± 38,7	2,4	187 ± 13,4
K562HHT	1254 ± 108,8	7,2	201 ± 18,8

C

Buněčná linie	IC50 nilotinib (nM)	Faktor rezistence	Nilotinib + ZSQ IC 50 (nM)
K562	6,2 ± 0,9	1	5,9 ± 1,0
K562/HHT1	8,5 ± 1,1	1,4	6,0 ± 1,1
K562/HHT2	9,9 ± 1,2	1,6	6,2 ± 1,2
K562HHT	14,5 ± 1,4	2,3	6,5 ± 1,5

Diskuze

Výsledky publikované za několik posledních let jsou značně rozporuplné ohledně otázky, zda jsou imatinib a nilotinib transportovány P-gp. Mahon a spolupracovníci poprvé ukázali, že zvýšená exprese P-gp u leukemických buněk vede ke vzniku rezistence na imatinib (Mahon et al., 2000). Ke stejnému závěru dospěla řada dalších skupin (Illmer et al., 2004; Dohse et al., 2010; Peng et al., 2011). Na druhou stranu jiné studie ukazují, že zvýšená exprese P-gp nezpůsobuje rezistenci na imatinib nebo že snížení exprese P-gp neobnovuje citlivost na imatinib (Ferraro et al., 2003; Zong et al., 2009). Podobně nekonzistentní výsledky byly

publikovány také v případě rezistence na nilotinib, kdy bylo ukázáno, že zvýšená exprese P-gp je příčinou rezistence (Mahon et al., 2008; Dohse et al., 2010), tak také že zvýšená exprese P-gp nevede k rezistenci (Davies et al., 2009; Hegedus et al., 2009).

Rozdílné výsledky dosažené různými skupinami mohou být způsobeny celou řadou faktorů. Ačkoliv P-gp transportuje přes membránu stovky strukturně odlišných látek, každá je transportována s různou účinností, což závisí její struktuře. Dokonce i velmi malý rozdíl ve struktuře látky může mít na účinnost transportu velký vliv, jak bylo ukázáno na případě imatinibu a jeho metabolitu, N-desmethyylimatinibu, které se liší pouze jednou chybějící methylovou skupinou na N-desmethyylimatinibu. I přes velkou strukturní podobnost byl N-desmethyylimatinib transportován mnohem účinněji a zdá se tak být lepším substrátem (Mlejnek et al., 2011). Podobným případem může být také transport DNR, imatinibu a nilotinibu. Účinnost transportu DNR, imatinibu a nilotinibu se u rezistentních linií liší, což se následně odráží také v rozdílné citlivosti na tyto látky (tab. 4 a tab. 5).

Účinnost transportu silně závisí na expresi P-gp. Při hodnocení, zda je daná látka substrátem P-gp a je tedy transportována P-gp či nikoliv, a zda buňky exprimující P-gp jsou rezistentní na danou látku, je nutné také hodnotit expresi P-gp na úrovni proteinu. Je nutné poznamenat, že různé skupiny používají rezistentní buňky získané odlišnými postupy. Většina *in vitro* experimentů je prováděna na rezistentních buňkách se zvýšenou expresí P-gp, které byly získány dlouhodobou kultivací citlivých buněk v médiu v přítomnosti cytotoxické látky (Zhou et al., 1996; Tang et al., 2008). Některé skupiny ovšem využívají také rezistentní linie se zvýšenou expresí P-gp získané transfekcí citlivých linií cDNA exprimující *ABCB1* (Ferrao et al., 2003). Jak se již dříve spekulovalo (Rumpold et al., 2006), je otázkou, jaká je u těchto transfekovaných buněk míra exprese P-gp v porovnání s buňkami dlouhodobě kultivovanými v přítomnosti cytotoxické látky.

Naše výsledky jasně naznačují, že závěr, zda P-gp způsobuje rezistenci a transportuje danou látku, silně závisí na míře exprese P-gp (Kosztyu et al., 2013; Kosztyu et al., 2014). Buňky s nejvyšší expresí P-gp signifikantně snižují intracelulární koncentraci DNR, imatinibu i nilotinibu (obr. 25). S postupným snižováním exprese P-gp dochází k vyšší akumulaci všech tří látek. Nicméně buňky s nejnižší expresí P-gp, ač signifikantně snižovaly intracelulární koncentraci DNR v porovnání s citlivou linií K562, nebyly schopny snížit intracelulární koncentraci

imatinibu či nilotinibu (obr. 25). Podobné výsledky byly dosaženy také v případě rezistence. S postupným snižováním exprese P-gp docházelo ke snižování rezistence buněk na DNR. Nicméně i buňky s nejnižší expresí P-gp byly stále signifikantně rezistentní na DNR v porovnání s citlivou linií K562, zatímco u imatinibu a nilotinibu došlo k obnovení citlivosti (tab. 4 a tab 5). Z našich výsledků vyplývá, že „dobré“ substráty P-gp, jako např. DNR, jsou účinně transportovány i z buněk s velmi nízkou expresí P-gp, zatímco „špatné“ substráty, jako imatinib nebo nilotinib, již buňky s nízkou expresí nejsou schopny transportovat. Ačkoliv jsme nebyli schopni pozorovat rozdíly v citlivosti a intracelulárních akumulací imatinibu a nilotinibu mezi buňkami citlivými K562 a K562/DoxDR05, neznamená to, že by se při změnách podmínek rozdíly neprojevíly. Je možné, že při delší inkubaci buněk s imatinibem nebo nilotinibem bychom byli schopni naměřit rozdíly v citlivosti i mezi buňkami K562 a K562/DoxDR05.

V literatuře je ovšem těžké porovnávat expresi P-gp u buněk použitých v experimentech různých vědeckých skupin. Mahon a spolupracovníci použili v experimentech buňky K562/Dox a ukázali, že P-gp transportuje nilotinib (Mahon et al., 2008). Stejně buňky jsme použili také my v našich experimentech a náš závěr ohledně transportu nilotinibu je stejný. Můžeme také konstatovat, že exprese u těchto buněk je velmi vysoká. Na druhou stranu buňky použité Hegedus a spolupracovníky, kteří tvrdí, že P-gp netransportuje nilotinib, jsou odlišné a data v publikaci naznačují, že exprese P-gp u těchto buněk je nízká (Hegedus et al., 2009). Ferrao a spolupracovníci použili při testování transportu imatinibu pomocí P-gp buňky transfekované, které signifikantně snižovaly intracelulární akumulaci DNR, ale nevykazovaly rezistenci na imatinib (Ferrao et al., 2003), podobně jako v našem případě buňky K562/DoxDR05, jejichž exprese P-gp byla velmi nízká. Další dvě skupiny vycházely z buněk získaných dlouhodobou kultivací citlivých buněk v přítomnosti cytotoxické látky a obě ukázaly, že buňky se zvýšenou expresí P-gp jsou rezistentní na imatinib (Mahon et al., 2000; Illmer et al., 2004). Další skupina používající také buňky K562/Dox ukázala jejich rezistenci na imatinib. Dále použili techniku RNA interference k potlačení exprese P-gp u buněk K562/Dox. U transfekovaných buněk pak pozorovali obnovení citlivosti na imatinib (Rumpold et al., 2005).

Naše výsledky naznačují, že rozporuplné výsledky v literatuře týkající se schopnosti P-gp transportovat imatinib a nilotinib, mohou být způsobené rozdílnou

expresí P-gp buněk použitých v experimentech. Ukázali jsme, že hodnocení, zda P-gp zprostředkovává rezistenci na imatinib a nilotinib, závisí silně na míře exprese P-gp. Buňky s velmi vysokou expresí P-gp byly na imatinib a nilotinib rezistentní. Na druhou stranu u buněk s velmi nízkou expresí P-gp nebyla v porovnání s citlivou linií pozorována rezistence. Ačkoliv jsme nestudovali míru exprese P-gp vyskytující se v klinických vzorcích, domníváme se, že buňky s nízkou expresí P-gp lépe odpovídají fyziologickým podmínkám.

Ze všech rozporuplných výsledků vyvstává otázka, která již byla v literatuře vznesena (Amiri-Kordestani et al., 2012), jakým způsobem hodnotit expresi ABCB1. Různé skupiny míru exprese ABCB1 stanovují různými metodami (průtoková cytometrie, western blot, real-time PCR), z čehož pak pramení problém, jak expresi mezi jednotlivými skupinami porovnávat. Jak jsme ukázali, exprese ABCB1 je klíčovým faktorem, pro posouzení, zda P-gp způsobuje rezistenci na dané léčivo.

6.2. Stanovení exprese genu *ABCB1* a odhad funkce *in vitro*

V první části výsledků bylo naznačeno, že o tom, jaká je účinnost transportu P-gp daného léčiva, rozhoduje míra exprese P-gp. Je proto nutné správně stanovit míru exprese P-gp. Výsledky z *in vitro* experimentů potvrzují obecnou shodu, že P-gp může způsobit lékovou rezistenci (Gottesman et al., 2002). V *in vivo* podmínkách je ovšem situace komplikovanější. Vliv exprese P-gp na rezistenci nádových buněk vůči protinádorovým léčivům je stále kontroverzní otázkou. V řadě studií nebyl nalezen vztah mezi expresí P-gp a klinickou rezistencí (Amiri-Kordestani et al., 2012).

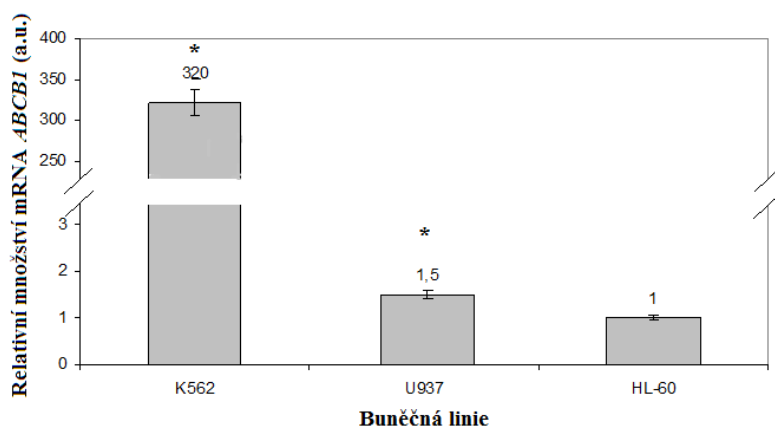
Vysvětlením pro rozporuplná data získaná z *in vivo* a někdy i *in vitro* experimentů může být různost metod a postupů zvolených ke stanovení míry exprese P-gp (Beck et al., 1996) a v neposlední řadě i složitost fenoménu MDR, který nelze redukovat pouze na přítomnost P-gp (Gottesman et al., 2002).

Jelikož se využívá jak v *in vitro* experimentech, tak u klinických vzorků řada metod, které zahrnují western blot, průtokovou cytometrii nebo kvantitativní real-time PCR (Szakács et al., 1998), je právě díky této rozmanitosti použitých metod velmi obtížné srovnat expresi P-gp u buněk používaných různými vědeckými skupinami. Často se navíc stává, že je exprese *ABCB1* detekována pouze jednou metodou, ať už na úrovni mRNA nebo proteinu, a následně se stanovuje korelace mezi expresí *ABCB1* a pozorovanou rezistencí nebo klinickým výsledkem (Zöchbauer et al., 1997; Kakihara et al., 1999; Baytekin et al., 2011). Je tedy na místě otázka, zda je jednoduchá korelace dostačující.

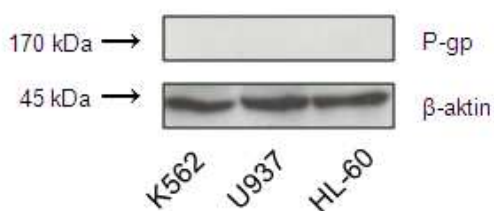
V naší práci jsme se proto pokusili zaměřit na to, zda míra exprese *ABCB1* odráží funkci transportéru.

U klinických vzorků, ale i v *in vitro* experimentech, je ke stanovení exprese genu *ABCB1* díky své přesnosti a specifitě často používanou metodou kvantitativní real-time PCR (qPCR). Porovnali jsme míru exprese *ABCB1* na úrovni mRNA u tří buněčných linií - K562 (bcr-abl pozitivní), U937 a HL-60 (bcr-abl negativní). Zjistili jsme, že buňky K562 exprimovaly 320krát vyšší hladinu mRNA genu *ABCB1* než buňky HL-60 a 213krát než buňky U937 (obr. 27). Na základě zjednodušeného přístupu používaného v literatuře by se dal předpokládat také rozdíl na úrovni proteinu a funkce. Linie K562 s největší expresí mRNA genu *ABCB1* nevykazovala

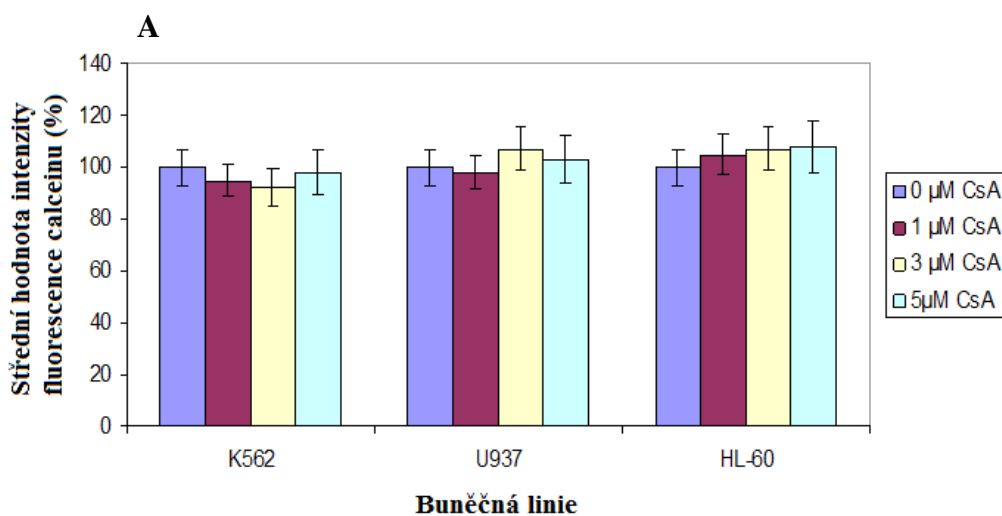
na úrovni proteinu žádnou měřitelnou expresi ABCB1, která byla detekována metodou western blot (obr. 28). Ani na úrovni funkce ABCB1 nebyl pozorován rozdíl mezi jednotlivými liniemi (obr. 29).

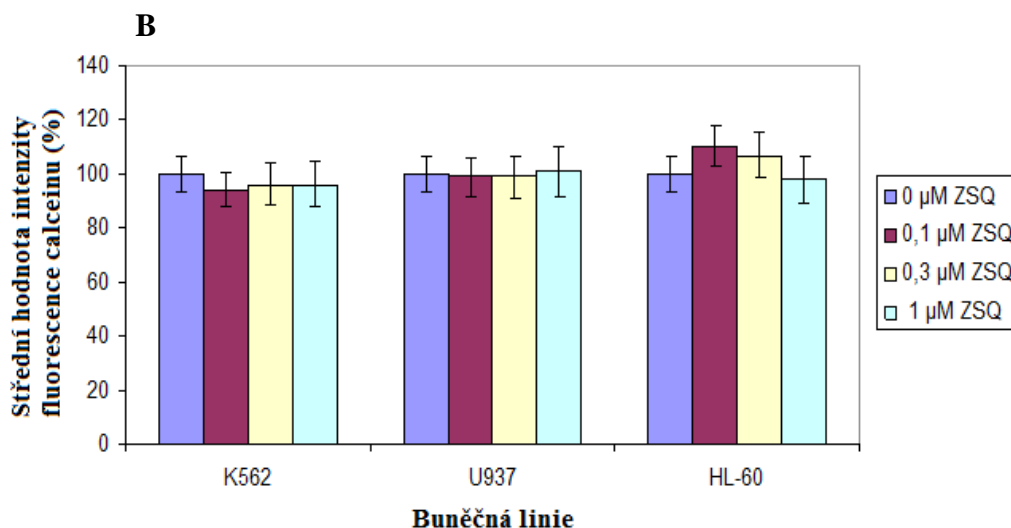


Obr. 27: Analýza exprese mRNA genu *ABCB1* u buněk K562, U937 a HL-60. Pro monitorování relativního množství mRNA byla použita metoda qPCR. Jednotlivé sloupce představují relativní nárůst mRNA genu *ABCB1* v porovnání s buňkami HL-60. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * vyjadřuje signifikantní změnu exprese v porovnání s expresí buněk HL-60 ($P < 0,05$).



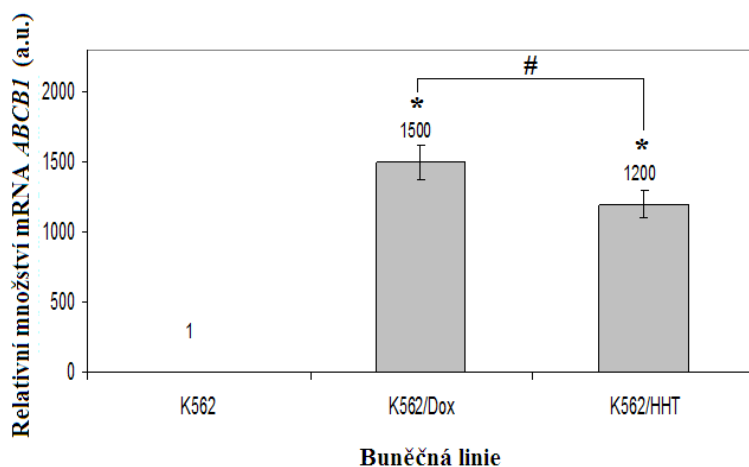
Obr. 28: Analýza exprese P-gp u buněk K562, U937 a HL-60 metodou western blot. Referenční protein β -aktin. Zobrazen typický výsledek.





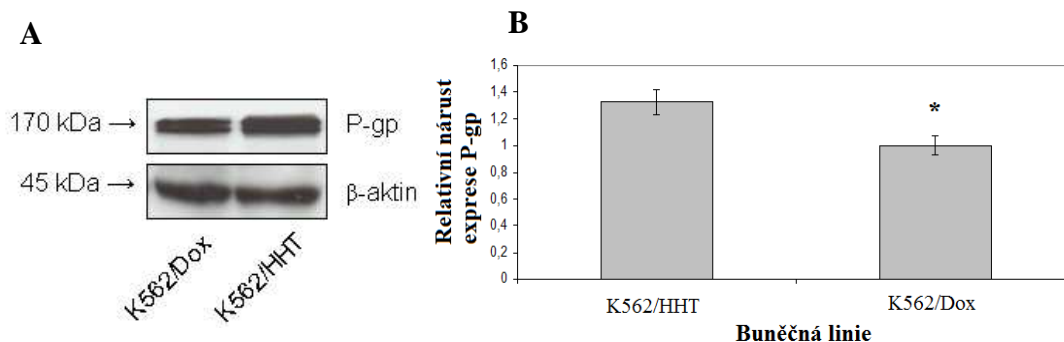
Obr. 29: Analýza funkce P-gp pomocí akumulace calceinu u buněk K562, U937 a HL-60. Buňky byly inkubovány po dobu 20 min. při 37°C s 0,2 μM calceinem AM a různými koncentracemi inhibitorů P-gp. Poté byla změřena fluorescence. Množství akumulovaného calceinu je vyjádřeno v procentech. 100 % odpovídá střední hodnotě intenzity fluorescence akumulovaného calceinu u dané buněčné linie bez aplikace inhibitoru P-gp. A) Cyklosporin A. B) Zosuquidar. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou.

Buňky K562/Dox a K562/HHT byly další buněčné linie, u kterých jsme našli nesrovnalosti při analýze exprese *ABCB1* a jeho funkce. Metodou qPCR jsme provedli analýzu relativního množství mRNA genu *ABCB1*. Linie K562/Dox exprimovala signifikantně vyšší hladinu mRNA genu *ABCB1* než linie K562/HHT (obr. 30). Exprese mRNA genu *ABCB1* u linie K562/HHT dosahovala přibližně 80 % v porovnání s linií K562/Dox.

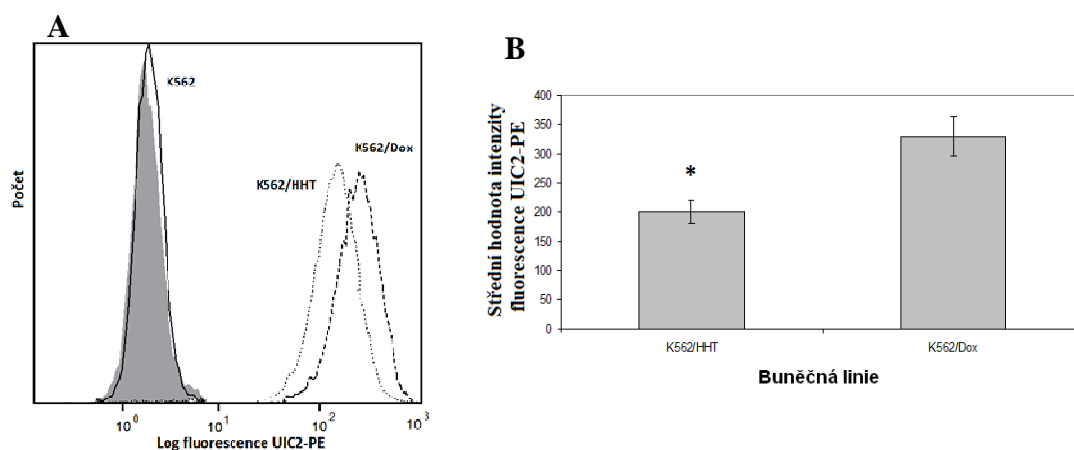


Obr. 30: Analýza exprese *ABCB1* na úrovni mRNA u buněk K562/Dox a K562/HHT metodou qPCR. Jako kontrola byly použity buňky K562 bez měřitelné exprese P-gp. Jednotlivé sloupce představují relativní nárůst množství mRNA genu *ABCB1* v porovnání s buňkami K562. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu v množství mRNA genu *ABCB1* mezi linií K562 a liniemi K562/Dox a K562/HHT ($P < 0,05$). # představuje signifikantní změnu v množství mRNA genu *ABCB1* mezi liniemi K562/Dox a K562/HHT ($P < 0,05$).

Následně jsme u obou linií analyzovali expresi ABCB1 na úrovni proteinu metodami western blot a průtokové cytometrie. Metodou western blot jsme detekovali signifikantně vyšší expresi ABCB1 u linie K562/HHT (obr. 31). Průtokovou cytometrií jsme ovšem detekovali signifikantně vyšší expresi ABCB1 u linie K562/Dox (obr. 32).



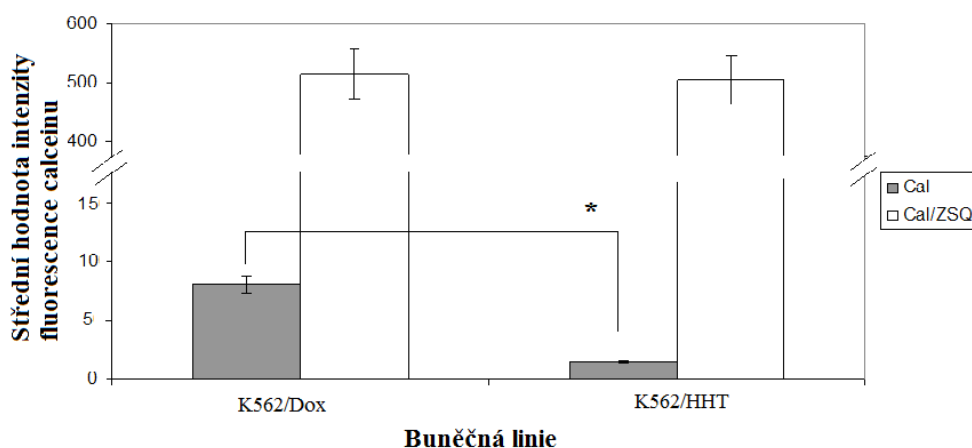
Obr. 31: Analýza exprese P-gp u buněk K562/Dox a K562/HHT metodou western blot. A) Typický výsledek. Referenční protein β -aktin. B) Průměrné densitometrické vyhodnocení ze tří nezávislých měření se standardní dochytkou. * představuje signifikantní změnu v expresi P-gp mezi liniemi K562/Dox a K562/HHT ($P < 0,05$).



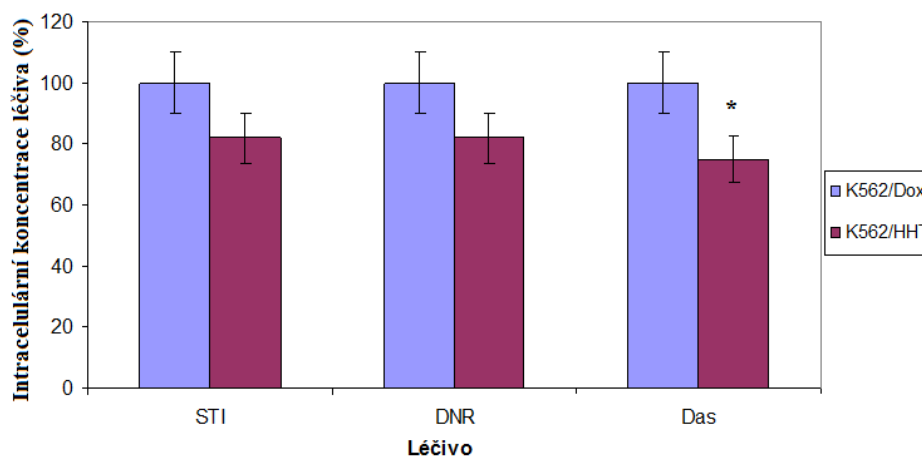
Obr. 32: Analýza exprese P-gp u buněk K562/Dox a K562/HHT metodou průtokové cytometrie. A) Typický histogram. Isotypová kontrola (šedý pík), K562 (-), K562/HHT (...) a K562/Dox (---). B) Kvantitativní analýza exprese P-gp. Expresce P-gp byla kvantifikována jako poměr střední hodnoty intenzity fluorescence UIC2-PE vůči isotypové kontrole. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu v expresi P-gp mezi linií K562/Dox a K562/HHT ($P < 0,05$).

Funkční analýza pomocí akumulace calceinu odhalila signifikantně vyšší aktivitu transportu u linie K562/HHT (obr. 33). Kromě akumulace calceinu jsme funkci P-gp ověřili také stanovením intracelulární koncentrace několika protinádorových léčiv. Analyzovali jsme extrakty buněk K562/Dox a K562/HHT, které byly inkubovány s daunorubicinem, imatinibem a dasatinibem. Intracelulární

akumulace dasatinibu byla u buněk K562/HHT signifikantně nižší než u buněk K562/Dox, intracelulární akumulace imatinibu a daunorubicinu byla u buněk K562/HHT pouze mírně nižší (obr. 34). Tyto výsledky naznačují vyšší transportní aktivitu P-gp u buněk K562/HHT, což naznačuje také vyšší expresi P-gp, kterou jsme detekovali metodou western blot (obr. 31).

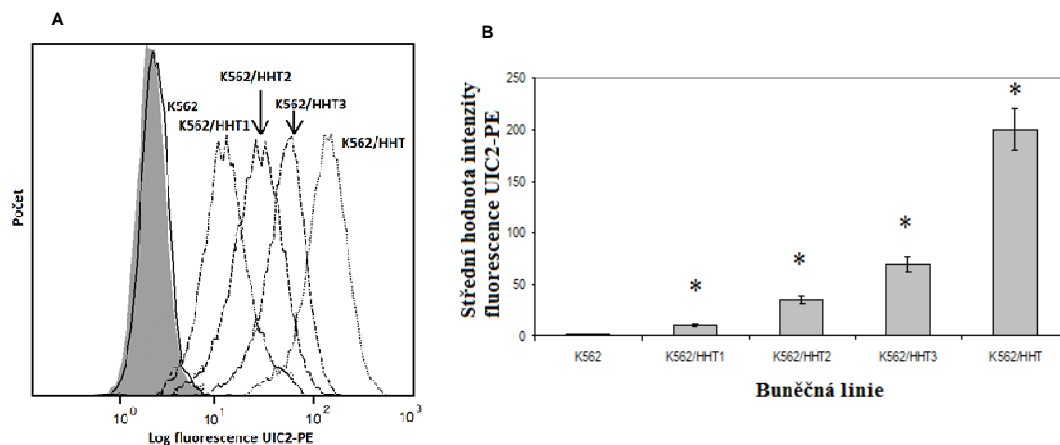


Obr. 33: Analýza funkce P-gp pomocí calceinového testu u buněk K562/Dox a K562/HHT. Buňky byly inkubovány s 0,2 μM calceinem AM (šedé sloupce) nebo s 0,2 μM calceinem a 0,1 μM ZSQ (bílé sloupce). Množství akumulovaného calceinu je vyjádřeno jako střední hodnota intenzity fluorescence. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * označuje signifikantní změnu střední hodnoty fluorescence calceinu mezi buňkami K562/Dox a K562/HHT ($P < 0,05$).



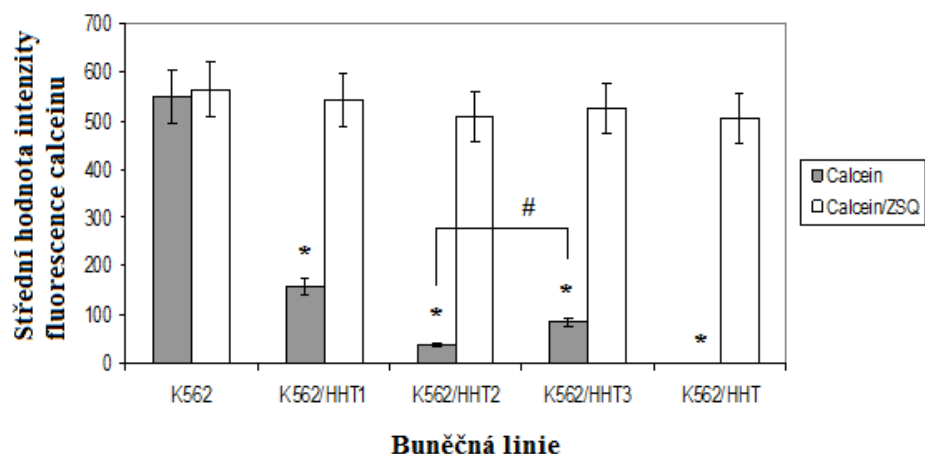
Obr. 34: Porovnání intracelulárních koncentrací vybraných léčiv u buněk K562/Dox a K562/HHT. Buňky byly inkubovány po dobu 5 hodin s léčivem. Poté byly centrifugovány přes silikonový olej a buněčný sediment byl extrahován. Koncentrace léčiva byla kvantifikována pomocí HPLC/MS/MS. Intracelulární koncentrace daného léčiva v buňkách K562/Dox je znázorněna jako 100 %, u buněk K562/HHT jde o procentuální podíl v porovnání s K562/Dox. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu intracelulární koncentrace daného léčiva mezi buňkami K562/Dox a K562/HHT.

Další buňky, u kterých jsme našli nesrovnalosti mezi expresí ABCB1 a funkcí, byly buňky odvozené z K562/HHT-SH. Ty jsme označili K562/HHT1, K562/HHT2 a K562/HHT3. Míra exprese ABCB1 na úrovni proteinu byla nejdříve ověřena metodou průtokové cytometrie (obr. 35).



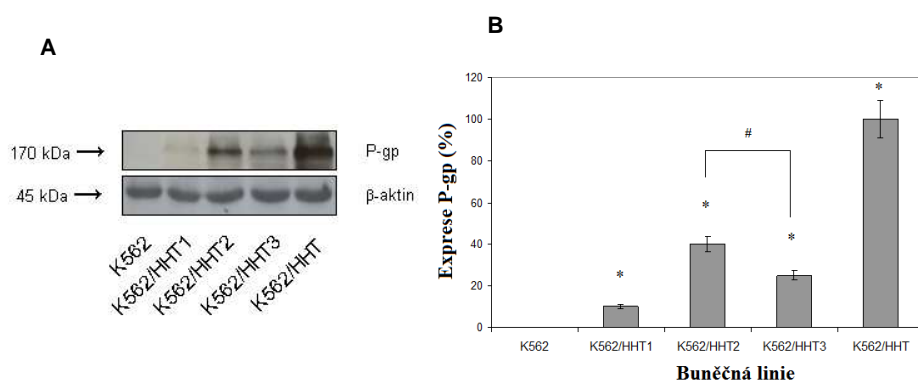
Obr. 35: Analýza exprese P-gp metodou průtokové cytometrie u buněk se sníženou expresí P-gp odvozených z buněčné populace K562/HHT-SH. A) Typický histogram. Isotypová kontrola (šedý pík), K562 (-), K562/HHT1 (-...-), K562/HHT2 (---), K562/HHT3 (-.-.) a K562/HHT (...). B) Kvantitativní analýza exprese P-gp. Exprese P-gp byla kvantifikována jako poměr střední hodnoty intenzity fluorescence UIC2-PE vůči isotypové kontrole. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu exprese P-gp v porovnání s linií K562 ($P < 0,05$).

Funkce P-gp byla opět ověřena pomocí akumulace calceinu (obr. 36). Buňky byly uspořádány v grafu podle vzestupné exprese ABCB1, která byla naměřena průtokovou cytometrií. U námi vyselektované sady buněk můžeme pozorovat s rostoucí expresí ABCB1 snižující se fluorescenci calceinu. U buněčného klonu K562/HHT3 dochází ovšem, v porovnání s klonem K562/HHT2, k nečekanému nárůstu fluorescence. Vzhledem tomu, že průtokovou cytometrií byla vyšší exprese ABCB1 naměřena u klonu K562/HHT3, očekávali bychom u tohoto klonu nižší akumulaci calceinu. Výsledky nicméně naznačují, že skutečná exprese ABCB1 u klonu K562/HHT3 by mohla být nižší než u klonu K562/HHT2.



Obr. 36: Analýza funkce P-gp pomocí calceinového testu u buněk K562/HHT1, K562/HHT2, K562/HHT3 a K562/HHT. Jako kontrola byly použity buňky K562 bez měřitelné exprese P-gp. Množství akumulovaného calceinu je vyjádřeno jako střední hodnota intenzity fluorescence. Buňky byly inkubovány s 0,2 μ M calceinem (šedý sloupec) nebo 0,2 μ M calceinem a 0,1 μ M ZSQ (bílý sloupec). Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * označuje signifikantní změnu střední hodnoty fluorescence calceinu mezi buňkami K562 a buňkami exprimujícími různé množství P-gp ($P < 0,05$). # představuje signifikantní změnu střední hodnoty fluorescence mezi buňkami K562/HHT2 a K562/HHT3 ($P < 0,05$).

Na základě rozporuplné korelace mezi expresí P-gp, která byla naměřena průtokovou cytometrií, a funkcí P-gp u buněčných klonů odvozených z buněk K562/HHT-SH, byla provedena analýza exprese P-gp metodou western blot. Na rozdíl od průtokové cytometrie ukázala metoda western blot vyšší expresi P-gp u buněk K562/HHT2 v porovnání s buňkami K562/HHT3 (obr. 37). Výsledky získané metodou western blot tak více korespondovaly s funkční analýzou.



Obr. 37: Analýza exprese P-gp u buněk K562/HHT1, K562/HHT2, K562/HHT3 a K562/HHT metodou western blot. Referenční protein β -aktin. A) Typický výsledek. B) Průměrné denzitometrické vyhodnocení ze tří nezávislých experimentů se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu exprese P-gp mezi buňkami K562 a buňkami s různou expresí P-gp ($P < 0,05$). # představuje signifikantní změnu exprese P-gp mezi buňkami K562/HHT2 a K562/HHT3 ($P < 0,05$).

Diskuze

Stanovení exprese proteinů je důležité v celé řadě oblastí. V případě ABCB1 je nezbytná přesná detekce míry exprese jak v *in vitro* experimentech, tak i u klinických vzorků. V předchozí kapitole bylo naznačeno, že míra rezistence u leukemických buněk závisí na míře exprese ABCB1 (Kosztyu et al., 2013; Kosztyu et al., 2014). Zvolení vhodné metody je proto velmi důležité a může tak ovlivnit přesnost dosažených výsledků a jejich interpretaci. Na rozporuplných výsledcích týkajících se různých aspektů P-gp je patrné, že doposud nebyl problém metodiky stanovení exprese ABCB1 uspokojivě vyřešen.

Ačkoliv byla již dříve metodická otázka řešena (Beck et al., 1996; Huet et al., 2005), stále se opakuje problém, který dle našeho názoru přispívá k rozporuplným výsledkům. Tím je přílišné zjednodušení hodnocení exprese ABCB1 a jeho příspěvku k pozorované rezistenci u nádorových buněk. V literatuře se objevuje množství prací s jednoduchou korelací mezi expresí *ABCB1* (jak na úrovni mRNA, tak proteinu) a rezistencí (nebo klinickým výsledkem) jak u hematologických malignit, tak také u solidních nádorů (Zöchbauer et al., 1997; Kakiyama et al., 1999; Baytekin et al., 2011).

Často používanou metodou měření exprese *ABCB1* je jak v *in vitro* experimentech, tak i u klinických vzorků qPCR, která představuje velmi citlivou techniku pro měření exprese *ABCB1* na úrovni mRNA. Problémem metody je, že nám množství mRNA genu *ABCB1* neposkytuje dostatečné informace o množství proteinu a jeho funkci. V naší práci jsme ukázali, že buňky K562 exprimují velké množství mRNA genu *ABCB1* v porovnání s buňkami U937 nebo HL-60 (obr. 27). Při použití zjednodušeného přístupu by se dala předpokládat zvýšená exprese proteinu u buněk K562. Nicméně, na úrovni proteinu jsme nepozorovali zvýšenou expresi ABCB1, což ovšem může souviset s kvalitou protilátky. Ani transportní funkce u buněk K562 se nelišila od zbývajících dvou linií (obr. 28 a obr. 29). Problémem metody qPCR je její velká citlivost. Můžeme pak nalézt případy, kdy není na úrovni proteinu ani funkce pozorován rozdíl, přesto lze na úrovni mRNA detekovat signifikantní změnu.

Dalším příkladem může být porovnání exprese genu *ABCB1* u buněk K562/Dox a K562/HHT. Buňky K562/Dox exprimují větší množství mRNA genu *ABCB1* (obr. 30). Funkce P-gp je ovšem vyšší u buněk K562/HHT. Vysvětlením by mohla být regulace exprese genu *ABCB1*. Bylo pozorováno, že

exprese *ABCB1* je regulována ve dvou oddělených krocích - mRNA stabilizací a iniciací translace (Yague et al., 2003). Rozdílná exprese na úrovni mRNA nemusí nutně odrážet rozdíl na úrovni proteinu (Grandjean et al., 2001). Stanovovat expresi *ABCB1* podle množství mRNA genu *ABCB1* může být zavádějící bez použití další metody.

Vzhledem k výše popsaným problémům stanovení exprese *ABCB1* na úrovni mRNA se zajímavě jeví použití monoklonálních protilátek k měření exprese na úrovni proteinu metodami western blot, průtokové cytometrie, imunocytochemie nebo imunohistochemie. Průtoková cytometrie je citlivou a jednoduchou metodou ke stanovení exprese P-gp u hematologických malignit. Na trhu je dostupné množství protilátek proti P-gp (MRK16, MRK17, C219, JSB-1, 265/4F, UIC2, F4 a další; Okochi et al., 1997). V naší práci jsme použili protilátku UIC2 konjugovanou s fykoerythrinem (UIC2-PE) rozpoznávající extracelulární epitop proteinu. Ukázali jsme, že měření vysokých (obr. 32) a středních (obr. 35) expresí P-gp nemusí vždy odpovídat funkci proteinu a může být tedy zavádějící odvozovat vliv exprese P-gp naměřené pouze průtokovou cytometrií na rezistenci. Nevýhodou protilátky UIC2-PE je, že její vazba na protein je ovlivněna konformací P-gp (Mechetner et al., 1997). Ani další protilátky ovšem nejsou ideální. Použití protilátky MRK16 při předpovědi rezistence bylo méně spolehlivé než funkční analýza pomocí rhodaminu 123 (Pallis a Das-Gupta, 2005). Protilátka JSB1 zase kromě P-gp reaguje s pyruvát karboxylasou (Rao et al., 1995).

Na výše zmíněných příkladech jsme demonstrovali, že metoda průtokové cytometrie není vždy zcela spolehlivá. Spolehlivější metodou se nám zdála být v našem případě metoda western blot za použití protilátky F4, ačkoliv sama o sobě je časově náročnější než průtoková cytometrie. Vzhledem k malému počtu testovaných vzorků nechceme navrhnout, že metoda western blot je nejideálnější.

Naše výsledky naznačují, že použití jen jedné metody pro stanovení exprese *ABCB1*, ať již na úrovni proteinu nebo mRNA, nemusí vždy věrohodně odrážet funkci transportéru ani v dobře definovaném *in vitro* systému. Proto je vhodnější míru exprese *ABCB1* jak v *in vitro* podmínkách, tak i v klinických experimentech stanovovat komplexněji, hlavně na úrovni proteinu, eventuálně i na úrovni mRNA. Vedle toho je nezbytné ověřit funkci proteinu použitím specifické fluorescenční sondy a/nebo reálného léčiva.

6.3. Inhibice ABCB1 vybranými tyrosin kinasovými inhibitory

Nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas představují zajímavou skupinu sloučenin, jejíž řada členů má schopnost interagovat s ABC transportéry, např. ABCB1 nebo ABCG2 (Shukla et al., 2012). Imatinib a další TKI dokázaly při zvyšující se koncentraci stimulovat ATPasovou aktivitu P-gp, který byl exprimován v izolovaných hmyzích buněčných membránách. Aktivita P-gp je spřažena s transportem substrátů. Při vysokých koncentracích TKI ale docházelo k inhibici aktivity P-gp (Hegedus et al., 2002). Vzhledem k široké substrátové specifitě P-gp není překvapující, že mnoho TKI patří mezi substráty P-gp (Ozvegy-Laczka et al., 2005). Další práce nicméně ukázaly, že TKI jsou také schopny inhibovat funkci P-gp. Imatinib při koncentraci 2,5 μM dokázal zvrátit rezistenci buněk epidermálního karcinomu se zvýšenou expresí P-gp na vincristin či paclitaxel, ale ne na adriamycin. Imatinib inhiboval transport vincristinu, ale u adriamycinu podobnou schopnost neměl (Mukai et al., 2003). Také Hamada a spolupracovníci ukázali, že imatinib inhibuje transportní funkci P-gp (Hamada et al., 2003). Z výše uvedených prací není zřejmé, zda je imatinib schopen skutečně inhibovat funkci P-gp nebo jde pouze o kompetici s jeho substrátem. Bylo rovněž ukázáno, že se imatinib váže do substrát-vázací kapsy P-gp, nikoliv do ATP-vazebného místa (Shukla et al., 2008). Zdá se, že o tom, zda se imatinib chová jako substrát nebo inhibitor, rozhoduje jeho koncentrace. Při nižších koncentracích působí jako substrát, při vyšších jako inhibitor (Dohse et al., 2010).

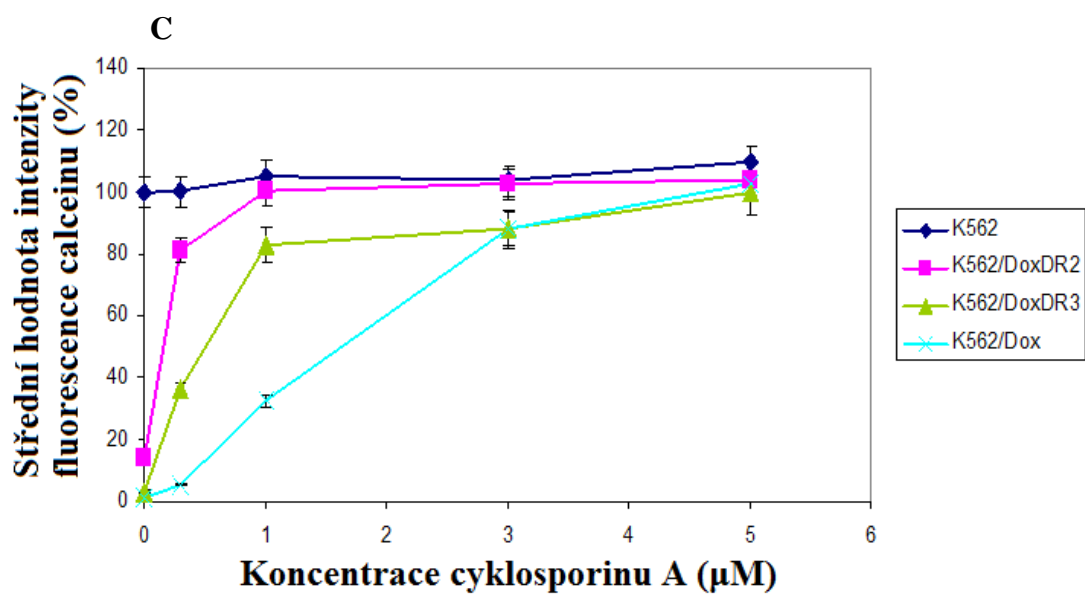
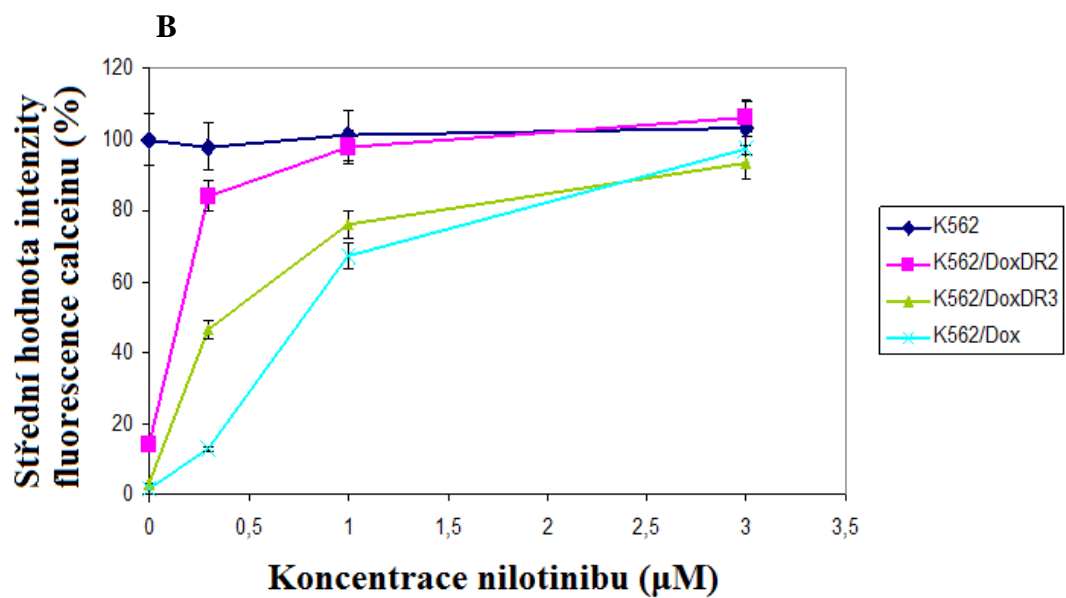
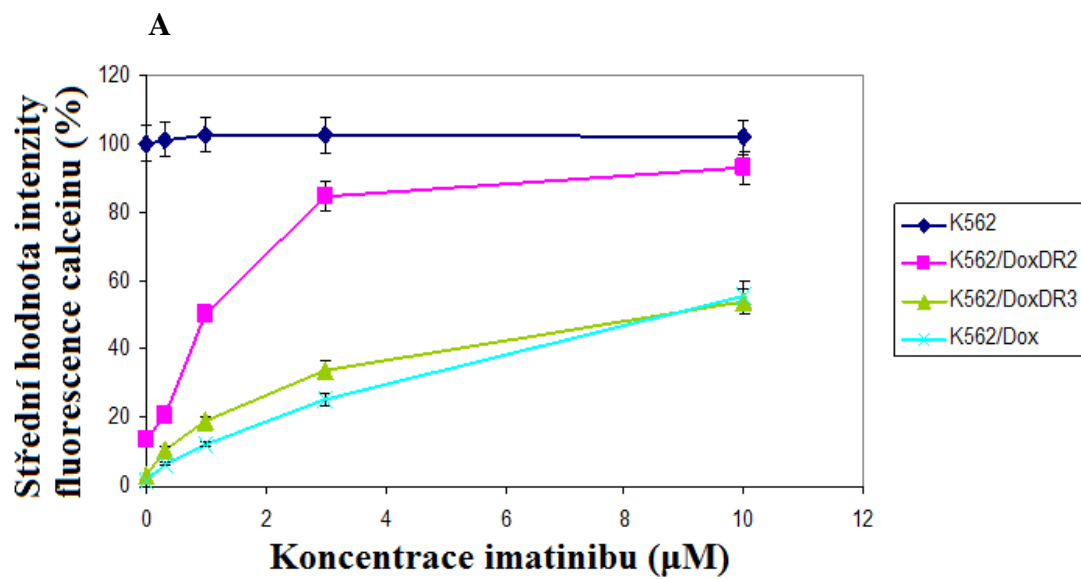
Podobná situace jako u imatinibu panuje také u nilotinibu. Na nebuněčném systému bylo ukázáno, že se vzrůstající koncentrací nilotinibu dochází ke stimulaci ATPasové aktivity P-gp exprimovaném v izolovaných hmyzích buněčných membránách. Nilotinib v koncentraci 1 μM a výše začíná ATPasovou aktivitu P-gp inhibovat (Hegedus et al., 2009). Bylo ukázáno, že nilotinib při 2,5 μM koncentraci signifikantně inhiboval transportní funkci P-gp a dokázal zvrátit rezistenci buněk epidermálního karcinomu se zvýšenou expresí P-gp na kolchicin, paclitaxel nebo vinblastin (Tiwari et al., 2009). Stejně jako imatinib se i nilotinib váže do substrát-vázací kapsy P-gp (Shukla et al., 2011). Bylo ukázáno, že při nižších koncentracích se nilotinib chová jako substrát, při vyšších jako inhibitor P-gp (Hegedus et al., 2009; Dohse et al., 2010).

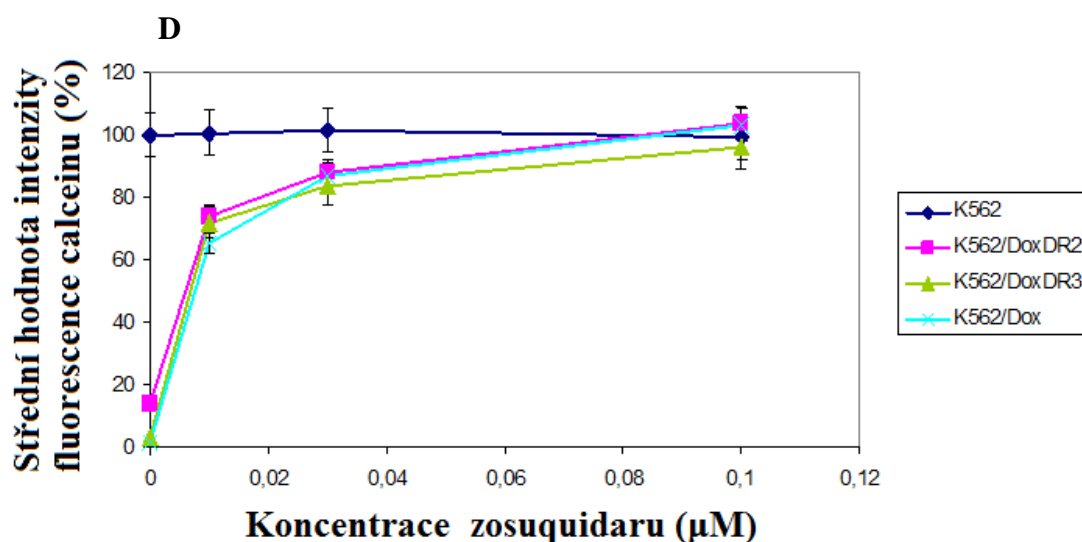
Také u mnoha dalších TKI bylo ukázáno, že mohou inhibovat funkci P-gp. Jako příklad můžeme uvést gefitinib nebo erlotinib, inhibitory EGFR, které inhibovaly funkci P-gp a zvýšily citlivost rezistentních nádorových buněk se zvýšenou expresí P-gp na topotecan, paclitaxel, kolchicin nebo vinblastin (Kitazaki et al., 2005; Yang et al., 2005; Shi et al., 2007).

V první fázi jsme chtěli ověřit schopnost imatinibu a nilotinibu inhibovat transportní funkci P-gp a stanovit jejich extracelulární koncentrace, při kterých inhibují P-gp. K tomu jsme využili rezistentní buněčnou linii K562/Dox s velmi vysokou expresí P-gp a dvě buněčné linie se sníženou expresí P-gp - K562/DoxDR2 a K562/DoxDR3. Jako kontrola byla použita linie K562 bez měřitelné exprese P-gp. Všechny buněčné linie byly inkubovány s calceinem AM a různými koncentracemi imatinibu a nilotinibu nebo bez nich. Míra inhibice P-gp imatinibem a nilotinibem byla srovnávána s dvěma klasickými inhibitory P-gp - cyklosporinem A a zosuquidarem.

Nebylo překvapením, že se zvyšující se koncentrací imatinibu a nilotinibu docházelo ke zvyšování intracelulární akumulace calceinu, což bylo měřeno jako nárůst fluorescence. Aplikace 3-10 μM imatinibu vedla u všech testovaných buněk k signifikantní inhibici transportu (obr. 38A). U nilotinibu vedla již 1-3 μM koncentrace k signifikantní inhibici transportu (obr. 38B). Při detailnějším rozboru jsme zjistili, že aplikace již 0,3-1 μM nilotinibu vedla u buněk s nejnižší expresí P-gp K562/DoxDR2 k nárůstu akumulace calceinu na hodnotu 80-90 % v porovnání s kontrolními buňkami K562 (obr. 38B). Při inhibici imatinibem došlo k podobnému efektu až při 10 μM koncentraci (obr. 38A). Aplikace 3 μM nilotinibu vedla dokonce i u buněk K562/Dox s nejvyšší expresí P-gp k nárůstu intracelulární akumulace calceinu téměř na úroveň pozorovanou u kontrolní linie K562 (obr. 38B). Naproti tomu u stejných buněk dosahovala intracelulární akumulace calceinu 50 % v porovnání s buňkami K562 po aplikaci 10 μM imatinibu (obr. 38A). Nilotinib se při těchto testech jevil jako účinnější inhibitor P-gp.

Klasické inhibitory P-gp cyklosporin A a zosuquidar byly schopny při nejvyšší koncentraci (5 μM , resp. 0,1 μM) inhibovat transportní funkci P-gp tak, že akumulace calceinu dosahovala téměř 100 % v porovnání s linií K562 (obr. 38C, D).





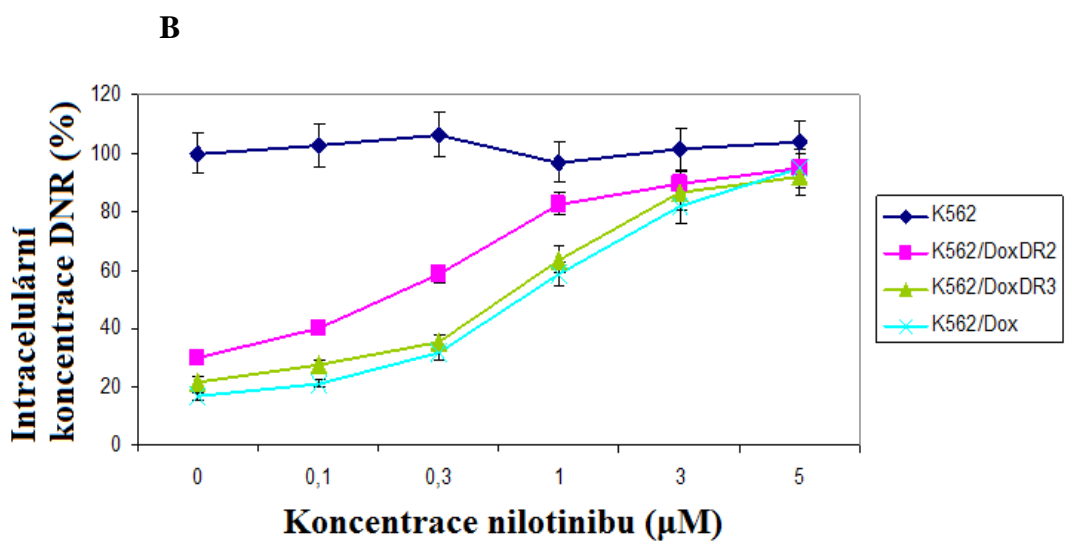
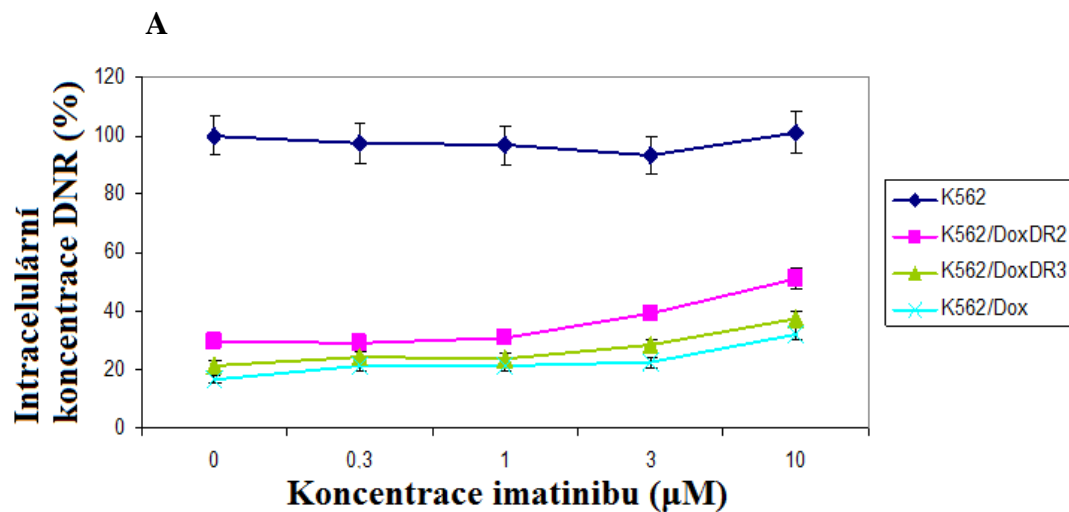
Obr. 38.: Analýza vlivu imatinibu a nilotinibu na intracelulární akumulaci calceinu u rezistentních linií. Srovnání s klasickými inhibitory P-gp. Buňky K562/DoxDR2, K562/DoxDR3 a K562/Dox se zvyšující se expresí P-gp. Jako kontrolní buňky byla použita linie K562 bez měřitelné exprese P-gp. Buňky byly inkubovány po dobu 20 minut při 37°C s 0,2 µM calceinem AM a s různými koncentracemi inhibitoru P-gp. Poté byla změřena fluorescence. 100 % odpovídá střední hodnotě intenzity fluorescence calceinu akumulovaného v buňkách K562 bez aplikace inhibitoru P-gp. A) Imatinib. B) Nilotinib. C) Cyklosporin A. D) Zosuquidar. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou.

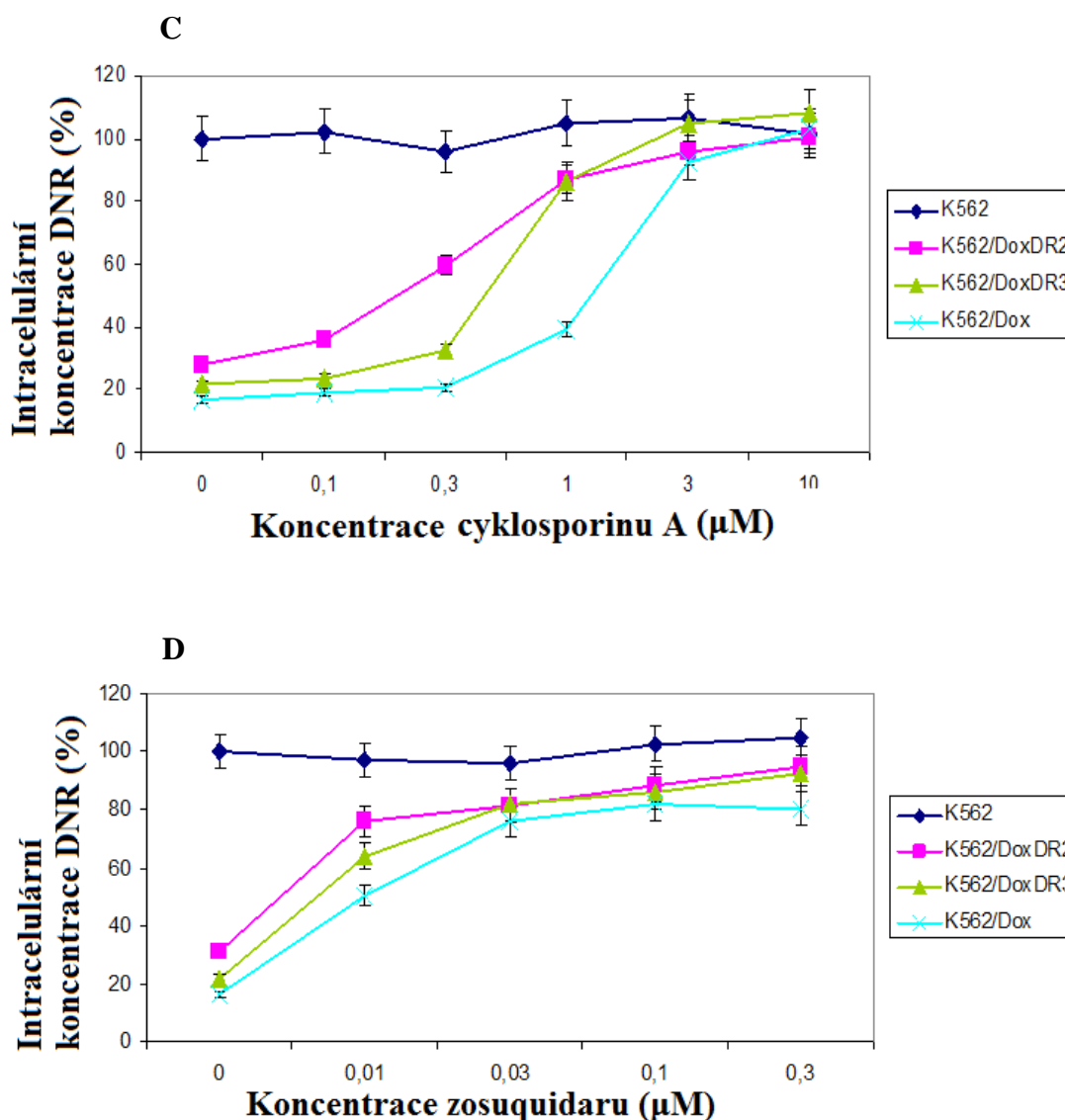
Dále jsme se pokusili zjistit, jak aplikace imatinibu a nilotinibu ovlivňuje transport daunorubicinu, který byl použit jako „dobrý“ substrát P-gp a referenční léčivo.

Aplikace 3-10 µM imatinibu vedla u buněk s nejnižší expresí P-gp k nárstu intracelulární akumulace daunorubicinu pouze na úroveň 50 % nalezenou u buněk K562. U buněk K562/Dox s nejvyšší expresí to bylo dokonce pouze 30 % (obr. 39A). Naproti tomu aplikace 1-3 µM nilotinibu vedla u všech rezistentních buněk k signifikantní inhibici transportu daunorubicinu. Aplikace již 1-3 µM nilotinibu vedla u buněk K562/DoxDR2 s nejnižší expresí P-gp k nárstu intracelulární akumulace daunorubicinu na úroveň 80 % v porovnání s intracelulární akumulací u buněk K562. Při aplikaci 3-5 µM nilotinibu došlo u všech testovaných buněk k nárstu intracelulární akumulace daunorubicinu téměř na úroveň pozorovanou u buněk K562 (obr. 39B). Nilotinib se opět ukázal jako lepší inhibitor P-gp než imatinib, který byl téměř neúčinný.

Cyklosporin A dokázal při koncentraci 3-10 µM koncentraci zcela inhibovat transportní funkci P-gp u všech testovaných buněk (obr. 39C). Cyklosporin A je ovšem při této koncentraci cytotoxický v *in vitro* podmínkách (data neuvedena).

Aplikace 0,03-0,3 μM zosuquidaru vedlo k nárustu intracelulární akumulace daunorubicinu na úroveň 70-80 % v porovnání s intracelulární koncentrací nalezenou v kontrolních buňkách K562 (obr. 39D). Zosuquidar ale není při účinné koncentraci cytotoxický.



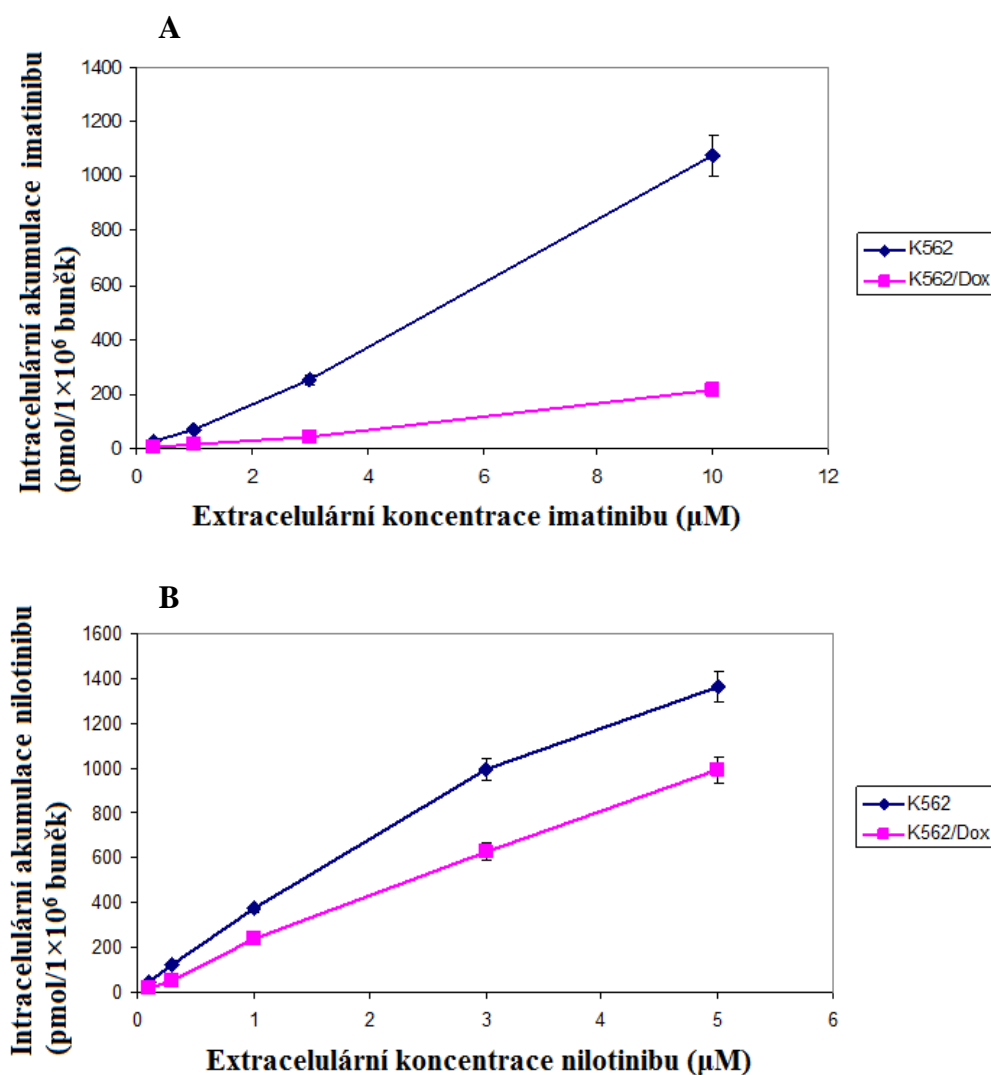


Obr. 39: Analýza vlivu imatinibu a nilotinibu na intracelulární akumulaci daunorubicinu rezistentních buněk. Buňky K562/DoxDR2, K562/DoxDR3, K562/Dox. Srovnání s klasickými inhibitory P-gp. Jako kontrolní buňky byla použita buněčná linie K562 bez měřitelné exprese P-gp. Buňky byly inkubovány po dobu 4 hodin s 0,5 µM DNR a různými koncentracemi inhibitoru P-gp, poté byla změřena fluorescence. A) Imatinib. B) Nilotinib. C) Cyklosporin A. D) Zosuquidar. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou.

Zajímavým zjištěním bylo, že účinnost inhibice transportu byla závislá na expresi P-gp. Se zvyšující se expresí P-gp docházelo ke snižování účinnosti inhibice transportu. To bylo pozorováno v rozdílech intracelulární akumulace substrátu P-gp u buněk s odlišnou expresí P-gp (obr. 38 a obr. 39).

Vzhledem k tomu, že výše uvedené experimenty neukázaly, zda imatinib a nilotinib inhibují transport P-gp kompeticí nebo nadbytkem substrátu, pokusili jsme se zjistit, zda jsou imatinib a nilotinib schopny autoinhibice P-gp, tzn., zda dokáží

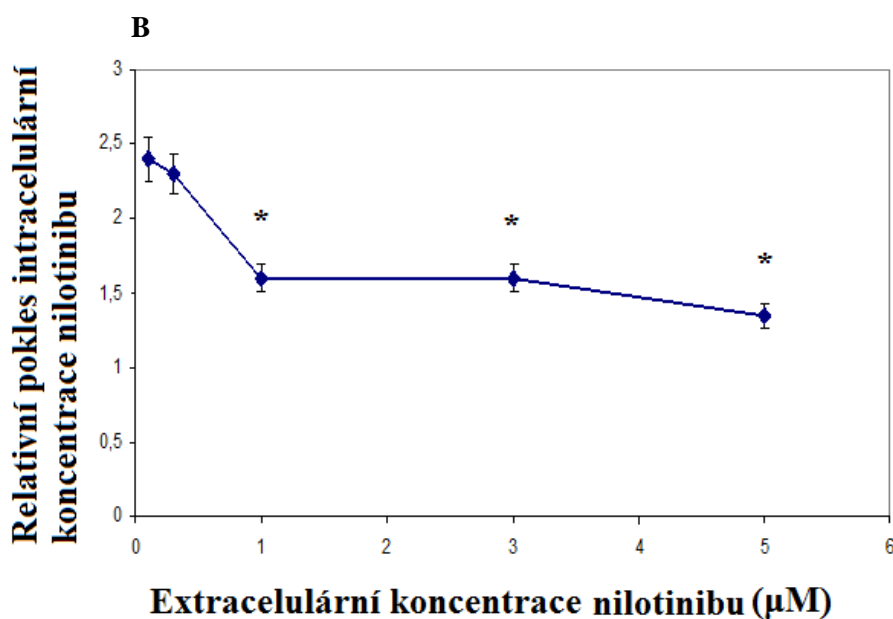
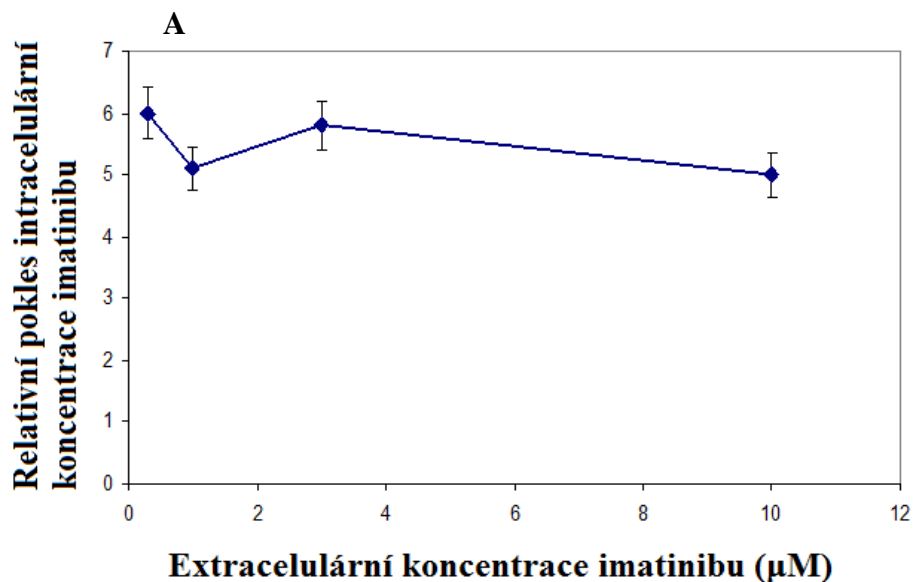
inhibovat transport P-gp nadbytkem substrátu. Analyzovali jsme extrakty buněk, které byly inkubovány s různými koncentracemi imatinibu a nilotinibu. Primární data ukazují, že citlivé buňky K562 vykazovaly vyšší intracelulární obsah obou TKI než rezistentní buňky K562/Dox. Se zvyšující se extracelulární koncentrací jak imatinibu, tak nilotinibu docházelo také ke zvyšování jejich intracelulárního obsahu u obou linií (obr. 40).



Obr. 40: Porovnání intracelulárních koncentrací imatinibu a nilotinibu u buněk K562 a K562/Dox. Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi imatinibu a nilotinibu po dobu 5 hodin při 37°C. Poté byly centrifugovány přes silikonový olej a buněčný sediment byl extrahován. Intracelulární obsah byl kvantifikován pomocí HPLC/MS/MS. A) Imatinib. B) Nilotinib. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou.

Z primárních dat (obr. 40) jsme stanovili poměr intracelulárního obsahu imatinibu v buňkách K562 ku buňkám K562/Dox (obr. 41). Stejně jsme postupovali i v případě nilotinibu. Zjistili jsme, že se vzrůstající extracelulární koncentrací

imatinibu se nezměnil signifikantně poměr jeho intracelulárního obsahu mezi buňkami K562 a K562/Dox (obr. 41A). Na druhou stranu nilotinib již při koncentraci 3 μM byl schopen signifikantně zmenšit poměr svého intracelulárního obsahu mezi buňkami K562 a K562/Dox (obr. 41B).



Obr. 41: Analýza vlivu imatinibu a nilotinibu na transport P-gp. Buňky K562 a K562/Dox byly inkubovány po dobu 5 hodin s rostoucími koncentracemi imatinibu (A) a nilotinibu (B). Poté byly centrifugovány přes silikonový olej a buněčný sediment byl extrahován. Intracelulární obsah léčiva byl kvantifikován pomocí HPLC/MS/MS. Do grafu byla vynesena závislost extracelulární koncentrace léčiva na poměru intracelulárního obsahu léčiva mezi buňkami K562 a K562/Dox. Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých měření se standardní odchylkou. * představuje signifikantní změnu v poměru intracelulárních obsahů léčiva mezi buňkami K562 a K562/Dox.

Z odvozených dat (obr. 41) se můžeme pokusit vyvodit, zda imatinib a nilotinib působí jako kompetitivní inhibitory nebo inhibují transport P-gp nadbytkem substrátu. Aplikace nilotinibu vedla se zvyšující se extracelulární koncentrací ke snižování poměru mezi intracelulárním obsahem nilotinibu v buňkách K562 a K562/Dox. Tento poměr se limitně blížil hodnotě jedna. Docházelo tudíž k inhibici transportu nadbytkem substrátu. Můžeme se tedy domnívat, že nilotinib může na jednu stranu působit jako kompetitivní inhibitor. Na druhou stranu jsme také ukázali jeho schopnost inhibovat transport P-gp nadbytkem substrátu. U imatinibu nevedla zvyšující se extracelulární koncentrace ke změně poměru jeho intracelulárního obsahu mezi buňkami K562 a K562/Dox. Nedochovalo tedy k inhibici transportu nadbytkem substrátu. Z výsledků předchozích experimentů můžeme usuzovat, že imatinib je pouze slabým kompetitivním inhibitorem.

Zjištění, že účinnost inhibice P-gp závisí na jeho expresi, nás přimělo tuto skutečnost dále prozkoumat. Původním předpokladem bylo, že u daného experimentu aplikujeme nadbytek inhibitoru nad počtem molekul P-gp. Vzhledem k výše zmíněné neobvyklosti, jsme se pokusili odhadnout počet molekul P-gp na povrchu buněk K562/Dox a K562/HHT. K tomu jsme využili purifikovaný protein P-gp (laskavě poskytnut prof. Y. Kimurou, Kyoto University, Japonsko) o známé koncentraci.

Při semikvantitativním odhadu počtu molekul P-gp byla využita metoda western blot. Vycházeli jsme ze dvou předpokladů: 1) Extrakce P-gp z buněk probíhá se stejnou účinností napříč různými buněčnými liniemi s rozdílnou expresí P-gp. 2) Účinnost přenosu proteinů na membránu při western blotu je stejná bez ohledu na množství P-gp.

Odhad počtu molekul P-gp v buňce byl proveden podle následujícího klíče. Lyzováno bylo 5×10^6 buněk, čímž bylo získáno cca 220 μ l proteinového extraktu o koncentraci celkových proteinů 5 μ g/ μ l. Při elektroforéze bylo aplikováno 25 μ g proteinů na jamku, což odpovídá přibližně 110×10^3 buňkám. Podle kalibrační křivky bylo spočítáno množství P-gp připadající na 110×10^3 buněk. Pro buňky K562/Dox bylo množství P-gp spočítáno na cca 120 ng a pro buňky K562/HHT na cca 190 ng (obr. 42). Následně byla hmotnost P-gp přepočítána na počet molekul v jedné buňce. U buněk K562/Dox byl počet molekul P-gp $3,8 \times 10^6$ a u buněk K562/HHT $6,0 \times 10^6$ (tab. 7).

Podle tloušťky plazmatické membrány jsme odhadli hustotu P-gp na povrchu buňky K562/Dox. Při předpokladu, že poloměr buňky je cca 9,58 μm a tloušťka plazmatické membrány je cca 10 nm, pak objem plazmatické membrány je cca $11,5 \times 10^{-15}$ l. Odsud můžeme odvodit koncentraci P-gp na povrchu buněk K562/Dox na cca 550 μM . Podobně jsme postupovali i v případě buněk K562/HHT.



Obr. 42: Kvantifikace P-gp metodou western blot. K odhadu množství P-gp na povrchu rezistentních buněk K562/Dox a K562/HHT jsme použili purifikovaný protein P-gp.

Tab. 7: Odhad množství P-gp v jedné buňce

Buněčná linie	Hmotnost P-gp (ng)	Počet molekul/1 b.	Lokální koncentrace Pgp/1 b. (μM)
K562/Dox	$124 \pm 10,5$	$3,8 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^5$	550
K562/HHT	$196 \pm 17,7$	$6,0 \times 10^6 \pm 5,0 \times 10^5$	870

Diskuze

Imatinib a nilotinib jsou TKI úspěšně používané k léčbě CML. Záhy po jejich uvedení do klinické praxe se nicméně objevily první případy pacientů rezistentních na tato dvě léčiva. Jedním z mechanismů rezistence jak na imatinib, tak nilotinib je zvýšená exprese ABCB1 na povrchu nádorových buněk (Mahon et al., 2004; Mahon et al., 2008). Vyskytla se ovšem také protichůdná tvrzení, že imatinib a nilotinib nejsou transportovány ABCB1, a že zvýšená exprese ABCB1 proto není příčinou rezistence (Ferraro et al., 2003; Zong et al., 2005; Davies et al., 2009; Hegedus et al., 2009).

Imatinib a nilotinib mohou plnit roli jak substrátů, tak i inhibitorů některých ABC transportérů. Při nižších koncentracích jsou oba TKI substráty P-gp, při vyšších koncentracích mají na druhou stranu schopnost inhibovat funkci P-gp (Dohse et al., 2010). Bylo ukázáno, že kromě ABCB1 inhibuje nilotinib navíc i transportér ABCG2

(Tiwari et al., 2009; Hegedus et al., 2009). Také další TKI inhibují jak P-gp, tak i ABCG2 (Shukla et al., 2012). Podle některých autorů by TKI proto mohly sloužit v klinické praxi jako modulátory funkce ABC transportérů a mohly by tak zlepšit účinnost chemoterapie u rezistentních nádorů se zvýšenou expresí ABC transportérů. Studie již ukázaly, že kombinace nilotinibu se standardními chemoterapeutiky, která jsou substráty P-gp, může zvýšit protinádorový efekt (Villar et al., 2012; Tiwari et al., 2013). Podobně byl testován také imatinib (Sims et al., 2013; Gao et al., 2006).

V naší práci jsme potvrdili schopnost imatinibu a nilotinibu inhibovat funkci P-gp. Ukázali jsme, že nilotinib je podstatně účinnější inhibitor P-gp než imatinib, což je v souladu s dřívější prací (Dohse et al., 2010). Nilotinib inhibuje transport calceinu, který je fluorescenční sonda používaná pro měření funkce P-gp, již od koncentrace 0,3-1 μM . Imatinib dosahoval srovnatelné inhibice až od koncentrace 3-10 μM (obr. 38). V případě inhibice transportu daunorubicinu, který byl použit jako referenční léčivo, byl imatinib téměř neúčinný. Pouze u buněk s nejnižší expresí P-gp dokázal při koncentraci 10 μM mírně, ale signifikantně inhibovat transport daunorubicinu. Nilotinib inhiboval transport daunorubicinu i buněk s nejvyšší expresí P-gp již při koncentraci 3 μM (obr. 39).

Rozdílná účinnost inhibice transportu P-gp různých substrátů imatinibem může souviset s vazbou imatinibu na P-gp. Bylo ukázáno, že při inhibici Bcr-Abl se imatinib váže do ATP-vazebného místa (Schindler et al., 2000), u P-gp jde ale o vazbu do substrát-vázací kapsy (Shukla et al., 2008). Zdá se, že P-gp obsahuje více vazebných míst pro své substráty (Shapiro a Ling, 1998; Shapiro et al., 1999; Martin et al., 2000). Různé substráty jsou navíc transportovány několika cestami (Parveen et al., 2011). V dřívější práci bylo ukázáno, že imatinib inhiboval transport rhodaminu 123 v koncentraci do 10 μM , zatímco transport BODIPY-prasozinu ovlivněn nebyl (Dohse et al., 2010), což potvrzuje uvažování o více vazebných místech a transportních cestách pro substrát. Můžeme tudíž spekulovat, že při inhibici jiného léčiva než daunorubicinu by imatinib mohl být účinnější.

Otázkou zůstává, zda koncentrace imatinibu a nilotinibu, při kterých je transportní funkce P-gp inhibována, jsou použitelné v klinické praxi kvůli jejich obecné cytotoxicitě. Bylo ukázáno, že se koncentrace imatinibu v plazmě pacientů s CML pohybuje v rozmezí 0,3-5,5 μM , průměr u pacientů s kompletní molekulární odpovědí užívající 600 mg imatinibu denně byl 2,7 μM (Picard et al., 2007). Mezi pacienty se však vyskytuje nezanedbatelná část, která je vůči imatinibu intolerantní.

U nilotinibu byla koncentrace v plazmě 1,7-3,6 μM u pacientů užívajících dvakrát denně 400 mg (Jabbour et al., 2008). Můžeme se tedy domnívat, že použití imatinibu jako inhibitoru P-gp by bylo v klinické praxi nereálné, vzhledem k tomu, že ani při 10 μM koncentraci, která vysoce převyšuje jeho koncentraci v plazmě pacientů, není schopen významně inhibovat funkci P-gp (obr. 39A). Naproti tomu použití nilotinibu jako inhibitoru P-gp je reálnější, jelikož již při 1-3 μM koncentraci signifikantně inhibuje transportní funkci P-gp i u buněk s velmi vysokou expresí P-gp, která je v klinických vzorcích těžko naměřitelná (obr. 38B a 39B).

Zajímavou skutečností také je, že účinnost inhibitorů P-gp se lišila v závislosti na míře exprese P-gp, což bylo pozorováno již dříve (Piwnicka-Worms et al., 1993). U buněk s nižší expresí P-gp byla účinnost inhibitoru vyšší než u buněk, které exprimovaly větší množství P-gp. To jsme pozorovali na intracelulární akumulaci jak calceinu, tak i daunorubicinu (obr. 38 a 39).

Při inhibičních experimentech jsme vycházeli z předpokladu, že množství inhibitoru bylo v nadbytku nad množstvím P-gp. Ukázali jsme ovšem, že účinnost inhibice byla závislá na aktivitě P-gp, resp. jeho expresi. Jednou z možností, jak vysvětlit toto atypické chování, je, že lokální koncentrace P-gp je velmi vysoká a je srovnatelná s koncentrací inhibitoru. Proto jsme se pokusili odhadnout koncentraci P-gp na povrchu rezistentních buněk K562/Dox a K562/HHT.

Zjistili jsme, že počet molekul P-gp připadajících na jednu rezistentní buňku se pohyboval v řádu několika málo milionů. Distribuce P-gp není ale v buňce rovnoměrná. Většina se nachází na povrchu buňky (Kartner et al., 1983). Koncentrace P-gp na povrchu buněk K562/Dox byla vypočítána na cca 550 μM (tab. 7). Koncentrace inhibitorů při experimentech se ovšem pohybovaly v rozmezí 0,1-10 μM . Jsme si však vědomi, že distribuce inhibitoru nemusí být v roztoku homogenní. Lokální koncentrace inhibitoru v okolí P-gp a v membráně může být mnohonásobně vyšší. Výše uvedené výsledky tak mohou být vysvětlením námi pozorované anomálie.

Naše práce ukázala, že inhibice P-gp je závislá na jeho expresi. U buněk s vyšší expresí ABCB1 byla inhibice méně účinná než u buněk s nižší expresí ABCB1. Proto se zdá být velmi důležité, při testování nových inhibitorů P-gp, provádět experimenty *in vitro* na buňkách, jejichž exprese ABCB1 odpovídá expresi nacházené u klinických vzorků. Navíc jsme potvrdili schopnost nilotinibu a imatinibu inhibovat transportní funkci P-gp. Nilotinib se ukázal jako výrazně

účinnější inhibitor P-gp. Vzhledem k účinným koncentracím, při kterých nilotinib inhibuje funkci P-gp, se jeho použití v klinické praxi jeví reálně. Na druhou stranu použití imatinibu jako inhibitoru P-gp v klinické praxi můžeme vyloučit.

7. Shrnutí

Dizertační práce se zabývá problematikou exprese P-glykoproteinu a rezistence na vybraná léčiva u leukemických buněk.

TKI jsou látky, které se dostávají do klinické praxe jako velmi specifická a účinná léčiva proti řadě nádorových onemocnění. Imatinib a nilotinib jsou TKI používané k léčbě CML. Záhy po jejich uvedení do klinické praxe se objevila část pacientů, kteří se v průběhu léčby stali rezistentní na tyto TKI. Rezistence může být způsobena řadou mechanismů. Tím prvním je zvýšená exprese genu *BCR-ABL1*, který je charakteristický pro CML, nebo mutace proteinu Bcr-Abl. Jedním z možných mechanismů rezistence, které nesouvisí s Bcr-Abl, je zvýšená exprese ABCB1. V literatuře nicméně nepanuje shoda v otázce, zda P-gp zprostředkovává rezistenci na TKI. V *in vitro* experimentech se většina autorů shodne na tom, že zvýšená exprese ABCB1 se podílí na vzniku rezistence vůči TKI. V *in vivo* podmínkách je ovšem situace velmi nejasná. Vzhledem k rozporuplnosti daného problému jsme se také zabývali expresí ABCB1 a jeho příspěvkem k pozorované rezistenci.

V naší práci jsme ukázali, že schopnost P-gp zprostředkovat rezistenci vůči TKI závisí na jeho expresi. U buněk se snižující se expresí ABCB1 docházelo ke zvyšování intracelulární koncentrace imatinibu a nilotinibu. Zároveň se buňky se snižující se expresí ABCB1 stávaly méně rezistentní. Zjistili jsme, že buňky s velmi nízkou expresí ABCB1 byly na imatinib a nilotinib stejně citlivé jako kontrolní buňky bez měřitelné exprese ABCB1. Tyto buňky s velmi nízkou expresí ABCB1 byly ovšem významně rezistentní na daunorubicin v porovnání s citlivými buňkami bez měřitelné exprese ABCB1.

Naše výsledky naznačují, že rozporuplné výsledky publikované v literatuře mohou být způsobeny použitím buněk s různou expresí ABCB1. Ukázali jsme, že buňky s vysokou expresí ABCB1 vykazují rezistenci vůči testovaným TKI. Na druhou stranu, u buněk s velmi nízkou expresí ABCB1 nebyla rezistence pozorována. Jelikož můžeme u klinických vzorků očekávat spíše nižší expresi ABCB1, je podle nás důležité používat i v *in vitro* systému při testování příspěvku ABCB1 ke vzniku rezistence buňky s nižší expresí ABCB1.

Ačkoliv je správné stanovení míry exprese *ABCB1* jak v *in vitro*, tak i v *in vivo* podmínkách nezbytně nutné k posouzení příspěvku ABCB1 k rezistenci

(nebo klinickému výsledku), nepanuje shoda v otázce, jak míru exprese *ABCB1* hodnotit. Různé vědecké skupiny používají rozdílné metody. Podle toho jsou často výsledky protichůdné. Z našich i dalších publikovaných výsledků vyplývá, že k rozporuplným výsledkům přispívá přílišné zjednodušení hodnocení exprese *ABCB1* a jeho příspěvku k pozorované rezistenci u nádorových buněk.

Proto jsme porovnali na několika buněčných liniích dvě metody všeobecně používané ke stanovení míry exprese *ABCB1* a studovali jsme, do jaké míry naměřená exprese *ABCB1* odráží funkci. Naše výsledky naznačují, že použití jediné metody, jak se často děje, k hodnocení míry exprese *ABCB1* není příliš spolehlivé. Metoda qPCR je velmi citlivou metodou posuzující relativní množství mRNA. Ukázali jsme nicméně, že signifikantní změna v expresi genu *ABCB1* na úrovni mRNA, nemusí nutně znamenat změnu na úrovni proteinu a jeho funkce. Problém metody spočívá v tom, že poskytuje informace pouze o mRNA.

Další možností je použití protilátek ke stanovení míry exprese *ABCB1* na úrovni proteinu metodou průtokové cytometrie. Ačkoliv byla metoda průtokové cytometrie použita v dobře definovaném *in vitro* systému, nebyla vždy spolehlivá. Ne vždy naměřená exprese odpovídala funkci. Pro srovnání jsme použili metodu western blot, kterou jsme získali přesnější výsledky exprese *ABCB1*, která by odpovídala také funkci. Nechceme nicméně tvrdit, že jde o metodu nejideálnější. Nevýhodou metody je její pracnost, časová náročnost a zřejmě obtížná použitelnost u klinických vzorků.

Z našich výsledků vyplývá, že stanovení míry exprese *ABCB1* jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách je nutno provádět komplexně, tzn. zejména na úrovni proteinu. Samozřejmostí by mělo být ověření funkce proteinu fluorescenční sondou nebo reálným léčivem.

V literatuře se vyskytují práce o tom, že by bylo možné použít imatinib a nilotinib jako modulátory P-gp, čímž by se zlepšila léčba rezistentních nádorů se zvýšenou expresí ABC transportérů. Ukázali jsme, že imatinib je neúčinným inhibitorem P-gp, zatímco nilotinib se jevil jako účinný inhibitor srovnatelný s klasickými inhibitory P-gp. Můžeme se domnívat, že použití nilotinibu jako inhibitoru P-gp by v klinické praxi mohlo být reálné, vzhledem k jeho účinným koncentracím, které jsou srovnatelné s jeho koncentrací v plazmě pacientů. Na druhou stranu použití imatinibu se nám, vzhledem k jeho vysokým koncentracím, při kterých účinně inhibuje P-gp, jeví velmi nereálně.

Zjistili jsme, že inhibice P-gp je závislá na jeho expresi. U buněk s vyšší expresí ABCB1 byla účinnost inhibitoru nižší než u buněk s nižší expresí ABCB1. Pro tento neočekávaný jev by jako jedno z možných vysvětlení mohla být vysoká lokální koncentrace P-gp na povrchu rezistentních buněk, která převyšovala koncentraci inhibitoru v roztoku.

8. Summary

The aim of this Ph.D. thesis was to study expression of P-glycoprotein and resistance to various anticancer drugs in leukemia cells.

TKI are compounds that are introduced into clinical practice as very specific and effective drugs against many cancer diseases. Imatinib and nilotinib are TKIs used for the treatment of chronic myelogenous leukemia. However, some patients may develop a resistance to these drugs during the therapy. The resistance may be caused by several mechanisms. One of them consists in increased expression of *BCR-ABL1* gene, which is typical for chronic myelogenous leukemia, or mutations of Bcr-Abl protein. One of the possible Bcr-Abl-independent mechanisms is increased expression of P-gp. However, there is a controversy in the literature, whether P-gp mediates resistance to TKIs. In the *in vitro* system, consensus is generally reached with respect to contribution of P-gp to the resistance. On the other site, the situation in the *in vivo* conditions is much more inconsistent. Due to the contradictions of this issue, we have addressed the question of P-gp expression and its contribution to the resistance.

In our study, we have shown that the ability of P-gp to mediate resistance to TKIs strongly depends on its expression level. The cells with decreasing ABCB1 expression accumulated higher amount of imatinib and nilotinib and they became more sensitive to these drugs. Our study has demonstrated that the cells with very low ABCB1 expression were as sensitive to imatinib and nilotinib as the control cells without measurable ABCB1 expression. However, the cells with very low ABCB1 expression were significantly resistant to daunorubicine in comparison to the sensitive cells.

Our results suggest that contradictory results published in literature could be caused by use of cells with various ABCB1 expressions. We have shown that cells with very high ABCB1 expression exhibited significant resistance to TKIs. On the other site, cells with very low ABCB1 expression exhibited no resistance. Because we can expect low P-gp expression in clinical samples, we suggest using the cells with low ABCB1 expression in *in vitro* system to test the contribution of ABCB1 to resistance to various drugs.

The precise assessment of ABCB1 expression level *in vitro* and *in vivo* is necessary for evaluation of the contribution of ABCB1 to the resistance (or clinical

outcome). However, there is no consensus about methods how to assess ABCB1 expression. Different research groups apply various methods leading into contradictory results. We suppose that contradictory results may be the result of oversimplification of the evaluation of ABCB1 expression level and its contribution to the resistance in cancer cells.

We have compared two generally employed methods to assess ABCB1 expression level on different cell lines and studied how its results correspond to the function. Our results suggest that use of a single method to assess ABCB1 expression is not reliable. Quantitative PCR is a very sensitive method for evaluation of relative amount of mRNA. We have demonstrated that significant change in *ABCB1* gene expression at mRNA level does not have to reflect change at protein level or its function. The limitation of this method is that it provides information only about mRNA but not about the protein.

Another possibility how to assess ABCB1 expression at the protein level is to use antibodies for flow cytometry method. Although flow cytometry is used in well defined *in vitro* system, it is not reliable every time. Our research revealed that the measured ABCB1 expression does not always correspond to the function. We have also used western blot method and we have achieved better results regarding ABCB1 expression corresponding to the function of the protein. However, it is not our intention to suggest that method as ideal. Disadvantage of this method lies in laboriousness, time-consumption and difficult applicability in clinical samples.

Our results also suggest that the assessment of ABCB1 expression level *in vitro* and *in vivo* has to be comprehensively evaluated mainly at protein level. It is also necessary to confirm function of ABCB1 with a fluorescent dye or a real drug.

In the literature we can find articles about possible use of imatinib and nilotinib as modulators of P-gp function to improve the chemotherapy of resistant tumors with increased expression of ABC transporters. We have shown that imatinib is a very ineffective P-gp inhibitor, whereas nilotinib is as effective as classical P-gp inhibitors. Due to the effective nilotinib concentration, which is found in patients' plasma, we suggest that the use of nilotinib in the clinical practice as the P-gp inhibitor might be real. On the other site, the use of imatinib seems to be unreal owing to very high concentration which is effective in the inhibition of P-gp.

We have found out that efficiency of P-gp function depends on its expression level. Efficiency of P-gp inhibition was lower in cell with higher ABCB1 expression.

Explanation of this unexpected phenomenon could be very high local concentration of P-gp on the surface of resistant cells which exceeded concentration of P-gp inhibitor in solution.

9. Seznam použité literatury

- Abbott BL, Colapietro AM, Barnes Y, Marini F, Andreeff M, Sorrentino BP. 2002. Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood* **100**: 4594-4601.
- Abele R, Tampé R. 1999. Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 405-419.
- Abelson HT, Rabstein LS. 1970. Lymphosarcoma: virus induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* **30**: 2213-2222.
- Advani R, Fisher GA, Lum BL, Hausdorff J, Halsey J, Litchman M, Sikic BI. 2001. A phase I trial of doxorubicin, paclitaxel, and valspodar (PSC 833), a modulator of multidrug resistance. *Clin Cancer Res* **7**: 1221-1229.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. 1995. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**: 423-426.
- Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, Riordan JR. 2000. The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol* **528**: 259-265.
- Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. 1995. UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. *Lancet* **345**: 1392-1397.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**: 5337-5339.
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. 1995. Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res* **55**: 102-110.
- Altenberg GA, Vanoye CG, Horton JK, Reuss L. 1994. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**: 4654-4657.
- Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, Fojo AT, Bates SE. 2012. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Updat* **15**: 50-61.
- Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben-Neria Y, Levitzki A. 1993. Tyrophostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood* **82**: 3524-3529.
- Andreasen PA, Schaumburg BP, Osterline K, Vinten J, Gammeltoft S, Gliemann J. 1974. A rapid technique for separation of thymocytes from suspensions by centrifugation through silicone oil. *Anal Biochem* **59**: 610-616.
- Annilo T, Chen ZQ, Shulenin S, Costantino J, Thomas L, Lou H, Stefanov S, Dean M. 2006. Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics* **88**: 1-11.
- Arora A, Scholar EM. 2005. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 971-979.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R; European LeukemiaNet. 2009. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* **27**: 6041-6051.
- Bakos E, Evers R, Szakács G, Tusnády GE, Welker E, Szabó K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Váradi A, Sarkadi B. 1998. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* **273**: 32167-32175.
- Baldwin AS. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**: 241-246.
- Barilá D, Superti-Furga G. 1998. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet* **18**: 280-282.
- Barnes DJ, Schultheis B, Adediji S, Melo JV. 2005a. Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* **24**: 6432-6440.

- Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, Pattacini L, Goldman JM, Melo JV. 2005b. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* **65**: 8912-8919.
- Barnes DJ, Melo JV. 2002. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol* **108**: 180-202.
- Baytekin F, Tuna B, Mungan U, Aslan G, Yorukoglu K. 2011. Significance of P-glycoprotein, p53, and survivin expression in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **29**: 502-507.
- Bazeos A, Marin D, Reid AG, Gerrard G, Milojkovic D, May PC, de Lavallade H, Garland P, Rezvani K, Apperley JF, Goldman JM, Foroni L, Khorashad JS. 2010. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **24**: 1243-1245.
- Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HS, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Weinstein R. 1996. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* **56**: 3010-3020.
- Beharry S, Zhong M, Molday RS. 2004. N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). *J Biol Chem* **279**: 53972-53993.
- Belhoussine R, Morjani H, Sharonov S, Ploton D, Manfait M. 1999. Characterization of intracellular pH gradients in human multidrug-resistant tumor cells by means of scanning microspectrofluorometry and dual-emission-ratio probes. *Int J Cancer* **81**: 81-89.
- Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, Facchini T, Goudier MJ, Krakowski I, Netter-Pinon G, Frenay M, Gousset C, Marié FN, Benmiloud M, Sturtz F. 2000. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* **11**: 1471-1476.
- Bennett JH. 1845. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J* **64**: 413-423.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**: 1771-1775.
- Bhatia R, Munthe HA, Verfaillie CM. 1999. Role of abnormal integrin-cytoskeletal interactions in impaired beta1 integrin function in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* **27**: 1384-1396.
- Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. 2003. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* **101**: 4701-4707.
- Boesch D, Gavériaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. 1991. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res* **51**: 4226-4233.
- Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Shepherd PC, Steegmann JL, Kluin-Nelemans HC, Thaler J, Simonsson B, Louwagie A, Reiffers J, Mahon FX, Montefusco E, Alimena G, Hasford J, Richards S, Saglio G, Testoni N, Martinelli G, Tura S, Baccarani M; Europea Study Group on Interferon in Chronic Myeloid Leukemia; Italian Cooperative Study Group on CML; France Intergroup of CML; German CML Study Group; UK Medical Research Council Working Party on CML; Spanish CML Study Group; Australian CML Study Group; Swedish CML Study Group. 2001. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood* **98**: 3074-3081.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brendel C, Scharenberg C, Dohse M, Robey RW, Bates SE, Shukla S, Ambudkar SV, Wang Y, Wennemuth G, Burchert A, Boudriot U, Neubauer A. 2007. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* **21**: 1267-1275.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* **22**: 336-345.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* **56**: 100-104.

- Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. 2004. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **104**: 2940-2942.
- Castro AF, Horton JK, Vanoye CG, Altenberg GA. 1999. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport by protein kinase C blockers. *Biochem Pharmacol* **58**: 1723-1733.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**: 1650-1654.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**: 5902-5910.
- Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM. 2006. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* **106**: 1306-1315.
- Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, Hu S, Narasimhan NI, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Druker BJ, Deininger MW, Talpaz M. 2012. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **367**: 2075-2088.
- Cripe LD, Uno H, Paietta EM, Litzow MR, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Luger S, Tallman MS. 2010. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* **116**: 4077-4085.
- Crouthamel MH, Wu D, Yang Z, Ho RJ. 2006. A novel MDR1 G1199T variant alters drug resistance and efflux transport activity of P-glycoprotein in recombinant Hek cells. *J Pharm Sci* **95**: 2767-2777.
- Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, Grogan TM, Laufman LR, Weiss GR, Bonnet JD. 1995. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* **75**: 815-820.
- Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, Law KL, Ehlhardt WJ, Baughman TM, Bumol TF, Starling JJ. 1996. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* **56**: 4171-4179.
- Dantzig AH, Shepard RL, Law KL, Tabas L, Pratt S, Gillespie JS, Binkley SN, Kuhfeld MT, Starling JJ, Wrighton SA. 1999. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 854-862.
- Davies A, Jordanides NE, Giannoudis A, Lucas CM, Hatzieremia S, Harris RJ, Jørgensen HG, Holyoake TL, Pirmohamed M, Clark RE, Mountford JC. 2009. 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* **23**: 1999-2006.
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. 2000. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**: 299-305.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**: 1156-1166.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* **7**: 11-20.
- Deininger MW. 2008. Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2008**: 418.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**: 3343-3356.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**: 687-689.
- Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan AG, Bourhis J. 2001. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* **97**: 2084-2090.
- Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, Dugray A, Bonnet ML, Vozenin-Brottons MC, Guilhot F, Turhan AG, Feunteun J, Bourhis J. 2003. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* **101**: 4583-4588.
- Diamond JM, Melo JV. 2011. Mechanisms of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* **52**: 12-22.

- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**: 3499-3511.
- Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. 1991. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. *Nature* **351**: 400-402.
- Dierov J, Dierova R, Carroll M. 2004. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* **5**: 275-285.
- Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA. 2002. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* **198**: 213-219.
- Djaldetti M, Padeh B, Pinkhas J, De Vries A. 1966. Prolonged remission in chronic myeloid leukemia after one course of busulfan. *Blood* **27**: 103-109.
- Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, Robey RW, Volkmann T, Deeken JF, Brendel C, Ambudkar SV, Neubauer A, Bates SE. 2010. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab Dispos* **38**: 1371-1380.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15665-15670.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**: 561-566.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**: 1031-1037.
- Druker BJ. 2008. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**: 4808-4817.
- Durie BG, Dalton WS. 1988. Reversal of drug-resistance in multiple myeloma with verapamil. *Br J Haematol* **68**: 203-206.
- Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, Bhalla KN. 2000. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* **96**: 2246-2253.
- Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. 2002. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* **359**: 30-36.
- Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. 1995. Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene* **10**: 1465-1473.
- Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, Ashman LK. 2003. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood* **102**: 4499-4503.
- Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE. 2006. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* **235**: 84-92.
- Filipits M, Pohl G, Rudas M, Dietze O, Lax S, Grill R, Pirker R, Zielinski CC, Hausmaninger H, Kubista E, Samonigg H, Jakesz R. 2005. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **23**: 1161-1168.
- Fischer V, Rodríguez-Gascón A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D, Vickers AE. 1998. The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite. *Drug Metab Dispos* **26**: 802-811.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **148**: 1237-1247.
- Friedenberg WR, Rue M, Blood EA, Dalton WS, Shustik C, Larson RA, Sonneveld P, Greipp PR. 2006. Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* **106**: 830-838.
- Fulda S. 2009. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* **124**: 511-515.
- Fung KL, Gottesman MM. 2009. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 860-871.

- Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Licht T, Cardarelli CO, Pastan I, Gottesman MM. 1996. Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**: 1708-1716.
- Germann UA, Ford PJ, Shlyakhter D, Mason VS, Harding MW. 1997. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* **8**: 141-155.
- Giannoudis A, Wang L, Jorgensen AL, Xinarianos G, Davies A, Pushpakom S, Liloglou T, Zhang JE, Austin G, Holyoake TL, Foroni L, Kottaridis PD, Müller MC, Pirmohamed M, Clark RE. 2013. The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood* **121**: 628-637.
- Gong Y, Duvvuri M, Krise JP. 2003. Separate roles for the Golgi apparatus and lysosomes in the sequestration of drugs in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *J Biol Chem* **278**: 50234-50239.
- Goodfellow HR, Sardini A, Ruetz S, Callaghan R, Gros P, McNaughton PA, Higgins CF. 1996. Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* **271**: 13668-13674.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**: 876-880.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**: 48-58.
- Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL. 2002. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**: 319-325.
- Grandjean F, Brémaud L, Verdier M, Robert J, Ratinaud MH. 2001. Sequential gene expression of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein: functional activity of P-gp and MRP present in the doxorubicin-resistant human K562 cell lines. *Anticancer Drugs* **12**: 247-258.
- Green JA, Robertson LJ, Clark AH. 1993. Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer* **68**: 235-239.
- Gribar JJ, Ramachandra M, Hrycyna CA, Dey S, Ambudkar SV. 2000. Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J Membr Biol* **173**: 203-214.
- Gschwind HP, Pfaar U, Waldmeier F, Zollinger M, Sayer C, Zbinden P, Hayes M, Pokorny R, Seiberling M, Ben-Am M, Peng B, Gross G. 2005. Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* **33**: 1503-1512.
- Guo JQ, Wang JY, Arlinghaus RB. 1991. Detection of BCR-ABL proteins in blood cells of benign phase chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer Res* **51**: 3048-3051.
- Gupta KP, Ward NE, Gravitt KR, Bergman PJ, O'Brian CA. 1996. Partial reversal of multidrug resistance in human breast cancer cells by an N-myristoylated protein kinase C-alpha pseudosubstrate peptide. *J Biol Chem* **271**: 2102-2111.
- Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H. 2003. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* **307**: 824-828.
- Handa H, Hegde UP, Kotelnikov VM, Mundle SD, Dong LM, Burke P, Rose S, Gaskin F, Raza A, Preisler HD. 1997. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leuk Res* **21**: 479-489.
- Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Storb RF, Sullivan KM, Anasetti C. 1998. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **338**: 962-968.
- Harris EJ, van Dam K. 1968. Changes of total water and sucrose space accompanying induced ion uptake or phosphate swelling of rat liver mitochondria. *Biochem J* **106**: 759-766.
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA. 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**: 311-314.
- Hazarika M, Jiang X, Liu Q, Lee SL, Ramchandani R, Garnett C, Orr MS, Sridhara R, Booth B, Leighton JK, Timmer W, Harapanhalli R, Dagher R, Justice R, Pazdur R. 2008. Tasigna for chronic and accelerated phase Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia resistant to or intolerant of imatinib. *Clin Cancer Res* **14**: 5325-5331.

- Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Váradi A, Sarkadi B, Kéri G. 2002. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1587**: 318-325.
- Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apáti A, Magócsi M, Német K, Orfi L, Kéri G, Katona M, Takáts Z, Váradi A, Szakács G, Sarkadi B. 2009. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* **158**: 1153-1164.
- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Heinze B, Georgii A, v. Wussow P, Bartram CR, Griesshammer M, Bergmann L, Essers U, Falge C, Hochhaus A, Queisser U, Sick C, Meyer P, Schmitz N, Verpoort K, Eimermacher H, Walther F, Westerhausen M, Kleeberg UR, Heilein A, Kabisch A, Barz C, Zimmermann R, Meuret G, Tichelli A, Berdel WE, Kanz L, Anger B, Tigges FJ, Schmid L, Brockhaus W, Zankovich R, Schlafer U, Weissenfels I, Meinzer A, Tobler M, Perker M, Hohnloser J, Messener D, Thiele J, Buhr T, Ansari H, German CML study group. 1993. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood* **82**: 398-407.
- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Hochhaus A, Heinze B, Georgii A, Bartram CR, Griesshammer M, Bergmann L, Essers U, Falge C, Queisser U, Meyer P, Schmitz N, Eimermacher H, Walther F, Fett W, Kleeberg UR, Kabisch A, Nerl C, Zimmermann R, Meuret G, Tichelli A, Kanz L, Tigges FJ, Schmid L, Brockhaus W, Tobler A, Reiter A, Perker M, Emmerich B, Verpoort K, Zankovich R, v. Wussow P, Prummer O, Thiele J, Buhr T, Carbonell F, Ansari H, German CML study group. 1994. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **84**: 4064-4077.
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. 2000. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**: 925-932.
- Hermans A, Heisterkamp N, von Linderen M, van Baal S, Meijer D, van der Plas D, Wiedemann LM, Groffen J, Bootsma D, Grosveld G. 1987. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* **51**: 33-40.
- Higgins CF, Gottesman MM. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**: 18-21.
- Higgins CF, Linton KJ. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 918-926.
- Higgins CF. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**: 205-210.
- Hiwase DK, Saunders V, Hewett D, Frede A, Zrim S, Dang P, Eadie L, To LB, Melo J, Kumar S, Hughes TP, White DL. 2008. Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* **14**: 3881-3888.
- Holló Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B. 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* **1191**: 384-388.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**: 789-800.
- Horvath CM. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* **25**: 496-502.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, Traxler P. 2004. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res* **64**: 2333-2337.
- Hrycyna CA, Airan LE, Germann UA, Ambudkar SV, Pastan I, Gottesman MM. 1998. Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport. *Biochemistry* **37**: 13660-13673.
- Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, Wang Y, Zou D, Thomas RM, Zhu X, Cai L, Wen D, Liu S, Romero J, Qi J, Chen I, Banda G, Lentini SP, Das S, Xu Q, Keats J, Wang F, Wardwell S, Ning Y, Snodgrass JT, Broudy MI, Russian K, Zhou T, Commodore L, Narasimhan NI, Mohemmad QK, Iulucci J, Rivera VM, Dalgarno DC, Sawyer TK, Clackson T, Shakespeare WC. 2010. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem* **53**: 4701-4719.
- Huet S, Marie JP, Laurand A, Robert J. 2005. Major improvement of the reference method of the French drug resistance network for P-glycoprotein detection in human haematological malignancies. *Leuk Res* **29**: 1029-1037.
- Hurwitz SJ, Terashima M, Mizunuma N, Slapak CA. 1997. Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. *Blood* **89**: 3745-3754.

- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**: 362-365.
- Chambers TC, Pohl J, Glass DB, Kuo JF. 1994. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem J* **299**: 309-315.
- Chan HS, DeBoer G, Thiessen JJ, Budning A, Kingston JE, O'Brien JM, Koren G, Giesbrecht E, Haddad G, Verjee Z, Hungerford JL, Ling V, Gallie BL. 1996. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation. *Clin Cancer Res* **2**: 1499-1508.
- Chang JS, Santhanam R, Trotta R, Neviani P, Eiring AM, Briercheck E, Ronchetti M, Roy DC, Calabretta B, Caligiuri MA, Perrotti D. 2007. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood* **110**: 994-1003.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.
- Chaudhary PM, Roninson IB. 1991. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**: 85-94.
- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. 1990. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* **265**: 506-514.
- Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA. 2003. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* **12**: 651-661.
- Chen ZJ, Le HB, Zhang YK, Qian LY, Sekhar KR, Li WD. 2011. Lung resistance protein and multidrug resistance protein in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *J Int Med Res* **39**: 1693-1700.
- Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L. 1995. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* **27**: 67-82.
- Christopher LJ, Cui D, Wu C, Luo R, Manning JA, Bonacorsi SJ, Lago M, Allentoff A, Lee FY, McCann B, Galbraith S, Reitberg DP, He K, Barros A Jr, Blackwood-Chirchir A, Humphreys WG, Iyer RA. 2008. Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos* **36**: 1357-1364.
- Chuang, T.-H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groen, J. and Bokoch, G. M. 1995. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad. Sci U S A* **92**: 10282-10286.
- Chufan EE, Kapoor K, Sim HM, Singh S, Talele TT, Durell SR, Ambudkar SV. 2013. Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1). *PLoS One* **8**: e82463.
- Ilaria RL, Jr., Van Etten RA. 1996. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* **271**: 31704-31710.
- Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlägel U, von Bonin M, Pursche S, Bergemann T, Ehninger G, Schleyer E. 2004. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* **18**: 401-408.
- Jabbour E, El Ahdab S, Cortes J, Kantarjian H. 2008. Nilotinib: a novel Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor for the treatment of leukemias. *Expert Opin Investig Drugs* **17**: 1127-1136
- Jackson P, Baltimore D. 1989. N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J* **8**: 449-456.
- Jacquel A, Herrant M, Legros L, Belhacene N, Luciano F, Pages G, Hofman P, Auberger P. 2003. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J* **17**: 2160-2162.
- Jacquel A, Colosetti P, Grosso S, Belhacene N, Puissant A, Marchetti S, Breitmayer JP, Auberger P. 2007. Apoptosis and erythroid differentiation triggered by Bcr-Abl inhibitors in CML cell lines are fully distinguishable processes that exhibit different sensitivity to caspase inhibition. *Oncogene* **26**: 2445-2458.
- Jordanides NE, Jorgensen HG, Holyoake TL, Mountford JC. 2006. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood* **108**: 1370-1373.
- Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162.
- Juszczyński P, Niewiarowski W, Krykowski E, Robak T, Warzocha K. 2002. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **43**: 153-158.

- Kakahara T, Tanaka A, Watanabe A, Yamamoto K, Kanto K, Kataoka S, Ogawa A, Asami K, Uchiyama M. 1999. Expression of multidrug resistance-related genes does not contribute to risk factors in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int* **41**: 641-647.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International STI571 CML Study Group. 2002. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **346**: 645-652.
- Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. 2006. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* **354**: 2542-2551.
- Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, Ossenkoppele GJ, Nicolini FE, O'Brien SG, Litzow M, Bhatia R, Cervantes F, Haque A, Shou Y, Resta DJ, Weitzman A, Hochhaus A, le Coutre P. 2007. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* **110**: 3540-3546.
- Kantarjian H, Pasquini R, Lévy V, Jootar S, Holowiecki J, Hamerschlak N, Hughes T, Bleickardt E, Dejardin D, Cortes J, Shah NP. 2009. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* **115**: 4136-4147.
- Kartner N, Riordan JR, Ling V. 1983. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **221**: 1285-1288.
- Kitazaki T, Oka M, Nakamura Y, Tsurutani J, Doi S, Yasunaga M, Takemura M, Yabuuchi H, Soda H, Kohno S. 2005. Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, directly inhibits the function of P-glycoprotein in multidrug resistant cancer cells. *Lung Cancer* **49**: 337-343.
- Kolitz JE, George SL, Marcucci G, Vij R, Powell BL, Allen SL, DeAngelo DJ, Shea TC, Stock W, Baer MR, Hars V, Maharry K, Hoke E, Vardiman JW, Bloomfield CD, Larson RA; Cancer and Leukemia Group B. 2010. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood* **116**: 1413-1421.
- Konig H, Härtel N, Schultheis B, Schatz M, Lorentz C, Melo JV, Hehlmann R, Hochhaus A, La Rosée P. 2007. Enhanced Bcr-Abl-specific antileukemic activity of arsenic trioxide (Trisenox) through glutathione-depletion in imatinib-resistant cells. *Haematologica* **92**: 838-841.
- Konopka JB, Davis RL, Watanabe SM, Ponticelli AS, Schiff-Maker L, Rosenberg N, Witte ON. 1984. Only site-directed antibodies reactive with the highly conserved src-homologous region of the v-abl protein neutralize kinase activity. *J Virol* **51**: 223-232.
- Kosztyu P, Dolezel P, Mlejnek P. 2013. Can P-glycoprotein mediate resistance to nilotinib in human leukaemia cells? *Pharmacol Res* **67**: 79-83.
- Kosztyu P, Bukvova R, Dolezel P, Mlejnek P. 2014. Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Chem Biol Interact* **219C**: 203-210.
- Kurzrock R, Shtalrid M, Romero P, Kloetzer WS, Talpas M, Trujillo JM, Blick M, Beran M, Gutterman JU. 1987. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **325**: 631-635.
- Lancet JE, Baer MR, Duran GE, List AF, Fielding R, Marcelletti JF, Multani PS, Sikic BI. 2009. A phase I trial of continuous infusion of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar with daunorubicin and cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* **33**: 1055-1061.
- le Coutre P, Ottmann OG, Giles F, Kim DW, Cortes J, Gattermann N, Apperley JF, Larson RA, Abruzzese E, O'Brien SG, Kuliczowski K, Hochhaus A, Mahon FX, Saglio G, Gobbi M, Kwong YL, Baccarani M, Hughes T, Martinelli G, Radich JP, Zheng M, Shou Y, Kantarjian H. 2008. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* **111**: 1834-1839.
- Lhommé C, Joly F, Walker JL, Lissoni AA, Nicoletto MO, Manikhas GM, Baekelandt MM, Gordon AN, Fracasso PM, Mietlowski WL, Jones GJ, Dugan MH. 2008. Phase III study of valspodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 2674-2682.

- Linton KJ. 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **22**: 122-130.
- List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, Appelbaum FR. 2001. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* **98**: 3212-3220.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods* **25**: 402-408.
- Loo TW, Clarke DM. 1993. Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem* **268**: 19965-19972.
- Loo TW, Clarke DM. 2000. Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem* **275**: 39272-39278.
- Loo TW, Clarke DM. 2005. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 419-422.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**: 1079-1082.
- Luzzatto L, Melo JV. 2002. Acquired resistance to imatinib mesylate: selection for pre-existing mutant cells. *Blood* **100**: 1105.
- Ma G, Lu D, Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. 1997. Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* **14**: 2367-2372.
- Ma B, Prueksaritanont T, Lin JH. 2000. Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos* **28**: 125-130.
- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. 2000. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**: 1070-1079.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. 2003. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**: 2368-2373.
- Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F, Belanger C, Manley PW, Leroy C, Etienne G, Roche S, Pasquet JM. 2008. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res* **68**: 9809-9816.
- Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. 2003. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol* **66**: 1207-1218.
- Mandery K, Glaeser H, Fromm MF. 2012. Interaction of innovative small molecule drugs used for cancer therapy with drug transporters. *Br J Pharmacol* **165**: 345-362.
- Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R. 2000. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **58**: 624-632.
- Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. 1999. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* **73**: 290-296.
- Mayer BJ, Baltimore D. 1994. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **14**: 2883-2894.
- McWhirter JR, Wang JY. 1993. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* **12**: 1533-1546.
- McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Bio* **13**: 7587-7595.
- Mechetner EB, Schott B, Morse BS, Stein WD, Druley T, Davis KA, Tsuruo T, Roninson IB. 1997. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12908-12913.
- Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. 1993. The ABLBCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* **81**: 158-165.
- Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. 2003. Chronic myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 132-152.
- Meschini S, Calcabrini A, Monti E, Del Bufalo D, Stringaro A, Dolfini E, Arancia G. 2000. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* **87**: 615-628.

- Miao YJ, Wang JY. 1996. Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* **271**: 22823-22830.
- Minami H, Ohtsu T, Fujii H, Igarashi T, Itoh K, Uchiyama-Kokubu N, Aizawa T, Watanabe T, Uda Y, Tanigawara Y, Sasaki Y. 2001. Phase I study of intravenous PSC-833 and doxorubicin: reversal of multidrug resistance. *Jpn J Cancer Res* **92**: 220-230.
- Mitelman F. 1993. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **11**: 11-15.
- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* **59**: 8-13.
- Mlejnek P, Dolezel P, Faber E, Kosztyu P. 2011. Interactions of N-desmethyl imatinib, an active metabolite of imatinib, with P-glycoprotein in human leukemia cells. *Ann Hematol* **90**: 837-842.
- Morschhauser F, Zinzani PL, Burgess M, Sloats L, Bouafia F, Dumontet C. 2007. Phase I/II trial of a P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), given orally in combination with the CHOP regimen in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **48**: 708-715.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Mross K, Bohn C, Edler L, Jonat W, Queisser W, Heidemann E, Goebel M, Hossfeld DK. 1993. Randomized phase II study of single-agent epirubicin +/- verapamil in patients with advanced metastatic breast cancer. An AIO clinical trial. Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie of the German Cancer Society. *Ann Oncol* **4**: 45-50.
- Mukai M, Che XF, Furukawa T, Sumizawa T, Aoki S, Ren XQ, Haraguchi M, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takamatsu H, Akiyama S. 2003. Reversal of the resistance to STI571 in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Cancer Sci* **94**: 557-563.
- Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON. 1991. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* **11**: 1785-1792.
- Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superti-Furga G, Kuriyan J. 2003. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**: 859-871.
- Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. 2002. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**: 4236-4243.
- Nakagawa M, Schneider E, Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C, Cowan KH. 1992. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **52**: 6175-6181.
- Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. 2002. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* **71**: 297-303.
- Nies AT, Schaeffeler E, van der Kuip H, Cascorbi I, Bruhn O, Kneba M, Pott C, Hofmann U, Volk C, Hu S, Baker SD, Sparreboom A, Ruth P, Koepsell H, Schwab M. 2014. Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (OCT1). *Clin Cancer Res* **20**: 985-994.
- Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Campiglio M, Napolitano M, Mancino M, Carotenuto A, Viglietto G, Menard S. 2006. The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* **207**: 420-427.
- Nowell P, Hungerford D. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497.
- Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, Slupianek A, Stoklosa T, Gloc E, Nieborowska-Skorska M, Blasiak J, Skorski T. 2004. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* **104**: 3746-3753.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. 2003. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**: 994-1004.
- O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. 2005. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* **65**: 4500-4505.

- O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, Adrian LT, Zhou T, Huang WS, Xu Q, Metcalf CA 3rd, Tyner JW, Loriaux MM, Corbin AS, Wardwell S, Ning Y, Keats JA, Wang Y, Sundaramoorthi R, Thomas M, Zhou D, Snodgrass J, Commodore L, Sawyer TK, Dalgarno DC, Deininger MW, Druker BJ, Clackson T. 2009. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* **16**: 401-412.
- Okochi E, Iwahashi T, Tsuruo T. 1997. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia* **11**: 1119-1123.
- Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. 2001. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* **97**: 2440-2448.
- Oram JF, Heinecke JW. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* **85**: 1343-1372.
- Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Várady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Váradi A, Kéri G, Orfi L, Németh K, Sarkadi B. 2004. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* **65**: 1485-1495.
- Ozvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B. 2005. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Updat* **8**: 15-26.
- Pabst T, Stillner E, Neuberger D, Nimer S, Willman CL, List AF, Melo JV, Tenen DG, Mueller BU. 2006. Mutations of the myeloid transcription factor CEBPA are not associated with the blast crisis of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **133**: 400-402.
- Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, Lin J. 2000. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* **20**: 407-416.
- Pallis M, Das-Gupta E. 2005. Flow cytometric measurement of functional and phenotypic P-glycoprotein. *Methods Mol Med* **111**: 167-181.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B. 1996. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **88**: 2410-2414.
- Pap M, Cooper GM. 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* **273**: 19929-19932.
- Parveen Z, Stockner T, Bentele C, Pferschy S, Kraupp M, Freissmuth M, Ecker GF, Chiba P. 2011. Molecular dissection of dual pseudosymmetric solute translocation pathways in human P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **79**: 443-452.
- Pascaud C, Garrigos M, Orlowski S. 1998. Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochem J* **333**: 351-358.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. 1991. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **66**: 161-171.
- Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, Gishizky ML. 1993. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **75**: 175-185.
- Peng XX, Tiwari AK, Wu HC, Chen ZS. 2012. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. *Chin J Cancer* **31**: 110-118.
- Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. 2010. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* **120**: 2254-2264.
- Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon FX. 2007. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**: 3496-3499.
- Piwonica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. 1993. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* **53**: 977-984.
- Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. 1994. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* **13**: 764-773.
- Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, Williamson NA, Greco WR, Minderman H, Baer MR. 2005. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res* **11**: 2320-2326.
- Rao VV, Anthony DC, Piwnica-Worms D. 1995. Multidrug resistance P-glycoprotein monoclonal antibody JSB-1 crossreacts with pyruvate carboxylase. *J Histochem Cytochem* **43**: 1187-1192.

- Razga F, Racil Z, Machova Polakova K, Buresova L, Klamova H, Zackova D, Dvorakova D, Polivkova V, Cetkovsky P, Mayer J. 2011. The predictive value of human organic cation transporter 1 and ABCB1 expression levels in different cell populations of patients with de novo chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* **94**: 303-306.
- Riordan JR, Johanna M, Rommens, Bat-sheva Kerem, Noa Alon, Richard Rozmahel, Zbyszko Grzelczak, Julian Zielenski, Si Lok, Natasa Plavsic, Jia-Ling Chou, Mitchell L. Drumm, Michael C. Iannuzzi, Francis S. Collins, Lap-Chee Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073.
- Robert J, Jarry C. 2003. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* **46**: 4805-4817.
- Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, Poruchynsky MS, Bates SE. 2003. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* **89**: 1971-1978.
- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE. 2009. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 3-13.
- Romsicki Y, Sharom FJ. 2001. Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* **40**: 6937-6947.
- Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, Higgins CF, Ford RC. 2005. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem* **280**: 2857-2862.
- Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. 2000. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **96**: 365-368.
- Rowley JD. 1973. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293.
- Rubin EH, de Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Lin Y, Musanti R, Grospe SL, Smith SL, Topmeyer DL, Much J, Kane M, Chaudhary A, Jordan C, Burgess M, Slapak CA. 2002. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **8**: 3710-3717.
- Ruff P, Vorobiof DA, Jordaan JP, Demetriou GS, Moodley SD, Nosworthy AL, Werner ID, Raats J, Burgess LJ. 2009. A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**: 763-768.
- Rumpold H, Wolf AM, Gruenewald K, Gastl G, Gunsilius E, Wolf D. 2005. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp Hematol* **33**: 767-775.
- Rumpold H, Wolf AM, Wolf D. 2006. The role of P-glycoprotein in imatinib resistance. *Leukemia* **20**: 144.
- Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege Cambrin G, Mazza U, Gavosto F. 1990. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **76**: 1819-1824.
- Samanta A, Perazzona B, Chakraborty S, Sun X, Modi H, Bhatia R, Priebe W, Arlinghaus R. 2011. Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **25**: 463-472.
- Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Chaudhary A, Fife K, Battiato L, Sweeney C, Jordan C, Burgess M, Slapak CA. 2004. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* **10**: 3265-3272.
- Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. 1996. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3) kinase pathway. *Oncogene* **12**: 839-846.
- Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten RA, Gu H, Griffin JD, Neel BG. 2002. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* **1**: 479-492.
- Sauna ZE, Ambudkar SV. 2001. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem* **276**: 11653-11661.
- Sawyers CL. 1999. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **340**: 1330-1340.
- Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. 1997. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* **387**: 520-523.

- Shani N, Valle D. 1998. Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol* **292**: 753-776.
- Shapiro AB, Ling V. 1997. Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **250**: 122-129.
- Shapiro AB, Ling V. 1998. Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **254**: 181-188.
- Shapiro AB, Fox K, Lee P, Yang YD, Ling V. 1998. Functional intracellular P-glycoprotein. *Int J Cancer* **76**: 857-864.
- Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. 1999. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* **259**: 841-850.
- Sharom FJ. 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**: 105-127.
- Sharom FJ. 2014. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Front Oncol* **4**: 41.
- Shepard RL, Cao J, Starling JJ, Dantzig AH. 2003. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int J Cancer* **103**: 121-125.
- Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS. 2007. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res* **67**: 11012-11020.
- Shitelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. 1985. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315**: 550-554.
- Shukla S, Sauna ZE, Ambudkar SV. 2008. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia* **22**: 445-447.
- Shukla S, Skoumbourdis AP, Walsh MJ, Hartz AM, Fung KL, Wu CP, Gottesman MM, Bauer B, Thomas CJ, Ambudkar SV. 2011. Synthesis and characterization of a BODIPY conjugate of the BCR-ABL kinase inhibitor Tasigna (nilotinib): evidence for transport of Tasigna and its fluorescent derivative by ABC drug transporters. *Mol Pharm* **8**: 1292-1302.
- Shukla S, Chen ZS, Ambudkar SV. 2012. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat* **15**: 70-80.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**: 1938-1942.
- Schinkel AH, Kemp S, Dollé M, Rudenko G, Wagenaar E. 1993. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* **268**: 7474-7481.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. 2007. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**: 377-397.
- Slingerland JM, Minden MD, Benchimol S. 1991. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Blood* **77**: 1500-1507.
- Smith TA. 1999. Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue. *Br J Biomed Sci* **56**: 285-292.
- Smith DL, Burtham J, Whetton AD. 2003. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert Rev Mol Med* **5**: 1-27.
- Sonneveld P, Suci S, Weijermans P, Beksac M, Neuwirtova R, Solbu G, Lokhorst H, van der Lelie J, Dohner H, Gerhartz H, Segeren CM, Willemze R, Lowenberg B; European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Leukaemia Cooperative Group (LCG); Dutch Haemato-Oncology Cooperative Study Group (HOVON). 2001. Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study (06914). *Br J Haematol* **115**: 895-902.
- Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, Medema RH. 2002. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* **168**: 5024-5031.
- Szakács G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. 1998. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res* **4**: 251-257.
- Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY and Hope TJ. 1998. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7457-7462.

- Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. 2006. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **354**: 2531-2541.
- Tang R, Faussat AM, Perrot JY, Marjanovic Z, Cohen S, Storme T, Morjani H, Legrand O, Marie JP. 2008. Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML). *BMC Cancer* **8**: 51.
- te Boekhorst PA, van Kapel J, Schoester M, Sonneveld P. 1992. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**: 238-242.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7735-7738.
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. 2004. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* **104**: 3739-3745.
- Tiwari AK, Sodani K, Wang SR, Kuang YH, Ashby CR Jr, Chen X, Chen ZS. 2009. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochem Pharmacol* **78**: 153-161.
- Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, Kish K, Lee FY, Borzilleri R, Lombardo LJ, Xie D, Zhang Y, Klei HE. 2006. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* **66**: 5790-5797.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**: 325-339.
- Towatari M, Adachi K, Kato H, Saito H. 1991. Absence of the human retinoblastoma gene product in the megakaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* **78**: 2178-2181.
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **99**: 1441-1454.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. 1982. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* **42**: 4730-4733.
- Twentyman PR, Fox NE, White DJ. 1987. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *Br J Cancer* **56**: 55-57.
- Tyzack JK, Wang X, Belsham GJ, Proud CG. 2000. ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* **275**: 34131-34139.
- Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R. 1992. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* **267**: 24248-24252.
- Uemura N, Salgia R, Ewaniuk DS, Little MT, Griffin JD. 1999. Involvement of the adapter protein CRKL in integrin-mediated adhesion. *Oncogene* **18**: 3343-3353.
- Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. 1989. The mouse type IV *c-abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* **58**: 669-678.
- Vandevuer S, Van Bambeke F, Tulkens PM, Prévost M. 2006. Predicting the three-dimensional structure of human P-glycoprotein in absence of ATP by computational techniques embodying crosslinking data: insight into the mechanism of ligand migration and binding sites. *Proteins* **63**: 466-478.
- Verweij J, Herweijer H, Oosterom R, van der Burg ME, Planting AS, Seynaeve C, Stoter G, Nooter K. 1991. A phase II study of epidoxorubicin in colorectal cancer and the use of cyclosporin-A in an attempt to reverse multidrug resistance. *Br J Cancer* **64**: 361-364.
- Virchow R. 1845. Weisses Blut. *Frorieps Notizen* **36**: 151-156.
- von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. 2002. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* **359**: 487-491.
- Warburg O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**: 269-270.
- Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright

- RD, Gilliland DG, Griffin JD. 2005. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**: 129-141.
- Welch PJ, Wang JY. 1995. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol* **15**: 5542-5551.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino AC, Cambareri AC, Quinn SR, Manley PW, Hughes TP. 2006. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* **108**: 697-704.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T. 2007. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* **110**: 4064-4072.
- White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, Saunders VA, Manley PW, Hughes TP. 2010a. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* **28**: 2761-2767.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. 2010b. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia* **24**: 1962-1965.
- Woodahl EL, Yang Z, Bui T, Shen DD, Ho RJ. 2004. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* **310**: 1199-1207.
- Wrighton SA, VandenBranden M, Ring BJ. 1996. The human drug metabolizing cytochromes P450. *J Pharmacokinetic Biopharm* **24**: 461-473.
- Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. 2008. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* **1**: 93-105.
- Xie S, Wang Y, Liu J, Sun T, Wilson MB, Smithgall TE, Arlinghaus RB. 2001. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* **20**: 6188-6195.
- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S, Zhang JT. 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* **279**: 19781-19789.
- Yague E, Armesilla AL, Harrison G, Elliott J, Sardini A, Higgins CF, Raguz S. 2003. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol Chem* **278**: 10344-10352.
- Yang CH, Huang CJ, Yang CS, Chu YC, Cheng AL, Whang-Peng J, Yang PC. 2005. Gefitinib reverses chemotherapy resistance in gefitinib-insensitive multidrug resistant cancer cells expressing ATP-binding cassette family protein. *Cancer Res* **65**: 6943-6949.
- Yang K, Wu J, Li X. 2008. Recent advances in the research of P-glycoprotein inhibitors. *Biosci Trends* **2**: 137-146.
- Zhou DC, Ramond S, Viguie F, Faussat AM, Zittoun R, Marie JP. 1996. Sequential emergence of MRP- and MDR1-gene over-expression as well as MDR1-gene translocation in homoharringtonine-selected K562 human leukemia cell lines. *Int J Cancer* **65**: 365-371.
- Zong Y, Zhou S, Sorrentino BP. 2005. Loss of P-glycoprotein expression in hematopoietic stem cells does not improve responses to imatinib in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* **19**: 1590-1596.
- Zöchbauer S, Wallner J, Haider K, Depisch D, Huber H, Pirker R. 1997. MDR1 RNA transcripts do not indicate long-term prognosis in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* **33**: 1516-1518.

10. Seznam použitých zkratk

ABC	ATP-binding cassette
ABCP	Placenta-specific ATP binding cassette
Abl	Abelson tyrosinová kinasa
ALL	Akutní lymfoblastická leukemia
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Arg	Abl-related gene
ATP	Adenosin trifosfát
ATR	Ataxia telangiectasia mutated
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-X _L	B cell lymphoma-extra large
Bcr	Breakpoint cluster region
BCRP	Breast cancer related protein
Bid	BH-3 interacting domain death antagonist
BRCA1	Breast cancer 1
C/EBP α	CCAAT-enhancer binding protein α
CaLB	Ca-dependentní vazba na lipidy
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CML	Chronická myeloidní leukemia
CR	Cytogenetická odpověď
Crk	CT10 regulator of kinase
Crkl	Crk-like
CsA	Cyklosporin A
CYP	Cytochrom P450
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní protein kinasa
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FA	Kyselina mravenčí
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetální hovězí sérum

FDA	Food and drug administration
FGFR	Receptor pro fibroblastový růstový faktor
FoxO	Forkhead box O
Gab2	Grb2-associated-binding protein 2
GDP	Guanosin difosfát
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSH	Glutathion
GSK3 β	Glykogen synthasa kinasa 3 β
GTP	Guanosin trifosfát
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein
HHT	Homoharringtonin
HIF	Hipoxia-inducible factor
hnRNP-E2	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein E2
HR	Hematologická odpověď
Chk1	Checkpoint kinase 1
IAP1	Inhibitors of apoptosis 1
JAK	Janusova kinasa
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MDR	Mnohočetná léková rezistence
MEK	Mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa
MeOH	Methanol
MR	Molekulární odpověď
mRNA	Mediátorová RNA
MTX	Mitoxantron
MXR	Mitoxantrone resistance protein
NADPH	Nikotinamid dinukleotid fosfát
NBD	Nukleotid-vázající doména
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OCT-1	Organický kationtový transportér 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PE	Fykoerythrin
P-gp	P-glykoprotein
PI-3K	Fosfatidylinositol-3 kinasa

PKA	Protein kinasa A
PKC	Protein kinasa C
pRb	Retinoblastomový protein
Rac-GAP	Oblast s GTPasovou aktivitou pro protein Rac
Raf-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarkoma
RecA	Rekombinasa A
Rho-GEF	Rho guanine-nucleotide exchange factor
rIFN	Rekombinantní interferon
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
SH doména	Src homologní doména
Shc	Src homology 2 domain containing protein
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
Sos	Son of sevenless
Src	Sarcoma
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TK	Tyrosinová kinasa
TKI	Inhibitor tyrosinové kinasy
TMD	Transmembránová doména
VEGFR	Receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

11. Seznam publikací a posterů

11.1. Práce související s dizertační prací

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru v časopisech s IF

Kosztyu P, Bukvova R, Dolezel P, Mlejnek P. 2014. Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Chem Biol Interact* **219C**: 203-210. **IF** 2,98

Kosztyu P, Dolezel P, Mlejnek P. 2013. Can P-glycoprotein mediate resistance to nilotinib in human leukaemia cells? *Pharmacol Res* **67**: 79-83. **IF** 3,97

Mlejnek P, Dolezel P, Faber E, Kosztyu P. 2011. Interactions of N-desmethyl imatinib, an active metabolite of imatinib, with P-glycoprotein in human leukemia cells. *Ann Hematol* **90**: 837-842. **IF** 2,62

Abstrakta v časopisech s IF

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. 2010. Modulation of P-glycoprotein expression by RNA interference. *Chemické listy* **104**: 372-373. **IF** 0,62

Seznam přednášek a posterů

Kosztyu P, Dolezel P, Mlejnek P. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by RNA interference. 3. FEBS Special Meeting on ABC Proteins – ABC 2010, 27. 2-5. 3. 2010, Innsbruck, Rakousko, poster.

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. Modulation of P-glycoprotein expression by RNA interference. 10. Mezioborová konference mladých chemiků a biologů, 25.-28. 5. 2010, Milovy, poster.

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. Kvantitativní vztah mezi expresí P-glykoproteinu a pozorovanou rezistencí u nádorových buněk. *Biotechnologie v medicíně*, 27.-29. 5. 2010, Vílanec u Jihlavy, přednáška.

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. Quantitative relationship between the P-glycoprotein expression and the drug resistance in leukemic cells. *Nová léčiva závažných lidských onemocnění*, 29.-31. 5. 2011, Kouty nad Desnou, přednáška.

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. Does the extracellular acidosis really increase the activity of P-glycoprotein in cancer cells? The 28th Workshop of SSCT and the FINCOPA Seminar- „Towards toxicity assessment without animals“, 20.- 23. 9. 2011, Tampere, Finsko, poster.

Kosztyu P, Dolezel P, Mlejnek P. Can P-glycoprotein mediate resistance to nilotinib in human leukemia cells? XV. Congresso Latinoamericano de Genetica, 28.-31. 10. 2012, Rosario, Argentina, poster.

Kosztyu P, Doležel P, Mlejnek P. Is the resistance to tyrosin kinase inhibitors mediated by P-glycoprotein? Konference chemické biologie a genetiky, 12.-14. 5. 2013, Malá Morávka – Karlov pod Pradědem, přednáška.

11.2.Ostatní publikace

Mlejnek P, Dolezel P, Kosztyu P. 2012. P-glycoprotein mediates resistance to A3 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-n-methyluronamide in human leukemia cells. *J Cell Physiol* **227**: 676-685. **IF** 4,22