

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Kateřina Ječmeňová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vývoj a charakteristika linií rezistentních
k purinovým a pyrimidinovým
cytostatikům**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Ječmeňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina JEČMEŇOVÁ

Osobní číslo: R180456

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Název tématu: Vývoj a charakteristika linií rezistentních k purinovým
a pyrimidinovým cytostatikům

Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

Práce bude zaměřená na přípravu rezistentních linií vůči purinovým a pyrimidinovým cytostatikům na buněčných liniích, které jsou odpovídajícího histogenetického původu, který je relevantní ke klinickému využití těchto protinádorových léčiv. Zejména půjde o buněčné linie kolo-
rektálního karcinomu, plicního adenokarcinomu, případně akutní lymfoblastické leukemie. Po
přípravě rezistentních klonů proběhne jejich rescreening a charakterizace mechanismů rezistence
pomocí molekulárně biologických metod. Teoretická část práce bude založena na aktuální re-
cenzi práci na téma molekulární mechanismy purinových a pyrimidinových cytostatik. Práce
bude splňovat všechny požadavky na magisterskou práci tak, jak jsou definovány v "Pokynech
pro zpracování závěrečné práce" Katedrou buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Klinická onkologie, Pavel Klener, Galén, 2002

Crit Rev Biotechnol. 2016 Aug;36(4):716-26. doi:

10.3109/07388551.2015.1015957. Epub 2015 Mar 11. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. Kartal-Yandim M1, Adan-Gokbulut A1, Baran Y1,2.

Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. Front Pharmacol. 2013;4:28. Published 2013 Mar 14.

doi:10.3389/fphar.2013.00028

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubaš, Ph.D.
děkan

L.S.

31-10-2018

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. března 2017

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Kateřina Ječmeňová

Název práce: Vývoj a charakteristika linií rezistentních k purinovým a pyrimidinovým cytostatikům

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák Ph.D

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: rezistence, mnohočetná léková rezistence, nukleosidy, 6-merkaptopurin, 6-thioguanin, cytarabin, fludarabin, roskovitin, 5-fluorouracil, gemcitabin

Počet stran: 71

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Souhrn

Diplomová práce se věnuje vývoji a charakteristice rezistentních linií na purinová (6-merkaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, roskovitin) a pyrimidinová (gemcitabin, 5-fluorouracil, cytarabin) cytostatika. Teoretická část práce je věnována molekulárním mechanismům účinku purinových a pyrimidinových cytostatik, která se v klinické praxi využívají k léčbě leukémií a solidních nádorů. Rešerše rovněž obsahuje popis obecných mechanismů rezistence na cytostatická léčiva se zaměřením na nukleosidové deriváty.

Experimentální část práce je zaměřena na selekci rezistentních buněk na purinová a pyrimidinová cytostatika. Rezistence byla ověřena pomocí MTS testu cytotoxicity a následně byla provedena základní charakteristika selektovaných buněk. Průtokovou cytometrií byla analyzována exprese P-glykoproteinu a MRP1, pomocí funkčního testu byla otestována aktivita nukleosidových transportérových proteinů. Na závěr byla na vyselektovaných rezistentních liniích otestována nová potencionální protinádorová léčiva.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Ječmeňová

Title: Development and characterization of resistant cell lines to purine and pyrimidine cytotoxic drugs

Type of thesis: master

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: MUDr. Petr Džubák Ph.D

The year of presentation: 2020

Keywords: resistance, multidrug resistance, nucleosides, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, fludarabine, roscovitine, 5-fluorouracil, gemcitabine

Number of pages: 71

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary

This master thesis deals with the development and characteristics of cell lines resistant to purine (6-mercaptopurine, 6-thioguanine, fludarabine, roscovitine) and pyrimidine (gemcitabine, 5-fluorouracil, cytarabine) cytostatics. The theoretical part of this thesis focuses on molecular mechanisms of the effect of purine and pyrimidine cytostatics that are in the clinical practice used for the treatment of leukaemia and solid tumors. The review also describes general mechanisms of resistance to cytostatic drugs with the focus on nucleoside derivatives.

The experimental part of the work is aimed at the selection of cells resistant to purine and pyrimidine cytostatics. The cells were subsequently characterized. The expression of P-glycoprotein and MRP1 was analyzed by flow cytometry, and the activity of nucleoside transporter proteins was tested by a functional assay. Finally, new potential anticancer drugs were tested on selected resistance lines.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením MUDr. Petra Džubáka Ph.D.

V Olomouci dne

podpis studenta

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Petrovi Džubákovi Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho cenné rady, ochotu a čas, který mi poskytl během vypracování této práce. Velký dík patří také Mgr. Lence Řeháčkové za podporu, cenné rady a čas, který mi věnovala během celé doby při práci v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat kolektivu pracoviště Ústavu molekulární a translační medicíny, za ochotu a pomoc při řešení experimentální části. Děkuji také své rodině, příteli a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Projekt byl podpořen granty GAČR 19-081248, OPENSREEN LM2018130 a IGA_LF_2020-019.

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	x
Seznam obrázků	xii
Seznam grafů.....	xiv
Seznam tabulek	xv
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Purinová cytostatika	3
3.1.1 6-merkaptopurin.....	3
3.1.2 6-thioguanin	4
3.1.3 Roskovitin	4
3.1.4 Fludarabin	5
3.2 Pyrimidinová cytostatika	6
3.2.1 Cytarabin.....	6
3.2.2 5-fluorouracil.....	7
3.2.3 Gemcitabin	8
3.3 Rezistence na cytostatická léčiva	9
3.3.1 Mnohočetná léková rezistence	10
3.3.2 Nukleosidové transportéry	14
3.4 Rezistence na nukleosidové deriváty.....	16

4	Materiál a metody	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Použité chemikálie, soupravy, roztoky a protilátky	18
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Příprava linií rezistentních k purinovým a pyrimidinovým cytostatikům 22	
4.4.2	Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} u selektovaných buněk pomocí MTS testu.....	23
4.4.3	Analýza exprese P-glykoproteinu průtokovou cytometrií	24
4.4.4	Analýza exprese MRP1 průtokovou cytometrií.....	25
4.4.5	Inhibice nukleosidových transportérových proteinů u vyselektovaných buněčných linií odvozených od buněčné linie CCRF-CEM.....	25
4.4.6	Testování potencionálních protinádorových léčiv na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM.....	27
5	Výsledky	28
5.1	Selektované buněčné linie	28
5.2	Stanovená inhibiční koncentrace IC_{50} u selektovaných buněk pomocí MTS testu	28
5.3	Analýza exprese P-glykoproteinu průtokovou cytometrií.....	32
5.4	Analýza exprese MRP1 průtokovou cytometrií	33
5.5	Inhibice nukleosidových transportérových proteinů u vyselektovaných rezistentních buněčných linií odvozených od buněčné linie CCRF-CEM.....	34
5.6	Testování potencionálních protinádorových léčiv.....	39

6	Diskuse.....	41
7	Závěr	45
8	Literatura.....	46

Seznam symbolů a zkratek

5FU	5-fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette
araC	Cytozin arabinozit 5'-trifosfát
araU	1-β-arabinofuranosyluracil
ATP	Adenosintrifosfát
BCRP	Breast cancer resistance protein
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CNT	Koncentrační nukleosidové transportéry
CTR	Cytarabin
dCTP	Deoxycytidin trifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ENT	Ekvilibrační nukleosidové transportéry
FCSI	Fetální bovinní sérum
FDR	Fludarabin
FdUMP	Fluorodeoxyuridin monofosfát
GEM	Gemcitabin
hCNT	Lidský koncentrační nukleosidový transportér
hENT1	Lidský ekvilibrační nukleosidový transportér 1
IC₅₀	Inhibiční koncentrace
MCP	6-merkaptopurin
MDR	Mnohočetná léková rezistence
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MRP1	Multidrug resistance-related protein 1
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium
NBD	Doména vázající nukleotid
NTs	Nukleosidové transportérové proteiny
P-Gp	P-glykoprotein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina

ROS	Roskovitin
THG	6-thioguanin
TMD	Transmembránová doména
TS	Thymidylát syntáza

Seznam obrázků

Obr. 1: Strukturní vzorec 6-merkaptopurinu.....	3
Obr. 2: Strukturní vzorec 6-thioguaninu	4
Obr. 3: Strukturní vzorec roskovitinu	5
Obr. 4: Strukturní vzorec fludarabinu	5
Obr. 5: Strukturní vzorec cytarabinu.....	6
Obr. 6: Strukturní vzorec 5-fluorouracilu	7
Obr. 7: Strukturní vzorec gemcitabinu.....	8
Obr. 8: Membránový topologický model P-glykoproteinu, který se skládá ze dvou transmembránových domén (TMD1 a TMD2), z nichž každá obsahuje šest transmembránových α -helixů a jednu nukleotid vazebnou doménu (NBD) (upraveno podle Kocurová, 2011).....	11
Obr. 9: Membránový topologický model MRP1, který se skládá ze dvou tandemově řazených transmembránových domén (TMD1 a TMD2), N-terminální transmembránové domény (TMD0), která je napojena na TMD1 pomocí intracelulárního linkeru a dvou nukleotid vazebných domén (NBD) (upraveno podle Kocurová, 2011).....	12
Obr. 10: Membránový topologický model BCRP, jež obsahuje jednu nukleotidovou vazebnou doménu (NBD), následovanou jednou transmembránovou doménou (TMD1) s šesti transmembránovými α -helixy (upraveno podle Kocurová, 2011)....	13
Obr. 11: Model transportu nukleosidů (Nuc) pomocí Na^+ dependentních koncentračních nukleosidových transportérů (CNT) a ekvilibračních nukleosidových transportérů (ENT) (upraveno podle Podgorska <i>et al.</i> , 2005).....	14
Obr. 12: Selektivita koncentračních nukleosidových transportérů. CNT1 vykazuje selektivitu pro pyrimidinové nukleosidy, CNT2 pro purinové nukleosidy a CNT3 pro purinové i pyrimidinové nukleosidy (upraveno podle Ritzel <i>et al.</i> , 2000).	15

Obr. 13: Schéma navyšování koncentrací léčiv při selekci rezistentních buněk odvozených od buněčné linie CCRF-CEM.....	22
Obr. 14: Strukturní vzorec dipyridamolu.....	25
Obr. 15: Chemická struktura látek PNH173 (a), PNH192 (b), AB61 (c).....	27

Seznam grafů

Graf 1: Hodnoty IC_{50} dipyridamolu pro parentální buňky a vyselektované buněčné linie odvozené od buněčné linie CCRF-CEM.....	26
Graf 2: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté cytarabinem (červená) a naopak ošetřené cytarabinem a následně inhibitorem (modrá).....	35
Graf 3: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 6-merkaptopurinem (červená) a naopak ošetřené 6-merkaptopurinem a následně inhibitorem (modrá)	35
Graf 4: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 5-fluorouracilem (červená) a naopak ošetřené 5-fluorouracilem a následně inhibitorem (modrá)	36
Graf 5: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté gemcitabinem (červená) a naopak ošetřené gemcitabinem a následně inhibitorem (modrá).....	36
Graf 6: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté fludarabinem (červená) a naopak ošetřené fludarabinem a následně inhibitorem (modrá)	37
Graf 7: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté roskovitinem (červená) a naopak ošetřené roskovitinem a následně inhibitorem (modrá)	37
Graf 8: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 6-thioguaninem (červená) a naopak ošetřené 6-thioguaninem a následně inhibitorem (modrá).....	38

Seznam tabulek

Tab. 1: Koncentrace látek po šesti cyklech ošetření u buněčných linií CCRF-CEM a K562.....	23
Tab. 2: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u parentálních buněk buněčné linie CCRF-CEM a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem	29
Tab. 3: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u odvozených buněk buněčné linie CCRF-CEM selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem.....	29
Tab. 4: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] druhého měření u parentálních buněk buněčné linie CCRF-CEM a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem.....	30
Tab. 5: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] druhého měření u odvozených buněk buněčné linie CCRF-CEM selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem.....	30
Tab. 6: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u parentálních buněk buněčné linie K562 a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem.....	31
Tab. 7: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u odvozených buněk buněčné linie K562 selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem	31
Tab. 8: Výsledky analýzy exprese P-glykoproteinu u buněčné linie CCRF-CEM, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly	32
Tab. 9: Výsledky analýzy exprese P-glykoproteinu u buněčné linie K562, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly.....	32
Tab. 10: Výsledky analýzy exprese MRP1 u buněčné linie CCRF-CEM, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly.....	33
Tab. 11: Výsledky analýzy exprese MRP1 u buněčné linie K562, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly.....	33

Tab. 12: Míra cytotoxicity látek PNH173, PNH192 a AB61 na buněčné linii CCRF-CEM a od ní odvozených linií selektovaných fludarabinem a cytarabinem..... 39

Tab. 13: Míra cytotoxicity látek PNH173, PNH192 a AB61 na buněčné linii CCRF-CEM a od ní odvozených linií selektovaných 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem 40

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jedny z nejvíce rozšířených onemocnění na světě. Purinová a pyrimidinová cytostatika jsou v klinické praxi využívána k léčbě leukémií a solidních nádorů. Základním problémem těchto onemocnění je jejich rezistence k použité léčbě a tedy selhání jejich účinnosti. Rozlišuje se primární, sekundární, zkřížená a mnohočetná léková rezistence, která představuje největší problém, poněvadž při ní dochází k rezistenci mezi cytostatiky, které se liší strukturně i mechanismem účinku.

V předložené práci byly vyselektovány rezistentní buněčné linie na purinová a pyrimidinová cytostatika. Podrobná molekulární analýza těchto nádorových buněk je nezbytná pro důkladné porozumění příčinných mechanismů rezistence na použitá léčiva. Tyto znalosti pak potencionálně přispívají k návrhu nových protinádorových léčiv překonávající rezistenci na cytostatika, která se využívají v klinické praxi.

2 Cíle práce

- 1) Vypracování aktuální rešeršní práce na téma molekulární mechanismy účinku a rezistence purinových a pyrimidinových cytostatik.
- 2) Příprava rezistentních linií vůči purinovým a pyrimidinovým cytostatikům, s relevantním histogenetickým původem k jejich klinickému využití.
- 3) Charakteristika mechanismů rezistence pomocí molekulárně biologických metod.

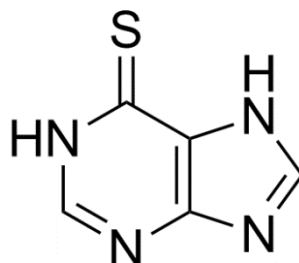
3 Literární přehled

3.1 Purinová cytostatika

Purinová cytostatika jsou odvozena od purinových bází adeninu a guaninu. Purinové metabolity mají významné postavení při biosyntéze DNA a RNA, z čehož je zřejmé, že průběh syntézy nukleových kyselin může být významně ovlivněný purinovými analogy. Do skupiny purinových cytostatik patří 6-merkaptopurin, 6-thioguanin, roskovitin a fludarabin (Klener, 2002).

3.1.1 6-merkaptopurin

6-merkaptopurin (MCP, Obr. 1), prodáván pod názvem Purinetol nebo Lederle, je derivátem hypoxantinu. Byl vyvinut v roce 1953 ve Spojených státech amerických Gertrudou Elion společně s Georgem Hitchingsem, kteří za něj obdrželi v roce 1988 Nobelovu cenu. MCP se dnes používá omezeně, v udržovací léčbě například akutní lymfoblastické leukémie (Hitchings *et al.*, 1954, Munshi *et al.*, 2014).

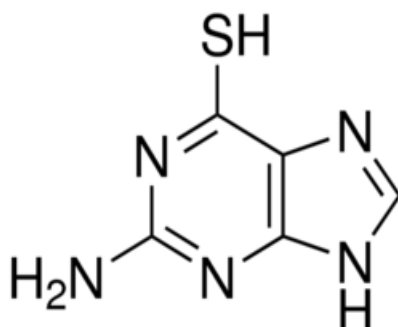


Obr. 1: Strukturní vzorec 6-merkaptopurinu

6-merkaptopurin musí být metabolicky převeden na aktivní formu. Může být metabolizován třemi kompetitivními cestami. Tou první, pomocí hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy, je převeden přes metabolický meziprodukt kyselinu thioinosinovou až na tvorbu 6-thioguaninových nukleotidů. Další cestou je konverze MCP xantin-oxidázou na kyselinu 6-thiomočovou. Třetí cesta je zprostředkovaná thio-purin-methyl-transferázou, tedy enzymem, který degraduje MCP na 6-methylmerkaptopurin. Tyto metabolity mohou být začleněny do DNA, což je důležitým krokem pro poškození DNA a zastavení její replikace (Weinshilboum *et al.*, 1980, Chalupná *et al.*, 2004, Munshi *et al.*, 2014).

3.1.2 6-thioguanin

6-thioguanin (THG, Obr. 2) je analogem purinové báze guaninu. V klinice byl představen už v 50. letech minulého století a stejně jako MCP byl vyvinut Gertrudou Elion společně s Georgem Hitchingsem (Hitchings *et al.*, 1954). Jde o látku s protinádorovou a imuno-supresivní aktivitou. THG se využívá v léčbě akutní a chronické myeloidní leukémie (Burchenal *et al.*, 1953).



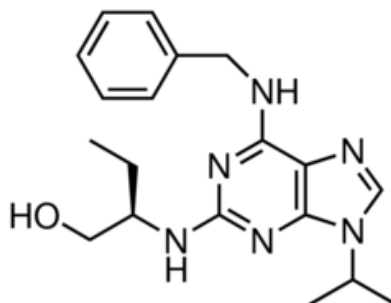
Obr. 2: Strukturní vzorec 6-thioguaninu

6-thioguanin je katabolizován dvěma cestami. Tou první je THG převeden guanindeaminázou na 6-thioxanthin, který má minimální antineoplastickou aktivitu. 6-thioxanthin je oxidován xanthinoxidázou na kyselinu thiomočovou, která je jako odpadní produkt vyloučena z těla. Druhou cestou je metylace THG thiopurinmethyltransferázou na thiomethylguanin, který má schopnost se zabudovat do DNA a tím působit cytotoxicky (Munshi *et al.*, 2014).

3.1.3 Roskovitin

Roskovitin (ROS, Obr. 3), známý také pod názvem Seliciclib, byl vyvinut Miroslavem Strnadem z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve spolupráci s Michele Legraverendem z Institutu Marie Curie v Orsay (Havlíček *et al.*, 1997). ROS je testovaný lék na karcinom plic, leukémii a virové infekce (HIV, Herpes Simplex virus) (Khalil *et al.*, 2015).

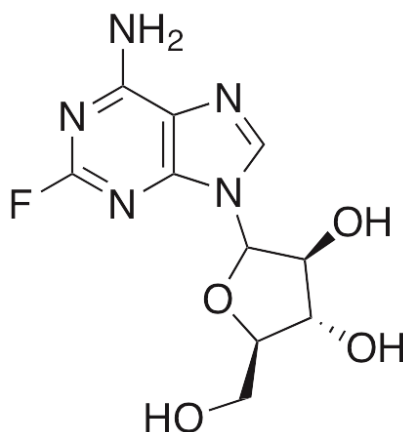
Roskovitin je inhibítozem cyklindependentních kináz (CDK) 1, 2, 5, 7 a 9, z čehož vychází, že může ovlivnit řadu buněčných funkcí včetně buněčného dělení, které je CDK regulované (Meijer *et al.*, 1997, Bach *et al.*, 2005).



Obr. 3: Strukturní vzorec roskovitinu

3.1.4 Fludarabin

Fludarabin (FDR, Obr. 4), pod chemickým názvem 9-β-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenin-5'-monofosfát, je fluorovaný analog adeninu, který je relativně odolný vůči deaminaci adenosindeaminázou (Keating *et al.*, 1989). Používá se k léčbě chronické lymfocytární leukémie B-buněčného typu (SÚKL, 2020).



Obr. 4: Strukturní vzorec fludarabinu

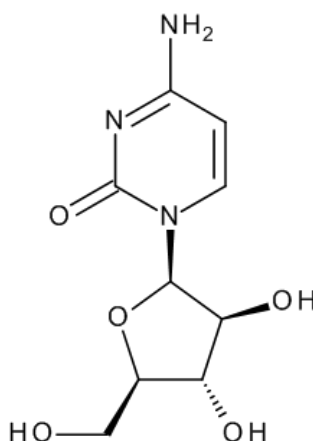
Fludarabin je podáván ve formě monofosfátu, který je defosforylován plazmovými fosfatázami a transportován do buněk. Zde dochází k fosforylaci adenylátkinázou na fludarabindifosfát a dále nukleosiddifosfátkinázou na fludarabintrifosfát, který představuje aktivní formu léčiva (Gandhi *et Plunkett*, 2002). Začlenění FDR do DNA způsobí zastavení replikační vidlice a zlom DNA. FDR se také může inkorporovat do RNA a bylo prokázáno, že přímo indukuje apoptózu prostřednictvím aktivace kaspáz (Gandhi *et Plunkett*, 2002).

3.2 Pyrimidinová cytostatika

Do skupiny pyrimidinových cytostatik se řadí fluorované pyrimidiny (5-fluorouracil), analoga cytidinu (cytarabin, gemcitabin) a azapyrimidiny.

3.2.1 Cytarabin

Cytarabin (CTR, Obr. 5), známý pod názvem Cytosar-U nebo Depocyt, byl poprvé syntetizován v roce 1959 Richardem Walwickem, Waldenem Robertsem a Charlesem Deckerem na Kalifornské univerzitě (Walwick *et al.*, 1959). CTR se používá k léčbě akutní myeloidní a lymfoblastické leukémie a do těla je vpravován intravenózně nebo subkutánně (SÚKL, 2020).

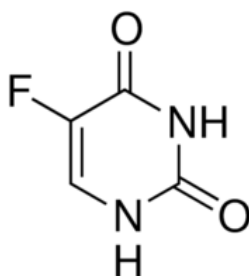


Obr. 5: Strukturní vzorec cytarabinu

Účinek CTR závisí na intracelulární fosforylaci na jeho aktivní metabolit cytozin arabinozit 5'-trifosfát (araC), který inhibuje syntézu DNA inhibicí DNA polymeráz, a tím dochází k ukončení prodlužování řetězce, ale také může docházet k inkorporaci araC do DNA v konkurenci s deoxycytidin trifosfátem (dCTP). Tato inkorporace způsobuje ukončení řetězce, což má za následek blokaci syntézy DNA. Při klinickém použití je aktivita CTR snížena tím, že araC může podléhat také rychlé deaminaci cytidin deaminázou, což vede ke vzniku biologicky neaktivního 1-β-arabinofuranosyluracilu (araU) (Plunkett *et al.*, 1987).

3.2.2 5-fluorouracil

5-fluorouracil (5FU, Obr. 6) je známý také pod názvem Adrucil. Jedná se o uracil, u kterého je substituován vodík fluorem v poloze C-5. Byl jedním z prvních léčiv, u kterých byla prokázána protinádorová aktivita (Vertessy *et Toth*, 2009). 5FU byl poprvé syntetizován Charlesem Heidelbergerem a používá se k paliativní a adjuvantní léčbě karcinomu gastrointestinálního traktu, především tlustého střeva a konečníku, karcinomu žaludku a karcinomu pankreatu (Heidelberger *et al.*, 1957, SÚKL, 2020)

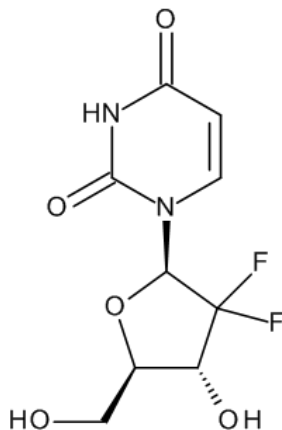


Obr. 6: Strukturní vzorec 5-fluorouracilu

5-fluorouracil nevykazuje cytotoxické účinky, proto musí být převeden na aktivní metabolity, jako jsou fluorodeoxyuridintrifosfáty nebo fluorouridintrifosfáty. 5FU je tedy fosforylován thymidin-fosforylázou na fluorodeoxyuridin, ten je pomocí thymidin-kinázy přeměněn na fluorodeoxyuridin monofosfát (FdUMP). Enzymem uridinmonofosfátkinázou je FdUMP přeměněn na fluorodeoxyuridindifosfát, který je fosforylován uridindifosfátkinázou na fluorodeoxyuridintrifosfát a ten je DNA polymerázou při replikaci začleněn do DNA místo 2-deoxythymidin-5-trifosfátu. Obdobně dochází ke vzniku fluorouridintrifosfátu, který je RNA polymerázou začleňován do RNA namísto uridin-5-trifosfátu. 5FU také inhibuje thymidylát syntázu, což je enzym, který katalyzuje redukční metylaci deoxy-uridinmonofosfátu na thymidin-monofosfát, který je nezbytný pro replikaci a opravy DNA (Diasio *et Harris*, 1989).

3.2.3 Gemcitabin

Gemcitabin (GEM, Obr. 7) se prodává pod názvem Gemzar. Jeho chemickým názvem je 2,2-difluoro-2-deoxycytidin a je používán k léčbě karcinomu močového měchýře, adenokarcinomu pankreatu, nemalobuněčného plicního karcinomu, karcinomu vaječníků a karcinomu prsu. Do těla je léčivo vpravováno intravenózně (SÚKL, 2020).



Obr. 7: Strukturní vzorec gemcitabinu

Gemcitabin se dostává do buňky přes plazmatickou membránu prostřednictvím nukleosidových transportérů (Mackey *et al.*, 1998). Hlavním transportérem GEM je lidský ekvilibrační nukleosidový transportér 1 (hENT1). V buňce je GEM fosforylován deoxycytidin kinázou na gemcitabin monofosfát, který je znovu fosforylován nukleosidmonofosfát kinázou za vzniku gemcitabin difosfátu. Finální fosforylaci pak katalyzuje nukleosiddifosfát kináza a vzniká gemcitabin trifosfát, který je spojený s cytotoxicitou GEM a následnou inhibicí syntézy DNA (Plunkett *et al.*, 1995). Fosforylovaný GEM se může inkorporovat do DNA i do RNA (Ruiz van Haperen *et al.*, 1993).

3.3 Rezistence na cytostatická léčiva

Rezistence se může definovat jako primární necitlivost nádorových buněk vůči cytostatiku nebo jako druhotná ztráta této citlivosti k léčivu (Klener 2002). Rezistence byla poprvé popsána v roce 1970 na plicních buňkách čínského křečka, na nichž byla pozorována rezistence na aktinomycin D. Na těchto buňkách byla prokázána také rezistence například na vinkristin a vinblastin (Biedler *et Riehm*, 1970).

Rozeznáváme rezistenci primární (přirozenou), kdy jsou maligní buněčné populace rezistentní na léčivo již při první léčbě a rezistenci sekundární (získanou), která vzniká až v průběhu léčby cytostatiky, kdy se původně citlivé buňky stávají buňkami rezistentními, a tím se snižuje účinnost cytostatické léčby. Jestliže při ztrátě citlivosti buněk na jedno cytostatikum vznikne rezistence i na jiné přípravky, které s ním mají podobnou strukturu, jedná se o rezistenci zkříženou (cross resistance). Pokud však dojde k rezistenci mezi cytostatiky, které se liší strukturně i mechanismem účinku, jde o mnohočetnou lékovou rezistenci (multidrug resistance, MDR) (Nosková *et al.*, 2000).

Rezistence na protinádorovou léčbu bývá komplexní povahy. Její vznik je nejčastěji vázán na (1) změnu farmakokinetiky, kdy je snižená resorpce léčiva, urychlená biotransformace a vylučování nebo dochází k rychlejší inaktivaci látky. Dále může docházet ke (2) změně cytokinetiky, kdy část nádorových buněk přechází do fáze G₀, v níž je citlivost k chemoterapii omezená. S přibývajícím růstem nádoru vznikají u buněk spontánní mutace, a tím se zvyšuje heterogenita populace buněk a vzniklé klony mohou mít odlišnou citlivost k léčbě. Nejčastějším způsobem vzniku rezistence jsou (3) metabolické a funkční změny buňky, kdy dochází ke zvýšení či snížení exprese nebo aktivity enzymů, k porušení intracelulární distribuce léčiva, ovlivnění jeho transportu membránou buňky nebo může docházet ke zvýšení intenzity oprav DNA (Nosková *et al.*, 2000).

3.3.1 Mnohočetná léková rezistence

Mnohočetná léková rezistence (MDR) je jedním z hlavních důvodů selhání chemoterapie, což může vést k recidivě maligních nádorů nebo dokonce k relapsu a smrti pacienta (Brown *et al.*, 1999). Existují dva typy MDR, klasická (typická) a neklasická (atypická). U klasické MDR dochází ke zvýšené expresi membránových transportérových proteinů, které se řadí do rodiny tzv. transportérových proteinů ABC (ATP-binding cassette), a které aktivně transportují xenobiotika z intracelulárního prostředí buňky. Kdežto u neklasické MDR může docházet ke změně aktivity specifických enzymů (např. glutathion S-transferázy nebo topoizomerázy), které mohou snížit cytotoxickou aktivitu léčiv nezávisle na jejich koncentracích (Krishna *et al.*, 2000).

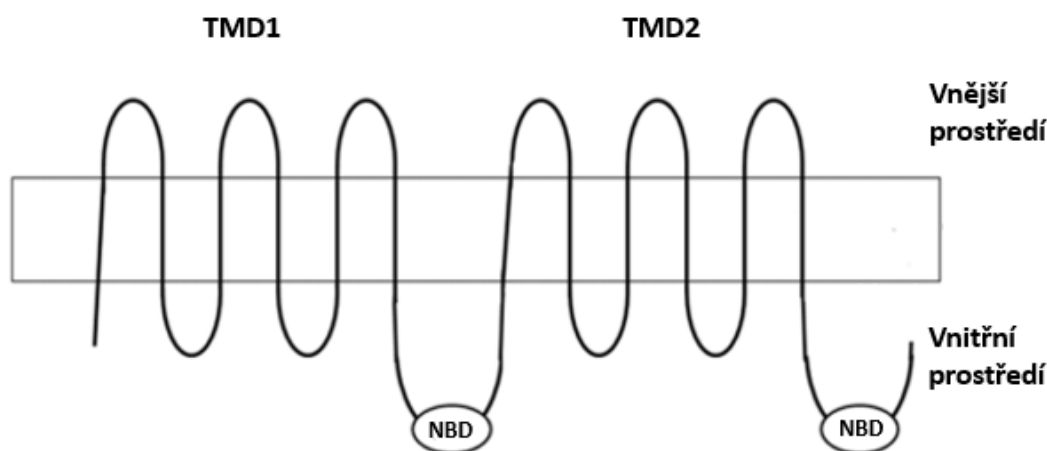
ABC transportérové proteiny

Jedním z mechanismů chemorezistence je snížená akumulace léčiv v buňce způsobená jejich zvýšeným efluxem z buňky, jež je zprostředkován proteiny příslušící k nadrodině ABC transportérových proteinů (Mohelníková-Duchoňová *et al.*, 2010). U člověka existuje 49 ABC variant genů kódujících transportérové proteiny klasifikovaných do sedmi různých rodin (A–G) v závislosti na jejich aminokyselinové sekvenci a případně na jejich proteinových doménách (Dean *et al.*, 2001). K transportu molekul přes buněčnou membránu z cytoplazmy do vnějšího prostředí využívají ABC transportéry energii z hydrolýzy ATP. U eukaryotních buněk se mohou nacházet kromě cytoplazmatické membrány i v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu nebo peroxizomech. U buněk nádorových jsou tyto transportéry pumpami, které vylučují protinádorová léčiva ven z buňky, a tím v nich snižují jejich koncentraci, a tedy omezují působení těchto látek. Jsou aktivní u širokého spektra lidských nádorů (lymfomy, leukemie, rakovina prsu, plic a vaječníků). Se zvyšujícím se počtem těchto pump u buňky může docházet ke snížení efektivity protinádorové léčby.

ABC transportér se skládá ze čtyř domén, dvou cytoplazmatických NBD (doména vázající nukleotid) a dvou TMD (transmembránová doména) obsahující 6–12 transmembránových α -helixů (Zolnericiks *et al.*, 2011). Pokud jsou všechny tyto čtyři domény kódovány pouze jednou mRNA, vzniká po přepisu kompletní transportér. Je-li protein kódován dvěma molekulami mRNA, kdy každá kóduje polovinu domén, jedná se o poloviční transportér (Dean, 2009).

ABC transportérové proteiny ABCB1/PGP1/MDR1, ABCC1/GS-X/MRP1 a ABCG2/MXR/BCRP byly nalezeny u skoro všech nádorových buněk u lidí, které vykazovaly MDR, a proto se předpokládá, že jsou významnými efluxními transportéry zodpovědnými za MDR (Dean *et al.*, 2001). ABC transportér **ABCB1**, nazývaný také jako **P-glykoprotein** (P-gp) nebo **MDR1**, byl objeven v roce 1976 dvojicí Julianem a Lingem (Juliano *et al.*, 1976) a je kódován genem *mdr1* (Ueda *et al.*, 1987), který se nachází na lokusu 7q21.1 (Callen, 1987).

P-glykoprotein se skládá ze dvou transmembránových domén, z nichž každá obsahuje šest transmembránových α -helixů a z jedné nukleotid vazebné domény (Obr. 8). Buňky nadměrně exprimující tento protein vykazují MDR na základě zvýšeného efluxu z intracelulárního prostoru. Mezi látky transportované P-gp patří hydrofobní sloučeniny, například kolchicin, doxorubicin, adriamycin, vinblastin, digoxin, saquinivir a paclitaxel. P-gp netransportuje záporně nabitě sloučeniny. P-gp je exprimován i ve zdravých tkáních, primárně v játrech, v krvi a v mozku (Dean *et al.*, 2001).



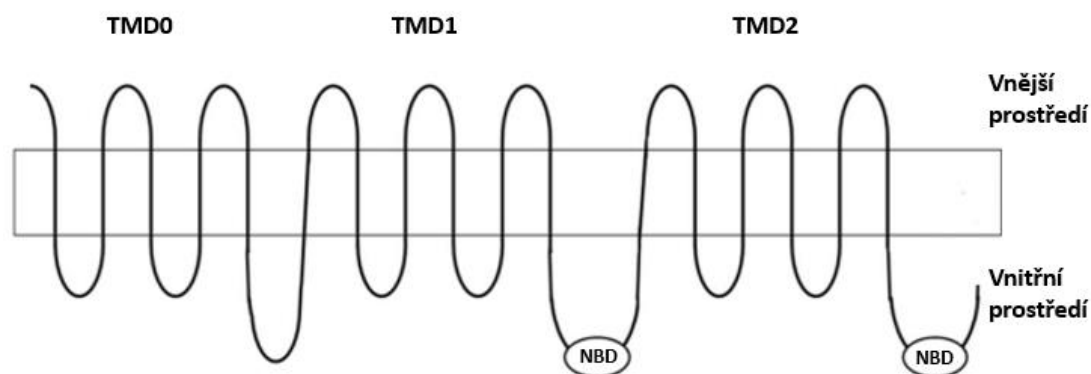
Obr. 8: Membránový topologický model P-glykoproteinu, který se skládá ze dvou transmembránových domén (TMD1 a TMD2), z nichž každá obsahuje šest transmembránových α -helixů a jednu nukleotid vazebnou doménu (NBD) (upraveno podle Kocurová, 2011).

Další ABC transportér **ABCC1 (GS-X/MRP1 - Multidrug resistance-associated protein 1)** byl z ABCC proteinů identifikován jako první a byl izolován z MDR buněčné linie H69AR odvozené od rakoviny plic (Cole *et al.*, 1992). Gen MRP1/ABCC1 je umístěn na lokusu 16p13. MRP1 se skládá ze dvou tandemově řazených transmembránových domén, N-terminální transmembránové domény, která

je napojena na TMD1 pomocí intracelulárního linkeru a dvou nukleotid vazebných domén (Obr. 9).

Mezi tkáně vykazující nejvyšší úroveň exprese MRP1 patří plíce, varlata, ledviny, srdce a placenta, přičemž funkcí tohoto proteinu je zde ochrana před xenobiotiky či jinými toxickými látkami. Proto je poněkud neočekávané, že MRP1 je na velmi nízké úrovni exprimován v játrech, což je hlavní orgán xenobiotického metabolismu a detoxikace (Bakos *et Homolya*, 2007).

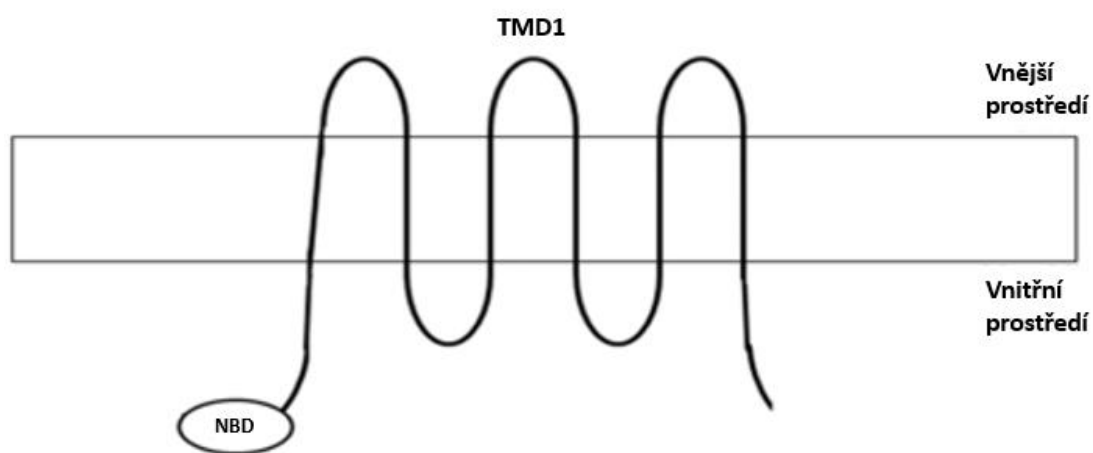
MRP1 může transportovat široké spektrum substrátů. Známými substráty jsou protinádorová léčiva včetně antracyklinů, epipodofylotoxinů, vinca alkaloidů, kamptothecinů, methotrexátu a mitoxantronu. Nadměrná exprese MRP1 může vést k MDR při chemoterapii rakoviny. Kromě protinádorových léčiv transportuje MRP1 také mnoho dalších typů léčiv, ku příkladu léky proti HIV (Yin *et al.*, 2009). MRP1 je zodpovědný za MDR u několika lidských maligních onemocnění (různé formy leukémie, nádory prsu, plic, prostaty) (Bakos *et Homolya*, 2007).



Obr. 9: Membránový topologický model MRP1, který se skládá ze dvou tandemově řazených transmembránových domén (TMD1 a TMD2), N-terminální transmembránové domény (TMD0), která je napojena na TMD1 pomocí intracelulárního linkeru a dvou nukleotid vazebných domén (NBD) (upraveno podle Kocurová, 2011).

Třetím významným ABC transportérem je **ABCG2 (MXR/BCRP-** breast cancer resistance protein). Gen ABCG2 je umístěn na lokusu 4q22. BCRP obsahuje jednu nukleotidovou vazebnou doménu následovanou jednou transmembránovou doménou s šesti transmembránovými α -helixy (Obr. 10). Ačkoliv byl původně identifikován jako specifický adenosintrifosfátový (ATP) vazebný transportér placenty (ABCP), může BCRP transportovat širokou škálu substrátů, od chemoterapeutických činidel po organické aniontové konjugáty. Mezi vysoce

afinitní substráty patří například mitoxantron, deriváty kamptothecinu nebo antracyklinová cytostatika (Honjo *et al.*, 2001)

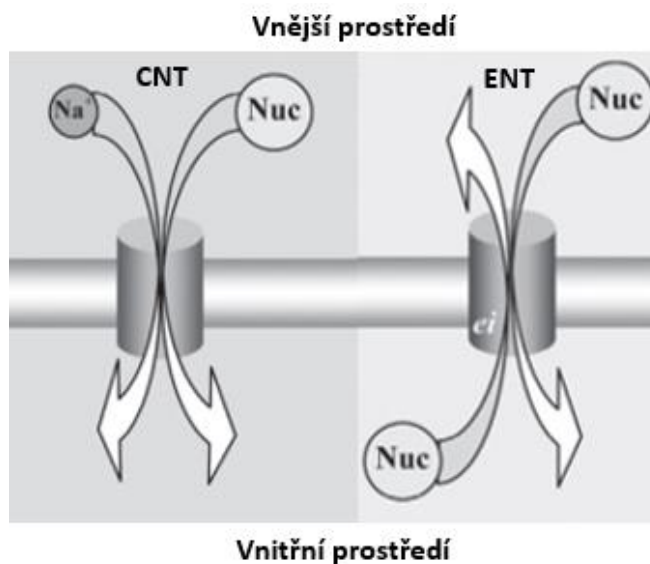


Obr. 10: Membránový topologický model BCRP, jež obsahuje jednu nukleotidovou vazebnou doménu (NBD), následovanou jednou transmembránovou doménou (TMD1) s šesti transmembránovými α -helixy (upraveno podle Kocurová, 2011).

3.3.2 Nukleosidové transportéry

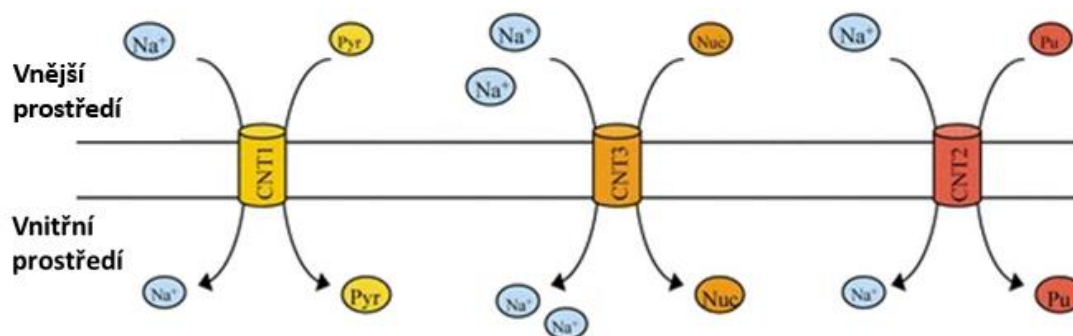
Pyrimidinové a purinové nukleosidy, včetně jejich derivátů, hrají důležitou roli ve fyziologii a mají různorodé farmakologické účinky. Slouží jako prekurzory nukleových kyselin nebo hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci. V klinické praxi jsou nukleosidová léčiva široce používána k léčbě nádorů a virových infekcí (King, *et al.*, 2006). Nukleosidy a jejich deriváty jsou hydrofilní, a proto je jejich dostupnost v buňkách a v extracelulárním prostředí závislá na specifických proteinech, nukleosidových transportérech (NTs), které usnadňují jejich pohyb přes cytoplazmatickou membránu a membrány některých organel (Baldwin *et al.*, 1999).

U lidí existují dvě rodiny nukleosidových transportérů, které zprostředkovávají fyziologický transport nukleosidů přes buněčnou membránu, rodina Na^+ dependentních proteinů SLC28, koncentračních nukleosidových transportérů (CNT1–3) a rodina Na^+ nezávislých proteinů SLC29, ekvilibračních nukleosidových transportérů (ENT1–4) (Young, 2016). CNT transportuje látky pouze dovnitř buňky, kdežto ENT dovnitř i ven z buňky (Obr. 11).



Obr. 11: Model transportu nukleosidů (Nuc) pomocí Na^+ dependentních koncentračních nukleosidových transportérů (CNT) a ekvilibračních nukleosidových transportérů (ENT) (upraveno podle Podgorska *et al.*, 2005).

Transportéry CNT jsou distribuovány například v mozku, placentě, srdci, játrech nebo v buňkách střeva (Gray *et al.*, 2004). Topologický model CNT proteinů se skládá z 13 transmembránových helixů s N-terminální oblastí umístěnou na cytoplazmatické straně. C-terminální hydrofilní část je umístěná v extracelulárním prostoru a je místem glykosylace (Podgorska *et al.*, 2005). CNT1 vykazuje selektivitu pro pyrimidinové nukleosidy a s nižší mírou pro adenosin, CNT2 pro purinové nukleosidy a uridin, CNT3 pro purinové i pyrimidinové nukleosidy (Obr. 12). Pomocí CNT1–3 jsou transportovány i protinádorová a antivirová léčiva. Mezi substráty lidského CNT1 patří cytotoxické analogy cytidinu, cytarabinu a gemcitabinu. CNT3 transportuje řadu protinádorových nukleosidových analogů včetně cladribinu, gemcitabinu, fludarabinu a zebularinu, Na rozdíl od CNT1 a 2 je CNT3 je široce distribuován v tkáních (Ritzel *et al.*, 2000).



Obr. 12: Selektivita koncentračních nukleosidových transportérů. CNT1 vykazuje selektivitu pro pyrimidinové nukleosidy, CNT2 pro purinové nukleosidy a CNT3 pro purinové i pyrimidinové nukleosidy (upraveno podle Ritzel *et al.*, 2000).

Transportéry ENT jsou obousměrné, mohou tedy zprostředkovávat jak uptake, tak eflux nukleosidových analogů (Baldwin *et al.*, 2004). ENT jsou přítomny ve většině typů tkání a buněk. Každý transportér ENT se skládá z 11 transmembránových domén, které jsou uspořádány v cytoplazmatické membráně tak, že N-konec je v cytoplazmě a C-konec se nachází v extracelulárním prostředí (Podgorska *et al.*, 2005). Lidské ENT1 a ENT2 transportují širokou škálu purinových a pyrimidinových nukleosidů. ENT3 je také široce distribuován, ale funguje převážně intracelulárně, v lysozomálních membránách. ENT4 se nachází v plazmatických membránách buněk mozku a srdce a transportuje adenosin a monoaminy (Parkinson *et al.*, 2011, Young *et al.*, 2013).

3.4 Rezistence na nukleosidové deriváty

Nukleosidy jsou důležitou třídou protinádorových léčiv pro solidní a hematologické malignity. Chemorezistence na protinádorová léčiva je hlavní příčinou selhání léčby, proto je nesmírně důležité objasnit mechanismy rezistence a identifikovat prediktivní markery inherentní a získané chemorezistence vůči nukleosidům pro lepší léčbu nádorů (Ciccolini *et al.*, 2016). V odborných publikacích již byly popsány mechanismy rezistence pro některá nukleosidová léčiva.

Pro zkoumání mechanismu buněčné rezistence u **6-merkaptopurinu** (MCP) byla vytvořena buněčná linie CCRF-CEM rezistentní na MCP. Analýza pomocí Western-blottingu ukázala, že u vytvořené rezistentní linie byla zvýšena exprese MRP4 proteinu, zatímco hladiny nukleosidových transportérů hENT1, hCNT2 a hCNT3 byly sníženy ve srovnání s rodičovskými CCRF-CEM buňkami. Souhrnně tyto výsledky ukázaly, že up-regulace MRP4 a down-regulace influxních transportérových proteinů hrály hlavní roli ve vzniku rezistence na MCP (Peng *et al.*, 2008).

Při studiu rezistence na **6-thioguanin** (THG) bylo zjištěno, že buňky s deficitem mismatch repair (MMR) byly rezistentní na THG až do $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$, zatímco buněčné linie schopné získat MMR byly významně citlivější při stejných úrovních expozice. Kromě toho byla mutagenní odpověď na hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu (HPRT), indukovaná THG, podstatně zvýšena u linií deficientních na MMR, ve srovnání s buněčnými liniemi schopnými MMR. Tato zjištění podporují názor, že cytotoxicita na THG je zprostředkována prostřednictvím funkčního MMR a rezistence na THG je přímo spojena se zvýšením indukovaných mutací v MMR defektních buňkách (Glaab *et al.*, 1998). Dále se ukázalo, že buňky rezistentní na THG exprimují více O-6-methylguanin-DNA methyltransferázy (MGMT), DNA opravného enzymu, který rozpoznává O-6-alkylovaný guanin (Gefen *et al.*, 2010).

Získaná rezistence na **fludarabin** (FLD) je velice častá, avšak mechanismy rezistence FLD v lymfomech jsou do značné míry neznámé. Data Lorkové *et al.* naznačila, že umlčení deoxycytidin kinázy (dCK) je pravděpodobnou příčinou mechanismu rezistence na FLD a zkřížené rezistence na jiné nukleosidové deriváty pyrimidinu a purinu. Kromě downregulace dCK bylo identifikováno několik sekundárních přispívajících nebo kompenzačních procesů spojených s rozvojem

rezistence na FLD. Neúčinné použití nukleosidů z prostředí indukuje replikační stres a činí rezistentní buňky vysoce závislé na *de novo* syntéze nukleotidů a účinné opravě DNA (Lorková *et al.*, 2015).

Rezistence na **cytarabin** (CTR) může být způsobena několika mechanismy. (1) CTR je aktivován fosforylací deoxycytidinovou kinázou (Cdr kináza), jejíž nedostatek může vést ke vzniku rezistence. K úplné rezistenci tímto způsobem dochází vzácně, protože vyžaduje inaktivaci obou alel genu kódujícího Cdr kinázu. (2) Dalším mechanismem rezistence na CTR je navýšení intracelulární hladiny deoxycytidin trifosfátu (dCTP) v buňkách. dCTP má dvojí účinek k antagonizaci působení CTR, zaprvé působí jako přirozený konkurenční inhibitor inkorporace CTR do DNA a zadruhé je inhibitorem zpětné vazby Cdr kinázy, který snižuje fosforylaci CTR. (3) Třetím mechanismem je deaminace CTR na uracil arabinosid cytidinovou deaminázou (CR deamináza), což vede k úplné ztrátě antineoplastické aktivity. Buňky nadměrně exprimující CR deaminázu, vykazují známky rezistence na CTR. K překonání tohoto typu rezistence vůči léčivu lze použít tetrahydrouridin, silný inhibitor CR deaminázy (Momparler, 2013).

Protinádorová rezistence na **5-fluorouracil** (5FU) může být způsobena různými příčinami. Nadměrná exprese thymidylát syntázy (TS), enzymu, který katalyzuje redukční metylaci deoxy-uridinmonofosfátu na thymidin-monofosfát, který je nezbytný pro replikaci a opravy DNA, je označována jako hlavní molekulární mechanismus zodpovědný za rezistenci vůči 5FU (Diasio *et Harris*, 1989). Dále dochází ke změnám influxu a efluxu léčiva, zvýšené inaktivaci léčiva a mutaci cílů léčiva. Zvýšená aktivita dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD), jež zprostředkovává konverzi 5FU na dihydrofluorouracil (DHFU) a zodpovídá za katabolismus 5FU, může vést k rezistenci na 5FU (Fukuda *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008).

Rezistence je u **gemcitabinu** (GEM) způsobena také mnoha způsoby. Transport GEM přes membránu je závislý na přítomnosti nukleosidových transportérů (hlavně na hENT1), přičemž buňky se sníženou expresí nukleosidových transportérů vykazovaly rezistenci. Dalším pravděpodobným mechanismem rezistence na GEM je krátké vystavení buněk léčivu v signifikantní koncentraci, přičemž rychlá deaminace způsobí pokles plazmatické koncentrace léčiva (Mackey *et al.*, 1998, Mohelníková-Duchoňová *et Souček*, 2010).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V experimentech byly použity buněčné linie K562 a CCRF-CEM. Všechny buněčné linie byly získány od společnosti American Tissue Culture Collection. Buněčná linie K562 je odvozena od chronické myeloidní leukémie a buněčná linie CCRF-CEM od akutní lymfoblastické leukémie. Mezi experimenty byly buňky kultivované v kultivačních láhvích o růstové ploše 150 cm² v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ atmosféře a 95% vlhkosti. Každá buněčná linie byla kultivována v médiu obohaceném o inaktivované fetální bovinní sérum a směs antibiotik (penicilin a streptomycin), v ISCOVE médiu buněčná linie K562 a v RPMI médiu buněčná linie CCRF-CEM.

4.2 Použité chemikálie, soupravy, roztoky a protilátky

Použité chemikálie

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium (MTS) (kat. č. G1111, PROMEGA)
- 4-nonylfenyl-polyethylen glykol (NP-40) (kat. č. 74385, SIGMA ALDRICH)
- 5-fluorouracil (kat. č. F6627, SIGMA ALDRICH)
- 6-merkaptopurin (kat. č. 852678, SIGMA ALDRICH)
- 6-thioguanin (kat. č. A4882, SIGMA ALDRICH)
- AB61 (ÚOCHB AV ČR ve spolupráci s ÚMTM)
- Cytarabin (kat. č. BP383, SIGMA ALDRICH)
- Dipyridamol (kat. č. D2850000, SIGMA ALDRICH)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (kat. č. D8418, SIGMA ALDRICH)
- Ethanol (kat. č. 437433T, VWR)
- Fetální bovinní sérum (FCSI) (kat. č. P110704, PAN-Biotech)
- Fludarabin (kat. č. Y0000419, SIGMA ALDRICH)
- Gemcitabin (kat. č. Y0000675, SIGMA ALDRICH)
- Hovězí sérový albumin (kat. č. A6793, SIGMA ALDRICH)
- Methanol (kat. č. 10202LP-20-10000, MIKROCHEM)

- Penicilin (kat. č. P3032, SIGMA ALDRICH)
- PNH 173 (ÚOCHB AV ČR ve spolupráci s ÚMTM)
- PNH192 (ÚOCHB AV ČR ve spolupráci s ÚMTM)
- Roskovitin (kat. č. R7772, SIGMA ALDRICH)
- Sterilní deionizovaná voda
- Streptomycin (kat. č. S6501, SIGMA ALDRICH)
- TRYPLE Tryple express (kat. č. 12604, GIBCO)

Použitá média

- ISCOVE médium (kat. č. 12-722F, LONZA)
- RPMI médium (kat. č. R8758, SIGMA ALDRICH)

Použité roztoky

- Blokační činidlo (100 ml roztoku cell wash, 500 mg BSA)
- Cell wash (kat. č. 349524, SIGMA ALDRICH)
- Fosfátový pufr (PBS) (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 1000 ml dH₂O)
- ISCOVE médium (ISCOVE + 50 ml 10% FCSI)
- Permeabilizační roztok (naředit 10× vodou vhodnou pro tkáňové kultury) (kat. č. 340973, SIGMA ALDRICH)
- Promývací roztok pro analýzu exprese MRP1 (0,5 % BSA, 0,1 % NaN₃, 1× PBS)
- Promývací roztok pro analýzu exprese P-glykoproteinu (20 ml roztoku cell wash, 100 mg BSA, 20 µl NP-40)
- RPMI médium (RPMI + 50 ml 10% FCSI)
- Saturační reagent pro receptory FC (naředit do 30 µl blokačního činidla pro každý vzorek) (kat. č. 732802, SIGMA ALDRICH)

Použité protilátky

Analýza exprese P-glykoproteinu

Primární protilátka Monoclonal Anti-P Glycoprotein produced in mouse (kat. č. P7965, Sigma-Aldrich)

Sekundární protilátka Anti-Mouse-IgG-FITC (kat. č. F2883, Sigma-Aldrich)

Izotopová kontrola IgG1 Isotype control from murine myeloma (kat. č. M5284, SigmaAldrich, USA)

Pro analýzu exprese P-glykoproteinu byly obě protilátky naředěny v poměru 1:250 v promývacím roztoku. Izotopová kontrola byla naředěna v poměru 1:140,8 také v promývacím roztoku.

Analýza exprese MRP1

Primární protilátka Human monoclonal antibody MRPm5 IgG2a (Alexis)

Sekundární protilátka Anti-Mouse-IgG-FITC (kat. č. F2883, Sigma-Aldrich)

Izotypová kontrola IgG2a Isotype control from murine myeloma (kat. č. M5409, SigmaAldrich)

Pro analýzu exprese MRP1 byla primární protilátka naředěna v poměru 1:200 a sekundární protilátka v poměru 1:250, obě byly naředěny promývacím roztokem. Izotopová kontrola byla naředěna v poměru 1:200 taktéž v promývacím roztoku.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Použité přístroje

- Analytické váhy (SCALTECH)
- Centrifuga 5810 R (EPPENDORF)
- Centrifuga Mini Spin (EPPENDORF)
- Centrifuga 5430 (EPPENDORF)
- Echo 550 Liquid Handler (LabCyte)
- EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)
- Inkubátor s CO₂ atmosférou (THERMOSCIENTIFIC)
- Magnetická míchačka MSH3 (Biosan)
- MultiDropTM Combi Reagent Dispenser
- Počítadlo buněk Vi-Cell XR (BECKMAN COULTER)
- Průtokový cytometr FACS Calibur (BD Biosciences)
- Světelný inverzní mikroskop Olmypus IX51 (OLYMPUS)
- Temperovaná vodní lázeň (Memmert)
- Třepačka Vortex Genie 2T (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

Software

- Cell Quest Flow Cytometry Software
- ClarisWorks 5.0
- Dotmatics
- GraphPad Prism 8
- Microsoft Excel
- Microsoft PowerPoint
- Microsoft Word

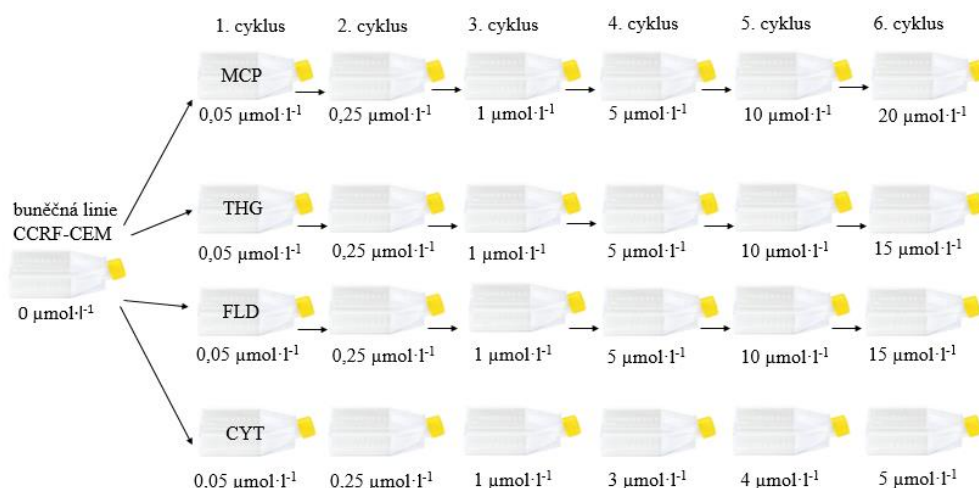
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

V diplomové práci byly použity následující experimentální a vyhodnocovací postupy.

4.4.1 Příprava linií rezistentních k purinovým a pyrimidinovým cytostatikům

V této diplomové práci byla použita purinová (6-merkaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, roskovitin) a pyrimidinová (gemcitabin, 5-fluorouracil, cytarabin) cytostatika. Buněčné linie byly kultivovány na kultivačních láhvích o růstové ploše 150 cm² v přítomnosti média obohaceného o inaktivované fetální bovinní sérum a antibiotika. Buňky v láhvích byly ošetřovány cytostatiky rozpuštěnými v DMSO.

Příprava rezistentních klonů k použitým cytostatikům, v případě buněčných linií CCRF-CEM a K562, trvala dva měsíce, kdy se k buňkám přidávaly látky ve stále se zvyšující koncentraci. Počáteční koncentrace byla 0,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byla koncentrace zvyšována podle stavu buněk (minimální životnost 90 % a minimální koncentrace $2\times 10^6/\text{ml}$ buněk). Zvyšování koncentrace proběhlo v šesti cyklech (Obr. 13).



Obr. 13: Schéma navýšování koncentrací léčiv při selekci rezistentních buněk odvozených od buněčné linie CCRF-CEM

Finální koncentrace jednotlivých látek jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 1). Po selekci byla stanovena inhibiční koncentrace IC_{50} pomocí MTS testu. Buňky buněčné linie CCRF-CEM byly reselektovány, znovu ošetřeny finálními koncentracemi látek a byl u nich opět proveden MTS test a tím byla ověřena jejich rezistence vůči testovaným látkám.

Tab. 1: Koncentrace látek po šesti cyklech ošetření u buněčných linií CCRF-CEM a K562

	Koncentrace látky u CCRF-CEM [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Koncentrace látky u K562 [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
MCP	20	15
THG	15	15
FLD	15	15
CYT	5	5

4.4.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} u selektovaných buněk pomocí MTS testu

Test je založen na principu přeměny 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium (MTS) na v buněčném kultivačním médiu rozpustný formazan. K této přeměně dochází pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách při teplotě 37 °C. Formazan se kvantifikuje spektrofotometricky a má maximální absorpenci při 490 nm. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk, které jsou přítomné ve vzorku. Z naměřených hodnot je poté určena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} , která udává koncentraci látky, která vyvolá 50 % maximálního buněčného poškození nebo apoptózu.

Pro testování inhibiční koncentrace IC_{50} byly připraveny buňky buněčné linie K562 o koncentraci $2,7 \cdot 10^4/\text{ml}$ a buňky buněčné linie CCRF-CEM o koncentraci $4 \cdot 10^4/\text{ml}$, poté byly automaticky napapipetovány pomocí přístroje MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser po 30 μl na 384jamkové panely SpectraPlate. Tyto panely

byly 24 hodin uloženy v inkubátoru při 37 °C, 5% obsahu oxidu uhličitého a 95% vlhkosti. Po inkubaci byly k buňkám přidány testované látky ve čtrnácti koncentracích $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $8,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě prvního testování a v případě druhého testování ve čtrnácti koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $8,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pomocí Echo 550 Liquid Handler. Jako pozitivní kontroly (100 % živých buněk) sloužily jamky s buňkami, ke kterým nebyla přidána žádná látka a jako negativní kontrola (100 % mrtvých buněk) byl použit roztok DMSO, do každé z jamek bylo přidáno 5 μl tohoto roztoku. Panely byly poté opět inkubovány po dobu 72 hodin. Po inkubaci byly ke všem vzorkům přidány 4 μl MTS, poté byly panely inkubovány 24 hodin. Následně byla na přístroji EnVision Multimode Plate Reader změřena jejich absorbance při vlnové délce 490 nm. Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 8, kde byly získány hodnoty IC_{50} .

4.4.3 Analýza exprese P-glykoproteinu průtokovou cytometrií

Analýza exprese P-glykoproteinu byla provedena pomocí průtokové cytometrie. Pro analýzu exprese P-glykoproteinu bylo použito $3\cdot 10^6$ vyselektovaných buněk buněčných linií CCRF-CEM a K562. Pozitivní kontrolou byly buňky buněčné linie K562 rezistentní k taxolům. Buňky byly zafixovány v methanolu. Zafixované buňky byly zcentrifugovány (5 min při 500 g). Poté byly propláchnuty 2 ml roztoku cell wash. K buňkám bylo následně přidáno 0,5 ml permeabilizačního roztoku a směs byla 10 minut inkubována, poté byla zcentrifugována a propláchnuta 2 ml promývacího roztoku (RB). Dále bylo přidáno 40 μl saturačního reagentu pro receptory FC. Směs se nechala opět inkubovat 10 minut, poté zcentrifugovat a promýt. Následně byly suspenze buněk rozděleny na dvě části po 1 ml, přičemž jedna část sloužila jako izotypová kontrola a do druhé bylo přidáno 40 μl primární protilátky pro P-glykoprotein. Obě části se nechaly 30 minut inkubovat ve tmě. Poté byly zcentrifugovány, promyty a do obou částí vzorku byla přidána sekundární protilátka konjugovaná s fluorescein isothiokyanátem (FITC) o objemu 40 μl . Po inkubaci, která trvala 30 minut, byly buňky zcentrifugovány, propláchnuty a rozsuspendovány v 0,5 ml blokačního činidla. Takto připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru pomocí argonového laseru ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Zpracování výsledků následně proběhlo v programu Cell Quest a následně byly exportovány v programu ClarisWorks.

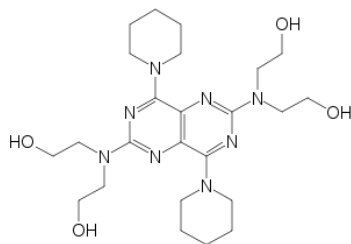
4.4.4 Analýza exprese MRP1 průtokovou cytometrií

Analýza exprese MRP1 byla provedena pomocí průtokové cytometrie. Pro analýzu exprese MRP1 bylo použito $3 \cdot 10^6$ vyselektovaných buněk buněčných linií CCRF-CEM a K562. Jako kontrola byly opět použity buňky buněčné linie K562 rezistentní k taxolům. Buňky byly zafixovány v methanolu. Zafixované buňky byly zcentrifugovány (5 min při 500 g). Následně byly promyty 1 ml PBS pufru a bylo k nim přidáno 0,5 ml permeabilizačního roztoku. Směs byla inkubována 10 minut, poté byly přidány 2 ml RB, buňky byly rozděleny na dvě části po 1 ml a proběhla centrifugace. Následně bylo do jedné části přidáno 100 μ l primární protilátky pro MRP1 a do druhé části 100 μ l izotypové kontroly. Obě části se nechaly inkubovat 60 minut ve tmě. Poté byly přidány 2 ml RB a vzorky byly zcentrifugovány. Následně bylo přidáno 100 μ l sekundární protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut. Poté byly opět přidány 2 ml RB a proběhla centrifugace. K peletu bylo přidáno 0,5 ml RB a následně byly připravené vzorky analyzovány stejně jako u P-glykoproteinu na průtokovém cytometru pomocí argonového laseru ($\lambda = 488$ nm). Zpracování výsledků následně proběhlo v programu Cell Quest a následně byly exportovány v programu ClarisWorks.

4.4.5 Inhibice nukleosidových transportérových proteinů u vyselektovaných buněčných linií odvozených od buněčné linie CCRF-CEM

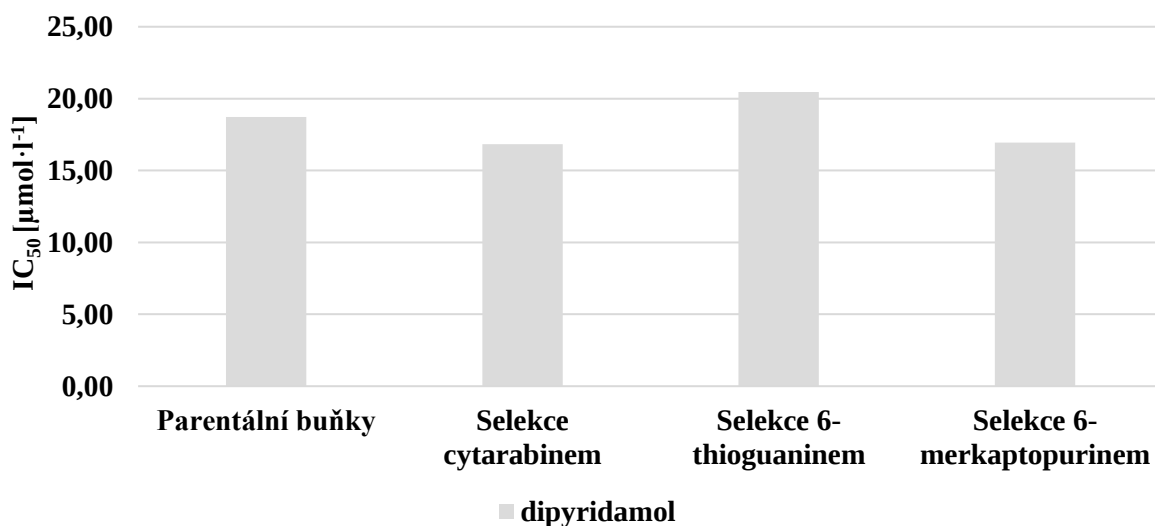
Nukleosidové transportérové proteiny lze inhibovat řadou látek. Mezi tyto látky patří dipyridamol, dilazep nebo nitrobenzylthioinosin. Jedná se o inhibitory ekvilibračních nukleosidových transportérů (Baldwin *et al.*, 2004).

Pro testování nukleosidových transportérů byla vybrána látka dipyridamol (Obr. 14), která inhibuje ENT1, ENT2 a ENT4 (Lin *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2013).



Obr. 14: Strukturní vzorec dipyridamolu

Nejprve byla pro dipyridamol stanovena míra cytotoxicity na vyselektovaných buňkách pomocí MTS testu. Dipyridamol byl na buňkách testován v koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $8,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledné hodnoty (Graf 1) byly použity pro nastavení optimální koncentrace dipyridamolu pro testování inhibice transportérových proteinů.



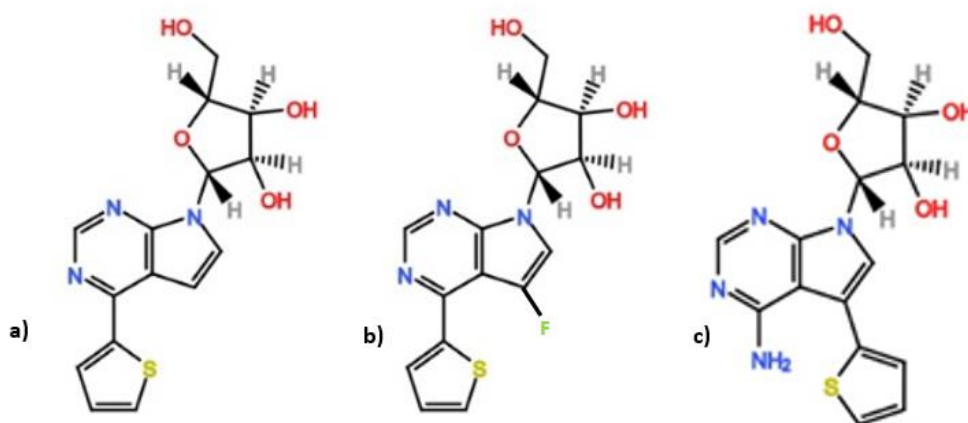
Graf 1: Hodnoty IC₅₀ dipyridamolu pro parentální buňky a vyselektované buněčné linie odvozené od buněčné linie CCRF-CEM

Testování inhibice transportérových proteinů dipyridamolem proběhlo opět pomocí MTS testu. Vždy byly připraveny vyselektované buňky odvozené od buněčné linie CCRF-CEM (buňky selektované 6-merkaptopurinem, 6-thioguaninem, cytarabinem a fludarabinem) o koncentraci $4\cdot 10^4/\text{ml}$ a byly automaticky napipetovány pomocí přístroje MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser po $30 \mu\text{l}$ na 384jamkové panely SpectraPlate. Tyto panely byly 24 hodin uloženy v inkubátoru při 37°C , 5% obsahu oxidu uhličitého a 95% vlhkosti. Po uplynutí inkubační doby byl v prvním případě k buňkám přidán dipyridamol v šesti koncentracích $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,083 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pomocí přístroje Echo 550 Liquid Handler. Po třiceti minutách působení inhibitoru byly k buňkám přidány v případě buněčné linie selektované 6-merkaptopurinem testované látky ve čtrnácti koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $8,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, u ostatních linií byly k buňkám přidány látky v devíti koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,76 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ve druhém případě byly k buňkám nejprve přidány látky opět v devíti koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,76 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a po jejich dvouhodinovém působení byl přidán inhibitor dipyridamol v šesti koncentracích $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,083 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Panely poté byly v obou případech inkubovány po dobu 72 hodin. Po inkubaci byly ke všem vzorkům přidány $4 \mu\text{l}$ MTS a panely byly

inkubovány 24 hodin. Následně byla na přístroji EnVision Multimode Plate Reader změřena jejich absorbance při vlnové délce 490 nm. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Dotmatics, kde byly získány hodnoty IC₅₀.

4.4.6 Testování potencionálních protinádorových léčiv na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM

Na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM byly testovány látky s nukleosidovou strukturou PNH173, PNH192 a AB61 (Obr. 15) patřící k potencionálním protinádorovým léčivům. Podle Perlíkové *et al.* vykazuje látka AB61 nanomolární cytotoxickou aktivitu proti různým nádorovým buněčným liniím, ale pouze mikromolární aktivitu proti normálním fibroblastům, kde na rozdíl od nádorových buněk není účinná fosforylace látky. Bylo prokázáno, že látka AB61 je do DNA i RNA inkorporována přednostněji než ribonukleotid a také, že trifosfát AB61 je substrátem pro DNA i RNA polymerázy v enzymatických testech (Perlíková *et al.*, 2016).



Obr. 15: Chemická struktura látek PNH173 (a), PNH192 (b), AB61 (c)

Látky byly testovány na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM pomocí MTS testu. Látky byly testovány dvakrát ve dvou technických a dvou biologických replikátech. Při prvním testování byly k vyselektovaným buňkám přidávány látky v koncentracích 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ –16,6 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a při druhém v koncentracích 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ –0,05 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

5 Výsledky

Cílem diplomové práce byl vývoj a charakteristika rezistentních linií vůči purinovým a pyrimidinovým cytostatikům.

5.1 Selektované buněčné linie

Rezistentní klony buněk odvozené od buněčných linií K562 a CCRF-CEM byly vyselektovány během asi dvouměsíčního působení purinových (6-merkaptopurin, 6-thioguanin a fludarabin) a pyrimidinových (cytarabin) cytostatik. Během selekce buňky získaly rezistenci proti testovaným cytostatikům, tedy k prostředí s koncentrací látky převyšující jejich běžnou hodnotu IC_{50} . Pomocí MTS testu byla po selekci buněk stanovena inhibiční koncentrace IC_{50} , udávající míru cytotoxicity látek.

5.2 Stanovená inhibiční koncentrace IC_{50} u selektovaných buněk pomocí MTS testu

Pro vyhodnocení cytotoxicity a stanovení, zda buňky získaly rezistenci na léčivo, byla stanovena IC_{50} , tedy hodnota udávající střední inhibiční koncentraci, která udává koncentraci látky vyvolávající 50 % maximálního buněčného poškození nebo apoptózu. Inhibiční koncentrace byla stanovena u selektovaných buněk buněčných linií CCRF-CEM a K562, které byly vystaveny působení purinových (merkaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, roscovitin) a pyrimidinových (gemcitabin, fluorouracil, cytarabin) cytostatik. S těmito látkami byl proveden i MTS test. Testování proběhlo v případě buněčné linie CCRF-CEM dvakrát ve dvou technických a ve dvou biologických replikátech a v případě buněčné linie K562 jednou na dvou technických a dvou biologických replikátech. Výsledky byly při prvním testování vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 8 a při druhém testování v programu Dotmatics. Z programů byly získány hodnoty IC_{50} . Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 2–7).

Byla tedy stanovena hodnota IC_{50} pro parentální buňky buněčné linie CCRF-CEM a pro odvozené selektované buňky. V tabulce (Tab. 2) jsou zaznamenány výsledky pro parentální buňky a buňky selektované fludarabinem a 6-merkaptopurinem. Z výsledků vyplývá, že buňky selektované fludarabinem získaly

rezistenci na fludarabin, 6-thioguanin, cytarabin a gemcitabin. Buňky selektované 6-merkaptopurinem získaly rezistenci kromě 6-merkaptopurinu také na 6-thioguanin.

Tab. 2: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u parentálních buněk buněčné linie CCRF-CEM a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem

CCRF-CEM	Parentální buňky		Selekce fludarabinem			Selekce 6-merkaptopurinem		
	IC_{50}	sd	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	0,75	0,21	>250	-	>333,33	>250	-	>333,33
6-merkaptopurin	0,47	0,03	0,19	0,10	0,40	>250	-	>531,91
Roskovitin	11,41	4,77	6,76	0,16	0,59	7,71	1,17	0,68
Cytarabin	0,0038	0,0029	0,06	0,02	15,79	0,01	0,0004	1,64
Fludarabin	1,04	0,21	46,53	5,15	44,74	0,83	0,01	0,80
5-fluorouracil	4,65	1,29	3,75	1,42	0,81	3,20	0,15	0,69
Gemcitabin	0,0047	0,0004	0,08	0,02	17,02	0,000093	0,00038	0,02

V tabulce (Tab. 3) jsou zaznamenány stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} u buněk buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem a cytarabinem. Buňky selektované 6-thioguaninem získaly rezistenci na 6-thioguanin a 6-merkaptopurin. Cytarabinem selektované buňky získaly rezistenci na cytarabin, 6-thioguanin, 6-merkaptopurin, fludarabin i gemcitabin.

Tab. 3: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] u odvozených buněk buněčné linie CCRF-CEM selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem

CCRF-CEM	Selekce 6-thioguaninem			Selekce cytarabinem		
	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	>250	-	>333,33	1,58	0,82	2,11
6-merkaptopurin	>250	-	>531,91	3,56	1,15	7,57
Roskovitin	9,78	0,78	0,86	11,28	0,97	0,99
Cytarabin	0,004	0,001	1,06	19,43	0,24	5113,16
Fludarabin	1,11	0,04	1,07	67,75	0,59	65,14
5-fluorouracil	4,85	0,14	1,04	8,63	0,78	1,85
Gemcitabin	0,00279	0,002	0,59	13,48	1,87	2868,09

Po šesti měsících byla pro ověření rezistence znovu stanovena hodnota IC_{50} pro parentální buňky buněčné linie CCRF-CEM a pro odvozené vyselektované buňky. V tabulce (Tab. 4) jsou zaznamenány výsledky pro parentální buňky a buňky selektované fludarabinem a 6-merkaptopurinem. Z výsledků vyplývá, že u buněk selektovaných fludarabinem klesla oproti prvnímu měření rezistence na 6-thioguanin,

fludarabin a gemcitabin, ale naopak vzrostla rezistence na cytarabin. U buněk selektovaných 6-merkaptopurinem byla zachována rezistence na 6-thioguanin a 6-merkaptopurin, ale poklesla rezistence na cytarabin.

Tab. 4: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] druhého měření u parentálních buněk buněčné linie CCRF-CEM a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem

CCRF-CEM	Parentální buňky		Selekce fludarabinem			Selekce 6-merkaptopurinem		
	IC_{50}	sd	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	1,80	0,11	0,04	0,01	0,02	>50	-	>27,83
6-merkaptopurin	5,24	0,56	0,16	0,01	0,03	>50	-	>9,55
Roskovitin	18,90	1,15	12,28	2,05	0,65	12,83	0,77	0,68
Cytarabin	0,006	0,00	0,27	0,08	45,00	0,006	0,00	1,00
Fludarabin	5,26	0,46	31,04	4,22	5,90	2,90	0,14	0,55
5-fluorouracil	26,53	0,50	0,45	0,04	0,01	13,40	1,91	0,51
Gemcitabin	0,006	0,00	0,01	0,00	1,67	0,006	0,00	1,00

V tabulce (Tab. 5) jsou zaznamenány stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} druhého měření u buněk buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem a cytarabinem. U buněk selektovaných 6-thioguaninem byla zachována rezistence na 6-thioguanin a 6-merkaptopurin a cytarabinem selektované buňky ztratily rezistenci na 6-thioguanin, ale rezistence na 6-merkaptopurin, cytarabin a gemcitabin vzrostla.

Tab. 5: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] druhého měření u odvozených buněk buněčné linie CCRF-CEM selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem

CCRF-CEM	Selekce 6-thioguaninem			Selekce cytarabinem		
	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	>50	-	>185,10	1,10	0,27	0,61
6-merkaptopurin	>50	-	>17,87	46,06	2,80	8,79
Roskovitin	11,81	0,95	0,63	14,45	0,63	0,76
Cytarabin	0,006	0,00	0,98	>50	-	>8196,72
Fludarabin	3,54	0,53	0,67	>50	-	>9,51
5-fluorouracil	10,98	2,46	0,41	>50	-	>1,89
Gemcitabin	0,006	0,00	0,98	19,95	0,46	3269,96

Inhibiční koncentrace IC_{50} byla stanovena i pro parentální buňky buněčné linie K562 a pro odvozené selektované buňky. V tabulce (Tab. 6) jsou zaznamenány výsledky pro parentální buňky a buňky selektované fludarabinem a 6-merkaptopurinem. U buněk selektovaných fludarabinem byl zaznamenán nárůst rezistence u fludarabinu, cytarabinu, 5-fluorouracilu a gemcitabinu. Buňky selektované 6-merkaptopurinem získaly kromě rezistence na 6-merkaptopurin také rezistenci na 6-thioguanin, cytarabin a 5-fluorouracil.

Tab. 6: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] u parentálních buněk buněčné linie K562 a odvozených selektovaných buněk fludarabinem a 6-merkaptopurinem

K562	Parentální buňky		Selekce fludarabinem			Selekce 6-merkaptopurinem		
	IC_{50}	sd	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	2,39	0,78	0,75	0,29	0,31	>250	-	>104,60
6-merkaptopurin	28,78	0,52	2,10	1,58	0,07	>250	-	>8,69
Roskovitin	12,74	4,00	25,62	11,33	2,01	11,66	5,40	0,92
Cytarabin	0,017	0,0001	0,86	0,10	50,59	0,06	0,0047	3,53
Fludarabin	47,30	6,85	>250	-	>5,29	18,42	3,41	0,39
5-fluorouracil	2,70	0,73	10,38	6,14	3,84	4,87	2,89	1,8
Gemcitabin	0,013	0,003	0,08	0,04	6,15	0,01	0,00028	1

V tabulce (Tab. 7) jsou zaznamenány stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} u buněk buněčné linie K562 selektované 6-thioguaninem a cytarabinem. Buňky selektované 6-thioguaninem získaly rezistenci na 6-thioguanin, 6-merkaptopurin, a gemcitabin. Buňky selektované cytarabinem získaly rezistenci na všechna léčiva kromě 6-merkaptopurinu.

Tab. 7: Stanovené inhibiční koncentrace IC_{50} [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] u odvozených buněk buněčné linie K562 selektovaných 6-thioguaninem a cytarabinem

K562	Selekce 6-thioguaninem			Selekce cytarabinem		
	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence	IC_{50}	sd	Násobek nárůstu rezistence
6-thioguanin	>250	-	>104,60	>250	-	>104,60
6-merkaptopurin	>250	-	>8,69	0,49	0,02	0,02
Roskovitin	8,18	0,80	0,64	15,64	0,08	1,23
Cytarabin	0,01	0,0028	0,57	47,97	16,02	2821,76
Fludarabin	5,01	1,83	0,11	>250	-	>5,29
5-fluorouracil	2,21	0,29	0,82	3,39	0,15	1,25
Gemcitabin	0,02	0,01	1,31	161,50	125,16	12423,08

5.3 Analýza exprese P-glykoproteinů průtokovou cytometrií

Pomocí průtokové cytometrie a specifických protilátek vázajících se na P-glykoprotein byla porovnána míra exprese tohoto proteinu mezi parentálními buňkami buněčných linií CCRF-CEM a K562 a jejich odvozených vyselektovaných rezistentních linií. Jako kontrola byly použity buňky buněčné linie K562 rezistentní k taxolům, které vykazují zvýšenou expresi P-glykoproteinu. U všech odvozených vyselektovaných rezistentních linií CCRF-CEM kromě linie selektované cytarabinem, byl pozorován nárůst exprese proteinu (Tab. 8). U linie selektované cytarabinem došlo k nepatrnému poklesu exprese proteinu. Nejvýraznější nárůst exprese u této linie byl u buněk selektovaných fludarabinem. Také u všech odvozených vyselektovaných rezistentních linií K562 byl pozorován nárůst exprese proteinu (Tab. 9). U buněk selektovaných 6-thioguaninem byl v porovnání s buňkami parentálními nárůst exprese 4,33× vyšší.

Tab. 8: Výsledky analýzy exprese P-glykoproteinu u buněčné linie CCRF-CEM, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly

Buněčná linie	Vzorek	IK	Poměr vzorek/IK	Nárůst exprese
CCRF-CEM	5,93	11,44	2,27	1,00
Selekce cytarabinem	25,25	12,30	2,05	0,90
Selekce 6-merkaptopurinem	50,03	13,40	3,73	1,65
selekce 6-thioguaninem	55,23	13,82	3,99	1,76
Selekce fludarabinem	48,70	11,04	4,41	1,94
K562 rezistentní k taxolům	68,54	11,14	6,15	2,71

Tab. 9: Výsledky analýzy exprese P-glykoproteinu u buněčné linie K562, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly

Buněčná linie	Vzorek	IK	Poměr vzorek /IK	Nárůst exprese
K562	102,74	11,76	8,74	1,00
Selekce cytarabinem	182,69	10,65	17,15	1,96
Selekce 6-merkaptopurinem	125,21	10,65	11,76	1,35
Selekce 6-thioguaninem	403,15	10,65	37,85	4,33
Selekce fludarabinem	120,79	10,46	11,55	1,32
K562 rezistentní k taxolům	289,03	12,19	23,71	2,71

5.4 Analýza exprese MRP1 průtokovou cytometrií

Pomocí průtokové cytometrie a specifických protilátek vázajících se na MRP1 byla porovnána míra exprese MRP1 mezi parentálními buňkami buněčných linií CCRF-CEM a K562 a jejich odvozených vyselektovaných rezistentních linií. Jako kontrola byly použity buňky buněčné linie K562 rezistentní k taxolům, které vykazují nízkou expresi MRP1. U všech odvozených vyselektovaných rezistentních linií buněčné linie CCRF-CEM byla exprese MRP1 snížena (Tab. 10), naopak u odvozených vyselektovaných rezistentních linií buněčné linie K562 došlo k nárůstu exprese proteinu MRP1, kromě buněk selektovaných fludarabinem, u kterých byla exprese snížena (Tab. 11).

Tab. 10: Výsledky analýzy exprese MRP1 u buněčné linie CCRF-CEM, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly

Buněčná linie	Vzorek	IK	Poměr vzorek/IK	Nárůst exprese
CCRF-CEM	1640,00	10,37	158,15	1,00
Selekce cytarabinem	1654,82	10,55	156,86	0,99
Selekce 6-merkaptopurinem	615,27	10,18	60,44	0,38
selekce 6-thioguaninem	827,88	10,18	81,32	0,51
Selekce fludarabinem	1165,22	9,91	117,58	0,74
K562 rezistentní k taxolům	798,63	9,39	85,05	0,54

Tab. 11: Výsledky analýzy exprese MRP1 u buněčné linie K562, odvozených vyselektovaných rezistentních linií a kontroly

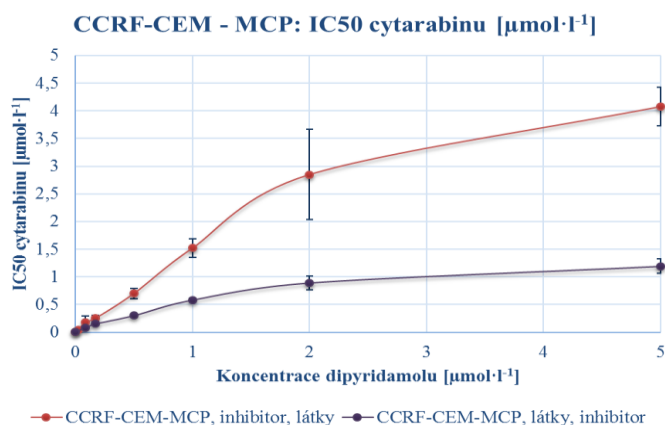
Buněčná linie	Vzorek	IK	Poměr vzorek /IK	Nárůst exprese
K562	138,24	9,06	15,26	1,00
Selekce cytarabinem	170,01	9,31	18,26	1,20
Selekce 6-merkaptopurinem	161,08	7,91	20,36	1,33
Selekce 6-thioguaninem	165,48	8,74	18,93	1,24
Selekce fludarabinem	77,74	6,04	12,87	0,84
K562 rezistentní k taxolům	203,51	9,82	20,72	1,36

5.5 Inhibice nukleosidových transportérových proteinů u vyselektovaných rezistentních buněčných linií odvozených od buněčné linie CCRF-CEM

Testování inhibice nukleosidových transportérových proteinů proběhlo pomocí MTS testu. Na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM byla testována látka dipyridamol, jež je inhibitorem ekvilibračních nukleosidových transportérů 1, 2 a 4. Dipyridamol byl k buňkám přidáván v šesti koncentracích $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,083\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Testování proběhlo dvojím způsobem. V případě prvního byl k buňkám nejprve přidán inhibitor a po třiceti minutách působení byly přidány testované látky a u druhého způsobu byly nejprve přidány testované látky a po dvou hodinách působení byl přidán inhibitor.

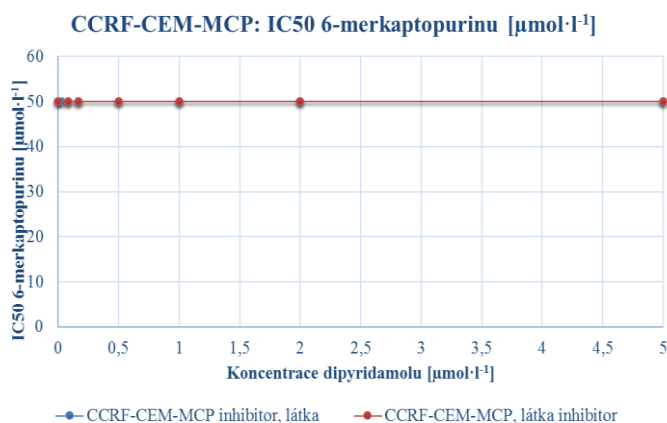
Výsledky testování inhibice nukleosidových transportérových proteinů jsou vyobrazeny v grafech (Graf 2–11), které byly vytvořeny v programu Microsoft Excel. V grafech jsou zaznamenány výsledky působení inhibitoru dipyridamolu na buněčnou linii CCRF-CEM selektovanou 6-merkaptopurinem. Červená spojnice vyjadřuje výsledky působení inhibitoru, který byl k buňkám přidán, a po jeho třicetiminutovém působení bylo přidáno léčivo. Modrá spojnice vyjadřuje výsledky působení léčiva (látky) po dobu dvou hodin a poté přidaného inhibitoru dipyridamolu.

Z grafu 2 vyplývá, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru dipyridamolu dochází i k navýšení hodnoty IC_{50} cytarabinu. Hodnota IC_{50} bez přidaného inhibitoru byla $0,0061\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě prvního způsobu testování (červená spojnice) a v případě druhého byla $\text{IC}_{50}\text{ }0,008\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při koncentraci dipyridamolu $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla IC_{50} u červené spojnice $4,08\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a v případě modré spojnice byla $\text{IC}_{50}\text{ }1,19\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



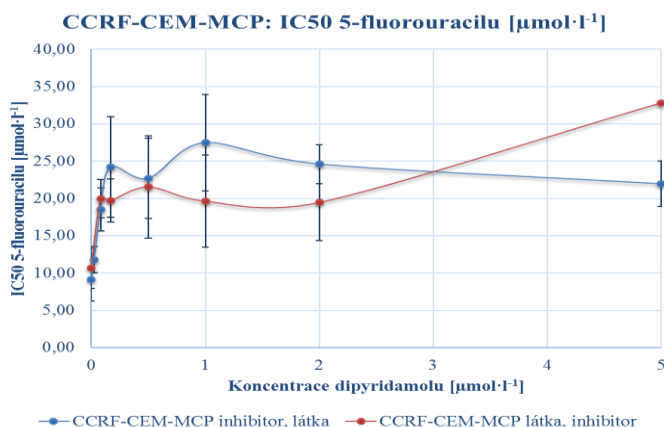
Graf 2: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté cytarabinem (červená) a naopak ošetřené cytarabinem a následně inhibitorem (modrá)

Graf 3 ukazuje, že přidání dipyridamolu nemělo ani v jednom způsobu testování žádný účinek na působení 6-merkaptopurinu, hodnota IC₅₀ byla větší než 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



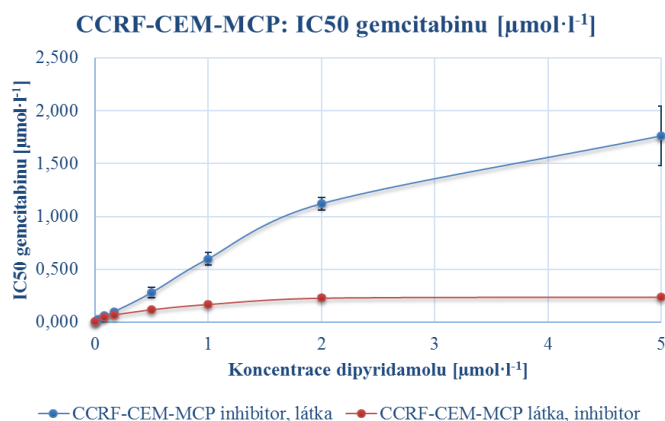
Graf 3: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 6-merkaptopurinem (červená) a naopak ošetřené 6-merkaptopurinem a následně inhibitorem (modrá)

Graf 4 ukazuje, že u modré spojnice došlo při podání dipyridamolu nejdříve k nárůstu IC_{50} , kdy IC_{50} 5-fluorouracilu bez podání inhibitoru byla $9,15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a po podání dipyridamolu o koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se hodnota zvedla na $27,48 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při koncentraci dipyridamolu větší než $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k poklesu hodnoty IC_{50} . V případě červené spojnice došlo k nárůstu IC_{50} z $10,63 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (IC_{50} 5-fluorouracilu bez inhibitoru) na $32,83 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při koncentraci dipyridamolu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



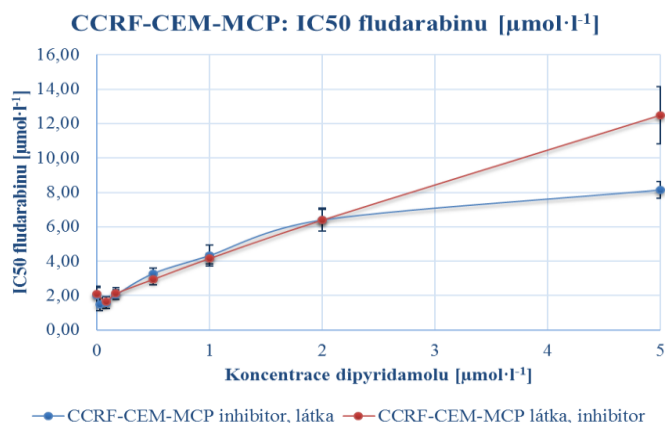
Graf 4: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 5-fluorouracilem (červená) a naopak ošetřené 5-fluorouracilem a následně inhibitorem (modrá)

Z grafu 5 vyplývá, že k významnému efektu inhibitoru došlo pouze v případě modré spojnice, kdy byl k buňkám nejprve přidán dipyridamol a poté gemcitabin. Hodnota IC_{50} vzrostla z $0,006 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $1,76 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V opačném případě, u červené spojnice, došlo k nárůstu IC_{50} z $0,008 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $0,24 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



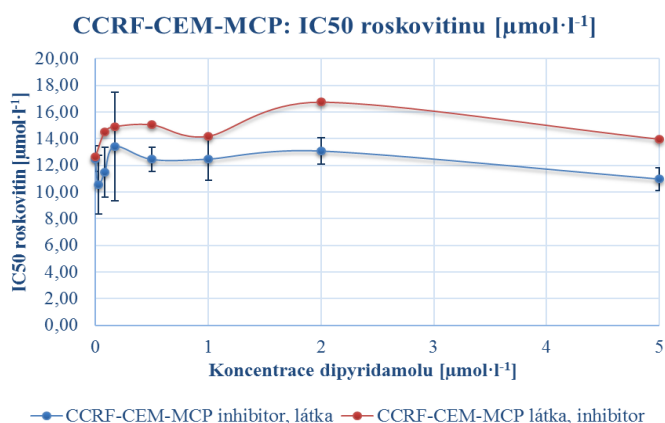
Graf 5: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté gemcitabinem (červená) a naopak ošetřené gemcitabinem a následně inhibitorem (modrá)

Při testování inhibitoru společně s léčivem fludarabinem došlo dle grafu 6 k nárůstu IC_{50} u obou spojnic. V případě červené byl nárůst výraznější, z $2,08 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na $12,47 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a u modré spojnice z $2,03 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na $8,16 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



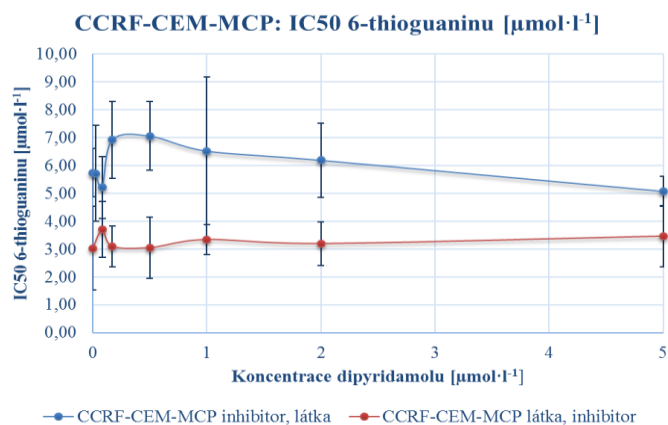
Graf 6: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyrindamolem a poté fludarabinem (červená) a naopak ošetřené fludarabinem a následně inhibitorem (modrá)

Z grafu 7 lze vyčíst, že působení inhibitoru mělo na buňky podobný efekt při obou způsobech testování roskovitinu. U modré spojnice byla počáteční hodnota IC_{50} u roskovitinu $12,49 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a nejvyšší nárůst byl zaznamenán při koncentraci $0,17 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dipyrindamolu na hodnotu $13,43 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. U červené spojnice byla na počátku hodnota IC_{50} roskovitinu $12,62 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a nejvyšší nárůst byl při koncentraci $2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na hodnotu $16,77 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 7: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyrindamolem a poté roskovitinem (červená) a naopak ošetřené roskovitinem a následně inhibitorem (modrá)

Graf 8 ukazuje, že při prvním způsobu testování inhibitoru u látky 6-thioguaninu došlo k nejvyššímu nárůstu IC_{50} při $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dipyridamolu, z $5,74 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $7,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při vyšších koncentracích docházelo k poklesu IC_{50} 6-thioguaninu. V případě druhého testování (červená spojnice) byl nejvyšší nárůst IC_{50} při $0,083 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dipyridamolu, z $3,03 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $3,70 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, poté se hodnoty v grafu pohybovaly průměrně kolem $3,234 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf 8: Buňky buněčné linie CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem (MCP) ošetřené inhibitorem dipyridamolem a poté 6-thioguaninem (červená) a naopak ošetřené 6-thioguaninem a následně inhibitorem (modrá)

5.6 Testování potencionálních protinádorových léčiv

Na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM byly testovány látky s nukleosidovou strukturou PNH173, PNH192 a AB61 patřící k potencionálním protinádorovým léčivům. Látky byly testovány na buněčných liniích pomocí MTS testu. Látky byly testovány dvakrát. Při prvním testování byly k selektovaným buňkám přidávány látky v koncentracích $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $16,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a při druhém v koncentracích $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z výsledků (Tab. 12 a 13) vyplývá, že po ošetření buněk látkami, vykazovala látka PNH173 vysokou aktivitu ($<1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na všech vyselektovaných rezistentních liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM. Její aktivita byla na vyselektovaných rezistentních liniích vyšší než na linii parentální. Látka PNH192 byla vysoce aktivní na vyselektovaných rezistentních liniích na 6-merkaptopurin, 6-thioguanin a cytarabin. Vyselektovaná rezistentní linie na fludarabin byla na látku PNH192 rezistentní. Látka AB61 vykazovala vysokou aktivitu na vyselektovaných rezistentních liniích na 6-merkaptopurin a 6-thioguanin. Vyselektované rezistentní linie na fludarabin a cytarabin byly na látku AB61 vysoce rezistentní.

Tab. 12: Míra cytotoxicity látek PNH173, PNH192 a AB61 na buněčné linii CCRF-CEM a od ní odvozených linií selektovaných fludarabinem a cytarabinem

Látka	CCRF-CEM		Selekce fludarabinem			Selekce cytarabinem		
	IC ₅₀	sd	IC ₅₀	sd	Násobek zvýšené rezistence	IC ₅₀	sd	Násobek zvýšené rezistence
PNH173	0,389	0,321	0,625	0,003	1,61	0,018	0,001	0,05
PNH192	0,068	0,005	0,608	0,068	8,95	0,020	0,000	0,30
AB61	0,020	0,003	9,180	1,030	463,38	50,620	9,620	2556,57

*Hodnoty IC₅₀ jsou udávány v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Tab. 13: Míra cytotoxicity látek PNH173, PNH192 a AB61 na buněčné linii CCRF-CEM a od ní odvozených linií selektovaných 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem

Látka	Selekce 6-merkaptopurinem			Selekce 6-thioguaninem		
	IC ₅₀	sd	Násobek zvýšené rezistence	IC ₅₀	sd	Násobek zvýšené rezistence
PNH173	0,010	0,001	0,030	0,029	0,001	0,070
PNH192	0,008	0,001	0,120	0,045	0,018	0,660
AB61	0,004	0,000	0,230	0,015	0,003	0,780

*Hodnoty IC₅₀ jsou udávány v $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

6 Diskuse

V předložené diplomové práci jsem se zabývala přípravou a charakterizací rezistentních linií k purinovým a pyrimidinovým cytostatikům. Tyto line byly zvoleny s ohledem na jejich medicínálně relevantní histogenetický původ. Pro účely práce byla vybrána purinová (6-merkaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin, roskovitin) a pyrimidinová (gemcitabin, 5-fluorouracil, cytarabin) protinádorová léčiva, jejichž původ, klinické využití a mechanismus účinku je rozebrán v teoretické části práce. Dále byla úvodní část práce věnována významu rezistence nádorových buněk, která při léčení nádorů představuje velký problém a její překonání je jednou z hlavních výzev v léčbě pokročilých a metastazujících nádorů.

V experimentální části práce byla pro přípravu rezistentních linií vybrána buněčná linie CCRF-CEM, která má svůj původ odvozený od akutní lymfoblastické leukémie a buněčná linie K562 odvozená od chronické myeloidní leukémie. Buňky těchto buněčných linií byly selektovány vybranými léčivy. Při selekci, která trvala přibližně dva měsíce, docházelo v šesti cyklech k postupnému navyšování koncentrací látek. Na selektovaných buněčných liniích byl poté pro stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} proveden MTS test.

Po porovnání hodnot IC_{50} parentálních a odvozených vyselektovaných buněk buněčné linie CCRF-CEM, které byly získány prvním MTS testem, bylo zjištěno, že buňky selektované fludarabinem získaly rezistenci kromě samotného fludarabinu také na 6-thioguanin, cytarabin a gemcitabin. Nejvýraznější nárůst rezistence byl pozorován u selekce 6-thioguaninem, přičemž jeho násobek nárůstu rezistence byl v porovnání s IC_{50} parentálních buněk $> 333,33\times$.

U buněk selektovaných 6-merkaptopurinem byla pozorována nejvýraznější rezistence na 6-merkaptopurin, oproti parentálním buňkám byl nárůst IC_{50} větší než $531,91\times$, tyto buňky získaly rezistenci i na 6-thioguanin a cytarabin. Buňky selektované 6-thioguaninem získaly rezistenci na 6-thioguanin a 6-merkaptopurin, u kterého byl nárůst nejvyšší, hodnota IC_{50} byla $531,91\times$ vyšší než u parentálních buněk. V případě buněk selektovaných cytarabinem došlo k vysokému nárůstu rezistence na cytarabin ($5113,16\times$) a na gemcitabin ($2868,09\times$).

Po druhém MTS testu, který byl na těchto buňkách proveden v odstupu čtyřiceti kultivačních pasáží bez selekčního tlaku, bylo zjištěno, že u buněk selektovaných fludarabinem klesla oproti prvnímu měření rezistence na 6-thioguanin, fludarabin a gemcitabin, ale naopak vzrostla rezistence na cytarabin. U buněk selektovaných 6-merkaptopurinem poklesla rezistence na cytarabin. Cytarabinem selektované buňky ztratily rezistenci na 6-thioguanin a rezistence na 6-merkaptopurin, cytarabin a gemcitabin vzrostla. Změny mohly nastat v důsledku odstranění selekčního tlaku léčiva na buňky.

U odvozených selektovaných buněk buněčné linie K562 se profil výsledků od buněčné linie CCRF-CEM lišil. U buněk selektovaných fludarabinem byla pozorována rezistence na fludarabin, 5-fluorouracil, gemcitabin a cytarabin, u kterého byl nárůst rezistence v porovnání s parentálními buňkami $50,59\times$ větší. Buňky selektované 6-merkaptopurinem vykazovaly rezistenci na 6-merkaptopurin, cytarabin, 5-fluorouracil a na 6-thioguanin, u kterého byl nárůst nejvyšší, hodnota IC_{50} byla $104,6\times$ vyšší než u parentálních buněk. V případě buněk selektovaných 6-thioguaninem byla pozorována nejvýraznější rezistence na samotný 6-thioguanin. Oproti parentálním buňkám byl nárůst IC_{50} léčiva $> 104,6\times$, přičemž tyto buňky získaly rezistenci i na 6-merkaptopurin a gemcitabin. Buňky, které byly selektovány cytarabinem získaly rezistenci na všechna testovaná léčiva kromě 6-merkaptopurinu. V porovnání s parentálními buňkami byl výrazný nárůst rezistence u léčiva cytarabinu ($28821,76\times$) a u gemcitabinu ($12423,08\times$).

Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že mezi testovanými léčivy vzniká zkřížená léková rezistence. Tuto hypotézu potvrzuje i odborná literatura. V článku od Sartorelli *et al.* byla popsána zkřížená rezistence mezi strukturně podobnými 6-thioguaninem a 6-merkaptopurinem a tým Klanová *et al.* popsal zkříženou rezistenci mezi nukleosidovými analogy cytarabinem, gemcitabinem (pyrimidinové deriváty) a fludarabinem (purinový derivát). U všech tří léčiv, i přes jejich odlišný původ, dochází po vstupu léčiva do buňky k fosforylaci pomocí kinázy, která léčivo aktivuje, což je nezbytné pro jejich cytotoxicitu (Sartorelli *et al.*, 1958, Klanová *et al.*, 2014). Rezistence tudíž může být způsobena poklesem aktivity těchto kináz. Léčivo tedy není aktivováno a je z buňky uvolněno bez účinku.

Pro základní charakteristiku selektovaných rezistentních buněk byla provedena analýza exprese P-glykoproteinu a MRP1 pomocí průtokové cytometrie. Tyto dva proteiny patří mezi ABC transportéry, které byly nalezeny u skoro všech nádorových buněk u lidí, jež vykazovaly MDR, a proto se předpokládá, že jsou významnými efluxními transportéry zodpovědnými za MDR (Dean *et al.*, 2001).

U všech odvozených selektovaných linií CCRF-CEM, kromě linie selektované cytarabinem, byl pozorován pouze mírný nárůst exprese P-glykoproteinu (1,65–1,94×). U buněčné linie K562 byl pozorován nárůst exprese tohoto proteinu u všech odvozených selektovaných linií (1,32–1,96×). U buněk selektovaných 6-thioguaninem byl nárůst exprese nejvyšší (4,33×). V případě rezistentních linií odvozených od CCRF-CEM byla exprese MRP1 proteinu snížena. Naproti tomu, u všech rezistentních klonů odvozených od buněčné linie K562 došlo k nárůstu exprese MRP1 proteinu (1,20–1,36×), s výjimkou linie selektované fludarabinem, u které byla exprese proteinu MRP1 snížena. Z výsledků lze tedy usuzovat, že vzniklá rezistence na studovaná léčiva nebude zapříčiněna těmito dvěma transportními proteiny.

Protože všechny testované látky patří do skupiny nukleosidových derivátů, které procházejí do buňky přes nukleosidové transportérové proteiny, byla pomocí funkčního testu otestována jejich aktivita (Baldwin *et al.*, 1999). K buňkám byl přidán inhibitor dipyridamol, který inhibuje ekvilibrační nukleosidové transportéry 1, 2 a 4 (Lin *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2013). Testování látek spolu s dipyridamolem proběhlo na buněčné linii CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem.

Hypotézou bylo, že po přidání inhibitoru, vzroste hodnota IC_{50} testované látky, poněvadž se nedostane přes inhibované nukleosidové transportérové proteiny do buňky. Tato hypotéza byla potvrzena u léčiv cytarabinu, gemcitabinu, fludarabinu a 5-fluorouracilu. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru docházelo k nárůstu hodnoty IC_{50} . V případě gemcitabinu tuto hypotézu potvrzuje i literatura, v níž se uvádí, že je léčivo transportováno přes plazmatickou membránu pomocí ENT1 (Plunkett *et al.*, 1995). Tato skutečnost naznačuje, že po zablokování ENT1 může dojít ke vzniku rezistence na gemcitabin. U 6-merkaptopurinu, který měl $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, neměl inhibitor žádný vliv. Přestože je 6-thioguanin, podle Nagai *et al.*, substrátem pro ENT2, nemělo na něj přidání inhibitoru téměř žádný vliv (Nagai *et al.*, 2007).

Z toho je možné usuzovat, že naše rezistentní linie mají preferenční expresi ENT1 a ne ENT2. Přesnou míru exprese uvažovaných transportérů by bylo možné identifikovat pomocí Western blottingu anebo na úrovni mRNA pomocí metody PCR. Na roskovitin neměl dipyridamol téměř žádný vliv.

Na vyselektovaných rezistentních buněčných liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM byly otestovány látky PNH173, PNH192 a AB61, které jsou vyvíjeny jako potenciální protinádorová léčiva s nukleosidovou strukturou. Výsledky ukázaly, že látka PNH173 vykazovala vysokou aktivitu ($<1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na všech vyselektovaných rezistentních liniích odvozených od buněčné linie CCRF-CEM. Její aktivita byla na těchto rezistentních klonech vyšší než na linii parentální. Tento fakt může být způsoben například cíleným nebo synergickým účinkem látky na proteiny způsobující rezistenci u vyselektovaných buněk, které logicky chybí u buněk parentální linie. Látka PNH192 byla vysoce aktivní na vyselektovaných rezistentních liniích na 6-merkaptopurin, 6-thioguanin a cytarabin. Fludarabinem vyselektovaná rezistentní linie byla na látku PNH192 rezistentní. Látka AB61 vykazovala vysokou aktivitu na vyselektovaných rezistentních liniích na 6-merkaptopurin a 6-thioguanin. Vyselektované rezistentní linie na fludarabin a cytarabin byly na látku AB61 vysoce rezistentní. Na základě výsledků se nejslibněji jeví látky PNH173 a PNH192, které by se potencionálně v budoucnosti mohly podílet na léčbě nádorů nebo jako sekundární léčba při vzniku rezistence na běžně se používající cytostatika. Domnívám se, že v této souvislosti by bylo vhodné vyselektovat rezistentní buněčné linie a prostudovat mechanismy vzniku rezistence na tyto nové nadějně analogy, což bude pravděpodobně práce pro nadcházející studium. Látka AB61 má zkříženou rezistenci vůči známým cytostatikům, tudíž by nebylo vhodné ji použít v kombinaci s těmito látkami při léčbě.

7 Závěr

V teoretické části byla vypracována aktuální rešeršní práce na téma molekulární mechanismy účinku purinových a pyrimidinových cytostatik. Dále byla obecně popsána rezistence na cytostatická léčiva včetně mnohočetné lékové rezistence a rezistence na nukleosidové deriváty.

V experimentální části byly úspěšně vyselektovány rezistentní linie CCRF-CEM a K562 na purinová a pyrimidinová cytostatika. U buněk byla stanovena hodnota IC_{50} , která potvrdila vznik rezistence. U buněk byla pozorována zkřížená rezistence mezi 6-thioguaninem a 6-merkaptopurinem a mezi fludarabinem, gemcitabinem a cytarabinem. Byla provedena základní charakteristika selektovaných buněk a to exprese P-glykoproteinu a MRP1 proteinu a byl proveden funkční test, kdy byly inhibovány nukleosidové transportérové proteiny jejich inhibitorem dipyridamolem. Testování ukázalo, že zablokováním těchto transportérů dojde u některých léčiv, ku příkladu u gemcitabinu, k navýšení hodnoty IC_{50} , buňka je tedy odolnější a její rezistence na léčivo roste.

Závěrečnou fází práce bylo testování nových potencionálních protinádorových léčiv na vyselektovaných rezistentních liniích. Výsledky tohoto testu ukázaly, že látky PNH173, PNH 192 s výjimkou AB61, mají vysokou aktivitu na těchto buňkách a daly by se tedy v budoucnosti využívat při léčbě nádorů v první linii nebo jako sekundární léčba při vzniku rezistence na klinicky využívaná cytostatika.

8 Literatura

Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S. P., Tang L., Jiang T., Liang D., Galons H., Dierick J. F., Pinna L. A., Meggio F., Totzke F., Schächtele C., Lerman A. S., Carnero A., Wan Y., Gray N., Meijera L. (2005). Roscovitine Targets, Protein Kinases and Pyridoxal Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31208–31219.

Bakos E., Homolya L. (2007). Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453, 621–641.

Baldwin S. A., Beal P. R., Yao S. Y. M., Young J. D., King A. E., Cass C. E. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447, 735–743.

Baldwin S. A., Mackey J. R., Cass C. E., Young J. D. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Molecular Medicine Today*, 5(5), 216–224.

Biedler J. L. a Riehm H. (1970). Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies. *Cancer research*, 30, 1174–1184.

Brown R., Links M. (1999). Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1(15), 1–21.

Burchenal J. H., Murphy M. L., Ellison R. R., Sykes M. P., Tan T. C., Leone L. A., Karnofsky D. A., Craver L. F., Dargeon H. W., Rhoads C. P. (1953). Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*. 8(11), 965–999.

Callen D. F., Baker E., Simmers R. N., Seshadi R., Roninson I. B. (1987). Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Human Genetics*, 77, 142–144.

- Ciccolini J., Serdjebi C., Le Thi Thu H., Lacarelle B., Milano G., Fanciullino R. (2016). Nucleoside analogs: ready to enter the era of precision medicine? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(8), 865–877.
- Cole S., Bhardwaj G., Gerlach J., Mackie J., Grant C., Almquist K., Deeley, R. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258(5088), 1650–1654.
- de Campos-Nebel M., Larripa I., González-Cid M. (2008). Non-homologous end joining is the responsible pathway for the repair of fludarabine-induced DNA double strand breaks in mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 646(1–2), 8–16.
- Dean, M. (2009). ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(1), 3–9.
- Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42, 1007–1017.
- Diasio, R. B., Harris, B. E. (1989). Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics*, 16(4), 215–23.
- Fukuda H., Takiguchi N., Koda K., Oda K., Seike K., Miyazaki M. (2006). Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase are Related to Histological Effects of 5-Fluorouracil and Cisplatin Neoadjuvant Chemotherapy for Primary Gastric Cancer Patients. *Cancer Investigation*, 24(3), 235–241.
- Gandhi, V., Plunkett, W. (2002). Cellular and Clinical Pharmacology of Fludarabine. *Clinical Pharmacokinetics*, 41, 93–103.
- Gefen N., Brkic G., Galron D., Priel E., Ozer J., Benharroch D., Gopas J. (2010). Acquired resistance to 6-thioguanine in melanoma cells involves the repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). *Cancer Biology & Therapy*, 9(1), 49–55.

- Glaab, W., Risinger J. I., Umar A., Barrett J. C., Kunkel T. A., Tindall K. R. (1998). Resistance to 6-thioguanine in mismatch repair-deficient human cancer cell lines correlates with an increase in induced mutations at the HPRT locus. *Carcinogenesis*, 19(11), 1931–1937.
- Gray J. H., Owen R. P., Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), 728–734.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997). Cytokinin-Derived Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and cdc2 Inhibitory Activity of Olomoucine and Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4), 408–412.
- Heidelberger C., Chaudhuri N. K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Scheiner J. (1957). Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*, 179(4561), 663–666.
- Hitchings G. H. a Elion G. B. (1954). The chemistry and biochemistry of purine analogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 60(2), 195–199.
- Honjo Y., Hrycyna C. A, Yan Q. W., Medina-Pérez W. Y. , Robey R. W., Laar A., Litman T., Dean M., Bates S. E. (2001). Acquired Mutations in the MXR/BCRP/ABCP Gene Alter Substrate Specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing Cells. *Cancer Research*, 61(18), 6635–6639.
- Chalupná P, Lukáš M, Šroubková R, Bortlík M, Stříteský J, Kumšta M, Šebesta I. (2004). 6-thioguanine therapy in inflammatory bowel disease. *Folia Gastroenterol Hepatol*, 2(3), 112–120.
- Juliano R. L., Ling V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455, 152–162.
- Keating M. J., Kantarjian H., Talpaz M., Redman J., Koller C., Barlogie B., Velasquez W., Plunkett W., Freireich E. J., McCredie K. B. (1989). Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 74(1), 19–25.

Khalil H. S., Mitev V., Vlaykova T., Cavicchi L., Zhelev N. (2015). Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. *Journal of Biotechnology*, 202, 40–49.

King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 416–425.

Klanová M., Lorková L., Vít O., Maswabi b., Molinský J., Pospíšilová J., Vocková P., Mavis C., Latecková L., Kulvait V., Vejmelková D., Jaksa R., Hernandez F., Trněný M., Vokurka M, Petrak J., Klener P. (2014). Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular Cancer*, 13, 159.

Klener P., (2002). *Klinická onkologie*, Praha: Galén. ISBN 80-7262-151-3.

Kocurová A. (2011): ABC transportéry a léková rezistence. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Krishna, R a Mayer, L. D. (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. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 265–283.

Lin W. a Buolamwini J. K. (2007). Synthesis, Flow Cytometric Evaluation, and Identification of Highly Potent Dipyridamole Analogues as Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(16), 3906–3920.

Lorkova L., Scigelova M., Arrey T. N., Vit O., Pospisilova J., Doktorova E., Klanova M., Alam M., Vockova P., Maswabi1 B., Klener P., Petrak J. (2015). Detailed Functional and Proteomic Characterization of Fludarabine Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells. *PLOS ONE*, 10(8).

Mackey J. R., Mani R. S. , Seiner M., Mowles D., Young J. D., Belt J. A., C. R. Crawford, Cass C. E. (1998). Functional Nucleoside Transporters Are Required for Gemcitabine Influx and Manifestation of Toxicity in Cancer Cell Lines. *Cancer research*, 58, 4349–4357.

Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J. P., Blow J. J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J. G., Moulinoux J. P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*, 243: 527–536.

Mohelníková-Duchoňová B., Souček P. (2010). Role membránových transportérů v chemorezistenci karcinomu pankreatu při terapii gemcitabinem. *Klinická onkologie*, 23(5): 306–310.

Momparler R. L. (2013). Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*, 2(1), 20.

Munshi P. N., Lubin M., Bertino R. J. (2014). 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy. *The Oncologist*, 19(7), 760–765.

Nagai K., Nagasawa K., Kihara Y., Okuda H., Fujimoto S. (2007). Anticancer nucleobase analogues 6-mercaptopurine and 6-thioguanine are novel substrates for equilibrative nucleoside transporter 2. *International Journal of Pharmaceutics*, 333(1–2), 56–61.

Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K. (2002). Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi: I. Typická MDR. *Klinická onkologie*, 2.

Parkinson E. F., Damaraju L. V., Graham K., Yao Y. M. S., Baldwin A. S., Cass E. C., Young D. J. (2011). Molecular Biology of Nucleoside Transporters and their Distributions and Functions in the Brain. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(8), 948–972.

Peng X. X., S. Z. Damaraju, V. L. Huang, X. C. Kruh, G. D. Wu H. C., Zhou Y., Tiwari A., Fu L., Cass C. E., Chen Z. S. (2008). Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leukemia Research*, 32(5), 799–809.

Perlíková P., Rylová, G., Nauš P., Elbert T., Tloustová E., Bourderioux, A., Poštová Slavětínská L., Motyka K., Doležal D., Znojek P., Nová A., Harvanová M., Džubák P., Šiller M., Hlaváč J., Hajdúch M., Hocek, M. (2016). 7-(2-Thienyl)-7-Deazaadenosine (AB61), a New Potent Nucleoside Cytostatic with a Complex Mode of Action. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 922–937.

Plunkett W., Huang P., Xu Y. Z., Heinemann V., Grunewald R., Gandhi V. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Seminars in Oncology*, 22, 3–10.

Plunkett W., Liliemark J. O., Estey E., Keating M. J. (1987). Saturation of ara-CTP accumulation during high-dose ara-C therapy: pharmacologic rationale for intermediate-dose ara-C. *Seminars in Oncology*, 14, 159–166.

Podgorska M., Kocbuch K., Pawelczyk T. (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 749–758.

Ritzel M. W. L., Ng A. M. L., Yao S. Y. M., Graham K., Loewen S. K., Smith K. M., Young J. D. (2000). Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (Systemcib). *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2914–2927.

Ruiz van Haperen V. W. T., Veerman G., Vermorken J. B., Peters G. J. (1993). 2',2'-difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 46(4), 762–766.

Sartorelli A. C., LePage G. A., Moore E. C. (1958). Metabolic Effects of 6-Thioguanine. *Cancer research*, 18, 10.

Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 26. 4. 2020]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>.

Ueda K., Cardaelli C., Gottesman M. M., Pastan I. (1987). Expression of fulllength cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to kolchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 3004–3008.

Walwick E. R., Decker C. A., Roberts W. K. (1959). Cyclization during phosphorylation of uridine and cytidine - A new route to the O²,2'-cyclonucleosides. *Proceedings of the Chemical Society*, 53, 2198.

Wang C., Lin W., Playa H., Sun S., Cameron K., Buolamwini J. K. (2013). Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). *Biochemical Pharmacology*, 86(11), 1531–1540.

Weinshilboum R. M., Sladek S. L. (1980). Mercaptopurine pharmacogenetics; monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American Journal of Human Genetics*, 32, 651–652.

Yin J. Y., Huang Q., Yang Y., Zhang J. T., Zhong M. Z., Zhou H. H., Liu, Z. Q. (2009). Characterization and analyses of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphisms in Chinese population. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(3), 206–216.

Young J. D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 869–876.

Young J. D., Yao S. Y. M., Baldwin J. M., Cass C. E., Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 529–547.

Zhang N., Yin Y., Xu S. J., Chen W. S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, 13(8), 1551–1569.

Zolnerciks, J. K., Andress, E. J., Nicolaou, M., Linton, K. J. (2011). Structure of ABC transporters. *Essays In Biochemistry*, 50, 43–61.