

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmakologie a toxikologie**

**INTERAKCE INHIBITORŮ CYKLIN-  
DEPENDENTNÍCH KINÁZ S ABC LÉKOVÝMI  
TRANSPORTÉRY *IN VITRO* A *IN SITU***

**Dizertační práce**  
**Mgr. Jakub Hofman**

Program: Farmacie

Obor: Farmakologie a toxikologie

Školitel: Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Mgr. Jakub Hofman

## Poděkování

Na tomto místě bych rád srdečně poděkoval všem, kteří mi během studia byli jakkoli nápomocni, a významně tak přispěli ke vzniku této práce.

V první řadě patří můj velký dík školiteli Prof. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné rady a podnětné připomínky, které mi přátelským a přitom profesionálním způsobem poskytoval po celou dobu studia.

Dále bych velmi rád poděkoval kolegyni PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D., která neváhala kdykoli přispět k řešení teoretických i praktických problémů a díky svým zkušenostem a nadhledu mě zdárně vedla úskalími vědecké činnosti. Mé veliké poděkování náleží rovněž celému kolektivu katedry farmakologie a toxikologie za ochotnou spolupráci a vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych rád poděkoval PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za provedení HPLC/MS analýzy, bez níž by se neobešla značná část experimentů popsanych v této práci, a také za ochotu, s níž mi pomáhal při řešení chemických otázek.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 114909/C) a projektu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV/2012/265-003).

Můj speciální dík patří celé rodině a zejména manželce Editě za všestrannou podporu a grafické zpracování všech obrázků.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: **Mgr. Jakub Hofman**

Školitel: **Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.**

Název dizertační práce: **Interakce inhibitorů cyklin-dependentních kináz s ABC lékovými transportéry *in vitro* a *in situ***

V této práci jsme se zaměřili na studium farmakokinetických interakcí inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKi) s lékovými efluxními transportéry breast cancer resistance proteinem (BCRP) a P-glykoproteinem (P-gp). Pomocí akumulčních a transportních metod jsme na buněčném modelu MDCKII-ABCG2 prokázali, že purinové CDKi purvalanol A, olomoucín II, bohemin a roskovitin inhibují BCRP. S využitím akumulčních metod a buněk MDCKII-ABCB1 jsme dále ukázali, že purvalanol A silně inhibuje P-gp a částečná inhibice byla zaznamenána i u ostatních studovaných CDKi (olomoucín II, roskovitin, flavopiridol, SNS-032). Stejně buněčné modely jsme použili pro studium substrátové afinity vybraných CDKi a pomocí transportní metody jsme určili olomoucín II jako duální substrát P-gp a BCRP. Substrátová afinita purvalanolu A k P-gp ani k BCRP nebyla prokázána. Tato zjištění jsme potvrdili s využitím stanovení ATPázové aktivity P-gp, které dále odhalilo skutečnost, že roskovitin je substrátem P-gp a flavopiridol a SNS-032 nejsou P-gp substráty nebo jsou pouze substráty s velmi nízkou afinitou. V další části práce jsme ověřili předchozí *in vitro* výsledky na orgánové úrovni pomocí metody duální perfúze potkaní placenty. Potvrdili jsme inhibici potkaního Bcrp pomocí purvalanolu A, olomoucínu II, boheminu i roskovitinu a substrátovou afinitu olomoucínu II k potkanímu P-gp i Bcrp. Zároveň jsme vyloučili substrátovou afinitu purvalanolu A k oběma testovaným transportérům. V závěrečné části studie jsme testovali naši hypotézu, že CDKi, které inhibují lékové transportéry, mohou zvýšit akumulaci současně podaných cytotoxických substrátů a zároveň potencovat jejich účinek svou vlastní antiproliferativní a cytotoxickou aktivitou. Pro tento účel jsme využili metody „combination index method of Chou-Talalay“. Synergistický či alespoň aditivní efekt

byl pozorován v kombinaci olomoucínu II a purvalanolu A s mitoxantronem, známým substrátem BCRP, na třech liniích přirozeně exprimujících značná množství BCRP. Naši hypotézu jsme dále potvrdili při kombinaci purvalanolu A, roskovitinu a olomoucínu II s daunorubicinem (substrát P-gp), kdy jsme sledovali výrazně vyšší synergistický efekt těchto kombinací na linii MDCKII-ABCB1 ve srovnání s parentními buňkami. S ohledem na naše výsledky můžeme očekávat značný vliv testovaných CDKi na farmakokinetické i farmakodynamické chování současně podaných léčiv, která jsou substráty BCRP nebo P-gp. Tuto skutečnost je třeba mít na zřeteli v případě možného zavedení CDKi do klinické praxe. Náš přístup kombinující CDKi, které inhibují lékové transportéry, s cytotoxickými substráty těchto transportérů, by alespoň částečně mohl pomoci překonat mnohočetnou lékovou rezistenci, která představuje jednu z největších překážek v chemoterapii.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: **Mgr. Jakub Hofman**

Supervisor: **Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.**

Title of Doctoral Thesis: **Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors with ABC drug transporters *in vitro* and *in situ***

In the present work, we focused on the study of pharmacokinetic interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) with drug efflux transporters breast cancer resistance protein (BCRP) and P-glycoprotein (P-gp). Using accumulation and transport methods with MDCKII-ABCG2 cells, we showed purvalanol A, olomoucine II, bohemine and roscovitine to inhibit BCRP. Employing accumulation method with MDCKII-ABCB1 cells, we further observed that purvalanol A potently inhibits P-gp and partial inhibition was recorded in the case of other studied CDKi (olomoucine II, roscovitine, flavopiridol, SNS-032). Transport method with the same cellular models was used for the study of substrate affinity of olomoucine II and purvalanol A when olomoucine II was determined to be a dual P-gp and BCRP substrate. Substrate affinity of purvalanol A toward any of the transporters tested was not observed. These findings were confirmed by the ATPase vesicular assay and using this experimental setup, we further showed that roscovitine is a P-gp substrate. Flavopiridol and SNS-032 seem to lack substrate affinity toward P-gp or to be P-gp substrates with a very low affinity. In the following part of this work we verified our *in vitro* results at organ level employing the method of dually perfused rat term placenta. We confirmed inhibition of the rat Bcrp by purvalanol A, olomoucine II, bohemine and roscovitine and substrate affinity of olomoucine II toward the rat P-gp as well as Bcrp. At the same time, we excluded the substrate affinity of purvalanol A toward both examined transporters. In the final part of the study, we tested our hypothesis that CDKi, which inhibit drug transporters, may increase the accumulation of concomitantly administered cytotoxic substrates and, at the same time, potentiate their effect by their own antiproliferative and cytotoxic activity. Combination index method of Chou-Talalay was employed for this purpose. Synergistic

or at least additive effects were observed in the combinations of olomoucine II or purvalanol A with mitoxantrone, an established BCRP substrate, in three cell lines which express considerable amounts of BCRP. Our hypothesis was further confirmed in the combinations of purvalanol A, roscovitine or olomoucine II with daunorubicin (P-gp substrate) when significantly higher synergistic effects of these combinations were observed in MDCKII-ABCB1 cells in comparison with parent cells. In the light of our results, it is possible to expect considerable impact of tested CDKi on the pharmacokinetic as well as pharmacodynamic behavior of concomitantly administered drugs, which are BCRP or P-gp substrates. This fact should be kept in mind in the case of possible introduction of CDKi into the clinical area. Our approach combining CDKi, which inhibit drug transporters, with the cytotoxic substrates of these transporters could, at least partially, help overcome the multidrug resistance which constitutes one of the main limitations in chemotherapy.

# Obsah

1	Seznam zkratk	10
2	Přehled současného stavu řešené problematiky	13
2.1	Lidské ABC transportéry	13
2.1.1	Obecná charakteristika lidských ABC transportérů	13
2.1.2	Lékové efluxní transportéry	14
2.1.3	Struktura lékových efluxních transportérů	14
2.1.4	Lokalizace a funkce lékových efluxních transportérů	16
2.1.5	Mnohočetná léková rezistence	17
2.1.6	P-glykoprotein (P-gp/ABCB1)	21
2.1.7	Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)	25
2.1.8	Proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí (ABCC/MRP)	29
2.2	Inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi)	32
2.2.1	Cyklin-dependentní kinázy a jejich funkce	32
2.2.2	Hlavní principy regulace CDK	32
2.2.3	CDK regulující buněčný cyklus	33
2.2.4	CDK regulující transkripci genů	33
2.2.5	Deregulace kontroly buněčného cyklu v rakovině	35
2.2.6	Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz	36
2.2.6.1	Purinové CDKi	36
2.2.6.2	Nepurinové CDKi	39
2.2.7	Farmakokinetické interakce studovaných CDKi	41
3	Cíle práce	44
4	Experimentální část	45
4.1	Materiál a metodika	45
4.1.1	Chemikálie a reagenty	45
4.1.2	Buněčné kultury	46
4.1.3	Zvířata	46



4.1.4	Akumulační studie s hoechst 33342.....	47
4.1.5	Akumulační studie s glyburidem.....	47
4.1.6	Akumulační studie s daunorubicinem.....	48
4.1.7	Transport přes buněčnou monovrstvu.....	48
4.1.8	Kombinační studie.....	49
4.1.9	Stanovení ATPázové aktivity P-gp.....	51
4.1.10	Duální perfúze potkaní placenty.....	51
4.1.11	Statistická analýza dat.....	52
4.2	Výsledky a diskuze.....	53
4.2.1	Inhibice BCRP prostřednictvím CDKi <i>in vitro</i> .....	53
4.2.2	Inhibice P-gp prostřednictvím CDKi <i>in vitro</i> .....	58
4.2.3	Substrátová afinita CDKi k BCRP <i>in vitro</i> .....	61
4.2.4	Substrátová afinita CDKi k P-gp <i>in vitro</i> .....	63
4.2.5	Inhibice Bcrp prostřednictvím CDKi <i>in situ</i> .....	66
4.2.6	Substrátová afinita CDKi k Bcrp a P-gp <i>in situ</i> .....	68
4.2.7	Kombinační studie.....	70
4.3	Závěr.....	75
5	Souhrn.....	76
6	Summary.....	79
7	Seznam literatury.....	82
8	Seznam publikovaných prací.....	104
8.1	Původní práce vztahující se k tématu dizertační práce.....	104
8.2	Podíl doktoranda na publikacích vztahujících se k tématu dizertační práce.....	104
8.3	Původní práce nevztahující se k tématu dizertační práce.....	105
8.4	Posterové prezentace a abstrakty publikované ve sbornících.....	106
8.5	Ústní prezentace.....	108

# 1 Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“, rodina transportérů vázajících ATP
ABCB1	gen kódující lékový transportér P-gp
ABCG2	gen kódující lékový transportér BCRP
ABCP	„placentární ABC transportér“, alternativní název BCRP
AhR	„aryl hydrocarbon receptor“, transkripční faktor
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“, rodina antiapoptotických proteinů
BCRP	breast cancer resistance protein, lékový efluxní ABC transportér
CAK	kináza aktivující CDK
CAR	„constitutive androstane receptor“, nukleární receptor
CB	cerebrospinální bariéra
CDK	cyklin-dependentní kináza(y), enzym(y) regulující buněčný cyklus
CDKi	inhibitor(y) cyklin-dependentních kináz
CI	kombinační index, parametr umožňující kvantifikaci kombinačního účinku
CIP	„CDK interacting proteins“, rodina endogenních inhibitorů CDK
CR	„corticosteroid receptor“, nukleární receptor
Cyc	cyklin, podjednotka cyklin-dependentních kináz
CYP	izoformy cytochromu P450
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's“ médium, médium pro kultivaci buněčných linií
DYRK1A	„dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A“, signální protein kináza
ERK	„extracellular signal-regulated kinases“, podrodina signálních protein kináz
eGFP	zelený fluorescenční protein
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
Fa	ovlivněná frakce buněk, parametr popisující počet živých/mrtvých buněk v kombinačních studiích

FBS	fetální bovinní sérum, aditivum do médií pro kultivaci buněčných linií
f/m	poměr fetální koncentrace k mateřské koncentraci, parametr sloužící pro popis a porovnání výsledků duálních perfúzí potkaní placenty
FTC	fumitremorgin C, potentní a specifický inhibitor BCRP
FXR	„farnesoid X receptor“, nukleární receptor
HEB	hematoencefalická bariéra
HIF-1	hypoxií indukovaný transkripční faktor 1
HIV	„human immunodeficiency virus“
HTB	hematotestikulární bariéra
IAP	„inhibitors of apoptosis“, rodina antiapoptotických genů
INK4	„inhibitors of CDK4“, rodina endogenních inhibitorů CDK
JAK	„Janus kinases“, podrodina signálních protein kináz
JNK	„c-Jun N-terminal kinases“, podrodina mitogenem aktivovaných protein kináz
KIP	„kinase inhibitory proteins“, rodina endogenních inhibitorů CDK
LY	LY335979, potentní a specifický inhibitor P-gp
Mcl-1	„induced myeloid leukemia cell differentiation protein“, antiapoptotický protein
MDCKII-ABCB1	psí ledvinná linie MDCKII transdukovaná lidským ABCB1 genem
MDCKII-ABCG2	psí ledvinná linie MDCKII transdukovaná lidským ABCG2 genem
MDCKII-par	parentní psí ledvinná MDCKII linie
MELK	„maternal embryonic leucine zipper kinase“, signální protein kináza
MRP	proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí, podrodina lékových efluxních ABC transportérů
NBD	nukleotidy vázající doména, podjednotka ABC transportérů zodpovědná za hydrolýzu ATP
NF-κB	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“, transkripční faktor
NF-Y	„nuclear factor Y“, transkripční faktor
OPT	Opti-MEM médium, médium pro kultivaci buněčných linií
PAK	„p21 activated kinases“, podrodina signálních protein kináz

PBS	fosfátový pufr, z angl. „phosphate buffered saline“
P-gp	P-glykoprotein, lékový efluxní ABC transportér
PKC	protein kináza C, signální protein kináza
PPAR- $\lambda$	„peroxisome proliferator-activated receptor gamma“, nukleární receptor
P-TEFb	„positive transcription elongation factor b“, transkripční faktor
PXR	„pregnane X receptor“, nukleární receptor
RAR	„retinoic acid receptor“, nukleární receptor
Ras	podrodina signálních protein kináz, z angl. „rat sarcoma“
Rb	retinoblastomový protein, protein regulující buněčný cyklus
RFU	relativní fluorescenční jednotky
RNPS1	„RNA-binding protein with serine-rich domain 1“, regulační protein
<i>r</i>	transportní poměr, parametr sloužící pro popis a porovnání výsledků transportních experimentů
SNP	záměna jednoho nukleotidu za druhý, z angl. „single nucleotide polymorphism“
Sp	„specificity proteins“, rodina transkripčních faktorů
Src	podrodina signálních protein kináz, z angl. „sarcoma“
STAT	„signal transducers and activators of transcription“, rodina transkripčních faktorů
TFIIH	„transcription factor II H“, transkripční faktor
TMD	transmembránová doména, doména ABC transportérů procházející skrz buněčnou membránu
VEGF	vaskulární epidermální růstový faktor
XIAP	„X-linked inhibitor of apoptosis protein“, antiapoptotický protein

### **Poznámka**

*V textu mohou být geny a proteiny označeny velkými nebo malými písmeny v návaznosti na současná doporučení, která používají velká písmena u lidských genů/proteinů a malá písmena u zvířecích ekvivalentů.*

## 2 Přehled současného stavu řešené problematiky

### 2.1 Lidské ABC transportéry

#### 2.1.1 Obecná charakteristika lidských ABC transportérů

Rodina „ATP-binding cassette“ (ABC) transportérů představuje nejpočetnější a nejlépe prozkoumanou skupinu transmembránových proteinů, jejíž zástupce lze nalézt jak v živočišné, tak v rostlinné říši. Charakteristickým rysem, jenž je společný pro všech 48 u člověka dosud popsaných ABC transportérů, je schopnost aktivně, za hydrolýzy ATP, „pumpovat“ různorodé látky ven z buňky i proti výraznému koncentračnímu gradientu (Linton, 2007).

V závislosti na sekvenční a strukturní homologii, která je obecně u ABC transportérů silně evolučně konzervovaná, jsou jednotliví zástupci řazeni do sedmi podrodin označovaných A – G. Členové ABCA podrodiny jsou přítomni především ve tkáních nervového a krevního systému a hrají roli v transportu lipidů mezi buněčnými organelami (Albrecht and Viturro, 2007; Mack *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2005). Někteří zástupci ABCB podrodiny jsou vedle jejich významné funkce v transportu léčiv zodpovědní za intracelulární transport peptidů (Herget and Tampe, 2007). Podrodina ABCC obsahuje největší počet lékových transportérů, ale rovněž zástupce s odlišnými funkcemi (např. ABCC7 – jediný známý transportér fungující jako chloridový kanál) (Borst *et al.*, 1999; Deeley *et al.*, 2006). Podrodina genů ABCD kóduje peroxizomální tzv. „poloviční“ transportéry (z ang. half transporters), z nichž některé jsou spojovány s neurodegenerativními onemocněními (Wanders *et al.*, 2007). Podrodiny ABCE a ABCF představují strukturní výjimku v rámci ABC transportérů, jelikož postrádají transmembránové domény, a podílí se na translaci mRNA (Chen *et al.*, 2006; Kerr, 2004). Ve výčtu poslední podrodina (ABCG) patří, podobně jako ABCD, k „polovičním“ transportérům a mimo funkce v transportu léčiv zastává také roli v udržování homeostázy cholesterolu a ostatních steroidů (Kusuhara and Sugiyama, 2007; Velamakanni *et al.*, 2007).

V rámci rodiny často bývá vyčleňována samostatná skupina několika významných zástupců, jejichž spojujícím činitelem je transport léčiv (Fromm and Kim, 2011; You and Morris, 2007). Lékové efluxní transportéry jsou předmětem našeho zkoumání, a proto se této skupině budu podrobně věnovat v následujících podkapitolách.

### **2.1.2 Lékové efluxní transportéry**

Do skupiny lékových efluxních transportérů bývají tradičně řazeni zástupci ze čtyř podrodin – ABCA (ABCA2), ABCB (ABCB1), ABCC (ABCC1-6 a ABCC11) a ABCG (ABCG2), nicméně nedávné výzkumy naznačují, že až 30 ABC transportérů se může podílet na transportu léčiv (Gillet *et al.*, 2007). Nejvýznamnější lékové transportéry, u kterých je známo, že se podílí na vzniku rezistence nádorových buněk k cytostatické léčbě, jsou podrobně popsány v podkapitolách 2.1.6, 2.1.7 a 2.1.8. Členění textu v těchto podkapitolách je následující: historie a úvod, struktura, regulace exprese, lokalizace a funkce, substráty, inhibitory, genetické polymorfizmy.

### **2.1.3 Struktura lékových efluxních transportérů**

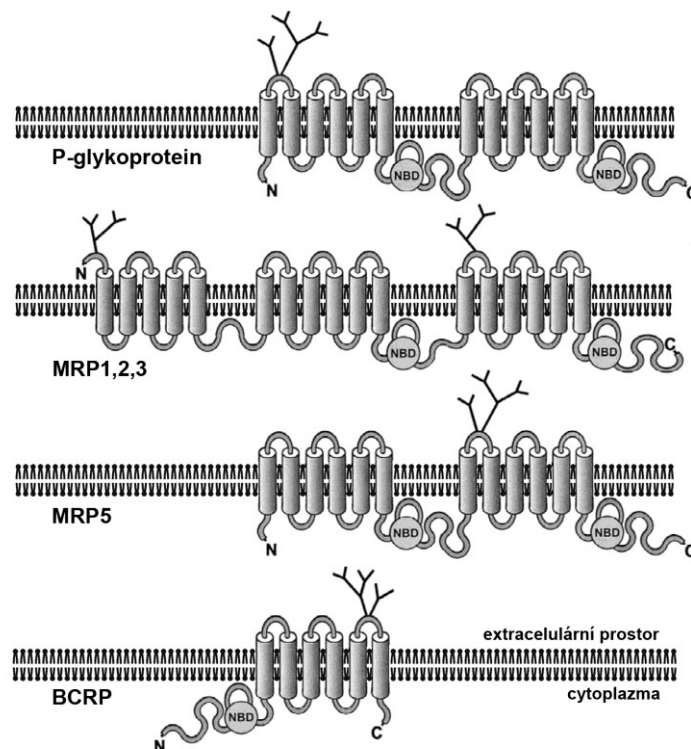
Primární struktura lékových efluxních transportérů a obecně ABC transportérů představuje evolučně vysoce konzervovaný sled aminokyselin. V důsledku toho je i sekundární struktura u všech lékových efluxních transportérů velmi podobná a skládá se z různého počtu transmembránových domén (TMD) a nukleotidy vázajících domén (NBD) (Zolnerciks *et al.*, 2011; Linton, 2007).

TMD jsou tvořeny šesti až jedenácti helikálními úseky spojenými smyčkami. Typický, tzv. „plný“ lékový transportér, obsahuje 2 TMD o šesti helikálních úsecích, ale existují též zástupci, kteří mají jednu („poloviční“ transportéry) nebo dokonce žádnou TMD (podrodiny ABCE a ABCF) (Schinkel and Jonker, 2003).

NBD, jejichž úkolem je vázat a hydrolyzovat ATP, obsahují úseky, které byly identifikovány i v jiných proteinech vázajících ATP, tzv. motivy „Walker A a B“.

ABC transportéry obsahují navíc „signature (C)“ motiv, kterým se od ostatních ATP vázajících proteinů odlišují. NBD mohou být lokalizovány jak na N-, tak C-konci molekuly proteinu a podobně jako u TMD také u NBD platí, že se jejich počet u jednotlivých zástupců různí (Hyde *et al.*, 1990). Na základě výzkumu izolovaných NBD nebo celých bakteriálních ABC transportérů bylo zjištěno, že 2 NBD v typickém „plném“ transportéru jsou spojeny v důsledku vazby ATP, což způsobuje konformační změnu proteinu. Původní konformace je následně obnovena po hydrolýze a uvolnění ATP (Dean, 2009).

V tvorbě terciární a kvarterní struktury mimo iontových a hydrofobních interakcí hrají esenciální roli (v intra- i intermolekulárním slova smyslu) též disulfidové vazby (Wakabayashi *et al.*, 2007). Co se týče posttranslačních modifikací, všechny transportéry jsou více či méně N-glykosylovány na extracelulárních smyčkách, přičemž tato modifikace pravděpodobně není důležitá pro transportní funkci těchto proteinů, ale hraje důležitou roli v stabilitě ukotvení v membráně a pravděpodobně též ve směrování do membrány (Schinkel *et al.*, 1993). Struktura nejvýznamnějších lékových transportérů je shrnuta v Obr. 1.



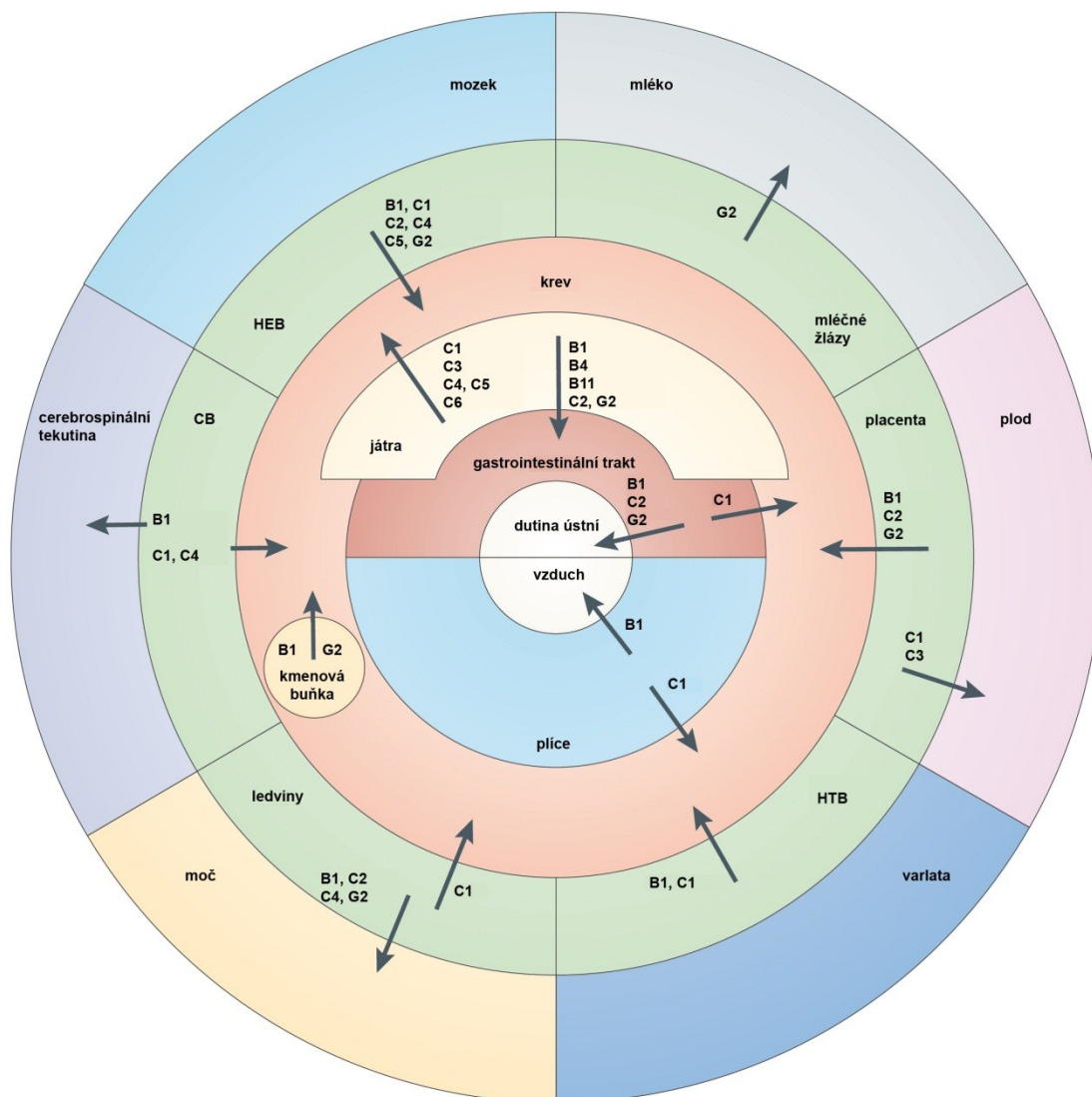
**Obr. 1:** Předpokládaná sekundární struktura nejvýznamnějších lékových transportérů tvořená různým počtem TMD a NBD. Převzato a upraveno ze Schinkel a Jonker, 2003.

## 2.1.4 Lokalizace a funkce lékových efluxních transportérů

Na první pohled je zřejmé, že lokalizace lékových efluxních transportérů úzce souvisí s jejich funkcí. Přítomnost a aktivita diskutovaných transportérů byla potvrzena v orgánech s absorpční a eliminační funkcí (játra, střeva, ledviny) a dále pak v tělesných bariérách (hematoencefalická, placentární a hematotestikulární bariéra) (DeGorter *et al.*, 2012). Lékové efluxní transportéry přenášejí celou řadu strukturně odlišných xenobiotik (léčiv, karcinogenů z potravy a životního prostředí) a jejich metabolitů, a skýtají tak ochranu citlivým tkáním proti toxickému vlivu těchto látek (Szakacs *et al.*, 2006). Zároveň je široce akceptovaná teorie, že lékové transportéry spolu s biotransformačními enzymy I. a II. fáze vytvářejí funkční celek, který má za úkol bránit vstupu a eliminovat xenobiotika z organismu (Benet and Cummins, 2001; Benet *et al.*, 1999; Szakacs *et al.*, 2008). Tuto teorii potvrzuje překrývající se lokalizace a substrátová, inhibiční a indukční specifita a v neposlední řadě i částečně shodná regulace exprese těchto proteinů. Mimo detoxikační funkce se některé lékové transportéry podílejí též na transportu látek endogenních (lipidy, peptidy, vitaminy, cholesterol a ostatní endogenní steroidy aj.), a mají tak důležitou funkci v udržení homeostázy (Fromm and Kim, 2011; You and Morris, 2007). Lokalizace lékových transportérů je přehledně shrnuta v Obr. 2.

Obecně vzato, lékové efluxní transportéry do značné míry ovlivňují farmakokinetické chování svých substrátů, a ovlivňují tak jejich osud v organismu – od absorpce, přes distribuci až k eliminaci (Petzinger and Geyer, 2006). Pokud jsou současně podány dva substráty s afinitou ke stejnému transportéru, může mezi nimi dojít k soupeření a vzniku potenciálně nebezpečných farmakokinetických lékových interakcí. Stejně tak aplikace inhibitoru transportéru může výrazně ovlivnit dispozici současně podaného substrátu, a tím jeho toxicitu (Giacomini *et al.*, 2010). Na tuto skutečnost je třeba brát zřetel v klinické praxi.





**Obr. 2:** Lokalizace lékových transportérů v organismu. Šipky značí směr, kterým jsou substráty transportovány mezi příslušnými tělními kompartmenty. Písmena označují jednotlivé zástupce podrodin lékových transportérů. HEB – hematoencefalická bariéra; CB – cerebrospinální bariéra; HTB – hematotestikulární bariéra. Převzato a upraveno ze Szakács et al., 2006.

### 2.1.5 Mnohočetná léková rezistence

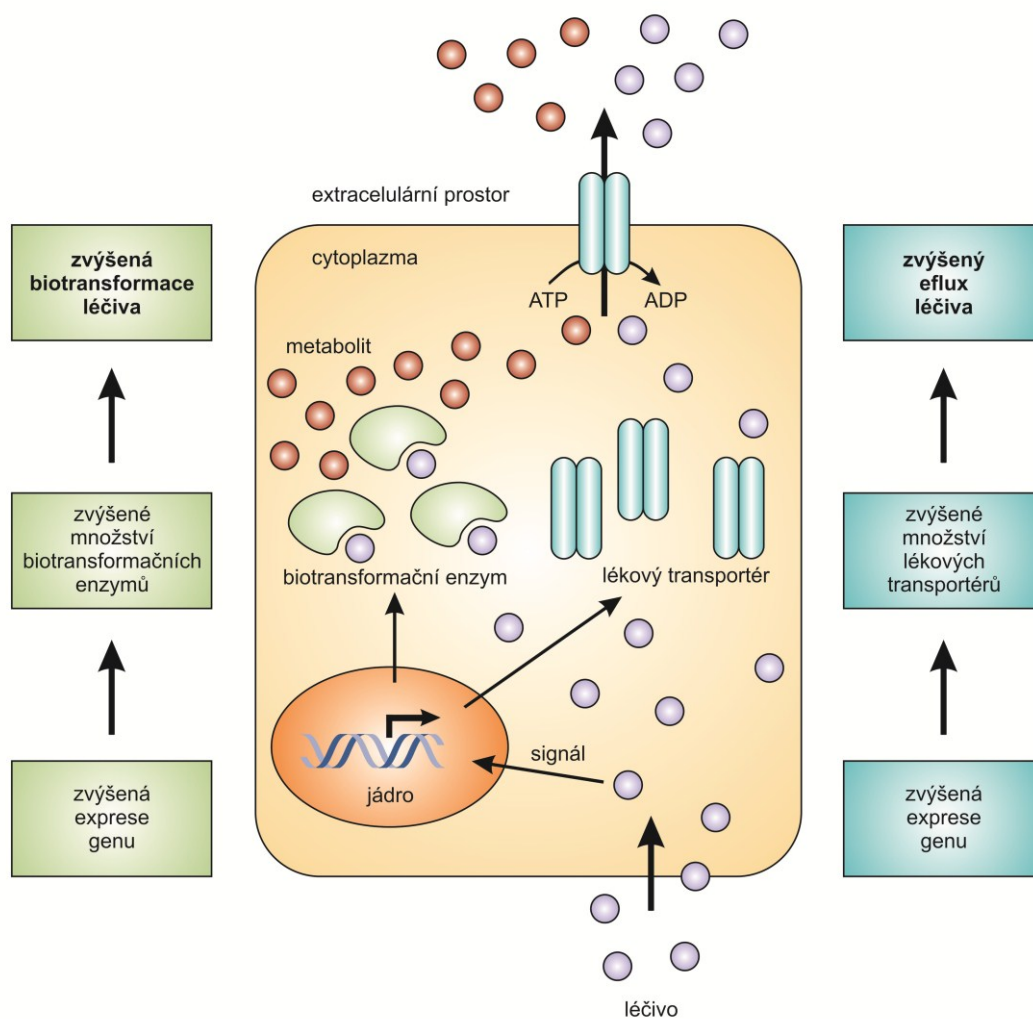
Lékové transportéry hrají v organismu důležitou detoxikační a ochrannou roli, zároveň ale negativně ovlivňují průběh a úspěšnost farmakoterapie řady onemocnění. Efluxní aktivitou v nádorové tkáni snižují akumulaci chemoterapeutik, a znemožňují tak jejich cytotoxický a cytostatický efekt (Fletcher *et al.*, 2010). Tento fenomén se nazývá

mnohočetná léková rezistence. Výraz „mnohočetná“ souvisí s faktem, že lékové transportéry jsou polyspecifické (tj. transportují více než jeden substrát), a proto mohou navodit rezistenci k více cytostatikům najednou. Přímý vztah mezi zvýšenou expresí ABC transportérů a rozvojem mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk byl na klinické úrovni prokázán v případě P-glykoproteinu a breast cancer resistance proteinu. Ačkoliv bylo demonstrováno, že někteří zástupci podrodiny ABCC transportují cytostatická léčiva, korelace mezi zvýšenou expresí těchto transportérů a rezistencí nádorů k chemoterapii nebyla na *in vivo* úrovni dosud jednoznačně potvrzena (Szakacs *et al.*, 2006; Gillet *et al.*, 2007).

Snížení akumulace léčiva v buňce dané jejím zvýšeným výstupem z buňky je hlavním mechanismem lékové rezistence. Mezi další mechanismy patří zvýšená detoxikace v důsledku indukce metabolizačních enzymů (Stavrovskaya, 2000; Gillet and Gottesman, 2010; Gottesman *et al.*, 2002). Jako příklad může být uvedena zvýšená aktivace glutathion-S-transferázy, která je schopna navodit rezistenci nádorových buněk k alkylujícím cytostatikům (Tew, 1994). Změna biologických struktur (zvýšení nebo snížení jejich aktivity/množství), které jsou cílem daného léčiva, je další variantou, jak se může buňka stát rezistentní k farmakoterapii. Bylo např. pozorováno, že snížení aktivity topoizomerázy II v důsledku mutace vede ke vzniku rezistence k adriamycinu, daunorubicinu, mitoxantronu či etoposidu (Pommier *et al.*, 1994). Podobně amplifikace genu pro dihydrofolát reduktázu a její následné zvýšené množství je asociováno s rezistencí k metotrexátu (Morales *et al.*, 2009).

Dle toho, zda mnohočetná léková rezistence vznikla před nebo po započetí léčby, se tato dělí na vrozenou a získanou. Vrozená rezistence je dána fyziologickou expresí lékových transportérů v tkáni, z které tumor vznikl, a proto např. neléčené karcinomy ledvin, jater a střev jsou vzhledem k přirozeně vysoké hladině P-glykoproteinu částečně rezistentní k léčbě cytostatiky, které jsou jeho substráty (Stavrovskaya, 2000). Velké riziko představuje získaná rezistence, kdy dochází v průběhu léčby k selekčnímu tlaku a u přeživších buněk je indukováno mnohonásobné zvýšení exprese lékových transportérů (Goldstein, 1996; Gillet *et al.*, 2007). Tato indukce je mimo jiné zprostředkována interakcí léčiva s nukleárními receptory PXR a CAR a následnou vazbou komplexu ligand-receptor na „xenobiotic response element“ sekvenci přítomnou v promotoru transportéru (Kohle and Bock, 2009; Pascussi *et al.*, 2008; Miller, 2010). Zvýšené exprese transportérů v důsledku léčby může být dosaženo též aktivací významné

signální kaskády, jejímž středobodem je hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 (HIF-1). Tento transkripční faktor je aktivován reaktivními formami kyslíku, které jsou produkovány buď za hypoxických podmínek, nebo v důsledku působení xenobiotik (Kuo, 2009; Wartenberg *et al.*, 2003). Hlavní mechanismy vzniku mnohočetné lékové rezistence jsou schematicky popsány v Obr. 3



**Obr. 3:** Hlavní mechanismy vzniku tzv. získané lékové rezistence, která je indukována přítomností léčiva. Převzato a upraveno z Fletcher *et al.*, 2010.

Zvýšená exprese lékových transportérů je často v praxi korelována s negativním výstupem a selháním léčby rakoviny (Nakanishi, 2007; Leonard *et al.*, 2003). Analýza exprese P-glykoproteinu a ostatních lékových transportérů tak logicky slouží jako

prognostický marker pro odpověď na léčbu, vznik rezistentního fenotypu a přežití (Del Vecchio *et al.*, 1999; Arts *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005).

Ačkoliv bylo již mnohokrát na *in vitro* úrovni demonstrováno, že mnohočetnou lékovou rezistenci lze překonat pomocí specifických inhibitorů lékových transportérů (Rabindran *et al.*, 2000; Dantzig *et al.*, 1996; Krishna and Mayer, 2000), snaha přenést tuto strategii do klinické praxe stále selhává. S inhibitory P-glykoproteinu bylo provedeno několik desítek klinických zkoušek, a přesto nebyl dosud zjištěn výrazný benefit kombinace těchto látek s cytostatiky v léčbě onkologických pacientů. Charakteristickou překážkou aplikace inhibitoru PSC-833 bylo snížení metabolismu a systémové clearance současně aplikovaného cytostatika, což vedlo ke zvýšení koncentrace cytostatika v plazmě nad toxickou mez. PSC-833 je inhibitorem 2. generace; u této generace byla prokázána nežádoucí inhibiční aktivita vůči cytochromu CYP3A a nespecifické interakce s ostatními lékovými transportéry. Navzdory tomu, že inhibitory 3. generace, jako např. zosuquidar, tariquidar či elacridar, jsou plně specifické pro P-glykoprotein, ani u těchto látek nebyl prozatím v klinickém zkušeni prokázán jednoznačný protinádorový efekt (Szakacs *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2010).

Mezi alternativní přístupy sloužící k potlačení mnohočetné lékové rezistence patří inhibice specifickými peptidy a protilátkami. Sharom *et al.* popsali inhibici P-glykoproteinu pomocí peptidů reversinu 121 a 205, které jsou v nízké koncentraci substráty se silnou afinitou, a ve vysoké pak jeho inhibitory (Sharom *et al.*, 1999). Nedávno bylo demonstrováno, že peptidy napodobující transmembránovou doménu P-glykoproteinu jsou schopny obejít mnohočetnou lékovou rezistenci tím, že znemožní normální poskládání tohoto transportéru (Tarasova *et al.*, 2005). U myši bylo sledováno úspěšné potlačení mnohočetné lékové rezistence pomocí protilátek mířených proti P-glykoproteinu, aniž by došlo k autoimunitní odpovědi (Mechetner and Roninson, 1992).

Snížení exprese transportéru pomocí specifických postupů je další z metod, jak zamezit lékové rezistenci vyvolané lékovými transportéry. Exprese transkripčních represorů, které se váží na specifická místa v promotoru genu kódujícím P-glykoprotein, způsobila selektivní snížení exprese tohoto transportéru a obnovení citlivosti rezistentních buněk k chemoterapii (Xu *et al.*, 2002). Úspěšné a selektivní snížení

exprese bylo dosaženo též pomocí metody RNA interference (Xu *et al.*, 2004a; Pichler *et al.*, 2005).

Relativně jednoduchým přístupem, jak zamezit vzniku mnohočetné lékové rezistence, je vyvinout léčiva, která nejsou substráty lékových transportérů. Přitom nemusí jít o zcela nová léčiva, ale je možné pouze modifikovat ta stávající. Jako příklad může být uveden analog kamptotecinu ST1481, který při zachování cytostatického účinku ve srovnání s parentní látkou postrádá substrátovou afinitu k breast cancer resistance proteinu (Perego *et al.*, 2001).

### 2.1.6 P-glykoprotein (P-gp/ABCB1)

P-gp byl objeven v roce 1976 jako membránový fosfoglykoprotein v rezistentních CHO buňkách a v současnosti je nejlépe popsáným lékovým transportérem (Juliano and Ling, 1976).

Tento 170 kDa protein spadá do skupiny „plných“ transportérů, obsahuje 2 TMD o šesti helikálních úsecích a 2 NBD (Obr. 1). U odborníků, zabývajících se strukturou P-gp, jsou uznávány 3 možné modely transportu pomocí P-gp: klasická pumpa, „vakuový čistič“ a „flipasa“. U prvního modelu substrát neinteraguje s membránou vůbec, u zbylých dvou se předpokládá, že substráty přistupují do jejich vazebného místa z buněčné membrány. Transportér obsahuje více specifických vazebných míst pro jednotlivé substráty (Lin and Yamazaki, 2003; Sharom, 2008; You and Morris, 2007).

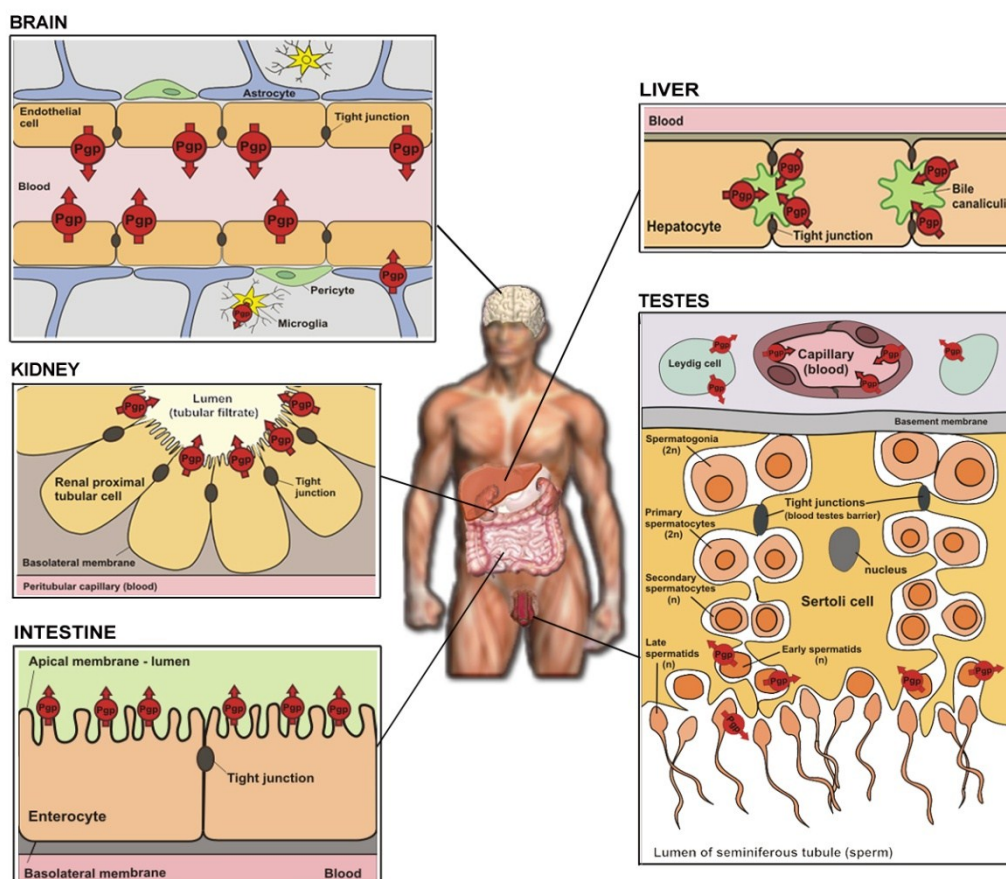
U lidí je P-gp kódován jedním genem (ABCB1), zatímco u hlodavců je potřeba dvou genů (Abcb1a, Abcb1b). Promotor genu ABCB1 neobsahuje TATA sekvenci, ale invertovaný CCAAT box, který interaguje s transkripčním faktorem NF-Y, a dále GC-bohatý element, který váže transkripční faktory Sp1 a Sp3 (Scotto, 2003). Tyto dvě regulační sekvence zajišťují bazální čili konstitutivní expresi genu ABCB1. Exprese ABCB1 je vysoce flexibilní a pohotově se mění jako odpověď na různé stresové stimuly (tepelný šok, zánět, hypoxie, xenobiotika, ozáření UV či radiace) aktivací signálních kaskád s účastí protein kinázy C a mitogenem aktivovaných protein kináz. Součástí kaskád je aktivace transkripčních faktorů „heat-shock factor 1“ (tepelný šok), NF- $\kappa$ B (zánět, xenobiotika) a nukleárních receptorů RAR, FXR, PXR, CAR aj. (xenobiotika)

(Miller, 2010; Scotto, 2003). Základní epigenetické mechanismy, acetylace/deacetylace histonů a metylace/demethylace promotoru, rovněž ovlivňují transkripci genu ABCB1 (Scotto, 2003). Translační regulace exprese také hraje svou roli v řízení exprese ABCB1, bylo např. pozorováno zvýšení stability mRNA ABCB1 u buněk vystavených různým stresovým stimulům (Yague *et al.*, 2003).

P-gp je exprimován v malé míře téměř ve všech tkáních, zatímco vysoké exprese dosahuje pouze v několika specifických orgánech (Staud *et al.*, 2010). Jeho vysoká exprese byla prokázána v apikální membráně enterocytů od duodena po rektum, kde svou efluxní aktivitou působí spolu s CYP3A4 jako bariéra proti vstupu xenobiotik do krevního oběhu při perorálním podání. Tímto výrazně snižuje biologickou dostupnost a absorpci léčiv, která jsou jeho substráty. Zároveň se aktivně podílí též na exkreci do stolice (Lin and Yamazaki, 2003; DeGorter *et al.*, 2012). V souvislosti s eliminační funkcí je nutné zmínit jeho vysokou expresi v apikální kanalikulární membráně hepatocytů (exkrece léčiv do žluče) a v apikální membráně proximálních tubulů ledvin (aktivní sekrece do moči). P-gp v neposlední řadě též ovlivňuje distribuční fázi farmakokinetiky skrze svou aktivní přítomnost v řadě tělesných bariér. V endoteliálních buňkách mozkových kapilár tvoří funkční součást hematoencefalické bariéry a omezuje vstup xenobiotik do mozku (Cascorbi, 2011; Lin and Yamazaki, 2003). Výrazná exprese P-gp byla prokázána v hematotestikulární bariéře (endoteliální buňky kapilár varlat, Sertoliho a Leydigovy buňky), kde se podílí na ochraně vyvíjejících se spermií před toxickým vlivem xenobiotik (Su *et al.*, 2011). Svou efluxní aktivitou v apikální membráně placentárního syncytiotrofoblastu P-gp brání přestupu toxických látek z mateřské do fetální cirkulace, a hraje tak významnou roli v ochraně plodu (Ceckova-Novotna *et al.*, 2006). Současně je P-gp ve zvýšené míře exprimován v některých nádorech, kde dosahuje i několikanásobných hodnot exprese v porovnání s fyziologickými podmínkami a navozuje mnohočetnou lékovou rezistenci (Leonard *et al.*, 2003). Pro lepší představu je lokalizace P-gp popsána v Obr. 4.

P-gp výrazně ovlivňuje farmakokinetické chování mnoha strukturně odlišných léčiv. Transportuje především lipofilní nebo slabě bazické či kyselé organické molekuly o molekulové hmotnosti od 200 do 1900 Da. Velmi významnou skupinu substrátů P-gp tvoří cytostatika (alkaloidy barvíčku, mandragory a tisu, antracykliny a kamptoteciny) vzhledem k schopnosti P-gp navodit mnohočetnou lékovou rezistenci buněk k léčbě těmito chemoterapeutiky. P-gp transportuje léčiva i z řady dalších farmakologických

skupin, např. některé zástupce HIV proteázových inhibitorů, analgetik, antihistaminik, antagonistů  $H_2$  receptorů, imunosupresiv, antiobezitik, statinů, antiemetik, antihelminetik, antiarytmik, blokátorů vápníkových kanálů, srdečních glykosidů, inhibitorů tyrozin kináz, antipsychotik, antihypertenziv, antibiotik a steroidů (Sharom, 2008; Schinkel and Jonker, 2003; Cascorbi, 2011).



**Obr. 4:** Lokalizace P-glykoproteinu v tkáních lidského těla. Převzato ze Staud et al., 2010.

Inhibitory P-gp jsou tradičně děleny do tří generací. Inhibitory 1. generace (verapamil, cyklosporin A, tamoxifen) a 2. generace (PSC833, VX-710, MS-209, GF120918) mají oproti inhibitorům 3. generace (LY335979, XR9576, OC144-093) nevýhodné vlastnosti (nižší inhibiční potence, mimo P-gp interagují také s ostatními biologickými strukturami, transportéry a biotransformačními enzymy, nepůsobí alosterickým mechanismem, ale samy vykazují substrátovou afinitu, jsou relativně

cytotoxické a ovlivňují expresi transportéru) (Yang *et al.*, 2008). Zatímco inhibice P-gp s sebou přináší možnost vzniku závažných lékových interakcí, zároveň skýtá možnost dosáhnout terapeuticky účinných koncentrací v tělesných bariérách, např. pro léčbu plodu či mozkových dysfunkcí (Lin and Yamazaki, 2003). I přes dosud neuspokojivé výsledky onkologických klinických studií je inhibice P-gp stále uznávanou potenciální metodou překonání mnohočetné lékové rezistence, jíž se věnuje obrovská pozornost, a logicky existuje snaha vyvinout nové inhibitory, které budou vykazovat ještě vyšší potenci, specifitu a výhodnější farmakokinetické a netoxické vlastnosti.

Bylo prokázáno, že gen ABCB1 je vysoce polymorfní a do dneška bylo objeveno asi 100 genetických variant tohoto genu. Vzhledem k tomu, že mutace a SNP (záměna jednoho nukleotidu za druhý, z angl. „single nucleotide polymorphism“) mohou mít za následek změnu aktivity nebo i exprese proteinu, je farmakogenomice P-glykoproteinu věnována velká pozornost. Nejznámější variantou je SNP C3435T, který byl původně asociován se sníženou expresí ABCB1 ve střevě a zvýšenou biologickou dostupností digoxinu (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Nicméně souvislost s vlivem této alelické varianty na snížení exprese ABCB1 byla později vyvrácena a jako možný následek tohoto polymorfizmu byla přijata změna aktivity (Cascorbi, 2006; Leschziner *et al.*, 2007). Druhým nejznámějším SNP je G2677T, který je spojován s odlišnou odpovědí na léčbu statiny mezi jednotlivci s různým pohlavím a z různých etnických skupin (Kajinami *et al.*, 2004). Výskyt mutací a SNP může korelovat s vyšším výskytem chorob, jako je Crohnova choroba či ulcerativní kolitida, jak bylo demonstrováno u mutace A893S/T a SNP C3435T (Brant *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Naopak bylo zjištěno, že polymorfizmy G2677T a C3435T, které se ve zvýšené míře vyskytují u čínské populace, pozitivně působí na akumulaci antiparkinsonika budipinu v mozku díky snížené aktivitě P-gp, což má za následek vyšší úspěšnost léčby touto látkou ve srovnání s ostatní populací (Tan *et al.*, 2005).



### 2.1.7 Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)

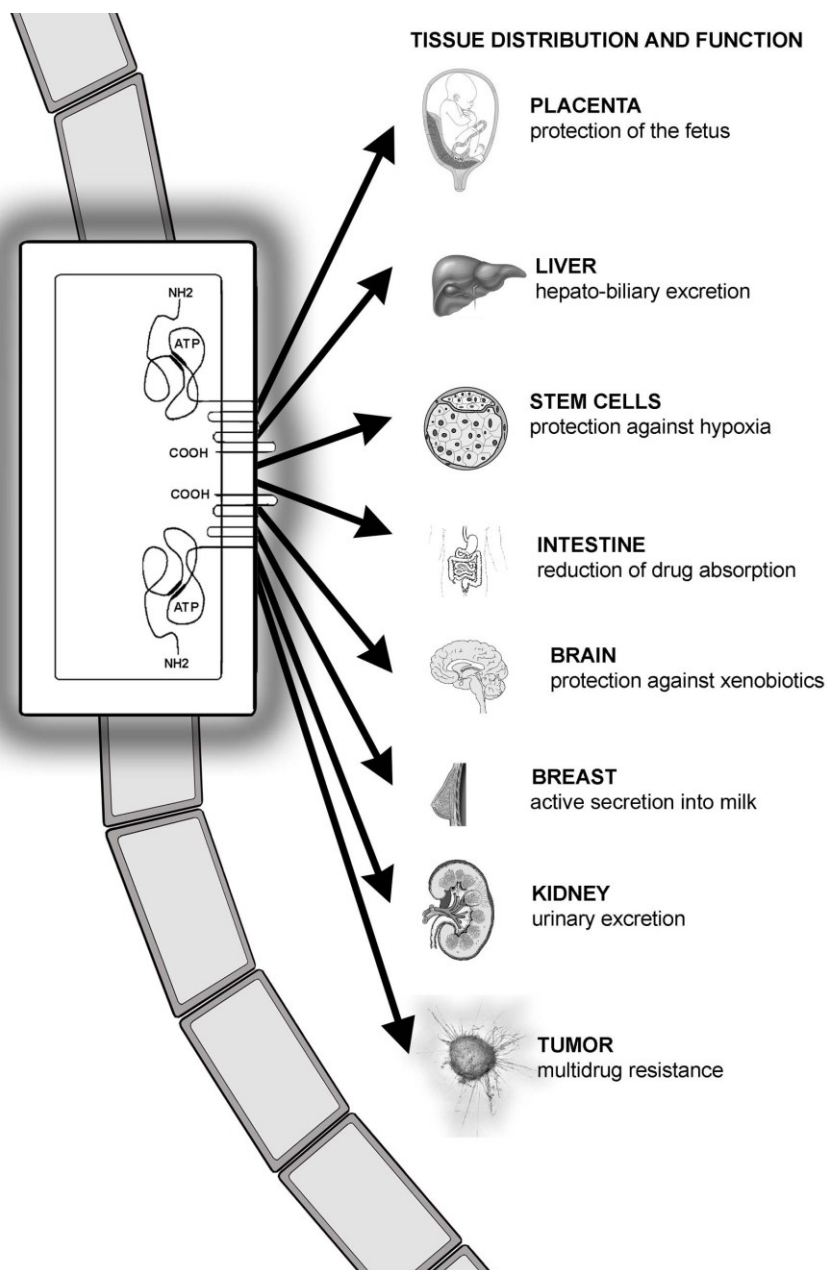
BCRP je nejpozději objeveným členem skupiny lékových efluxních transportérů. Poprvé byl popsán Doylem *et al.* jako hlavní faktor přispívající k adriamycinové rezistenci u buněčné linie odvozené od rakoviny prsu (MCF-7 AdrVp) (Doyle *et al.*, 1998). Odtud plyne jeho jméno, které se s postupem času ukázalo jako nepřilíš trefné, protože jeho výskyt a funkce zdaleka nejsou omezeny pouze na karcinom prsu. Prvenství jeho objevu bývá připisováno ještě dalším dvěma laboratořím (Allikmets *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999). Allikmets pojmenoval tento protein pro jeho vysokou expresi v lidské placentě jako ABCP („placentární ABC transportér“), nicméně tento název nebyl oficiálně přijat a byl později definitivně nahrazen názvem BCRP.

BCRP patří do podrodiny G, která je charakteristická tím, že se jedná o „poloviční“ transportéry. 72 kDa protein se skládá z pouze jedné TMD a jedné NBD (Obr. 1). Původně se předpokládalo, že „poloviční transportéry“ musí pro vytvoření funkčního proteinu homo- nebo heterodimerizovat (Litman *et al.*, 2001). Dle novějších studií však tyto transportéry fungují jako homotetramery (Xu *et al.*, 2004b) nebo homooktamery tvořené čtyřmi homodimery (McDevitt *et al.*, 2006). Při spojování jednotlivých podjednotek hrají esenciální roli disulfidové vazby a sacharidové posttranslační modifikace. Pokud nedojde k těmto modifikacím, nefunkční protein je označen ubiquitinem a odsouzen k degradaci v proteazomu (Wakabayashi-Nakao *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2007).

Gen ABCG2 stejně jako ABCB1 v promotoru postrádá sekvenci TATA a jeho konstitutivní exprese je řízena CCAAT sekvencí a Sp1 transkripčním faktorem vázajícím se na příslušná vazebná místa (Staud and Pavek, 2005). Promotor ABCG2 obsahuje elementy odpovídající na estrogen a progesteron, přičemž hormony 17 $\beta$ -estradiol a progesteron zvyšují expresi ABCG2 skrze aktivaci estrogenového a progesteronového transkripčního faktoru (Ee *et al.*, 2004; Mo and Zhang, 2012). V promotoru ABCG2 lze nalézt i tři elementy odpovídající na hypoxii, s čímž souvisí zvýšená exprese ABCG2 při hypoxických podmínkách zahrnující působení transkripčního faktoru HIF-1 (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Z dalších prokázaných transkripčních faktorů a nukleárních receptorů podílejících se na řízení exprese ABCG2 lze jmenovat AhR, PPAR- $\lambda$ , NF- $\kappa$ B, PXR, CR (Mo and Zhang, 2012). Všechny tyto

receptory a faktory jsou více či méně spojeny s odpovědí na stresové stimuly, jako jsou onemocnění či xenobiotika, což souvisí s obrannou funkcí BCRP. Během vzniku rezistentního fenotypu byla pozorována hyperacetylace histonů a demethylace promotoru ABCG2, což poukazuje na pravděpodobnou roli epigenetických mechanismů v řízení exprese tohoto genu (To *et al.*, 2006; To *et al.*, 2008). Posttranskripční regulace je mimo jiné zajišťována pomocí mikroRNA, se snížením exprese jsou spojovány sekvence hsa-miR-520h a miR-328 (Wang *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2009). Tzv. genová amplifikace (duplikace genu v rámci genomu) hraje významnou roli ve zvýšení exprese ABCG2 i dříve diskutovaného ABCB1 a uplatňuje se především při rozvoji mnohočetné lékové rezistence u nádorových buněk (Mo and Zhang, 2012).

BCRP stejně jako P-gp výrazně ovlivňuje farmakokinetické chování různorodých látek (od absorpce, přes distribuci až po eliminaci) a svou efluxní aktivitou v tělesných bariérách chrání citlivé tkáně před toxickým vlivem xenobiotik (Staud and Pavek, 2005). Není proto divu, že se tkáňová lokalizace těchto dvou lékových transportérů do značné míry překrývá. BCRP byl detekován v apikální membráně enterocytů (s nejvyšší expresí v duodenu) a v apikální kanalikulární membráně hepatocytů, kde ovlivňuje absorpční a eliminační fázi farmakokinetiky. Aktivita tohoto transportéru byla prokázána také v apikální membráně proximálních tubulů ledvin (aktivní sekrece do moči). Exprese genu ABCG2 byla popsána v hematoencefalické a hematotestikulární bariéře, přičemž BCRP jako funkční jednotka těchto bariér skýtá ochranu citlivým mozkovým buňkám a spermii před toxickým vlivem xenobiotik (You and Morris, 2007; Mo and Zhang, 2012). Mimořádně vysoká exprese BCRP byla pozorována v apikální membráně placentárního syncytiotrofoblastu, přičemž zde dosahuje o řád vyšších hodnot než exprese P-gp. BCRP v placentě výrazně omezuje přestup xenobiotik z mateřské do fetální cirkulace, a přispívá tak k ochraně plodu před jejich škodlivým vlivem (Ceckova *et al.*, 2006; Hahnova-Cygalova *et al.*, 2011). Mimo tato tradiční místa výskytu byla výrazná exprese popsána též v cévách oběhového systému, děloze a děložním čípku, kmenových buňkách a mléčné žláze, kde se BCRP podílí na aktivní sekreci xenobiotik do mléka (You and Morris, 2007; Mo and Zhang, 2012). Vysoká exprese ABCG2 byla pozorována u mnoha druhů malignit, kde souvisí s rozvojem mnohočetné lékové rezistence k chemoterapii (Robey *et al.*, 2007). Přehled výskytu a funkce BCRP v organismu je znázorněn na Obr. 5.



**Obr. 5:** Schéma lokalizace a funkce BCRP v organismu. Převzato a upraveno ze Staud a Pavěk, 2005.

Stejně jako je výrazný překryv v lokalizaci a funkci BCRP a P-gp, podobný je i překryv v jejich substrátové afinitě. BCRP je však na rozdíl od P-gp schopen transportovat také kladně a záporně nabitě molekuly, organické anionty a sulfátové a glukuronidové konjugáty (Staud and Pavěk, 2005). BCRP je schopen navodit mnohočetnou lékovou rezistenci rakovinných buněk vůči některým zástupcům

antimetabolitů, alkaloidů mandragory, antracyklinů a kamptotecinů, inhibitorů tyrozin kináz a cyklin-dependentních kináz. Mezi jeho další substráty patří léčiva ze skupiny antivirotik, statinů, antibiotik, blokátorů vápníkových kanálů a také antagonisty H<sub>2</sub> receptorů cimetidin a perorální antidiabetikum glyburid. BCRP mimo léčiv ovlivňuje dispozici endogenních látek (vitamíny, steroidní hormony, jejich prekurzory a sulfátové konjugáty, porfyriny, kyselina močová), a má tak důležitý vliv na udržení normálního metabolismu a homeostázy (Mo and Zhang, 2012; Fromm and Kim, 2011; Natarajan *et al.*, 2012; Sharom, 2008).

Cílená inhibice BCRP je asociována jednak s možností překonání mnohočetné lékové rezistence nebo též zlepšení farmakokinetického profilu špatně absorbovaných substrátů. Mykotoxin fumitremorgin C a jeho analog Ko143 jsou známými modelovými inhibitory BCRP používanými ve výzkumu, u nichž bylo prokázáno, že jsou specifické pro tento transportér (Rabindran *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2002). BCRP může být inhibován i řadou léčiv, z nichž jmenuji např. kortikosteroidy, antivirotika, imunosupresiva nebo inhibitory tyrozin kináz (You and Morris, 2007). Vzhledem k široké distribuci BCRP v organismu a jeho mnohočetným funkcím je třeba dbát opatrnosti při systémovém podání inhibitorů BCRP z důvodu nepředvídatelného farmakokinetického chování současně podaných substrátů a možnému výskytu toxicity. Mezi alternativní přístupy pro potlačení funkce BCRP patří princip RNA interference či aplikace specifických protilátek (Mo and Zhang, 2012).

BCRP je podobně jako P-gp vysoce polymorfní, přičemž některé alelické varianty mohou výrazně ovlivňovat farmakokinetické chování substrátů tohoto proteinu. Alelické varianty F208S a S441N snižují množství BCRP. Nefunkční protein je označen ubiquitinem a degradován v proteazomu (Nakagawa *et al.*, 2008). Zřejmě nejvýznamnější SNP je C421A; řada výzkumných skupin potvrdila sníženou expresi a transportní funkci u této varianty a zvýšenou biologickou dostupnost topotekanu a diflomotekanu u onkologických pacientů (Mizuarai *et al.*, 2004; Sparreboom *et al.*, 2005; Sparreboom *et al.*, 2004). Na druhou stranu polymorfizmy s sebou mohou přinášet zvýšené riziko vzniku chorob. Např. u populace nesoucí SNP C421A byla pozorována hypeurikemie a zvýšené riziko výskytu dny (Woodward *et al.*, 2011).

## 2.1.8 Proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí (ABCC/MRP)

Podrodina C představuje poslední skupinu lékových transportérů, u nichž byla prokázána souvislost s lékovou rezistencí. Farmaka a jejich konjugáty transportuje prvních 8 členů (MRP1 - 8), přičemž nejdůležitější jsou MRP1 - 5. Jako první zástupce byl objeven MRP1 v roce 1992 (Cole *et al.*, 1992).

Zatímco struktura MRP4 a 5 odpovídá typickému „plnému“ transportéru, jedna z transmembránových domén zástupců MRP1, 2 a 3 obsahuje jedenáct helikálních úseků namísto šesti (Obr. 1). Podrodina C obsahuje v porovnání s ostatními podrodinami ABC transportérů specifické sekvenční odchylky v obou NBD, což poukazuje na společnou evoluci členů této podrodiny (Deeley *et al.*, 2006).

Regulace exprese u podrodiny C je mnohem méně prozkoumaná než u obou transportérů diskutovaných v předchozích podkapitolách (P-gp, BCRP). Existují důkazy, že inducibilní forma řízení exprese zahrnuje působení transkripčních faktorů a nukleárních receptorů, které jsou spojené s odpovědí na stres (CAR, PXR, FXR, HIF-1 aktivovaný reaktivními formami kyslíku, PPAR- $\lambda$ ) (Gerk and Vore, 2002; Kast *et al.*, 2002; Payen *et al.*, 2001; Johnson and Klaassen, 2002). Čím dál více je zřejmé, že stresová signalizace je spojujícím regulačním článkem pro všechny lékové transportéry a zároveň i pro některé biotransformační enzymy, což úzce souvisí s jejich společnou ochrannou a detoxikační funkcí v organismu (Xu *et al.*, 2005).

Zástupci podrodiny C výrazně ovlivňují exkreci a eliminaci endogenních látek i xenobiotik, což je jejich hlavní funkce v organismu, a zároveň jsou zodpovědné za proces enterohepatální cirkulace (Deeley *et al.*, 2006). MRP1 je detekovatelný v mnoha tkáních, zejména v plicích, varlatech, ledvinách, srdečním a příčně pruhovaném svalstvu a v placentě. Polarizace jeho umístění v membránách je různá (apikální v syncytiotrofoblastu, bazolaterální v bariéře hematoencefalické a hematotestikulární). MRP2 je výrazně exprimován v apikálních membránách hepatocytů, enterocytů a proximálních tubulů ledvin, což souvisí s jeho exkreční funkcí. Dále je přítomen v apikální membráně placenty, v plicích a žlučníku. Fyziologicky není exprimován v hematoencefalické ani hematotestikulární bariéře, nicméně za určitých podmínek

může dojít k jeho „upregulaci“ a ovlivnění vstupu např. antiepileptik do mozku (Deeley *et al.*, 2006; You and Morris, 2007). Signifikantní exprese MRP3 byla pozorována v bazolaterální membráně hepatocytů, v distálních tubulech ledvin, ve střevě, placentě, žlučníku a nadledvinách. Apikální lokalizace MRP4 byla detekována v proximálních tubulech ledvin a endotelu mozkových kapilár. Bazolaterální orientace MRP4 se potvrdila v buňkách hematoencefalické bariéry a hepatocytech, přičemž v játrech je bazální exprese nízká. Mimoto byla exprese MRP4 sledována v astrocytech, erytrocytech, pyramidálních neuronech a hladkém svalstvu gastrointestinálního traktu. MRP5 byl detekován v epitelu močové trubice, příčně pruhovaném svalstvu, srdečních myocytech, astrocytech a pyramidálních neuronech. Apikální lokalizace byla popsána v endotelu kapilár hematoencefalické bariéry, bazolaterální orientace pak v syncytiotrofoblastu placenty (Fromm and Kim, 2011; You and Morris, 2007). Ačkoliv je všech prvních 5 zástupců podrodiny C schopno navodit rezistenci nádorových buněk k cytotoxickému účinku cytostatik *in vitro*, klinická souvislost mezi jejich zvýšenou expresí a vznikem rezistentního fenotypu nádoru *in vivo* nebyla dosud jednoznačně potvrzena (Gillet *et al.*, 2007).

MRP transportéry vykazují substrátovou afinitu k polárním organickým aniontům a jejich konjugátům (sulfáty, glukuronidy). MRP1 a 2 transportují redukovanou i oxidovanou formu glutathionu, a účastní se tak ochrany buněk před oxidačním stresem. Glutathion aktivuje ATPázovou aktivitu MRP1 a 2 a je vyžadován pro transport ostatních substrátů (pravděpodobně je s nimi kotransportován) (Homolya *et al.*, 2003). MRP transportují řadu endogenních látek (bilirubin, prekurzory mužských i ženských pohlavních hormonů, prostaglandiny, leukotrieny, cyklický guanozinmonofosfát a adenosinmonofosfát aj.), a podílí se tak na regulaci fyziologických dějů (Deeley *et al.*, 2006; Fromm and Kim, 2011; You and Morris, 2007). Vedle endogenních látek se členové podrodiny C podílí na transportu cytostatik ze skupin antimetabolitů, alkaloidů barvínku a mandragory, inhibitorů topoizomerázy I a dále též na transportu cisplatin. Zřejmý je překryv se substrátovou afinitou ostatních lékových transportérů (Szakacs *et al.*, 2006).

Mezi inhibitory MRP patří MK571 (antagonista receptorů pro leukotrien D4), antiuraticum probenecid a antidiabetikum glyburid. MRP1 je inhibován nespecifickým P-gp inhibitorem 2. generace VX-710, který mimo MRP1 a P-gp inhibuje i BCRP. Mezi specifické inhibitory MRP1 jsou řazeny bicyklické izoxazoly LY465803 a LY475776

(Deeley *et al.*, 2006). Vzhledem k tomu, že glutathion je vyžadován pro aktivitu MRP1 a 2, stala se tato molekula cílem pro návrh alternativních inhibičních strategií. Jeden z těchto přístupů využívá blokády syntézy glutathionu pomocí inhibitoru glutathion syntetázy DL-buthionin-(S,R)-sulfoximinu (Zaman *et al.*, 1995). Úspěšné inhibice bylo dosaženo také pomocí peptidových analog glutathionu (O'Brien *et al.*, 1999). Při překonání mnohočetné lékové rezistence zprostředkované MRP pomocí inhibice těchto transportérů je třeba mít na zřeteli nepředvídatelnou změnu farmakokinetického chování jeho substrátů, která může vést k systémové toxicitě. Vzhledem k význačné funkci MRP v transportu důležitých endogenních látek může jejich inhibice též negativně ovlivnit homeostázu.

SNP či mutace v genu MRP transportérů mohou mít za následek změnu jejich aktivity, exprese či lokalizace, a mohou tak ovlivnit farmakokinetické chování MRP substrátů a mnohočetnou lékovou rezistenci u jedinců nesoucích tyto genetické odchylky. Dále jsou polymorfizmy ABCC spojeny se vznikem chorob, jako např. Dubin-Johnsonův syndrom charakterizovaný hyperbilirubinemií (ABCC2), dědičné dermatologické onemocnění pseudoxanthoma elasticum (ABCC6), cystická fibróza (ABCC7), hyperinzulinemická hypoglykémie u dětí (ABCC8) či dilatovaná kardiomyopatie (ABCC9) (You and Morris, 2007).

## 2.2 Inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi)

### 2.2.1 Cyklin-dependentní kinázy a jejich funkce

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) spadají do rozsáhlé rodiny protein kináz, jejichž spojujícím rysem je regulace cílových struktur pomocí fosforylace. V lidském genomu bylo doposud odhaleno 21 genů pro CDK, přičemž většinu lze zařadit do dvou hlavních skupin – první reguluje buněčný cyklus, zatímco druhá řídí transkripci genů. Aktivita CDK střídavě stoupá a klesá s tím, jak buňka postupuje buněčným cyklem. Tyto pravidelné oscilace vedou k cyklickým změnám ve fosforylaci vnitrobuněčných proteinů, které iniciují nebo regulují hlavní body buněčného cyklu – replikaci DNA, mitózu a cytokinezi. Cyklické změny aktivity CDK jsou závislé na činnosti komplexní sítě různých regulačních proteinů. Nejdůležitější regulační prvky, jak naznačuje samotný název CDK, představují cykliny, které po navázání na CDKs probouzí jejich protein kinázovou aktivitu. Zatímco koncentrace jednotlivých cyklinů v průběhu buněčného cyklu stoupá a klesá, hladina CDKs zůstává po celou dobu přibližně konstantní (Alberts *et al.*, 2002; Malumbres and Barbacid, 2005; Malumbres *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Hlavní principy regulace CDK

Aktivace CDK nastává po spojení s příslušnou cyklinovou podjednotkou (A – T), inhibice je zprostředkována vazbou endogenních inhibitorů (INK4, CIP/KIP) na komplex CDK-cyklin. Skupina INK4 endogenních inhibitorů (p15, p16, p18, p19) inhibuje komplexy CDK-cyklin D (CDK 2, 4 a 6). Skupina CIP/KIP (p21, p27, p57) inhibuje komplexy CDK2-cyklin E a CDK2-cyklin A (Sherr and Roberts, 1999; Sherr and Roberts, 1995). CDK jsou aktivovány fosforylací kinázou aktivující CDK (CAK; komplex CDK7-cyklin H-MAT1) (Harper and Elledge, 1998) a mohou být prostřednictvím fosforylace též inaktivovány (Morgan, 1995).



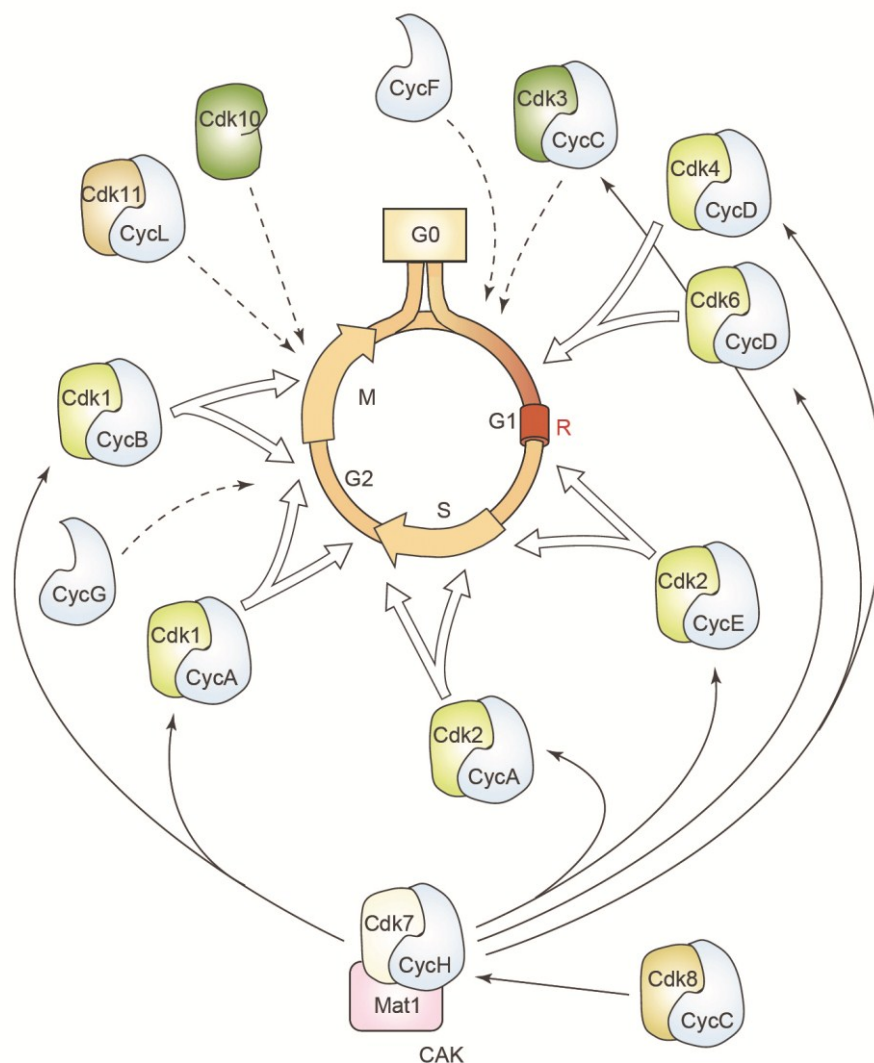
### 2.2.3 CDK regulující buněčný cyklus

Průchod fází G1 a přechod G1/S je řízen retinoblastomovým proteinem (Rb) (Weinberg, 1995). Aktivní defosforylovaný Rb je vázán na transkripční faktory ze skupiny E2F, které jsou touto vazbou inhibovány (Dyson, 1998; Malumbres and Barbacid, 2001). V průběhu přechodu G1/S je Rb nejprve částečně deaktivován komplexy CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D, v důsledku čehož dojde k částečnému uvolnění E2F a k transkripci cyklinu E. Cyklin E se spojí s CDK2 a komplex následně plně fosforyluje Rb, což vede k úplnému uvolnění transkripčních faktorů E2F a transkripci genů nutných pro vstup do S fáze (Sherr, 2000). Časně po vstupu do S fáze jsou cykliny D a E degradovány (Elledge and Harper, 1998). Komplex CDK2-cyklin A provádí buňku S fází, řídí expresi proteinů účastnících se syntézy DNA a zároveň inhibuje transkripční faktory skupiny E2F (Ford and Pardee, 1998; Xu *et al.*, 1994). V pozdní S fázi a během G2 fáze stoupá exprese cyklinů A a B a aktivita CDK1-cyklin A (Dehay and Kennedy, 2007). Přechod G2/M je zahájen aktivací CDC25 fosfatázy, která odstraňuje inhibiční fosfátové skupiny z komplexu CDK1-cyklin B a tento následně spouští procesy rozvolnění jaderné membrány a kondenzace chromatinu (Sausville, 2002). Signální dráhy ATM-Chk2 a ATR-Chk1 kontrolují aktivitu CDC25 a brání přechodu do M fáze v případě, že zaregistrují poškození DNA (Smith *et al.*, 2010). CDK3 je také spojena s regulací buněčného cyklu a pravděpodobně se za fyziologických podmínek podílí na inaktivaci Rb (Malumbres and Barbacid, 2005). Na druhou stranu bylo popsáno, že CDK3 váže cyklin C a stimuluje Rb během výstupu z G0 fáze u rakovinných buněk (Ren and Rollins, 2004). Schéma funkce CDK v řízení buněčného cyklu je shrnuto v Obr. 6.

### 2.2.4 CDK regulující transkripci genů

Do skupiny CDKi, které se podílí na regulaci exprese rozličných genů, patří pětice CDK (CDK7-11) (Malumbres and Barbacid, 2005). CDK7 je jedna z komponent CAK, která aktivuje pravděpodobně všechny CDKi účastnící se regulace buněčného cyklu (viz. 2.2.2). CAK spolu s šesti dalšími podjednotkami tvoří transkripční faktor

TFIIH, který nasedá na promotorovou sekvenci genů a spouští jejich transkripci (Lolli and Johnson, 2005; Fisher, 2005). Komplex CDK8-cyklin C fosforyluje C-terminální doménu velké podjednotky RNA polymerázy II, čímž tento enzym aktivuje a iniciuje nasednutí na promotory genů a syntézu mRNA (Akoulitchev *et al.*, 2000). Stejným mechanismem aktivuje RNA polymerázu II i CDK9, která spojením s cyklinem T a K vytváří transkripční faktor P-TEFb (Garriga and Grana, 2004). CDK10 inhibuje transaktivaci transkripčního faktoru Ets2, který reguluje expresi CDK1 (Kasten and Giordano, 2001). Komplex CDK11-cyklin L interaguje s proteiny RNPS1 a 9G8, které hrají roli v sestřihu mRNA (Loyer *et al.*, 2005).



**Obr. 6:** Průběh buněčného cyklu regulovaný aktivitou CDK. R značí tzv. restriční bod, což je kontrolní bod na konci G1 fáze, kterým když buňka projde, nemůže nadále setrvat v G1 fázi nebo se vrátit do klidové fáze G0 a je nucena pokračovat v průchodu buněčným cyklem. Cyc – cyklin; Cdk – cyklin-dependentní kináza; Mat1 – podjednotka CAK; CAK – kináza aktivující CDK. Převzato a upraveno z Malumbres a Barbacid, 2005.

## 2.2.5 Deregulace kontroly buněčného cyklu v rakovině

Změněná exprese, popř. aktivita CDK nebo jejich inhibitorů je velmi často sledovaným rysem u buněk, jež podlely rakovinnému bujení (Sherr, 1996). Tato deregulace vede ke ztrátě kontroly nad buněčným cyklem a dává tak rakovinným buňkám možnost rychle proliferovat bez ohledu na okolní podmínky, nashromážděné mutace a nedostatečnou diferenciaci (Shapiro, 2006). Deregulace signálních kaskád zprostředkovaných CDK4, CDK6, cyklinem D, endogenními inhibitory ze skupiny INK4, Rb či E2F byly pozorovány u přibližně 80% nádorů (Dai and Grant, 2003). Funkce Rb může být u rakoviny ztracena v důsledku mutace či deaktivací na úrovni proteinu, např. vazbou s virálním E7 onkoproteinem lidského papilomaviru (Liu *et al.*, 2006). Velmi často sledovaným jevem je potlačení aktivity endogenního inhibitoru p16 prostřednictvím bodové mutace, delece či epigenetického utlumení transkripce (metylace). Toto potlačení zanechává buňky s trvale zvýšenou aktivitou komplexů CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D, což jim skýtá možnost nekontrolovaně proliferovat a uniknout procesu senescence (Shapiro, 2006). Zvýšená exprese CDK4 či cyklinu D v důsledku genové amplifikace je rovněž poměrně často sledovanou záležitostí u maligních buněk (Buschges *et al.*, 1999; Kanoe *et al.*, 1998; Muthusamy *et al.*, 2006). Mutace, způsobující ztrátu schopnosti CDK4 vázat inhibitory ze skupiny INK4, byla poprvé popsána u lidského melanomu (Wolfel *et al.*, 1995). Zvýšená exprese cyklinu D je další poměrně častou deregulací, která může být zapříčiněna zvýšenou aktivitou signální kaskády zahrnující působení signálního proteinu Ras. Kaskáda Ras hraje důležitou roli v aktivaci exprese cyklinu D a sama bývá při rakovině deregulována (Malumbres and Barbacid, 2003), což může způsobit indukci exprese tohoto důležitého cyklinu (Filmus *et al.*, 1994). Dalšími sledovanými abnormalitami pozorovanými u rakovinných buněk je zvýšená aktivita CDK1 a CDK2 v důsledku zvýšené exprese cyklinů A, B a E a dále zvýšená exprese fosfatázy CDC25, která kontroluje aktivitu CDK-cyklin B (Krystof and Uldrijan, 2010).

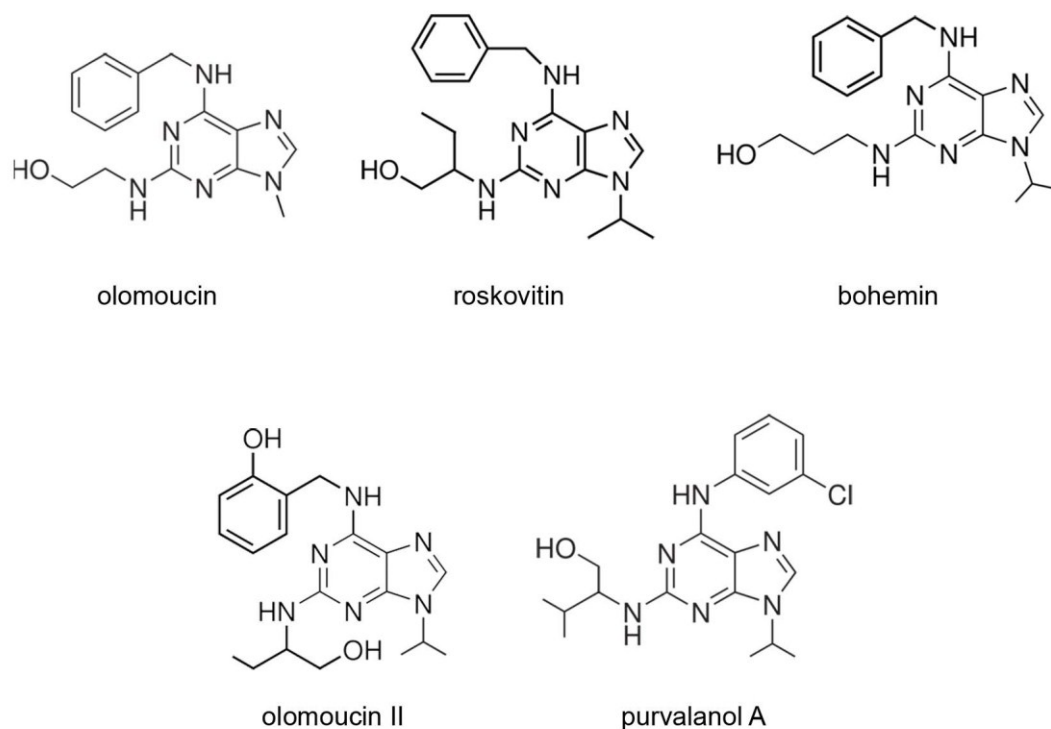
## 2.2.6 Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz

Výše popsaná deregulace CDK se logicky stala cílem pro design a vývoj syntetických inhibitorů CDK (CDKi); inhibice CDK pomocí těchto molekul byla přijata jako moderní a relativně netoxická alternativa léčby rakoviny (Shapiro, 2006). Během minulých 20 let bylo syntetizováno mnoho strukturně odlišných CDKi, přičemž přibližně 30 z nich vstoupilo do klinického testování pro léčbu rakoviny. CDKi vykazují antiproliferativní účinky, navozují zástavu buněčného cyklu v různých fázích v závislosti na jejich specifitě k jednotlivým CDK (Cicenas and Valius, 2011; Dai and Grant, 2003; Krystof and Uldrijan, 2010). CDKi, které inhibují CDK zodpovědné za regulaci transkripce (např. CDK 7 a 9), navíc efektivně indukují apoptózu tím, že aktivují tumor supresorový protein p53 a inhibují transkripci genů kódujících antiapoptotické proteiny, jako např. Bcl-2, Mcl-1, survivinu či XIAP (Krystof and Uldrijan, 2010; Lam *et al.*, 2001). CDKi, kterými jsem se zabýval ve své práci, budou podrobně diskutovány v následujících dvou podkapitolách.

### 2.2.6.1 Purinové CDKi

Purinové CDKi tvoří skupinu strukturně podobných látek odvozených od rostlinných hormonů cytokinů, které řídí růst, dělení, diferenciaci a senescenci rostlinných buněk (Havlicek *et al.*, 1997). Skelet purinových CDKi tvoří adenin, jenž je substituován v pozicích 2, 6 a 9 různými funkčními skupinami (Obr. 7). Tyto látky se váží do ATP vazebného místa CDK, a znemožňují tak navázání a hydrolýzu ATP – proto jsou řazeny mezi tzv. ATP kompetitivní CDKi (Meijer and Raymond, 2003). Podle jiné klasifikace je lze zařadit do skupiny tzv. panspecifických CDKi, jejichž společným rysem je inhibice více CDKi najednou. Vedle interakcí s CDK byla prokázána také inhibice jiných zástupců rodiny protein kináz v řádu mikromolárních koncentrací, jako např. ERK, JNK, Src a mnoho dalších (Bain *et al.*, 2003; Bain *et al.*, 2007). Purinové inhibitory inhibují CDK1, 2, 5, 7 a 9, přičemž afinita k jednotlivým CDK se pro každou látku liší a afinita k CDK4 a CDK6 je nízká (Meijer and Raymond, 2003). Purinové CDKi nemají pouze léčebný potenciál, ale slouží též jako výzkumné

prostředky pro studium buněčného cyklu, neuronálních funkcí a apoptózy. V následujících odstavcích budou diskutovány vlastnosti pěti purinových CDKi, které byly předmětem našeho výzkumu. K výběru jednotlivých látek nás přiměla studie An *et al.*, kteří s pomocí transportu hematoporfyrinu přes membránové vezikuly připravené z Sf9 buněk transdukovaných lidským genem ABCG2 nastínili možnost interakce purinových CDKi s lékovým transportérem BCRP (An *et al.*, 2009).



**Obr. 7:** Struktury testovaných purinových CDKi.

**Olomoucín** byl prvním objeveným zástupcem purinových CDKi (Vesely *et al.*, 1994). Tato látka byla již před svým objevem komerčně dostupná jako antagonist rostlinné cytokinin-7-glukozyltransferázy, ale až Jaroslav Veselý ve spolupráci s Laurentem Meijerem objevili její afinitu k CDK (Meijer and Raymond, 2003). Olomoucín je nejméně potentní purinový CDKi vykazující afinitu k CDK1 ( $IC_{50} = 7 \mu M$ ), CDK2 ( $IC_{50} = 7 \mu M$ ) a CDK5 ( $IC_{50} = 3 \mu M$ ). Z jeho nespecifických cílů z rodiny protein kináz lze jmenovat např. ERK1 ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ) (Cicenas and Valius, 2011).

**Bohemin** patří stejně jako olomoucín k méně potentním zástupcům purinových CDKi. Inhibuje komplex CDK1-cyklin B ( $IC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$ ), CDK2-cyklin E ( $IC_{50} = 4,6 \mu\text{M}$ ) a CDK9-cyklin T ( $IC_{50} = 2,7 \mu\text{M}$ ) a nespecificky pak signální protein kinázu ERK2 ( $IC_{50} = 52 \mu\text{M}$ ) (Raynaud *et al.*, 2005; Krystof *et al.*, 2002). Poměrně hodně pozornosti bylo věnováno metabolismu boheminu; bylo prokázáno, že tato látka je intenzivně metabolizována izoformami CYP2A a CYP3A (Rypka *et al.*, 2002). U myši *in vivo* bylo sledováno, že bohemin je intenzivně metabolizován a z oběhu zmizí přibližně za 60 min, přičemž O- $\beta$ -D-glukosid je hlavním eliminovaným konjugátem (Chmela *et al.*, 2001).

**Purvalanol A** vykazuje mnohem vyšší inhibiční potenci pro CDK ve srovnání s předchozími dvěma látkami. Inhibiční afinita k CDK2 ( $IC_{50} = 4 - 70 \text{ nM}$ ) je asi 1000x vyšší než u olomoucínu a cca 100x vyšší než u roskovitinu (Cicenas and Valius, 2011; Dai and Grant, 2003; Krystof *et al.*, 2002). Purvalanol A inhibuje také CDK1 ( $IC_{50} = 50 \text{ nM}$ ), CDK5 ( $IC_{50} = 75 \text{ nM}$ ) a mnohem méně selektivní je pro CDK4 ( $IC_{50} = 850 \text{ nM}$ ) (Krystof *et al.*, 2002; Cicenas and Valius, 2011). Mimo interakcí s CDK purvalanol A výrazně inhibuje protein kinázy PAK4, PAK5, MELK, Src, ERK2 či DYRK1A (Bain *et al.*, 2003; Bain *et al.*, 2007). Purvalanol A účinně zastavuje proliferaci (Villerbu *et al.*, 2002) a zároveň indukuje apoptózu prostřednictvím inhibice fosforylace receptorů JAK2/STAT3 a RNA polymerázy II, což vede ke snížení exprese antiapoptotických proteinů (Iizuka *et al.*, 2008). Indukce apoptózy cestou inhibice signálních drah zahrnujících aktivitu transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B byla rovněž popsána (Agbottah *et al.*, 2008).

**Olomoucín II** vykazuje přibližně stejnou selektivitu a potenci jako roskovitin s výjimkou výrazně zvýšené afinity k CDK9. Olomoucín II inhibuje komplexy CDK1-cyklin B ( $IC_{50} = 7,6 \mu\text{M}$ ), CDK2-cyklin E ( $IC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ ), CDK4-cyklin D1 ( $IC_{50} = 19,8 \mu\text{M}$ ), CDK7-cyklin H ( $IC_{50} = 0,45 \mu\text{M}$ ) a CDK9-cyklin T ( $IC_{50} = 0,06 \mu\text{M}$ ) a dále protein kinázu ERK2 ( $IC_{50} = 32 \mu\text{M}$ ) (Krystof *et al.*, 2005). Olomoucín II má z purinových CDKi nejvyšší antiproliferativní a cytotoxické účinky na rakovinné buněčné linie. Co se týče těchto účinků *in vitro*, lze purinové CDKi seřadit následovně: olomoucín II > purvalanol A > bohemin = roskovitin > olomoucín, čemuž odpovídají nejen poznatky z literatury (Krystof *et al.*, 2002), ale i naše vlastní data. Nedávno bylo demonstrováno, že kombinace olomoucínu II s antivirotikem cidofovirem vede k téměř úplné zástavě replikace adenoviru sérotypu 4 (Holcakova *et al.*, 2010). Již dříve bylo

navrženo, že CDKi mohou vykazovat antivirální účinky proti virům, jež pro svou replikaci vyžadují aktivitu CDK hostitele (Schang *et al.*, 2006).

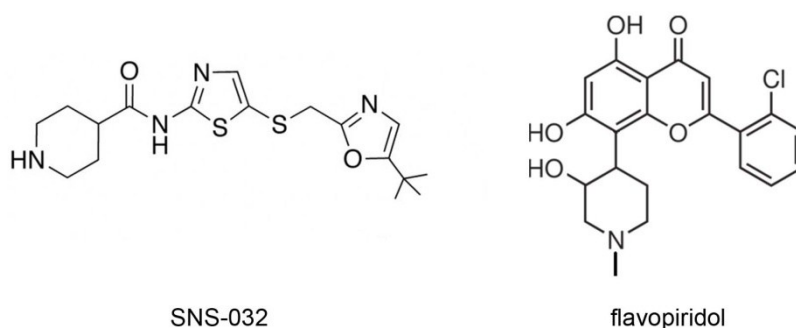
**Roskovitin** (CYC202, seliciclib) inhibuje komplexy CDK1-cyklin B ( $IC_{50} = 2.7 \mu\text{M}$ ), CDK2-cyklin E ( $IC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ ), CDK4-cyklin D1 ( $IC_{50} = 14.2 \mu\text{M}$ ), CDK7-cyklin H ( $IC_{50} = 0.49 \mu\text{M}$ ) a CDK9-cyklin T ( $IC_{50} = 0.74 \mu\text{M}$ ) (Krystof *et al.*, 2005). Dále inhibuje různé mitogenem aktivované protein kinázy a pyridoxal kinázu, což pravděpodobně podporuje jeho antiproliferativní účinek (Bach *et al.*, 2005). Roskovitin, resp. jeho účinnější R-izomer, jako jediný z purinových CDKi postoupil do fáze klinického zkoušení pro léčbu rakoviny. V I. fázi proběhlo několik klinických studií, kdy byl aplikován roskovitin sám nebo v kombinaci s cisplatinou či gemcitabinem, přičemž částečné odezvy bylo dosaženo u necelé poloviny pacientů. Ačkoliv v těchto studiích byly pozorovány nežádoucí účinky jako např. nauzea, letargie, vyrážky, závratě, hypokalemie a hyponatremie, léčba pomocí roskovitinu byla shledána jako bezpečná a klinické zkoušky pokročily do II. fáze (Dickson and Schwartz, 2009; Cicenas and Valius, 2011). V II. fázi je roskovitin testován pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic, nosohltanového karcinomu a leukemií (Malumbres and Barbacid, 2009; Aldoss *et al.*, 2009).

### 2.2.6.2 Nepurinové CDKi

Další skupinu CDKi tvoří látky, jejichž struktura není založena na substituovaném adeninovém skeletu (tzv. nepurinové CDKi). Z této skupiny jsme pro naše studium vybrali 2 látky (flavopiridol a SNS-032), které jsou již delší dobu předmětem klinického testování pro léčbu rakoviny, ale poznatky o jejich interakcích s lékovými transportéry jsou dosud velmi omezené (Obr. 8).

**Flavopiridol** je polosyntetický derivát rohitukinu, alkaloidu z rostliny *Dysoxylum binectariferum* a patří mezi nejprostudovanější CDKi (Dai and Grant, 2003). Jedná se o panspecifický a ATP kompetitivní inhibitor; flavopiridol inhibuje CDK1, 2, 4, 6, 7 a 9 v řádu 40 – 400 nM (Sausville, 2002; Huwe *et al.*, 2003). Inhibice CDK7 a 9 je velmi důležitá pro efektivní indukci apoptózy skrze snížení exprese antiapoptotických proteinů ze skupiny Bcl-2 či IAP; potlačení produkce antiapoptotických proteinů je

hlavním mechanismem této indukce (Dai and Grant, 2003; Krystof and Uldrijan, 2010; Sausville, 2002). Chao et al. pozorovali, že flavopiridolem zprostředkovaná inhibice transkripčního faktoru P-TEFb, jehož součástí je komplex CDK9-cyklin T, vede k efektivní inhibici replikace viru HIV (Chao *et al.*, 2000), což je v souladu s dříve zmíněnými antivirálními účinky olomoucínu II, který také výrazně inhibuje CDK9. Flavopiridol má antiangiogenní účinky, jelikož je schopen blokovat indukci vaskulárního epidermálního růstového faktoru (VEGF) (Melillo *et al.*, 1999). Dále inhibuje též receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a řadu signálních protein kináz (PKC, ERK1 aj.), přičemž inhibice těchto nespecifických cílů zřejmě podporuje antiproliferativní efekt flavopiridolu (Sedlacek, 2001). Flavopiridol se váže na dvoušroubovici DNA, což naznačuje, že DNA může být jeho další cílovou strukturou, a vysvětluje skutečnost, proč je flavopiridol schopen zabít i rakovinné buňky, které neprochází buněčným cyklem (Bible *et al.*, 2000). Flavopiridol byl testován v asi šedesáti klinických zkouškách fáze I i II. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u chronické lymfocytární leukemie, kde byla sledována částečná odezva u 40 % pacientů (Byrd *et al.*, 2007; Phelps *et al.*, 2009). Speciální pozornost je věnována kombinacím flavopiridolu se standardními cytotoxickými chemoterapeutiky, které vedou k synergistickému účinku. Mechanismus a úroveň synergizmu úzce souvisí s druhem současně podávané cytotoxické látky a velmi důležité je i pořadí podání (Dai and Grant, 2003; Shapiro, 2006). V klinické zkoušce fáze II pro léčbu akutní myeloidní leukemie, kdy byl kombinován flavopiridol, cytozin arabinosid a mitoxantron, bylo dosaženo kompletní remise u 75 % pacientů bez předchozí léčby a u 75 %, kteří prodělali časný relaps po předchozí cytostatické léčbě (Karp *et al.*, 2007).



**Obr. 8:** Struktury testovaných nepurinových CDKi.



**SNS-032** (BMS-387032) je relativně selektivní a potentní CDKi, který inhibuje CDK2 ( $IC_{50} = 38$  nM), CDK7 ( $IC_{50} = 62$  nM) a CDK9 ( $IC_{50} = 4$  nM). Inhibuje též ostatní CDK, ale až ve významně vyšších koncentracích ( $IC_{50} > 300$  nM) (Cicenas and Valius, 2011). Podobně jako flavopiridol, SNS-032 blokuje produkci VEGF, čímž omezuje angiogenezi indukovanou rakovinnými buňkami (Ali *et al.*, 2007). SNS-032 také negativně působí na invazní a migrační schopnosti nádorových buněk prostřednictvím inhibice exprese HIF-1, který aktivuje geny spojené s rozvojem těchto schopností (Ali *et al.*, 2009). Na *in vitro* úrovni byl sledován synergistický účinek kombinace SNS-032 a cytozin arabinosidu. Tento efekt byl přičten účinné redukci exprese antiapoptotických proteinů (XIAP, Bcl-2 a Mcl-1) (Walsby *et al.*, 2011). Na liniích NCI-H460 a A549 byl demonstrován synergistický účinek SNS-032 s ozařováním, přičemž v tomto případě byl princip účinku vysvětlen blokadou mechanismů účastnících se oprav zlomů DNA a následným zvýšením citlivosti buněk k radioterapii (Kodym *et al.*, 2009). První tři klinické zkoušky fáze I odhalily skutečnost, že SNS-032 je pacienty dobře snášen a je relativně bezpečný (Cicenas and Valius, 2011). V následující zkoušce fáze I byl SNS-032 testován pro léčbu metastatických solidních nádorů a refrakterního lymfomu. Byly pozorovány nevýrazné nežádoucí účinky (závratě a nauzea), přičemž stabilizace nemoci bylo dosaženo u 15 % pacientů (Heath *et al.*, 2008). Další klinická zkouška fáze I byla provedena u devatenácti pacientů s chronickou lymfocytární leukemií a mnohočetným myelomem. Hlavním nežádoucím účinkem byla myelosuprese. Pouze u jednoho pacienta došlo k částečné odpovědi na léčbu, u dvou pak ke stabilizaci nemoci (Tong *et al.*, 2010).

## **2.2.7 Farmakokinetické interakce studovaných CDKi**

Základní farmakokinetické parametry CDKi odrážející farmakokinetické chování těchto látek v organismu (biologická dostupnost, distribuční objem, eliminační poločas a clearance) byly poměrně dobře charakterizovány během preklinických a klinických studií (Raynaud *et al.*, 2005; Shapiro, 2004). Detailní poznatky o přestupu CDKi přes biologické membrány a především o interakcích s transportními systémy jsou naopak velmi omezené.

Jako první se problematikou interakcí CDKi s lékovými efluxními transportéry zabývali Hooijberg *et al.*, kteří pomocí metody stanovení ATPázové aktivity určili flavopiridol jako substrát MRP1 (Hooijberg *et al.*, 1999). S využitím páru buněčných linií CHO lišících se v expresi P-gp bylo prokázáno, že flavopiridol je slabým substrátem P-gp (Boerner *et al.*, 2001). Co se týče interakcí flavopiridolu s lékovými efluxními transportéry, bylo dále zjištěno, že tento CDKi i jeho glukuronidovaný konjugát jsou u potkanů aktivně vylučovány do žluče prostřednictvím Mrp2 (Jager *et al.*, 2003). Na základě *in vivo* studií u „wild-type“ myši a jejich modifikovaného protějšku s „knockoutovaným“ genem *Abcb1* byl SNS-032 určen jako slabý P-gp substrát (Kamath *et al.*, 2005). Bachmaier s Millerem jako první naznačili inhibici P-gp roskovitinem pomocí akumulčních experimentů s rhodaminem 123 v endoteliálních buňkách odvozených z bovinních mozkových kapilár (Bachmeier and Miller, 2005). Pomocí metody transportu hematoporfyrinu přes membránové vezikuly připravené z Sf9 buněk transdukovaných lidským genem *ABCG2* bylo demonstrováno, že purvalanol A a WHI-P180 inhibují BCRP s vysokou afinitou, zatímco afinita roskovitinu a boheminu je nižší a afinita olomoucínu je prakticky nulová (An *et al.*, 2009). O rok později Rajnai *et al.* s využitím několika *in vitro* metodik určili roskovitin jako specifický substrát P-gp s vysokou afinitou a navrhli, že tato farmakokinetická interakce může být příčinou nedostatečné akumulace roskovitinu v mozkových buňkách (Rajnai *et al.*, 2010).

Omezené jsou též poznatky o interakcích CDKi s biotransformačními enzymy, které spolu s lékovými transportéry významně ovlivňují absorpci a eliminaci léčiv. Glukuronidace prostřednictvím enzymu UDP-glukuronyltransferázy byla prokázána jako hlavní biotransformační cesta flavopiridolu (Jager *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2002). Dostupné informace týkající se biotransformace boheminu jsou shrnuty v podkapitole 2.2.6.1. Co se týče roskovitinu, byla demonstrována jeho metabolizace různými izoformami cytochromu P450 *in vitro* i *in vivo*, přičemž karboxylát byl detekován jako převažující metabolit. Glukuronidace roskovitinu a jeho metabolitů následovaná sekrecí do žluče a vyloučením stolicí byla určena jako hlavní eliminační cesta tohoto purinového CDKi u potkanů (McClue and Stuart, 2008). Nedávno byla sledována inhibice CYP3A4, CYP1A2 a CYP2C9 izoformami cytochromu P450 olomoucínem II (Siller *et al.*, 2009).

Znalosti farmakokinetických interakcí stávajících i potenciálních léčiv s lékovými efluxními transportéry jsou z klinického pohledu velmi důležité. Na základě těchto znalostí lze do určité míry předpovědět jednak farmakokinetické chování zkoumané látky a také změnu farmakokinetického chování současně podaných léčiv, které interagují se stejným transportérem jako zkoumaná látka, potažmo vznik potenciálně nebezpečných lékových interakcí (Giacomini *et al.*, 2010).

### 3 Cíle práce

Z předchozí podkapitoly vyplývá, že znalosti interakcí studovaných CDKi s lékovými efluxními transportéry jsou velmi omezené, přestože se jedná o klinicky důležité téma. Hlavním cílem této dizertační práce bylo studium farmakokinetických interakcí CDKi s ABC lékovými efluxními transportéry. Dílčími cíli práce bylo:

- 1) Studium inhibice BCRP purinovými CDKi *in vitro* pomocí akumulčních a transportních metod.
- 2) Studium inhibice P-gp purinovými i nepurinovými CDKi *in vitro* pomocí akumulčních metod.
- 3) Studium inhibice potkaního Bcrp purinovými CDKi *in situ* s využitím metody duální perfúze potkaní placenty.
- 4) Studium substrátové afinity purinových i nepurinových CDKi k BCRP a P-gp *in vitro* pomocí metody stanovení ATPázové aktivity a transportní metody.
- 5) Studium substrátové afinity purinových CDKi k potkanímu Bcrp a P-gp *in situ* s využitím metody duální perfúze potkaní placenty.
- 6) Zavedení metody „combination index method of Chou-Talalay“ a její aplikace na studium kombinace purinových CDKi s cytostatiky, která jsou substráty lékových transportérů.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a metodika

#### 4.1.1 Chemikálie a reagensie

Purinové CDKi, olomoucín, olomoucín II, bohemín, roskovitin a purvalanol A, byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) nebo Merck (Darmstadt, Německo). Nepurinové CDKi, SNS-032 a flavopiridol, byly od SelleckChem (Houston, USA). Fumitremorgin C, potentní a specifický inhibitor BCRP (Rabindran *et al.*, 2000), byl pořízen od Alexis Corporation (Lausanne, Švýcarsko). Ko143, další potentní a specifický inhibitor BCRP (Allen *et al.*, 2002), byl obdržán od Enzo Life Sciences AG (Lausen, Švýcarsko). LY335979, specifický a potentní inhibitor P-gp (Dantzig *et al.*, 1996), byl zakoupen od Toronto Research Chemicals (North York, Kanada). GF120918, potentní duální inhibitor P-gp/BCRP (Hyafil *et al.*, 1993; de Bruin *et al.*, 1999), byl pořízen od GlaxoSmithKline (Greenford, Velká Británie). Glyburid, známý duální substrát BCRP/P-gp (Gedeon *et al.*, 2006; Golstein *et al.*, 1999), byl od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Jeho radioaktivně značená forma, [<sup>3</sup>H]-glyburid, byla zakoupena od Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, USA). Modelový duální substrát P-gp/BCRP, hoechst 33342 (Lalande *et al.*, 1981; Scharenberg *et al.*, 2002), byl obdržán od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Daunorubicin, známý substrát P-gp (Spoelstra *et al.*, 1992), a mitoxantron, substrát BCRP (Litman *et al.*, 2000), byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). XTT sodná sůl, fenazin metosulfát a dextran značený fluoresceinem izothiokyanátem byly od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Pentobarbital byl pořízen od Abbott Laboratories (Abbott Park, USA). Pierce BCA protein assay kit sloužící pro stanovení obsahu proteinů ve vzorcích byl obdržán od Thermo Scientific (Rockford, USA). MDR1 PREDEASY ATPase kit použitý pro stanovení ATPázové aktivity P-gp byl od Solvo Biotechnology (Szeged, Maďarsko). Reagensie pro kultivaci buněčných linií byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) nebo Gibco BRL Life Technologies (Rockville, USA). Ostatní použité chemikálie byly v čistotě „pro analýzu“.

### 4.1.2 Buněčné kultury

Psí ledvinná epiteliální MDCKII linie transdukovaná lidským ABCG2 genem (MDCKII-ABCG2), která stabilně exprimuje lidský BCRP transportér, byla vyvinuta v laboratoři Dr. Schinkela (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holandsko). Stejný původ má i MDCKII linie transdukovaná lidským ABCB1 genem (MDCKII-ABCB1), která stabilně exprimuje lidský P-gp. Tyto dvě sublinie spolu s parentní linií (MDCKII-par) byly kultivovány v kompletním „Dulbecco's modified Eagle's“ médiu (DMEM) s 10 % fetálního bovinního séra (FBS). Lidská choriokarcinomová linie BeWo byla pořízena z Evropské kolekce buněčných kultur (Salisbury, Velká Británie) a byla kultivována v Ham's F12 médiu, které obsahovalo 1,5 g/l bikarbonát sodný, 10 % FBS a 2 mM L-glutamin. Lidská jaterní karcinomová linie HepG2 byla zakoupena z „American Type Cell Collection“ (Manassas, USA) a kultivována v kompletním DMEM s 1 mM pyruvát sodným, 0,1 mM neesenciálními aminokyselinami a 10 % FBS. Nenádorová HRP-1 linie, odvozená od potkaního trofoblastu, byla darována Dr. Michaelem Soaresem (University of Kansas Medical Center, Kansas) a byla kultivována v RPMI 1640 médiu obsahujícím 10 % FBS, 1 mM pyruvát sodný a 50  $\mu$ M  $\beta$ -merkaptoetanol.

### 4.1.3 Zvířata

Březí samice potkana kmene Wistar byly nakupovány od Biotest s.r.o. (Konárovice, Česká republika) a chovány při periodě 12/12 den/noc s krmnými peletami a vodou *ad libitum*. Experimenty byly prováděny v 21. den březosti. Samice potkana byly před pokusem anestetovány pentobarbitalem (40 mg/kg) podaným intravenózně do ocasní žíly. Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (Univerzita Karlova v Praze) a prováděny v souladu s Průvodcem pro péči a použití laboratorních zvířat (1996) a Evropskou úmluvou o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely (Štrasburk, Francie, 1986).

#### 4.1.4 Akumulační studie s hoechst 33342

Buňky MDCKII-ABCG2 ( $6 \times 10^4$ ; studie inhibice BCRP) nebo MDCKII-ABCB1 ( $5 \times 10^4$ , studie inhibice P-gp) a MDCKII-par ( $4 \times 10^4$ ; kontrola) byly nasazeny na 96 jamkovou destičku v růstovém médiu 24 hod před experimentem. Po uplynutí kultivační doby bylo médium odsáto a buňky dvakrát omyty předeřhřátým 1 x fosfátovým pufrem (PBS, z angl. „phosphate buffered saline“). K buňkám byl přidán roztok CDKi v médiu Opti-MEM (OPT) a do kontrolních jamek pouze čistý OPT. V případě studia inhibice BCRP byl navíc aplikován i fumitremorgin C a u studia inhibice P-gp pak LY335979 jako pozitivní inhibiční kontrola. Následovala inkubace 30 min v inkubátoru a přidavek hoechst 33342 ve finální koncentraci 8  $\mu$ M. Fluorescence byla měřena ve spodním modu (excitační vlnová délka = 360 nm, emisní vlnová délka = 465 nm) ihned po přidavku substrátu v 1 min intervalech po dobu 30 min na mikrodestičkovém spektrofotometru Genios Plus (Tecan, Salzburg, Rakousko).

#### 4.1.5 Akumulační studie s glyburidem

Akumulační studie s glyburidem byla až na malé změny provedena dle postupu uvedeného v naší předchozí publikaci (Staud *et al.*, 2006). Buňky MDCKII-ABCG2 ( $18 \times 10^4$ ) a MDCKII-par ( $15 \times 10^4$ ) byly nasazeny na 24 jamkovou destičku 24 hod před experimentem. Poté bylo médium odsáto a buňky omyty předeřhřátým 1 x PBS. Buňky byly následně preinkubovány s čistým OPT (kontrola) nebo s roztokem CDKi, popř. fumitremorginu C v OPT za standardních podmínek v inkubátoru po dobu 1 hod. Po preinkubaci byl přidán [ $^3$ H]-glyburid ve finální koncentraci 10 nM a buňky byly vloženy do inkubátoru na 4 hod. Aktivní eflux byl zastaven umístěním destičky na ledovou podložku a odsátím média. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty ledovým 1 x PBS a lyzovány v 5 % dodecylsulfátu sodném 24 hod. Detekce [ $^3$ H]-glyburidu v lyzátu byla prováděna radiometricky pomocí scintilačního analyzáru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Boston, USA). Získané hodnoty radioaktivity byly

normalizovány na celkový obsah proteinů, který byl stanoven Pierce BCA protein assay kitem (bicinchoninová metoda).

#### 4.1.6 Akumulační studie s daunorubicinem

Buňky MDCKII-ABCB1 ( $15 \times 10^4$ ) a MDCKII-par ( $15 \times 10^4$ ) byly nasazeny na 12 jamkovou destičku 24 hod před experimentem. Po uplynutí kultivační doby bylo médium odsáto a buňky omyty přehřátým 1 x PBS. Buňky byly následně preinkubovány s čistým OPT (kontrola) nebo s roztokem CDKi, popř. LY335979, v OPT za standardních podmínek v inkubátoru po dobu 30 min. Po preinkubaci byl přidán daunorubicin ve finální koncentraci 2  $\mu\text{M}$  a buňky byly vloženy do inkubátoru na 1 hod. Aktivní transport byl zastaven umístěním destičky na ledovou podložku a odsátím média. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty ledovým 1 x PBS, uvolněny pomocí 10 x trypsinu, rozsuspendovány v 2 % roztoku FBS v 1 x PBS a uloženy do doby, než byly analyzovány, při 4 °C. Fluorescence buněk byla stanovena pomocí C6 průtokového cytometru (Accuri, Ann Arbor, USA) s nastavením analýzy 10000 buněk v každém ze vzorků při použití excitačního filtru s vlnovou délkou 488 nm a emisního filtru o vlnové délce 585 nm.

#### 4.1.7 Transport přes buněčnou monovrstvu

Transportní experimenty byly s výjimkou několika malých změn provedeny dle postupu uvedeného v naší předchozí publikaci (Cervený *et al.*, 2006). Tyto experimenty byly použity jak pro studium inhibičních, tak i substrátových vlastností purinových CDKi.

V případě inhibičních experimentů byly buňky MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par nasazeny v počtu  $1 \times 10^6$  na membránové inzerty (3  $\mu\text{m}$  velikost pórů, průměr 24 mm; Costar, Cambridge, USA) 72 hod před experimentem. Po uplynutí kultivační doby bylo médium odsáto a buňky omyty na apikální i bazální straně přehřátým 1 x PBS. Do obou kompartmentů byl přidán roztok CDKi nebo



fumitremorginu C v OPT, popř. čistý OPT (kontrola) a buňky byly preinkubovány v inkubátoru 1 hod. Experiment byl odstartován odsátím média v příslušném kompartmentu a výměnou za OPT obsahující [<sup>3</sup>H]-glyburid o finální koncentraci 10 nM a CDKi nebo fumitremorgin C. Vzorky byly odebrány v dvouhodinových intervalech po celkovou dobu 6 hod. Radioaktivita vzorků byla stanovena pomocí scintilačního analyzáru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Boston, USA). Integrita buněčné monovrstvy byla ověřena ihned po skončení experimentu, kdy byl sledován přestup dextranu značeného fluoresceinem izothiokyanátem přes monovrstvu za 1 hod; pouze množství dextranu ≤ 1 % v akceptorovém kompartmentu bylo akceptováno.

U studií substrátových vlastností purinových CDKi byly buňky MDCKII-ABCG2 nebo MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par nasazeny v počtu  $1 \times 10^6$  na membránové inzerty (3  $\mu$ m velikost pórů, průměr 24 mm; Costar, Cambridge, USA) 72 hod před experimentem. V průběhu této kultivační doby bylo buňkám každých 24 hod měněno médium za čerstvé. Po uplynutí kultivační doby bylo médium odsáto a buňky byly omyty na apikální i bazální straně předehřátým 1 x PBS. Do obou kompartmentů byl přidán čistý OPT, popř. roztok fumitremorginu C nebo LY335979 v OPT a buňky byly preinkubovány v inkubátoru 1 hod. Experiment byl odstartován odsátím média v příslušném kompartmentu a výměnou za OPT obsahující CDKi nebo OPT obsahující CDKi a fumitremorgin C nebo LY335979. Vzorky byly odebrány v dvouhodinových intervalech po celkovou dobu 6 hod. Koncentrace CDKi ve vzorcích byla stanovena pomocí HPLC/MS analýzy na LC 20A Prominence chromatografickém systému (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) spojeném s LCQ Max advantage hmotnostním spektrometrem (Thermo Finnigan, San Jose, USA). Integrita buněčné monovrstvy byla ověřena stejně jako v předchozím případě.

#### **4.1.8 Kombinační studie**

Cytotoxicitní test XTT byl využit jak pro stanovení  $IC_{50}$  jednotlivých látek, tak pro samotné kombinační studie. Buňky BeWo ( $1,5 \times 10^4$ ), HepG2 ( $1,5 \times 10^4$ ), HRP-1 ( $1 \times 10^4$ ), MDCKII-ABCB1 ( $1 \times 10^5$ ) nebo MDCKII-par ( $1 \times 10^5$ ) byly nasazeny 24 hod před experimentem. Poté bylo médium odsáto a vyměněno za čerstvé médium (kontrola) nebo médium obsahující CDKi nebo mitoxantron (experimenty sledující vliv

BCRP) nebo daunorubicin (experimenty sledující vliv P-gp). Buňky byly kultivovány v inkubátoru 72 hod a poté bylo médium odsáto a vyměněno za roztok 0,167 mg/ml XTT s fenazin metosulfátem v OPT. Buňky byly následně inkubovány za standardních podmínek 2 – 4 hod v závislosti na testované buněčné linii. Po uplynutí inkubační doby byla stanovena absorbance při vlnové délce 450 nm na mikrodestičkovém spektrofotometru Genios Plus (Tecan, Salzburg, Rakousko). Získané hodnoty  $IC_{50}$  byly použity pro návrh koncentrací pro kombinační experimenty.

Pro tento účel jsme využili metody „combination index method of Chou-Talalay“, která umožňuje přesnou kvantifikaci kombinačního účinku dvou a více látek pomocí výpočtu kombinačního indexu. V rámci této metody je synergismus charakterizován jako kombinační účinek vyšší než součet účinků jednotlivých látek, aditivní efekt je roven součtu účinků jednotlivých látek a antagonismus odpovídá kombinačnímu účinku menšímu než je součet účinků jednotlivě podaných látek (Chou and Talalay, 1984). V české odborné literatuře bývají kombinační účinky léčiv většinou kategorizovány odlišným způsobem. Vzhledem k tomu, že jsme pro naši práci vybrali metodu „combination index method of Chou-Talalay“, používáme pro prezentaci výsledků nomenklaturu zavedenou autory metody. V experimentech byly látky kombinovány ve fixním koncentračním poměru; tento design je doporučován, jelikož umožňuje nejefektivnější analýzu dat (Chou, 2006). Fixní koncentrační poměr pro danou kombinaci byl založen na poměru  $IC_{50}$  testovaných látek a látky byly kombinovány v koncentracích, které u linií BeWo, HepG2 a HRP-1 odpovídaly 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 a 2 násobkům jejich  $IC_{50}$ . U buněk MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par byly použity koncentrace látek rovny 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,45, 0,5, 0,6, 0,7 a 0,75 násobku jejich  $IC_{50}$ . Metodicky se jednalo o XTT cytotoxicitní test popsáný v předchozím odstavci. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru CompuSyn 3.0.1 (ComboSyn Inc., Paramus, USA)

#### 4.1.9 Stanovení ATPázové aktivity P-gp

MDR1 PREDEASY ATPase kit byl použit dle instrukcí výrobce. Fosfátová kalibrace byla připravena pro každé měření. Verapamil sloužil jako pozitivní kontrola pro stimulaci ATPázové aktivity P-gp a cyklosporin A byl použit jako kontrola pro inhibici ATPázové aktivity P-gp.

#### 4.1.10 Duální perfúze potkaní placenty

*In situ* metoda duální perfúze potkaní placenty s recirkulací fetálního kompartmentu byla použita pro studium inhibičních i substrátových vlastností purinových CDKi na orgánové úrovni. Experimenty byly s výjimkou několika malých změn provedeny dle postupu uvedeného v naší předchozí publikaci (Staud *et al.*, 2006).

U samice potkana v celkové anestezii byla otevřena dutina břišní a uvolněn jeden děložní roh, který byl ponořen do předehřátého Ringerova roztoku. Do děložní tepny v blízkosti cévního zásobení vybrané placenty byl zaveden katetr a připojen k peristaltické pumpě. Do katetru byl přiveden Krebsův roztok obsahující 1 % dextransu rychlostí 1 ml/min. Děložní žíla byla přerušena, aby mohl mateřský roztok volně odtékat, a poté byla včetně cévních zásobení ostatních placent zaškrcena pomocí ligatur. Vybraná placenta s plodem byla vypreparována z děložního rohu, do pupečnickové tepny i žíly byly zavedeny katetry a poté byly připojeny přes manometr k umělému fetálnímu oběhu. Před začátkem pokusu byl kontrolován objem fetálního roztoku opouštějícího pupečnickovou žílu pro ověření, zda někde nedochází k jeho úniku. Po celou dobu pokusu byl sledován mateřský a fetální tlak, který se za normálních podmínek pohyboval těsně okolo fyziologických hodnot. Pokud došlo k úbytku fetálního roztoku nebo pokud se mateřský či fetální tlak výrazně měnil, pokus byl předčasně ukončen.

V případě testování inhibičních schopností purinových CDKi byla do mateřského i fetálního katetru zavedena infúze roztoku glyburidu a stopového množství [<sup>3</sup>H]-glyburidu s nebo bez přidaného CDKi a po pětiminutovém stabilizačním intervalu byl fetální roztok recirkulován po dobu 60 min. Vzorky byly odebírány každých 10 min

z fetálního i mateřského kompartmentu a koncentrace [<sup>3</sup>H]-glyburidu byla analyzována pomocí scintilačního analyzáru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Boston, USA).

U experimentů, které sloužily pro studium substrátových vlastností purinových CDKi, byla do mateřského i fetálního katetru zavedena infúze roztoku CDKi s nebo bez přidaného Ko143, GF120918, glyburidu nebo LY335979. Stejně jako v předchozím případě byl po pětiminutovém stabilizačním intervalu fetální roztok recirkulován po dobu 60 min s odběry vzorků v desetiminutových intervalech. Koncentrace CDKi ve vzorcích byla stanovena pomocí HPLC/MS analýzy na LC 20A Prominence chromatografickém systému (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) spojeném s LCQ Max advantage hmotnostním spektrometrem (Thermo Finnigan, San Jose, USA).

#### **4.1.11 Statistická analýza dat**

Výsledky akumulčních studií s hoechst 33342 a glyburidem, transportních experimentů s glyburidem (podkapitola 4.2.1), akumulčních studií s daunorubicinem (4.2.2), perfúzních experimentů s glyburidem sledujících inhibici Bcrp (4.2.5) a perfúzních experimentů ověřujících substrátovou afinitu olomoucínu II a purvalanolu A (4.2.6) byly statisticky analyzovány pomocí jednosměrného ANOVA testu následovaného Bonferroniho testem.

Ke statistické analýze dat z transportních experimentů sledujících substrátovou afinitu olomoucínu II a purvalanolu k BCRP (podkapitola 4.2.3) a k P-gp (4.2.4) byl použit nepárový Studentův t-test.

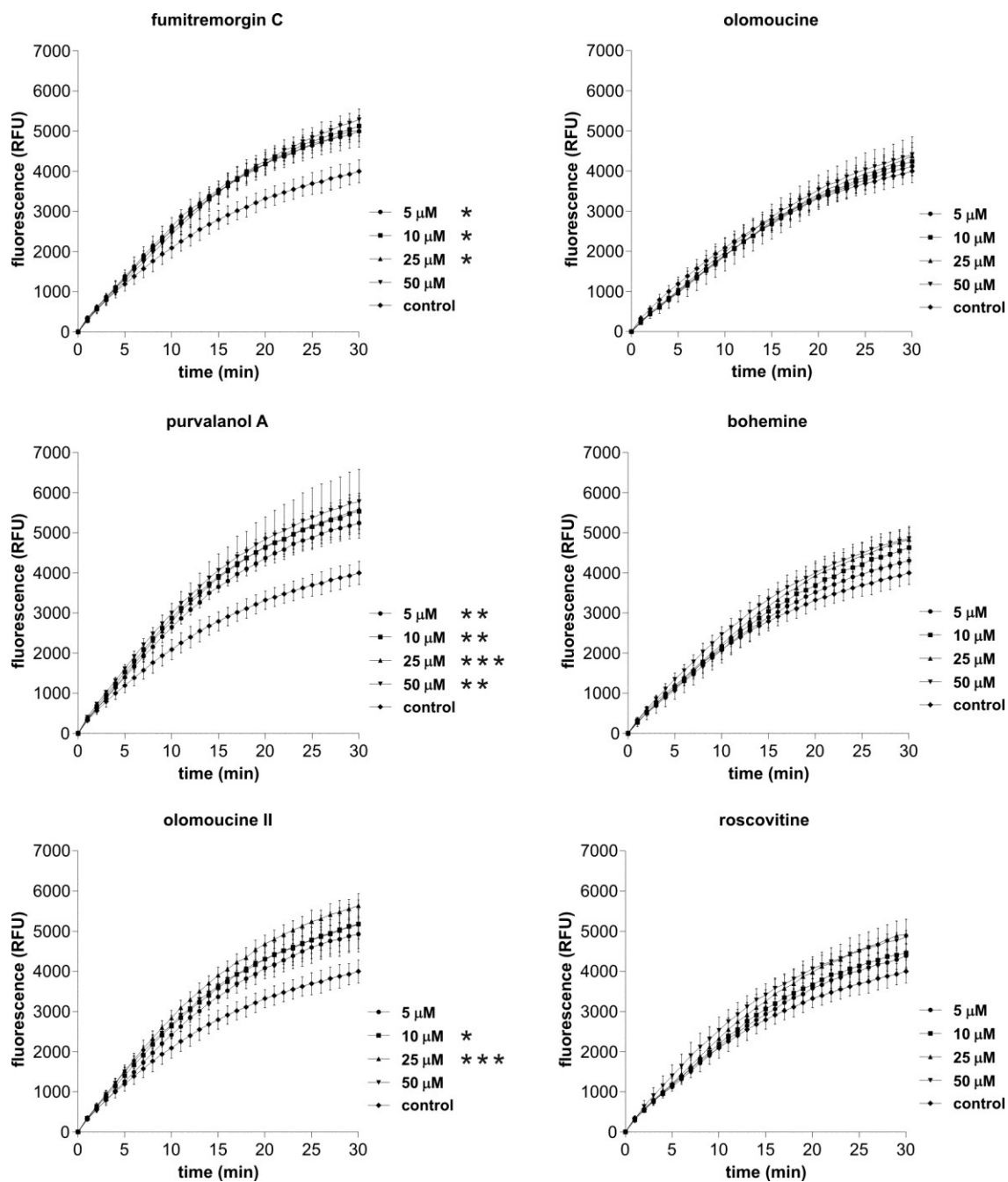
Veškerá statistická analýza byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

## 4.2 Výsledky a diskuze

### 4.2.1 Inhibice BCRP prostřednictvím CDKi *in vitro*

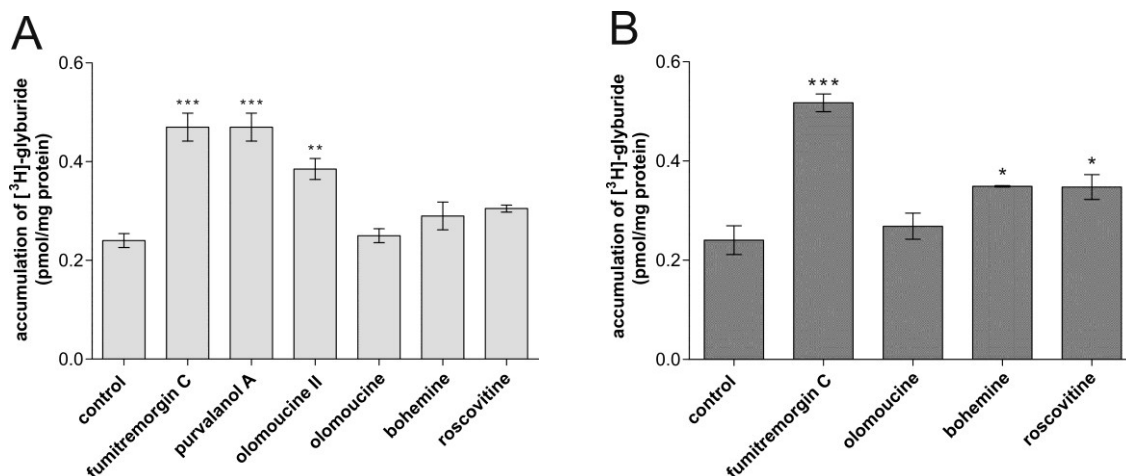
Inhibice funkce BCRP působením purinových CDKi (olomoucín, olomoucín II, bohemin, roskovitin a purvalanol A) na *in vitro* úrovni byla nejprve testována pomocí akumulační studie s modelovými substráty BCRP, hoechst 33342 a glyburidem, na buňkách MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par. Pokud u akumulačních experimentů dojde k inhibici funkce studovaného transportéru testovanou látkou, zvýší se akumulace modelového substrátu v transdukovaných buňkách ve srovnání se vzorky obsahujícími pouze samotný substrát. U parentních buněk kvůli absenci transportéru žádné změny v akumulaci substrátu po přidání inhibitoru nenastanou.

V případě hoechst 33342 jsme testovali 4 koncentrace CDKi a funitremorginu C (5, 10, 25 a 50  $\mu\text{M}$ ) a ukázali jsme, že ze všech testovaných látek nejvýrazněji zvyšují akumulaci substrátu purvalanol A a olomoucín II. Zatímco purvalanol A dosáhl svého maximálního efektu v 50  $\mu\text{M}$  koncentraci, přičemž signifikantně zvýšil akumulaci hoechst 33342 o 44 %, olomoucín II byl nejúčinnější už v koncentraci 25  $\mu\text{M}$  a zvýšil akumulaci substrátu o 41 %. Obě tyto látky byly překvapivě účinnější než funitremorgin C, specifický a potentní inhibitor BCRP, který zvýšil akumulaci hoechst 33342 maximálně pouze o 32 % v 50  $\mu\text{M}$  koncentraci. Maximální zvýšení akumulace u boheminu bylo rovno 21 % v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a 23 % u roskovitinu v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , avšak ani u jednoho z těchto dvou CDKi jsme neprokázali statistickou významnost této změny. Nevýrazná změna v akumulaci hoechst 33342 rovna maximálnímu zvýšení o 10 % v 50  $\mu\text{M}$  koncentraci byla pozorována v případě olomoucínu (Obr. 9). Dle očekávání jsme na parentních buňkách sledovali pouze nevýznamné změny v akumulaci hoechst 33342 u všech testovaných látek (data neuvedena).



**Obr. 9:** Akumulace 8  $\mu\text{M}$  hoechst 33342, modelového substrátu BCRP, v buňkách MDCKII-ABCG2 inkubovaných s nebo bez (kontrola) purinových CDKi. Fumitremorgin C byl použit jako pozitivní kontrola pro inhibici BCRP a pro účely porovnání inhibiční potence. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n = 9$ ). Pro statistickou analýzu byly použity hodnoty z konce pokusu, které byly porovnávány s kontrolní neinhibovanou hodnotou. RFU – relativní fluorescenční jednotky. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Na základě výsledků akumulace hoechst 33342 jsme pro akumulární experimenty s [<sup>3</sup>H]-glyburidem použili 2 koncentrace purinových CDKi (5 a 50 μM). V 5 μM koncentraci purvalanol A signifikantně zvýšil akumulaci glyburidu o 96 % v transdukovaných buňkách a dosáhl stejného inhibičního účinku jako funitremorgin C v této koncentraci. 5 μM olomoucine II byl též signifikantně efektivní a způsobil zvýšení akumulace glyburidu o 60 %. Bohemin a roskovitin zvýšily akumulaci substrátu o 21 a 27 %, statistickou významnost těchto změn jsme však neprokázali (Obr. 10A). V 50 μM koncentraci byl signifikantně účinný funitremorgin C (zvýšení akumulace o 115 %), bohemine (zvýšení o 45 %) i roskovitin (zvýšení o 45 %) (Obr. 10B). U 50 μM olomoucine II a purvalanolu A jsme v tomto 5 hodin trvajícím experimentu zaznamenali výraznou cytotoxicitu, a proto jsme u nich tuto koncentraci vyřadili z testování. Podobně jako u experimentů s hoechst 33342 nebyla prokázána statistická významnost změn u olomoucine, který způsobil zvýšení akumulace glyburidu pouze o 4 % v 5 μM koncentraci a o 12 % v koncentraci 50 μM. Na parentních buňkách jsme opět sledovali pouze nevýznamné změny v akumulaci substrátu u všech testovaných látek (data neuvedena).

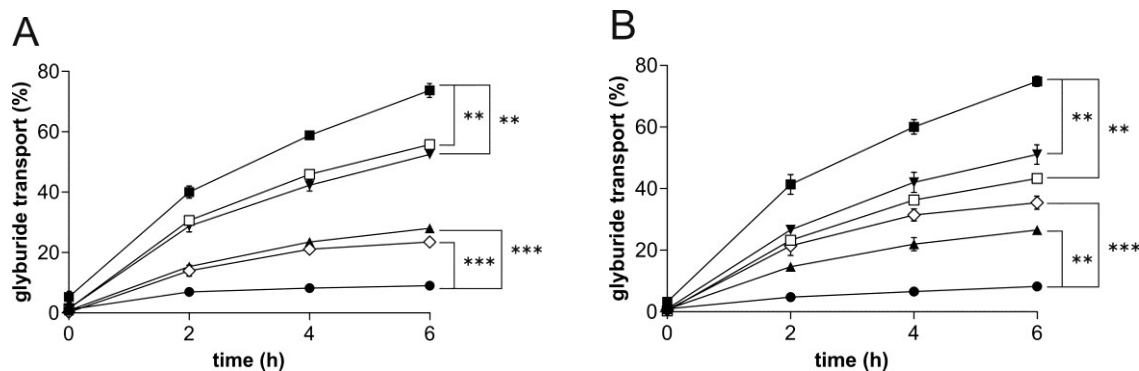


**Obr. 10:** Vliv purinových CDKi na akumulaci 10 nM [<sup>3</sup>H]-glyburidu, známého substrátu BCRP, v buňkách MDCKII-ABCG2. (A) 5 μM koncentrace inhibitoru, (B) 50 μM koncentrace inhibitoru. Funitremorgin C byl použit jako pozitivní kontrola pro inhibici BCRP a pro účely porovnání inhibiční potence. Získané hodnoty koncentrace [<sup>3</sup>H]-glyburidu byly normalizovány na celkový obsah proteinů. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (n = 9). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 v porovnání s neinhibovanou kontrolní hodnotou.

Ovlivnění funkce BCRP prostřednictvím olomoucínu II a purvalanolu A, jež byly v akumulčních experimentech pozorovány jako nejúčinnější inhibitory, byla dále ověřena pomocí transportních experimentů. V těchto experimentech jsme aplikovali [<sup>3</sup>H]-glyburid jako substrát a sledovali vliv olomoucínu II a purvalanolu A na jeho transport přes buněčnou monovrstvu MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par. Metoda využívající transport přes polarizovanou buněčnou monovrstvu je založena na skutečnosti, že pokud je daná látka substrátem studovaného transportéru, dojde na transdukovaných buňkách k urychlení jejího transportu v jednom směru, zatímco v opačném směru je transport omezen. Směr, v kterém bude transport látky urychlen nebo omezen, souvisí s lokalizací transportéru na apikální či bazolaterální membráně. Pokud daná látka není substrátem nebo je její transport inhibován testovanou látkou, žádná asymetrie v transportu nenastane. Na parentních buňkách kvůli absenci transportéru také k žádné asymetrii v transportu nedojde (i když je látka substrátem).

Na základě předchozích výsledků jsme vybrali 10  $\mu$ M koncentraci CDKi a fumitremorginu C. K porovnání výsledků sloužil transportní poměr ( $r$ ) vypočítaný z dat na konci experimentu, který je definován jako poměr transportu v bazolaterálně-apikálním směru ku transportu v apikálně-bazolaterálním směru. Fumitremorgin C i olomoucín II významně snížily asymetrii transportu glyburidu: zatímco neovlivněná asymetrie byla rovna  $r = 8,2$ , fumitremorgin C ji snížil na  $r = 1,9$  a olomoucín II na  $r = 2,4$  (Obr. 11A). Purvalanol A ( $r = 1,2$ ) byl nejúčinnější inhibitor BCRP v tomto experimentu, jelikož téměř kompletně zamezil asymetrii v transportu glyburidu (Obr. 11B). Na parentních buňkách byla sledována pouze zanedbatelná asymetrie v transportu glyburidu a nezaznamenali jsme ani žádné významné změny po aplikaci CDKi (data neuvedena).





**Obr. 11:** Transport 10 nM [ $^3\text{H}$ ]-glyburidu přes buněčnou monovrstvu MDCKII-ABCG2 ovlivněný (A) 10  $\mu\text{M}$  olomoucinem II a (B) 10  $\mu\text{M}$  purvalanolem A. 10  $\mu\text{M}$  funitremorgin C byl využit jako pozitivní kontrola pro inhibici BCRP a pro účely porovnání inhibiční potence. ■, transport v bazolaterálně-apikálním směru; ●, transport v apikálně-bazolaterálním směru; ▼, transport v bazolaterálně-apikálním směru ovlivněný funitremorginem C; ▲, transport v apikálně-bazolaterálním směru ovlivněný funitremorginem C; □, transport v bazolaterálně-apikálním směru ovlivněný olomoucinem II nebo purvalanolem A; ◇, transport v apikálně-bazolaterálním směru ovlivněný olomoucinem II nebo purvalanolem A. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatné odchylky (n = 3). Pro statistickou analýzu byly použity hodnoty z konce pokusu. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

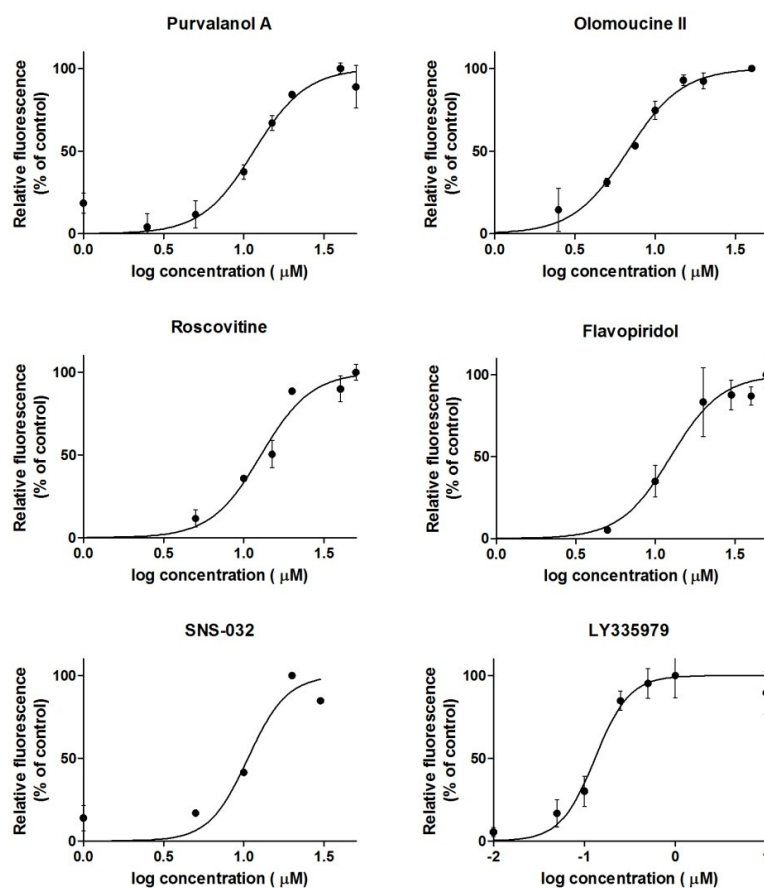
Na základě našich dat z akumulčních a transportních experimentů lze studované CDKi zařadit mezi inhibitory BCRP a dle inhibiční potence je můžeme seřadit následovně: purvalanol A > olomoucine II > bohemine = roskovitine. Získaná data přitom velmi dobře korelují s dříve popsanou inhibicí BCRP purinovými CDKi (purvalanol A, WHI-P180, roskovitine a bohemine) (An *et al.*, 2009). Autoři studie pomocí transportu hematoporfyrinu přes membránové vezikuly připravené z Sf9 buněk transdukováných lidským genem ABCG2 prokázali, že purvalanol A je inhibitor BCRP s vysokou afinitou, zatímco afinita roskovitinu a boheminu je nižší a afinita olomoucinu je prakticky nulová. S ohledem na naše výsledky lze očekávat, že studované CDKi, zejména purvalanol A a olomoucine II, mohou do značné míry ovlivňovat farmakokinetické chování současně podaných léčiv, která jsou transportována prostřednictvím BCRP. Toto zjištění je důležité vzhledem k možnému zavedení těchto CDKi do klinické sféry.

Diskutované výsledky jsou součástí publikace Hofman *et al.* (2012), která byla publikována v časopise *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

## 4.2.2 Inhibice P-gp prostřednictvím CDKi *in vitro*

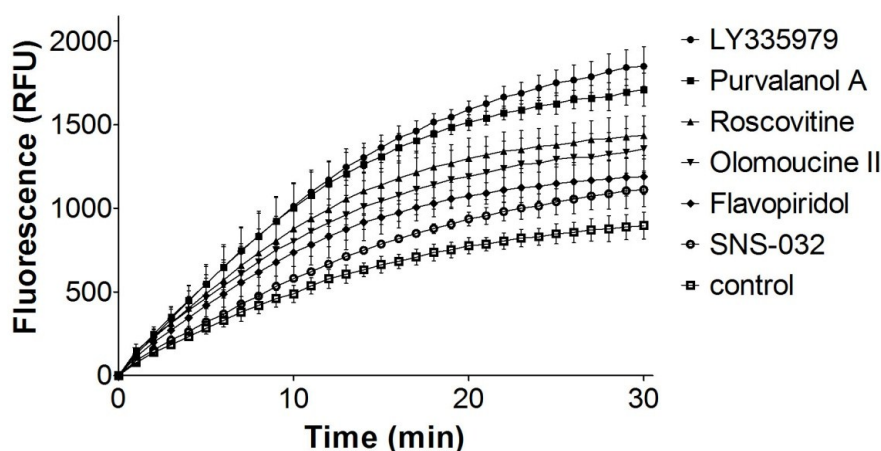
Podobně jako v předchozím případě jsme pro studium inhibice P-gp využili akumulačních metod se známými substráty P-gp, hoechst 33342 a daunorubicinem, na buněčných liniích MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par. V této fázi práce jsme hodnotili inhibiční účinky jak purinových CDKi (purvalanol A, olomoucine II, roscovitine), tak CDKi strukturně odlišných (flavopiridol, SNS-032).

U všech látek jsme pozorovali na koncentraci závislé zvýšení akumulace hoechst 33342 v MDCKII-ABCG2 buňkách. Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných CDKi se pohybovaly v rozmezí 6 – 18  $\mu\text{M}$ , u modelového specifického inhibitoru P-gp LY335979 byla zjištěna hodnota  $IC_{50} = 130 \text{ nM}$  (Obr. 12).



**Obr. 12:** Akumulace 8  $\mu\text{M}$  hoechst 33342 v buňkách MDCKII-ABCB1 ovlivněná CDKi nebo LY335979 vyjádřená jako křivky závislosti „koncentrace-účinek“. Za 100 % kontrolu byla pro každou látku považována její nejvyšší dosažená hodnota, jako 0 % kontrolu pak hodnota akumulace ničím neovlivněná. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n = 6$ ).

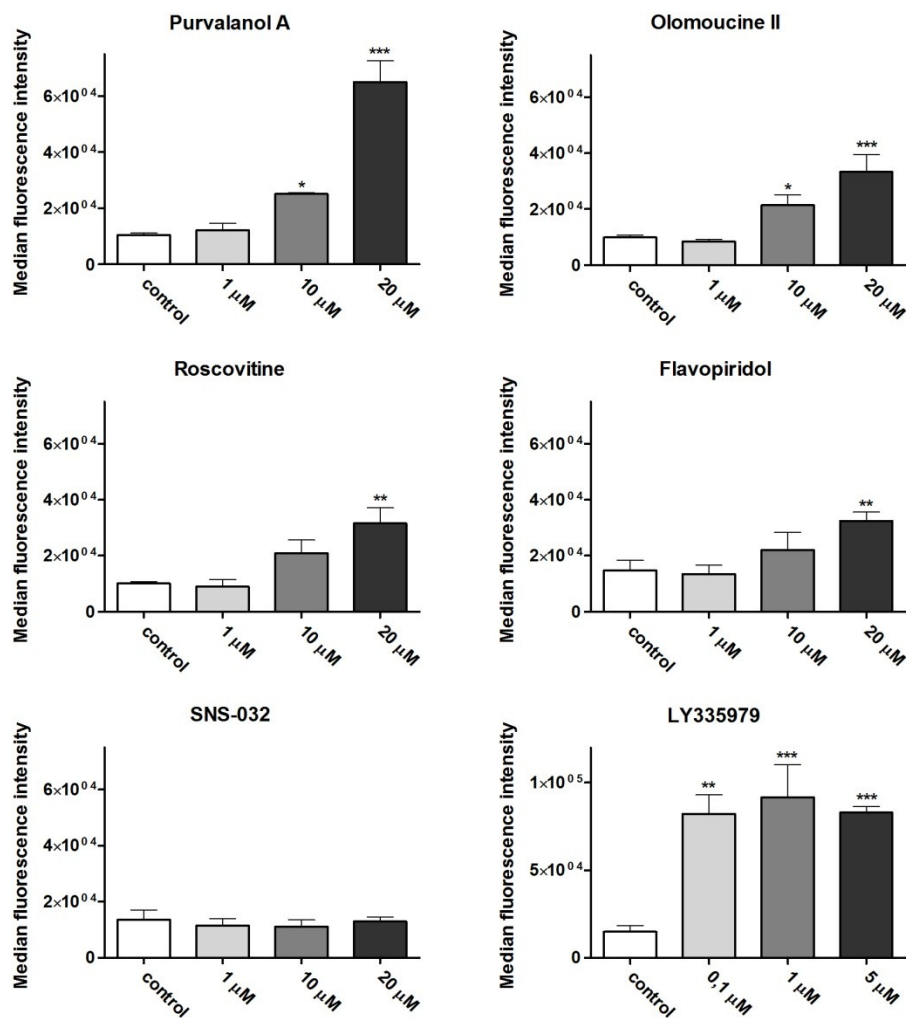
Pro srovnání inhibiční potence jednotlivých CDKi jsme v tomto případě provedli experiment, v němž jsme sledovali vliv CDKi a LY335979 na akumulaci hoechst 33342 v koncentracích rovných  $IC_{50}$ . Hodnota LY335979 byla považována jako 100 % inhibice P-gp. Purvalanol A a roscovitine dosáhly 86 % a 57 % efektu LY335979. U olomoucínu II a flavopiridolu bylo dosaženo 48 % a 31 % efektu LY335979, zatímco u SNS-032 pouze 23 % (Obr. 13). Na parentních buňkách nedošlo po aplikaci testovaných látek k žádným výrazným změnám v akumulaci substrátu (data neuvedena).



**Obr. 13:** Akumulace 8  $\mu\text{M}$  hoechst 33342 v buňkách MDCKII-ABCB1 ovlivněná CDKi nebo LY335979. V tomto experimentu jsou látky testovány v koncentracích rovných jejich  $IC_{50}$ , které byly zjištěny v předchozím experimentu. Tento experimentální přístup byl vybrán pro přesné porovnání inhibiční potence studovaných CDKi. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n = 9$ ).

Při srovnání maximálních dosažených hodnot u akumulace daunorubicinu jsme ukázali, že LY335979 a purvalanol A shodně 6,2 krát zvyšují akumulaci daunorubicinu v MDCKII-ABCB1 buňkách, avšak LY335979 už v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci, zatímco purvalanol A až v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Olomoucín II a roscovitine byly méně efektivní než předchozí dvojice a zvýšily akumulaci substrátu maximálně 3,4 a 3,1 krát, oba až v nejvyšší testované 20  $\mu\text{M}$  koncentraci. Flavopiridol byl v tomto experimentu nejslabší inhibitor P-gp a způsobil maximálně pouze 2,2 násobné zvýšení akumulace daunorubicinu ve srovnání s kontrolou v 20  $\mu\text{M}$  koncentraci. V případě SNS-032 jsme

nepozorovali žádné ovlivnění funkce P-gp (Obr. 14). Na parentních buňkách jsme opět sledovali pouze zanedbatelné změny v akumulaci substrátu u všech testovaných látek (data neuvedena).



**Obr. 14:** Vliv CDKi a LY335979 na akumulaci 2 μM daunorubicinu v MDCKII-ABCB1 buňkách. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (n = 3). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 v porovnání s neinhibovanou kontrolou.

Naše data potvrzují inhibici P-gp všemi studovanými CDKi, přičemž dle inhibiční potence je lze seřadit takto: purvalanol A > roskovitin > olomoucine II > flavopiridol > SNS-032. Získané výsledky jsou v souladu s prací Bachmaiera a Millera, kteří jako první naznačili inhibici P-gp roskovitinem pomocí akumulačních experimentů s rhodaminem 123 v endoteliálních buňkách odvozených z bovinních mozkových kapilár (Bachmeier and Miller, 2005). Ještě před tímto objevem bylo pozorováno, že

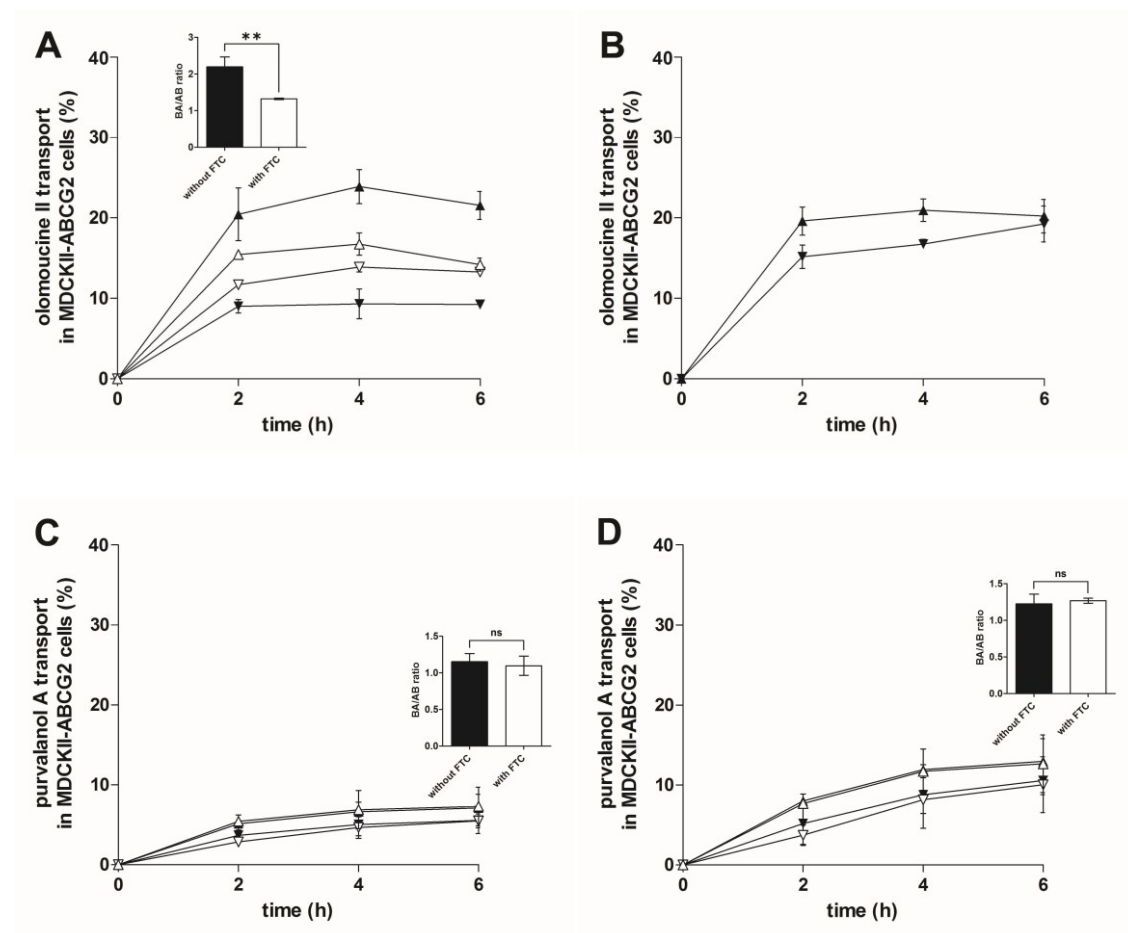
flavopiridol je ve vysokých koncentracích schopen inhibovat vazbu [<sup>3</sup>H]-azidopinu na P-gp v izolovaných membránových vezikulách, což opět koreluje s našimi výsledky (Boerner *et al.*, 2001). P-glykoprotein obsahuje 2 známá vazebná místa pro své substráty – prvním je vazebné místo pro rhodamin 123 a druhým pak místo pro hoechst 33342. Každé z těchto míst může vykazovat odlišnou afinitu pro jednu látku (Shapiro and Ling, 1997; Tang *et al.*, 2004). Tyto skutečnosti mohou být důvodem rozdílné inhibiční potence CDKi zaznamenané u akumulace hoechst 33342 a daunorubicinu. Největší rozdíl jsme pozorovali u SNS-032, který způsobil zvýšení akumulace hoechst 33342, ale neměl vliv na akumulaci daunorubicinu. Je tedy pravděpodobné, že SNS-032 interaguje s transportem skrz vazebné místo hoechst 33342, ale neovlivňuje transfer využívající vazebné místo pro daunorubicin. S ohledem na naše výsledky lze očekávat, že testované CDKi, zejména purvalanol A, olomoucín II a roskovitin, mohou do značné míry ovlivňovat farmakokinetické chování současně podaných léčiv, která jsou substráty BCRP. Toto zjištění je důležité vzhledem k možnému zavedení těchto CDKi do klinické praxe.

Výsledky prezentované v této podkapitole jsou součástí publikace Cihalova *et al.*, která byla odeslána do časopisu *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

#### **4.2.3 Substrátová afinita CDKi k BCRP *in vitro***

Možná substrátová afinita olomoucínu II a purvalanolu A k BCRP byla na *in vitro* úrovni testována pomocí transportních experimentů, které nám umožnily sledovat kinetiku přechodu těchto dvou CDKi přes monovrstvu buněk MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par. U olomoucínu II byla pozorována časově závislá produkce sulfatovaného konjugátu, který způsoboval mírné zkreslení výsledků původní látky, a proto byl u olomoucínu II zkrácen interval pro vyhodnocení a statistickou analýzu výsledků na 2 hod. U purvalanolu A byl tento interval standardní, tedy 6 hod. S ohledem na dřívější výsledky a kvantifikační limit HPLC/MS metody jsme vybrali pro každou látku 2 koncentrace – 100 nM a 10  $\mu$ M pro olomoucín II a 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M pro purvalanol A.

U nízké 100 nM koncentrace olomoucínu II jsme na MDCKII-ABCG2 buňkách zjistili asymetrii transportu odpovídající  $r = 2,27$ . Fumitremorgin C způsobil signifikantní snížení asymetrie na hodnotu  $r = 1,32$ , čímž potvrdil účast BCRP na transportu olomoucínu II (Obr. 15A). Když jsme aplikovali vysokou 10  $\mu\text{M}$  koncentraci olomoucínu II,  $r$  se snížil na 1,29 pravděpodobně v důsledku saturace BCRP (Obr. 15B).



**Obr. 15:** Transport (A) 100 nM olomoucínu II, (B) 10  $\mu\text{M}$  olomoucínu II, (C) 1  $\mu\text{M}$  purvalanolu A a (D) 10  $\mu\text{M}$  purvalanolu A přes buněčnou monovrstvu MDCKII-ABCG2. 5  $\mu\text{M}$  fumitremorgin C (FTC) byl použit jako modelový inhibitor BCRP. Kvůli produkci sulfatovaného konjugátu byl u olomoucínu II interval pro vyhodnocení a statistickou analýzu výsledků zkrácen na 2 hod. U purvalanolu A byl tento interval standardní (6 hod). Transportní poměry s a bez FTC byly vypočítány pro příslušné časové intervaly a statisticky porovnány (viz. grafy ve výřezu). ▲, transport v bazolaterálně-apikálním směru; ▼, transport v apikálně-bazolaterálním směru; △, transport v bazolaterálně-apikálním směru ovlivněný FTC; ▽, transport v apikálně-bazolaterálním směru ovlivněný FTC. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0,01$ .

Na rozdíl od olomoucinu II jsme na MDCKII-ABCG2 buňkách nepozorovali výraznou asymetrii transportu purvalanolu A, a ani přídavek fumitremorginu C nezpůsobil signifikantní změnu tohoto trendu (Obr. 15C, 15D). Na parentních buňkách jsme zaznamenali pouze nevýznamnou asymetrii transportu obou látek (data neuvedena).

Naše výsledky naznačují, že olomoucin II je substrátem BCRP, zatímco purvalanol A nikoliv. V literatuře nejsou dostupné žádné informace týkající se substrátové afinity CDKi k BCRP. S ohledem na získaná data lze očekávat možný vliv olomoucinu II na farmakokinetické chování současně podaných léčiv, která jsou transportována BCRP. Dále je možné předpovědět vznik rezistence k léčbě touto látkou u nádorů vykazujících vysokou expresi BCRP. Tato tvrzení neplatí pro purvalanol A, což jej teoreticky činí vhodnějším kandidátem pro léčbu rakoviny ve srovnání s olomoucinem II.

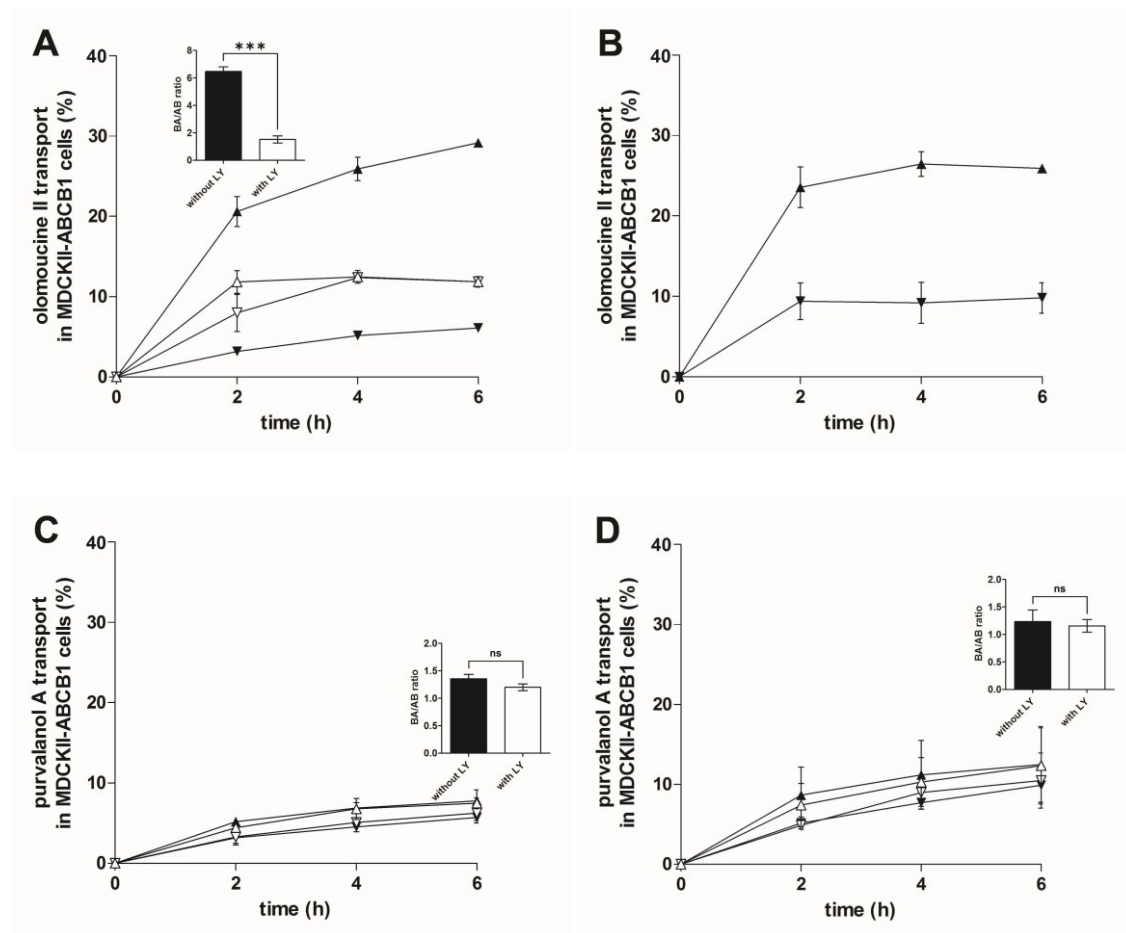
Výsledky diskutované v této podkapitole jsou součástí publikace Hofman et al., která byla odeslána do časopisu *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

#### **4.2.4 Substrátová afinita CDKi k P-gp *in vitro***

Substrátovou afinitu olomoucinu II a purvalanolu A k P-gp jsme nejprve testovali s využitím transportních experimentů. Výsledky jsme poté potvrdili pomocí metody stanovení ATPázové aktivity P-gp v membránových vezikulách a do testování jsme zahrnuli také roskovitin, flavopiridol a SNS-032.

U MDCKII-ABCB1 buněk byla asymetrie transportu 100 nM olomoucinu II přibližně třikrát vyšší než u buněk transdukovaných genem ABCG2. Transportní poměr se po aplikaci LY335979 snížil z 6,45 na 1,48, což potvrzuje substrátovou afinitu olomoucinu II k P-gp (Obr. 16A). V koncentraci 10  $\mu$ M jsme sledovali redukci  $r$  na hodnotu 2,51 pravděpodobně v důsledku částečné saturace P-gp (Obr. 16B). Podobně jako u MDCKII-ABCG2 ani u MDCKII-ABCB1 jsme nezjistili významnou asymetrii transportu purvalanolu A. Současná aplikace LY335979 způsobila pouze nesignifikantní snížení již tak nízkého  $r$  (Obr. 16C, 16D). Žádná výrazná asymetrie

transportu olomoucínu II ani purvalanolu A na parentních buňkách nebyla pozorována (data neuvedena).

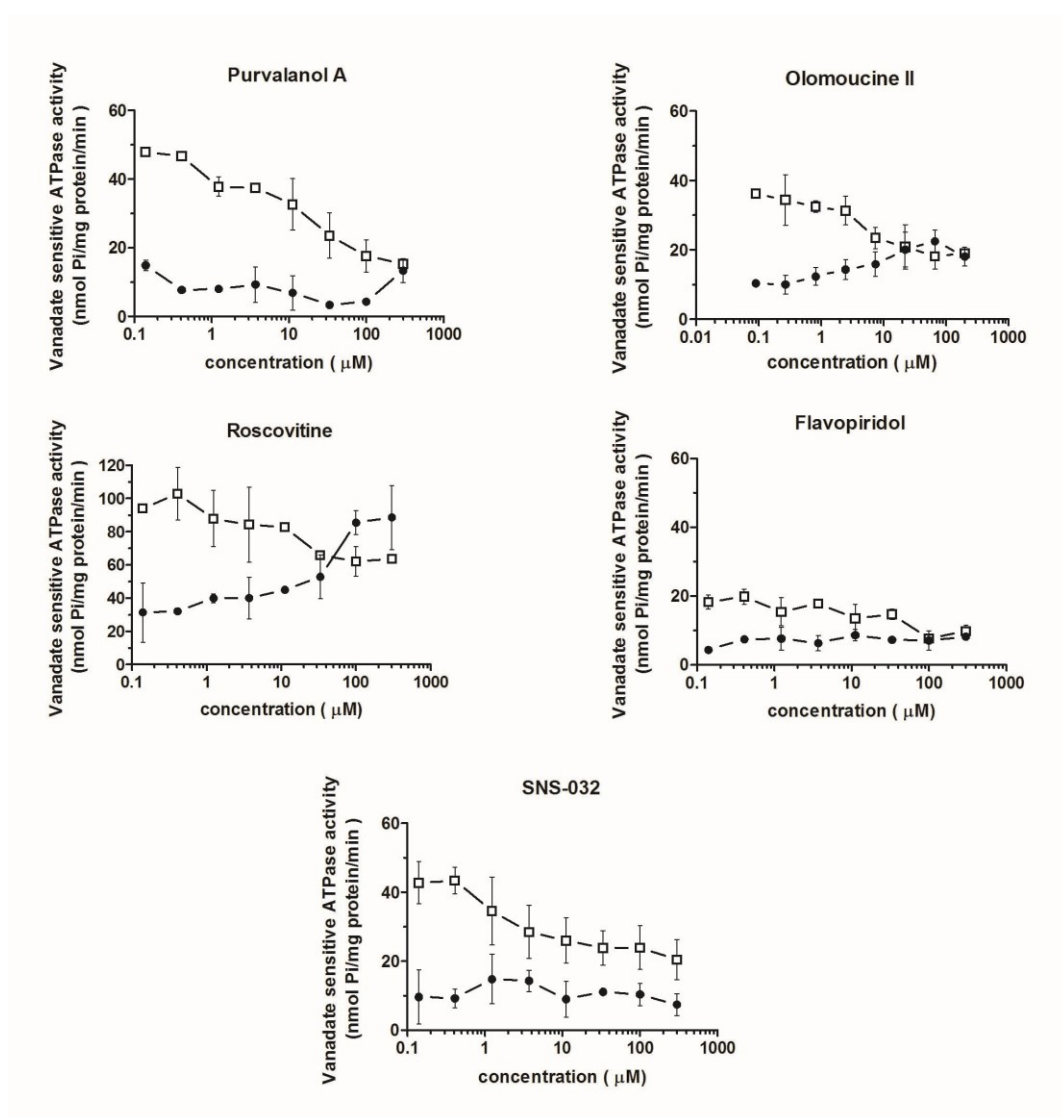


**Obř. 16:** Transport (A) 100 nM olomoucínu II, (B) 10 μM olomoucínu II, (C) 1 μM purvalanolu A a (D) 10 μM purvalanolu A přes buněčnou monovrstvu MDCKII-ABCB1. Pro modelovou inhibici P-gp byl použit 1 μM LY335979 (LY). Kvůli produkci sulfatovaného konjugátu byl u olomoucínu II interval pro vyhodnocení a statistickou analýzu výsledků zkrácen na 2 hod. U purvalanolu A byl tento interval standardní (6 hod). Transportní poměry s a bez LY byly vypočítány pro příslušné časové intervaly a statisticky porovnány (viz. grafy ve výřezu). ▲, transport v bazolaterálně-apikálním směru; ▼, transport v apikálně-bazolaterálním směru; △, transport v bazolaterálně-apikálním směru ovlivněný LY; ▽, transport v apikálně-bazolaterálním směru ovlivněný LY. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (n = 3). \*\*\*p < 0,001.

Substrátová afinita olomoucínu II a purvalanolu A byla dále testována pomocí aktivační varianty stanovení ATPázové aktivity P-gp. Na koncentraci závislé zvýšení



ATPázové aktivity citlivé na vanadát indikuje substrátovou afinitu testované látky k P-gp. Neoddělitelnou součástí stanovení ATPázové aktivity P-gp je i inhibiční varianta, kde na koncentraci závislé snížení ATPázové aktivity citlivé na vanadát odráží inhibici P-gp studovanou látkou. Výrazné zvýšení ATPázové aktivity v rámci aktivační varianty jsme pozorovali u olomoucínu II a roskovitinu, zatímco k žádnému zvýšení nedošlo v případě purvalanolu A. Nevýrazná indukce ATPázové aktivity byla sledována u flavopiridolu a SNS-032. Na koncentraci závislé snížení ATPázové aktivity P-gp v rámci inhibiční varianty stanovení jsme zaznamenali u všech testovaných látek (Obr. 17), což je v souladu s výsledky akumulčních studií sledujících inhibici P-gp.



**Obr. 17:** ATPázová aktivita P-gp v membránových vezikulách připravených z hmyžích Sf9 buněk transdukovaných lidským genem ABCB1. V tomto pokusu byl sledován vliv CDKi na ATPázovou aktivitu citlivou na vanadát, která je specifická pro ABC transportéry. ●, aktivační varianta stanovení aktivity; □, inhibiční varianta stanovení aktivity. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty ± směrodatné odchylky (n = 2).

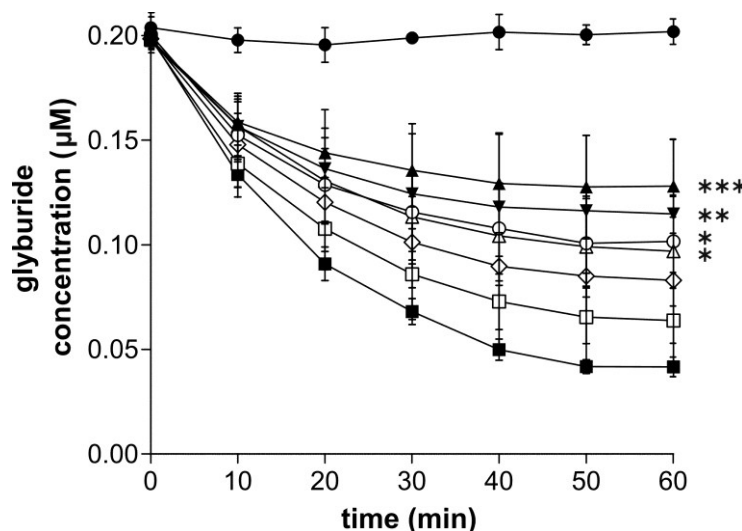
Ze získaných výsledků vyplývá, že olomoucín II a roskovitin jsou substráty P-gp s vysokou afinitou, purvalanol A není substrátem P-gp a u dvojice flavopiridol a SNS-032 je substrátová afinita buď velice nízká, nebo žádná. Výsledky transportních experimentů a stanovení ATPázové aktivity spolu dobře korelují a zřejmý je i soulad s dostupnou literaturou. Rajnai et al. pomocí několika *in vitro* metodik určili roskovitin jako specifický substrát P-gp s vysokou afinitou (Rajnai *et al.*, 2010). Flavopiridol byl s využitím páru buněčných linií CHO, lišících se v expresi P-gp, prokázán jako slabý substrát P-gp (Boerner *et al.*, 2001). SNS-032 byl také určen jako slabý P-gp substrát pomocí *in vivo* studií u „wild-type“ myši a jejich modifikovaného protějšku s „knockoutovaným“ genem *Abcb1* (Kamath *et al.*, 2005). S ohledem na naše výsledky lze v případě olomoucínu II a roskovitinu očekávat jejich možný vliv na farmakokinetické chování současně podaných léčiv, která vykazují substrátovou afinitu k P-gp. V důsledku tohoto ovlivnění může dojít k potenciálně nebezpečným lékovým interakcím. Nelze vyloučit též vznik rezistence k léčbě těmito látkami u nádorů vykazujících vysokou expresi P-gp.

Výsledky transportních experimentů jsou součástí připravované publikace Hofman et al., výsledky stanovení ATPázové aktivity P-gp v membránových vezikulách budou prezentovány v publikaci Cihalova et al. Obě publikace byly odeslány do časopisu *Pharmacol Res* a jsou uvedeny v Seznamu publikovaných prací.

#### **4.2.5 Inhibice Bcrp prostřednictvím CDKi *in situ***

Inhibici potkaního Bcrp purinovými CDKi jsme na orgánové úrovni ověřili pomocí metody duální perfúze potkaní placenty s recirkulací fetálního kompartmentu. Potkaní placenta byla vybrána jako modelový orgán pro studium interakcí CDKi s lékovými transportéry *in situ*, jelikož exprimuje značné množství Bcrp a P-gp (Staud *et al.*, 2006). Pokud je testovaná látka - substrát - aktivně transportována z fetálního do mateřského oběhu, dochází v průběhu času k rovnoměrnému poklesu její koncentrace ve fetálním kompartmentu. Pokud je aktivní efluxní systém inhibován, saturován nebo nehraje roli v transportu testované látky, k poklesu její koncentrace ve fetálním oběhu nedojde, popř. je pokles výrazně omezen.

V tomto experimentu jsme použili 200 nM glyburid jako modelový substrát BCRP a sledovali vliv 2  $\mu\text{M}$  CDKi na jeho transplacentární přechod. Poměr fetální koncentrace k mateřské koncentraci (f/m) byl u neovlivněné varianty na konci pokusu roven 0,206. Purvalanol A a olomoucín II signifikantně zamezily přestupu glyburidu z fetálního do mateřského kompartmentu a dosáhly  $f/m = 0,568$  a  $0,634$ . Ačkoliv jsme *in vitro* popsali bohemín ( $f/m = 0,503$ ) a roskovitin ( $f/m = 0,480$ ) spíše jako slabé inhibitory BCRP, oba tyto CDKi inhibovaly potkaní Bcrp s vyšší potencí než fumitremorgin C, který způsobil pouze nesignifikantní omezení transplacentárního přechodu glyburidu s hodnotou  $f/m = 0,412$ . Zanedbatelný vliv na transport glyburidu byl sledován v případě olomoucínu ( $f/m = 0,316$ ) (Obr. 18).



**Obr. 18:** Eliminace 200 nM glyburidu z fetální cirkulace ovlivněná 2  $\mu\text{M}$  CDKi. 2  $\mu\text{M}$  fumitremorgin C byl použit jako pozitivní inhibiční kontrola a sloužil též pro porovnání inhibiční potence. ●, mateřská koncentrace; ■, neovlivněná fetální koncentrace; ◇, fetální koncentrace s fumitremorginem C; ▲, fetální koncentrace s olomoucínem II; ▼, fetální koncentrace s purvalanolem A; ○, fetální koncentrace s roskovitinem; △, fetální koncentrace s bohemínem; □, fetální koncentrace s olomoucínem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n = 5$ ). Statistická analýza byla provedena s hodnotami z konce pokusu. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  v porovnání s neovlivněnou fetální koncentrací.

Výsledky *in situ* perfúzních experimentů potvrdily inhibici potkaního Bcrp purvalanolem A, olomoucínem II, bohemínem a roskovitinem, a korelují tak těsně

s výsledky a výstupy *in vitro* buněčných experimentů. Naše výsledky nelze diskutovat s relevantními literárními zdroji, jelikož jsme první, kdo se interakcemi purinových CDKi s BCRP na orgánové úrovni zabývá. Nevýznamný inhibiční efekt fumitremorginu C může být vysvětlen mezidruhovými rozdíly, které mají za následek různou inhibiční afinitu k BCRP/Bcrp u člověka a hlodavců (Gonzalez-Lobato *et al.*, 2010). Pokud by testované CDKi byly zavedeny do klinické praxe, bude nutné dbát zvýšené pozornosti současnému podání léčiv, která jsou substráty BCRP, při medikaci matek během těhotenství. Inhibice placentárního BCRP působením CDKi by mohla vést k omezení odčerpávání současně podaných léčiv z plodu do matky, čímž se zvyšuje riziko poškození plodu.

Tyto výsledky jsou součástí publikace Hofman *et al.* (2012), která byla publikována v časopise *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

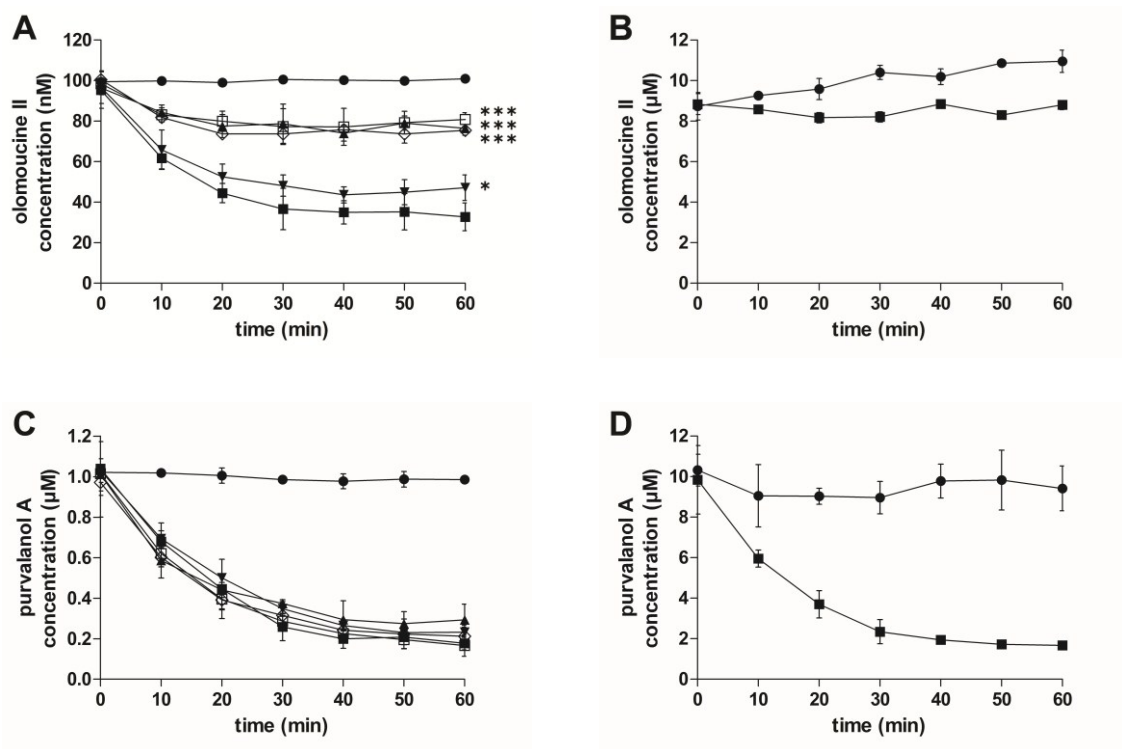
#### **4.2.6 Substrátová afinita CDKi k Bcrp a P-gp *in situ***

Duální perfúze potkaní placenty s recirkulací fetálního kompartmentu byla dále použita pro studium substrátové afinity olomoucínu II a purvalanolu A k potkanímu Bcrp a P-gp na orgánové úrovni. V těchto experimentech jsme použili stejné koncentrace CDKi, jež byly testovány v transportních buněčných experimentech.

V případě 100 nM olomoucínu II jsme pozorovali rovnoměrný pokles v jeho fetální koncentraci dosahující  $f/m = 0,325$  na konci experimentu. Aktivní transport proti koncentračnímu gradientu byl účinně blokován GF120918, duálním inhibitorem P-gp/BCRP, a glyburidem, duálním substrátem P-gp/BCRP. První jmenovaný inhibitor zvýšil  $f/m$  na hodnotu 0,757 a druhý na 0,800. Abychom odhalili specifitu a afinitu olomoucínu II k jednotlivým transportérům, sledovali jsme dále vliv LY335979, specifického inhibitoru P-gp, a Ko143, specifického inhibitoru BCRP, na jeho transplacentární přechod. LY335979 navodil téměř kompletní omezení přechodu olomoucínu II do mateřské cirkulace srovnatelné s tím, které navodil GF120918 a glyburid ( $f/m = 0,747$ ). Ko143 sice způsobil signifikantní zvýšení hodnoty  $f/m$  na hodnotu 0,467, ale úroveň inhibice transportního mechanismu byla výrazně menší než v případě LY335979 (Obr. 19A). Zvýšení koncentrace olomoucínu II na 10  $\mu\text{M}$  vedla

k omezení poklesu jeho koncentrace ve fetálním kompartmentu ( $f/m = 0,804$ ), což naznačuje saturaci efluxního systému (Obr. 19B). Stejný trend jsme pozorovali i v případě buněčných transportních experimentů.

U  $1 \mu\text{M}$  purvalanolu A jsme sice pozorovali aktivní transport z fetální do mateřské cirkulace dokonce s vyšší kapacitou než u olomoucínu II ( $f/m = 0,180$ ), ale žádný z testovaných inhibitorů P-gp/BCRP nezpůsobil jeho statisticky významnou blokádu (Obr. 19C). Po zvýšení koncentrace na  $10 \mu\text{M}$  nedošlo ke zvýšení hodnoty  $f/m$  ( $f/m = 0,178$ ), což naznačuje, že tato koncentrace není v případě purvalanolu A saturující (Obr. 19D).



**Obr. 19:** Eliminace (A)  $100 \text{ nM}$  olomoucínu II, (B)  $10 \mu\text{M}$  olomoucínu II, (C)  $1 \mu\text{M}$  purvalanolu A a (D)  $10 \mu\text{M}$  purvalanolu A z fetální cirkulace. Pro potvrzení substrátové afinity a určení substrátové specifity studovaných CDKi byly použity 4 látky - GF120918, glyburid, LY335979 a Ko143. Koncentrace GF120918, LY335979 a Ko143 byla  $2 \mu\text{M}$ . Glyburid byl použit jako kompetitivní inhibitor, a proto byla aplikována saturační koncentrace  $100 \mu\text{M}$ . ●, mateřská koncentrace; ■, neovlivněná fetální koncentrace; ▲, fetální koncentrace s GF120918; □, fetální koncentrace s glyburidem; ▼, fetální koncentrace s Ko143; ◇, fetální koncentrace s LY335979. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky ( $n \geq 3$ ). Hodnoty z konce pokusu byly podrobeny statistické analýze. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  v porovnání s neovlivněnou fetální koncentrací.

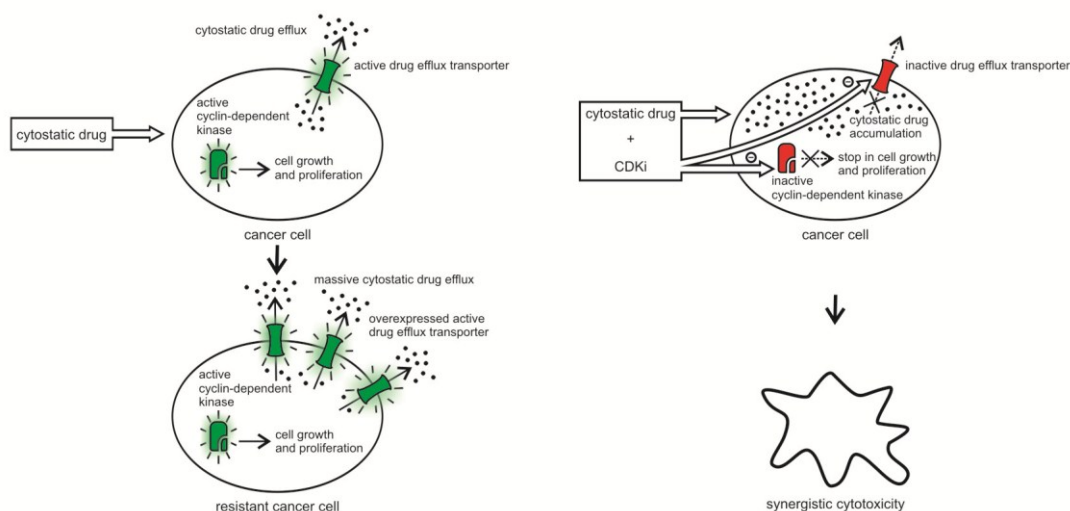
Výsledky výše popsaných experimentů potvrdily substrátovou afinitu olomoucínu II k oběma studovaným transportérům, přičemž afinita k potkanímu P-gp je výrazně vyšší než afinita k Bcrp. U purvalanolu A bylo potvrzeno, že není substrátem P-gp ani Bcrp. Tato zjištění přesně korelují s výsledky a výstupy *in vitro* transportních experimentů a stanovení ATPázové aktivity P-gp. Na druhou stranu jsme prokázali, že neznámý efluxní systém lokalizovaný na apikální membráně syncytiotrofoblastu je zodpovědný za aktivní přenos purvalanolu A z fetálního do mateřského kompartmentu. Vzhledem k tomu, že rodina proteinů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí představuje další důležitý efluxní mechanismus působící v placentě (Deeley *et al.*, 2006), domníváme se, že jeden nebo více zástupců podrodiny ABCC by mohl(o) být zodpovědný(ch) za transplacentární přechod tohoto CDKi. Tuto hypotézu podporuje vysoká exprese proteinů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí v potkaní placentě (Leazer and Klaassen, 2003; St-Pierre *et al.*, 2004). Na základě našich výsledků lze očekávat relativní bezpečnost olomoucínu II i purvalanolu A při medikaci matek během těhotenství, jelikož oba tyto CDKi jsou efektivně odstraňovány z fetálního oběhu aktivními efluxními mechanismy. Pokud by olomoucín II nebo purvalanol A byly skutečně používány v průběhu těhotenství, je třeba dbát zvýšené opatrnosti při současném podávání léčiv, které inhibují transportní mechanismy zodpovědné za transfer těchto látek z plodu do matky.

Výsledky diskutované v této podkapitole jsou součástí publikace Hofman *et al.*, která byla odeslána do časopisu *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

#### **4.2.7 Kombinační studie**

V závěrečné části práce jsme testovali naši hypotézu, že CDKi, které jsou nejsilnějšími inhibitory zkoumaných lékových transportérů, mohou zvýšit akumulaci současně podaných cytotoxických substrátů a zároveň potencovat jejich účinek svou vlastní antiproliferativní a cytotoxickou aktivitou (Obr. 20).

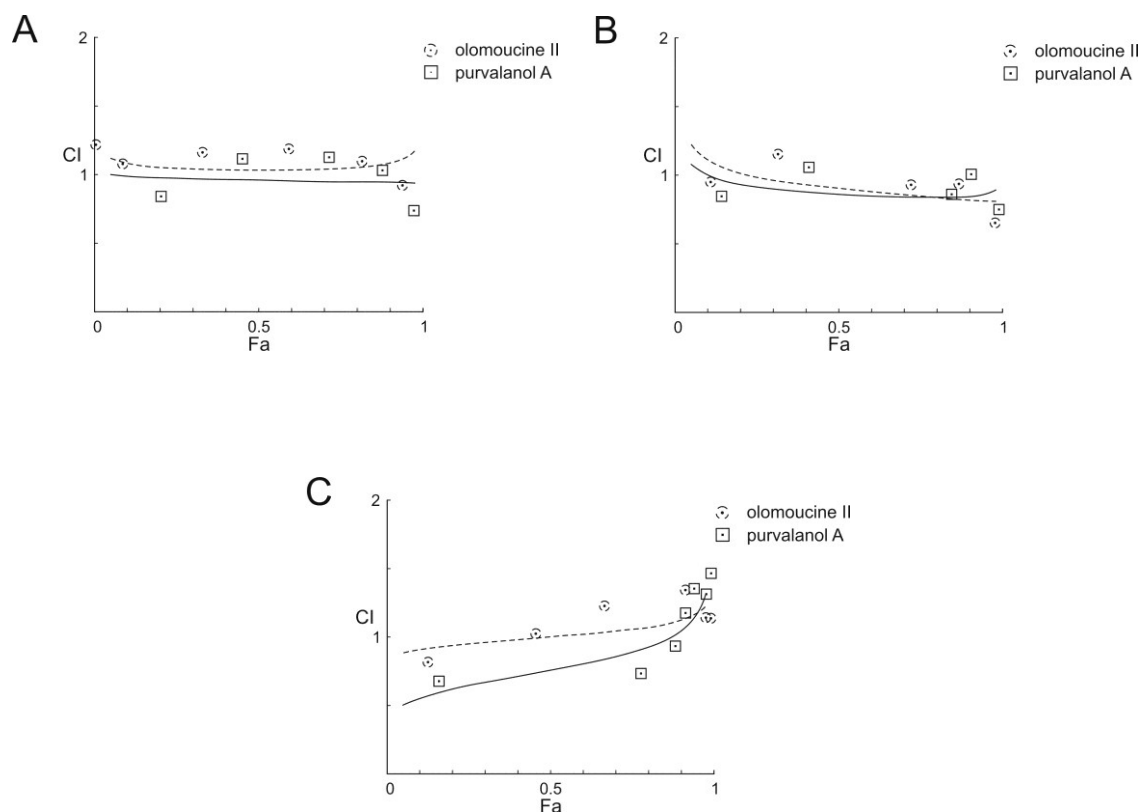
Pro tento účel jsme využili metody „combination index method of Chou-Talalay“, která umožňuje přesnou kvantifikaci kombinačního účinku dvou a více látek pomocí výpočtu kombinačního indexu (CI). Hodnota  $CI < 0,9$  značí synergismus, rozmezí  $CI = 0,9 - 1,1$  indikuje aditivní efekt a  $CI > 1,1$  odpovídá antagonismu.



**Obr. 20:** Hypotéza synergistického působení CDKi inhibujících lékové transportéry podaných současně s cytostatickými léčivy, která jsou substráty těchto transportérů. Obrázek byl převzat a upraven z grafického abstraktu k publikaci Hofman et al. (2012), která byla publikována v časopise *Pharmacol Res* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

V první kombinační studii jsme aplikovali olomoucín II nebo purvalanol A současně s mitoxantronem, známým cytostatickým substrátem BCRP, na liniích BeWo, HepG2 a HRP-1, které přirozeně exprimují značná množství BCRP/Bcrp (Ceckova *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Staud *et al.*, 2006). Ačkoliv by bylo vhodné provést studii na dvojici linií MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par, tuto možnost jsme vyloučili vzhledem k dříve zjištěné interferenci zeleného fluorescenčního proteinu (eGFP) přítomného v buňkách MDCKII-ABCG2 s cytotoxickou aktivitou cytostatik (Ceckova *et al.*, 2008). Kombinační efekt olomoucínu II i purvalanolu A na lidské choriokarcinomové linii BeWo spadal do aditivní kategorie kombinačního účinku v celém rozmezí ovlivněné frakce buněk (Fa) (Obr. 21A). U olomoucínu II jsme na lidské jaterní karcinomové linii HepG2 pozorovali synergismus v rozmezí Fa od 0,5 do 0,97 a rovněž u purvalanolu A jsme zaznamenali synergistický efekt kombinace s mitoxantronem v rozmezí Fa od 0,3

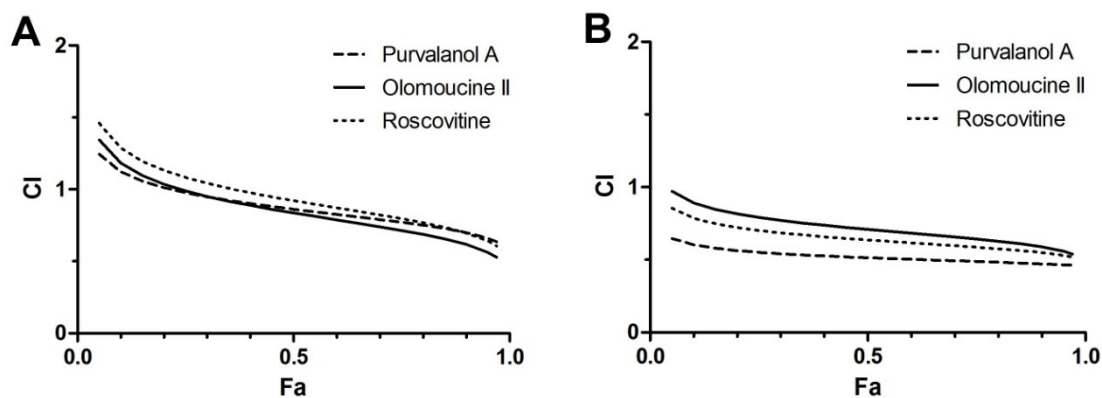
do 0,97 (Obr. 21B). Kombinační efekt olomoucínu II na nenádorové buněčné linii odvozené od potkaního trofoblastu HRP-1 byl vyhodnocen jako aditivní v téměř celé škále Fa. U purvalanolu A jsme však pozorovali nejsilnější synergistický efekt v rámci těchto experimentů v rozmezí Fa od 0,05 do 0,97, jehož maximální zaznamenaná úroveň odpovídala  $CI = 0,51$  (Obr. 21C).



**Obr. 21:** Fa-CI křivky kombinace olomoucínu II nebo purvalanolu s mitoxantronem v (A) BeWo, (B) HepG2 a (C) HRP-1 buňkách. Dva nebo tři cytotoxické testy pro jednotlivé látky byly provedeny před příslušnými kombinacemi a fixní koncentrační poměr použitý v kombinaci byl založen na  $IC_{50}$  jednotlivých látek, které byly vypočítány z těchto předcházejících experimentů. Pro výpočet hodnot CI sloužily hodnoty ze tří nezávislých kombinačních experimentů. Fa-CI křivky olomoucínu II jsou prezentovány jako přerušovaná linka, Fa-CI křivky purvalanolu A jako linka plná. Fa = 0 vyjadřuje stoprocentní životaschopnost buněk a Fa = 1 indikuje nulovou životaschopnost.



Naši hypotézu synergistického působení CDKi v kombinaci s cytotoxickými substráty lékových transportérů jsme dále ověřili na úrovni P-gp. V této studii jsme vybrali tři CDKi, u kterých byla zjištěna nejsilnější inhibiční afinita k P-gp (purvalanol A, roskovitin a olomoucín II), a zkombinovali je s daunorubicinem, cytotoxickým substrátem P-gp. Abychom jednoznačně potvrdili účast P-gp na synergistickém efektu, provedli jsme experimenty na liniích MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par. Buňky MDCKII-ABCB1 jsou na rozdíl od MDCKII-ABCG2 připraveny bez použití eGFP, a proto jsme je v tomto případě mohli použít. Na buněčné linii MDCKII-par jsme zaznamenali synergismus u purvalanolu A v rozmezí  $F_a$  0,45 – 0,97, u olomoucínu II v rozmezí 0,4 – 0,97 a u roskovitinu mezi 0,55 – 0,97. Nejvyšší pozorovaná úroveň synergizmu pro purvalanol A odpovídala  $CI = 0,64$ , pro roskovitin  $CI = 0,61$  a pro olomoucín II  $CI = 0,53$  (Obr. 22A). Na linii MDCKII-ABCB1 jsme u všech tří testovaných CDKi pozorovali celkově vyšší úroveň synergizmu než na parentní linii. Kombinační efekt purvalanolu A, olomoucínu II i roskovitinu spadal do kategorie synergizmu v téměř celé škále  $F_a$  (od 0,1 do 0,97). Nejvyšší zaznamenaná úroveň synergizmu pro purvalanol A byla rovna  $CI = 0,46$ , pro roskovitin  $CI = 0,52$  a pro olomoucín II  $CI = 0,54$  (Obr. 22B).



**Obr. 22:**  $F_a$ - $CI$  křivky kombinace purvalanolu A, olomoucínu II nebo roskovitinu s daunorubicinem v (A) MDCKII-par a (B) MDCKII-ABCB1 buňkách. Dva nebo tři cytotoxicitní testy pro jednotlivé látky byly provedeny před příslušnými kombinacemi a fixní koncentrační poměr použitý v kombinaci byl založen na  $IC_{50}$  jednotlivých látek, které byly vypočítány z těchto předcházejících experimentů. Pro výpočet hodnot  $CI$  sloužily hodnoty ze tří nezávislých kombinačních experimentů.  $F_a = 0$  vyjadřuje stoprocentní životaschopnost buněk a  $F_a = 1$  indikuje nulovou životaschopnost.

Pozorované rozdíly v kombinačních efektech na liniích BeWo, HepG2 a HRP-1 mohou být přisouzeny několika faktorům, jako např. různé expresi transportérů a biotransformačních enzymů, původu linií (rakovinné versus nerakovinné) a rozdílné inhibiční afinitě CDKi k lidským versus potkaním transportérům. Co se týče kombinací olomoucínu II nebo purvalanolu A s cytotoxickými látkami, jsme první, kdo takovou studii provedl. Na druhou stranu, několik kombinačních studií bylo provedeno s klinicky nadějným roskovitinem, blízkým strukturním analogem olomoucínu II a purvalanolu A, kdy byl pozorován synergistický efekt kombinace s doxorubicinem, paklitaxelem, taxolem, 5-fluorouracilem či vinblastinem *in vitro* i *in vivo* (Appleyard *et al.*, 2009; Abaza *et al.*, 2008; Coley *et al.*, 2007). Mechanismus účinku těchto synergizmů byl často přisuzován efektivnější indukci apoptózy, nicméně Appleyard *et al.* nezaznamenali žádné změny apoptotických markerů (exprese p53 a survivinu, fosforylace p53) u kombinace roskovitinu s doxorubicinem v buňkách MCF7 a navrhli, že synergistický efekt této kombinace podmiňuje spíše zástava buněčného cyklu (Appleyard *et al.*, 2009). S ohledem na naše výsledky věříme, že výše popsané synergizmy mohou být alespoň zčásti zprostředkovány farmakokinetickými interakcemi na P-gp, protože roskovitin je známý inhibitor P-glykoproteinu (Bachmeier and Miller, 2005) a doxorubicin, paklitaxel/taxol a vinblastin jsou substráty P-gp (Schinkel and Jonker, 2003). Námi navržený přístup kombinující CDKi, které inhibují lékové transportéry, se substráty těchto transportérů by se mohl uplatnit v onkologické léčbě a mohl by alespoň částečně pomoci překonat mnohočetnou lékovou rezistenci u některých typů nádorových bujení.

Výsledky kombinačních studií s mitoxantronem jsou součástí publikace Hofman *et al.* (2012), která byla publikována v časopise *Pharmacol Res.* Výsledky kombinačních studií s daunorubicinem jsou součástí publikace Cihalova *et al.*, která byla odeslána do časopisu *Pharmacol Res.* Obě publikace jsou uvedeny v Seznamu publikovaných prací.

### 4.3 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že jsme splnili všechny vytyčené cíle a podařilo se nám detailně popsat farmakokinetické interakce vybraných CDKi s lékovými transportéry BCRP a P-gp. Naše výsledky přináší zcela nové a důležité informace, jejichž interpretace může do značné míry ovlivnit výběr a způsob aplikace studovaných látek při jejich případném zavedení do klinické praxe.

S ohledem na zjištěné inhibiční schopnosti testovaných CDKi lze očekávat značný dopad těchto látek na farmakokinetické i farmakodynamické chování současně podaných léčiv, která jsou substráty BCRP nebo P-gp, a je možné predikovat i vznik potenciálně nebezpečných lékových interakcí.

Vzhledem k potvrzené substrátové afinitě olomoucinu II a roskovitinu k P-gp je možné předpovědět vznik rezistence k léčbě touto látkou u nádorů vykazujících vysokou expresi zmíněného lékového transportéru. Tento problém by se neměl vyskytnout v případě purvalanolu A, flavopiridolu a SNS-032, u nichž jsme vyvrátili signifikantní substrátovou afinitu k výše zmíněnému transportéru. S ohledem na tato zjištění by purvalanol A, flavopiridol a SNS-032 mohly teoreticky být vhodnějšími kandidáty pro onkologickou léčbu než olomoucín II a roskovitin.

Na základě výsledků duálních perfúzí potkaní placenty lze očekávat relativní bezpečnost olomoucínu II i purvalanolu A při medikaci matek během těhotenství, jelikož oba tyto CDKi jsou efektivně odstraňovány z fetálního oběhu aktivními efluxními mechanismy. Pokud by olomoucín II nebo purvalanol A byly skutečně používány v průběhu těhotenství, je třeba dbát zvýšené opatrnosti při současném podávání léčiv, která inhibují transportní mechanismy zodpovědné za transfer těchto látek z plodu do matky. Vzhledem k možným mezidruhovým rozdílům by bylo vhodné naše výsledky ověřit také na jiných placentárních modelech včetně lidského.

Potenciálně klinicky důležitý je i námi navržený přístup kombinující CDKi, které inhibují lékové transportéry, s cytotoxickými substráty těchto transportérů. Tato kombinační terapie potvrzená na *in vitro* úrovni by se mohla uplatnit v onkologické léčbě a mohla by alespoň částečně pomoci překonat mnohočetnou lékovou rezistenci, která představuje jednu z největších překážek v chemoterapii.

## 5 Souhrn

Rodina cyklin-dependentních kináz (CDK) představuje srdce systému, jehož úkolem je řízení a kontrola buněčného cyklu. Abnormálně a trvale zvýšená aktivita těchto enzymů je charakteristickým rysem, který spojuje mnoho druhů rakoviny. Tato skutečnost vede ke ztrátě kontroly nad buněčným cyklem a dává rakovinným buňkám možnost rychle proliferovat bez ohledu na okolní podmínky, nashromážděné mutace a nedostatečnou diferenciaci. Výše popsaná deregulace aktivity CDK se logicky stala cílem pro design a vývoj syntetických inhibitorů CDK (CDKi) a specifická inhibice CDK pomocí těchto molekul byla přijata jako moderní a relativně netoxická alternativa léčby rakoviny. Během posledních dvou desetiletí bylo syntetizováno mnoho strukturně odlišných CDKi, přičemž přibližně 30 z nich vstoupilo do klinického testování pro léčbu rakoviny. CDKi vykazují antiproliferativní účinky, navozují zástavu buněčného cyklu v různých fázích v závislosti na jejich specifitě k jednotlivým CDK a někteří zástupci navíc efektivně indukují apoptózu. Ačkoliv farmakodynamické vlastnosti CDKi jsou poměrně dobře prozkoumány, znalosti jejich farmakokinetického chování a zejména interakcí s lékovými efluxními transportéry jsou velmi omezené.

Lékové efluxní transportéry P-glykoprotein (P-gp/ABCB1) a breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) z rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů plní v organismu významnou ochrannou a detoxikační roli, což souvisí s jejich vysokou expresí ve střevě, játrech, ledvinách a v tělních bariérách. Tyto proteiny aktivně pumpují širokou škálu strukturně rozličných substrátů, často léčiv, ven z buňky, a ovlivňují tak do značné míry jejich farmakokinetické chování – od absorpce, přes distribuci až k eliminaci. Zároveň je patologicky zvýšená exprese a aktivita těchto transportérů korelována se vznikem mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk, kdy v důsledku omezené akumulace cytostatik dochází k selhání léčby.

V této práci jsme se zaměřili na studium farmakokinetických interakcí CDKi s lékovými transportéry BCRP a P-gp. Pomocí akumulačních a transportních metod jsme na buněčném modelu MDCKII-ABCG2 prokázali, že purinové CDKi purvalanol A, olomoucín II, bohemin a roskovitin inhibují BCRP, přičemž purvalanol A a olomoucín II vykazují přibližně stejnou potenci jako modelový specifický inhibitor BCRP fumitremorgin C. S využitím akumulačních metod a buněk MDCKII-ABCB1

jsme dále ukázali, že purvalanol A inhibuje P-gp s téměř srovnatelnou potencí jako specifický inhibitor LY335979 a částečná inhibice tohoto transportéru byla zaznamenána i v případě ostatních studovaných CDKi (olomoucín II, roskovitin, flavopiridol, SNS-032).

Stejně buněčné modely jsme později použili pro studium možné substrátové afinity olomoucínu II a purvalanolu A a pomocí transportní metody jsme určili olomoucín II jako duální substrát P-gp a BCRP, přičemž substrátová afinita tohoto CDKi k P-gp je významně vyšší než k BCRP. Substrátová afinita purvalanolu A k P-gp ani k BCRP nebyla prokázána. Tato zjištění jsme potvrdili na základě výsledků stanovení ATPázové aktivity P-gp, které dále odhalily skutečnost, že roskovitin je substrátem P-gp. ATPázové experimenty na druhou stranu naznačují, že flavopiridol a SNS-032 pravděpodobně nejsou P-gp substráty nebo jsou pouze substráty s velmi nízkou afinitou.

V další části práce jsme ověřili naše předchozí *in vitro* výsledky na orgánové úrovni pomocí metody duální perfúze potkaní placenty. Potvrdili jsme inhibici potkaního Bcrp pomocí purvalanolu A, olomoucínu II, boheminu i roskovitinu a substrátovou afinitu olomoucínu II k potkanímu P-gp i Bcrp, přičemž inhibiční potence a výše substrátové afinity byly přibližně srovnatelné s těmi, které byly pozorovány v buněčných experimentech. Zároveň jsme vyloučili substrátovou afinitu purvalanolu A k oběma testovaným transportérům, což opět velmi těsně koreluje s *in vitro* výsledky.

V závěrečné části studie jsme testovali naši hypotézu, že CDKi, které jsou nejsilnějšími inhibitory zkoumaných lékových transportérů, mohou zvýšit akumulaci současně podaných cytotoxických substrátů a zároveň potencovat jejich účinek svou vlastní antiproliferativní a cytotoxickou aktivitou. Pro tento účel jsme využili metody „combination index method of Chou-Talalay“, která umožňuje přesnou kvantifikaci kombinačního účinku dvou a více látek. Synergistický či alespoň aditivní efekt byl pozorován v kombinaci olomoucínu II a purvalanolu A s mitoxantronem, který je známým substrátem BCRP, na třech liniích přirozeně exprimujících značná množství BCRP/Bcrp (BeWo, HepG2 a HRP-1). Naši hypotézu jsme dále potvrdili při kombinaci purvalanolu A, roskovitinu a olomoucínu II s daunorubicinem (substrát P-gp), kdy jsme sledovali výrazně vyšší synergistický efekt těchto kombinací na linii MDCKII-ABCB1 ve srovnání s parentními buňkami.

Závěrem lze konstatovat, že s ohledem na naše výsledky můžeme očekávat značný vliv testovaných CDKi na farmakokinetické i farmakodynamické chování současně podaných léčiv, která jsou substráty BCRP nebo P-gp, a je možné předpovědět i vznik potenciálně nebezpečných lékových interakcí. Tuto skutečnost je třeba mít na zřeteli v případě možného zavedení CDKi do klinické praxe. Vzhledem ke zjištěné substrátové afinitě olomoucínu II k P-gp a BCRP lze očekávat vznik rezistence k léčbě touto látkou u nádorů vykazujících vysokou expresi zmíněných lékových transportérů. Olomoucín II i purvalanol A by na druhou stranu mohly být relativně bezpečné pro medikaci matek během těhotenství, jelikož oba tyto CDKi jsou efektivně odstraňovány z fetálního oběhu aktivními efluxními mechanismy. Náš přístup kombinující CDKi, které inhibují lékové transportéry, s cytotoxickými substráty těchto transportérů, by se mohl uplatnit v onkologické léčbě a mohl by alespoň částečně pomoci překonat mnohočetnou lékovou rezistenci, která představuje jednu z největších překážek v úspěšné chemoterapii.

## 6 Summary

The family of cyclin-dependent kinases (CDK) represents the hearth of the system which ensures the orchestration and control of the cell cycle. Abnormally and permanently increased activity of these enzymes is the common feature found in various cancer cells. This feature leads to the loss of control of the cell cycle and allows the cancer cells to proliferate quickly without respect to the surrounding conditions, acquired mutations and poor differentiation. This deregulation has logically become a target for the design and development of synthetic inhibitors of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) and specific inhibition of CDK by these compounds has been widely accepted as a safe and relatively non-cytotoxic alternative in cancer therapy. A variety of structurally diverse CDKi has been synthesized during the last two decades while approximately 30 of them have entered the clinical trials for cancer treatment to date. CDKi show antiproliferative effects, they evoke the cell cycle arrest in various stages of cell cycle depending on the specificity toward particular CDK and some agents also effectively induce apoptosis. Although pharmacodynamic properties of CDKi are relatively well understood, the knowledge of their pharmacokinetic behavior, especially interactions with drug efflux transporters, is considerably limited.

Drug efflux transporters P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) from the family of ABC (ATP-binding cassette) transporters play an important protective and detoxication role in organism and this fact is associated with their high expression in the intestine, liver, kidneys and body's barriers. These proteins actively pump a variety of structurally diverse substrates, commonly drugs, out of the cells and affect their pharmacokinetic behavior – from absorption, through distribution up to elimination. At the same time, pathologically increased expression and activity of these transporters is correlated with the generation of multidrug resistance when limited accumulation of cytostatics in the cells leads to the failure of anticancer treatment.

In the present work, we focused on the study of pharmacokinetic interactions of CDKi with drug efflux transporters BCRP and P-gp. Using accumulation and transport methods with MDCKII-ABCG2 cells, we showed purvalanol A, olomoucine II, bohemine and roscovitine to inhibit BCRP whereas purvalanol A and olomoucine II shared similar potency with fumitremorgin C, a model specific BCRP inhibitor.

Employing accumulation method with MDCKII-ABCB1, we further observed that purvalanol A inhibits P-gp with almost the same potency as LY335979 and partial inhibition of this transporter was recorded in the case of other studied CDKi (olomoucine II, roscovitine, flavopiridol, SNS-032).

Transport method with the same cellular models was later used for the study of possible substrate affinity of olomoucine II and purvalanol A when olomoucine II was determined to be a dual P-gp and BCRP substrate, while affinity to P-gp was markedly higher than that toward BCRP. Substrate affinity of purvalanol A toward any of the transporter tested was not observed. These findings were confirmed by the ATPase vesicular assay and using this experimental setup, we further showed that roscovitine is a P-gp substrate. On the other hand, flavopiridol and SNS-032 seem to lack the substrate affinity toward P-gp or to be P-gp substrates with a very low affinity.

In the following part of our work we verified our previous *in vitro* results at organ level employing the method of dually perfused rat term placenta. We confirmed inhibition of the rat Bcrp by purvalanol A, olomoucine II, bohemine and roscovitine and substrate affinity of olomoucine II toward the rat P-gp as well as Bcrp. Inhibitory potencies and levels of substrate affinities were comparable to those observed in the cellular experiments. At the same time, we excluded the substrate affinity of purvalanol A toward both examined transporters while these results again tightly correlate with previous *in vitro* findings.

In the final part of the study we tested our hypothesis that CDKi, which are the strongest inhibitors of examined drug transporters, may increase the accumulation of concomitantly administered cytotoxic substrates and, at the same time, potentiate their effect by their own antiproliferative and cytotoxic activity. Combination index method of Chou-Talalay was employed for this purpose as it allows for the quantification of combination effect of two or more simultaneously applied drugs. Synergistic or at least additive effects were observed in the combinations of olomoucine II or purvalanol A with mitoxantrone, an established BCRP substrate, in three cell lines which express considerable amounts of BCRP/Bcrp (BeWo, HepG2 and HRP-1). Our hypothesis was further confirmed in the combinations of purvalanol A, roscovitine or olomoucine II with daunorubicin (P-gp substrate) when significantly higher synergistic effects of these combinations were observed in MDCKII-ABCB1 cells in comparison with parent cells.



In conclusion, in the light of our results it is possible to expect considerable impact of tested CDKi on the pharmacokinetic as well as pharmacodynamic behavior of concomitantly administered drugs, which are BCRP or P-gp substrates, and it is also possible to predict the rise of potentially dangerous drug-drug interactions. This fact should be kept in mind in the case of possible introduction of CDKi into the clinical area. With respect to the discovered substrate affinity of olomoucine II toward P-gp and BCRP, it is possible to expect the generation of resistance of tumors overexpressing these transporters to the olomoucine II based anticancer therapy. On the other hand, olomoucine II and purvalanol A might be relatively safe in the medication of mother during pregnancy as both these CDKi are effectively cleared from the fetal circulation by active efflux systems. Our approach combining CDKi, which inhibit drug transporters, with the cytotoxic substrates of these transporters could be applicable in the oncological treatment and could, at least partially, help overcome the multidrug resistance which constitutes one of the main limitations in the successful chemotherapy.

## 7 Seznam literatury

Abaza, M. S., Bahman, A. M. & Al-Attayah, R. J. (2008). Roscovitine synergizes with conventional chemo-therapeutic drugs to induce efficient apoptosis of human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 14(33): 5162-5175.

Agbottah, E., Yeh, W. I., Berro, R., Klase, Z., Pedati, C., Kehn-Hall, K., Wu, W. & Kashanchi, F. (2008). Two specific drugs, BMS-345541 and purvalanol A induce apoptosis of HTLV-1 infected cells through inhibition of the NF-kappaB and cell cycle pathways. *AIDS Res Ther* 5: 12.

Akoulitchev, S., Chuikov, S. & Reinberg, D. (2000). TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407(6800): 102-106.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. *Garland Science, New York*.

Albrecht, C. & Viturro, E. (2007). The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch* 453(5): 581-589.

Aldoss, I. T., Tashi, T. & Ganti, A. K. (2009). Seliciclib in malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 18(12): 1957-1965.

Ali, M. A., Choy, H., Habib, A. A. & Saha, D. (2007). SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor. *Neoplasia* 9(5): 370-381.

Ali, M. A., Reis, A., Ding, L. H., Story, M. D., Habib, A. A., Chattopadhyay, A. & Saha, D. (2009). SNS-032 prevents hypoxia-mediated glioblastoma cell invasion by inhibiting hypoxia inducible factor-1alpha expression. *Int J Oncol* 34(4): 1051-1060.

Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J. H., Koomen, G. J. & Schinkel, A. H. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 1(6): 417-425.

- Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V. & Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58(23): 5337-5339.
- An, R., Hagiya, Y., Tamura, A., Li, S., Saito, H., Tokushima, D. & Ishikawa, T. (2009). Cellular phototoxicity evoked through the inhibition of human ABC transporter ABCG2 by cyclin-dependent kinase inhibitors in vitro. *Pharm Res* 26(2): 449-458.
- Appleyard, M. V., O'Neill, M. A., Murray, K. E., Paulin, F. E., Bray, S. E., Kernohan, N. M., Levison, D. A., Lane, D. P. & Thompson, A. M. (2009). Seliciclib (CYC202, R-roscovitin) enhances the antitumor effect of doxorubicin in vivo in a breast cancer xenograft model. *Int J Cancer* 124(2): 465-472.
- Arts, H. J., Katsaros, D., de Vries, E. G., Massobrio, M., Genta, F., Danese, S., Arisio, R., Scheper, R. J., Kool, M., Scheffer, G. L., Willemse, P. H., van der Zee, A. G. & Suurmeijer, A. J. (1999). Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 5(10): 2798-2805.
- Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., Liang, D. C., Galons, H., Dierick, J. F., Pinna, L. A., Meggio, F., Totzke, F., Schachtele, C., Lerman, A. S., Carnero, A., Wan, Y., Gray, N. & Meijer, L. (2005). Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 280(35): 31208-31219.
- Bachmeier, C. J. & Miller, D. W. (2005). A fluorometric screening assay for drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Pharm Res* 22(1): 113-121.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371(Pt 1): 199-204.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. & Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408(3): 297-315.
- Benet, L. Z. & Cummins, C. L. (2001). The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 50 Suppl 1: S3-11.

- Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A. &Wacher, V. J. (1999). Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 62(1-2): 25-31.
- Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., Cantonati, H., Attems, J., Gsur, A. &Micksche, M. (2005). Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 131(6): 355-363.
- Bible, K. C., Bible, R. H., Jr., Kottke, T. J., Svingen, P. A., Xu, K., Pang, Y. P., Hajdu, E. &Kaufmann, S. H. (2000). Flavopiridol binds to duplex DNA. *Cancer Res* 60(9): 2419-2428.
- Boerner, S. A., Tourne, M. E., Kaufmann, S. H. &Bible, K. C. (2001). Effect of P-glycoprotein on flavopiridol sensitivity. *Br J Cancer* 84(10): 1391-1396.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. &Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461(2): 347-357.
- Brant, S. R., Panhuysen, C. I., Nicolae, D., Reddy, D. M., Bonen, D. K., Karaliukas, R., Zhang, L., Swanson, E., Datta, L. W., Moran, T., Ravenhill, G., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Karban, A. S. &Cho, J. H. (2003). MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 73(6): 1282-1292.
- Buschges, R., Weber, R. G., Actor, B., Lichter, P., Collins, V. P. &Reifenberger, G. (1999). Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9(3): 435-442; discussion 432-433.
- Byrd, J. C., Lin, T. S., Dalton, J. T., Wu, D., Phelps, M. A., Fischer, B., Moran, M., Blum, K. A., Rovin, B., Brooker-McEldowney, M., Broering, S., Schaaf, L. J., Johnson, A. J., Lucas, D. M., Heerema, N. A., Lozanski, G., Young, D. C., Suarez, J. R., Colevas, A. D. &Grever, M. R. (2007). Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109(2): 399-404.
- Cascorbi, I. (2006). Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112(2): 457-473.

- Cascorbi, I. (2011). P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol* (201): 261-283.
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P. & Staud, F. (2006). P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 22(3): 400-410.
- Ceckova, M., Libra, A., Pavek, P., Nachtigal, P., Brabec, M., Fuchs, R. & Staud, F. (2006). Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(1-2): 58-65.
- Ceckova, M., Vackova, Z., Radilova, H., Libra, A., Buncek, M. & Staud, F. (2008). Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicol In Vitro* 22(8): 1846-1852.
- Cervený, L., Pavek, P., Malakova, J., Staud, F. & Fendrich, Z. (2006). Lack of interactions between breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) and selected antiepileptic agents. *Epilepsia* 47(3): 461-468.
- Cicenas, J. & Valius, M. (2011). The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(10): 1409-1418.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. & Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258(5088): 1650-1654.
- Coley, H. M., Shotton, C. F. & Thomas, H. (2007). Seliciclib (CYC202; r-roscovitine) in combination with cytotoxic agents in human uterine sarcoma cell lines. *Anticancer Res* 27(1A): 273-278.
- Dai, Y. & Grant, S. (2003). Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 3(4): 362-370.
- Dantzig, A. H., Shepard, R. L., Cao, J., Law, K. L., Ehlhardt, W. J., Baughman, T. M., Bumol, T. F. & Starling, J. J. (1996). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* 56(18): 4171-4179.

- de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R. & Bates, S. E. (1999). Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* 146(2): 117-126.
- Dean, M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14(1): 3-9.
- Deeley, R. G., Westlake, C. & Cole, S. P. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86(3): 849-899.
- DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J. & Kim, R. B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 249-273.
- Dehay, C. & Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8(6): 438-450.
- Del Vecchio, S., Ciarmiello, A. & Salvatore, M. (1999). Clinical imaging of multidrug resistance in cancer. *Q J Nucl Med* 43(2): 125-131.
- Dickson, M. A. & Schwartz, G. K. (2009). Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol* 16(2): 36-43.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15665-15670.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12(15): 2245-2262.
- Ee, P. L., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X., Ross, D. D. & Beck, W. T. (2004). Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res* 64(4): 1247-1251.
- Elledge, S. J. & Harper, J. W. (1998). The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1377(2): M61-70.
- Filmus, J., Robles, A. I., Shi, W., Wong, M. J., Colombo, L. L. & Conti, C. J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9(12): 3627-3633.

- Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* 118(Pt 22): 5171-5180.
- Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 10(2): 147-156.
- Ford, H. L. & Pardee, A. B. (1998). The S phase: beginning, middle, and end: a perspective. *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 1-7.
- Fromm, M. F. & Kim, R. B. (2011). Drug transporters. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, New York*.
- Garriga, J. & Grana, X. (2004). Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 337: 15-23.
- Gedeon, C., Behravan, J., Koren, G. & Piquette-Miller, M. (2006). Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure. *Placenta* 27(11-12): 1096-1102.
- Gerk, P. M. & Vore, M. (2002). Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2): 407-415.
- Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczyński, M. J. & Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9(3): 215-236.
- Gillet, J. P., Efferth, T. & Remacle, J. (2007). Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta* 1775(2): 237-262.
- Gillet, J. P. & Gottesman, M. M. (2010). Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol* 596: 47-76.
- Goldstein, L. J. (1996). MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 32A(6): 1039-1050.

- Golstein, P. E., Boom, A., van Geffel, J., Jacobs, P., Masereel, B. & Beauwens, R. (1999). P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch* 437(5): 652-660.
- Gonzalez-Lobato, L., Real, R., Prieto, J. G., Alvarez, A. I. & Merino, G. (2010). Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumitremorgin C. *Eur J Pharmacol* 644(1-3): 41-48.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2(1): 48-58.
- Hahnova-Cygalova, L., Ceckova, M. & Staud, F. (2011). Fetoprotective activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2): expression and function throughout pregnancy. *Drug Metab Rev* 43(1): 53-68.
- Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1998). The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev* 12(3): 285-289.
- Havlicek, L., Hanus, J., Vesely, 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. *J Med Chem* 40(4): 408-412.
- Heath, E. I., Bible, K., Martell, R. E., Adelman, D. C. & Lorusso, P. M. (2008). A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. *Invest New Drugs* 26(1): 59-65.
- Herget, M. & Tampe, R. (2007). Intracellular peptide transporters in human--compartmentalization of the "peptidome". *Pflugers Arch* 453(5): 591-600.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M. & Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3473-3478.
- Holcakova, J., Tomasec, P., Bugert, J. J., Wang, E. C., Wilkinson, G. W., Hrstka, R., Krystof, V., Strnad, M. & Vojtesek, B. (2010). The inhibitor of cyclin-dependent



kinases, olomoucine II, exhibits potent antiviral properties. *Antivir Chem Chemother* 20(3): 133-142.

Homolya, L., Varadi, A. &Sarkadi, B. (2003). Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17(1-4): 103-114.

Hooijberg, J. H., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Vrasdonk, C., Heijn, M., de Jong, M. C., Scheper, R. J., Lankelma, J. &Pinedo, H. M. (1999). Potent interaction of flavopiridol with MRP1. *Br J Cancer* 81(2): 269-276.

Huwe, A., Mazitschek, R. &Giannis, A. (2003). Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Angew Chem Int Ed Engl* 42(19): 2122-2138.

Hyafil, F., Vergely, C., Du Vignaud, P. &Grand-Perret, T. (1993). In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res* 53(19): 4595-4602.

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. &Higgins, C. F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346(6282): 362-365.

Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., Taube, R., Sausville, E. A., Senderowicz, A. M., Peterlin, B. M. &Price, D. H. (2000). Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* 275(37): 28345-28348.

Chen, Z. Q., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A. G. &Dean, M. (2006). The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* 281(11): 7452-7457.

Chmela, Z., Vesely, J., Lemr, K., Rypka, M., Hanus, J., Havlicek, L., Krystof, V., Michnova, L., Fuksova, K. &Lukes, J. (2001). In vivo metabolism of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine in mice: glucosidation as the principal metabolic route. *Drug Metab Dispos* 29(3): 326-334.

- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58(3): 621-681.
- Chou, T. C. & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.
- Iizuka, D., Ogura, A., Kuwabara, M. & Inanami, O. (2008). Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II. *Anticancer Drugs* 19(6): 565-572.
- Jager, W., Gehring, E., Hagenauer, B., Aust, S., Senderowicz, A. & Thalhammer, T. (2003). Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2). *Life Sci* 73(22): 2841-2854.
- Jager, W., Zembsch, B., Wolschann, P., Pittenauer, E., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Sedlacek, H. H., Graf, J. & Thalhammer, T. (1998). Metabolism of the anticancer drug flavopiridol, a new inhibitor of cyclin dependent kinases, in rat liver. *Life Sci* 62(20): 1861-1873.
- Johnson, D. R. & Klaassen, C. D. (2002). Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicol Sci* 67(2): 182-189.
- Juliano, R. L. & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455(1): 152-162.
- Kajinami, K., Brousseau, M. E., Ordovas, J. M. & Schaefer, E. J. (2004). Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (MDR1) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. *Am J Cardiol* 93(8): 1046-1050.
- Kamath, A. V., Chong, S., Chang, M. & Marathe, P. H. (2005). P-glycoprotein plays a role in the oral absorption of BMS-387032, a potent cyclin-dependent kinase 2 inhibitor, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 55(2): 110-116.
- Kanoe, H., Nakayama, T., Murakami, H., Hosaka, T., Yamamoto, H., Nakashima, Y., Tsuboyama, T., Nakamura, T., Sasaki, M. S. & Toguchida, J. (1998). Amplification of

the CDK4 gene in sarcomas: tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. *Anticancer Res* 18(4A): 2317-2321.

Karp, J. E., Smith, B. D., Levis, M. J., Gore, S. D., Greer, J., Hattenburg, C., Briel, J., Jones, R. J., Wright, J. J. & Colevas, A. D. (2007). Sequential flavopiridol, cytosine arabinoside, and mitoxantrone: a phase II trial in adults with poor-risk acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4467-4473.

Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T. M. & Edwards, P. A. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277(4): 2908-2915.

Kasten, M. & Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20(15): 1832-1838.

Kerr, I. D. (2004). Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 315(1): 166-173.

Kodym, E., Kodym, R., Reis, A. E., Habib, A. A., Story, M. D. & Saha, D. (2009). The small-molecule CDK inhibitor, SNS-032, enhances cellular radiosensitivity in quiescent and hypoxic non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 66(1): 37-47.

Kohle, C. & Bock, K. W. (2009). Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 77(4): 689-699.

Krishna, R. & 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. *Eur J Pharm Sci* 11(4): 265-283.

Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P. & Schuetz, J. D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279(23): 24218-24225.

- Krystof, V., Lenobel, R., Havlicek, L., Kuzma, M. & Strnad, M. (2002). Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett* 12(22): 3283-3286.
- Krystof, V., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Fischer, P. M., Muller, P., Vojtesek, B., Orsag, M., Havlicek, L. & Strnad, M. (2005). Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* 62(15): 1763-1771.
- Krystof, V. & Uldrijan, S. (2010). Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 11(3): 291-302.
- Kuo, M. T. (2009). Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 11(1): 99-133.
- Kusuhara, H. & Sugiyama, Y. (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* 453(5): 735-744.
- Lalande, M. E., Ling, V. & Miller, R. G. (1981). Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(1): 363-367.
- Lam, L. T., Pickeral, O. K., Peng, A. C., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltane, J. M., Averett, L. M., Zhao, H., Davis, R. E., Sathyamoorthy, M., Wahl, L. M., Harris, E. D., Mikovits, J. A., Monks, A. P., Hollingshead, M. G., Sausville, E. A. & Staudt, L. M. (2001). Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2(10): RESEARCH0041.
- Leazer, T. M. & Klaassen, C. D. (2003). The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metab Dispos* 31(2): 153-167.
- Leonard, G. D., Fojo, T. & Bates, S. E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 8(5): 411-424.
- Leschziner, G. D., Andrew, T., Pirmohamed, M. & Johnson, M. R. (2007). ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 7(3): 154-179.

- Li, G., Chen, X., Wang, Q., Xu, Z., Zhang, W. &Ye, L. (2007). The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27(2): 173-175.
- Lin, J. H. &Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42(1): 59-98.
- Linton, K. J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 22: 122-130.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H. &Bates, S. E. (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 ( Pt 11): 2011-2021.
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. &Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58(7): 931-959.
- Liu, X., Clements, A., Zhao, K. &Marmorstein, R. (2006). Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 281(1): 578-586.
- Lolli, G. &Johnson, L. N. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 4(4): 572-577.
- Loyer, P., Trembley, J. H., Katona, R., Kidd, V. J. &Lahti, J. M. (2005). Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal* 17(9): 1033-1051.
- Mack, J. T., Brown, C. B. &Tew, K. D. (2008). ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin Ther Targets* 12(4): 491-504.
- Malumbres, M. &Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1(3): 222-231.
- Malumbres, M. &Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3(6): 459-465.

- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30(11): 630-641.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-166.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H. & Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11(11): 1275-1276.
- McClue, S. J. & Stuart, I. (2008). Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine) in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* 36(3): 561-570.
- McDevitt, C. A., Collins, R. F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I. D., Ford, R. C. & Callaghan, R. (2006). Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14(11): 1623-1632.
- Mechetner, E. B. & Roninson, I. B. (1992). Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 5824-5828.
- Meijer, L. & Raymond, E. (2003). Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res* 36(6): 417-425.
- Melillo, G., Sausville, E. A., Cloud, K., Lahusen, T., Varesio, L. & Senderowicz, A. M. (1999). Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res* 59(21): 5433-5437.
- Miller, D. S. (2010). Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci* 31(6): 246-254.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59(1): 8-13.

- Mizuarai, S., Aozasa, N. & Kotani, H. (2004). Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 109(2): 238-246.
- Mo, W. & Zhang, J. T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 3(1): 1-27.
- Morales, C., Garcia, M. J., Ribas, M., Miro, R., Munoz, M., Caldas, C. & Peinado, M. A. (2009). Dihydrofolate reductase amplification and sensitization to methotrexate of methotrexate-resistant colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8(2): 424-432.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374(6518): 131-134.
- Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P. H., Chin, L. & Bosenberg, M. W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45(5): 447-454.
- Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Komada, M., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K. & Ishikawa, T. (2008). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem J* 411(3): 623-631.
- Nakanishi, T. (2007). Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics Proteomics* 4(3): 241-254.
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R. & Ross, D. D. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 83(8): 1084-1103.
- O'Brien, M. L., Vulevic, B., Freer, S., Boyd, J., Shen, H. & Tew, K. D. (1999). Glutathione peptidomimetic drug modulator of multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther* 291(3): 1348-1355.
- Pan, Y. Z., Morris, M. E. & Yu, A. M. (2009). MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 75(6): 1374-1379.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J. & Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic

metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 1-32.

Payen, L., Courtois, A., Loewert, M., Guillouzo, A. &Fardel, O. (2001). Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun* 282(1): 257-263.

Perego, P., De Cesare, M., De Isabella, P., Carenini, N., Beggiolin, G., Pezzoni, G., Palumbo, M., Tartaglia, L., Pratesi, G., Pisano, C., Carminati, P., Scheffer, G. L. &Zunino, F. (2001). A novel 7-modified camptothecin analog overcomes breast cancer resistance protein-associated resistance in a mitoxantrone-selected colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 61(16): 6034-6037.

Petzinger, E. &Geyer, J. (2006). Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372(6): 465-475.

Phelps, M. A., Lin, T. S., Johnson, A. J., Hurh, E., Rozewski, D. M., Farley, K. L., Wu, D., Blum, K. A., Fischer, B., Mitchell, S. M., Moran, M. E., Brooker-McEldowney, M., Heerema, N. A., Jarjoura, D., Schaaf, L. J., Byrd, J. C., Grever, M. R. &Dalton, J. T. (2009). Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113(12): 2637-2645.

Pichler, A., Zelcer, N., Prior, J. L., Kuil, A. J. &Piwnicka-Worms, D. (2005). In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 11(12): 4487-4494.

Pommier, Y., Leteurtre, F., Fesen, M. R., Fujimori, A., Bertrand, R., Solary, E., Kohlhagen, G. &Kohn, K. W. (1994). Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest* 12(5): 530-542.

Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. &Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60(1): 47-50.



- Rajnai, Z., Mehn, D., Beery, E., Okyar, A., Jani, M., Toth, G. K., Fulop, F., Levi, F. &Krajcsi, P. (2010). ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Drug Metab Dispos* 38(11): 2000-2006.
- Ramirez, J., Iyer, L., Journault, K., Belanger, P., Innocenti, F., Ratain, M. J. &Guillemette, C. (2002). In vitro characterization of hepatic flavopiridol metabolism using human liver microsomes and recombinant UGT enzymes. *Pharm Res* 19(5): 588-594.
- Raynaud, F. I., Whittaker, S. R., Fischer, P. M., McClue, S., Walton, M. I., Barrie, S. E., Garrett, M. D., Rogers, P., Clarke, S. J., Kelland, L. R., Valenti, M., Brunton, L., Eccles, S., Lane, D. P. &Workman, P. (2005). In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin Cancer Res* 11(13): 4875-4887.
- Ren, S. &Rollins, B. J. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117(2): 239-251.
- Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W. &Bates, S. E. (2007). ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26(1): 39-57.
- Rypka, M., Vesely, J., Chmela, Z., Riegrova, D., Cervenkova, K., Havlicek, L., Lemr, K., Hanus, J., Cerny, B., Lukes, J. &Michalikova, K. (2002). In vitro biotransformation of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine by mouse liver microsomes. *Xenobiotica* 32(11): 1017-1031.
- Sausville, E. A. (2002). Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol Med* 8(4 Suppl): S32-37.
- Scotto, K. W. (2003). Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22(47): 7496-7511.
- Sedlacek, H. H. (2001). Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol* 38(2): 139-170.

- Shapiro, A. B. & Ling, V. (1997). Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* 250(1): 130-137.
- Shapiro, G. I. (2004). Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Clin Cancer Res* 10(12 Pt 2): 4270s-4275s.
- Shapiro, G. I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 24(11): 1770-1783.
- Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9(1): 105-127.
- Sharom, F. J., Yu, X., Lu, P., Liu, R., Chu, J. W., Szabo, K., Muller, M., Hose, C. D., Monks, A., Varadi, A., Seprodi, J. & Sarkadi, B. (1999). Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem Pharmacol* 58(4): 571-586.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274(5293): 1672-1677.
- Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60(14): 3689-3695.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9(10): 1149-1163.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Schang, L. M., St Vincent, M. R. & Lacasse, J. J. (2006). Five years of progress on cyclin-dependent kinases and other cellular proteins as potential targets for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother* 17(6): 293-320.
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A. & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99(2): 507-512.
- Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55(1): 3-29.

- Schinkel, A. H., Kemp, S., Dolle, M., Rudenko, G. & Wagenaar, E. (1993). N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* 268(10): 7474-7481.
- Schwab, M., Schaeffeler, E., Marx, C., Fromm, M. F., Kaskas, B., Metzler, J., Stange, E., Herfarth, H., Schoelmerich, J., Gregor, M., Walker, S., Cascorbi, I., Roots, I., Brinkmann, U., Zanger, U. M. & Eichelbaum, M. (2003). Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124(1): 26-33.
- Siller, M., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., Dolezal, K., Popa, I. & Strnad, M. (2009). Interactions of olomoucine II with human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 37(6): 1198-1202.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. & Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108: 73-112.
- Sparreboom, A., Gelderblom, H., Marsh, S., Ahluwalia, R., Obach, R., Principe, P., Twelves, C., Verweij, J. & McLeod, H. L. (2004). Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* 76(1): 38-44.
- Sparreboom, A., Loos, W. J., Burger, H., Sissung, T. M., Verweij, J., Figg, W. D., Nooter, K. & Gelderblom, H. (2005). Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan. *Cancer Biol Ther* 4(6): 650-658.
- Spoelstra, E. C., Westerhoff, H. V., Dekker, H. & Lankelma, J. (1992). Kinetics of daunorubicin transport by P-glycoprotein of intact cancer cells. *Eur J Biochem* 207(2): 567-579.
- St-Pierre, M. V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J. F., Serrano, M. A., Marin, J. J., Sugiyama, Y. & Meier, P. J. (2004). Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(6): R1505-1516.
- Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S. & Pavek, P. (2010). Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol* 596: 199-222.

- Staud, F. &Pavek, P. (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 37(4): 720-725.
- Staud, F., Vackova, Z., Pospechova, K., Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., Cygalova, L., Nachtigal, P. &Fendrich, Z. (2006). Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 319(1): 53-62.
- Stavrovskaya, A. A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 65(1): 95-106.
- Su, L., Mruk, D. D. &Cheng, C. Y. (2011). Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol* 208(3): 207-223.
- Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. &Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5(3): 219-234.
- Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C. &Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13(9-10): 379-393.
- Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M. &Ueda, K. (2005). ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol* 38(1): 2-12.
- Tan, E. K., Chan, D. K., Ng, P. W., Woo, J., Teo, Y. Y., Tang, K., Wong, L. P., Chong, S. S., Tan, C., Shen, H., Zhao, Y. &Lee, C. G. (2005). Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 62(3): 460-464.
- Tang, F., Ouyang, H., Yang, J. Z. &Borchardt, R. T. (2004). Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 33342, fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein, across MDCK-MDR1 cell monolayers. *J Pharm Sci* 93(5): 1185-1194.
- Tarasova, N. I., Seth, R., Tarasov, S. G., Kosakowska-Cholody, T., Hrycyna, C. A., Gottesman, M. M. &Michejda, C. J. (2005). Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter. *J Med Chem* 48(11): 3768-3775.
- Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54(16): 4313-4320.

- To, K. K., Polgar, O., Huff, L. M., Morisaki, K. & Bates, S. E. (2008). Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Mol Cancer Res* 6(1): 151-164.
- To, K. K., Zhan, Z. & Bates, S. E. (2006). Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma. *Mol Cell Biol* 26(22): 8572-8585.
- Tong, W. G., Chen, R., Plunkett, W., Siegel, D., Sinha, R., Harvey, R. D., Badros, A. Z., Popplewell, L., Coutre, S., Fox, J. A., Mahadocon, K., Chen, T., Kegley, P., Hoch, U. & Wierda, W. G. (2010). Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Clin Oncol* 28(18): 3015-3022.
- Velamakanni, S., Wei, S. L., Janvilisri, T. & van Veen, H. W. (2007). ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* 39(5-6): 465-471.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S. & et al. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 224(2): 771-786.
- Villerbu, N., Gaben, A. M., Redeuilh, G. & Mester, J. (2002). Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *Int J Cancer* 97(6): 761-769.
- Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Furukawa, T., Nakagawa, H. & Ishikawa, T. (2009). Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1): 66-72.
- Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshiba, S., Hoshijima, K., Komada, M. & Ishikawa, T. (2007). Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J Biol Chem* 282(38): 27841-27846.
- Walsby, E., Lazenby, M., Pepper, C. & Burnett, A. K. (2011). The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine. *Leukemia* 25(3): 411-419.

- Wanders, R. J., Visser, W. F., van Roermund, C. W., Kemp, S. & Waterham, H. R. (2007). The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch* 453(5): 719-734.
- Wang, F., Xue, X., Wei, J., An, Y., Yao, J., Cai, H., Wu, J., Dai, C., Qian, Z., Xu, Z. & Miao, Y. (2010). hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations. *Br J Cancer* 103(4): 567-574.
- Wartenberg, M., Ling, F. C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Putz, V., Hescheler, J. & Sauer, H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *Faseb J* 17(3): 503-505.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81(3): 323-330.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269(5228): 1281-1284.
- Woodward, O. M., Kottgen, A. & Kottgen, M. (2011). ABCG transporters and disease. *Febs J* 278(18): 3215-3225.
- Xu, C., Li, C. Y. & Kong, A. N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28(3): 249-268.
- Xu, D., Kang, H., Fisher, M. & Juliano, R. L. (2004a). Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. *Mol Pharmacol* 66(2): 268-275.
- Xu, D., Ye, D., Fisher, M. & Juliano, R. L. (2002). Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *J Pharmacol Exp Ther* 302(3): 963-971.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S. & Zhang, J. T. (2004b). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* 279(19): 19781-19789.

- Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S. & Piwnicka-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14(12): 8420-8431.
- Yague, E., Armesilla, A. L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C. F. & Raguz, S. (2003). P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol Chem* 278(12): 10344-10352.
- Yang, K., Wu, J. & Li, X. (2008). Recent advances in the research of P-glycoprotein inhibitors. *Biosci Trends* 2(4): 137-146.
- You, G. & Morris, M. E. (2007). Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition. *John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey*.
- Zaman, G. J., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R. P., Baas, F. & Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7690-7694.
- Zolnerciks, J. K., Andress, E. J., Nicolaou, M. & Linton, K. J. (2011). Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 50(1): 43-61.

## 8 Seznam publikovaných prací

### 8.1 Původní práce vztahující se k tématu dizertační práce

- 1) Hahnova Cygalova L., Hofman J., Ceckova M., Staud F.: **Transplacental pharmacokinetics of glyburide, rhodamine 123, and BODIPY FL Prazosin: Effect of drug efflux transporters and lipid solubility.** J Pharmacol Exp Ther 2009; 331 (3): 1118 – 25 (IF pro 2011 = 3,828)
- 2) Hofman J., Ahmadimoghaddam D., Hahnova L., Pavek P., Ceckova M., Staud F.: **Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 transporter *in vitro* and *in situ* and synergistically potentiate cytostatic effect of mitoxantrone.** Pharmacol Res 2012; 65 (3): 312 – 9 (IF pro 2011 = 4,436)
- 3) Hofman J., Kucera R., Cihalova D., Klimes J., Ceckova M., Staud F.: **Substrate affinity of olomoucine II and purvalanol A toward ABCG2/Abcg2 and ABCB1/Abcb1 transporters *in vitro* and *in situ*.** (zasláno do časopisu Pharmacol Res, IF pro 2011 = 4,436)
- 4) Cihalova D., Hofman J., Ceckova M., Staud F. **Inhibition of P-glycoprotein by cyclin-dependent kinase inhibitors: involvement of drug transporter in the mediation of synergistic effect in drug combinations** (zasláno do časopisu Pharmacol Res, IF pro 2011 = 4,436)

### 8.2 Podíl doktoranda na publikacích vztahujících se k tématu dizertační práce

U publikací 2) a 3) je předkladatel této dizertační práce hlavním autorem; prováděl všechny experimenty, které jsou v těchto publikacích prezentovány, a dále zpracovával data, analyzoval je a sepsal oba rukopisy. V rámci publikace 2) zavedl na pracovišti metodu „combination index method of Chou-Talalay“. HPLC/MS analýza vzorků potřebná pro vyhodnocení experimentů u publikace 3) byla provedena druhým autorem, PharmDr. Radimem Kučerou, Ph.D.



V publikaci 1) je předkladatel dizertační práce uveden jako druhý autor. V této studii spolupracoval s hlavní autorkou při provádění duálních perfúzí potkaní placenty s recirkulací fetálního kompartmentu, na zpracování vzorků a analýze dat a přispěl rovněž k sepsání práce. Předkladatel později použil metodiku duálních perfúzí pro studium interakcí CDK<sub>i</sub> s lékovými transportéry a jelikož je publikace metodicky velice blízká *in situ* části této dizertační práce, je zařazena mezi publikace vázající se k tématu práce.

V publikaci 4) je předkladatel dizertační práce uveden jako druhý autor. V rámci této práce pomáhal hlavní autorce s měřením ATPázové aktivity P-gp v membránových vezikulách, s návrhem kombinačních experimentů, zpracováním dat a také se sepsáním rukopisu.

### 8.3 Původní práce nevztahující se k tématu dizertační práce

- 1) Piterkova J., Hofman J., Mieslerova B., Sedlarova M., Luhova L., Lebeda A., Petřivalský M.: **Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.-*Oidium neolyopersici* interactions.** Environ Exp Bot 2011; 74: 37 – 44 (IF pro 2011 = 2,985)
- 2) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Zemankova L., Nachtigal P., Dolezelova E., Cerveny L., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **Synchronized activity of organic cation transporter 3 (Oct3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (Mate 1/SLC47A1) transporter in transplacental passage of MPP+ in rat.** (v elektronické verzi publikováno 26. dubna 2012, časopis Toxicol Sci, IF pro 2011 = 4,652)
- 3) Piterkova J., Luhova L., Hofman J., Tureckova V., Novak O., Petrivalsky M., Fellner M.: **Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions.** (v elektronické verzi publikováno 9. července 2012, časopis Ann Bot, IF pro 2011 = 4,030)
- 4) Hofman J., Buncek M., Haluza R., Streinz L., Ledvina M., Cigler P.: ***In vitro* transfection mediated by dendrigraft poly(L-lysines): effect of structure and molecule size.** (zasláno do časopisu Macromol Biosci, IF pro 2011 = 3,886)

## 8.4 Posterové prezentace a abstrakty publikované ve sbornících

- 1) Hofman J., Luhova L., Piterkova J., Petrivalsky M., Fellner M.: **The role of NO in germination of 7B-1 mutant of *Lycopersicon esculentum* Mill. under osmotic stress.** 11. Dny fyziologie rostlin – Konference experimentální biologie rostlin, 9. – 12. července 2007, Olomouc
- 2) Piterkova J., Luhova L., Petrivalsky M., Mieslerova B., Hofman J., Adamkova S., Lebeda A.: **Studium úlohy oxidu dusnatého v průběhu patogenese u *Lycopersicon* spp.** Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 21. – 22. března 2007, Praha
- 3) Piterkova J., Luhova L., Petrivalsky M., Hofman J., Fellner M.: **The role of nitric oxide in defence mechanisms of tomato during osmotic and salinity stres.** XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 6. – 7. února 2008, Brno
- 4) Piterkova J., Luhova L., Petrivalsky M., Hofman J., Mieslerova B.: **Vliv NO na vývoj padlí rajčatového (*Oidium neolycopersici*).** Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, 12. – 13. února 2008, Praha
- 5) Piterkova J., Hofman J., Petrivalsky M., Luhova L., Mieslerova B., Lebeda A.: **The involvement of nitric oxide in the development of *Oidium neolycopersici* on the leaf discs of *Lycopersicon* spp.** XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, 17. – 22. srpna 2008, Tampere, Finsko
- 6) Sedlarova M., Petrivalsky L., Luhova L., Hasova M., Hofman J., Kocirova J., Lebeda A.: **The role of nitric oxide in development of biotrophic pathogens and their interaction with host cells.** 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, 24. – 29. srpna 2008, Turín, Itálie
- 7) Hahnova-Cygalova L., Ceckova M., Hofman J., Staud F.: **Interactions of cyclin dependent kinase inhibitors with drug efflux transporter ABCG2 (BCRP).** 59. Farmakologické dni, 2. – 4. září 2009, Bratislava, Slovensko
- 8) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Brckakova E., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **Localization and functional analysis of organic cation transporter 3 (OCT3) in rat placenta.** 9th International ISSX Meeting, 4. – 8. září 2010, Istanbul, Turecko

- 9) Hofman J., Ahmadimoghaddam D., Hahnova L., Ceckova M., Staud F.: **Inhibition of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by purine cyclin-dependent kinase inhibitors *in vitro* and *in situ***. 9th International ISSX Meeting, 4. – 8. září 2010, Istanbul, Turecko
- 10) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Brackova E., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **Expression and function of organic cation transporter 3 (OCT3) in rat placenta during pregnancy**. 60. Česko-slovenské farmakologické dny, 15. – 17. září 2010, Hradec Králové
- 11) Hofman J., Ahmadimoghaddam D., Hahnova L., Ceckova M., Staud F.: **On interactions between cyclin-dependent kinase inhibitors and breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)**. 60. Česko-slovenské farmakologické dny, 15. – 17. září 2010, Hradec Králové
- 12) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Brackova E., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **The role of organic cation transporter (OCT3) in placental transfer of MPP<sup>+</sup> at different stages of gestation**. Multi-Drug Efflux Systems, 12. – 17. června 2011, Les Diablerets, Švýcarsko
- 13) Hofman J., Kucera R., Ahmadimoghaddam D., Ceckova M., Klimes J., Staud F.: **Interactions of olomoucine II and purvalanol A with ABCG2 transporter *in vitro* and *in situ***. Multi-Drug Efflux Systems, 12. – 17. června 2011, Les Diablerets, Švýcarsko
- 14) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Brackova E., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **The role of organic cation transporter 3 (OCT3) in fetal protection throughout gestation in rat**. 61. Česko-slovenské farmakologické dny, 14. – 16. září 2011, Brno
- 15) Hofman J., Kucera R., Ahmadimoghaddam D., Ceckova M., Klimes J., Staud F.: **Olomoucine II and purvalanol A are inhibitors and substrates of ABCG2 transporter *in vitro* and *in situ***. 61. Česko-slovenské farmakologické dny, 14. – 16. září 2011, Brno
- 16) Cihalova D., Hofman J., Ceckova M., Staud F.: **Inhibition of P-glycoprotein efflux activity by cyclin-dependent kinase inhibitors**. 62. Farmakologické dni, 25. – 27. června, Košice, Slovensko
- 17) Hofman J., Cihalova D., Kucera R., Klimes J., Staud F.: **Substrate affinity of olomoucine II and purvalanol A for ABCG2 and ABCB1 transporters *in vitro* and *in situ***. 62. Farmakologické dni, 25. – 27. června, Košice, Slovensko

## 8.5 Ústní prezentace

- 1) Piterkova J., Hofman J., Luhova L., Mieslerova B., Petrivalsky M.: **Účast aktivních forem kyslíku a dusíku v průběhu patogeneze *Oidium neolycopersici* na listových discích *Lycopersicon* spp.**. XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, 6. – 7. února 2008, Brno
- 2) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Brcakova E., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **Transport of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) across rat term placenta.** 1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, 1. – 2. února 2011, Hradec Králové
- 3) Hofman J., Ahmadimoghaddam D., Hahnova L., Ceckova M., Staud F.: **Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 and synergistically potentiate cytotoxic effect of mitoxantrone.** 1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, 1. – 2. února 2011, Hradec Králové
- 4) Ahmadimoghaddam D., Hofman J., Zemankova L., Nachtigal P., Dolezelova E., Cerveny L., Ceckova M., Micuda S., Staud F.: **Cooperation of organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion transporter 1 (Mate1/SLC47A1) in transplacental passage of MPP<sup>+</sup>.** 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, 31. ledna – 1. února 2011, Hradec Králové
- 5) Hofman J., Kucera R., Ceckova M., Klimes J., Staud F.: **Pharmacokinetic interactions of purine cyclin-dependent kinase inhibitors with ABCG2 transporters *in vitro* and *in situ*.** 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, 31. ledna – 1. února 2011, Hradec Králové