

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Lékařská fakulta**  
**Ústav histologie a embryologie**



Regulace exprese ABC transportérů  
odpovědných za mnohočetnou lékovou rezistenci  
během embryonálního vývoje

**Mgr. Anna Konieczna**

Dizertační práce  
Olomouc 2015

**Palacký University Olomouc**  
**Faculty of Medicine and Dentistry**  
**Department of Histology and Embryology**



Regulation of ABC transporter expression  
related to multidrug resistance  
during embryogenesis

**Mgr. Anna Konieczna**

Dissertation Thesis  
Olomouc 2015

## SOUHRN

Standardní úlohou ABC transportérů MDR1, MRP1, BCRP (*MDR1=Multidrug Resistance Protein 1*, *MRP1=Multidrug Resistance Associated Protein 1*, *BCRP=Breast Cancer Resistant Protein*) v embryonálních/fetálních tkáních během intrauterinního vývoje (IUV) je ochrana zdravých buněk před cizorodými látkami, u nádorových buněk však tyto transportéry významně přispívají ke vzniku nežádoucí mnohočetné lékové rezistence (MDR). Úkolem této dizertační práce je přispět k pochopení, jak lze účinně potlačovat nadměrnou expresi zmíněných transportérů a tak omezit či obejít obranu nádorové buňky. Jako nadějná strategie se jeví inhibice transkripce a translace transportérů s využitím vlivu signální dráhy PI3K/Akt a s ní souvisejících inhibitorů receptorů tyrozin kináz (TKIs) a agonistů receptorů aktivovaných proliferátory peroxizomů  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ).

Pro prohloubení poznání mechanismů MDR byly provedeny experimenty seskupené do dvou částí. V první části (morfoloické) pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické metody byla zmapována exprese zmíněných ABC transportérů v embryonálních/fetálních tkáních tří různých orgánů, lišících se dále ještě stádiem IUV. V druhé části (funkční) pomocí testu životaschopnosti WST-1 bylo zjištěno, které TKIs a agonisté PPAR- $\gamma$  jsou substráty vybraných ABC transportérů. Pomocí kvantitativní PCR s reverzní transkripcí byl popsán účinek klinicky používaných tří TKIs (imatinibu, nilotinibu a dasatinibu) a tří agonistů PPAR- $\gamma$  (ciglitazonu, rosiglitazonu, troglitazonu) na transkripci ABC transportérů, a dále pomocí průtokové cytometrie byl popsán účinek stejných tří TKIs na translaci ABC transportérů. Pomocí westernového přenosu byla při regulaci této exprese studována účast proteinů pPTEN a PPAR- $\gamma$  zapojených do signální dráhy PI3K/Akt.

U embryonálních/fetálních střev a jater byla pozorována specifická exprese zmíněných ABC transportérů v závislosti na fázi IUV. U embryonálních/fetálních ledvin byla pozorována specifická exprese transportérů v závislosti na pozici ve tkáni (pozitivita roste se stupněm diferenciací vyvíjejících se nefronů a tubulárního systému směrem ke dřeni), ale nikoliv na fázi IUV.

Bylo prokázáno, že substrátem transportéru MDR1 jsou všechny tři TKIs. Tyto TKIs snížily expresi mRNA transportéru MDR1 už po 1. hodině od ovlivnění, zatímco na proteinové úrovni byl viditelný pokles exprese až po 3. dnu od ovlivnění.

Substrátem transportéru MRP1 je pouze rosiglitazon. U buněčné linie A549 byl pozorován pokles exprese mRNA transportéru MRP1 po ovlivnění nilotinibem a pokles na proteinové úrovni (největší po ovlivnění imatinibem) až po 3. dnu od ovlivnění. U buněčné linie HEK293 byl pozorován pokles exprese mRNA transportéru MRP1 po ovlivnění dasatinibem.

Substrátem transportéru BCRP je imatinib a nilotinib. U obou buněčných linií byl pozorován nežádoucí nárůst exprese na úrovni mRNA (rychlý u buněk A549, pomalejší u buněk HEK293 - po 1. až 3. dnu od ovlivnění), nárůst na úrovni proteinů byl pozorován u buněk A549. Hladina proteinu BCRP rostla navzdory účinku TKIs, tento nárůst byl pozorován dokonce s rostoucím množstvím buněčných pasáží.

Proces regulace exprese ABC transportérů odpovědných za MDR pomocí TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$  probíhá skrze aktivaci proteinů PPAR- $\gamma$ /pPTEN.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

MDR, rakovina, ABC transportéry, MDR1, MRP1, BCRP, signální dráha kináz PI3K/Akt, TKIs, agonisté PPAR- $\gamma$ , embryogeneze, IUV, embryonální/fetální střevo, játra, ledviny

## **BIBLIOGRAFICKÁ ANOTACE**

**Autor:** Mgr. Anna Konieczna  
**Název práce:** Regulace exprese ABC transportérů odpovědných za mnohočetnou lékovou rezistenci během embryonálního vývoje  
**Studijní program:** Anatomie, histologie a embryologie  
**Vedoucí práce:** MUDr. Běla Erdošová, Ph.D.  
**Akademický rok:** 2014/2015  
**Počet stran:** 83

## SUMMARY

Three ABC transporters (MDR1, MRP1, BCRP) belonging to the family of multidrug resistance (MDR) proteins, play a crucial role in the protection mechanisms during embryogenesis and mediate drug resistance in cancer cells. The aim of this thesis is to contribute to better understanding how to suppress the ABC transporters mediated cancer cell self-defense mechanism. The inhibition of transcription or translation of ABC transporters via tyrosine kinase inhibitors (TKIs) or peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) mediated by PI3K/Akt signalling pathway seems to be a promising strategy, which can restore the susceptibility of resistant cells.

For a deeper understanding of MDR mechanisms we conducted experiments divided into two parts. In the first part (morphology oriented) we aimed to describe spatio-temporal expression pattern of ABC transporters during human prenatal development (by indirect two-step immunohistochemical method). In the second part (mechanism oriented) kinetics of three TKIs in clinical use (imatinib, nilotinib and dasatinib) and three PPAR- $\gamma$  agonists (ciglitazone, rosiglitazone, troglitazone) on ABC transporters efficiency of transcription (using quantitative reverse transcription real-time PCR) and translation (using flow cytometry) was studied. We have also described the role of PPAR- $\gamma$  and PTEN proteins related to PI3K/Akt signalling pathway in the process of ABC transporters expression (using western blotting) and the interactions of TKIs and PPAR- $\gamma$  agonists with ABC transporters (using cytotoxicity WST-1 assay).

We demonstrated differences in expression pattern of ABC transporters during IUD in intestine and liver, yet in kidneys the age-specific localization was not observed. However, the increasing positivity from the kidney surface towards deeper, more differentiated parts was found.

We have proved that all three TKIs serve as substrates to MDR1 transporter. While MDR1 mRNA is significantly down-regulated already 1 h following exposure to all three TKIs, down-regulation of protein expression becomes evident only after day 3.

Although MRP1 transporter seems to be a less effective TKIs extruder, its inhibition of mRNA expression in A549 cells after nilotinib exposure and in HEK293 cells after dasatinib exposure was demonstrated. On the MRP1 protein level, slight inhibition was shown, as well (highest 3 d following imatinib exposure).

BCRP is a transporter of imatinib and nilotinib. We observed up-regulation of its mRNA after short-time exposure to TKIs in A549 cells and 1 d or 3 d thereafter in HEK293 cells. The expression of BCRP protein increased regardless of TKI effect in succeeding passages.

We observed that TKIs and PPAR- $\gamma$  agonists-mediated down-regulation of MDR-related ABC transporters correlates with PPAR- $\gamma$ /PTEN activation.

## **KEYWORDS**

MDR, cancer, ABC transporters, MDR1, MRP1, BCRP, signalling pathway PI3K/Akt, TKIs, PPAR- $\gamma$  agonists, embryogenesis, IUD, embryonal/fetal intestine, liver, kidneys

## **BIBLIOGRAPHICAL ANNOTATION**

**Author:** Mgr. Anna Konieczna  
**Title of Thesis:** Regulation of ABC transporter expression related to multidrug resistance during embryogenesis  
**Field of Study:** Anatomy, histology and embryology  
**Supervisor:** MUDr. Běla Erdöšová, Ph.D.  
**Academic Year:** 2014/2015  
**Number of Pages:** 83

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně s využitím pouze těch informačních zdrojů, které jsou v práci citovány, a s dodržением ostatních zásad publikační a vědecké etiky.

Upozorňuji, že případné využití mé práce jiným subjektem se musí řídit ustanoveními platných citačních norem.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Palackého v Olomouci má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona. Souhlasím s půjčováním mé dizertační práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 4. července 2015

Mgr. Anna Konieczna

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala přednostovi Ústavu histologie a embryologie prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za četné kvalitní rady, podnětné konzultace a věcné připomínky. Stejně tak mé díky patří zástupkyni téhož ústavu MUDr. Běle Erdšové, Ph.D. za odborné vedení práce a pomoc ve vyhodnocování imunohistochemických preparátů.

Dále děkuji Mgr. Jiřině Medalové, Ph.D. za nezištné zprostředkování současných vědeckých poznatků z dané oblasti výzkumu a také Doc. MUDr. Martinu Klabusayovi, Ph.D. za umožnění provedení závěrečných experimentů.

Děkuji rovněž všem spolupracovníkům z Ústavu histologie a embryologie LF UP v Olomouci a z Mezinárodního centra klinického výzkumu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně (FNUSA-ICRC) a také své rodině za trpělivost a podporu během celé doby mého studia.



# OBSAH:

## TEORETICKÁ ČÁST

<b>1. Mnohočetná léková rezistence (MDR)</b> .....	11
<b>2. ABC transportní proteiny odpovědné za MDR</b> .....	13
2.1 Obecná charakteristika .....	13
2.2 Tři typy ABC transportérů.....	16
2.2.1 ABCB1/PGP1/MDR1 .....	17
2.2.2 ABCC1/GS-X/MRP1 .....	17
2.2.3 ABCG2/MXR/BCRP.....	17
2.3 Substrátová specifita .....	18
2.4 Inhibitory .....	20
2.5 Expresní profil ABC transportérů v lidském těle .....	21
2.5.1 Střeva, játra, ledviny.....	21
2.5.2 Ostatní tkáň.....	22
2.6 Fyziologické funkce .....	23
<b>3. Signální dráha kináz PI3K/Akt a její vliv na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR</b> .....	24
3.1 Signální dráha kináz PI3K/Akt .....	24
3.2 Regulace exprese pomocí TKI .....	25
3.2.1 Tyrozin kinázové receptory (TKR) – charakteristika .....	25
3.2.2 Inhibitory enzymů tyrozin kináz (TKI) .....	25
3.2.3 Mechanismus účinku TKI .....	26
3.2.4 Regulace exprese pomocí vybraných TKI.....	26
3.3 Regulace exprese pomocí agonistů PPARs.....	27
3.3.1 Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs) – charakteristika .....	27
3.3.2 Mechanismus účinku PPARs.....	27
3.3.3 Izoformy PPARs a jejich ligandy .....	27
3.3.4 Regulace exprese pomocí vybraných agonistů PPAR- $\gamma$ .....	28
<b>4. Pohled na embryonální buňky vybraných tkání jako na model pro studium MDR</b> .....	30
4.1 Podobnost vlastností nádorových buněk s vlastnostmi buněk embryonálních .....	30
4.2 Embryogeneze střev, jater a ledvin.....	30
4.3 Expresní profil ABC transportérů odpovědných za MDR v embryonálních/fetálních tkáních .....	32
4.3.1 Střeva, játra a ledviny .....	32
4.3.2 Ostatní tkáň.....	33
<b>5. Cíle práce</b> .....	34

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

<b>6. Materiál a metody</b> .....	35
6.1 Použité protilátky .....	35
6.2 Imunohistochemická detekce proteinů .....	35
6.3 Buněčné linie a jejich kultivace .....	36
6.4 WST-1 (test životaschopnosti) .....	37
6.4.1 Stanovení afinity agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs k jednotlivým transportérům .....	37
6.4.2 Stanovení koncentrací IC50 agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs u buněčných linií HEK293 a A549 .....	37
6.5 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase .....	38
6.5.1 Izolace RNA .....	38
6.5.2 Měření koncentrace RNA .....	38
6.5.3 Navrhování primerů a sond .....	38
6.5.4 Reverzní transkripce .....	39
6.5.5 Amplifikace pomocí qRT-PCR .....	39
6.6 Průtoková cytometrie .....	40
6.7 Imunofluorescenční značení proteinů .....	41
6.8 Western blotting .....	41
6.8.1 Izolace proteinů .....	41
6.8.2 Měření koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové .....	42
6.8.3 SDS-PAGE – elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu .....	42
6.8.4 Westernový přenos .....	43
6.8.5 Detekce proteinů na membráně .....	43
6.9 Statistika .....	43
<b>7. Výsledky</b> .....	44
7.1 Imunohistochemická lokalizace ABC transportérů odpovědných za MDR v embryonálních/fetálních tkáních: .....	44
7.1.1 střeva .....	44
7.1.2 játra .....	45
7.1.3 ledviny .....	46
7.2 Stanovení koncentrace IC50 pro agonisty PPAR- $\gamma$ a TKIs u buněčných linií HEK293 a A549 pomocí testu životaschopnosti WST-1 .....	51
7.3 Vliv agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR na úrovni mRNA u modelových buněčných linií HEK293 a A549 .....	52
7.4 Vliv agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR na úrovni proteinů u modelové buněčné linie A549 .....	57
7.5 Možnosti regulace exprese ABC transportérů odpovědných za MDR pomocí aktivace proteinů PPAR- $\gamma$ /PTEN .....	61
7.6 Afinita TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$ k jednotlivým transportérům .....	62
<b>8. Diskuze</b> .....	65
<b>9. Závěry</b> .....	69
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	70
<b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	72
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	82
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	83

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Mnohočetná léková rezistence (MDR)

Léková rezistence je schopnost nádorových (a také jiných např. bakteriálních) buněk odolávat cytotoxickým efektům určitých léčiv a tvoří tak překážku v léčbě pacientů s různými typy tumorů, infekčních onemocnění apod. V posledních letech jsou způsoby oslabení této rezistence předmětem zájmu mnoha studií.

Pokud rezistence existuje již před prvním použitím léků, jedná se o **rezistenci přirozenou (primární)**. **Získaná (sekundární) rezistence** vzniká až v průběhu léčby, kdy původně citlivé buňky se postupně stávají k dané cytotoxické látce rezistentní. Při ztrátě citlivosti k určitému léčivu však může být zachována citlivost k jiným látkám. Pokud při vzniku rezistence na jednu látku vzniká současně rezistence i na jinou strukturálně příbuznou látku, jedná se o **rezistenci zkříženou**. Mnohdy se však vyskytují případy zkřížené rezistence mezi látkami, které jsou strukturálně i funkčně nepříbuzné a přitom se mohou lišit i jiným mechanismem účinku – tehdy se jedná o tzv. **mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR)** (1).

MDR byla poprvé popsána v roce 1970 na buněčné linii izolované z plic čínského křečka a na buněčné linii myší leukémie. Autoři zde pozorovali zkříženou rezistenci na aktinomycin D a zároveň na vinblastin a daunomycin (2).

K potlačení vznikající sekundární rezistence buněk se mnohdy zvyšují dávky léčiv (i za cenu zesílení jejich vedlejších účinků). Bohužel, tímto současně dochází ke zdokonalování a posilování obranných mechanismů buněk působících proti těmto lékům. Takto vzniká MDR. Jakmile se MDR jednou objeví, je již podání dalších léčiv neúčinné, dochází k toxickému efektu a ke zhoršení zdravotního stavu pacienta (3). Nutno však poznamenat, že problematika MDR se netýká jenom protinádorových léčiv, ale i antibiotik, antimykotických, antiparazitárních a jiných léků.

Existuje velké množství mechanismů podílejících se na vzniku MDR (přitom každému druhu nádoru odpovídá jiný soubor specifických mechanismů). Jedná se o **změny farmakokinetiky léků** (snížení resorpce a distribuce, urychlení biotransformace a vylučování léků), o **změny cytokinetiky buněk** (zvyšování podílu nádorových buněk přecházejících ze stavu G1 do klidového stavu G0, nárůst spontánních mutací vedoucích k selekci a následnému pomnožení rezistentního klonu buněk). Jedná se také o **strukturální a funkční změny buňky**, které spočívají v nastolení obranných buněčných mechanismů zahrnujících: regulaci průchodu látek do buňky (s cílem jeho omezení), aktivaci detoxifikačních enzymů a reparačních mechanismů DNA, inhibici apoptózy, změny v mikroprostředí buňky a v signálních dráhách regulujících kontrolní body buněčného cyklu, a také zvýšení vylučování léčiv díky nadměrné expresi membránových transportních proteinů (neboli transportérů či přenašečů) odpovědných za MDR – viz tabulka č. 1 (4).

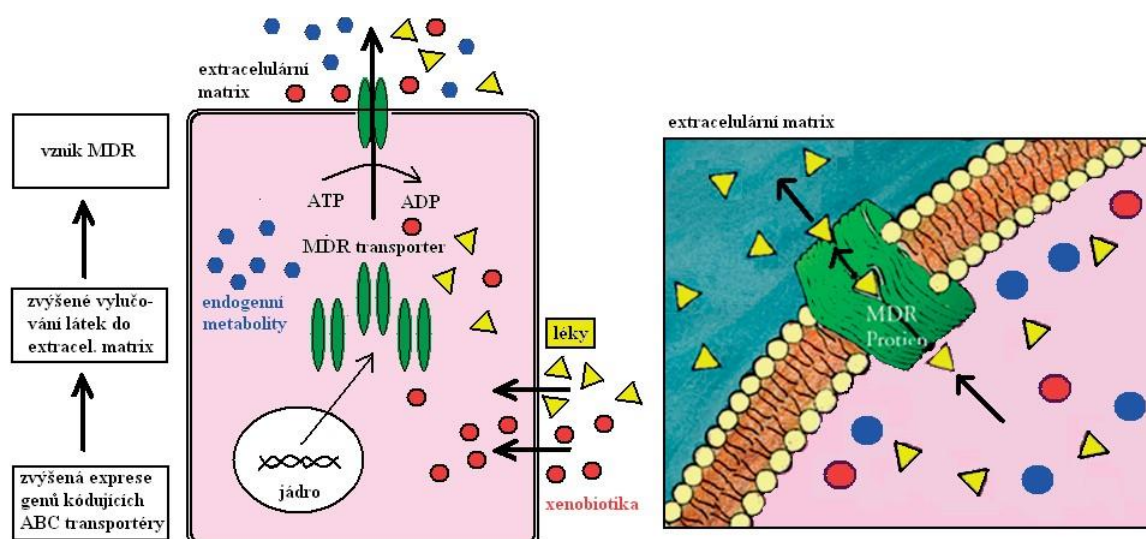
Tabulka č. 1 – Mechanizmy charakterizující mnohočetnou lékovou rezistenci

MECHANIZMUS	POPIS
<b>změny farmakokinetiky léků</b>	
snížení resorpce	snížení vstřebávání léčiva v trávicím traktu
snížení distribuce	horší pronikání léků do některých, např. odlišně prokrvených míst (nádorů)
urychlení biotransformace (metabolizmu) léků	rychlejší přeměna léků na jiné neaktivní sloučeniny většinou podmíněna biochemickými procesy enzymatického původu
urychlení vylučování léků	rychlejší vylučování léků a jejich metabolitů z krevního oběhu do vnějšího prostředí
<b>změny cytokinetiky buněk</b>	
zvyšování podílu nádorových buněk přecházejících ze stavu G1 do stavu G0	ve stavu G0 jsou buňky méně citlivé k lékům
nárůst spontánních mutací	vznik heterogenní populace buněk s odlišnou citlivostí k léku, selekce a pomnožení rezistentního klonu buněk
<b>strukturální a funkční změny buňky</b>	
regulace průchodu látek do buňky	snížená exprese transportérů zajišťující přítok látek do buňky, změny ve složení membránových lipidů cílené na znesnadnění průchodu látek buněčnou membránou
aktivace detoxifikačních enzymů	inaktivace toxinů díky enzymům fáze I. a II. např. GSH (glutathion), GST (glutathion-S-transferáza)
aktivace reparačních mechanismů DNA	odstranění pro buňku nežádoucích zásahů do struktury DNA: korekce párování bází, obnovení fosfodiesterové vazby spojující nukleotidy, chemická modifikace bází (alkyltransferáza, topoizomeráza I a II)
inhibice apoptózy	inhibice skrze vnitřní mitochondriální dráhu a narušení rovnováhy mezi pro- a anti-apoptotickými faktory (např. Bcl-2, Bcl-xL, Bax, survivin)
změny v mikroprostředí	pH, hypoxie, populace buněk v klidovém (quiescentním) stavu
změny v signálních dráhách	signální dráhy regulující apoptózu, kontrolní body bun. cyklu (např. p53, NF- $\kappa$ B)
změny v intracelulárním prostředí buňky	zvýšení vakuolizace, změny struktury a funkce lysozómů
<b>exprese membránových proteinů</b>	<b>nadměrná exprese ABC transportérů odpovědných za MDR</b>

## 2. ABC transportní proteiny odpovědné za MDR

### 2.1 Obecná charakteristika

ABC transportní proteiny (*ABC=ATPbinding cassette* - ATP-vážíací kazetu), patří do nadrodiny transmembránových proteinů nacházejících se ve všech organizmech od bakterií po člověka. Využívají energii z hydrolyzy ATP (adenosin trifosfát) k transportu různých molekul přes buněčnou membránu z cytoplazmy do vnějšího prostředí buňky (viz obrázek č.1). U eukaryot se ABC transportéry kromě cytoplazmatické membrány nachází také na membránách dalších organel, jako jsou např. endoplazmatické retikulum, mitochondrie, peroxisomy, kde fungují jako jednosměrní přenašeči substrátů (většinou z cytoplazmy do organely, vzácněji z jedné organely do druhé). U nádorových buněk, působí ABC transportéry jako pumpy a vylučují chemoterapeutika, čímž snižují koncentraci těchto léků v buňkách a omezují tak jejich cílené působení. Pumpy jsou aktivní u širokého spektra lidských nádorů, včetně lymfomů, leukemií, rakoviny prsu, plic a vaječníku. Čím víc těchto pump nádorová buňka obsahuje, tím je menší očekávaná efektivnost chemoterapie (5, 6, 7).



Obrázek č. 1: Schéma transportu exo- a endogenních látek pomocí ABC transportních proteinů – upraveno podle Fletcher JI. a kol., 2010 – (8)

Existuje 49 typů lidských ABC transportérů, které jsou podle organizace jejich domén a podle homologie aminokyselin rozdělené do sedmi podrodin proteinů označených ABCA-G. Konkrétní označení každého transportéru je doplněno o jeho pořadové identifikační číslo, tedy např. ABCA1, ABCA2, atd. Přehledné rozdělení všech lidských ABC transportérů – viz tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Stručný přehled lidských ABC transportérů

skupina	Nc	Nr	vybrané transportéry		
			označení	alternativní názvy	funkce
ABCA	13	1	ABCA1	ABC1	transport cholesterolu do HDL
			ABCA2	ABC2	léková rezistence
			ABCA3	ABC3/ABCC	sekrece surfaktantu
			ABCA4	ABCR	transport derivátů vit.A (N-Retinylidin) z vnější strany čípku do cytoplazmy
ABCB	11	3	<b>ABCB1</b>	<b>PGP1/MDR1</b>	<b>mnohočetná léková rezistence (MDR)</b>
			ABCB2	TAP1	transport peptidů do ER, součást HLAI
			ABCB3	TAP2	transport peptidů do ER, součást HLAI
			ABCB4	PGY3/MDR3/PFIC3	transport žlučových solí, léková rezistence
			ABCB6	MTABC3	transport proteinových prekurzorů obsahujících Fe/S komplexů v mitochondriích
			ABCB7	ABC7	transport proteinových prekurzorů obsahujících Fe/S komplexů v mitochondriích
			ABCB8	MTABC1	transport proteinových prekurzorů obsahujících Fe/S komplexů v mitochondriích
			ABCB10	MTABC2	transport proteinových prekurzorů obsahujících Fe/S komplexů v mitochondriích
			ABCB11	SPGP/BSEP/SPGP	transport žlučových solí, léková rezistence

skupina	Nc	Nr	vybrané transportéry		
			označení	alternativní názvy	funkce
ABCC	12	8	ABCC1	GS-X /MRP1	mnohočetná léková rezistence (MDR)
			ABCC2	MRP2/cMOAT/DJS	sekrece záporně nabitých organických molekul, léková rezistence
			ABCC3	MRP3/MOAT-D/cMOAT2	léková rezistence
			ABCC4	MRP4/MOAT-B	transport nukleosidů, léková rezistence
			ABCC5	MRP5/MOAT-C/ABC11	transport nukleosidů, léková rezistence
			CFTR	ABCC7	chloridový kanál
			ABCC8	SUR	sulfonylmočovinový receptor
			ABCC9	SUR2	regulace K(ATP) kanálu – sekrece inzulínu
			ABCC10	MRP7	léková rezistence
			ABCC11	MRP8	léková rezistence
ABCD	4	0	ABCD1	ALD	regulace transportu mastných kyselin (VLCFA) v peroxizómech
ABCE	1	0	ABCDE1	OABP/RNSYI	protein vázající oligoadenylát
ABCF	3	0	–	–	–
ABCG	5	1	ABCG1	ABC8/White	transport cholesterolu
			ABCG2	MXR/ABCP/BCRP	mnohočetná léková rezistence (MDR)
			ABCG5	White3/Sterolin-1	transport sterolů ve střevech a játrech
			ABCG8	Sterolin-2	transport sterolů ve střevech a játrech

Zkratky: Nc – celkový počet transportérů, Nr – počet transportérů způsobujících rezistenci – upraveno podle Dean a kol., 2002 (9) a Stavrovskaya a kol., 2008 (10) a „The National Centre of Biotechnology Information (NCBI)“.

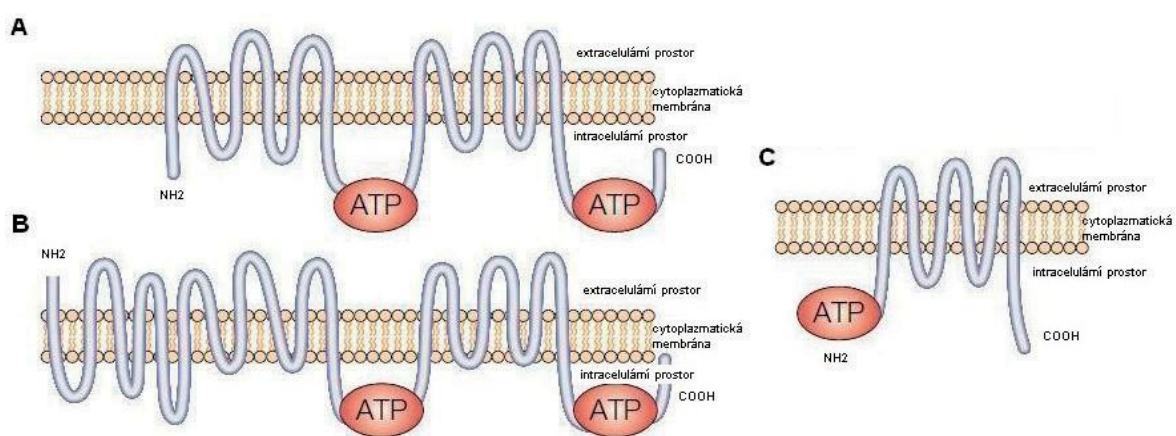
Obecně se ABC transportní proteiny skládají z domén vázajících ATP, (tzv. *NBD=nukleotide binding domain*) a z transmembránových domén (tzv. *TMD=transmembrane domain*), které obsahují 6-12 transmembránových  $\alpha$ -helixů. Tyto domény jsou kódovány buď jednou molekulou mRNA a existují ve formě monomeru (tzv. úplné transportéry obsahující jednu NBD a jednu TMD) nebo jsou kódovány dvěma molekulami mRNA, z nichž každá kóduje

pouze polovinu domén (11). Pro vytvoření funkčního transmembránového „póru“ tyto domény homo- nebo heterodimerizují (tzv. poloviční transportéry obsahující dvě NBD a dvě TMD) (12, 13) – viz obrázek č. 2.

Recentní genomové studie ukazují, že domény vázající ATP mají charakteristickou strukturu a obsahují jedny z nejkonzervovanějších proteinových sekvencí, které nacházíme téměř u všech buněčných organizmů (14). Skládají se z 200-250 aminokyselin seskupených do šesti oblastí: Walker A motiv, Walker B motiv (oba přítomné u všech proteinů vázajících ATP) (15), C motiv (jinak také „*ABC signature region*“) typický pro ABC transportéry, dále Q-, D- a H-smyčka. Q-smyčka je původcem interakcí mezi vlastní NBD doménou a doménou TMD a to takovým, že spojuje hydrolyzu ATP (reaguje s gamma fosfátem molekuly ATP) s konformační změnou TMD domény. Tyto interakce jsou nezbytné pro aktivaci transportéru a správný přenos substrátu. D-smyčka odpovídá za interakci mezi vlastní NBD doménou a sousedící NBD doménou (obsahuje totiž aspartát, který reaguje s asparaginem Walker A motivu sousedící NBD domény). H-smyčka obsahuje histidin umožňující polarizaci molekuly vody nutné pro hydrolyzu ATP (16, 17) – viz obrázek č. 3. Studie ukazují také, že v nepřítomnosti ATP je mezi dvěma doménami NBD mezera, která se po navázání ATP uzavře a semkne tak substrát (18).

## 2.2 Tři typy ABC transportérů

Tři z výše uvedených ABC transportérů (viz tabulka č. 2) jsou nalezeny jak v lidských, tak v hlodavčích tkáních u téměř všech nádorových buněk vykazujících MDR. Jsou to: ABCB1/PGP1/MDR1, ABCC1/GS-X/MRP1 a ABCG2/MXR/BCRP (19).



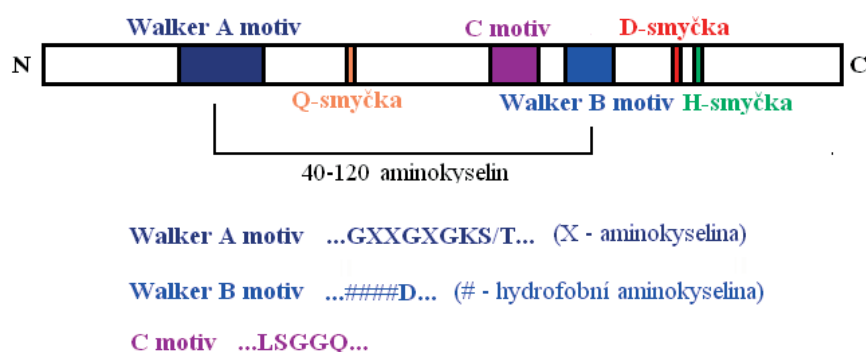
Obrázek č. 2: Schéma struktury ABC transportérů

**A) Struktura MDR1 proteinu se dvěma transmembránovými doménami (každá obsahuje 6  $\alpha$ -helixů) a se dvěma doménami vázající ATP.**

**B) Struktura MRP1 proteinu se dvěma transmembránovými doménami, jednou přidavnou doménou (obsahující 5  $\alpha$ -helixů na NH2 konci) a dvěma doménami vázající ATP.**

**C) Struktura BCRP proteinu s jednou transmembránovou doménou a jednou doménou vázajícími ATP (na rozdíl od předchozích dvou orientované na NH2 konci) – upraveno podle Gottesman a kol., 2002 (4).**





Obrázek č. 3: Schéma struktury NBD domény – upraveno podle Schneider a kol., 1998 (20)

### 2.2.1 ABCB1/PGP1/MDR1

První z výše uvedených ABC transportérů MDR1 (*MDR1*=*Multidrug Resistance Protein 1*) je často označován také jako P-glykoprotein (P-gp). Tento protein byl objeven v roce 1976 Julianem a Lingem (21), ale jeho funkce byla objasněna až v roce 1993 (22) a úloha v rezistenci až v roce 1996 (23). Je to 170 kDa ATP-dependentní vylučovací pumpa obsahující 1280 aminokyselin, kódována genem *mdr1* (24, 25) nacházejícím se na chromozómu 7q21.1 (26). Myši mají dokonce dva homology MDR1 a to: gen *Abcb1a* kódující MDR1A a gen *Abcb1b* kódující MDR1B (27, 28). Tato pumpa MDR1 je exprimována v mnoha zdravých tkáních jako jsou: nadledviny, ledviny, játra, mozek, střeva a v hematopoetických kmenových buňkách, kde plní exkretční a protektivní funkci a také reguluje hladinu hormone v buňkách (29, 30). Protein MDR1 podléhá posttranslačním modifikacím jako je glykosylace, fosforylace a defosforylace (fosforylace má vliv na jeho aktivitu). Nadměrná exprese MDR1 je jednou z nejčastějších příčin vzniku MDR fenotypu (31) a je postačující k získání mnohočetné lékové rezistence (32).

### 2.2.2 ABCC1/GS-X/MRP1

Druhý z výše uvedených ABC transportérů je MRP1 (*MRP1*=*Multidrug Resistance Associated Protein 1*). Tento protein byl objeven v roce 1992 Colem a kol. u buněk karcinomu plic, které byly rezistentní na doxorubicin, ale nevykazovaly zvýšenou expresi MDR1 (33). Později byl také prokázán i u dalších rezistentních buněčných linií a nádorových tkání (34). Je to 190 kDa ATP-dependentní vylučovací pumpa obsahující 1531 aminokyselin, kódována genem *mrp1* nacházejícím se na chromozómu 16p13.1 (35, 36). U člověka je identifikováno dalších 8 homologů MRP: ABCC2-6/MRP2-6 a ABCC10-12/MRP7-9. Jejich fyziologická role je málo známá, nicméně je možné, že hrají roli v procesu detoxifikace buňky a rovněž se podílejí na vzniku lékové rezistence (37).

### 2.2.3 ABCG2/MXR/BCRP

Třetí z výše uvedených ABC transportérů je BCRP. Je to 72 kDa ATP-dependentní vylučovací pumpa obsahující 655 aminokyselin, kódována genem *bcrp* nacházejícím se na chromozómu

4q22 (38). Tato pumpa byla nezávisle na sobě objevena v několika laboratořích, proto také dostala různé názvy. V roce 1998 byla klonována cDNA této pumpy z rezistentních buněčných linií odvozených od nádoru prsu (*BCRP=Breast Cancer Resistant Protein*) (39) a od buněk placenty (*ABCP=Placenta-specific ATP-binding cassette gene*) (40). V roce 1999 byla Miyakem a kol. klonována cDNA z buněčné linie nádoru střeva rezistentní na mitoxantron v přítomnosti verapamilu (kvůli blokaci funkce MDR1) (*MXR=Mitoxantrone Resistant Protein*) (41). V roce 2001 byl nalezen rozdíl mezi transportérem BCRP a MXR a to v mutaci na aminokyselině 482. Mutantní forma BCRP<sup>R482G</sup> (transportér MXR) obsahuje glycin nebo treonin místo argininu a získává tak oproti nemutované formě schopnost transportu doxorubicinu (42). Nedávno Krishnamurthy a kol. dokázali, že exprese pumpy BCRP je indukována hypoxií a že regulaci této exprese ovlivňuje hypoxický indukibilní faktor HIF-1 (*HIF-1=Hypoxia-Inducible Transcription Factor Complex 1*) (43).

## 2.3 Substrátová specifita

ABC transportéry se mezi sebou liší jak v molekulární struktuře tak v substrátové specifitě. Je pozoruhodné, že téměř pro každou molekulu, která musí projít přes cytoplazmatickou membránu, existuje specifický ABC transportér, jako „nosič“ této molekuly. Dříve popsané tři klíčové transportéry odpovědné za MDR chrání (zdravé i nádorové) buňky před škodlivými látkami obsaženými ve vylučovaných metabolitech a jiných exogenních substrátech, které se dostávají do extracelulárního prostředí a potom až do samotných buněk. Transportéry MDR1 a BCRP váží a vylučují pozitivně i negativně nabitě léky nebo různé endo- a exogenní lipofilní substráty (jako lipidy, steroidy, peptidy a xenobiotika). Naproti tomu transportér MRP1 váže a vylučuje lipofilní nebo amfipatické substráty konjugované s glukuronidy, sulfáty nebo glutathiony (36), přičemž tyto substráty mají záporný náboj. MRP1 váže substráty z cytoplazmy, kdežto MDR1 přímo z cytoplazmatické membrány (44, 45). BCRP kromě xenobiotik reaguje mj. s porfyriny, kyselinou močovou (jeho porucha způsobuje dnu) (46), sulfatovanými steroidy (47, 48) a cholesterolem, který stimuluje bazální ATP-ázovou aktivitu a napomáhá tak transportu léčiv (49).

Mezi léčiva, která jsou nejčastěji substráty těchto tří transportérů patří: vinca alkaloidy, anthracykliny, antibiotika, antrachinony, taxany, epipodofylotoxiny, antimetabolity, antivirotika, kamptoteciny, antiandrogeny, antihypertenziva, kardioaktivní glykosidy, kortikosteroidy, imunosupresiva, opioidní analgetika, toxiny a další cytotoxické látky – přehledně viz tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: Přehled vybraných substrátů a jejich vazeb na jednotlivé ABC transportéry

	látko	transportéry			citace
		MDR1	MRP1	BCRP	
<b>vinca alkaloidy</b>	nevalbin	ano	-	-	50
	vinblastin	ano	ano	ano	50, 51, 57
	vinkristin	ano	ano	ano	50, 51
<b>antracykliny</b>	daunorubicin	ano	ano	ano	50, 51
	doxorubicin	ano	ano	ano	50, 51
	epirubicin	ano	ano	ano	50
	idarubicin	ano	ano	ano	50
<b>Antibiotika cytotoxická</b>	aktinomycin D	ano	ano	-	51
tetracyklinová	tetracyklin	ano	-	-	51
fluorochinolinová	difloxacin	ano	ano	ano	51
beta-laktamová	ampicilin	ano	-	ano	51
makrolidová	erythromycin	ano	ano	ano	51
ketolidová	telithromycin	ano	-	-	51
aminoglykosidová	puromycin	ano	-	ano	52, 53
<b>antrachinony</b>	mitoxantron	ano	ano	ano	50, 51
<b>taxany</b>	paklitaxel	ano	-	-	50, 51
	docetaxel	ano	-	-	50, 51
<b>epipodofylotoxiny</b>	etopozid (VP16)	ano	ano	ano	50, 51
	tenipozid	ano	ano	ano	50
<b>antimetaboly</b>	methotrexát	ano	ano	ano	50, 51
	cladribin			ano	51
<b>antivirotika</b>	indinavir	ano	ano		51
<b>kamptoteciny</b>	irinotekan	ano	ano	ano	50
	topotekan	ano	-	ano	50, 51
	SN-38	ano	ano	ano	50
<b>antiandrogeny</b>	flutamid	-	ano	-	54
	hydroxyflutamid	-	ano	-	54
<b>antihypertenziva</b>	prazosin	ano	-	ano	51
<b>kardioaktivní glykosidy</b>	digoxin	ano	-	-	51, 57
<b>kortikosteroidy</b>	dexamethason	ano	-	-	51
<b>imunosupresiva</b>	cyklosporin A	ano	-	-	51
<b>opioidní analgetika</b>	morfin	ano	-	-	51
<b>toxiny</b>	aflatoxin B1	-	ano	ano	55, 56
	methoxychlor	-	ano	-	55
<b>další cytotoxické látky</b>	mitomycin C	ano	-	-	51
	kolchicin	ano	-	-	51
	cisplatina	-	ano	-	50
	flavopiridol	ano	-	ano	50, 51

## 2.4 Inhibitory

Aktivitu ABC transportérů je možno omezovat či dokonce zablokovat. Jedním ze způsobů je použití specifických molekul tzv. inhibitorů a modulátorů, které pomáhají obnovit citlivost buněk k cytotoxickým léčivům (3). Doposud byly vyvinuty tři generace inhibitorů ABC transportérů.

První a druhou generaci inhibitorů tvoří tzv. **kompetitivní inhibitory**. Tyto inhibitory jsou substráty transportérů soutěžící s cytotoxickými léčivy o vazbu na aktivní místo. Pokud má inhibitor a cytotoxická látka k aktivnímu místu podobnou afinitu, pak při vyšší koncentraci inhibitoru je menší pravděpodobnost vazby léčiva a jeho transportu skrze buněčnou membránu. Naopak čím vyšší je koncentrace cytotoxické látky, tím je inhibice méně účinná. Kromě toho inhibitory jsou však i substráty jiných transportérů a enzymových systémů (např. cytochromu P450 3A4), což v přítomnosti chemoterapeutik může způsobit nepředvídatelné farmakokinetické interakce a ohrozit tak zdraví pacienta (58, 59).

Třetí generaci tvoří tzv. **nekompetitivní inhibitory**, které se vážou na jinou část molekuly transportéru (tedy nikoliv na aktivní místo) než substráty. Touto vazbou inhibitory indukují konformační změnu ABC transportéru, po které aktivní místo není už rozpoznatelné substrátem a proto nedochází k hydrolyze ATP a k přenosu léčiva (60).

Bylo popsáno mnoho inhibitorů syntetické nebo přírodní povahy, avšak jen některé z nich dosáhly fáze klinických studií (61). V první klinické studii z roku 1980 byl testován účinek první generace inhibitorů transportéru MDR1: verapamilu a cyklosporinu A. Tyto látky vykázaly vysokou toxicitu a vedlejší účinky se dostavily dříve, než dosáhly účinku inhibičního. Druhou generací inhibitorů MDR1 představuje valsopodar (PSC 833), který je už specifičtější a také méně toxický.

Tabulka č. 4: Přehled inhibitorů ABC transportérů odpovědných za MDR

transportér	inhibitor	generace	transportér	inhibitor
<b>MDR1</b>	verapamil	I.	<b>MRP1</b>	probenecid
	cyklosporin A	I.		sulfipyrazon
	chinin	I.		indometacin
	chinidin	I.		MK571
	nifedipin	I.		verapamil
	dexniguldipin	I.		quercitin
	amiodaron	I.		genistein
	valspodar (PSC-833)	II.		biricodar (VX-710)
	biricodar (VX-710)	II.		cyklosporin
	GG918	II.		V-104
	elacridar (GF120918)	III.	sulindac	
	tariquidar (XR-9576)	III.	tariquidar (XR-9576)	
	dofequidar (MS 209)	III.	dofequidar (MS 209)	
	zosuquidar (LY335979)	III.	fumitremorgin C	
	laniquidar (R101933)	III.	Ko132, Ko134	
	ONT-093	III.	cyklosporin A	
	S9788	III.	flavopiridol	
	OC144-093	III.	novobiocin	
	pyronaridin	III.	elacridar (GF120918)	
	V-104	III.	imatinib	
pluronic L61	jiné	gefitinib		
			<b>BCRP</b>	tariquidar (XR-9576)

– upraveno podle Boumendel a kol., 2009 (50).

## 2.5 Expresní profil ABC transportérů v lidském těle

### 2.5.1 Střeva, játra, ledviny

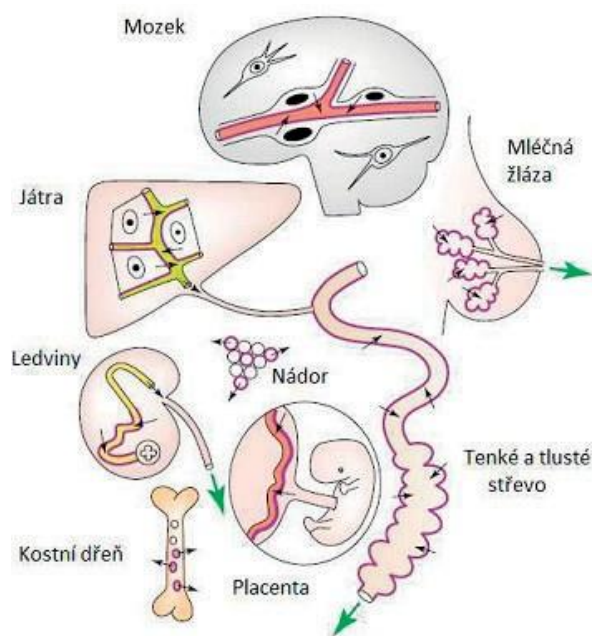
V zažívacím traktu dochází k prvnímu kontaktu s požitými toxiny. Transportéry MDR1 a BCRP jsou zde lokalizovány zejména v apikální části střevních klků, kde díky aktivnímu transportu toxinů do lumen střeva snižují podíl toxických látek procházejících dál do těla (62). Transportér MRP1 je lokalizován v bazolaterální části slizničních krypt tenkého i tlustého střeva, kde transportuje toxiny do krve. Rozmístění jednotlivých transportérů proximodistálně se liší v jednotlivých úsecích zažívacího traktu. Transportér MDR1 se nachází hlavně v ileu (63), kdežto transportér BCRP hlavně v duodenu a jejunu, směrem k tračníku jeho množství postupně klesá (64, 65). Bylo prokázáno, že v lidském střevě transportér BCRP se podílí na reabsorpci topotekanu (66), inhibice tohoto transportéru pak u myši vede ke zvýšení absorpce irinotekanu o 63% (67).

Portální vena dále vede krev do jater, orgánu, kde probíhá hlavní proces detoxifikace. V potkaních játrech se MDR1 a BCRP transportéry nachází v žlučových kanálcích azprostředkovávajíeliminacitoxinůrozpusnýchvtučíchdožluči(68, 69, 70). Vhepatocytech ABC transportéry transportují xenobiotika do krve, která následně prochází renální filtrací. V tubulárním systému nefronů transportéry MDR1 a BCRP transportují endogenní toxické produkty metabolismu do moče (71, 72).

Myši s „knokautovanými“ ABC transportéry jsou více citlivé na působení toxinů, také mají sníženou schopnost sekrece xenobiotik ve střevě do lumen a v játrech do žluče (73, 74, 75). U *Mrp1*<sup>-/-</sup> myši byla prokázána polyurie, což naznačuje úlohu tohoto transportéru v reabsorpci vody ve sběrných kanálcích (76). Naopak funkce ledvin u *Bcrp*<sup>-/-</sup> byla normální. Zajímavostí však je, že tyto myši měly méně „vedlejší populace“ (*SP=Side population*) hematopoetických kmenových buněk (HSCs) v kostní dřeni (77).

### 2.5.2 Ostatní tkáně

Kromě výskytu v buňkách nádorových a v buňkách kmenových (KB) (78) se ABC transportéry hojně nacházejí na rozhraní různých tkání nebo prostředí (na bariérách) – viz obrázek č. 4. Slouží zde hlavně jako ochránci před toxickými látkami a kontrolují distribuci živin. Jedná se o tyto tkáně: epitel tenkého a tlustého střeva, hepatocyty a žlučové kanálky jater, ledvinové tubuly (všechny tyto tkáně jsou předmětem zájmu této práce), dále také syncytiotrofoblast placenty (40, 79, 80), prsní žláza u žen (81), bariéra mezi krví a mozkem (hematoencefalická bariéra) (82) a bariéra mezi krví a varlaty u mužů (testikulární bariéra) (83).



Obrázek č. 4: Exprese ABC transportérů v lidských tkáních – převzato z Huang a kol., 2006 (84)

## 2.6 Fyziologické funkce

ABC transportéry odpovědné za MDR kromě funkce ochranné mají také další fyziologické úlohy. Transportér MDR1 a obzvláště transportér BCRP se nachází v kmenových buňkách různých typu tkání a začal být považován dokonce za marker kmenových buněk (KB) (85, 86). Nadměrná exprese transportéru BCRP inhibuje hematopoézu KB, proto se předpokládá, že eliminuje z buněk substráty zodpovědné za jejich diferenciaci. Také v neurálních KB transportéry MDR1 a BCRP regulují příjem molekul zapojených do diferenciačního procesu. V průběhu diferenciace neurálních buněk klesá exprese MDR1 a nestinu (marker neurálních prekurzorů) a zároveň stoupá exprese GFAP (gliální fibrilární kyselý protein). Pomocí cyklosporinu A (inhibitoru transportéru MDR1) dochází k inhibici procesu proliferace neurálních buněk (87).

Transportní protein MDR1 se nachází také na cytoplazmatické membráně lymfocytů, kde transportuje cytokiny a moduluje tak funkci NK buněk (*NK=natural killer*), dendritických buněk a CD8+ lymfocytů (88).

Transportní protein MRP1 má vliv na migraci dendritických buněk z periferních tkání do lymfatických uzlin během zánětlivé reakce tím, že transportuje leukotrieny, které zajišťují správnost této migrace. Tato migrace je narušena u myši s „knokautovaným“ genem MRP1 (*Abcc1*<sup>-/-</sup> myši), ale po přidání exogenních leukotrienů C4 nebo D4 se opět obnoví. Předpokládá se, že vylučování těchto leukotrienů v dendritických buňkách pomocí transportéru MRP1 je řízeno autokrinně a je klíčové pro jejich správnou migraci (89).

Transportér MRP1 je hojně exprimován v Leydigových buňkách, kde eliminuje konjugáty estrogenu. Předpokládá se, že hraje obrannou funkci před feminizujícím účinkem tohoto hormonu (90).

Je známo, že transportní protein BCRP se ve velké míře nachází v placentě, kde kromě toxických látek transportuje také prekurzory a metabolity estrogenu z těla plodu do těla matky a stává se důležitým regulátorem syntézy steroidních hormonů během těhotenství (91). V prsní žláze kromě eliminace xenobiotik, reguluje také transport riboflavinu, biotinu a vitamínu K do mléka (92).

Zajímavostí je, že exprese ABC transportérů je částečně rozdílná v závislosti na pohlaví. U myších samic byla nalezena vyšší hladina exprese transportéru MRP1 v ledvinách a v játrech (93). U myších samců ve žlučovodech se nachází mnohem vyšší množství transportéru BCRP, což vede k mnohem efektivnějšímu transportu látek z plazmy do žluči (94).

Ke zvýšené expresi ABC transportérů dochází v hypoxických podmínkách. Za těchto podmínek buňky aktivují transportér BCRP skrze HIF-1 signální dráhu. Tento transportér má důležitou úlohu, umožňuje totiž eliminovat hem a porfyrin akumulovaný v buňce způsobující poškození mitochondrií (95). Aktivace transportéru BCRP může být také evoluční strategií umožňující přežití embrya v podmínkách s nízkým obsahem kyslíku (embryo se vyvíjí za fyziologicky hypoxických podmínek –  $O_2 < 2\%$ ) (96).

### 3. Signální dráha kináz PI3K/Akt a její vliv na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR

#### 3.1 Signální dráha kináz PI3K/Akt

U nádorových buněk nadměrná exprese ABC transportérů je nežádoucí a je jedním z faktorů charakterizujících MDR. Na transkripční úrovni je exprese regulována geneticky a epigeneticky a na posttranskripční úrovni je exprese regulována změnou proteinové stability a ovlivněním transportu ABC transportérů na membránu (97). Transkripce ABC transportérů je regulována významně pomocí **signální dráhy PI3K/Akt**, se kterou jsou úzce propojeny tyrozin kinázové receptory (TKR) a receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs). **Předmětem studia této práce je popsat účinek ligandů obou typů receptorů na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR.**

PI3K/Akt signální dráha je jednou z hlavních signálních drah podílejících se na regulaci buněčné proliferace, apoptózy, růstu, glukózového metabolismu, buněčného pohybu a invazivité buněk (98). Fosfatidylinozitol 3-kináza (PI3K) je enzym asociovaný s receptory na buněčném povrchu, tvořící s nimi komplexy. K aktivaci tohoto komplexu dochází po navázání růstových faktorů, cytokinů a jiných ligandů. Následně enzym PI3K fosforyluje lipidy, např. lipid fosfatidylinozitol-4,5bis-fosfát (PIP<sub>2</sub>) fosforyluje na lipid fosfatidylinozitol 3,4,5 trisfosfát (PIP<sub>3</sub>). Takto PI3K řídí celou řadu intracelulárních signálních drah. Jeho hlavním úkolem je však aktivace protein serin/treoninové kinázy Akt (jinak protein kinázy B) pomocí PDK1 (*PDK1=3'-phosphoinositide-dependent kinase1*). Kináza Akt může fosforylovat další kinázy, transkripční faktory a jiné regulační molekuly (99). Jedním z transkripčních faktorů, který fosforyluje Akt jsou NF-κB nebo STAT. PI3K je možné inhibovat pomocí nádorového supresoru PTEN (*PTEN=Phosphatase and Tensin Homolog Deleted in Chromosome Ten*) (100), který naopak defosforyluje fosfatidylinozitol 3,4,5 trisfosfát (101) (viz obrázek č. 7.).

Nedávno bylo prokázáno, že signální dráha PI3K/Akt mj. reguluje expresi ABC transportérů odpovědných za MDR. Aktivace signální dráhy PI3K/Akt je spouštěcím mechanismem vzniku rezistence různých typů nádorových buněk vůči cytostatikům. Inhibice této signální dráhy má za následek zvýšení citlivostí různých buněčných linií: karcinomu mléčné žlázy na tamoxifen (102), rakoviny močového měchýře na doxorubicin (103), adenokarcinomu pankreatu na gemcitabin (104) a nemalobuněčného karcinomu plic na mnoho druhů chemoterapeutik (105, 106).

Pomocí wartmanninu jako inhibitoru PI3K (107) došlo na modelu buněčné linie blastů AML ke snížení exprese fosforylované formy proteinu Akt a také transportéru MRP1. Předpokládá se, že jiný inhibitor LY294002 ovlivňuje Golgiho aparát a způsobuje translokaci transportérů z cytoplazmatické membrány do cytoplazmy a následně pokles jejich funkce (108, 109). Byl však pozorován také opačný efekt (zvýšení exprese) u melanocytů buněčné linie MEL4M a to po krátkodobém působení tohoto inhibitoru (teprve dlouhodobá inhibice vedla ke snížení exprese ABC transportérů). Důvod tohoto chování nebyl dosud plně



objasněn, spekuluje se však, že melanocyty potřebují ABC transportéry na export látek produkovaných během melanogeneze (110). Transkripční faktor NF- $\kappa$ B má vazebné místo v promotorové oblasti transportéru MDR1 a proto se přímo podílí na regulaci jeho transkripce (111). Inhibice PI3K pomocí wortmanninu a inhibitoru LY294002 u buněčné linie odvozené od myšního lymfomu vedla k inhibici NF- $\kappa$ B a také transportního proteinu MDR1 (112).

## 3.2 Regulace exprese pomocí TKI

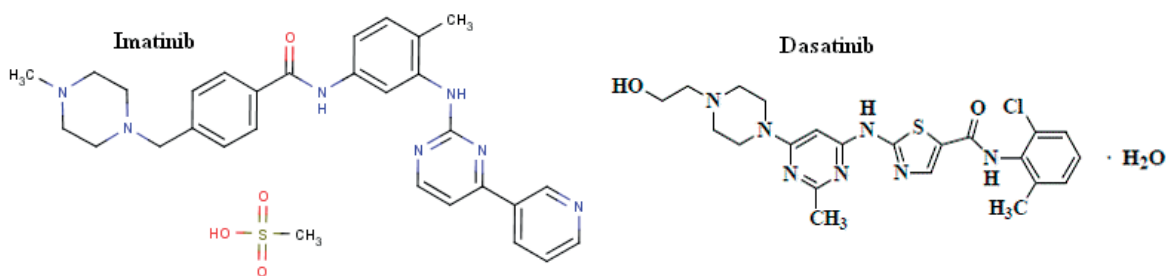
### 3.2.1 Tyrozin kinázové receptory (TKR) – charakteristika

Tyrozin kinázové receptory (TKR) jsou membránové receptory asociované s tyrozin kinázami (TK), čili s enzymy, které přenášejí fosfátovou skupinu z ATP na aminokyselinu tyrozin. Navázání ligandu na extracelulární část receptoru způsobuje nejdřív dimerizaci receptoru, potom aktivaci tyrozin kinázy a navázání adaptorových molekul (Grb2, SOS) a následně aktivaci různých kináz, např. PI3K – viz obrázek č. 7. Nadměrná aktivace TK je nejčastěji způsobena translokací kinázového genu *bcr-abl* (fúzní protein chronické myeloidní leukemie) anebo mutací odpovědnou za aktivaci kináz asociovaných s receptory EGF a PDGF (*EGF=Epidermal Growth Factor*, *PDGF=Platelet-Derived Growth Factor*) (113).

### 3.2.2 Inhibitory enzymů tyrozin kináz (TKI)

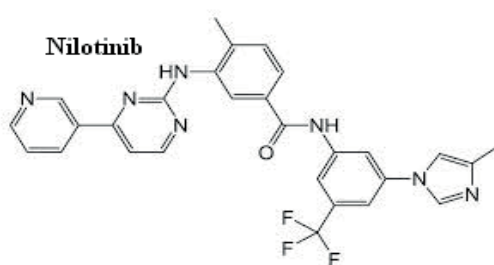
Inhibitory enzymů tyrozin kináz (TKI) jsou látky, které byly primárně vyvinuty pro léčbu chronické myeloidní leukemie (pro účely inhibice fúzní *bcr-abl* kinázy). Nejčastěji dosud používaným TKI je **imatinib** mesylát (Gleevec, STI-571) (114, 115), který se vyrábí ve formě soli methansulfonát. Někteří pacienti však vůči této látce vyvíjejí rezistenci. Jedním z mechanismů vedoucích k rezistenci k imatinibu pozorovaných na buněčné linii odvozené z buněk chronické myeloidní leukémie (CML) je nadměrná exprese transportéru MDR1 (116).

Proto byla vyvinuta druhá generace těchto inhibitorů, která je schopna překonat rezistenci způsobenou imatinibem. Představitelem je **dasatinib** (Sprycel, BMS-354825), derivát aminopyrimidinu inhibující 32 kináz včetně rodiny Src a Abl a **nilotinib** (AMN107) inhibující PDGFR, ARG a c-kit TK (117, 118, 119).



4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-feny]-benzamidmethansulfonát

Monohydrát N-(2-chlor-6-methyl-fenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolkarboxamidu



4-methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl(phenyl))-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-benzamidhydrochloridu

Obrázek č. 5: Strukturální vzorce vybraných TKI

### 3.2.3 Mechanismus účinku TKI

TKI se vážou na TKR v místě předchozí vazby ATP (imatinib se váže minimálně přes 21 klíčových tyrozinových residuí lokalizovaných v proteinkinázové aktivační smyčce) a zabraňují jejich autofosforylaci (120). Následkem je stabilizace enzymu v neaktivní formě, což vede k inhibici fosforylace substrátů, indukci apoptózy a zastavení signálních drah podílejících se na vzniku nádorového fenotypu buňky. Tato inhibice vede rovněž ke změně exprese souvisejících „down-stream“ kináz (např. PI3K, Src, MAPK), které mezi jinými regulují expresi ABC transportérů (121, 122) – viz obrázek č. 7.

### 3.2.4 Regulace exprese pomocí vybraných TKI

Experimentální zajímavostí je, že buněčná linie Caco2 kultivovaná v přítomnosti imatinibu (10  $\mu$ M) začíná exprimovat transportéry BCRP a MDR1, které tuto látku začnou pumpovat do extracelulárního prostředí. Koncentrace imatinibu uvnitř buňky tak klesá na 50 % (123). Naopak v buňkách rezistentních na mitoxantron způsobuje imatinib pokles exprese transportéru BCRP (124, 125). TKI, které působí inhibičně na PI3K, mohou regulovat expresi MDR1 a BCRP transportérů také posttranskripčně díky jejich přesunu z cytoplazmatické membrány do cytoplazmy (126).

### 3.3 Regulace exprese pomocí agonistů PPARs

#### 3.3.1 Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs)

##### – charakteristika

PPARs jsou steroidní jaderné receptory, které patří do stejné nadrodiny jako thyroidní, retinoidní a receptory pro vitamín D. Regulují různé biologické procesy jako metabolismus tuků a uhlovodíků, vývoj, diferenciaci, apoptózu, nádorovou transformaci, zánět a regeneraci tkání (127).

#### 3.3.2 Mechanismus účinku PPARs

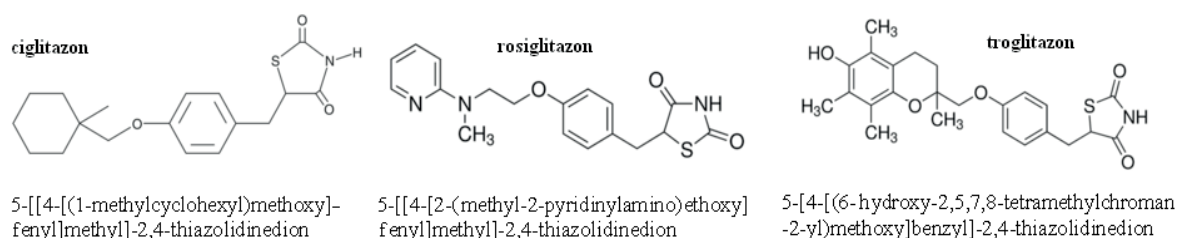
PPARs jsou transkripčními faktory regulující expresi specifických genů v závislosti na ligandu. Poprvé byly popsány po roce 1990 jako receptory aktivované krysími hepatokarcinogeny, které způsobují proliferaci peroxisomů (128). Pro zahájení transkripční aktivity vyžadují heterodimerizaci s retinoidním X receptorem (129) – viz obrázek č. 5. Skládají se ze šesti funkčních domén označených A až E. N-terminální A/B-doména má variabilní délku a obsahuje AF-1 (*AF-1=ligand-independent activation function 1*). C-doména je nejvíc konzervativní, je to DNA-vázající doména DBD (*DBD=DNA binding domain*) skládající se ze dvou zinkových prstů (*zinc-finger-like motives*) charakteristických pro jaderné receptory. D-doména je pouze variabilním závěsem. Multifunkční E-doména zahrnuje: ligand-vázající doménu LBD (*LBD=ligand binding domain*), doménu AF-2 (*AF-2=ligand-dependent activation function 2*) stěžejní pro transkripční aktivaci, dimerizační doménu a region zajišťující jadernou lokalizaci receptoru. U některých jiných jaderných receptorů je přítomna také ještě F-doména (u PPARs chybí) (128). V přítomnosti agonisty je DBD navázán na promotorovou sekvenci PPRE – responzivní element proliferátoru peroxisomu (*PPRE=Peroxisome Proliferator Responsive Element*) a takto spouští expresi specifických genů. PPRE obsahuje elementy DR-1 (*DR-1=direct repeat 1 elements*) skládající se ze dvou přímých repetací AGGTCA (s jednonukleotidovou mezerou mezi repeticemi) (130).

#### 3.3.3 Izoformy PPARs a jejich ligandy

Byly popsány tři izoformy receptorů PPARs u žáby *Xenopus*: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$ , PPAR- $\gamma$  (131), později tytéž izoformy byly také popsány u člověka. Každá z nich je kódována odlišnými geny lokalizovanými na různých chromozómech. Tyto izoformy se liší fyziologickou funkcí, hladinou exprese v různých tkáních a ligandovou specifitou (132).

Přirozenými ligandy PPARs jsou mastné kyseliny a eikosanoidy. Syntetické ligandy zahrnují hypolipidemika (fibráty) a stimulatory inzulínu (thiazolidinediony) (133).

Tato práce se zabývá účinkem (na expresi ABC transportérů) vybraných agonistů PPAR- $\gamma$  ze skupiny thiazolidinedionů: **ciglitazonu**, **rosiglitazonu** a **troglitazonu** – léků, které byly dříve používané pro léčbu *diabetes mellitus* 2. typu.



Obrázek č. 6: Strukturální vzorce vybraných agonistů PPAR- $\gamma$

### 3.3.4 Regulace exprese pomocí vybraných agonistů PPAR- $\gamma$

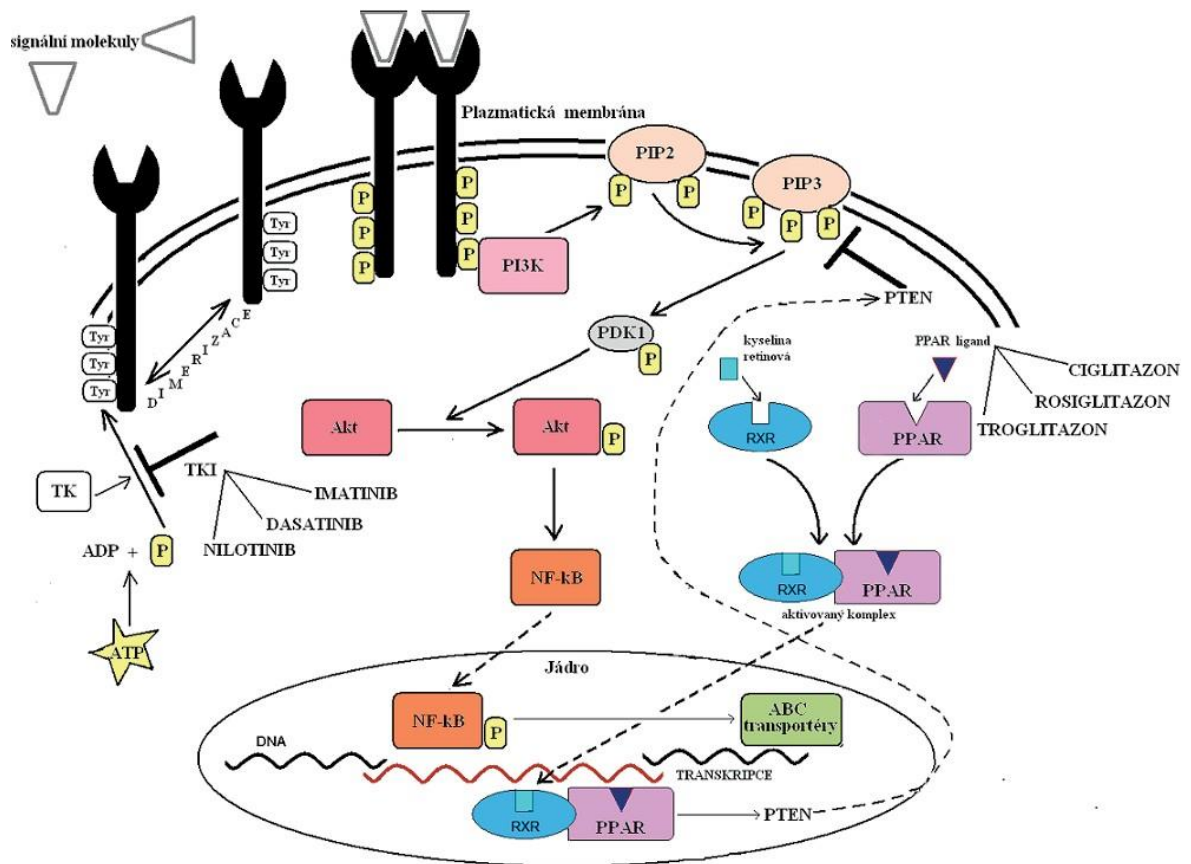
Szatmari a kol. demonstrovali, že PPAR- $\gamma$  přímo transkripčně **indukuje expresi** transportéru BCRP u lidských dendritických buněk odvozených od monocytů a buněčné linie MM6 (z buněk myeloidní leukémie). Identifikovali a charakterizovali konzervativní úsek dlouhý 150-pb obsahující tři funkční sekvence PPRE „up-stream“ od lidského genu *bcrp*. Všechny tři obsahují přímé repetice DR-1 a jsou schopné vázat PPAR- $\gamma$ /RXR heterodimery (134). U transportérů MDR1 a MRP1 prozatím nebyla nalezena oblast PPRE, byla však prokázána přítomnost vazebného místa pro RXR u MDR1 (135).

Oproti tomu Davies a kol. u dvou buněčných linií rezistentních na doxorubicin (u buněčné linie rakovinu prsu MCF-7 a u buněčné linie leukémie K562) díky působení troglitazonu zaznamenali: **snížení exprese** transportéru BCRP a MDR1 a obnovení citlivosti těchto buněčných linií na doxorubicin (136). Proto se zdá, že agonisté PPAR- $\gamma$  mohou ovlivňovat expresi transportéru BCRP nejen přímou vazbou aktivovaného receptoru na PPRE transportéru (čímž dochází k indukci exprese), ale také nepřímo – hlavně přes signální dráhu PI3K/Akt (kdy transkripce transportérů je naopak inhibována) a to tak, že aktivují transkripci nádorového supresoru PTEN (137, 138) – viz obrázek č. 7.

Výše uvedenou tézi obohatil Weiss a kol. zjištěním, že vlivem působení troglitazonu a rosiglitazonu dochází k inhibici funkce transportéru BCRP (i když exprese mRNA tohoto transportéru byla indukována) a že naopak u transportéru MDR1 dochází jak k inhibici funkce, tak ke snížené expresi mRNA (139). Je tedy vidět, že agonisté PPAR- $\gamma$  se zdají být vhodnými negativními regulátory exprese transportéru MDR1, zatímco u transportéru BCRP se povaha regulace nezdá jednoznačná.

Inhibice transkripce transportéru MDR1 vlivem troglitazonu byla prokázána také u buněčné linie rakoviny žaludku SGC7901 rezistentní na vinkristin (140). V buněčné linii lidského osteosarkomu 143B rezistentní na doxorubicin byla prokázána zvýšená exprese transportéru MDR1 a Kruppel-like faktoru 2 (141) – čili specifického PPAR- $\gamma$  supresoru (142). Ehrhard a kol. inhibovali transkripci transportéru MDR1 pomocí fenolfibrátu u buněčné linie LLC-PK1 (z epiteliálních buněk pravečích ledvin) a také u buněčné linie L-MDR1 (odvozené od předchozí linie, do které byl transfekcí vnesen gen kódující MDR1) (143). Tyto studie rovněž potvrzují vhodnost negativní regulace MDR1 pomocí PPAR- $\gamma$ .

Hafner a kol. prokázali, že PPAR- $\gamma$  agonisté posilují imunitní odpověď organismu a mají rovněž vliv na stroma nádorových buněk (negativně regulují angiogenezi) (144).



Obrázek č.7: Regulace exprese ABC transportérů pomocí TKIs a PPAR- $\gamma$  ligandů

## 4. Pohled na embryonální buňky vybraných tkání jako na model pro studium MDR

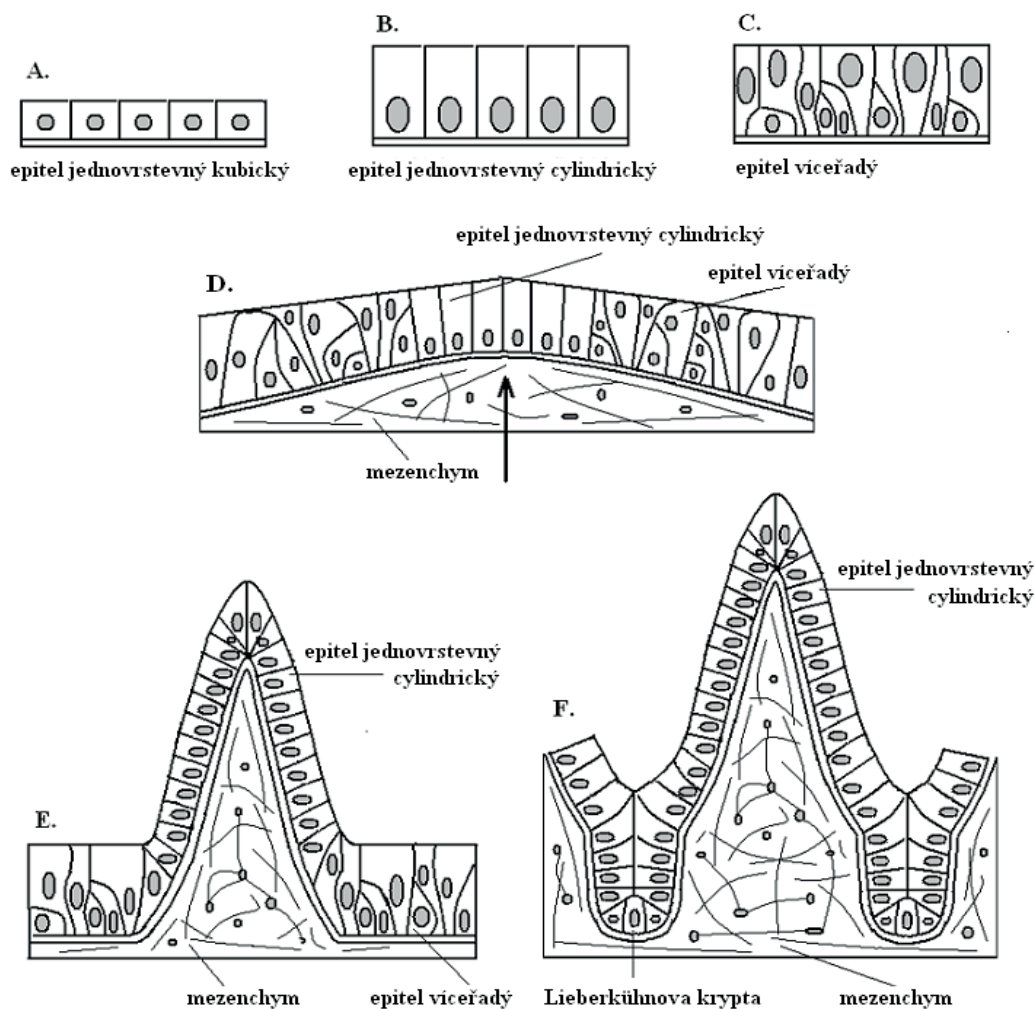
### 4.1 Podobnost vlastností nádorových buněk s vlastnostmi buněk embryonálních

Už od poloviny 19. století bylo při studiu patologických jevů zpozorováno, že tumory vznikají z buněk podobných embryonálním buňkám (145). Tento poznatek byl založen na pozorované podobnosti mezi embryonální a rakovinnou tkání. Během kancerogeneze buňky procházejí zpětnou dediferenciací a jejich vlastnosti se blíží vlastnostem embryonálních buněk. Jiná hypotéza říká, že příčinou vzniku tumorů je porucha nebo nepravidelnost v embryonálních rudimentech (Julius Cohnheim, 1889) Tato hypotéza byla potvrzena objevem nádorových kmenových buněk.

Důležitou předností embryonálních buněk je jejich jasná rezistence ke xenobiotikům zajišťující přirozenou ochranu embrya proti cizím škodlivým látkám. Na základě analogie k buňkám embryonálním je možno pak lépe vést strategii oslabení či „obelstění“ mnohočetné lékové rezistence (MDR) buněk nádorových.

### 4.2 Embryogeneze střev, jater a ledvin

Primitivní střevo se začíná vyvíjet velmi časně – na konci 3. týdne intrauterinního vývoje (dále jen IUV), kdy embryo už obsahuje všechny tři zárodečné vrstvy: ekto-, endo- a mezoderm. Nejdřív se střevní stěna utváří do podoby čtyř základních vrstev a to: mukózy, submukózy, vnější svalové vrstvy a serózy. Ve 4. týdnu IUV se výrazně začíná diferencovat endoderm a mezenchym. Epitel trávicí trubice je nejdřív jednovrstevný kubický až cylindrický, později se mění na epitel víceřadý cylindrický, který mezi 5. a 6. týdnem uzavírá lumen. Ke konci 6. týdne IUV se díky apoptóze buněk obnovuje průsvit lumen, který se vytváří vznikem drobných dutinek v epitelu. Tyto dutinky se postupně rozšiřují a tím vznikají nepravidelnosti – základ střevních klků. Primitivní střevní klky jsou tvořeny mezenchymem a epitelovými buňkami, které se kolem 8. týdne IUV začnou postupně transformovat z epitelu vrstevnatého na epitel jednovrstevný cylindrický. V místech s přetrvávajícím epitelem vrstevnatým dochází k aktivaci mezenchymu, který prorůstá směrem k lumen. Apikální část klku je tvořena epitelem jednovrstevným cylindrickým, zatímco epitel báze zůstává prozatím víceřadý cylindrický – viz obrázek č. 8. Přibližně v průběhu 13. a 14. týdne IUV vzniká slizniční svalovina, oddělující *lamina propria mucosae* od submukózy. Během 15. a 16. týdne začíná epitel na bázi klků prorůstat do slizničního vaziva a vytváří tak Lieberkühnovy krypty. V bazální části klků se nachází kmenové buňky dávající vznik progenitorovým buňkám, které se dál diferencují na další buněčné typy (enterocyty, pohárkové, endokrinní buňky atd.). Tyto buňky se posouvají směrem k apikální části klků, kde nahrazují již buňky odumírající (146).

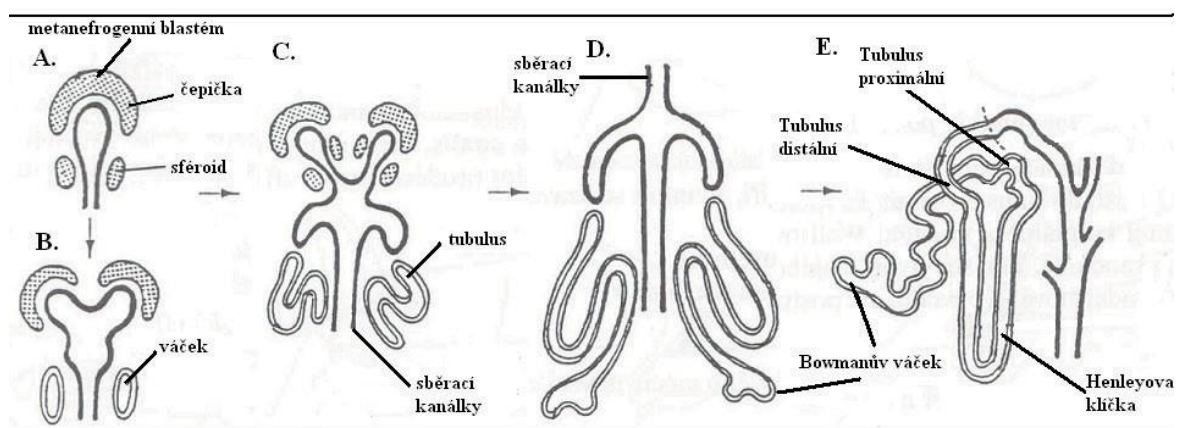


Obrázek č. 8: Schéma vývoje střevního epitelu

Jaterní výběžek (základ jater) vyrůstá z endodermu primitivního duodena ke konci 3. týdne IUV. Z jeho buněk se diferencují hepatoblasty, později hepatocyty. První žlučové kanálky se formulují ve 4. týdnu IUV, žlučové vývody v polovině druhého měsíce IUV. Hematopoéza v játrech probíhá v období od 6. do 12. týdne IUV.

Ledviny vznikají převážně z intermediálního mezodermu – tzv. nefrotomů (intermediální mezoderm je částí třetí zárodečné vrstvy – mezodermu spojující prvosegmenty s nesegmentovaným mezodermem). Během svého vývoje prochází třemi stádii: pronefros, mezonefros a metanefros. Metanefros (pravá ledvina) vzniká na úrovni 3. až 5. prvosegmentu jako souvislý nesegmentovaný útvar – metanefrogenní blastém (MB). Z kaudální části Wolffova vývodu vyrůstá uretrální pupen (UP), který prorůstá do MB a větví se v něm. Následně dochází k tzv. reciproké indukci – sérii interakcí mezi epiteliálními buňkami uretrálního pupene (UP) a mezenchymovými buňkami metanefrogenního blastému (MB) v období od 5. do 36. týdne IUV. Výsledkem těchto interakcí je fragmentace metanefrogenní tkáně na izolované seskupení mezenchymových buněk, čili sféroidy. Sféroidy později luminizují a mění se na váčky, které se prodlužují a mění svůj tvar na měsíčitý (tzv. „comma-

*shaped bodies*“) a esovitě prohnutý (tzv. „*S-shaped bodies*“). Z těchto váčků se postupně vyvíjí nefrony a to tak, že z proximálního konce vzniká Bowmanův váček, do kterého se zanoří krevní kapiláry glomerulu, a z distálního konce vzniká tubulární systém. Z UP vznikají vnitřní a vnější cesty močové – sběrací kanálky, ledvinové kalichy, pánvička a močovody – viz obrázek č. 9. Tento proces se cyklicky opakuje, vznikající nefrony se posouvají od neogenní zóny směrem do dřene ledviny a napojují se na stávající sběrací kanálky. Během nefrogeneze neogenní zóna se postupně ztenčuje a přibývá počet vyvíjejících se nefronů a sběracích kanálků. Na jednom tkáňovém řezu embryonální/fetální ledviny najdeme proto tyto struktury v různých fázích svého vývoje. Produkce moči začíná v 9. až 10. týdnu IUV (147).



Obrázek č. 9: Schéma vývoje metanefros – upraveno podle Malinský J, Lichnovský V, 2001 (148)

## 4.3 Expresní profil ABC transportérů odpovědných za MDR v embryonálních/fetálních tkáních

### 4.3.1 Střeva, játra a ledviny

Embryo se vyvíjí v závislosti na vnějším prostředí, které má důležitý vliv na správný průběh embryogeneze. Placenta tvoří první ochrannou bariéru regulující průnik cizích látek směrem k embryu. Tato bariéra je však semipermeabilní a není tedy dostatečným ochranným systémem. Předpokládá se, že ABC transportní proteiny odpovědné za MDR ve vyvíjejících se embryonálních/fetálních tkáních lépe prezentují svoji ochrannou funkci než ve tkáních dospělých.

Expres těchto transportérů v embryonálních/fetálních střevech, játrech a ledvinách nebyla dosud uspokojivě prostudována. Pouze práce Kalkena a kol. popisuje výskyt transportéru MDR1 v 9 lidských embryonálních/fetálních tkáních v období mezi 7.-38. týdnem IUV (149). Expres tohoto proteinu byla detekována pomocí imunohistochemie, mRNA pomocí techniky „*ribonuclease protection assay*“. Slabá expres proteinu byla zaznamenána na membráně endotelu zažívacího traktu v době od 11. do 20. týdne IUV, v endotelu tlustého střeva však mnohem zřetelněji a taky dříve - již od 7. týdne IUV. Slabá expres mRNA byla



zaznamenána v 11., 13. a 14. týdnu IUV, v 16. a 20. týdnu IUV tato exprese vzrostla. Výrazná pozitivita byla popsána také ve žlučových kanálcích jater po 14. týdnu IUV, žlučové vývody a jaterní parenchym byly však negativní. V ledvinách byla pozitivita popsána v apikální části tubulů po 11. týdnu IUV a v Bowmanově membráně nefronů v 11. a 13. týdnu IUV. Přítomnost MDR1 transportéru u glomerulů a metanefrogenního mezenchymu (MM) nebyla zjištěna.

Několik studií popisuje výskyt transportérů odpovědných za MDR během potkaního/myšího ontogenetického vývoje. Rosati a kol. studovali pomocí metody RT-PCR expresi potkaních transkriptů (mRNA) genů *mdr1a*, *mdr1b* a *mrp1* v pěti orgánech v 15. dni IUV a také v postnatálním období do 8. měsíce. Hladina potkaního transkriptu genů *mdr1a* a *mdr1b* vzrostla v ledvinách v 6. dni po narození, v játrech také v 6. dni u *mdr1b* a ve 20. dni u *mdr1a*. Pokles transkriptu genu *mdr1a* u 5-měsíčních myší byl zaznamenán v játrech, naproti tomu pokles transkriptu genu *mdr1b* byl zaznamenán ve všech zkoumaných orgánech (150). Cui a kol. zaznamenali v ledvinách před 10. dnem malé množství mRNA genu *mdr1b*, pak až do 30. dne nárůst exprese tohoto genu (151).

#### 4.3.2 Ostatní tkáň

Výše popsané tři ABC transportéry byly také nalezeny v dalších embryonálních/fetálních tkáních. Kalken a kol. zaznamenali výrazný výskyt proteinu MDR1 v endotelu lidského embryonálního žaludku. Vyvíjející se pneumocyty plic a průdušinky byly negativní, jen hlavní průdušky byly slabě pozitivní v 17. a 20. týdnu IUV. Mozkové tkáň embryí 14. a 28. týdne byly negativní, v mozkových kapilárách však byla zaznamenána pozitivita po 28. týdnu IUV (149). Matsuoka a kol. studovali expresi a lokalizaci pumpy MDR1 v tkáních potkaního mozku během prenatalního vývoje. Tato pumpa byla lokalizována rovněž v mozkových kapilárách, avšak od 7. dne IUV. Její exprese v dalších mozkových tkáních během ontogeneze postupně vzrůstala až do dosáhnutí plateau v dospělém mozku (152).

Petrini a kol. prokázali, že transkript genu *Mdr1* byl exprimován v kuřecím embryu od 12. dne od vylíhnutí, zatímco v burse od 14. do 17. dne IUV (153). Lidský transportér BCRP je hojně přítomný v syncytiotrofoblastu placenty (154), myší *mdr1b* se však kromě placenty nachází také v endometriu gravidní dělohy (155). MDR1 byl nalezen v časně fázi embryogeneze a také v oocytech, kde chrání zrající zárodečné buňky před xenobiotiky (156).

## 5. Cíle práce

Tato dizertační práce sleduje následující výzkumné cíle:

### I. část

- Zmapovat expresi ABC transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních tkáních: střevech, játrech a ledvinách představujících různá stádia IUV.

### II. část

- Zjistit, které z TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$  jsou substráty transportérů MDR1, MRP1 a BCRP pomocí buněčných linií HL60, HL60-MDR1, HL60-MRP1 a PLB-BCRP;
- popsat roli proteinů PPAR- $\gamma$  a pPTEN patřících do signální dráhy PI3K/Akt v procesu regulace exprese ABC transportérů u buněk A549;
- stanovit koncentrace IC50 klinicky používaných vybraných tří TKIs (imatinibu, nilotinibu a dasatinibu) a tří agonistů PPAR- $\gamma$  (ciglitazonu, rosiglitazonu, troglitazonu) u buněčných linií HEK293 a A549;
- popsat účinek klinicky používaných vybraných tří TKIs (imatinibu, nilotinibu a dasatinibu) a tří agonistů PPAR- $\gamma$  (ciglitazonu, rosiglitazonu, troglitazonu) na transkripci ABC transportérů u buněk HEK293 a A549;
- popsat účinek klinicky používaných vybraných tří TKIs (imatinibu, nilotinibu a dasatinibu) na translaci transportérů MDR1, MRP1 a BCRP u buněk A549.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6. Materiál a metody

### 6.1 Použité protilátky

V práci byly použity protilátky, jejichž stručný popis je obsažen v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Seznam použitých protilátek

protilátka	ředění	použití	označení, firma
MDR1	1:100	IHC	ab3366 [JSB-1], Abcam
		FC	APC anti-human CD243 (clone UIC2), Biolegend
MRP1	1:400	IHC	sc-71600 (6D555), Santa Cruz Biotechnology
		FC	PE anti-human CD9 (clone HI9a), Biolegend
BCRP	1:100	IHC	sc-58222 (BXP-21) Santa Cruz Biotechnology
		FC	FITC anti-human CD338 (clone 5D3), Biolegend
sekundární anti-mouse/rabbit IgG	1:10000	IHC	HRP Rabbit/mouse, DAKO
PPAR- $\gamma$	1:100	WB	sc-81152, Santa Cruz Biotechnology
pPTEN	1:200	WB	Ser380/Thr382/Thr383 (sc-9549), Cell Signaling Technology
$\beta$ -actin	1:1000	WB	cs-4967, Cell Signaling Technology
MCM7	1:1000	WB	sc-4018, Cell Signaling Technology
sekundární anti-mouse IgG	1:1000	WB	sc-7076, Cell Signaling Technology
sekundární anti-rabbit IgG	1:1000	WB	sc-7074, Cell Signaling Technology

Zkratky: **IHC** - imunohistochemická detekce proteinů, **FC** - průtoková cytometrie, **WB** – westernový přenos

### 6.2 Imunohistochemická detekce proteinů

Byla provedena imunohistochemická detekce ABC transportérů odpovědných za MDR v lidských embryonálních/fetálních střevech (n=35), játrech (n=35) a ledvinách (n=37). Pomocí nepřímé dvoustupňové metody byla provedena imunohistochemická detekce

lidských zárodků o stáří v rozmezí od 5,5. až 28. týdne IUV. Všechny tkáně pocházely z archívu Ústavu histologie a embryologie LF UP Olomouci.

Tkáně byly fixovány ve formolu a zpracovány běžnou parafinovou technikou. Tkáňové řezy (4  $\mu\text{m}$ ) byly odparafinovány v xylenu a zavodněné v sestupné alkoholové řadě. Antigeny byly demaskovány působením citrátového pufru ( $\text{pH}=6$ ) v mikrovlnné troubě (Histos Pro, Milestone) (15 min), endogenní peroxidázová aktivita byla zablokována v 3% roztoku peroxidu vodíku (30 min), pozadí u jaterních tkání bylo odstraněno inkubací v 5% roztoku odtučněného mléka (30 min). Primárními protilátkami byly: MDR1, MRP1 a BCRP (Abcam, Santa Cruz Biotechnology), sekundárními protilátkami byly anti-myši/králíčí protilátky značené křenovou peroxidázou (DAKO, HRP Rabbit/mouse) – viz bod 6.1.. Pro vizualizaci protilátek byl použit detekční systém DAKO EnVision™ + systém HRP obsahující 3,3' diaminobenzidin (DAB) reagující s chromogenní peroxidázou a poskytující hnědý precipitát. Jako kontrastní barvení byl použit hematoxylin. Preparáty byly následně odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě a acetonu, projasněny xylenem a zamontovány v enthalanu. Expres proteinů byla hodnocena semikvantitativně pomocí tzv. histoskóre. Histoskóre bylo počítáno jako násobek intenzity signálu (0 – žádný signál, 1 – slabý signál, 2 – silný signál, 3 – velmi silný signál) a procentuálního zastoupení pozitivních buněk (0 – do 5%, 1 – do 30%, 2 – do 60%, 3 – nad 60%). Maximální hodnota histoskóre je 9.

### **6.3 Buněčné linie a jejich kultivace**

Pro experimenty byly použity buněčné linie HEK293, A549 a HL60 a buněčné linie transfekované exprimující jeden ze studovaných transportérů: HL60-MDR1, HL60-MRP1 (157), PLB-BCRP (158). Buněčná linie HEK293 (ATCC číslo CRL-1573) byla poprvé připravena a popsána v roce 1977 F.L. Grahamem (159), je tvořena lidskými embryonálními ledvinovými buňkami tříměsíčního fěta (transfekovanými adenovirem 5 DNA). Buněčná linie A549 (ATCC číslo CCL-185) sestává z epitelových buněk nemalobuněčného plicního karcinomu, které byly poprvé popsány v roce 1972 D. J. Giardem (160). Linie HL60 jsou suspenzní buňky akutní promyelocytární leukémie a byly poprvé popsány v roce 1977 S. J. Collinsem (161). Linie HEK293, A549 a HL60 byly darem od Ústavu experimentální biologie Masarykovy univerzity v Brně. Transfektanty HL60 byly darem od prof. Sarkadiho z Maďarské akademie věd v Budapešti (Simmelweis University Medicine, National Blood Centre, Membrane Res Grp, Hungarian Acad Sci).

Linie HEK293 a A549 byly kultivovány v médiu DMEM (Gibco) s 10 % FBS (fetálním bovinním sérem), s L-glutaminem s antibiotiky streptomycinem (0,1 mg/ml) a penicilinem (100 U/ml). Suspenzní linie HL-60 a transfektanty HL-60 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10 % FBS, s L-glutaminem a s antibiotiky streptomycinem (0,1 mg/ml) a penicilinem (100 U/ml). Všechny buněčné linie byly kultivovány při 37 °C a 5 % obsahu  $\text{CO}_2$  a pasážovány každé 3 až 4 dny.

## 6.4 WST-1 (test životaschopnosti)

Pro stanovení životaschopnosti buněk byla použita kolorimetrická metoda WST, která je modifikací metody MTT (dříve popsána v literatuře – 162). Při WST je světle červený roztok tetrazoliových solí 4-[3-(4-Iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat metabolizován mitochondriálními dehydrogenázami živých buněk na tmavě červený formazán, jehož vzniklé množství je přímo úměrné počtu živých buněk (163). Změna zbarvení je měřena spektrofotometricky.

### 6.4.1 Stanovení afinity agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs k jednotlivým transportérům

Pro účely zjištění zda agonisté PPAR- $\gamma$  (ciglitazon, rosiglitazon, troglitazon) a TKIs (dasatinib, imatinib, nilotinib) jsou substráty ABC transportérů, byl proveden test WST-1 na buněčné línii HL60 a na buněčných liniích transfekovaných: HL60-MDR1, HL60-MRP1, PLB-BCRP. Buňky byly vysety na 96-jamkovou misku (s koncentrací  $2 \times 10^5$  buněk v 90  $\mu$ l media na jamku). Po 24 h bylo k buňkám přidáno 6 různých testovaných látek o koncentracích v rozmezí 1-50  $\mu$ M v totálním objemu 10  $\mu$ l – do jamek sloužících jako kontrola (blank) bylo pipetováno pouze 10  $\mu$ l čistého kultivačního média. Inkubace při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub> probíhala dva dny. K takto ovlivněným buňkám se pak přidal roztok WST1 (Roche Applied Science) dvakrát ředěný PBS a PMS (1-metoxy-5-metylfenazinium metyl) v poměru PMS 1:1000 WST1+PBS v množství 10  $\mu$ l na jamku. Inkubace při 37 °C probíhala tři hodiny, poté byla změřena absorbance na ELISA readeru (Schoeller instruments) při vlnové délce 420 nm. Měření absorbance bylo provedeno v triplicátu a následně byly naměřené hodnoty normalizovány vzhledem ke kontrole (kontrolou byly buňky kultivované v čistém médiu). Měření bylo opakováno třikrát a z naměřených hodnot byla stanovena průměrná absorbance.

### 6.4.2 Stanovení koncentrací IC<sub>50</sub> agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs u buněčných linií HEK293 a A549

Buněčné linie HEK293 a A549 byly vysety na 96-jamkovou misku (s koncentrací  $2 \times 10^5$  buněk v 90  $\mu$ l media na jamku). Po 24h bylo k buňkám přidáno 6 různých testovaných látek o různých koncentracích v totálním objemu 10  $\mu$ l - do jamek sloužících jako kontrola (blank) bylo pipetováno pouze 10  $\mu$ l čistého kultivačního média. Inkubace při 37 °C a 5 % obsahu CO<sub>2</sub> probíhala dva dny. K takto ovlivněným buňkám se pak přidal roztok WST1(Roche Applied Science) dvakrát ředěný PBS a PMS (1-metoxy-5-metylfenazinium metyl) v poměru PMS 1:1000 WST1+PBS v množství 10  $\mu$ l na jamku. Inkubace při 37 °C probíhala tři hodiny, poté byla změřena absorbance na ELISA readeru (Schoeller instruments) při vlnové délce 420 nm. Aproximací byla sestavena lineární přímka znázorňující funkci procentuálního množství přeživších buněk na koncentraci testované látky. Z rovnice regrese přímky byla vypočtena koncentrace IC<sub>50</sub> (koncentrace testované látky, při které přežije 50 % buněk). Měření byla prováděna v triplicátu třikrát.

Nejdřív se koncentrace testovaných látek pohybovala v rozmezí 1-20  $\mu\text{M}$ , potom se toto rozmezí podle hodnot  $\text{IC}_{50}$  upravilo. Z těchto měření byla pro každou testovanou látku vypočítána průměrná koncentrace  $\text{IC}_{50}$ .

## **6.5 Kvantitativní RT-PCR v reálném čase**

### **6.5.1 Izolace RNA**

Pro izolaci mRNA byl využit komerčně dodávaný kit (UltraClean Tissue & Cells RNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc.). Od buněk, které rostou přisedlé na povrchu kultivační misky bylo odsáto médium, buňky byly pomocí trypsinu přemístěny do zkumavek a zcentrifugovány 5 minut při 2000 g při 37 °C. Peleta byla následně resuspendována v PBS pufru, suspenze opět zcentrifugována 5 minut při 2000 g při 37 °C, homogenizována ( $\beta$ -merkaptoethanolem s DNázovým pufrům v poměru 1:1000), lyzována (DNázovým promývacím pufrům), přenesena do kolonek s membránou vázající RNA a centrifugována (1 minutu při 10 000 g při 37 °C). Membrána s RNA byla potom promyta pomocí centrifugace (1 minutu při 10 000 g při 37 °C) 1 $\times$  promývacím pufrům eliminujícím proteiny a 2 $\times$  promývacím pufrům eliminujícím soli. Potom byla membrána sušena 2 minuty při 13 000 g při 37 °C. Z membrány byla eluována RNA pomocí vody „RNase free“ (inkubace 1 minutu, centrifugace 1 minutu při 10 000 g při 37 °C) a skladována při -80 °C.

### **6.5.2 Měření koncentrace RNA**

Pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific) byla měřena absorbance izolované RNA a na základě odečtených hodnot byla stanovena koncentrace RNA jednotlivých vzorků. Absorbance v objemu 1  $\mu\text{l}$  každého vzorku byla porovnána s absorbancí kontroly (blanku). Naměřené hodnoty podávaly informaci o čistotě vzorku: poměr mezi hodnotami absorbancí naměřených při 260/230 nm by neměl být nižší než 1,7 – jinak se jedná o kontaminaci fenolickými látkami, poměr mezi hodnotami absorbancí naměřených při 260/280 nm by se měl pohybovat kolem 2 – jinak se jedná o kontaminaci proteiny. Izolovaná RNA byla skladována při -80 °C.

### **6.5.3 Navrhování primerů a sond**

Z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) byly získány sekvence genů ABC transportérů odpovědných za MDR a to: MDR1, MRP1, BCRP. Pomocí programu primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) byly navrženy primery zpětné a přímé a taky duálně značené TaqMan sondy (BHQ1-FAM) – viz tabulka č. 5. Pomocí programu PREMIERBiosoft (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/Help/xnetprlaunch.html>) byla provedena kontrola možných zkřížených reakcí primerů a sond, tvorby smyček atd..

Tabulka č. 5: Primery a sondy pro specifickou amplifikaci genů kódující ABC transportéry odpovědné za MDR

gen	primer přímý (forward) – sekvence	%GC	Teplota tání (T <sub>m</sub> )/°C
	primer zpětný (reverse) – sekvence		
	sonda– sekvence		
MDR1	ACCCTAAAAACACCACTGGA	45,00	57,02
	AATTACAGCAAGCCTGGAAC	45,00	56,97
	CGCCAATGATGCTGCTCAAG	55,00	55,00
MRP1	CTGTGGACTGCAAGTCTTTG	50,00	57,01
	GGTAGACCCAGACAAGGATG	55,00	57,00
	TGCTTCTGGCTCCCATCACC	60,00	65,00
BCRP	GCATTCCACGATATGGATTT	40,00	57,36
	AGGATTGTTTCCTGTTGCAT	40,00	57,11
	TTGGGACAAAACCTTCTGCCCA	47,62	64,93

#### 6.5.4 Reverzní transkripce

Všechny chemikálie, primery a sondy pro přepis mRNA do cDNA byly pořízeny od firmy Elisabeth Pharmacon – viz tabulka č. 6.

Tabulka č. 6: Master mix (na 1 vzorek)

	RT kit plus: komponenty	objem/μl
1.	RT-MIX	10
2.	reverzní transkriptáza: MMLV-RT 40U/μl + inhibitor RNáz: RNasi STOP 4U/μl v „RNase free“ vodě	5
3.	RNA	10
celkový objem		25

Podmínky reakce:

- hybridizace primerů při 25 °C, 10 minut
- reverzní transkripce při 37 °C, 45 minut
- denaturace při 95 °C, 5 minut

Výsledná cDNA byla skladována při -20°C.

#### 6.5.5 Amplifikace pomocí qRT-PCR

qRT-PCR (qRT-PCR=*quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*) je metoda PCR kvantifikující vzorky v reálném čase. Vzorky byly pipetovány v triplicátech

na 96 jamkovou destičku – viz tabulka č. 5, destička potom byla překryta ochrannou fólií, centrifugována při 4 °C a 13 000 g po dobu 5 min. Samotná reakce byla prováděna na přístroji Lightcycler 480-96S Real-Time PCR od firmy Roche. Jako endogenní kontrola byl použit gen pro lidský ACTB (beta aktin), k němuž byla vztažena relativní kvantifikace.

**Tabulka č. 7: Master mix (pro 1 vzorek)**

	<b>komponenty</b>	<b>koncentrace</b>	<b>objem/<math>\mu</math>l</b>
1.	master mix		10
2.	přímý primer	200 nM	0,04
3.	zpětný primer	200 nM	0,04
4.	sonda	100 nM	0,02
5.	MQ sterilní voda		7,9
6.	cDNA		2
celkový objem			20

Podmínky reakce:

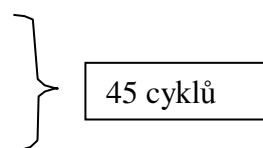
Počáteční denaturace: 94 °C, 5 min

1. Denaturace: 95 °C, 10 s

2. Hybridizace primerů (annealing): 60 °C, 10 s

3. Prodlužování primerů (extension): 72 °C, 10 s

Konečné chlazení



## 6.6 Průtoková cytometrie

Buněčná linie A549 byla po dosažení 90% konfluency ovlivněna imatinibem, nilotinibem a dasatinibem (koncentrací IC50). Po 1 a 3 dnech od ovlivnění byly buňky sklizeny pomocí akutázy, 2x opláchnuty v PBS pufu, centrifugovány při 400 g po dobu 5 min, následně inkubovány při pokojové teplotě 15 minut v přítomnosti DNázy (STEMCELL Technologies), a centrifugovány při 400 g po dobu 5 min. Potom byly buňky spočítány pomocí přístroje Coulter Counter (Beckman Coulter) a z tohoto údaje bylo spočítáno výsledné množství buněk v roztoku. Ředěním pomocí CellWASH pufu (BD Biosciences) byla připravena buněčná suspenze. Poté byly přidány monoklonální protilátky v saturační koncentraci – viz tabulka č. 4 (protilátky byly přidávány vždy ke stejnému množství buněk v celkovém objemu 100  $\mu$ l), inkubace probíhala 20 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky zcentrifugovány při 400 g po dobu 5 min a opět promyty v CellWASH pufu. Povrchové antigeny byly analyzovány průtokovou cytometrií (FACS Canto II, Becton-Dickinson). V každém vzorku bylo měřeno minimálně 30 000 buněk. Gatování bylo provedeno pomocí diagramu FS/SS (forward scatter/side scatter), odstranění dubletů bylo provedeno pomocí diagramu FSC-H (forward-scatter height) versus FCS-A (forward-scatter area).



Mediány intenzity fluorescence byly odečteny z histogramů analyzovaných antigenů a následně pomocí kalibračních kuliček značených fluorochromy PE, FITC a APC převedeny na MESF jednotky (molecules of equivalent soluble fluorochrome) za použití softwaru QuickCal®(Bangs Laboratories, IN). Roztok kalibračních kuliček byl ředěn tak, že jedna kapka roztoku byla přidána k 400  $\mu$ l pufru CellWASH a dobře promíchána. Kalibrační kuličky označené jako blank byly analyzovány ve stejném pufru. Z mediánů intenzity fluorescence kalibračních kuliček byla sestavena kalibrační přímka, na základě které byly odečteny hodnoty MESF pro každý analyzovaný vzorek.

## 6.7 Imunofluorescenční značení proteinů

Buněčná linie A549 byla kultivována 24 hodin ve 4-jamkové misce (určené pro analýzu pomocí konfokálního mikroskopu). Následně byly buňky označené monoklonální protilátkou PE anti-human CD9 (clone HI9a, Biolegend), chromatin byl obarven modře pomocí DAPI. Analýza byla provedena pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 780 Axio Observer.

## 6.8 Western blotting

### 6.8.1 Izolace proteinů

Lyzační pufr pro izolaci proteinů byl připraven podle tabulky č. 8. Inhibitory fosfatáz (označení FI) a proteináz (označení PI) byly pořízeny od firmy Roche (PhosSTOP).

Složení zásobních roztoků:

- FI: 1 tabletu rozpustíme v 1 ml ddH<sub>2</sub>O
- PI: 1 tabletu rozpustíme ve 2 ml ddH<sub>2</sub>O
- NP-40 pufr: 1 ml 0,5M EDTA pH=8,0; 50 ml 0,1M Tris; 15 ml 1M NaCl; 1 ml NP-40; doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

Tabulka č. 8: Složení lyzačního pufru (pro 1 vzorek)

komponenty	objem/ $\mu$ l
NP-40 pufr	258
FI	30
PI	12
celkový objem	300

Od buněk, které rostou na povrchu Petriho misky o průměru 5 cm bylo odsáto médium. Následně byly buňky 2 $\times$  opláchnuty studeným pufrům PBS, bylo k nim přidáno 300  $\mu$ l lyzačního pufru a buňky byly lyzovány 5 minut na ledu. Potom buňky byly rozetřeny

sterilní škrabkou, lyzační roztok s buňkami odpipetován a inkubován 1 hodinu na ledu (během inkubace byly buňky každých 15 minut krátce vortexovány). Lyzované buňky byly centrifugovány po dobu 30 minut při 15 000 g při 4 °C. Supernatant byl skladován při -80 °C.

### 6.8.2 Měření koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Bylo připraveno 5 standardů koncentrací proteinů v rozmezí 100-500 µg/ml ředěním zásobního roztoku lidského albuminu (1mg/ml) destilovanou vodou – viz tabulka č. 9.

Tabulka č. 9: Příprava proteinů o koncentraci v rozmezí 100-500 µg/ml

standardy koncentrací (µg/ml)	komponenty/µl		celkový objem standardů/µl
	zásobní roztok albuminu (1 mg/ml)	dH <sub>2</sub> O	
100	10	90	100
200	20	80	
300	30	70	
400	40	60	
500	50	50	

Na mikrotitrační destičku pipetujeme v duplikátech 10 µl: destilované vody (blanku), standardů koncentrací proteinů a lyzátů ředěných 10×. Následně do každé jamky přidáme 200 µl roztoku Bradfordové a inkubujeme 5 minut. Pomocí ELISA readeru (Schoeller instruments) měříme absorbanci při vlnové délce 595 nm. Sestavíme si kalibrační přímku a odečteme koncentraci proteinů v lyzátu.

### 6.8.3 SDS-PAGE – elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu

Po sestavení aparatury (Bio-Rad) pro nalití gelu byl připraven 10 % separační gel, který obsahoval: 2,1 ml MQ vody, 2,8 ml 1M TRIS-HCl (pH = 8,8), 75 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % APS, 2,5 ml 30% akrylamidu, 5 µl TEMED. Gel byl napipetován středem mezi připravené sklo a keramickou destičku cca 1 cm pod úroveň dna jamek. Tuhnoucí gel byl převrstven destilovanou vodou. Polymerace probíhala 30 minut. Jakmile byla směs zpolymerizována, voda byla odlita a případné zbytky odsáty odsávačkou. Na takto připravený 10% gel byl napipetován 5% zaostřovací gel, který obsahoval: 2,6 ml MQ vody, 470 µl 1M TRIS-HCl (pH = 6,8), 37,5 µl 10 % SDS, 18,8 µl 10 % APS, 627 µl 30 % akrylamidu, 3,75 µl TEMED a přidán hřebínek. Po 30 min polymerizace byla aparatura s gelem vložena do elektroforetické vany a zalita elektroforetickým pufrem (29 g glycinu, 6 g Tris, 10 ml 10% SDS, 2 l destilované vody). Po nalití elektroforetického pufru byl odstraněn hřebínek a do první jamky bylo napipetováno 1 µl markeru (Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker – GE Healthcare,

Life Sciences) a doplněno do celkového objemu 15  $\mu$ l nanášecím pufrem (4 g sacharózy, 5 g 5% roztoku bromfenolové modři, 2 ml 0,5M EDTA pH 8,0).

Do ostatních jamek bylo napipetováno po 15  $\mu$ l jednotlivých vzorků, které byly před nanesením povařeny 5 min při 95 °C a poté krátce zcentrifugovány. Elektroforéza byla prováděna počátečních 30 min při napětí 75–80 V a poté při 100 V (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories).

#### **6.8.4 Westernový přenos**

Po proběhnutí elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z aparatury a promýván společně s PVDF (polyvinylidendifluorid) membránou (Millipore) a dvěma filtračními papíry Whatman (Amersham) 30 minut ve vychlazeném transferovém pufru (29 g glycinu, 6 g Tris, 2 l destilované vody). Byl sestaven „sendvič“: filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír. Přenos proteinů probíhal pomocí polosuchého transferu (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) po dobu 45 minut při napětí 20 V.

#### **6.8.5 Detekce proteinů na membráně**

Po westernovém přenosu byla PVDF membrána promývána 60 min 5% roztokem mléka v PBS s 0,1 % tweenu-20. Inkubace primárních protilátek probíhala přes noc v 5% roztoku mléka. Následující den byla směs protilátek 3× promyta po dobu 15 min 1% pufrem PBS a přidána sekundární anti-myší nebo anti-králičí protilátka. Ředění protilátek – viz tabulka č. 4. Po 60 min inkubaci při pokojové teplotě byla membrána znovu 3× promyta po dobu 10 min 1% pufrem PBS. Na takto připravenou membránu byla napipetována směs připravená z komponent kitu ECLplus (GE Healthcare) a nechána působit po dobu alespoň 5 min. Poté byla membrána zabalena do fólie a vložena do kazety. V temné komoře byl do kazety vložen film (CL-XPosure Film, Thermo Scientific) a po 5 min. vyvolán postupným ponořením do vývojky, vody, ustalovače a nakonec opláchnut v proudu vody.

### **6.9 Statistika**

Většina výsledků je uvedena ve formě průměrů z nezávislých měření a směrodatné odchylky. Významnost rozdílů u dat získaných pomocí qRT-PCR byla stanovena pomocí T-testu: na hladině  $P \leq 0.05$  je tento rozdíl v grafech znázorněn symbolem \* a na hladině  $P \leq 0.01$  je tento rozdíl v grafech znázorněn symbolem \*\*.

## 7. Výsledky

### 7.1 Imunohistochemická lokalizace ABC transportérů odpovědných za MDR v embryonálních/fetálních tkáních:

#### 7.1.1 střeva

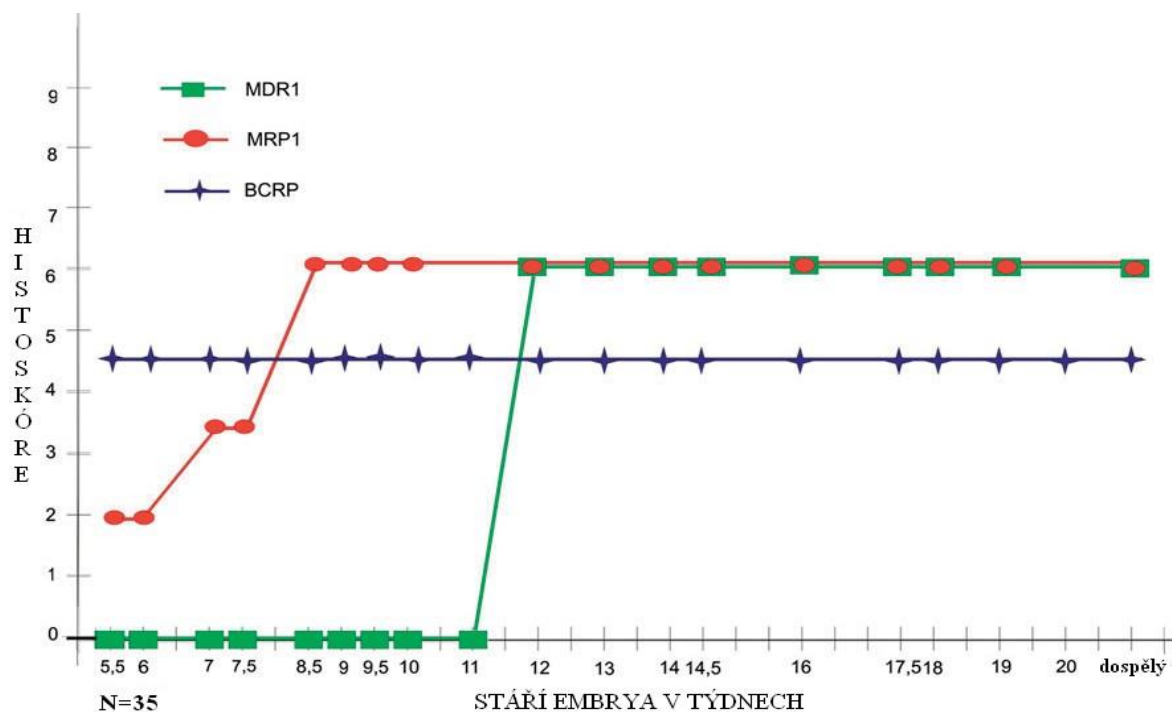
Transportér MDR1 je exprimován od 12. týdne IUV v apikální membráně enterocytů (viz obrázek č. 10). Transportér MRP1 je slabě exprimován v cytoplazmatické membráně enterocytů střevních klků v 5,5. a 6. týdnu IUV. Od 7. týdne IUV je patrná jaderná pozitivita některých enterocytů (viz obrázek č. 11), která se od 8,5. týdne IUV přesouvá spíše do apikální části klků s epitelem jednovrstevným kubickým až cylindrickým. V bazální části klků s epitelem víceřadým je pozitivita cytoplazmatická (viz obrázek č. 12 a 13). V dospělém tlustém střevu je patrná jaderná pozitivita všech enterocytů. Transportér BCRP je exprimován ve všech vzorcích jak v cytoplazmě, tak v cytoplazmatické membráně enterocytů. V závislosti na fázi IUV se však mění poloha BCRP pozitivních buněk ve tkáni. Od 8,5. týdne IUV je výrazně pozitivní zejména bazální část střevních klků (viz obrázek č. 15 a 16) – shrnuto v tabulce č. 10 a grafu č. 1.

Pohárkové buňky jsou negativní pro všechny tři ABC transportéry. Od 10. týdne IUV je pozorována pozitivita v endotelu vyvíjejících se cévních kapilár a také v gangliových buňkách v podslizničním vazivu (*tunica submucosa*). Slabá exprese transportérů MRP1 a BCRP je prokázána ve slizniční svalovině (*tunica muscularis externa*), exprese transportéru MRP1 v této vrstvě je obzvláště patrná v období od 10. do 14. týdne IUV.

Tabulka č. 10: Exprese transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálním/fetálním střevním epitelu

	struktura
MDR transporter	epitel
MDR1	+ (CM od 12. týdne IUV)
MRP1	+ (CM od 5,5. do 6. týdne IUV)
	+ (J od 7. týdne IUV)
BCRP	+ (CM, C)

Zkratky: + - pozitivita, CM – cytoplazmatická membrána, C – cytoplazma, J – jádro



Graf č. 1: Expressie transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálním/fetálním střevním epitelu

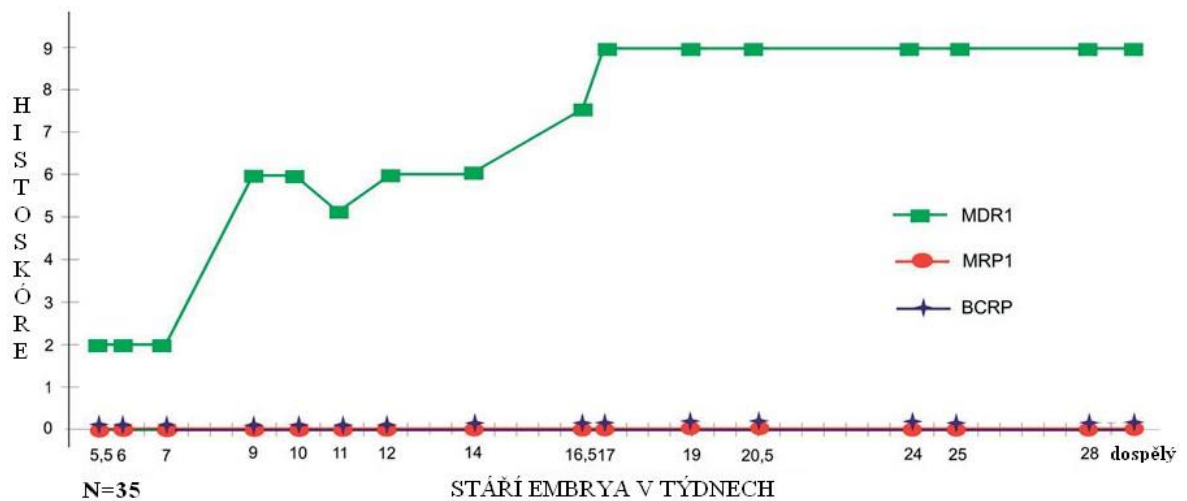
### 7.1.2 játra

Transportér MDR1 je exprimován od 5,5. týdne IUV ve vyvíjejících se žlučových kanálcích (viz obrázek č. 17). S postupnou diferenciací žlučových kanálků (od 9. týdne IUV) roste i míra exprese tohoto transportéru (viz obrázek č. 18 a 19). Transportér MRP1 je exprimován v jádrech hepatocytů v době od 10. do 17. týdne IUV (viz obrázek č. 20 a 21). V dospělých játrech je patrná ojedinělá pozitivita v cytoplazmě hepatocytů. Expresse transportéru BCRP je zaznamenána v jádrech hepatocytů pouze v době od 10. do 11. týdne IUV. V dospělých játrech je tento transportér exprimován v cytoplazmě hepatocytů, ojediněle na membráně hepatocytů – přehledně shrnuto v tabulce č. 11 a grafu č. 2a a 2b.

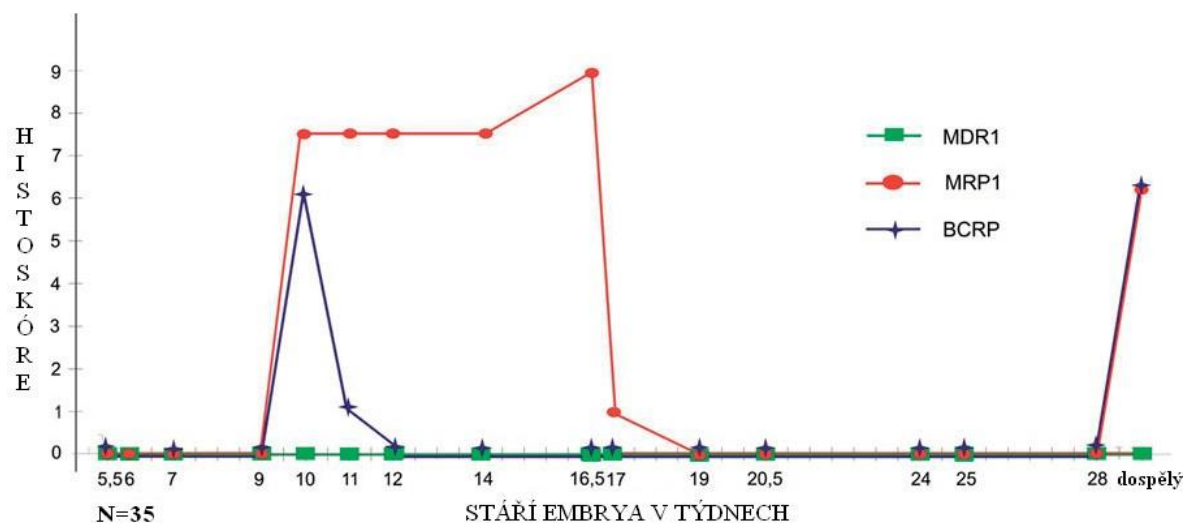
Tabulka č. 11: Expressie transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních žlučových kanálcích

MDR transporter	struktura	
	žlučové kanálky	hepatocyty
MDR1	+ (CM)	-
MRP1	-	+ (J od 10. do 17. týdne IUV)
BCRP	-	+ (J od 10. do 11. týdne IUV)

Zkratky: + pozitivita, CM – cytoplazmatická membrána, C – cytoplazma, J – jádro



Graf č. 2a: Expressie transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních žlučových kanálcích



Graf č. 2b: Expressie transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních hepatocytech

### 7.1.3 ledviny

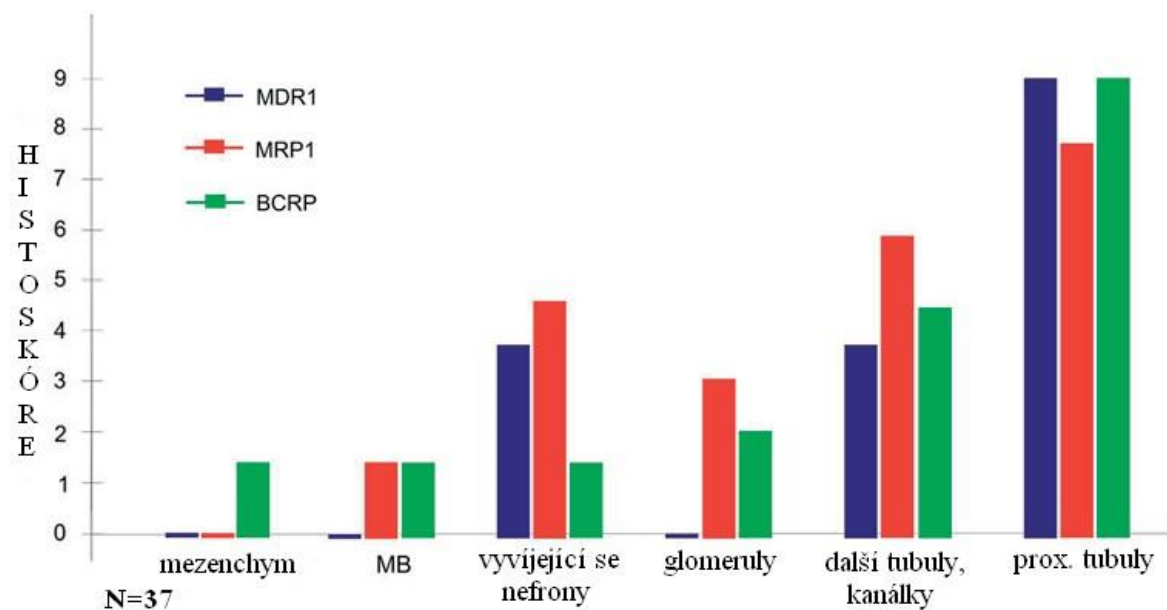
V apikální membráně tubulárního systému ledviny typu mezonefros je zaznamenána silná exprese transportérů MDR1 (viz obrázek č. 22) a MRP1, zato slabá exprese transportéru BCRP. V metanefros exprese všech tří ABC transportérů nezávisí na stáří embryonální/fetální tkáně, ale na umístění ve tkáni. Každá ledvina typu metanefros byla rozdělena na tři části: neogenní zónu (metanefrogenní blastém MB a vyvíjející se nefrony s větvicím se uretrálním pupenem UP), subneogenní zónu (mezenchym, vyvíjející se renální tělíska, tubulární systém) a dřeň. Mezenchym je negativní, MB je slabě pozitivní pro všechny tři ABC transportéry ve všech testovaných tkáních. S mírou diferenciacce nefronů (sféroidy, tzv. „comma-shaped bodies“ a „S-shaped bodies“) roste i míra exprese ABC transportérů. Nejsilnější pozitivita je zaznamenána v apikální membráně proximálních tubulů, slabší v membráně distálních tubulů, Henleovy klíčky, uretrálních pupenů/sběrných kanálků.

V některých Bowmanových váčcích a glomerulech jsou exprimovány transportéry MRP1 a BCRP (viz obrázky č. 23 až 29) – přehledně shrnuto v tabulce č. 12.

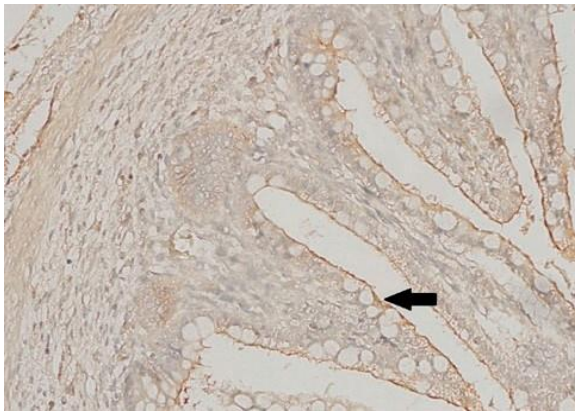
Tabulka č. 12: Exprese transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních ledvinách

MDR transporter	struktura					
	mezenchym	metanefrogenní blastém (MB)	vyvíjející se nefrony	glomeruly	další tubuly, kanálky	prox. tubuly
MDR1	-	-	+ (CM)	-	+ (CM)	+ (CM,C)
MRP1	-	-	+ (CM)	+ (CM)	+ (CM)	+ (CM,C, J)
BCRP	+ (C)	+ (C)	+ (CM)	+ (CM)	+ (CM)	+ (CM,C)

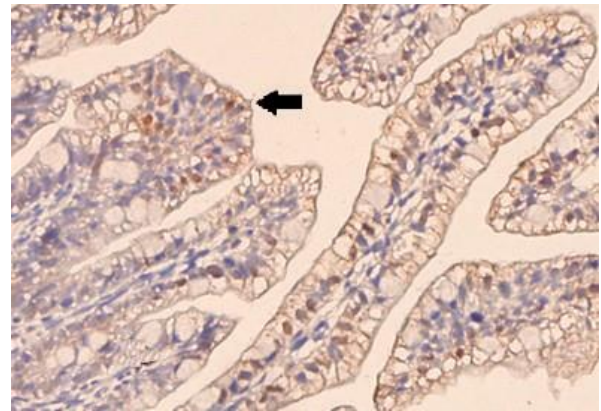
Zkratky: + pozitivita, CM – cytoplazmatická membrána, C – cytoplazma, J – jádro



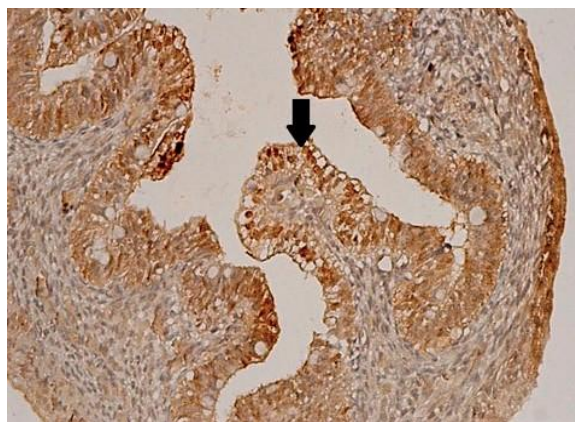
Graf č. 3: Exprese transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních ledvinách



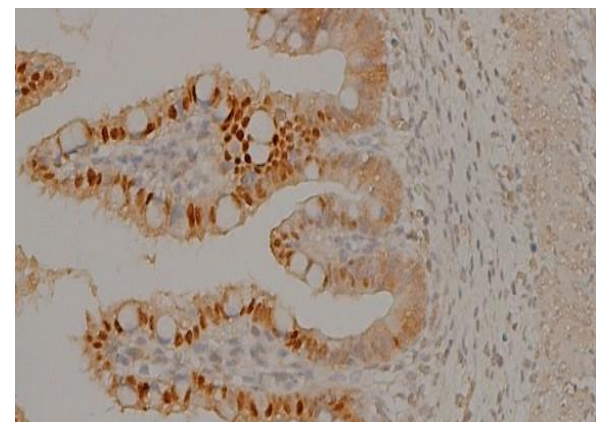
**Obrázek č. 10: Fetální střevo, 16. týden IUV, MDR1 pozitivní apikální membrána střevních klků (šipka), slabá + mezenchymu a tunica muscularis externa. Zv. 200×**



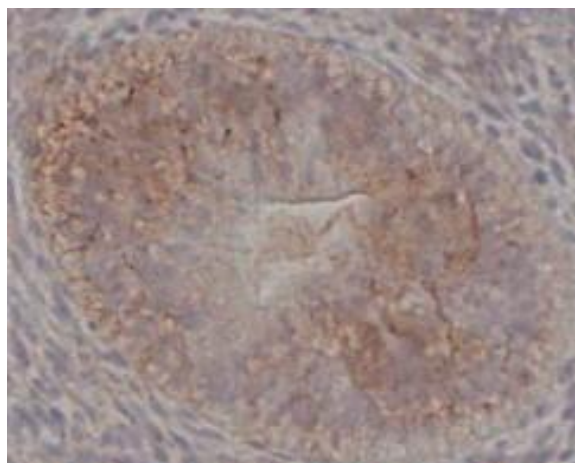
**Obrázek č. 11: Embryonální střevo, 7. týden IUV, náhodná MRP1 jaderná pozitivita enterocytů (šipka). Zv. 400×**



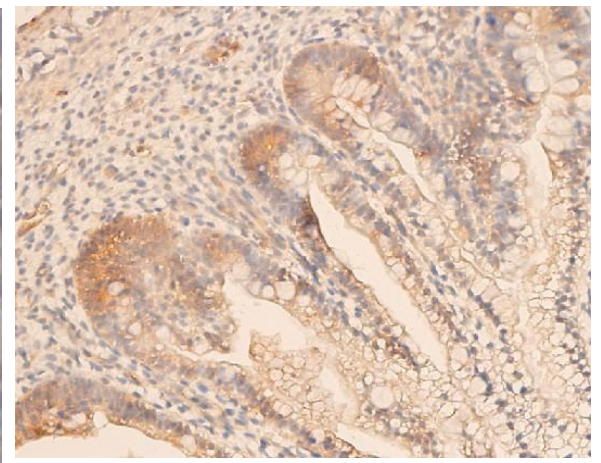
**Obrázek č. 12: Fetální střevo, 9. týden IUV, MRP1 jaderná pozitivita enterocytů v apikální, části klků (šipka), v bazální části klků cytoplazmatická pozitivita enterocytů. Zv. 200×**



**Obrázek č. 13: Fetální střevo, 19. týden IUV, zřetelná MRP1 jaderná pozitivita enterocytů v apikální části klků. Zv. 400×**

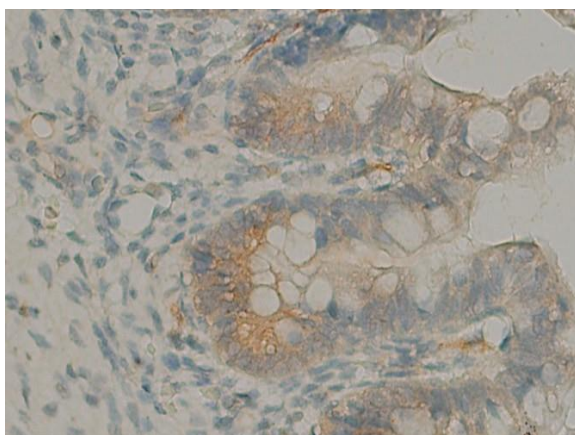


**Obrázek č. 14: Embryonální střevo, 5,5. týden IUV, BCRP cytoplazmatická pozitivita primitivních enterocytů. Zv. 800×**

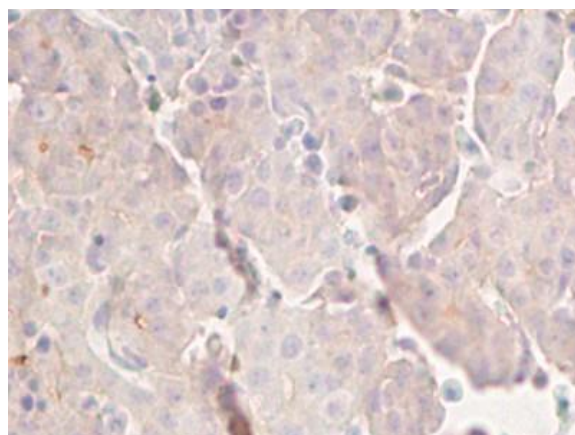


**Obrázek č. 15: Fetální střevo, 10. týden IUV, BCRP cytoplazmatická pozitivita v bazální části střevních klků. Zv. 200×**

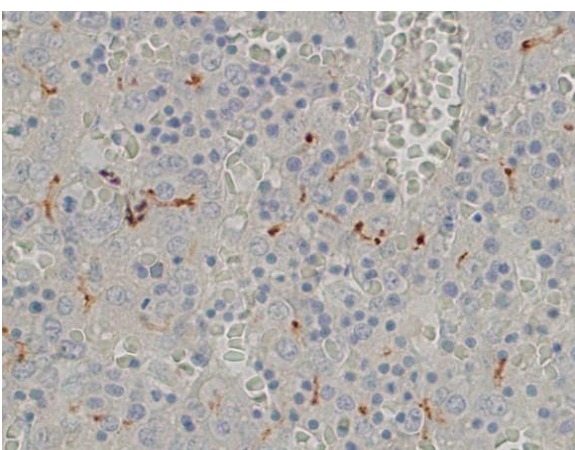




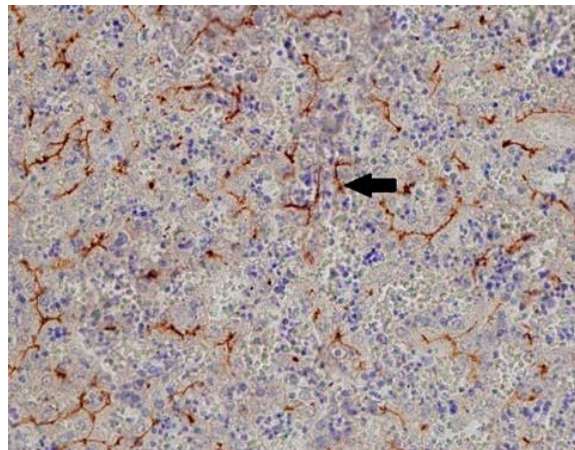
**Obrázek č. 16: Fetální střevo, 19. týden IUV, detail střevního klku, BCRP pozitivní bazální část klku. Zv. 400×**



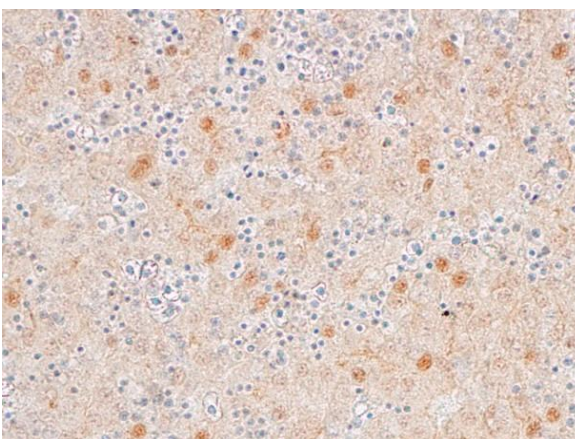
**Obrázek č. 17: Embryonální játra, 5,5. týden IUV, MDR1 slabě pozitivní vyvíjející se žlučové kanálky. Zv. 400×**



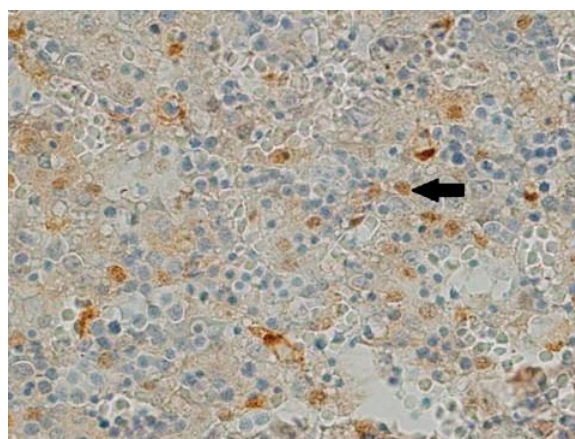
**Obrázek č. 18: Fetální játra, 16,5. týden IUV MDR1 pozitivní žlučové kanálky, hepatocyty jsou negativní. Zv. 400×**



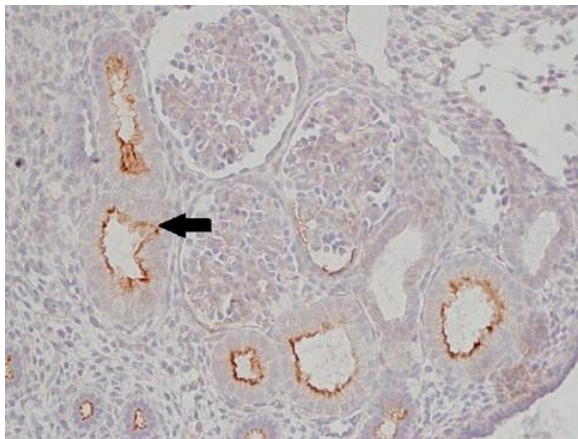
**Obrázek č. 19: Fetální játra, 20,5. týden IUV, MDR1 pozitivní žlučové kanálky (šipka), hepatocyty jsou negativní. Zv. 200×**



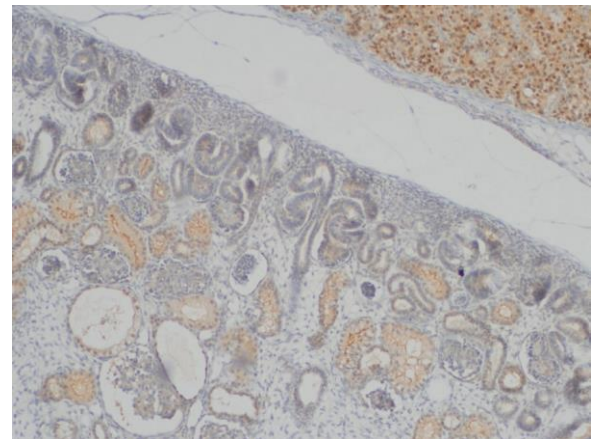
**Obrázek č. 20: Fetální játra, 11. týden IUV, MRP1 jaderná pozitivita hepatocytů v době hematopoézy. Zv. 400×**



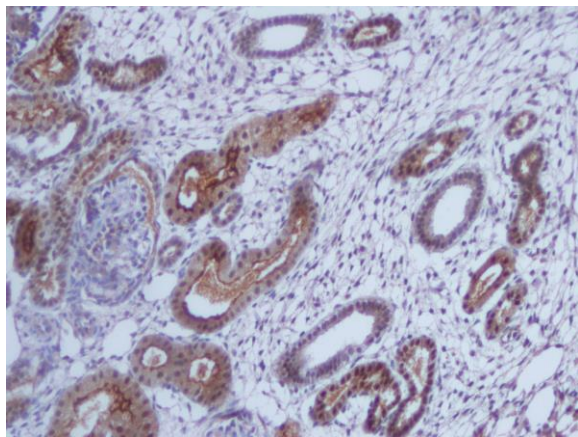
**Obrázek č. 21: Fetální játra, 16,5. týden IUV, MRP1 jaderná pozitivita hepatocytů v době hematopoézy (šipka). Zv. 400×**



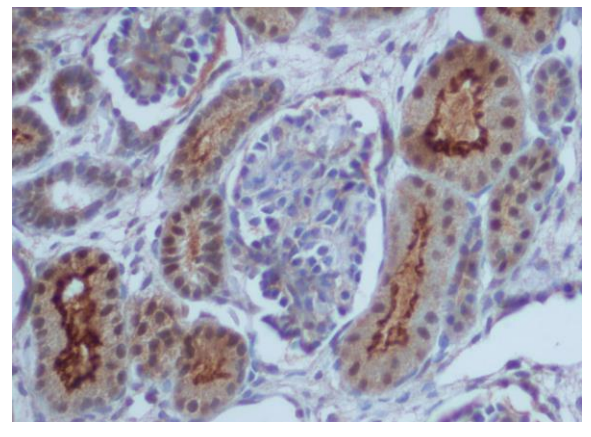
**Obrázek č. 22: Embryonální mezonefros, 5,5. týden IUV, MDR1 pozitivní apikální membrána tubulů (šipka). Zv. 200×**



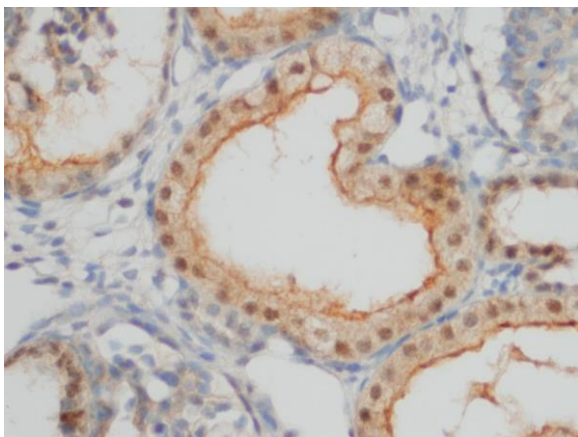
**Obrázek č. 23: Fetální metanefros, 10. týden IUV, MDR1 neg. MB, slabě pozitivní vyvíjející se nefrony, výrazně pozitivní tubulární systém. Zv. 100×**



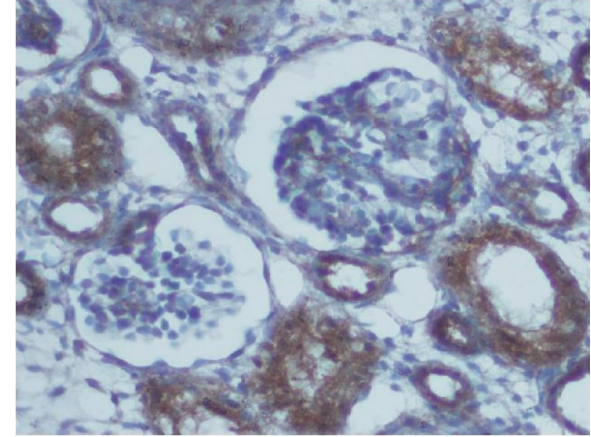
**Obrázek č. 24: Fetální metanefros, 10. týden IUV, rozdíl mezi negativním mezenchymem a MRP1 pozitivním tubulárním systémem. Zv. 200×**



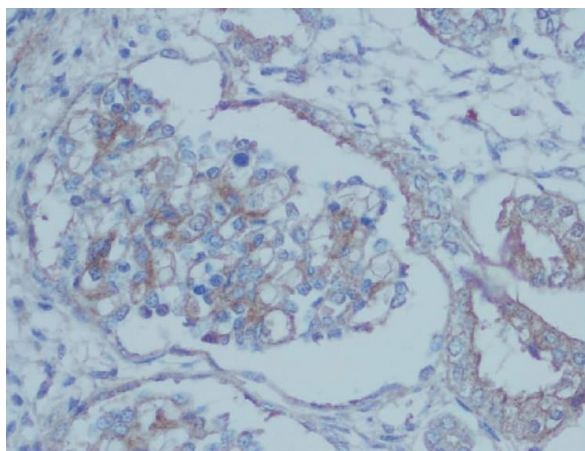
**Obrázek č. 25: Fetální metanefros, 10. týden IUV, MRP1+ tubulárního systému, výrazně pozitivní apikální membrána prox. tubulů. Zv. 400×**



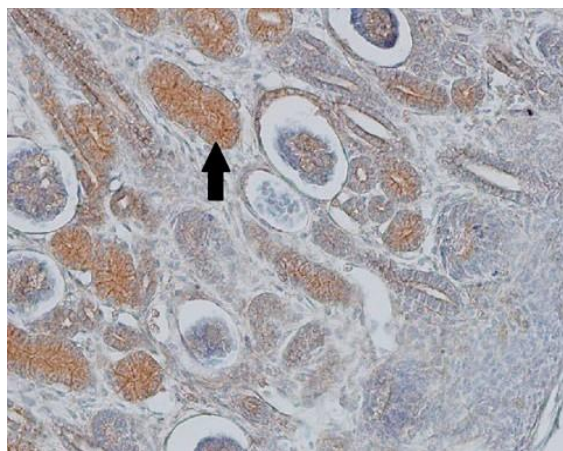
**Obrázek č. 26: Fetální metanefros, 10. týden IUV, MRP1+ detail proximálního tubulu. Zv. 800×**



**Obrázek č. 27: Fetální metanefros, 13. týden IUV, MRP1 pozitivní apikální membrána a cytoplazma tubulů. Zv. 400×**



Obrázek č. 28: Fetální metanefros, 14. týden IUV, MRP1 pozitivní detail glomerulu. Zv. 800×



Obrázek č. 29: Fetální metanefros, 18. týden IUV, BCRP neg. MB, slabě + vyvíjející se nefrony, výrazně pozitivní prox. tubuly (šipka). Zv. 200×

## 7.2 Stanovení koncentrace IC<sub>50</sub> pro agonisty PPAR- $\gamma$ a TKIs u buněčných linií HEK293 a A549 pomocí testu životaschopnosti WST-1

Aby v dalších experimentech byly ovlivněny buňky se stejnou efektivitou, byly stanoveny koncentrace IC<sub>50</sub> testovaných látek. Pomocí stanovení počtu přeživších buněk byla zhotovena kalibrační přímka a z ní byla pomocí regresní analýzy stanovena koncentrace IC<sub>50</sub> jako koncentrace způsobující snížení počtu buněk na 50 % vůči kontrole. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Hodnoty koncentrace IC<sub>50</sub> pro TKIs a agonisty PPAR- $\gamma$  u buněčných linií HEK293 a A549

Zkoumaná látka		IC <sub>50</sub> /μM	
		HEK293	A549
TKIs	imatinib	2.500	24.000
	nilotinib	8.800	0.900
	dasatinib	0.010	0.015
agonisté PPAR- $\gamma$	ciglitazon	15.200	18.000
	rosiglitazon	54.500	30.500
	troglitazon	25.00	55.000

### 7.3 Vliv agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR na úrovni mRNA u modelových buněčných linií HEK293 a A549

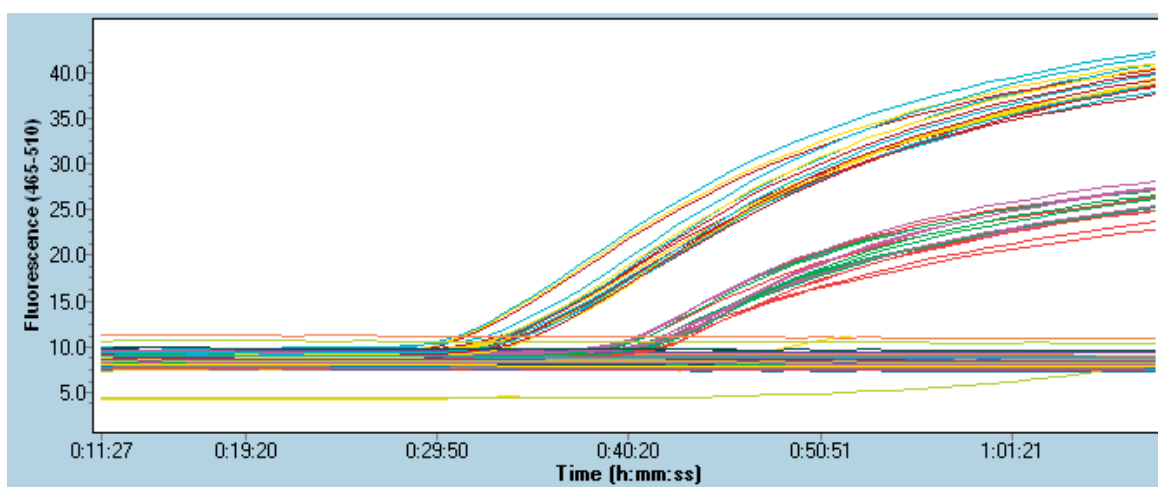
Pomocí qRT-PCR byl stanoven expresní profil transportérů MDR1, MRP1 a BCRP po použití TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$  u buněčných linií HEK293 a A549. Endogenní exprese všech tří ABC transportérů je v buňkách HEK293 velmi nízká, proto jsou vhodné ke studiu dějů, které se v buňkách neodehrávají spontánně. Oproti tomu v buňkách A549 je exprese všech tří transportérů vysoká a proto jsou dobrým modelem pro analonii už vytvořené lékové rezistence.

Agonisté PPAR- $\gamma$  inhibují účinně expresi mRNA pouze transportéru MDR1. Jedině ciglitazon aktivuje expresi tohoto transportéru u buněk HEK293 po 3. dnu.

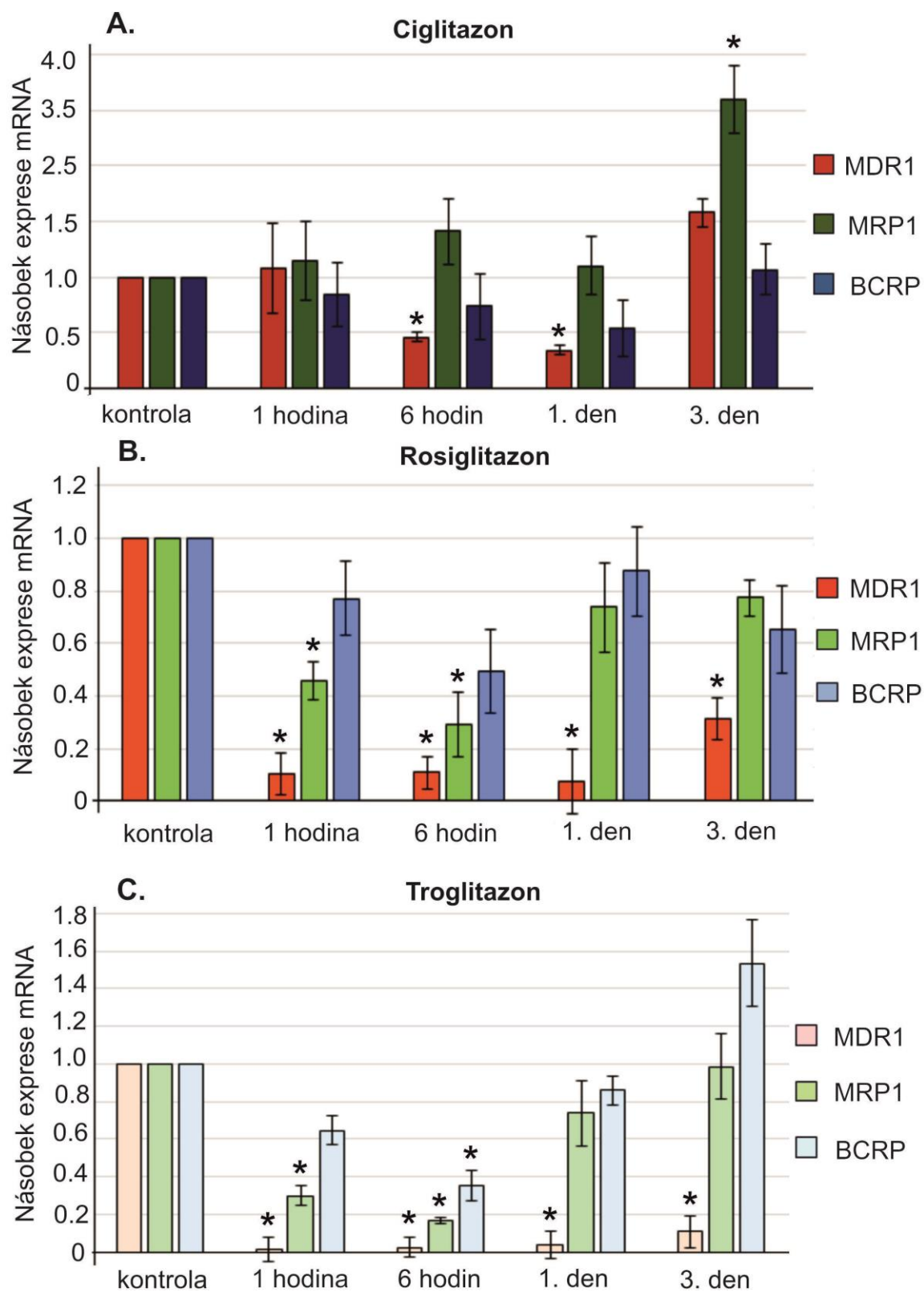
Imatinib inhibuje expresi mRNA transportéru MDR1 už od 1. hodiny od ovlivnění. Tato inhibice trvá do 1. dne u buněk A549 a do 3. dne u buněk HEK293. Exprese transportérů MRP1 je rovněž po 1. hodině inhibována, avšak následně v čase opět postupně roste. Oproti tomu exprese transportéru BCRP roste u buněk A549 po 6. hodině (1,24-násobek) a naroste po 1. dnu (1,33-násobek). U buněk HEK293 exprese naroste po 1. dnu (16-násobek) a po 3. dnu (7,3-násobek).

Nilotinib inhibuje expresi transportérů MDR1 a MRP1 u buněk A549 od 6. hodin do 3. dne od ovlivnění, u buněk HEK293 do 6. hodin od ovlivnění. Exprese transportérů BCRP u buněk A549 naroste stejně jako po ovlivnění dasatinibem po 1. hodině (3,5-násobek), u buněk HEK293 však později po 1. dnu (5,98-násobek) a po 3. dnu (2,08-násobek) – přehledně zobrazeno v grafu č. 4 a 5.

Dasatinib inhibuje expresi mRNA všech tří transportérů u obou buněčných linií až do 3. dne od ovlivnění, jedině exprese transportéru BCRP u buněčné linie A549 po 1. hodině naroste (2,54-násobek).

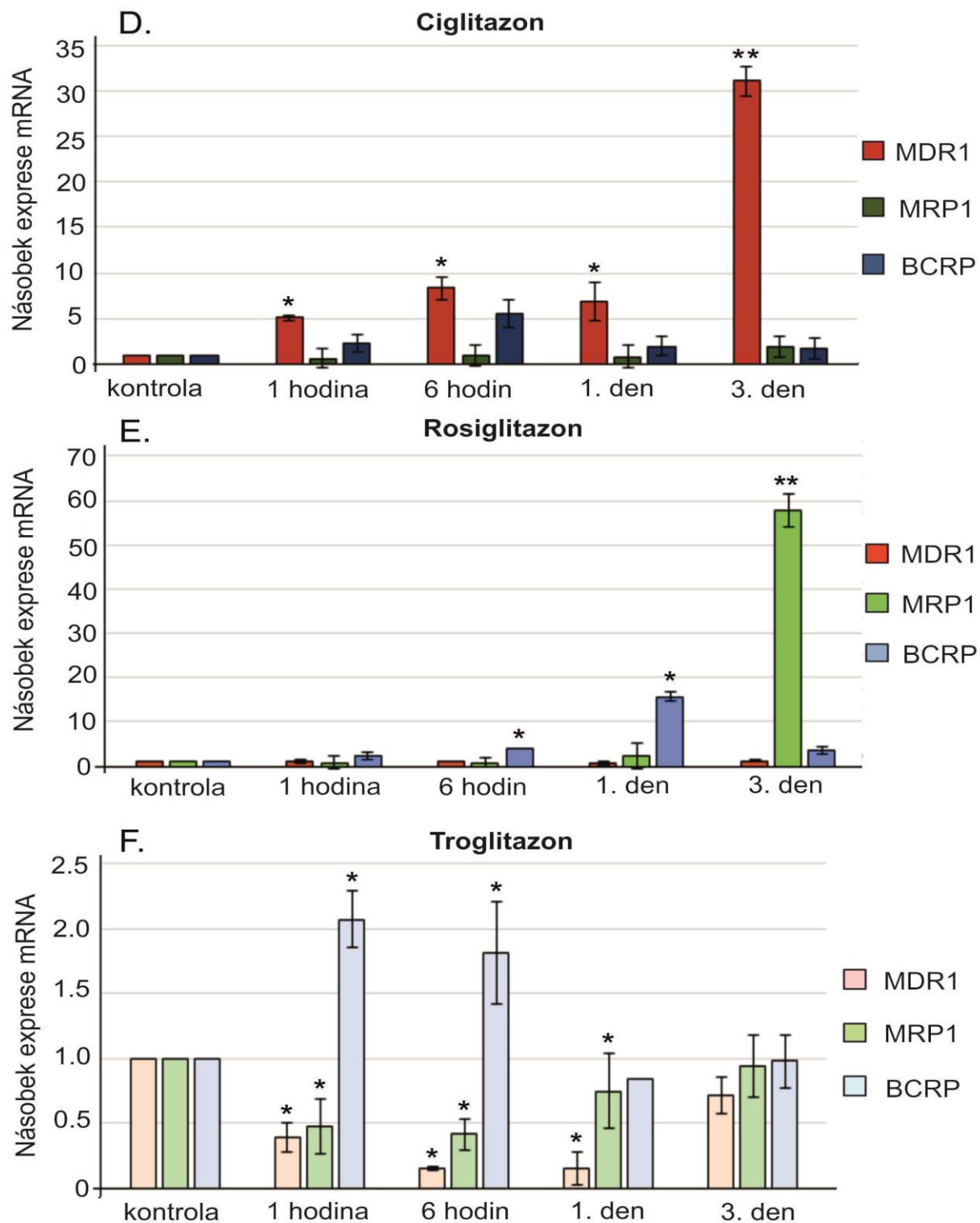


Obrázek č. 30: Amplifikační křivky kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (qRT-PCR). Produkty amplifikace genu MDR1 a  $\beta$ -aktinu.



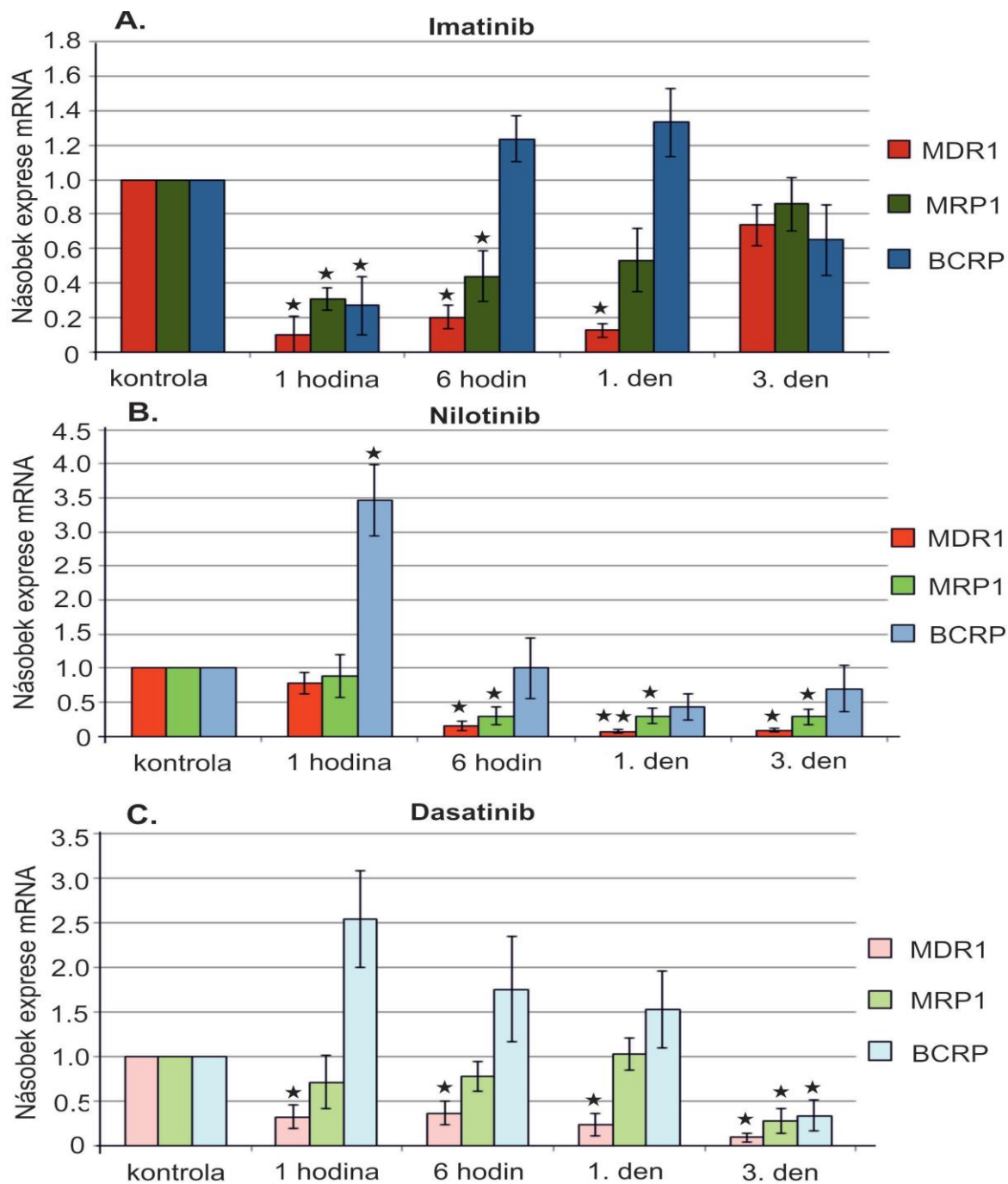
Graf č. 4: qRT-PCR pro MDR1, MRP1 a BCRP u buněk A549 ovlivněných A: Ciglitazonem, B: Rosiglitazonem, C: Troglitazonem

Výsledné hodnoty získané pomocí qRT-PCR jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole. Hladina mRNA jednotlivých ABC transportérů je vztažena k transkripční hladině „house-keeping“ genu ACTB (beta aktin), hodnoty jsou průměrem 2 nezávislých experimentů. Statisticky významná změna exprese ABC transportérů oproti kontrole ( $P < 0,05$ ) je označena (\*), ( $P < 0,01$ ) je označena (\*\*).



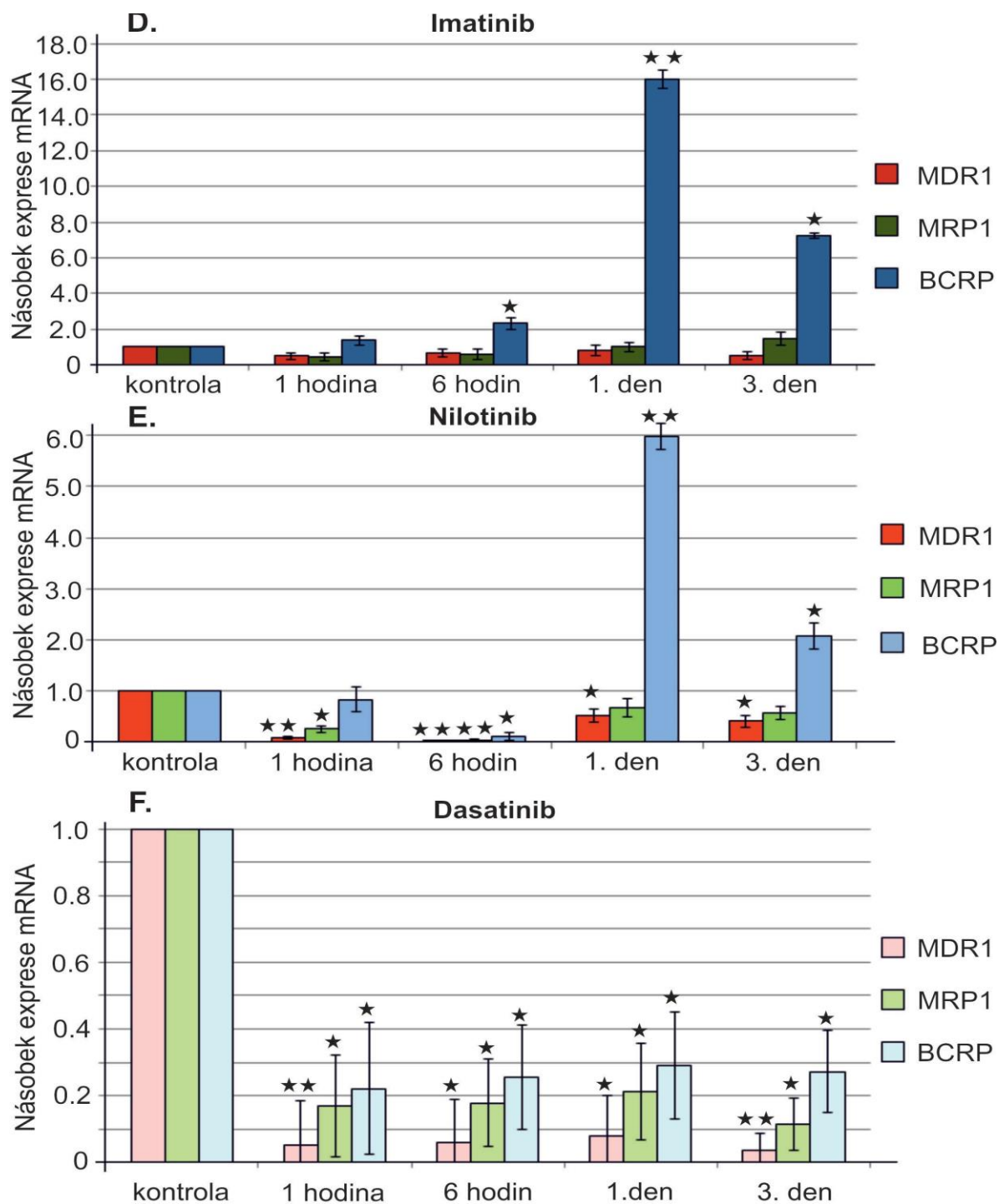
Graf č. 5: qRT-PCR pro MDR1, MRP1 a BCRP u buněk HEK293 ovlivněných A: Ciglitazonem, B: Rosiglitazonem, C: Troglitazonem

Výsledné hodnoty získané pomocí qRT-PCR jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole. Hladina mRNA jednotlivých ABC transportérů je vztažena k transkripční hladině „house-keeping“ genu ACTB (beta aktin), hodnoty jsou průměrem 2 nezávislých experimentů. Statisticky významná změna exprese ABC transportérů oproti kontrole ( $P < 0,05$ ) je označena (\*), ( $P < 0,01$ ) je označena (\*\*).



Graf č. 6: qRT-PCR pro MDR1, MRP1 a BCRP u buněk A549 ovlivněných A: Imatinibem, B: Nilotinibem, C: Dasatinibem

Výsledné hodnoty získané pomocí qRT-PCR jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole. Hladina mRNA jednotlivých ABC transportérů je vztažena k transkripční hladině „house-keeping“ genu ACTB (beta aktin), hodnoty jsou průměrem 2 nezávislých experimentů. Statisticky významná změna exprese ABC transportérů oproti kontrole ( $P < 0,05$ ) je označena (\*), ( $P < 0,01$ ) je označena (\*\*).



Graf č. 7: qRT-PCR pro MDR1, MRP1 a BCRP u buněk HEK293 ovlivněných D: Imatinibem, E: Nilotinibem, F: Dasatinibem

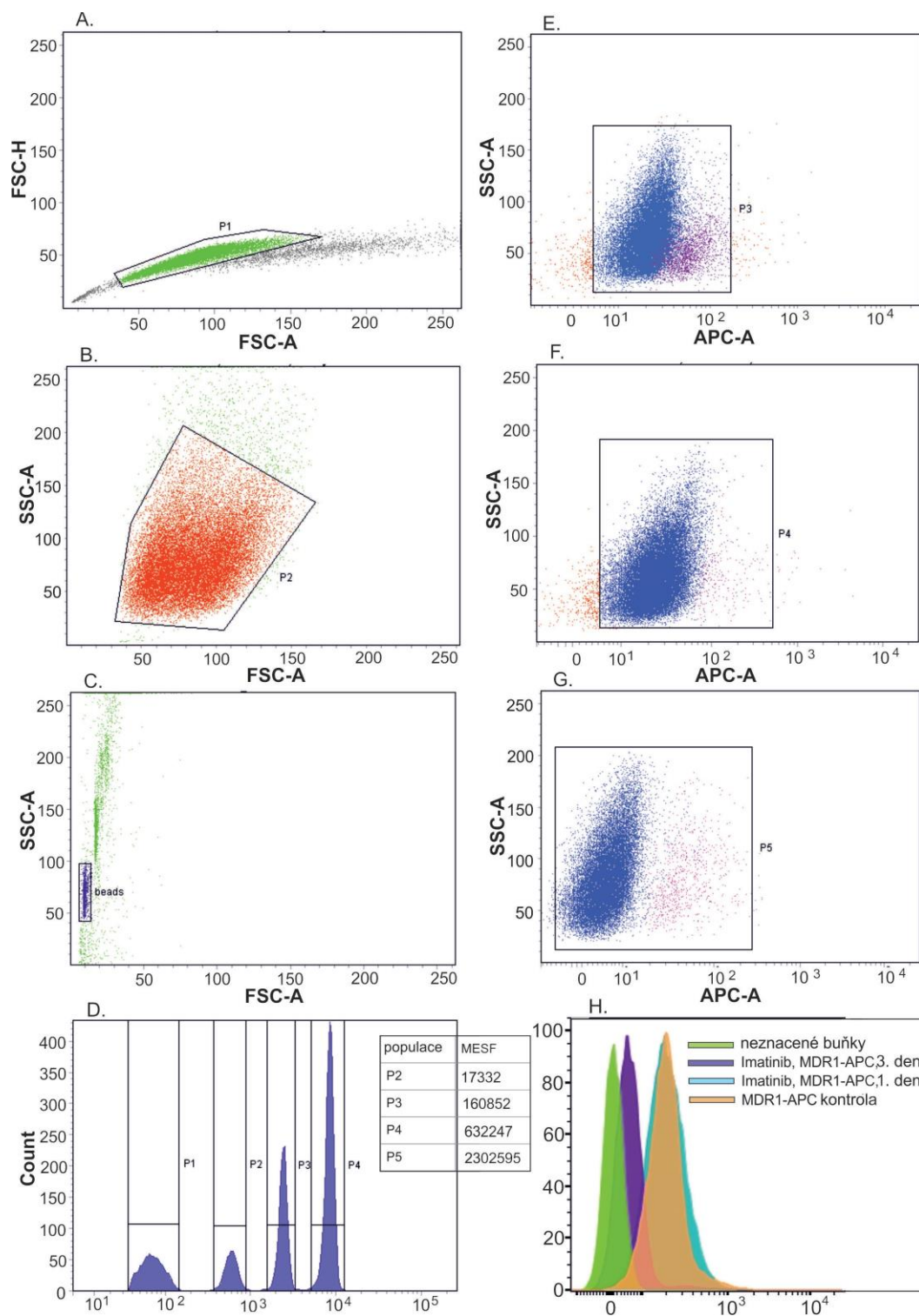
Výsledné hodnoty získané pomocí qRT-PCR jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole. Hladina mRNA jednotlivých ABC transportérů je vztažena k transkripční hladině „house-keeping“ genu ACTB (beta aktin), hodnoty jsou průměrem 2 nezávislých experimentů. Statisticky významná změna exprese ABC transportérů oproti kontrole ( $P < 0,05$ ) je označena (\*), ( $P < 0,01$ ) je označena (\*\*).



## **7.4 Vliv agonistů PPAR- $\gamma$ a TKIs na expresi ABC transportérů odpovědných za MDR na úrovni proteinů u modelové buněčné linie A549**

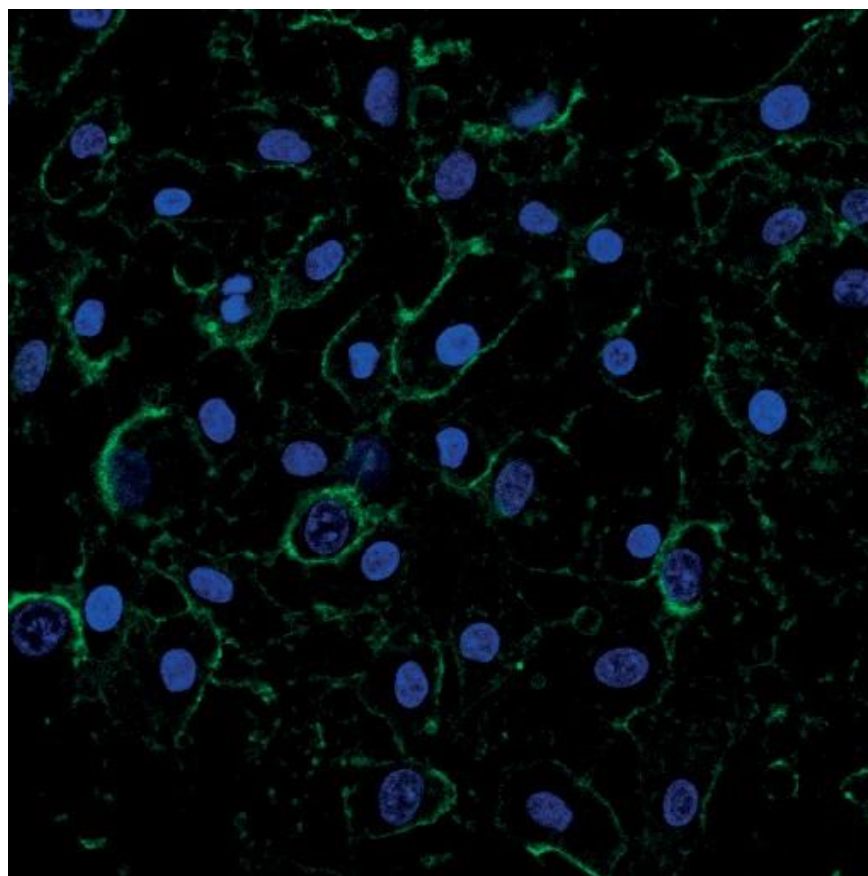
Aby se zjistil účinek vlivu agonistů PPAR- $\gamma$  a TKIs na expresi transportérů MDR1, MRP1 a BCRP na úrovni proteinů, byla použita průtoková cytometrie. Expze proteinů je vyjádřena v jednotkách MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome).

Všechny tři TKIs výrazně snižují expresi transportéru MDR1 ve 3. dni od ovlivnění (nejvýraznější pokles expze je zaznamenán po použití nilotinibu a to z 63 628 na 9 900 MESF). Expze transportéru MRP1 se rovněž mírně snižuje, naopak expze transportéru BCRP s rostoucí délkou kultivace buněk se zvyšuje – přehledně zobrazeno v grafu č. 6. Příklad gatování buněk je znázorněn ve schématu č. 1.

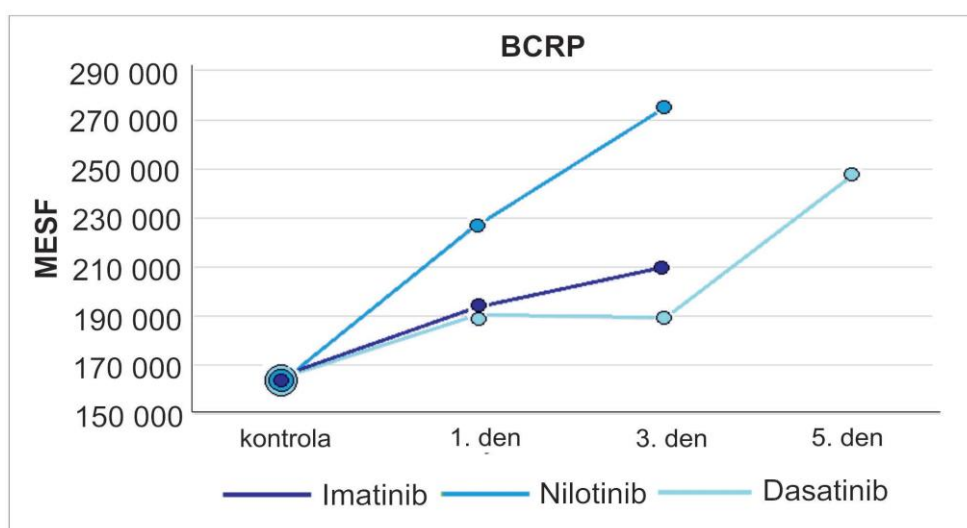
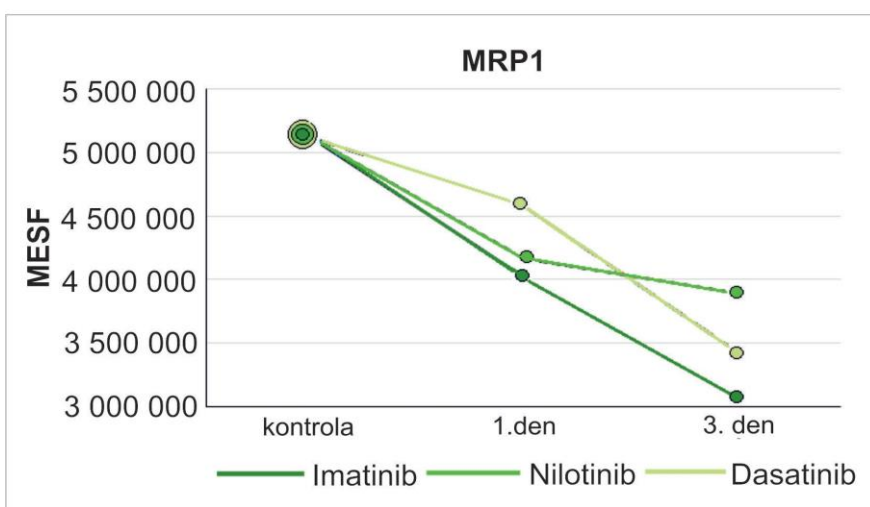
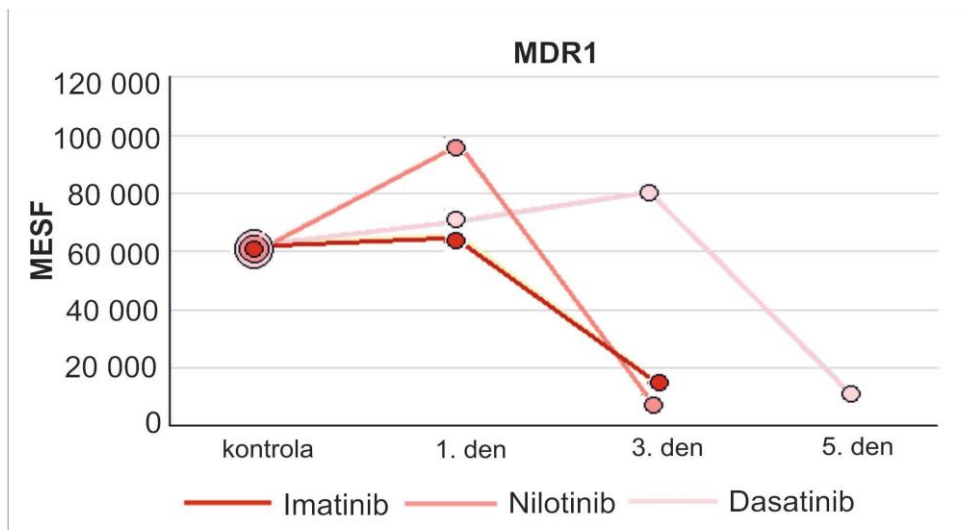


**Schéma č. 1: Gating A549 značených MDR1-APC buněk po ovlivnění imatinibem** A: Buňky A549 značené MDR1-APC byly gatovány na histogramu forward-scatter height (FSC-H) vs. forward-scatter area (FSC-A). B: Gating stejných buněk na histogramu side-scatter area (SSC-A) vs. forward-scatter area (FSC-A). C: Kalibrační mikročástice (pro MESF jednotky) byly gatovány na histogramu side-scatter area (SSC-A) vs. forward-scatter area (FSC-A). D: Jejich střední intenzita fluorescence (MFI) byla měřena na jednoparametrovém histogramu. Dot ploty znázorňují expresi MDR1 transportéru u E: kontrolních neovlivněných buněk, F: buněk po 1. dnu od ovlivnění imatinibem, G: buněk po 3. dnu od ovlivnění imatinibem, G: porovnání exprese MDR1 transportéru u všech zkoumaných populací.

Expres transportéru MRP1 u buněk A549 byla potvrzena pomocí přímé imunofluorescence – viz obrázek č. 31.



*Obrázek č. 31: Imunofluorescenční značení transportéru MRP1 pomocí protilátky značené fluoroforem PE (clone HI9a; Biolegend) u A549 buněk. Jádra jsou značena DAPI. Zv.400×*

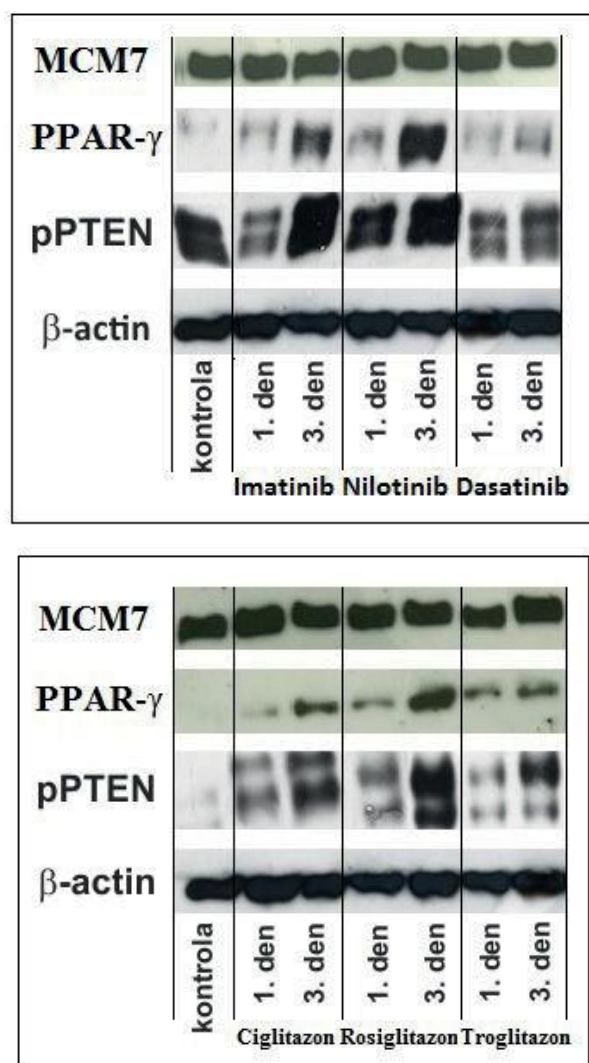


**Graf č. 8: Expres proteinů MDR1, MRP1 a BCRP u A549 buněk ovlivněných TKIs**  
 Mediány hodnot intenzity fluorescence byly převedeny do MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) jednotek.

## 7.5 Možnosti regulace exprese ABC transportérů odpovědných za MDR pomocí aktivace proteinů PPAR- $\gamma$ /PTEN

Pro pochopení úlohy proteinů PPAR- $\gamma$ /PTEN v procesu regulace exprese ABC transportérů odpovědných za MDR byla pomocí westernového přenosu detekována exprese proteinů PPAR- $\gamma$  a fosforylovaného PTEN (na aminokyselinách Ser380/Thr382/Thr383) po ovlivnění TKIs a agonisty PPAR- $\gamma$ .

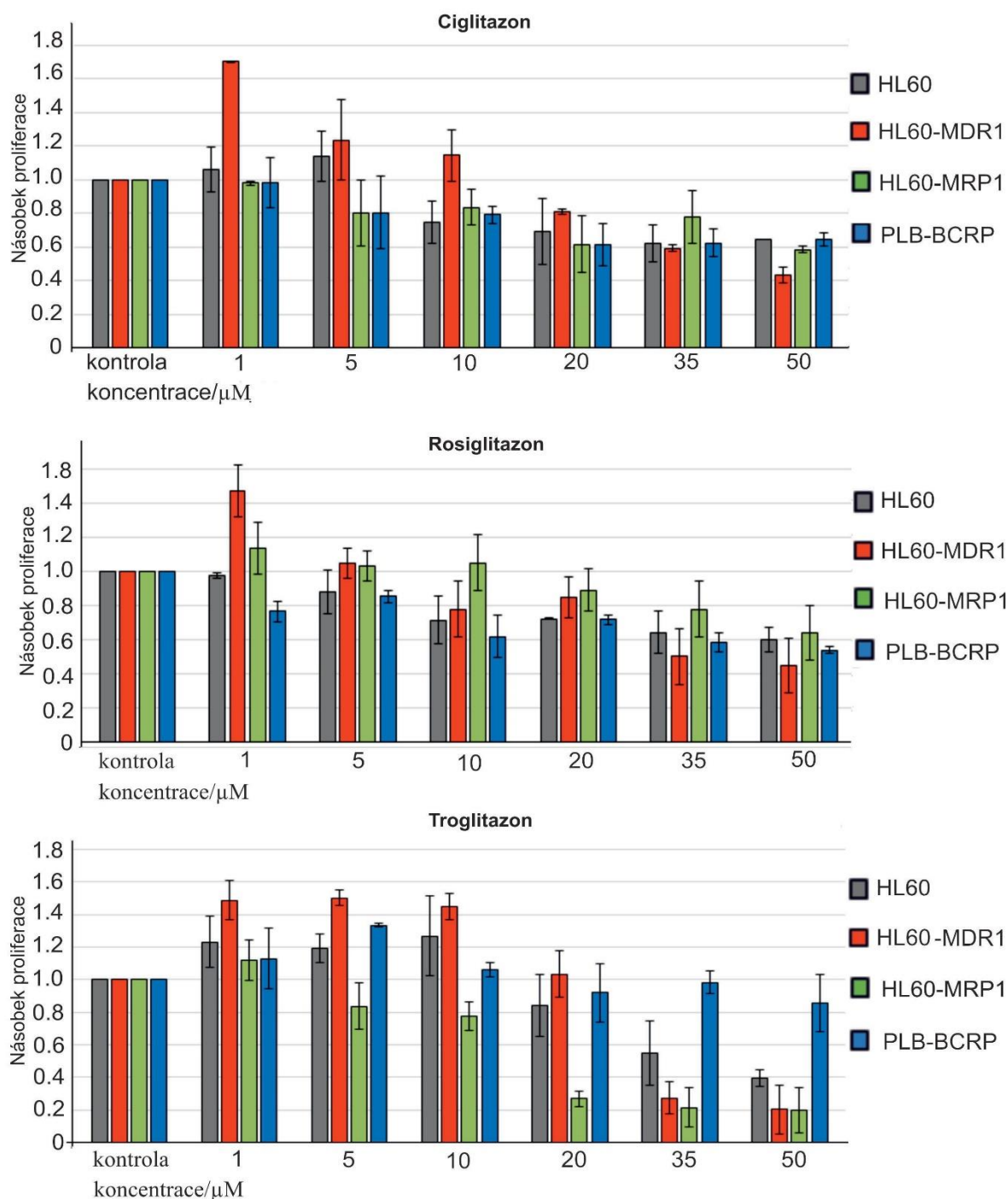
Ve 3. dnu po ovlivnění TKIs a agonisty PPAR- $\gamma$  je pozorován nárůst exprese PPAR- $\gamma$  a fosforylované formy pPTEN. Ukazuje se, že PPAR- $\gamma$ /PTEN jsou negativními regulátory exprese ABC transportérů odpovědných za MDR.



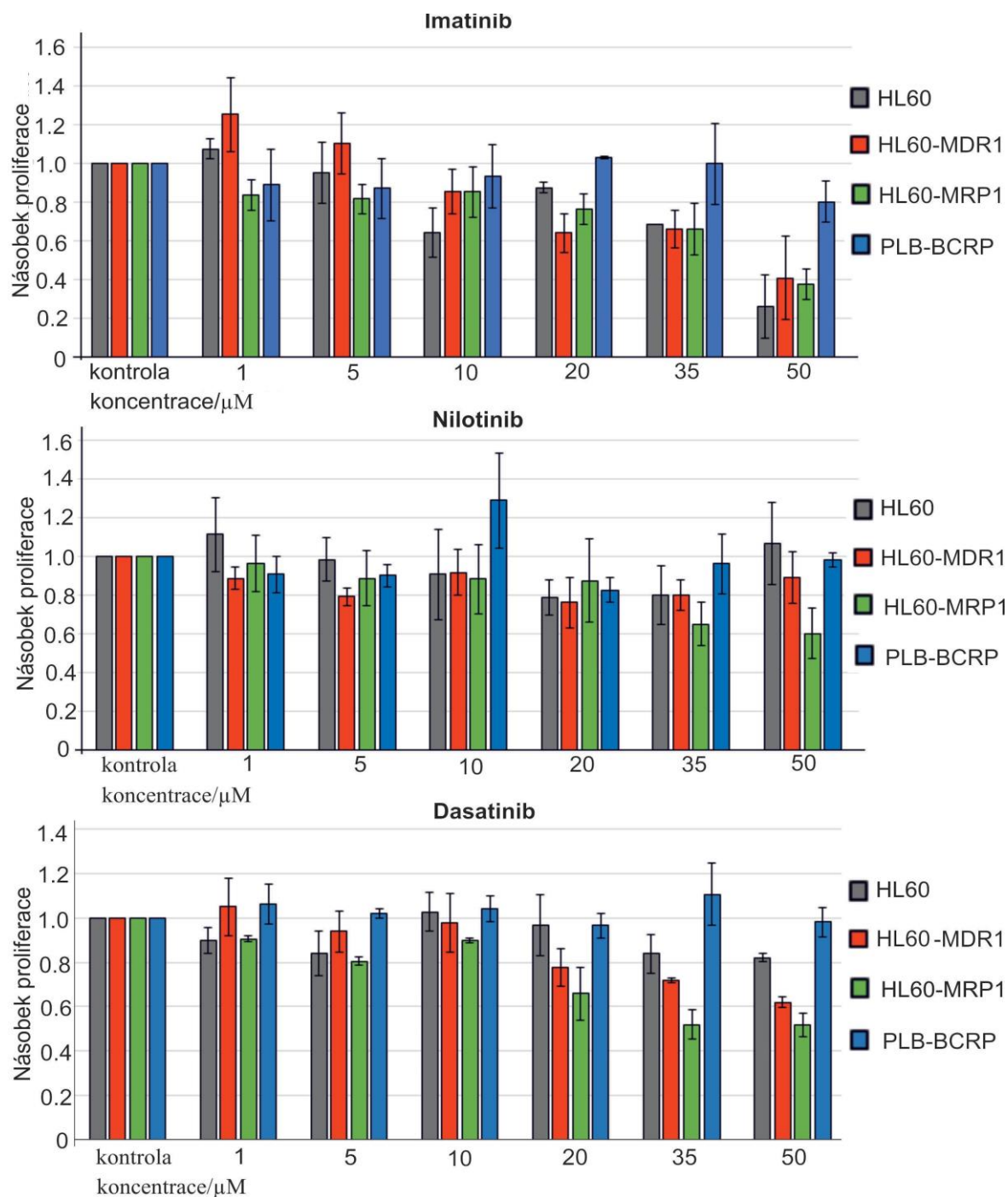
Obrázek č. 32: Detekce PPAR $\gamma$  a pPTEN v buňkách A549 po působení TKIs a agonistů PPAR $\gamma$ . Výsledky jsou ilustrační obrázky ze dvou opakování experimentu. Lyzáty byly zhotoveny po jednom a třech dnech inkubace se zkoumanými látkami. Beta actin a MCM7 slouží jako kontrola stejného množství proteinů ve vzorku.

## 7.6 Afinita TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$ k jednotlivým transportérům

Pomocí testu životaschopnosti WST-1 byla stanovena substrátová afinita TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$  k transportérům MDR1, MRP1 a BCRP. Tento experiment byl prováděn na leukemické buněčné linii HL-60 s mizivým množstvím ABC transportérů a na transfekovaných buněčných liniích exprimujících jeden ze studovaných transportérů (HL-60-MDR1, HL-60-MRP1, PLB-BCRP).



Graf č. 9: Test životaschopnosti WST-1 pro agonisty PPAR- $\gamma$  u buněk HL60, HL60-MDR1, HL60-MRP1, HL60-BCRP. Výsledné hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých experimentů a jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole.



**Grafč. 10: Test životaschopnosti WST-1 pro TKIs u buněk HL60, HL60-MDR1, HL60-MRP1, HL60-BCRP. Výsledné hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých experimentů a jsou normalizovány vzhledem k neovlivněné kontrole.**

Předpokládá se, že vliv agonistů PPAR- $\gamma$  (164) nebo inhibice TK pomocí TKIs zpomalí proliferaci buněk. Proto buňky s vysokou expresí transportérů, které transportují danou látku, by měly růst rychleji, než kontrolní buňky HL60.

Množství buněk HL60-MDR1 v přítomnosti 1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M imatinibu je 126 % a 110 % (kontrolních buněk HL60 je 108 % a 95 %). Množství buněk PLB-BCRP v přítomnosti 20  $\mu$ M imatinibu je 109 % (kontrolních buněk HL60 je 88 %), v přítomnosti 10  $\mu$ M nilotinibu je 129 % (kontrolních buněk HL60 je 88 %). Množství buněk HL60-MDR1 v přítomnosti 1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M dasatinibu je 106 % a 94% (kontrolních buněk HL60 je 90 % a 84 %), množství buněk PLB-BCRP v přítomnosti 35  $\mu$ M dasatinibu je 111 % (kontrolních buněk HL60 je 84 %).

Z grafů č. 9 a 10 vyplývají následující závěry: Imatinib je substrátem transportéru MDR1 a BCRP, nilotinib je substrátem transportéru BCRP. Dasatinib je substrátem transportéru BCRP a v menší míře substrátem transportéru MDR1. Ciglitazon je substrátem transportéru MDR1. Rosiglitazon je substrátem transportéru MDR1 a MRP1. Troglitazon je substrátem transportéru MDR1 a BCRP.

Tyto výsledky jsou přehledně shrnuty v tabulce č. 14.

*Tabulka č. 14: Afinity zkoumaných ABC transportérů k testovaným látkám*

zkoumaná látka		transportéry		
		MDR1	MRP1	BCRP
TKIs	<b>imatinib</b>	ano	-	ano
	<b>nilotinib</b>	-	-	ano
	<b>dasatinib</b>	ano	-	ano
agonisté PPAR- $\gamma$	<b>ciglitazon</b>	ano	-	-
	<b>rosiglitazon</b>	ano	ano	-
	<b>troglitazon</b>	ano	-	ano



## 8. Diskuze

Důležitou předností embryonálních buněk je jejich jasná rezistence ke xenobiotikům zajišťující přirozenou ochranu embrya proti cizím škodlivým látkám. Tato fyziologická vlastnost je dána především díky vysoké expresi ABC transportérů, které aktivně přenášejí substráty proti koncentračnímu spádu do extracelulární matrix. Vlastností nádorových buněk se podobají vlastnostem buněk embryonálních (díky zpětné dediferenciaci během kancerogeneze), a proto obdobně nádorové buňky jsou schopny aktivně vylučovat cytotoxické léčiva a odolávat tak jejich účinku.

Doposud nebyla popsána exprese transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních tkáních lišících se dále ještě stádiem IUV. Pouze Kalken a kol. zaznamenal distribuci transportéru MDR1 v 9 embryonálních/fetálních tkáních (149) a také pár dalších studií popisuje expresi některých ABC transportérů v průběhu ontogenetického vývoje myši (150, 151).

V této práci pomocí nepřímé dvoustupňové metody byla provedena imunohistochemická detekce transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v embryonálních/fetálních orgánech lišících se dále ještě stádiem IUV. Jednalo se o orgány účastnící se absorpčních, distribučních a exkrečních procesů a to střeva, játra a ledviny.

Transportér MDR1 byl lokalizován v apikální části cytoplazmatické membrány enterocytů, žlučových kanálků a v tubulárním systému ledvin (zejména v proximálních tubulech). Enterocyty byly pozitivní od 12. týdne IUV. Tento poznatek se shoduje s pozorováním Kalkena a kol., který ve střevním epitelu zaznamenal slabou membránovou pozitivitu tohoto transportéru v období od 11. do 20. týdne IUV. Kromě toho také pozoroval expresi transportéru MDR1 v proximálních tubulech ledvin, avšak exprese tohoto transportéru v Bowmanově váčku v období od 11. do 13. týdne IUV potvrzena nebyla. Kalken pozoroval expresi tohoto transportéru také ve žlučových kanálcích od 14. týdne IUV, avšak v našich tkáních jsme zaznamenali pozitivitu dřív, a to už od 9. týdne IUV (čili v době, kdy se žlučové kanálky začínají formovat). Rosati a kol. studovali expresi transportérů *mdr1a* a *mdr1b* (myši analogy transportérů *Mdr1*) na úrovni transkripce v pěti orgánech u 15-denních potkaních zárodků a taky u potkanů v postnatálním období do 8. měsíce. Zaznamenali v ledvinách zvýšenou expresi transkriptu *mdr1a* a *mdr1b* v 6. dni, v játrech zvýšenou expresi transkriptu *mdr1b* rovněž v 6. dni a transkriptu *mdr1a* ve 20. dni. Později u 5-měsíčních potkanů zaznamenali v játrech sníženou hladinu transkriptu *mdr1a*, ve všech studovaných orgánech zaznamenali od 5. měsíce sníženou hladinu transkriptu *mdr1b* (150). Cui a kol. zaznamenali nízkou hladinu transkriptu *mdr1b* v myších ledvinách v postnatálním období před dosažením 10. dne, tato hladina později stoupla do dosažení 30. dne (151).

Transportér MRP1 byl do 6. týdne IUV slabě exprimován v cytoplazmatické membráně a cytoplazmě epitelu střevních klků, později od 9. týdne IUV byl tento transportér detekován v bazální části klků, kde se nachází ještě nediferencované enterocyty. Od 7. týdne byla

zaznamenána slabá pozitivita v jádrech některých enterocytů, od 9. týdne se jaderná pozitivita enterocytů přesunula do apikální části střevních klků. Tento transportér byl rovněž exprimován v jádrech hepatocytů od 10. do 17. týdne IUV. Předpokládáme, že jaderná pozitivita v hepatocytech vyskytující se v tomto období může souviset s jaterní hematopoézou probíhající ve stejném čase. Transportér MRP1 byl hojně exprimován v tubulárním systému ledvin (zejména v proximálních tubulech) a také v některých renálních tělískách. Rosati a kol. nezaznamenali žádný rozdíl v expresi transkriptu *mrp1* v pěti různých orgánech během ontogeneze potkana. Avšak v játrech v postnatálním období v 8. měsíci a v ledvinách v 5. a 8. měsíci u potkanů byla hladina exprese signifikantně nižší (150). Většina studií popisuje výskyt tohoto transportéru v bazolaterální membráně polarizovaných buněk, avšak v našich tkáních jsme zaznamenali jadernou pozitivitu v některých embryonálních/fetálních enterocytech a hepatocytech. Tento jev může být zřejmě způsoben přítomností transportéru MRP1 na jaderné membráně nebo na membránách perinukleárních organel.

Transportér BCRP byl exprimován v cytoplasmě a cytoplazmatické membráně v časném období vývoje (do 8.5 týdne IUV) střevního epitelu. Ve starších embryích byla pozitivita nalezena v bazální části střevních klků, kde se nachází ještě nediferencované enterocyty. Slabá exprese byla zaznamenána v jádrech hepatocytů v období od 10 do 11. týdne IUV, zřetelná exprese byla pozorována v tubulárním systému ledvin (obzvláště v proximálních tubulech) a také v některých renálních tělískách.

ABC transportéry v dospělých zdravých tkáních mají řadu fyziologických funkcí. Jejich hlavní úlohou je transport širokého spektra molekul včetně xenobiotik (např. v játrech). Studie na „knokautovaných“ myších potvrzují úlohu ABC transportérů také v orální absorpci látek, v hepatobiliární sekreci (165) a v reabsorpci vody ve sběrných kanálcích ledvin (166). ABC transportéry (obzvláště pak BCRP) jsou přítomny v syncytiotrofoblastu placenty, kde tvoří důležitou obrannou bariéru vyvíjejícího se embrya (40, 79, 80). Byla prokázána zvýšená exprese ABC transportérů v hypoxických podmínkách. Je známo, že embryo se vyvíjí za podmínek fyziologické hypoxie. V odpovědi na hypoxii dochází u hematopoetických kmenových buněk k aktivaci transportéru BCRP skrze transkripční faktor HIF-1, která má za následek snížení akumulace hemu a porfyrinu vedoucí k poškození mitochondrií (95). Aktivace ABC transportérů může být tedy strategií umožňující přežití embrya v podmínkách s nízkým obsahem kyslíku (96).

Dále byl v této práci studován význam signální dráhy PI3K/Akt v regulaci exprese transportérů MDR1, MRP1 a BCRP pomocí inhibitorů tyrozin kináz (TKIs) a receptorů aktivovaných proliferátory peroxizómů (PPARs). Nejdřív pomocí testu životaschopnosti WST-1 bylo ověřováno, zda jsou vybrané testované látky substráty studovaných transportérů. Využili jsme k tomu standardní buňky HL60 a transfekované buňky HL-60 obsahující jeden ze studovaných transportérů (HL60-MDR1, HL-60-MRP1, PLB-BCRP). Tato studie byla provedena kvůli nejednotným údajům v literatuře. Imatinib, obzvláště v koncentraci 1-5  $\mu\text{M}$ , byl úspěšně transportován z buněk HL60-MDR1, proto se jeví jako substrát tohoto transportéru. Tuto interakci rovněž potvrzují studie Hegedus a kol. a Hamada a kol. (167, 168). Mahon a kol. prokázali, že transportér MDR1 zprostředkovává rezistenci k imatinibu

*in vitro* (169), a Lima a kol. díky umlčení genů kódující transportér pomocí siRNA obnovili citlivost buněk chronické myeloidní leukémie k imatinibu (170). Buňky HL60-BCRP také transportovaly imatinib a to dokonce i při koncentraci v rozmezí 1–50  $\mu\text{M}$ . I když Shuklal a kol. tvrdí, že tento process je účinný pouze v koncentracích nižších než 1  $\mu\text{M}$  (171), Burger a kol. prokázali, že buňky MCF7/MR, MCF7/AdVp-3000 a také HEK293 transfekované genem pro pumpu BCRP, transportovaly imatinib i při vyšších koncentracích (172). Podle Brendela a kol. imatinib nasedá na substrát vázající místo transportéru BCRP a stimuluje ATP-ázovou aktivitu (173).

Nilotinib a dasatinib byly také transportovány z buněk HL60-BCRP a zdají se být silnými substráty transportéru BCRP. Dasatinib byl transportován z buněk HL60-MDR1 ve stejném rozmezí koncentrací jako imatinib (1–5  $\mu\text{M}$ ), ve vyšších koncentracích docházelo ke snížení množství živých buněk. Nilotinib jako jediný TKIs nebyl buňkami HL60-MDR1 transportován vůbec. Tento poznatek se shoduje s tvrzením Hegedus a kol. kteří pomocí HPLC-MS studovali akumulaci TKIs v buňkách K562-ABCB1 a K562-ABCG2. Prokázali, že nilotinib byl efektivně pumpován pouze transportérem BCRP, kdežto dasatinib byl pumpován jak transportérem BCRP tak MDR1. Nilotinib však může stimulovat ATP-ázovou aktivitu transportérů MDR1 a BCRP (největší stimulace ATP-ázy pro transporter MDR1 zaznamenali při koncentraci 500 nM, pro transportér BCRP při koncentraci 25 nM) (174).

TKIs nejsou substráty transportéru MRP1, v přítomnosti těchto látek nebylo pozorováno zvýšené množství buněk HL60-MRP1 ve srovnání s množstvím buněk v kontrolním vzorku.

Pomocí testu životaschopnosti WST-1 byla rovněž stanovena koncentrace IC<sub>50</sub> tří klinicky používaných TKIs: imatinibu, nilotinibu a dasatinibu a tří agonistů PPAR- $\gamma$ : ciglitazonu, rosiglitazonu a troglitazonu u buněčných linií HEK293 a A549. Je zajímavé, že zjištěná koncentrace IC<sub>50</sub> dasatinibu je v řádu nM, kdežto koncentrace IC<sub>50</sub> imatinibu a nilotinibu je v řádu  $\mu\text{M}$ . Ve srovnání - Šimara a kol. k ovlivnění buněk K562 a k následnému měření intracelulární koncentrace TKIs použili imatinib v koncentraci 2,5 a 32,5  $\mu\text{M}$  a dasatinib v koncentraci 1 a 100 nM (175).

Dále byl pomocí kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (qRT-PCR) a pomocí průtokové cytometrie studován vliv TKIs a agonistů PPAR- $\gamma$  na transkripci a na translaci transportérů MDR1, MRP1 a BCRP. Z agonistů PPAR- $\gamma$  rosiglitazon a troglitazon účinně inhibovali expresi mRNA transportéru MDR1. Davies a kol. rovněž prokázali, že troglitazon snížil expresi transportéru MDR1 a obnovil rezistenci k doxorubicinu u buněk MCF7 a buněk K562 (136). Byla pozorována snížená exprese transportéru MDR1 jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů po ovlivnění TKIs. Naproti tomu exprese transportéru BCRP se zvýšila. U buněk A549 (s vysokou endogenní expresí ABC transportérů) došlo dále ještě ke zvýšení exprese mRNA transportéru BCRP, a to (rychleji než u buněk HEK293) už po 1. hodině od ovlivnění nilotinibem a dasatinibem a po 6. hodině od ovlivnění imatinibem. U buněk HEK293 k této zvýšené expresi došlo později a to po 1. dni od ovlivnění imatinibem a dasatinibem. Zvýšená (17-násobně) exprese transportéru BCRP byla rovněž zaznamenána po dlouhodobém (do 100 dní) působení imatinibu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  u buněčné linie Caco2. Tato zvýšená exprese se projevila dvakrát, a to po 3. dni a po 25. dni (176).

Detailní analýza cis-regulační oblasti transportéru BCRP prokázala vazebná místa pro některé transkripční faktory (např. XRE, HRE, ARE), které se aktivují během stresu (177). Na základě práce Nakanishi a kol. (kteří porovnali vliv imatinibu na expresi transportéru BCRP u pozitivních a negativních buněk BCR-ABL), usuzujeme, že inhibice exprese BCRP může být úspěšnější u buněk s BCR-ABL translokací (178). Tato otázka však vyžaduje ještě detailnější zkoumání.

Pomocí metody western blotting byly rovněž pozorovány změny v expresi proteinů souvisejících se signální dráhou PI3K/Akt a to: nádorového supresoru PTEN a receptoru PPAR- $\gamma$ . PTEN fyziologicky inhibuje signální dráhu PI3K/Akt pomocí defosforylace fosfatidylinozitol 3,4,5 trisfosfátu fosforylovaného s účastí PI3K (101). Bylo prokázáno, že specifický inhibitor PI3K (LY294002) inhiboval rezistenci k vinkristinu, který byl transportován pomocí pumpy MDR1 u buněk L1210/VCR (179). V našich experimentech byla zaznamenána zvýšená exprese fosforylovaného PTEN ve 3. dnu od ovlivnění a to jak agonisty PPAR- $\gamma$ , tak TKIs. Tato skutečnost potvrzuje, že zkoumané látky inhibují díky aktivaci PTEN signální dráhu PI3K/Akt.

Inhibitory TKIs jsou selektivní léčiva působící specificky proti řadě tyrozin kináz, avšak překážkou jejich účinku je schopnost nádorových buněk vytvářet rezistenci vůči těmto cíleným léčivům. Tato rezistence je způsobena zvýšenou expresí ABC transportérů, zejména MDR1 a BCRP, které nejčastěji transportují TKIs a snižují tak jejich cílené působení v buňce.

V experimentech této práce byla zaznamenána snížená exprese transportérů MDR1 a MRP1 po působení zmíněných TKIs. Ovšem v klinické praxi lze doporučit použití pouze některých inhibitorů. Koncentrace imatinibu, při které je exprese transportérů jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů inhibována činí až 24  $\mu\text{M}$  u buněčné linie A549, tedy lék v této koncentraci není v klinické praxi použitelný vzhledem k jeho vysoké cytotoxicitě. Pro srovnání - u pacientů s CML při standartně podávaném imatinibu se jeho koncentrace v plazmě pohybuje v rozmezí 0,3-5,5  $\mu\text{M}$ , a u pacientů s kompletní molekulární odpovědí užívajících 600 mg imatinibu denně je průměr této koncentrace 2,7  $\mu\text{M}$  (180). Oproti tomu použití nilotinibu a zejména dasatinibu se jeví jako klinicky přijatelné. Na příklad - koncentrace nilotinibu v plazmě u pacientů užívajících 2x denně 400 mg tohoto léku je 1,7 - 3,7  $\mu\text{M}$  (181).

Byl zjištěn také nežádoucí opačný jev, a to u transportéru BCRP: studované TKIs aktivují expresi tohoto transportéru na úrovni mRNA a na úrovni proteinů, zejména v buňkách s vysokou endogenní expresí této pumpy (jedině dasatinib inhiboval expresi transportéru BCRP, a to na úrovni mRNA). V klinické praxi by se proto před podáváním TKIs měla zohlednit skutečnost, zda-li nebyla zjištěna vysoká endogenní exprese transportéru BCRP.

Práce ukazuje také možnost využití pro inhibici transportéru MDR1 agonistů PPAR- $\gamma$  rosiglitazonu a troglitazonu. Jejich podávání by mohlo přispět k zabránění vzniku rezistence (předcházení vzniku rezistence je první strategií pro zefektivnění terapie), aplikovali by se agonisté PPAR- $\gamma$  samostatně anebo spolu s chemoterapeutiky (se zde studovanými TKIs i s některými jinými).

## 9. Závěry

- Lokalizace transportérů MDR1, MRP1 a BCRP v jednotlivých embryonálních/fetálních tkáních blíže specifikuje úlohu těchto transportérů v obraně vyvíjejícího se zárodku před xenobiotiky. Vysoká exprese všech těchto tří ABC transportérů je nalezena v enterocytech střevních klků a v tubulárním systému ledvin (zejména v proximálních tubulech), transportéru MDR1 ve vyvíjejících se žlučových kanálcích, transportérů MRP1 a BCRP v hepatocytech (zejména v období hematopoézy).
- TKIs a agonisté PPAR- $\gamma$  jsou vskutku substráty ABC transportérů, zejména pump MDR1 a BCRP. Proto mohou být agonisté PPAR- $\gamma$  a TKIs transportovány ven z buněk, které nadměrně exprimují tyto pumpy.
- Je vysledována negativní regulace exprese transportérů MDR1 a MRP1 pomocí aktivace receptoru PPAR- $\gamma$ , který následně aktivuje nádorový supresor PTEN jako součást signální dráhy PI3K/Akt. Tato regulace je pozorována nejen působením samotných agonistů PPAR- $\gamma$ , ale také působením inhibitorů tyrozin kináz (TKIs), které zasahují „upstream“ od zmíněného supresoru PTEN.
- Rosiglitazon a troglitazon (agonisté PPAR- $\gamma$ ) inhibují expresi transportéru MDR1 na úrovni mRNA. TKIs mění expresi transportérů MDR1, MRP1 a BCRP jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů. Při srovnání všech inhibitorů se zdá nejúčinnější dasatinib. Na úrovni mRNA dasatinib účinně inhibuje expresi transportérů MDR1 a MRP1 u buněčných linií HEK293 a A549 až do 3. dne od ovlivnění, jediné exprese transportéru BCRP u buněčné linie A549 po 1. hodině naroste (2,54-násobek). Na úrovni proteinů dasatinib dobře inhibuje expresi ve 3. dni od ovlivnění u transportéru MDR1, trochu méně u transportéru MRP1.
- Expresi transportéru BCRP se daří inhibovat pouze pomocí dasatinibu u buněk HEK293. V ostatních případech exprese tohoto transportéru u buněk A549 (s vysokou endogenní expresí ABC transportérů) roste už po 1. a 6. hodině od ovlivnění, u buněk HEK293 (s velmi nízkou endogenní expresí ABC transportérů) roste až po 1. dnu od ovlivnění. Tento nárůst exprese může být zapříčiněn přítomností vazebných míst v cis-regulační oblasti pro transkripční faktory XRE, HRE, ARE, které ve stresových podmínkách zvyšují expresi tohoto transportéru.

## Seznam zkratek:

A549	buněčná linie odvozená z epiteliálních buněk nemalobuněčného plicního karcinomu
ABC	ATP vážící kazetu ( <i>ATP Binding Casette</i> )
ABCP	ABC protein exprimovaný v placentě ( <i>an ABC Transporter Expressed in the Placenta</i> )
AF-2	aktivační funkce závislá na vazbě ligandu ( <i>Ligand-Dependent Activation Function 2</i> )
Akt	proteinkináza B ( <i>Protein kinase B</i> )
APC	allofykocyanin ( <i>Allophycocyanin</i> )
ARE	( <i>Antioxidant response element</i> )
ATP	adenozin trifosfát ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
BCRP	protein rezistence rakoviny prsu ( <i>Breast Cancer Resistance Protein</i> )
Bcrp <sup>-/-</sup>	myši s “knockoutovaným” genem kódujícím BCRP
CaCo2	buněčná linie odvozená z nádoru tlustého střeva
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
c-kit TK	tyrozin kináza receptoru pro c-kit
CML	chronická myeloidní leukemie
DAPI	( <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DBD	DNA-vázající doména ( <i>DNA Binding Domain</i> )
ddH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DR-1	element přímého opakování 1 ( <i>Direct Repeat 1 Elements</i> )
DMEM	buněčné kultivační médium ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ES	embryonální kmenové buňky ( <i>Embryonal Stem Cells</i> )
FITC	Fluorescein-iso-thio-kyanát ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
FSC-A	( <i>Forward-scatter area</i> )
FSC-H	( <i>Forward-scatter high</i> )
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
Grb2	receptor pro růstový faktor vázající protein 2 ( <i>Growth Factor Receptor-bound Protein 2</i> )
GSH	glutathion
HEK293	buněčná linie odvozená z lidské embryonální ledviny ( <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> )
HIF-1	hypoxií-indukovaný faktor 1 ( <i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i> )
HL-60	buněčná linie odvozená z buněk akutní promyelocytární leukémie
HRA	( <i>Hypoxia response element</i> )
IUV	intrauterinní vývoj
HSC	hematopoetické kmenová buňka ( <i>Hematopoetic Stem Cell</i> )
LLC-PK1	buněčná linie odvozená z epiteliálních buněk prasečích ledvin
L1210/VCR	buněčná linie odvozená z myších lymfocytických leukemických buněk rezistentních na vinkristin
KB	kmenové buňky
K562	buněčná linie odvozená z buněk chronické myeloidní leukémie
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MB	metanefrogenní blastém

MCF7/MR	buněčná linie odvozená z lidského karcinomu prsu, rezistentní na mitoxantron
MDR	mnohočetná léková rezistence
MDR1	( <i>Multidrug Resistance Protein 1</i> )
MEL4M	buněčná linie odvozená od buněk melanomu ( <i>Melanoma Cell Line</i> )
MESF	( <i>Molecules of equivalent soluble fluorochrome</i> )
MRP1	protein spojený s MDR ( <i>Multidrug Resistance Associated Protein 1</i> )
Mrp1-/-	myši s “knockoutovaným” genem kódujícím MRP1
MM6	buněčná linie odvozená od lidských monocytů ( <i>Human Monocytic Cell Line</i> )
MXR	protein rezistentní na mitoxantron ( <i>Mitoxantrone Resistant Protein</i> )
NBD	doména vázající nukleotid ( <i>Nukleotide Binding Domain</i> )
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B ( <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of B Cells</i> )
NK	přirození zabijáci ( <i>Natural Killer</i> )
NS	neurální kmenové buňky ( <i>Neural Stem Cells</i> )
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic ( <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> )
PDGFR	receptor pro destičkový růstový faktor ( <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i> )
PDK1	fosfoinozitol dependentní kináza 1 ( <i>3'-Phosphoinositide-Dependent Kinase1</i> )
PE	fykoerythrin ( <i>Phycocerythrin</i> )
PI3K	fosfatidylinozitol 3-kináza ( <i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i> )
PIP2	fosfatidylinozitol-4,5bis-fosfát ( <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> )
PIP3	fosfatidylinozitol 3,4,5 trisfosfát ( <i>Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate</i> )
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxisomů ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> )
PPRE	responzivní element proliferátoru peroxisomů ( <i>Peroxisome Proliferator Responsive Element</i> )
PTEN	nádorově supresorový gen s fosfátovou aktivitou a sekvenční homologií s některými cytoskeletálními proteiny ( <i>Phosphatase and Tensin Homolog Deleted in Chromosome Ten</i> )
qRT-PCR	kvantitativní PCR s reverzní transkripcí ( <i>quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RPM	otáčky za minutu ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	buněčné kultivační médium ( <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> )
RXR	retinoidní X receptor ( <i>Retinoid X Receptor</i> )
SGC-7901	buněčná linie odvozená z nádoru žaludku
SOS	SOS protein ( <i>Son of Sevenless Homolog</i> )
Src	Src kináza ( <i>Tyrosine-Protein Kinase CSK</i> )
SP	vedlejší populace ( <i>Side population</i> )
STAT	( <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> )
TK	tyrozin kináza ( <i>Tyrosine kinase</i> )
TKI	inhibitor tyrozin kináz ( <i>Tyrosine-Kinase Inhibitor</i> )
TMD	transmembránová doména ( <i>transmembrane domain</i> )
TR	tyrozin kinázový receptor ( <i>Receptor tyrosine kinases</i> )
UP	uretrální pupen
VLCFA	velmi dlouhé mastné kyseliny ( <i>very long chain fatty acid</i> )
WST	proliferiční reagent ( <i>water-soluble tetrazolium salts</i> )
XRE	( <i>Xenobiotic response element</i> )

## Citovaná literatura

- [1] NOSKOVÁ V, HAJDÚCH M, MICHÁL V, CWIERTKA K. (2000). Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, I. Typická MDR. *Klinická onkologie*. 13(2):4-9.
- [2] BIEDLER JL, RIEHM H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res*. 30:1174.
- [3] OZBEN T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 580(12):2903-2909.
- [4] GOTTESMAN MM. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53: 615–627.
- [5] 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.
- [6] DAVIS ALISON. (1997). Tiny pumps protect many animals from toxins – sometimes a little too well. *Science Notes*.
- [7] DONNENBERG VS, DONNENBERG AD. (2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin. Pharmacol.* 45:872-877.
- [8] FLETCHER JI, HABER M, HENDERSON MJ, NORRIS MD. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*. 10(2):147-156.
- [9] DEAN M. (2002). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *National Center for Biotechnology Information (US)*.
- [10] STAVROVSKAYAAA, STROMSKAYA TP. (2008). Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 73 (5):592-604.
- [11] DEAN M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 14:3-9.
- [12] SCHINKELI AH, JONKER JW. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 55(1):3-29.
- [13] DOYLE L, ROSS DD. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2): *Oncogene*. 22(47):7340-7358.
- [14] HIGGINS CF. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8:67-113.
- [15] WALKER JE, SARATEM, RUN WICK MJ, GAY NJ. (1981). Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*. 1:945-51.
- [16] HYDESC, EMSLEYP, HARTSHORN MJ, MIMMANCHMM, GILEADIU, PEARCESR, 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.
- [17] DE LA ROSA MB, NELSON SW. (2011). An interaction between the Walker A and D-loop motifs is critical to ATP hydrolysis and cooperativity in bacteriophage T4 Rad50. *J Biol Chem*. 286(29):26258-26266.
- [18] CHEN J, LU G, LIN J, DAVIDSON AL, QUIOCHO FA. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*. 12:651–661.
- [19] DEAN M. (2001). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *J Lipid Res*, 42:1007–1017.
- [20] SCHNEIDER E, HUNKE S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *Fems Microbiol Rev*. 22(1):1-20.
- [21] JULIANO RL, LING V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta*. 455:152-162.



- [22] SMIT JM., SCHINKEL AH, ELFERINK RPI, GROEN AK, WAGENAAR E, VAN DEEMTER L, MOL CA, OTTENHOF R, VANDER LUGT NMT, VAN ROON MA, VANDER VALK MA, OFFERHAUS GJA, BEMS AJM, BORST P. (1993). Homozygous disruption of the murine *MDR2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 75(3):451–462.
- [23] FARDELO, COURTOIS A, DRENOU B, LAMY T, LECUREUR V LE PRISÉ PY, FAUCHET R. (1996). Inhibition of P-glycoprotein activity in human leukemic cells by mifepristone. *Anticancer Drugs*. 7:671–677.
- [24] UEDA K, CARDAELLI C, GOTTESMAN MM, PASTAN I. (1987). Expression of fulllength cDNA for the human *MDR1* gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Nat Acad Sci*. 84:3004–3008.
- [25] SAKAEDA T, NAKANUTA T, OKUMURA K. (2002). *MDR1* genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull*. 25:1391–1400.
- [26] CALLEN DF, BAKER E, SIMMERS RN, SESHADI R, RONINSON IB. (1987). Localization of the human multiple drug resistance gene, *MDR1*, to 7q21.1. *Hum Genet*. 77:142–144.
- [27] HSU SI, LOTHSTEIN L, HORWITZ SB. (1989). Differential overexpression of free *mdr* gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique *mdr* genes. *J Biol Chem*. 264(20):12053–12062.
- [28] DEVAULT A, GROS P. (1990). Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol*. 10(4):1652–1663.
- [29] THIEBAUT F, TSURUO T, HAMADA H, GOTTESMAN MM, PASTAN I, WILLINGHARM 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.
- [30] FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM, PASTAN I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Nat Acad Sci*. 84: 265–269.
- [31] LEONARD GD, FOJO T, BATES SE. (2003). The role of ABC transporters in clinical practise. *The Oncologist*. 8:411–442.
- [32] GROS P, NERIAH YB, CROOP JM et al. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*. 323(6090):728–731.
- [33] 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*. 258:1650–54.
- [34] COLE SP, DEELEY RG. (1998). Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays*. 20:931–940.
- [35] LOE DW, DEELEY RG, COLE SPC. (1996). Biology of the Multidrug Resistance- associated Protein. M.R.P. *Europ. J. Cancer*. 32(A)6:945–57.
- [36] ISHIKAWA T, KUO MT, FURUTA K, SUZUKI M. (2000). The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design. *Clin Chem Lab Med*. 38:893–897.
- [37] KOOL M, HAAS M, SCHEFFER GL, SCHEPER RJ, VAN EIJK MJ, JUIJN JA, BAAS F, BORST P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4 and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 3537–3547.
- [38] ALLIKMETS R, GERRARD B, HUTCHINSON A, DEAN M. (1996). Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*. 5:1649–1655.
- [39] 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 USA*, 95: 15665–70.
- [40] ALLIKMETS R, SCHRIML LM, HUTCHINSON A, ROMANO-SPICA V, DEAN M. (1998). A human placenta-specific ATPbinding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. 58:5337–5339.

- [41] 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 mitoxantroneresistant cell: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59:8–13.
- [42] HONJO Y, HRYCYNA CA, YAN QW, MEDINA-PEREZ WY, ROBEY RW, VAN DE LAAR A, LITMAN T, DEAN M, BATES SE. (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* 61(18):6635–6639.
- [43] KRISHNAMURTHY P, ROSS DD, NAKANISHI T, BAILEY-DELL K, ZHOU S, MERCER KE, SARKADI B, SORRENTINO BP, SCHUETZ JD. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* 279:24218–24225.
- [44] ROMSICKI Y, SHAROM FJ. (1999). The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry.* 38:6887–6896.
- [45] DEELEY RG, COLE SP. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* 580(4):1103–1111.
- [46] HOSOMI A, NAKANISHI T, FUJITA T, TAMAI L. (2012). Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One.* 7(2):e30456.
- [47] SUZUKI M, SUZUKI H, SUGIMOTO Y, SUGIYAMA Y. (2003). ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem.* 278(25):22644–22649.
- [48] GRUBE M, REUTHER S, MEYER ZU SCHWABEDISSEN H, KOCK K, DRABER K, RITTER CA, FUSCH C, JEDLITSCHKY, KROEMER HK. (2007). Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos.* 35(1):30–35.
- [49] GARRIGUES A, ESCARGUEIL AE, ORLOWSKI S. (2002). The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA,* 99(16):10347–52.
- [50] BOUMENDJEL A, BOUTONNAT J, ROBERT J. (2009). ABC transporters and multidrug resistance. ISBN 978-0-470-22734-3.
- [51] MARQUEZ B, VAN BAMBEKE F. (2011). ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions. *Current Drug Targets.* 12:600–620.
- [52] McCLEAN S, WHELAN RD, HOSKING LK, HODGES GM, THOMPSON FH, MEYERS MB, SCHUURHUIS GJ, HILL BT. (1993). Characterization of the P-glycoprotein over-expressing drug resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their in-vitro exposure to fractionated X-irradiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1177: 117–126.
- [53] TAKENAKA K, MORGAN JA, SCHEFFER GL, ADACHI M, STEWART CF, SUN D, LEGGAS M, EJENDAL KF, HRYCYNA CA, SCHUETZ JD. (2007). Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* 67(14):6965–6972.
- [54] HAIT WN. Regulation of Drug Sensitivity by Functional Status of p53 in Human Prostate Cancer. (2005). Thesis, Award Number: DAMD17-01-1-0081.
- [55] DEELEY RG, COLE SP. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* 580(4):1103–1111.
- [56] VAN HERWAARDEN AE, WAGENAAR E, KARNEKAMP B, MERINO G, JONKER JW, SCHINKEL AH. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis.* 27(1):123–130.
- [57] EKINS S, KIM RB, LEAKE BF, DANTZIQ AH, SCHUETZ EG, LAN LB, YASUDA K, SHEPARD RL, WINTER MA, SCHUETZ JD, WIKEL JH, WRIGHTON SA. (2002). Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Mol Pharmacol.* 61:974–981.

- [58] KRISHNA R, MAYER LD. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci.* 11:265-83.
- [59] THOMAS H, COLEY HM. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control.* 10(2):159-165.
- [60] YANG K, WU J, LI X. (2008). Recent advances in research on P-glycoprotein inhibitors. *Biosci.Trends.* 2:137-146.
- [61] KAYE SB. (2008). Reversal of drug resistance in ovarian cancer: where do we go from here? *J Clin Oncol.* 26:2616-2618.
- [62] CHAN LM, LOWES S, HIRST BH. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 21:25-51.
- [63] MOULY S, PAINE MF. (2003). P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res.* 20:1595-1599.
- [64] ENGLUNG G, ROSMAN F, RONNBLOM A, *et al.* (2006). Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 29:269-277.
- [65] SEITHEL A, KARLSSON J, HILGENDORF C, BJORQUIST A, UNGELL AL. (2006) Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 28(4):291-299.
- [66] JONKER JW, SMIT JW, BRINKHUIS RF, MALIEPAARD M, BEIJNEN JH, SCHELLENS JH, SCHINKEL AH. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* 92:1651–1656.
- [67] STEWART CF, LEGGAS M, SCHUETZ JD, PANETTA JC, CHESHIRE PJ, PETERSON J, DAW N, JENKINS JJ III, GILBERTSON R, GERMAIN GS, HARWOOD FC, HOUGHTON PJ. (2004). Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res.* 64:7491–7499.
- [68] LEE CH, BRADLEY G, ZHANG JT, LING V. (1993). Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocytes culture. *J Cell Physiol.* 157(2):392–402.
- [69] CHANDRA P, BROUWER KL. (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res.* 21:719–735.
- [70] YUE W, ABE K, BROUWER KLR (2009) Knocking down breast cancer resistance protein (Bcrp) by adenoviral vector-mediated RNA interference (RNAi) in sandwich-cultured rat hepatocytes: a novel tool to assess the contribution of Bcrp to drug biliary excretion. *Mol. Pharmaceutics.* 6(1):134–143.
- [71] TRAMONTI G, ROMITI N, NORPOTH M, CHIELI E. (2001). P-glycoprotein in HK-2 proximal tubule cell line. *Ren Fail.* 23(3–4):331–337.
- [72] HULS M, BROWN CDA, WINDASS AS, SAYER R, VAN DEN HEUVEL JMW, HEEMSKERK S, RUSSEL FGM, MASEREEUW R. (2008). The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int.* 73(2):220–225.
- [73] SCHINKEL AH, WAGENAAR E, Van DEEMTER L, MOL CA, BORST P. (1995). Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyklosporin A. *J Clin Invest.* 96:1698–1705.
- [74] SPARREBOOM A, VAN ASPEREN J, MAYER U, SCHINKELAH, SMIT JW, MEIJER DKF, BORST P, NOOIJEN WJ, BEIJNEN JH, VAN TELLINGEN O. (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:2031–2035.
- [75] SMIT JW, SCHINKEL AH, WEERT B, MEIJER DK. (1998). Hepatobiliary and intestinal clearance of amphiphilic cationic drugs in mice in which both mdr1a and mdr1b genes have been disrupted. *Br J Pharmacol.* 124:416–424.

- [76] WIJNHOLDS J, SCHEFFER GL, VANDER VALK M, VANDER VALK P, BEIJNEN JH, SCHEPER RJ, BORST P. (1998). Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J Exp Med.* 188(5):797–808.
- [77] ZHOU S, MORRIS JJ, BARNES Z (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:12339–12344.
- [78] DEAN M, FOJO T, BATES S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5: 275–84.
- [79] CECKOVA-NOVOTNA M, PAVEK P, STAUD F. (2006). P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod. Toxicol.* 22:400–410.
- [80] EVSEENKO D, PAXTON JW, KEELAN JA. (2006). Active transport across the human placenta: impact on drug efficacy and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2:51–69.
- [81] JONKER JW, MERINO G, MUSTERS S, VAN HERWAARDEN AE, BOLSCHER E, WAGENAAR E, MESMAN E, DÁLE TC, SCHINKEL AH. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med.* 11:127-129.
- [82] SCHINKEL AH. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 36(2-3):179-194.
- [83] BART J, HOLLEMA H, GROEN HJ, DE VRIES EG, HENDRIKSE NH, SLEIJFER DT, WEGMAN TD, VAALBURG W, VANDER GRAAF WT. (2004). The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *European Journal of Cancer.* 40:2064–2070.
- [84] HUANG Y, SADEÉ W. (2006). Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Letters.* 239(2):168-182.
- [85] SCHARENBERG CW, HARKEY MA, TOROK-STORB BJ. (2000). The transporter ABCG2 effluxes Hoechst and its expression is restricted to the most primitive human hematopoietic cells. *Blood.* 96:666a.
- [86] ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD, COLAPIETRO AM, SAMPATH J, MORRIS JJ, LAGUTINA I, GROSVELD GC, OSAWA M, NAKAUCHI H, SORRENTINO BP. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 7:1028–1034.
- [87] ISLAM MO, KANEMURA Y, TAJRIA J, MORI H, KOBAYASHI S, SHOFUDA T, MIYAKE J, HARA M, YAMASAKI M, OKANO H. (2005). Characterization of ABC transporter ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett.* 579(17):3473-3480.
- [88] JOHNSTONE RW, RUEFLI AA, SMYTH MJ. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci.* 25(1):1-6.
- [89] ROBBIANI DF, FINCH RA, JAGER D, MULLER WA, SARTORELLI C, RANDOLPH GJ. (2000). The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell.* 103(5):757-768.
- [90] QIAN YM, SONG WC, CUI H, COLE SP, DEELEY RG. (2001). Glutathione stimulates estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem.*, 276(9): 6404-6411.
- [91] GRUBE M, REUTHER S, MEYER ZU SCHWABEDISSEN H, KOCK K, DRABER K, RITTER CA, FUSCH C, JEDLITSCHKY G, KROEMER HK. (2007). Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos.* 35(1):30-35.
- [92] PROCHÁZKOVÁ J, LANOVA M, PACHERNIK J. (2012). Multidrug resistance-associated ABC transporters – too much of one thing, good for nothing. *BioMol Concepts.* 3(4):319-331.
- [93] MAHER JM, SLITT AL, CHERRINGTON NJ, CHENG X, KLAASSEN CD. (2005). Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos.* 33(7):947-955.

- [94] MERINO G, VAN HERWAARDEN AE, WAGENAAR E, JONKER JW, SCHINKEL AH. (2005). *Mol Pharmacol.* 67(5):1765-1771.
- [95] KRISHNAMURTHY P, SCHULTZ JD. (2005). The ABC transporters Abcg2/ Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals.* 18(4):349–358.
- [96] DUNWOODIE SL (2009) The role of hypoxia in development of the mammalian embryo. *Developmental Cell.* 17(6):755–773.
- [97] SCOTTO KW. (2003). Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 22: 7496-511.
- [98] ENGELMAN JA, LUO J, CANTLEY LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism (2006). *Nat Rev Genet*, 7:606-619.
- [99] CANTRELL DA. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* 114:1439-45.
- [100] LEE YR, YU HN, NOH EM, YOUN HJ, SONG EK, HAN MK, PARK CS, KIM BS, PARK YS, PARK BK, LEE SH, KIM JS. (2007). TNF-alpha upregulates PTEN via NF-kappaB signaling pathways in human leukemic cells. *Exp Mol Med.* 39(1):121-127.
- [101] TAMURAM, GU J, DANEHEH, TAKINO T, MIYAMOTOS, YAMADA KM. (1999). PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 274:20693-20703.
- [102] CLARKAS, WEST K, STREICHER S, DENNIS PA. (2002). Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 1(9):707-717.
- [103] TANAKA M, KOUL D, DAVIES MA, LIEBERT M, STECK A, GROSSMAN HB. (2000). MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene.* 19:5406-5412.
- [104] NG SW, TSAO MS, CHOW S, HEDLEY DW. (2000). Inhibition of phosphatidylinositol 3 kinase enhances Gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 60:5451-5455.
- [105] BROGNARD J, CLARK AS, NI Y, DENNIS PA. (2001). Akt/PKB is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 61:3986-3997.
- [106] LI H, SCHMID-BINDERT G, WANG D, ZHAO Y, YANQ X, SU B, ZHOU C. (2011). Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Adv Med Sci.* 56(2):275-284.
- [107] TAZZARI PL, CAPPELLINI A, RICCI F, EVANGELISTI C, PAPA V, GRAFONE T, MARTINELLI G, CONTE R, COCCO L, McCUBREY JA, MARTELLI AM. (2007). Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia.* 21:427-438.
- [108] MOGI M., YANG J, LAMBERT JF, COLVIN GA, SHIOJIMA I, SKURK C, SUMMER R, FINE A, QUESENBERRY PJ, WALSH K. (2003). Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J Biol Chem.* 278(40):39068-39075.
- [109] TAKADA T, SUZUKI H, GOTOH Y, SUGIYAMA Y. (2005). Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state Akt in polarized cells. *Drug Metab Dispos*, 33:905-909.
- [110] CHEN KG, VALENCIA JC, GILLET JP, HEARING VJ, GOTTESMAN MM. (2009). Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22(6):740-749.
- [111] BENTIREN-ALJ M, BARBU V, FILLET M, CHARIOT A, RELIC B, JACOBS N, GIELEN J, MERVILLE MP, BOURS V (2003). NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene.* 22(1):90-97.
- [112] GARCÍA MG, ALANIZ LD, CORDO RUSSO RI, ALVAREZE, HAJOS SE. (2008). PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF-kappaB in murine lymphoma cell lines. *Leuk Res.* 33(2):288-296.

- [113] COMBATES NJ, RZEPKA RW, CHEN YN, COHEN D. (1994). NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcription factors, binds and trans-activates the human MDR1 gene promoter. *J Biol Chem.*, 269: 29715-29719.
- [114] EVSEENKO DA, PAXTON JW, KEELAN JA. (2007). Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblast by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos.* 35:595-601.
- [115] 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, GRATWOHLA, 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.
- [116] 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(7):767-775.
- [117] BACHE KG, SLAGSVOLD T, STENMARK H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *Embo J.* 23:2707-2712.
- [118] GAMBACORTI-PASSERINI C, LE COUTRE P, MOLOGNI L, FANELLI M, BERTAZZOLI C, MARCHESI E, NICOLA M, BIONDI A, CORNEO GM, BELOTTI D, POGLIANI E, LYDON NB. (1997). *Blood Cells Mol Dis.* 23:380-394.
- [119] HAGOP K, SHAH NP, HOCHHAUS A, CORTES J, SHAH S, AYALAM et al. (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New Journal of Medicine.* 362:2260-2270.
- [120] NAGAR B, BORNMANN WG, PELLICENAP, SCHINDLER T, VEACHD, 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.
- [121] HEGEDUS C, OZVEGY-LACZKA C, APATI A, MAGOSCI M, NEMET K, ORFI L, KERI G, KATONA M, TAKATS Z, VARADIA, SZAKACS 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.
- [122] 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.
- [123] NAKANISHI T, SHIOZAWA K, HASSEL BA, ROSS DD. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood.* 108:678-684.
- [124] AN Y, ONGKEGO WM. (2009). ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 5:1529-1542.
- [125] MAITRA R, HALPIN PA, KARLSON KH, PAGE RL, PAIK DY, LEAVITT MO, MOYER BD, STANTON BA, HAMILTON JW. (2001). Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression. *Biochem J.* 355:617-624.
- [126] LIANG J, GE F, GUO C, LUO G, WANG X, HAN G, ZHANG D, WANG J, LI K, PAN Y, YAO L, YIN Z, GUO X, WU K, DING J, FAN D. (2009). Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrP(C)-induced drug resistance in gastric cancer cells. *Febs J.* 685-694.
- [127] ROBYR D, WOLFFE AP, WAHLI W. (2000). Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Molecular Endocrinology.* 14:329-347.
- [128] ISSEMANN I, GREEN S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 18: 347(6294):645-650.

- [129] KLIEWIER SA, UMESONO K, NOONAN DJ, HEYMAN RA, EVANS RM. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358(6389):771–774.
- [130] SCHACHTRUP C, EMMER T, BLECK B, SANDQVIST A, SPENER F. (2004). Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem. J.* 382:239–245.
- [131] DREYER C, KREY G, KELLER, GIVEL F, HELFTENBEIN G, WAHLI W. (1992). Kontrol of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 6; 68:879–887.
- [132] WANG YX. (2010). PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Research*. 20:124–137.
- [133] SPIEGELMAN BM. (1998). PPAR- $\gamma$ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47:507–514.
- [134] SZATMARI I, VAMOSI G, BRAZDA P, BALINT BL, BENKO S, SZÉLES L, JENEY V, OZVEGY - LACZKA C, SZÁNTÓ A, BARTA E, BALLA J, SARKADI B, NAGY L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem*. 281:23812–23823.
- [135] KUROSE K, SAEKI M, TOHKIN M, HASEGAWA R. (2008). Thyroid hormone receptor mediates human MDR1 gene expression-Identification of the response region essential for gene expression. *Arch Biochem Biophys*. 474:82-90.
- [136] DAVIES GD, JUURLINK BHJ, HARKNESS TAA. (2009). Troglitazone reverses the multiple drug resistance phenotype in cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*. 3:79–88.
- [137] YANG ZC, TSAO YP, HO TC, CHOUNG IP. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cause growth arrest and apoptosis in human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Gynecol Cancer*. 17:418-425.
- [138] CAO LQ, CHEN XL, WANG Q, HUANG XH, ZHEN MC, ZHANG LJ, LI W, BI J. (2007). Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin*. 28:879-887.
- [139] WEISS J, SAUER A, HERZOG M, BÖGER RH, HAEFELI WE, BENNDORF RA. (2009). Interaction of Thiazolidinediones (Glitazones) with the ATP-Binding Cassette Transporters P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein. *Pharmacology*. 84:264–270.
- [140] CHEN Q, ZHOU J, JIANG C, CHEN J. (2010). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in SGC7901/VCR cells by PPAR $\gamma$  activation by troglitazone. *Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medical Science*. 30:326–331.
- [141] RAJKUMAR T, YAMUNA M. (2008). Multiple pathways are involved in drug resistance to doxorubicin in an osteosarcoma cell line. *Anti-Cancer Drugs*. 19:257–265.
- [142] SCHOBER SL, CHAY K, SCHLUNS KS, LEFRANCOIS L, LEIDEN JM, JAMESON SC. (1999). Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival memory T cells in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*. 163:3662–3667.
- [143] EHRHARD M, LINDENMAIER H, BURHENNE J, HAEFELI J, WEISS J. (2004). Influence of lipid lowering fibrates on Pglycoprotein activity in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 67:285–292.
- [144] HAFNER C, REICHLER A, VOGT T. (2005). New indications for established drugs: combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPAR $\gamma$  agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 5:393–419.
- [145] RECAMIER JCA. (1829). Recherches dur le Traitement du Cancer, etc. Paris. Editorial Archiv fuer pathologische Anatomie und Physiologie und fuer klinische Medizin 8 (1855) 23.
- [146] BOUZIGES M, F., COLIN, S., KEDINGER, M., Keller, M. K., Schilt, J., Simon-Assmann, P. and Haffen, K. (1990). Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol*. 34:205-218.
- [147] CARLSON BM. (1999). Human embryology & developmental biology. ISBN 0-8151-1458-3.

- [148] MALINSKÝ J, LICHNOVSKÝ V. (2001). Přehled embryologie člověka v obrazech. ISBN 80-244-0243-2.
- [149] KALKEN CK, GIACCONE G, VAN DER VALK P, KUIPER CM, HADISAPUTRO MM, BOSMA SA, SCHEPER RJ, MEIJER CJ, PINEDO HM. (1992). Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus. *American Journal of Pathology*. 141:1063–1072.
- [150] ROSATIA, MANIORS, DECORTI G, CANDUSSIO L, GIRALDI T, BARTOLI F. (2003). Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. *Dev Growth Differ*. 45:377–387.
- [151] CUI YJ, CHANG X, WEAVER YM, KLAASSEN D. (2009). Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos*. 37:203–210.
- [152] MATSUOKA Y, OKAZAKI M, KITAMURA Y, TANIUCHI T. (1999). Developmental expression of P-glycoprotein (multidrug resistance gene product) in the rat brain. *J Neurobiol*. 5; 39:383–392.
- [153] PETRINI M, GALIMBERTI S, SABBATINI A, BIANCHI F, BERNARDINI N, DOLFI A, LUPETTI M. (1995). Expression of multidrug resistance (mdr) gene(s) in primary lymphoid organs of chicken immune system during embryonic development. *Experientia*. 15; 51:137–140.
- [154] MALIEPAARD M, SCHEFFER GL, FANEYTE IF, VAN GASTELEN MA, PIJNENBORG AC, SCHINKEL AH, VAN DE VIJVER MJ, SCHEPER RJ, SCHELLENS JH. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 61:3458–3464.
- [155] GOTTESMAN MM. (1993). How Cancer Cells Evade Chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*. 53:747–754.
- [156] ELBLING L, BERGER W, REHBERGER A, WALDHÖR T, MICKSCHE M. (1993). P-glycoprotein regulates chemosensitivity in early developmental stages of the mouse. *FASEB J*. 1499–1506.
- [157] HOLLO Z, HOMOLYA L, HEGEDUS T, SARKADI B. (1996). Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett*. 383:99-104.
- [158] UJHELLY O, OZVEGY C, VARADY G, CERVENAK J, HOMOLYA L, GREZ M, SCHEFFER G, ROOS D, BATES SE, VARADI A, SARKADI B, NÉMET K. (2003). Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther*. 14:403-412.
- [159] GRAHAM FL, SMILEYJ, RUSSELLWC, NAIRN R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36(1):59-74.
- [160] GIARD DJ, AARONSON SA, TODARO, GJ, ARNSTEIN P, KERSEY JH, DOSIK H, PARKS WP (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 51(5):1417–1423.
- [161] COLLINS SJ. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 70(5):1233-1244.
- [162] MOSMANN T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 65:55-63.
- [163] ISCHYAMA M, SHIGA M, SASAMOTO K, MIZOGUCHI M, HE P. (1993). A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull*. 41:1118-1122.
- [164] PLACHA W, GIL D, DEMBIŃSKA-KIEĆ A, LAIDLER (2003). The effect of PPARγ ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res*. 13(5):447-456.
- [165] SMIT JW, SCHINKEL AH, WEERT B, MEIJER DK (1998). Hepatobiliary and intestinal clearance of amphiphilic cationic drugs in mice in which both mdr1a and mdr1b genes have been disrupted. *Br J Pharmacol*. 124:416–424.
- [166] WIJNHOLDS J, SCHEFFER GL, VAN DER VALK M, VAN DER VALK P, BEIJNEM JH, SCHEPER RJ, BORSTP (1998). Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J Exp Med*. 188(5):797–808.



- [167] HEGEDUS T, ORFI L, SEPRODIA, 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(2-3):318-325.
- [168] HAMADA A, MIYANO H, WATANABE H, SAITO H (2003). Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*. 307(2):824-828.
- [169] MAHON FX, BELLOC F, LAGARDE V, CHOLLET C, MOREAU-GAUDRY F, REIFESS J, GOLDMAN JM, MELO JV (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 101(6):2368-2373.
- [170] LIMA RT, GUIMARAES JE, VASCONCELOS MH (2007). Overcoming K562Dox resistance to STI571 (Gleevec) by downregulation of P-gp expression using siRNAs. *Cancer Therapy*. 5:67-76.
- [171] 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.
- [172] BURGER H, VAN TOL H, BOERSMAAW, 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.
- [173] BRENDEL C, SCHARENBER 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(6):1267-1275.
- [174] HEGEDUS C, OZVEGY-LACZKA C, APÁTI A, MAGÓSCI M, NÉMET K, ORFI L, KÉRI G, KATONA M, TAKÁTS Z, VÁRADI A, SZAKÁSC 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(4):1153-1164.
- [175] SIMARA P, STEJSKAL S, KOUTNA I, POTESIL D, TESAROVA L, POTESILOVA M, ZDRAHAL Z, MAYER J (2013). Apoptosis in chronic myeloid leukemia cells transiently treated with imatinib or dasatinib is caused by residual BCR-ABL kinase inhibition. *Am. J. Hematol*. 88(5):385-393.
- [176] BURGER H, VAN TOL H, BROK M, WIEMER EA, BRUIJN DE EA, GUETENS G, BOECK DE G, SPARREBOOM A, VERWIJ J, NOOTER K (2005). Chronic Imatinib Mesylate Exposure Leads to Reduced Intracellular Drug Accumulation by Induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) Drug Transport Pumps. *Cancer Biology & Therapy*. 4(7):747-752.
- [177] KRISHNAMURTHY P, ROSS DD, NAKANISHI T, BAILEY-DELL K, ZHOU S, MERCER KE, SARKADI B, SORRENTINO BP, SCHUETZ JD (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*. 4; 279(23):24218-24225.
- [178] NAKANISHI T, SHIOZAWA K, HASSEL BA, ROSS DD (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood*. 108(2).
- [179] BARANCIK M, BOHÁCOVÁ V, SEDLÁK J, SULOVA Z, BREIER A (2006). LY294,002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur J Pharm Sci*. 29(5):426-434.
- [180] 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 chronic myeloid leukemia. *Blood*. 109:3496-3499.
- [181] 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.

## Seznam publikací

### 1. Práce související s dizertační prací

**A) Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF**  
Konieczna A, Erdösová B, Lichnovská R, Jandl M, Čížková K, Ehrmann J (2011): Differential expression of ABC transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in developing human embryos. *J Mol Histol.* 42(6): 567-74. (IF 1.75)

Konieczna A, Nováková V, Pevná M, Medalová J, Ehrmann J, Klabusay M (2015). Tyrosine kinase inhibitors regulate the level of expression of ABC transporters related to multidrug resistance (před odesláním k recenznímu řízení)

Konieczna A, Nováková V, Medalová J, Erdösová B, Erceg S, Ehrmann J, Klabusa M (2015). Thiazolidindiones regulate the level of ABC transporters expression on lung cancer cells. *Klinická Onkologie* (potvrzeno přijetí k tisku).

Čížková K, Konieczna A, Erdösová B, Ehrmann J (2014): Time-dependent expression of cytochrome p450 epoxygenases during human prenatal development. *Organogenesis.* 1; 10(1): 53-61. (IF 2.706)

### **B) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v časopisech s IF**

Konieczna A, Lichnovská R, Erdösová B, Ehrmann J (2009): The Role of PPARs in MDR – a lesson from embryonic development. *Neoplasma.* 2009;56(4): 279-83. (IF 1.64)

**C) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných fórech:**  
Konieczna A, Lichnovská R, Erdösová B, Ehrmann J. Úloha PPARs vzhledem k MDR během embryogeneze. Přednáškový večer Spolku lékařů ČLS JEP v Olomouci, Olomouc, 2009.

Konieczna A, Erdösová B, Lichnovská R, Ehrmann J. Differential expression of MRP1 in embryonal/fetal kidney. *Morphology 2009*, 45th International Congress on Anatomy, 46th Lojda Symposium on Histochemistry, Plzeň, 2009.

Konieczna A, Erdösová B, Lichnovská R, Jandl M, Čížková K, Ehrmann J (2011): Differential expression of ABC transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in developing human embryos. *Morphology 2011*, Praha 2011.

46th International Congress on Anatomy, 48th Lojda Symposium on Histochemistry, Praha. The 7th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, Olomouc, 2011.

### 2. Práce nesouvisející s dizertační prací

#### **A) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v časopisech s IF**

Čížková K, Konieczna A, Erdösová B, Lichnovská R, Ehrmann J (2012): Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochromes P450: new way to overcome multidrug resistance? *J Biomed Biotechnol.* 2012: 656428. (IF 2.71)

#### **B) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech**

Helán M, Konieczna A, Klabusay M, Šrámek V. Plicní hypertenze – patofyziologické mechanismy. *Vnitr lek*, 2014; 60(10): 852-858.

## Seznam příloh

1. Konieczna A, Nováková V, Pevná M, Medalová J, Ehrmann J, Klabusay M (2015). Tyrosine kinase inhibitors regulate the level of expression of ABC transporters related to multidrug resistance (před odesláním k recenznímu řízení).
2. Konieczna A, Nováková V, Medalová J, Erdösová B, Erceg S, Ehrmann J Klabusay M (2015). Thiazolidindiones regulate the level of ABC transporters expression on lung cancer cells. *Klinická Onkologie* (potvrzeno přijetí k tisku).
3. Konieczna A, Erdösová B, Lichnovská R, Jandl M, Čížková K, Ehrmann J (2011): Differential expression of ABC transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in developing human embryos. *J Mol Histol.* 42(6): 567-74. (IF 1.75)
4. Konieczna A, Lichnovská R, Erdösová B, Ehrmann J (2009): The Role of PPARs in MDR – a lesson from embryonic development. *Neoplasma.* 2009;56(4): 279-83. (IF 1.64)