

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Interakce vybraných protinádorových látek ze skupiny
inhibitorů MAPK/ERK signalizační kaskády s ABC
lékovými transportéry**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Lukáš Slatinský

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

Na tomto místě bych rád poděkoval Skupině experimentální farmakologie a lékových interakcí při Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové za možnost účastnit se jejich výzkumného projektu a vypracovat tak tuto diplomovou práci, dále bych chtěl poděkovat vedoucí práce doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za odborné vedení práce a podnětné připomínky a v neposlední řadě bych rád poděkoval Mgr. Aleši Šorfovi za pomocnou ruku v laboratoři a cenné rady při vypracovávání této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Lukáš Slatinský

Školitel: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce vybraných protinádorových látek ze skupiny inhibitorů MAPK/ERK signalizační kaskády s ABC lékovými transportéry

ABCB1 (Pgp, P-glycoprotein) a ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein) patří mezi membránové efluxní transportéry závislé na ATP, tzv. ATP-binding cassettes (ABC). Fyziologicky jsou exprimovány v buněčné membráně a chrání tkáň před potencionálně toxickými xenobiotiky, včetně léčiv. Tím, že jsou schopny odčerpávat širokou škálu cytotoxických léčiv, představují také jeden z obranných mechanismů nádorových buněk, což vede k selhávání léčby.

BRAF protein má důležitou regulační a signální roli v MAPK/ERK signalizační kaskádě ovlivňující buněčné dělení, diferenciaci a sekreci. Mutace BRAF vedou k nadměrné aktivitě MAPK/ERK kaskády v mnoha nádorových buňkách a stávají se tak cílem protinádorové terapie. Kobimetinib a dabrafenib jsou relativně nové protinádorové látky, inhibují uvedenou signální dráhu a používají se v léčbě melanomu s mutacemi BRAF.

Cílem této práce bylo zjistit, jestli inhibitory kináz kobimetinib a dabrafenib mohou inhibovat efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2 a překonávat tak lékovou rezistenci na jejich substráty *in vitro*. Použitím metody Hoechst jsme studovali inhibiční vliv těchto látek na MDCKII liniích nadměrně exprimujících ABCB1 a ABCG2 transportéry. Dále byla použita metoda XTT, a to ke studiu antiproliferativního efektu kobimetinibu a dabrafenibu a jejich vliv na cytotoxicitu

daunorubicinu (modelový substrát ABCB1) a mitoxantronu (modelový substrát ABCG2).

Zjistili jsme, že kobimetinib a dabrafenib jsou schopny inhibovat ABCB1 a ABCG2 efluxní transportéry u MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 buněk. Kobimetinib vykazoval větší inhibiční efekt na ABCB1, v porovnání s ABCG2. Naproti tomu dabrafenib inhiboval více ABCG2.

Obě látky, kobimetinib a dabrafenib, jsou schopny překonávat rezistenci na daunorubicin u MDCKII-ABCB1 buněk. Dabrafenib je navíc schopný překonávat rezistenci i na mitoxantron u MDCKII-ABCG2 buněk. Také jsme zjistili, že ani přítomnost ABCB1, ani ABCG2 transportérů neovlivnila rezistenci na kobimetinib u MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 buněk, z čehož vyplývá, že tyto transportéry nehrají roli ve vzniku rezistence na kobimetinib. Citlivost použitých buněčných linií vůči dabrafenibu (v testovaných koncentracích do 50 μ M) byla minimální, a to bez ohledu na přítomnost ABCB1 nebo ABCG2.

Prokázali jsme, že obě testované protinádorové látky kobimetinib a dabrafenib jsou schopné inhibovat ABCB1 a ABCG2 a překonávat tak lékovou rezistenci zprostředkovanou oběma transportéry. Tyto výsledky mohou být využity při optimalizaci terapie zahrnující použití kobimetinibu a dabrafenibu u pacientů s rezistentním melanomem.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lukáš Slatinský

Supervisor: Assoc. prof. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Interactions of selected anticancer drugs of the MAPK/ERK signaling pathway inhibitors group with the ABC drug transporters

ABCB1 (Pgp, P-glycoprotein) and ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein) are members of a transmembrane efflux ATP dependent transporter family, so called ATP-binding cassettes (ABC). Physiologically they are expressed in the cellular membrane and protect body tissues against potentially toxic xenobiotics including drugs. They represent also one of the tumor defense mechanisms when being able to efflux a wide variety of cytotoxic drugs out of the cancer cells leading to treatment failure.

BRAF protein plays an important regulatory and signal role in MAPK/ERK pathway affecting cell division, differentiation and secretion. Mutations of BRAF lead to overactivity in MAPK/ERK pathway in many cancer cells and can be therefore targeted by anticancer therapy. Cobimetinib and dabrafenib are relatively new anticancer therapeutics inhibiting the signal pathway mentioned above and they are used in treatment of melanoma carrying the BRAF mutation.

The aims of this project were to investigate whether the kinase inhibitors cobimetinib and dabrafenib could inhibit the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 and reverse drug resistance to ABCB1 and ABCG2 substrates in vitro. Using the Hoechst accumulation assay we studied the inhibitory effect of these drugs to MDCKII cell lines overexpressing ABCB1 and ABCG2 transporters. The

XTT assay was further used to study the antiproliferative effect of cobimetinib and dabrafenib and their impact on cytotoxicity of daunorubicin and mitoxantron, the model anticancer substrates of ABCB1 and ABCG2, respectively.

We found that cobimetinib and dabrafenib are able to significantly inhibit ABCB1 and ABCG2 efflux transporters in MDCKII-ABCB1 and MDCKII-ABCG2 cell lines with cobimetinib showing higher inhibitory effect on ABCB1, compared to ABCG2. Contrary to cobimetinib, dabrafenib revealed preferential inhibition of ABCG2.

Both drugs cobimetinib and dabrafenib can significantly reverse daunorubicin resistance in MDCKII-ABCB1 cells. Moreover, dabrafenib is able to reverse resistance of mitoxantrone in MDCKII-ABCG2 cells. We also showed that the presence of neither ABCB1, nor ABCG2 affected resistance of cobimetinib in MDCKII-ABCB1 and MDCKII-ABCG2 cells, indicating that these transporters do not play a role in the cellular resistance to these drugs. The sensitivity to dabrafenib (in tested concentrations to 50 μ M) was minimal in all the cell lines we used regardless of presence of ABCB1 or ABCG2.

We demonstrate both anticancer agents, cobimetinib and dabrafenib, as inhibitors of ABCB1 and ABCG2 able to reverse ABC transporter-mediated drug resistance to daunorubicin and mitoxantron. These results may be taken into account when optimizing the cobimetinib- and dabrafenib- containing therapeutic regimens for the treatment of multidrug resistance melanoma patients.

Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod	3
3	Teoretická část	7
3.1	ABC transportéry	7
3.1.1	ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1)	7
3.1.2	ABCG2 (Breast cancer resistant protein, BCRP).....	9
3.2	Substráty ABC transportérů	10
3.2.1	Daunorubicin	10
3.2.2	Mitoxantron.....	12
3.3	MAP kinázové signalizační kaskády	13
3.3.1	MAPK/ERK signalizační kaskáda	15
3.3.2	Mutace BRAF proteinu	17
3.4	Inhibitory MAP/ERK signalizační kaskády.....	19
3.4.1	Kobimetinib.....	19
3.4.2	Dabrafenib	21
4	Cíle práce	24
5	Experimentální část	25
5.1	Materiál	25
5.1.1	Chemikálie.....	25
5.1.2	Buněčné kultury.....	25
5.1.3	Přístrojové vybavení	25
5.2	Metodika	26
5.2.1	Akumulačně efluxní studie.....	26
5.2.2	Proliferační studie.....	27
5.2.3	Statistická analýza dat.....	29
6	Výsledky	30
6.1	Inhibice ABC efluxních transportérů.....	30
6.2	Překonání mnohočetné lékové rezistence	35
6.3	Studium vzniku rezistence skrze ABC transportéry	42
7	Diskuze.....	46
8	Závěr	49

9	Reference.....	50
---	----------------	----

1 Seznam zkratk

ABC	ATP vázající přenašeč, z anglického „ATP binding cassette“
ABCB1	jedno z označení pro P-glykoprotein
ABCG2	jedno z označení pro BCRP
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	breast cancer resistance protein, ABCG2
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKi	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
DAB	dabrafenib, modelový inhibitor ABCB1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z anglického „deoxyribonucleic acid“
EC ₅₀	efektivní koncentrace, koncentrace, která způsobí 50% snížení aktivity transportéru
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza, z anglického „extracellular signal-regulated kinase“
FBS	fetální bovinní sérum
GDP	guanosindifosfát
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, koncentrace, která způsobí 50% snížení buněčné proliferace
ITC	mezinárodní transportérové konsorcium, z angl. International Transporter Consortium

MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza, z anglického „mitogen-activated protein kinase“
MDCKII	Madine-Darby canine kidney, buněčná linie
MDR	mnohočetná léková rezistence, z angl. „multiple-drug resistance“
MIT	mitoxantron, modelový inhibitor ABCG2
PBS	fosfátový pufr, z angl. „phosphate buffered saline“
Pgp	P-glykoprotein, ABCB1
PMS	fenazin metosulfát
WHO	světová zdravotnická organizace, z anglického „World Health Organisation“
XTT	tetrazoliová sůl

2 Úvod

Nádorová onemocnění se v současnosti spolu s nemocemi oběhové soustavy, respiračního traktu a infekčními onemocněními řadí celosvětově mezi nejčastější příčiny úmrtí. V rozvinutých zemích počet nádorových onemocnění stoupá stále rychleji a v počtu úmrtí se spolu s nemocemi oběhové soustavy řadí na přední příčky. Dle studie WHO GLOBOCAN 2012, provedené v roce 2012, činil v tomto roce počet úmrtí na nádorová onemocnění 8 milionů, což je skoro jedna šestina všech úmrtí. (Torre *et al.*, 2015) Počet nově diagnostikovaných případů byl 14 milionů. Celosvětově nejrozšířenějšími jsou nádory plic (13 %), prsu (11,9 %), kolorekta (9,7 %), prostaty (7,9 %) a žaludku (6,8 %). U mužů na předních místech dominují nádory plic (16,7 %), prostaty (15 %), kolorekta (10 %) a žaludku (8,5 %). U žen pak prsu (25,2 %), kolorekta (9,2 %), plic (8,7 %) a děložního čípku (7,9 %). (Ferlay *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2015) Výskyt nádorů se liší i geograficky. V rozvinutých zemích se je celkově nejvyšší incidence těchto onemocnění, což se připisuje celkovému životnímu stylu i střední délce života. Nejvíce se zde vyskytují nádory prsu, kolorekta a prostaty, které mají, i vzhledem k rozvinutému zdravotnictví v těchto zemích, dobrou prognózu. V rozvojových zemích se objevují nejčastěji nádory jater, žaludku a jícnu. Tyto však mají prognózu horší. Celosvětově nejvíce úmrtí připadá na nádory plic (19,4 %), jater (9,1 %), žaludku (8,8 %), kolorekta (8,5 %) a prsu (6,4 %). U mužů dominují plicní nádory (23,6 %), u žen pak prsu a plic (obojí kolem 14 %). (Ferlay *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2015)

V České republice má podle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR incidence nádorových onemocnění taktéž vzestupný charakter. V roce 2012 byla incidence těchto onemocnění přibližně 57,5 tisíce¹ (547,2 případů na 100 000 obyvatel), v roce 2015 již skoro 58,3 tisíce (553,5 př./100 tis. obyv.). To nás dlouhodobě staví nad celosvětový (2012 – 288,2 př./100 tis. obyv., 2015 – 279,9 př./100 tis. obyv.) i celoevropský

¹ Hodnoty zde uváděné jsou bez nejčastěji diagnostikovaného nádorového onemocnění „jiný zhoubný novotvar kůže.“ Díky své příznivé prognóze, včasné diagnóze a nízké úmrtnosti se vylučuje z analýz, aby nezkrášloval informace o onkologických onemocněních jako celku. (ÚZIS, 2015)

průměr (2012 – 410,1 případů/100 tis. obyv., 2015 – 397,9 př./100 tis. obyv.). Nejvíce zastoupeným typem nádorového onemocnění u nás je u mužů karcinom prostaty s incidencí 136,1 př./100 tis. obyv., u žen se nejčastěji vyskytují nádory prsu, kdy spadá 132,4 př./100 tis. obyvatel. (WHO, 2014; ÚZIS, 2015) Jedním z nádorů s celosvětově rychle rostoucí incidencí je maligní melanom. Bohužel u něj stále zůstává vysoká mortalita, a je tak velkou hrozbou. (Manuscript, 2010; Rastrelli *et al.*, 2014)

I přes současný vědecký a technologický pokrok v medicíně stále ještě nejsme schopni nádorová onemocnění zcela vyléčit. Probíhá proto celá řada výzkumů zaměřená na vznik a vývoj nádorů, vlastnosti a metabolismus nádorových buněk, ale i na možnosti léčby těchto onemocnění. Vedle chirurgických a radiologických postupů při léčbě zaujímá své důležité místo i postup farmakologický, označovaný obecným pojmem chemoterapie. Tento termín použil poprvé německý chemik Paul Ehrlich na přelomu 19. a 20. století ve významu prevence nebo léčby onemocnění chemickou látkou. (Skinner, 1949; Wain, 1958) Dnes se spíše užívá, obzvláště u široké veřejnosti, v souvislosti s protinádorovou léčbou.

První zmínky o protinádorové chemoterapeutické léčbě nacházíme již od starověku. Tehdy se jednalo o různé rostlinné přípravky. V období středověku se hojně používá arsen, který je znovu používán ve druhé polovině 19. století k léčbě leukémie. (Papac, 2001) První polovina století 20. patřila zejména vývoji zvířecích modelů a standardizaci metod. Za počátek moderní protinádorové chemoterapie můžeme považovat první světovou válku. Konkrétně použití bojového plynu yperit (známý také pod názvem hořčičný plyn). Zjistilo se, že zpomaluje růst rychle se dělících tkání, jako je např. kostní dřev. Rozsáhlejší výzkumy s ním proběhly v období druhé světové války. Yperit tak stál za zrodem prvních cytostatik, jejichž analoga založená na stejném účinku (alkylace řetězce DNA) se používají i dnes. (Ralhan and Kaur, 2007)

Ve druhé polovině 20. století se objevuje řada protinádorových látek. Některé jsou přírodního původu jako např. rostlinné vinka alkaloidy nebo taxany, vázající se na dělicí vřeténko během mitózy a zastavující tak buněčné dělení, či podofylotoxiny tvořící komplexy s topoizomerázou II. Další jsou původu

syntetického. Ty můžeme dělit třeba podle mechanismu účinku. Mezi DNA alkylující látky patří deriváty yperitu, nitrosomočoviny či sloučeniny platiny. Dalšími významnými látkami jsou analoga purinových a pyrimidinových bazí, zastavující transkripci či translaci na úrovni nukleových kyselin, nebo protinádorová antibiotika vmezeřující se do struktury DNA. (Martínková *et al.*, 2007) Velkým posunem ve výzkumu pak bylo sekvenování genetického kódu, čímž se výzkum stává více cíleným a do léčby se tak dostávají cíleně působící monoklonální protilátky. Výzkumnou práci také usnadnilo zavedení buněčných a počítačových modelů, čímž se zároveň omezilo i používání modelů zvířecích. Výzkumy zaměřené na sekvenování DNA také ukázaly, že řada patologických procesů v nádorových buňkách je spojena s proteinkinázami. Ty jsou jako transportní molekuly součástí signálních drah buňky sloužících k ovlivňování jejího metabolismu, růstu, vývoje, dělení, ale i plánované buněčné smrti. Není tedy divu, že se ovlivnění těchto kináz stalo v protinádorové léčbě jedním z cílů. (DeVita and Chu, 2008)

První schválenou látkou z rodiny inhibitorů proteinkináz, konkrétně inhibitorů receptorových tyrozinkináz, byl imatinib. Schválen byl v roce 2001 k léčbě chronické myeloidní leukemie. (Dagher *et al.*, 2002) Ukázalo se, že cílená léčba je výhodná (nižší toxicita pro pacienta, vyšší úspěšnost léčby), a tak se začaly objevovat další látky z inhibitorů proteinkináz, jako například lapatanib, gefitinib či sorafenib. (Arora and Scholar, 2005) Jedněmi z nejnovějších látek jsou CDK1 ribociclib a abemaciclib (oba schváleny FDA v roce 2017 k léčbě metastazující rakoviny prsu). (Laderian and Fojo, 2018)

Jedněmi z nejnovějších látek používaných k cílené terapii, a to inhibicí proteinkináz, jsou látky inhibující BRAF protein kinázu. Ta je součástí MAP/ERK signalizační kaskády sloužící k ovlivňování buněčného dělení, diferenciace a buněčné sekrece. Zvýšená aktivita BRAF kinázy byla prokázána u některých nádorových buněk, například melanomových, kolorektálních, gliomových, adenokarcinomu plic, ad. (Davies *et al.*, 2002; Pratilas, Xing and Solit, 2012)

Spolu s úspěšnou léčbou protinádorovými léčivy se objevuje i léčba neúspěšná, kdy nádorové buňky nejsou citlivé na podané chemoterapeutikum. Mechanismů vzniku této rezistence je několik. Například změny v cílovém

receptoru pro léčivo, změny v metabolické dráze léčiva, v signálních drahách buňky či transkripčních faktorech DNA. (Gillet and Gottesman, 2010) Za jeden z významných mechanismů vzniku rezistence mohou efluxní transportéry, které svou aktivitou snižují koncentraci cytostatika, které je jejich substrátem, uvnitř buňky. (Fischl, M.A., Richman, 1987; Baguley, 2010) Další výzkumy se tak zaměřily na možnost zvratu této mnohočetné lékové rezistence (MDR) různými mechanismy. Jedním z těchto mechanismů je možnost inhibice funkce efluxních transportérů. Výzkumy Skupiny experimentální farmakologie a lékových interakcí při Farmaceutické fakultě v Hradci Králové zjistily, že některé látky ze skupiny CDKi mají schopnost tyto transportéry zablokovat. (Cihalova *et al.*, 2013; Hofman *et al.*, 2016)

V této práci jsme se zaměřili na interakci nových látek ze skupiny inhibitorů BRAF proteinu (konkrétně kobimetinib a dabrafenib) s ABC efluxními transportéry ABCB1 a ABCG2. Chtěli jsme zjistit, jestli na tyto látky jakožto na substráty ABCB1 a ABCG2 může vznikat jejich vlivem MDR. Také nás zajímalo, jestli námi zkoumané látky mají schopnost inhibovat tyto transportéry stejně jako jiné látky ze skupiny CDKi, u kterých tato schopnost byla potvrzena v dřívějších studiích, a pokud ano, jestli touto inhibicí mohou zvrátit MDR navozenou na jiné substráty námi testovaných transportérů.

3 Teoretická část

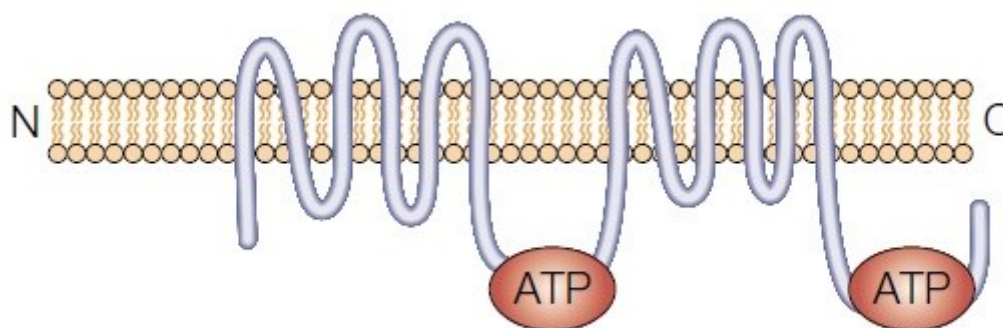
3.1 ABC transportéry

ABC efluxní transportéry (ATP-binding cassette transporters) jsou struktury v buněčné membráně, jejichž funkcí je transport xenobiotik ven z buňky. Děje se tak za spotřeby energie z ATP. Tento transport probíhá i proti koncentračnímu spádu. Buňka se tak chrání před působením pro ni cizích látek, které by ji mohly poškodit. Jelikož jsou tyto transportéry nespecifické, mezi jejich substráty patří řada látek, mimo jiné i léčiva. (Borst and Elferink, 2002) ABC transportéry tak ovlivňují farmakokinetické parametry léčiv. To může představovat problém při léčbě, kdy se buňka může zbavovat léčiva v ní nakumulovaného. ABC transportéry jsou fyziologicky přítomny v tkáních chránících organismus a jeho citlivé tkáně. Exprimované jsou tak např. ve střevní stěně, kde snižují lékovou absorpci, v hematoencefalické a hematotestikulární bariéře a placentě, kde brání distribuci potenciálně toxických látek do citlivých tkání (mozek, zárodečný epitel, vyvíjející se plod). V ledvinách i játrech pak zprostředkovávají aktivní exkreci. Můžeme je však najít i u buněk nádorových, kde svou aktivitou mohou způsobovat selhání léčby cytostatiky. Hovoříme zde o tzv. mnohočetné lékové rezistenci (zkratka MDR). (Gottesman, Fojo and Bates, 2002)

3.1.1 ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1)

ABCB1, označovaný i jako P-glykoprotein nebo také Pgp, je nejdéle známý a nejvíce prozkoumaný ABC efluxní transportér. Byl popsán již v roce 1976 u ovariálních nádorových buněk křečička čínského. (Juliano and Ling, 1976) U člověka je fyziologicky přítomen na povrchu mnoha orgánů, např. v ledvinách, játrech, střevní sliznici, žaludeční sliznici, placentě, hematoencefalické bariéře, hematotestikulární bariéře apod. Zde všude plní svou ochrannou funkci a pumpuje xenobiotika ven z buněk. Ve zvýšené míře se nachází i v nádorových buňkách, kde navozuje pro nás nechtěnou MDR. (Lin and Yamazaki, 2003)

Strukturálně je ABCB1 složen z 2 homologních částí. Každá z těchto částí se dále dělí na 6 transmembránových domén, které v párech tvoří efluxní kanály, a jednu doménu intracelulární, která je schopna vázat ATP a štěpit je (obr. 1). Díky energii ze štěpení ATP probíhá transmembránový přenos substrátu vně buňky. (Ficková, Vlček and Topinková, 2002) Substráty ABCB1 jsou kromě cytostatik mimo jiné i léčiva ze skupin betablokátorů, steroidů, antiemetik, inhibitorů HIV proteáz, blokátorů vápníkových kanálů, H1 a H2 antihistaminik, ad. (tab. 1) (Pechandová *et al.*, 2006)



Obr. 1: **Struktura P-glykoproteinu.** Modifikováno dle (Gottesman, Fojo and Bates, 2002)

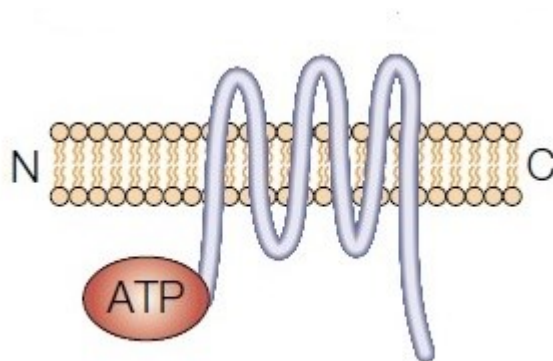
Tab. 1: **Vybrané substráty transportéru ABCB1.**

Protinádorové látky (inhibitory proteinkináz)	Jiné protinádorové látky	Ostatní látky
dabrafenib	topotekan	ibuprofen
imatinib	doxorubicin	rivaroxaban
kobimetinib	cisplatina	mirabegron
dasatinib	paklitaxel	dapaglifoazin
axitinib	vinblastin	nifedipin

Převzato z (Wishart *et al.*, 2017)

3.1.2 ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP)

ABCG2, známý jako breast cancer resistance protein nebo BCRP, patří také do skupiny ABC efluxních transportérů. Jak název napovídá, byl prvně popsán u buněk lidského karcinomu prsu v roce 1998, konkrétně u rezistentních buněčných linií s označením MCF-7. (Doyle *et al.*, 1998) Na rozdíl od ABCB1 se skládá pouze z jedné části obsahující 6 transmembránových domén a jedné intracelulární s ATPázovou aktivitou (obr. 2). Spojuje se však disulfidickými můstky a funguje tak jako homodimer. Fyziologicky je přítomen např. ve střevní sliznici, placentě, prsní žláze, hematoencefalické bariéře, hematotestikulární bariéře, ad. (Koshiha *et al.*, 2008) Jeho substrátová specifita je opět široká a zahrnuje nejenom cytostatika, ale i například statiny, flavonoidy, atd. (tab. 2) (Ni *et al.*, 2010)



Obr. 2: **Struktura Breast cancer resistant proteinu.** Modifikováno dle (Gottesman, Fojo and Bates, 2002)

Tab. 2: **Vybrané substráty transportéru ABCG2.**

Protinádorové látky (inhibitory proteinkináz)	Jiné protinádorové látky	Ostatní látky
gefitinib	topotekan	sumatriptan
imatinib	doxorubicin	nitrofurantoin
afatinib	cisplatina	kyselina listová
dasatinib	etoposid	rosuvastatin
osimertinib	paklitaxel	ezetimib

Převzato z (Wishart *et al.*, 2017)

3.2 Substráty ABC transportérů

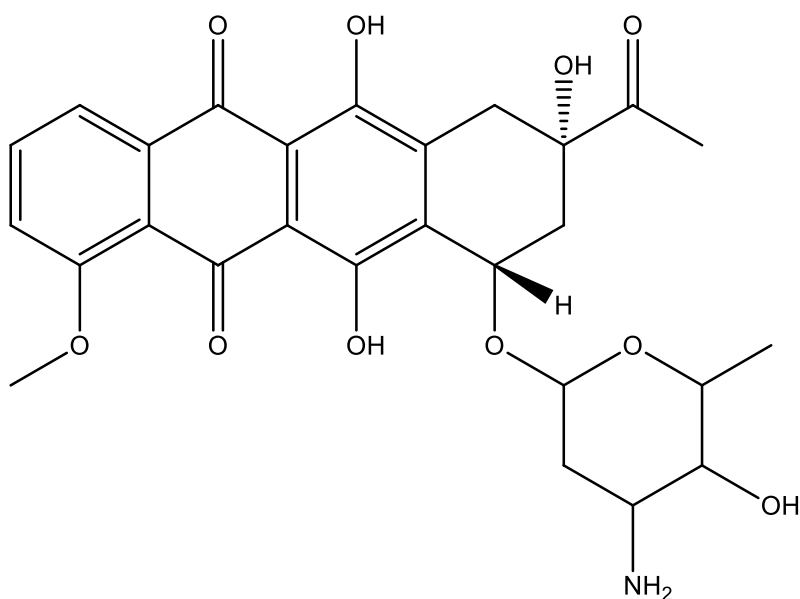
3.2.1 Daunorubicin

Daunorubicin, celým názvem (7S,9S)-9-acetyl-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion je červeně zbarvená látka ze skupiny antracyklinových antibiotik (obr. 3). Jedná se o významnou skupinu látek s antineoplastickým účinkem. Patří sem mimo jiné i široce používaná léčiva doxorubicin a idarubicin. Mechanismus účinku antracyklinových antibiotik je založen na interkalaci látky mezi řetězce DNA. Tímto pak brání její transkripci a replikaci. Zároveň inhibují funkci DNA-topoizomerázy II, jejímž úkolem je rozvolňování terciární struktury DNA, posílením její vazby s molekulou DNA. Ta se tedy nemůže rozvolnit a opět je tím bráněno její transkripci a replikaci. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017)

Daunorubicin je znám již přes padesát let. Ve čtyřicátých letech dvacátého století byl objeven aktinomycin A, první antibiotikum s protinádorovou aktivitou. V letech padesátých se díky tomuto objevu rozběhl další výzkum a z bakterií rodu *Streptomyces* bylo izolováno několik dalších látek s protinádorovým účinkem, mezi nimi i daunorubicin. Byl získán z bakterie *Streptomyces peucetius* ve dvou

na sobě nezávislých laboratořích v Itálii a Francii. Během 60. let probíhaly studie zaměřené na zjištění jeho struktury a klinické významnosti. Daunorubicin se ukázal být efektivní v léčbě leukemií a lymfomů. (Di Marco, Cassinelli and Arcamone, 1981; S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017) Později bylo také zjištěno, že je substrátem ABCG2 a ABCB1 (Wishart *et al.*, 2017) a zároveň se ukázalo, že funkcí efluxních transportérů na něj může vznikat klinicky významná MDR. (Gottesman, Fojo and Bates, 2002; Ni *et al.*, 2010)

Daunorubicin byl v roce 1979 schválen FDA k léčbě akutní myeloidní leukémie a akutní lymfocytární leukémie. V těchto indikacích se používá i dnes. (K.-W. Kim *et al.*, 2016) Je také součástí seznamu esenciálních léčiv vydávaného WHO². (WHO, 2017)



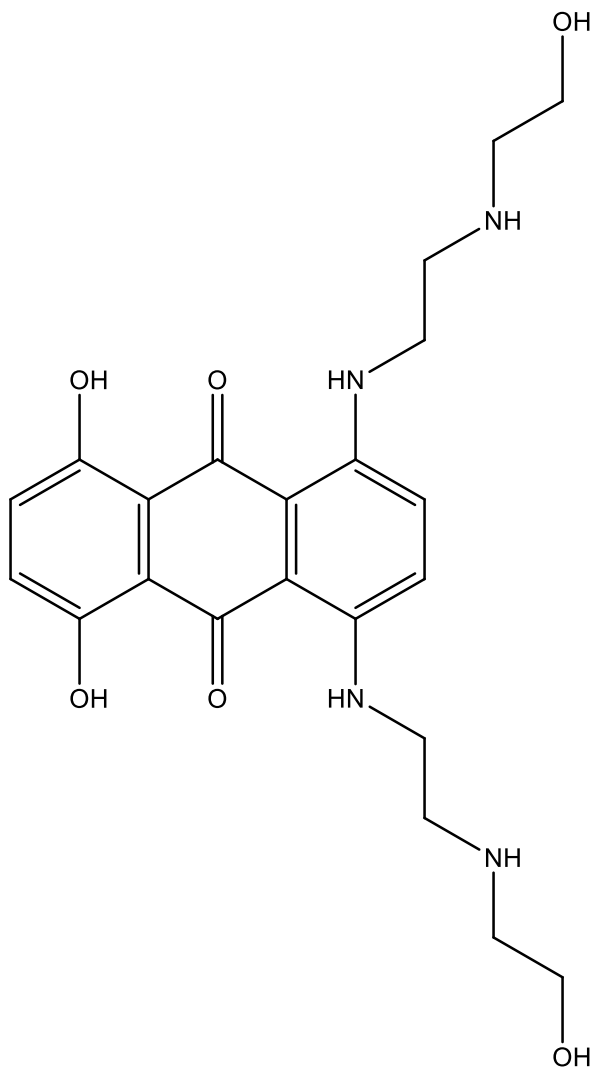
Obr. 3: **Struktura daunorubicinu.**

² Seznam esenciálních léčiv (WHO Model List of Essential Medicines, zkratka EML) je vydávaný WHO pravidelně každé dva roky od roku 1977. Obsahuje základní účinná, bezpečná a cenově dostupná léčiva, která mají sloužit pro potřeby základního zdravotního systému. Od roku 2007 vydává WHO i seznam esenciálních léčiv pro děti do 12 let (WHO Model List of Essential Medicines for Children, zkratka EMLc). Jednotlivé země si často dle těchto seznamů vytvářejí své vlastní národní seznamy.

3.2.2 Mitoxantron

Mitoxantron, neboli 1,4-dihydroxy-5,8-bis[2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino]anthracen-9,10-dion je látka modré barvy, která se řadí mezi antrachinonová cytostatika (obr. 4). Svou strukturou se podobá antracyklinovým antibiotikům (oboje jsou analoga anthracen-9,10-dionu), a tak i jeho mechanismus účinku je jim podobný. Stejně jako antracyklinová antibiotika je tedy i mitoxantron inhibitorem topoizomerázy II, čímž způsobuje inhibici transkripce a replikace DNA. Mitoxantron patří mezi substráty ABCB1 a ABCG2. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017)

Na začátku 70. let byla na základě dobrých antineoplastických výsledků doxorubicinu a daunorubicinu připravena další analoga anthracen-9,10-dionu. Mezi nimi byl v 80. letech syntetizován i mitoxantron. Ten byl v roce 1987 schválen FDA k léčbě akutní myeloidní leukémie. O devět let později, tedy v roce 1996, byla tato indikace rozšířena o symptomatickou rakovinu prostaty, která neodpovídá na hormonální terapii. V roce 2000 byl mitoxantron schválen FDA k léčbě některých forem roztroušené sklerózy. Zjistilo se totiž, že dokáže inhibovat imunitní systém. Potlačuje růst a dělení makrofágů, T a B buněk a snižuje produkci prozánětlivých cytokinů. (Krapcho *et al.*, 1995; Fox, 2004)



Obr. 4: **Struktura mitoxantronu.**

3.3 MAP kinázové signalizační kaskády

MAPK signalizační kaskáda je jednou ze signálních drah v buňce podílející se na buněčné proliferaci a buněčné smrti. (Roovers and Assoian, 2000) Skládá se z membránového receptoru a intracelulárních signalizačních proteinů, takzvaných kináz. Ty přenášejí fosfátovou skupinu z vysokoenergetické molekuly (např. z ATP) na jinou molekulu, kterou nazýváme substrát. Tento přenos se nazývá fosforylace. Přenos fosfátové skupiny na proteinový substrát ovlivní jeho konformaci, a tudíž i jeho funkci. Ta je u některých proteinů fosforylací aktivována

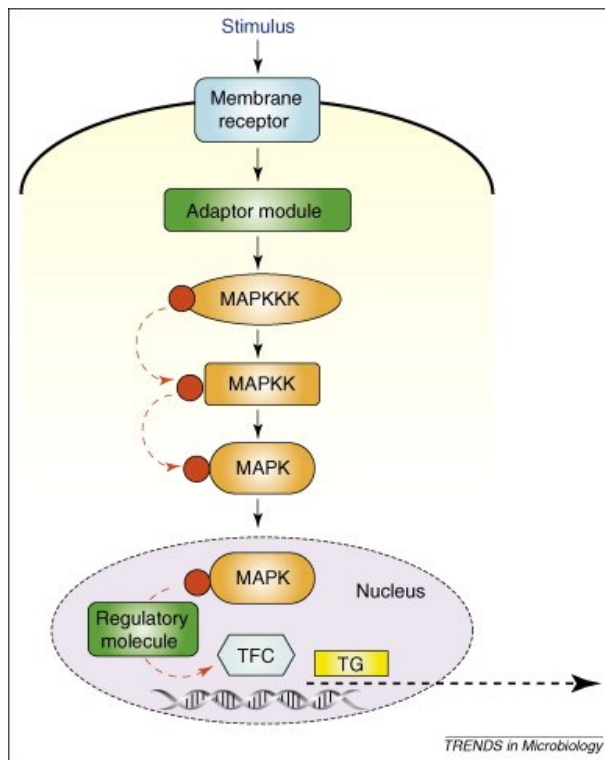
a u některých naopak deaktivována. Hovoříme o pozitivním a negativním ovlivnění. (Alberts *et al.*, 2005)

Opačnou funkci, tedy odstranění fosfátové skupiny z molekuly, mají na starosti enzymy, které se nazývají fosfatázy. Proces, při kterém je tato skupina odstraněna, se nazývá defosforylace. Podobně jako u fosforylace se tímto posmění prostorové uspořádní molekuly proteinu (v tomto případě toho, ze kterého byla fosfátová skupina odebrána), a tím i jeho funkce. (Alberts *et al.*, 2005)

Mezi nejvýznamnější kinázy patří proteinkinázy. Ty přenášejí fosfátovou skupinu na proteiny, kde se váže na hydroxylovou skupinu aminokyselin v řetězci proteinu za vzniku esterové vazby. Proteinkinázy rozdělujeme na dvě skupiny podle aminokyselin, na které se na substrátu váže fosfátová skupina. Máme tak skupinu tyrosinkináz, kde se fosfát váže na tyrosinový řetězec proteinu, a skupinu serin/threonin kináz, kde se fosfát připojuje na serinový nebo threoninový zbytek. Serin/threonin kinázy jsou početnější skupinou než tyrosinkinázy. Mezi serin/threonin kinázy se řadí i MAP kinázy. (Shchemelinin, Šefc and Nečas, 2006)

V 80. letech 20. století objevené MAP kinázy, neboli mitogenem³ aktivované protein kinázy (z anglického mitogen activated protein kinase), jsou důležitou součástí buněčných signálních drah (tzv. MAPK kaskády), které ovlivňují buněčné dělení, růst, diferenciaci a buněčnou apoptózu. Někdy se MAPK označují i jako ERK, což znamená extracelulárním signálem regulovaná kináza (z anglického extracellular signal-regulated kinase). Pojmem ERK se také označují některé konkrétní kinázy z MAPK/ERK kaskády. Oba názvy kináz (MAPK i ERK) napovídají, že na počátku aktivace těchto kináz stojí extracelulární posel, který se váže na transmembránový receptor. Ten svou činností aktivuje řetězec alespoň tří navzájem na sebe navazujících a aktivujících MAP kináz. V důsledku tato cesta vede k regulaci genové exprese a ovlivnění buněčného cyklu (obr. 5). (Román *et al.*, 2007)

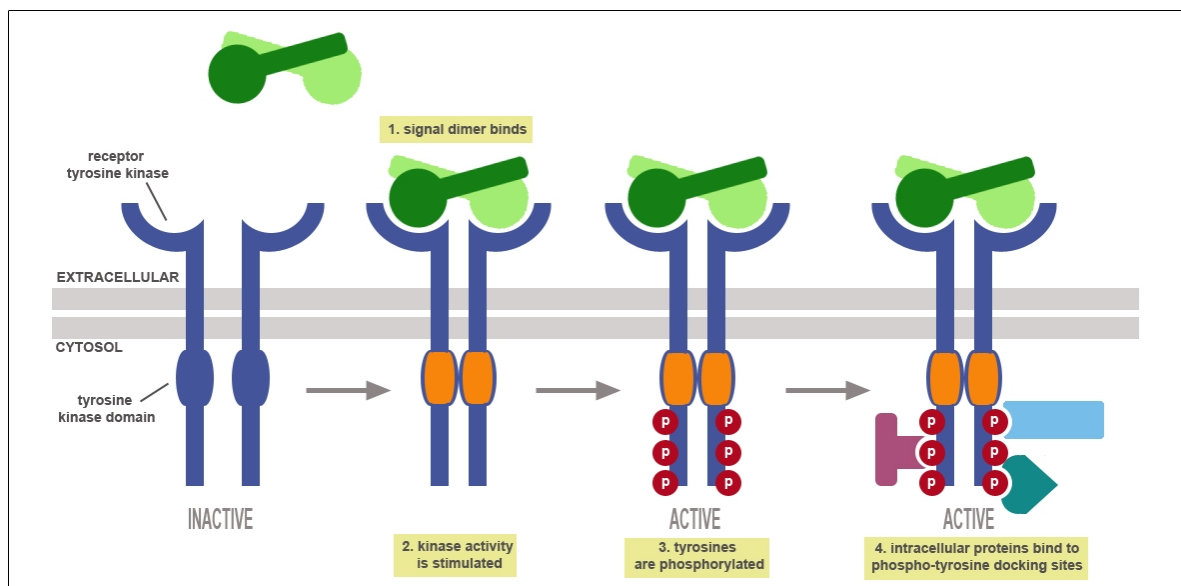
³ látka navozující mitózu, např. růstové faktory



Obr. 5: **Obecné schéma MAPK kaskády.** Převzato z (Román *et al.*, 2007).

3.3.1 MAPK/ERK signalizační kaskáda

V lidských buňkách je několik MAPK signalizačních drah. Nejznámější, a také snad nejvíce prozkoumanou, je MAPK/ERK kaskáda, někdy také nazývaná jako ERK1/ERK2 kaskáda nebo jako „klasická kinázová cesta“. (Lemmon and Schlessinger, 2010) Ta začíná na povrchu buňky, kde se nachází transmembránové tyrosinkinázové receptory. Ten se skládá z extracelulární části vázající ligand, transmembránové šroubovice, cytoplazmatické části obsahující tyrosinkinázu a intracelulárního zbytku proteinu. Když se na extracelulární část naváže ligand, což je nejčastěji některý z růstových faktorů, receptor se aktivuje (obr. 6). A to nejčastěji dimerizací molekul receptoru, někdy pouze i změnou konformace oligomeru. Tato aktivace vede ke zvýšení katalytické aktivity receptoru a autofosforylaci jeho tyrosinových zbytků na jeho intracelulární části řetězce. (Lemmon and Schlessinger, 2010)

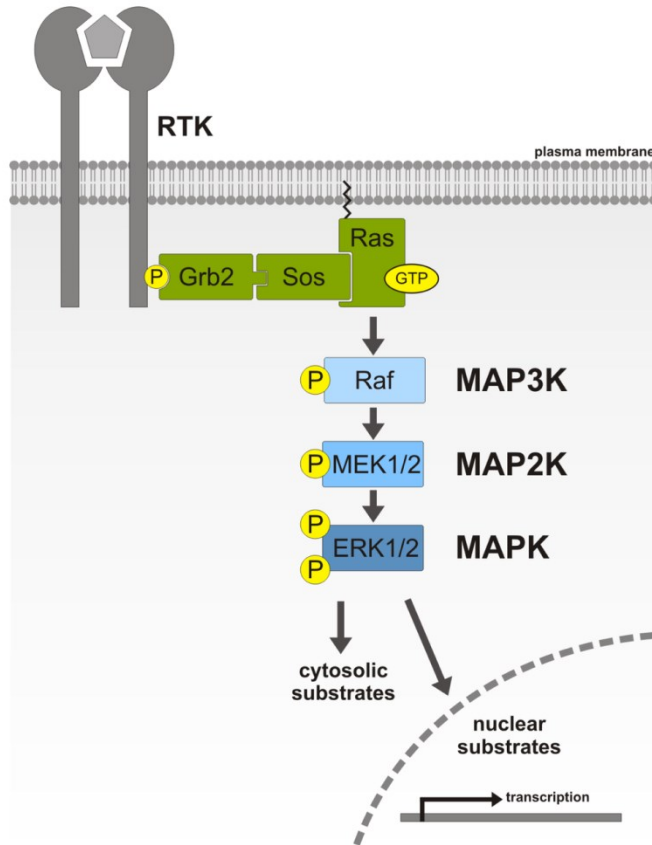


fastbleep))

Obr. 6: **Aktivace tyrosinkinázového receptoru.** Převzato z <http://membranereceptors.com/transduction-process/enzyme-linked-receptors/> (ke dni 6. 1. 2018)

Tato fosforylace vede dále k připojení dalších proteinů na vzniklé fosfotyrosinové zbytky a vznikne tak multireceptorový komplex, který je enzymaticky aktivní. Prvním navázaným proteinem je Grb2, jehož SH2 proteinová doména interaguje s fosfotyrosinem. Na vzniklý komplex se připojí Sos faktor. Svou enzymatickou aktivitou poté interaguje s Ras proteinem, který má ve své molekule navázaný zbytek molekuly GDP. Sos faktor patří mezi GEF (Guanine nukleotide exchange factors), což znamená, že je schopný stimulovat záměnu guaninových nukleotidů. Zde konkrétně způsobí výměnu zbytku GDP na Ras proteinu za molekulu GTP. Tím se Ras protein stane aktivním. Aktivovaný Ras protein se váže na další signální molekulu, a to BRAF protein (známý též jako B-Raf nebo Raf-1 protein). Přímou s ním interaguje a mění jeho konformaci. Aktivuje tak BRAF protein, který má kinázovou aktivitu a předává signál dál. Fosforyluje MAP kinázy s označením MEK1 a MEK2. Z nich se signál přenesou opět na MAP kinázy, konkrétně ERK1 a ERK2. Substrátem těchto dvou kináz jsou pak různé transkripční faktory, které se účastní transkripce DNA při

buněčném růstu, dělení, diferenciaci a plánované buněčné smrti (obr. 7). (Pearson *et al.*, 2014)



Obr. 7: **MAP/ERK signální kaskáda.** Převzato z (Meister *et al.*, 2013)

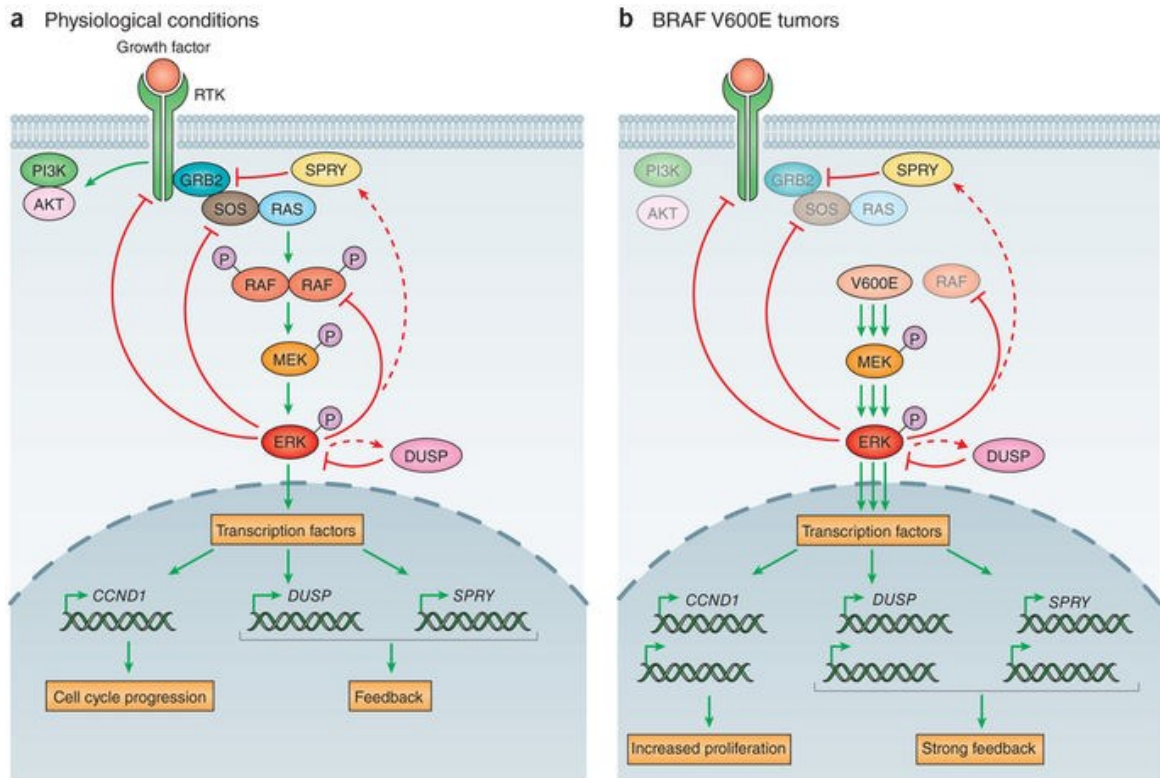
3.3.2 Mutace BRAF proteinu

Pokud dojde k poruše funkce některého z členů této signální dráhy, nepříznivě to ovlivní celý buněčný cyklus. Pokud některý protein v buňce chybí nebo je nefunkční, znamená to pro buňku například zpomalení růstu, případně apoptózu. Pokud je však proteinu více nebo je nadměrně aktivní, což bývá způsobeno změnou jeho konformace, hrozí zde rychlejší růst buňky a její nadměrné dělení. Tento problém pozorujeme u některých nádorových buněk. Dochází zde k mutacím DNA na úrovni genu pro daný signální protein. Tyto pak při proteosynté způsobí zařazení jiné aminokyseliny (nebo její vynechání) do

řetězce vznikajícího proteinu. Následné konformační změny v enzymu mohou, v porovnání s fyziologickou strukturou, zvýšit jeho aktivitu. To vede k většímu spouštění dalších členů signální kaskády. Mutace DNA však může nastat již před samotným genem pro signální protein, a to v části, kam se vážou transkripční faktory. To může vyústit v nadměrnou tvorbu tohoto proteinu, a následně i větší aktivaci signální dráhy. (Sever and Brugge, 2015)

Výše zmíněná možnost, tedy že mutace genu pro kinázu ovlivňuje její aktivitu, byla prokázána u BRAF proteinu. Výzkumy ukázaly, že mutace BRAF proteinu je přítomná u různých druhů nádorů. Nejčastěji u melanomu, dále u kolorektálního karcinomu nebo karcinomu plic. V případě melanomu se mutace BRAF proteinu vyskytuje kolem 50 % případů. Z toho se přibližně 80-90 % mutací nachází na kodonu 600, který je v kinázové části řetězce. Na tomto kodonu je popsáno několik mutací, které ale všechny zvyšují kinázovou aktivitu BRAF proteinu. A to tak, že jeho funkce není závislá na aktivaci předchozím poslem MAP/ERK kaskády, a to RAS proteinem (obr. 8). Nejvíce zastoupenými mutacemi jsou mutace s označením V600E a V600K⁴. Mutace V600E spočívá v substituci aminokyseliny valinu (V) na kodonu 600 glutamovou kyselinou (K). Při mutaci V600K je valin substituován za lysin (K). Kvůli klinické významnosti těchto mutací v onkologii se BRAF protein stal jedním z cílů protinádorové léčby. (Davies *et al.*, 2002; Rubinstein *et al.*, 2010; Ascierto *et al.*, 2012; Lovly *et al.*, 2012)

⁴ V některých zdrojích označované také jako V599E a V599K.



Obr. 8: **Patologické změny v MAP/ERK signalizační kaskádě při mutaci BRAF V600E v porovnání s fyziologicky fungující dráhou.** Převzato z (Lito, Rosen and Solit, 2013)

3.4 Inhibitory MAP/ERK signalizační kaskády

3.4.1 Kobimetinib

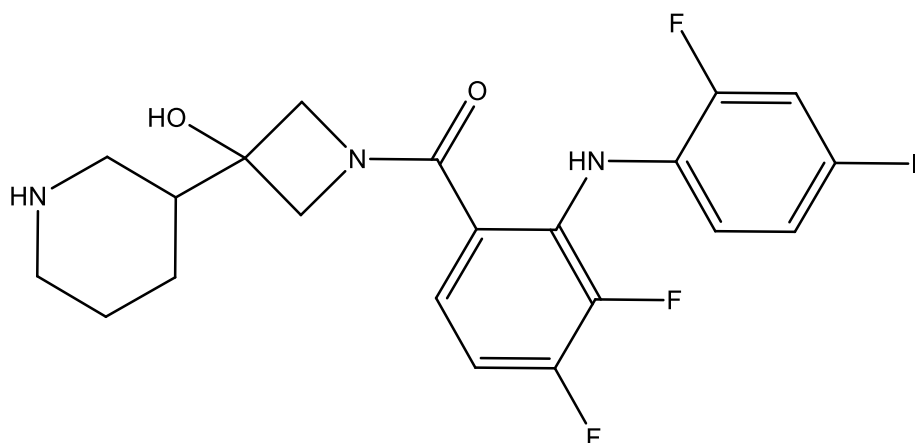
Kobimetinib, názvoslovně dle IUPAC [3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-iodoanilino)fenyl]-[3-hydroxy-3-[(2S)-piperidin-2-yl]azetidín-1-yl]methanon, je látka řadící se mezi inhibitory BRAF proteinu (obr. 9). Využívá se jeho schopnosti reverzibilně se vázat, a tak inhibovat MEK1 kinázu, která je po BRAF proteinu dalším signálním poslem v MAP/ERK signalizační kaskádě. Nepřímo tak inhibuje BRAF kinázu zabráněním předání jejího signálu dále do kaskády. Kobimetinib je prokázáným substrátem ABCB1. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017)

Kobimetinib je vcelku novou látkou. Výzkumy započaly na počátku 21. století, kdy v roce 2007 podepsaly firmy Exelixis a Genentech dohodu o spoluvývoji nové antineoplastické látky, kobimetinibu. Kobimetinib vstoupil v roce 2009 do 1. fáze klinických studií v léčbě melanomu. Dnes se v kombinační terapii s vemurafenibem používá k léčbě melanomu neresekovatelného, metastazujícího melanomu s mutací V600E genu pro BRAF protein. Tato kombinace byla v roce 2015 schválena ve Švýcarsku a později ve stejném roce ji schválila i FDA. (Garnock-Jones, 2015)

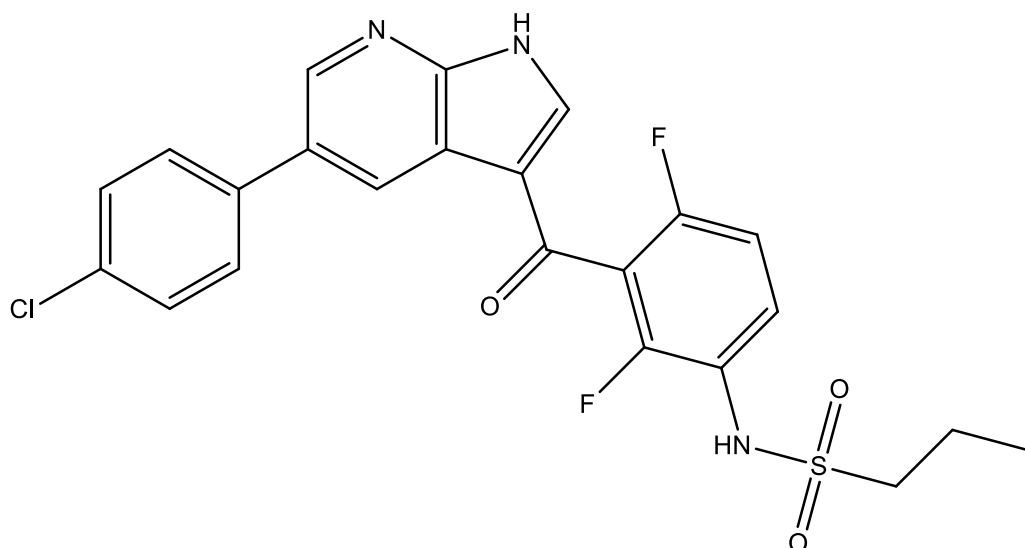
Vemurafenib, neboli N-[3-[5-(4-chlorofenyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-carbonyl]-2,4-difluorofenyl]propan-1-sulfonamid, patří do skupiny přímých inhibitorů BRAF proteinu (obr. 10). S ATP kompetuje o vazebné místo na molekule BRAF kinázy a brání tak její fosforylaci a defosforylaci. To má za následek zastavení přenosu signálu v MAP/ERK kaskádě. Vemurafenib byl v roce 2011 schválen FDA k léčbě metastazujícího melanomu s mutací BRAF V600E. Jednalo se o první BRAF inhibitor schválený FDA. V roce 2017 byla indikace rozšířena o léčbu dospělých pacientů s Erdheim-Chesterovou chorobou⁵ s mutací BRAF V600E. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017) Vemurafenib je substrátem ABCB1 i ABCG2. (Mittapalli *et al.*, 2012)

Kobimetinib není schválen v monoterapii, ale, jak bylo zmíněno výše, je schválen k použití v kombinaci s vemurafenibem. Studie ukázaly, že při monoterapii může vznikat na léčbu BRAF inhibitory rezistence. Důvodem je reaktivace MAP/ERK kaskády. Zjistilo se, že léčba kombinací inhibitoru BRAF kinázy a inhibitoru MEK kinázy je v tomto případě účinnější než monoterapie a předchází vzniku rezistence. (Tran *et al.*, 2016)

⁵ Onemocnění charakterizované nadměrnou proliferací histiocytů (jeden z druhů makrofágů) pohlcujících lipidové kapénky. Histiocyty se pak ukládají do různých tkání, kde působí různé zánětlivé a sklerotické změny. Nejčastěji postihuje CNS, dlouhé kosti, cévy, plíce a kůži.



Obr. 9: **Struktura kobimetinibu.**



Obr. 10: **Struktura vemurafenibu.**

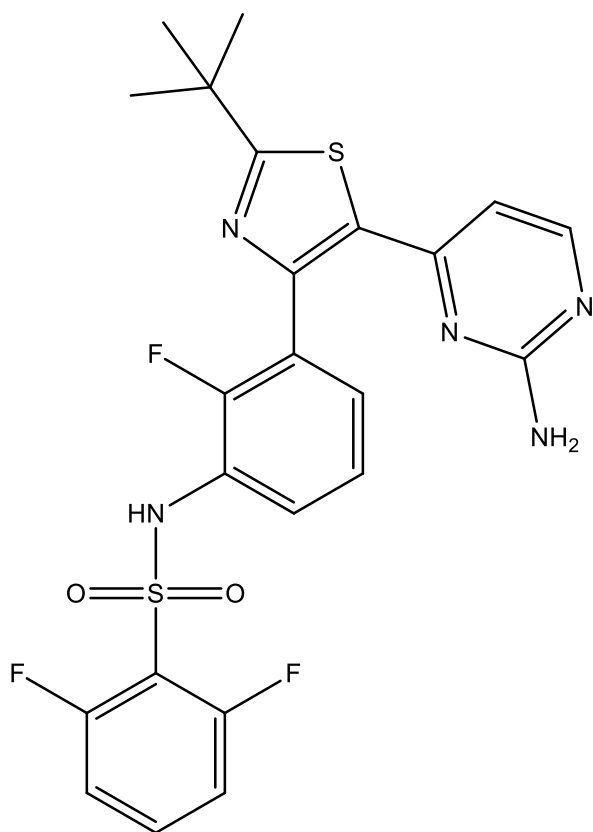
3.4.2 Dabrafenib

Dabrafenib je látka se strukturním názvem N-[3-[5-(2-aminopyrimidin-4-yl)-2-terc-butyl-1,3-thiazol-4-yl]-2-fluorofenyl]-2,6-difluorobenzensulfonamid (obr. 11). Na rozdíl od kobimetinibu se jedná o přímý inhibitor BRAF kinázy. Inhibuje ji reverzibilně a o vazebné místo soupeří s molekulou ATP, podobně jako vemurafenib. Inhibicí BRAF kinázy zabraňuje dalšímu přenosu signálu

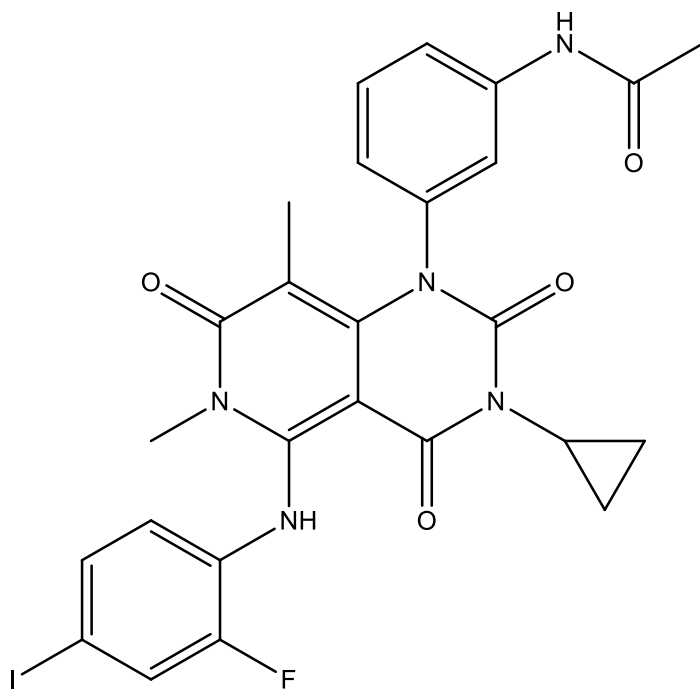
v MAPK/ERK kaskádě. Dabrafenib je substrátem ABCB1 i ABCG2 transportérů. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017)

Dabrafenib je také novou látkou. Byl schválen FDA v roce 2013 jako druhý inhibitor BRAF v historii po vemurafenibu. Je používán podobně jako vemurafenib k léčbě metastatického melanomu s mutací BRAF V600E. (Tran *et al.*, 2016) V roce 2014 schválila FDA léčbu kobimetinibem v kombinaci s trametinibem. Důvod je stejný jako v případě kombinační léčby kobimetinibem a vemurafenibem, a to větší účinnost léčby a předcházení vzniku rezistence na monoterapii. (Menzies and Long, 2014)

N-[3-[3-cyklopropyl-5-(2-fluoro-4-iodoanilino)-6,8-dimethyl-2,4,7-trioxopyrido[4,3-d]pyrimidin-1-yl]fenyl]acetamid, neboli trametinib, patří stejně jako vemurafenib mezi MEK inhibitory, které nekompetují o vazebné místo s ATP (obr. 12). Brání tak dalšímu přenosu signálu v MAP/ERK kaskádě. V roce 2013 byl schválen FDA k terapii metastatického melanomu s mutací BRAF V600. O rok později (v roce 2014) byl, jak bylo řečeno výše, schválen v kombinační léčbě s dabrafenibem. (Menzies and Long, 2014; S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017)



Obr. 11: **Struktura dabrafenibu.**



Obr. 12: **Struktura trametinibu.**

4 Cíle práce

Cílem této práce bylo hodnotit schopnost interakce kobimetinibu a dabrafenibu s membránovými lékovými transportéry ABCB1 a ABCG2. Konkrétními dílčími cíli bylo hodnocení:

1. Zda jsou námi vybrané CDKi kobimetinib a dabrafenib schopné inhibovat ABC efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2.
2. Zjistit, jestli kobimetinib a dabrafenib mohou zvrátit buněčnou rezistenci na substrát ABC transportérů (substrát ABCB1 – daunorubicin, substrát ABCG2 – mitoxantron) inhibicí těchto transportérů.
3. Zda ABCB1 a ABCG2 mohou hrát roli při vzniku buněčné rezistence na kobimetinib a dabrafenib.

5 Experimentální část

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie

Buněčné medium DMEM high glucose + 10 % fetal bovine serum jsme zakoupili od firmy Sigma Aldrich, sídlící v St. Louis, MO, USA. Od této firmy jsme zakoupili i další chemikálie, které jsme používali, a to XTT, DMSO a PMS. Dále jsme od firmy Sigma Aldrich získali cytostatika daunorubicin a mitoxantron. Inhibitor ABCB1 LY335979 jsme zakoupili od Toronto research chemicals, North York, ON, Canada, inhibitor ABCG2 KO143 od Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA. Buněčné medium Opti-MEM dodala společnost Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA. Zkoumané inhibitory BRAF, kobimetinib a dabrafenib, byly zakoupeny od německé firmy Selleckchem, Munich. PBS jsme si v naší laboratoři připravovali sami.

5.1.2 Buněčné kultury

K pokusům jsme použili buněčné linie MDCKII. Konkrétně MDCKII-ABCB1 exprimující ABCB1, MDCKII-ABCG2 exprimující ABCG2 a MDCKII-par, které neexprimují žádný ABC transportér. Tyto linie jsme získali od Dr. Alfreda Schinkela z nizozemského Cancer Institute v Amsterdamu.

Všechny buněčné linie byly kultivovány v růstovém mediu DMEM s 10 % PBS.

5.1.3 Přístrojové vybavení

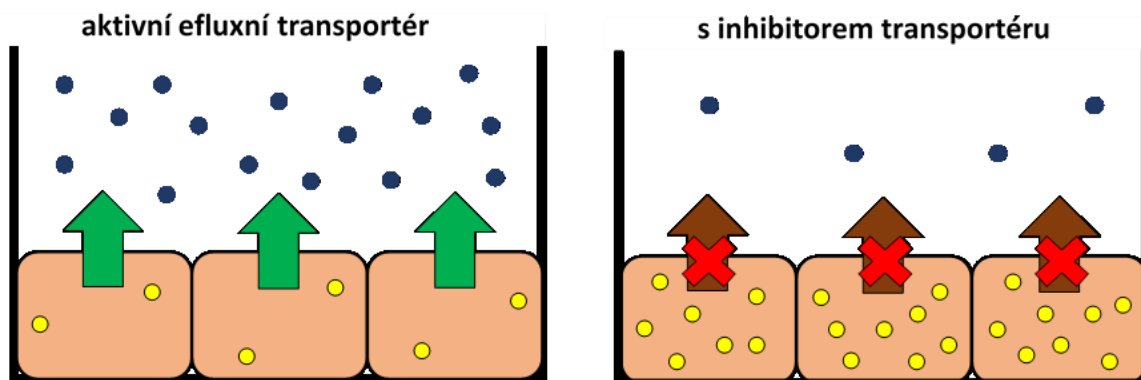
- Tecan microplate reader, Infinite M200 (Salzburg, Rakousko)

- Inkubátor SANYO MCO-18AC(UV) (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, France)

5.2 Metodika

5.2.1 Akumulačně efluxní studie

Akumulačně efluxní studie slouží ke zjištění míry inhibice efluxních transportérů zkoumanou látkou. Použitá fluorescenční látka Hoechst 33342 je fluorescenční bisbenzimidové barvivo vázající se na DNA, zvláště na místa bohatá na adenin a thymin. Hoechst 33342 patří mezi substráty ABCB1 a ABCG2. (Shapiro and Ling, 1997; Kim *et al.*, 2002) Navázané barvivo fluoreskuje při jiné vlnové délce (461 nm) než nenavázané (510 – 540 nm). Intenzita fluorescence při vlnové délce navázaného barviva je přímo úměrná jeho akumulaci uvnitř buňky (obr. 13).



Obr. 13: **Princip akumulace efluxní studie.** Vlevo je znázorněna jamka s buňkami, u kterých je aktivní efluxní transportér (zobrazen zelenou šipkou). Ten transportuje molekuly barviva Hoechst ven z buňky (modrá kolečka) a uvnitř buňky tak zůstává pouze malé množství barviva, které se váže na DNA (žlutá kolečka) a fluoreskuje při jiné vlnové délce než nenavázané. Pokud se transportéry zablokují (jamka vpravo), zůstává více barviva uvnitř buňky a více se ho tak váže na DNA. Fluorescence je pak intenzivnější.

Na mikrodestičky se nasadily buňky suspendované v DMEM. Počet buněk byl takový, aby konfluence po 24 hodinách kultivace byla 100 %. Tomu odpovídalo nasazení MDCKII-par a MDCKII-ABCB1 v počtu 50000 buněk na jamku, MDCKII-ABCG2 60000 buněk na jamku. Po kultivaci se z destiček odsálo opatrně medium tak, aby nebyla porušena vrstva buněk na dně destičky. Buňky se pak dvakrát opláchly 100 μ l teplého PBS. Vždy po přidání PBS k buňkám se tento opět opatrně odsál. Po opláchnutí se přidalo 90 μ l směsi inhibitorů ABC transportérů naředěných v Opti-MEM. Jako modelový stoprocentní kontrolní inhibitor pro ABCB1 transportéry byl použit 1 μ M LY335979, pro ABCG2 pak 1 μ M KO143. Jako negativní kontrola sloužil čistý Opti-MEM bez přidání inhibitorů, což v praxi znamenalo, že buňky byly preinkubovány v 90 μ l čistého Opti-MEM.

Samotné buňky v Opti-MEM vykazují vlastní nepatrnou fluorescenci. Aby tato nezkreslovala výsledek, byla přidána i kontrola pozadí (background), kdy k buňkám v této kontrole bylo přidáno 100 μ l čistého Opti-MEM bez následného přidání substrátu. V průběhu měření byla zaznamenána hodnota fluorescence tohoto pozadí a byla odečtena od hodnot naměřených ve zkoumaných jamkách.

Destičky jsme pak 15 minut inkubovali při 37 °C. Pak jsme do každé jamky (kromě backgroundové kontroly) přidali 10 μ l 8 μ M roztoku Hoechst 33342 v Opti-MEM. Ihned jsme začali měřit fluorescenci v intervalu 1 min po dobu 30 min. Excitační vlnová délka byla 350 nm a fluorescence barviva se měřila při 465 nm. Měření probíhalo na přístroji TECAN.

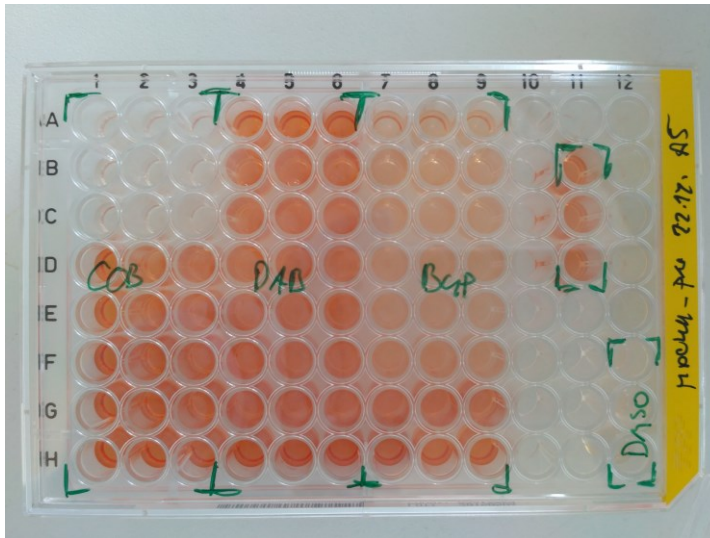
5.2.2 Proliferační studie

Proliferační studie provedené metodou XTT slouží ke stanovení viability buněk. Je založena na enzymatické přeměně bezbarvé tetrazoliové soli XTT na oranžový formazan. Tuto přeměnu zajišťuje enzym sukcinátetrazoliumreduktáza, která se nachází na mitochondriální membráně, ale pouze u živých buněk. Množství vzniklého formazanu je pak přímo úměrné počtu živých buněk (obr. 14).

Praktické provedení pak vypadalo následovně: Na mikrodestičky s 96 jamkami jsme nasadili buňky v suspenzi s růstovým médiem (DMEM). Na každou jamku připadlo 100 μ l této suspenze. Buňky byly nasazeny v takovém počtu, aby výsledná influence po první kultivaci byla přibližně 30 %. Tomu odpovídalo nasazení MDCKII-par 10000 buněk na jamku, MDCKII-ABCB1 v počtu 8000 buněk na jamku a MDCKII-ABCG2 10000 buněk na jamku. Destičky se pak 24 hodin kultivovaly při 37 °C pod 5 % CO₂. Poté jsme k buňkám přidali testované látky a pod jejich vlivem se buňky kultivovali dalších 72 hodin za podmínek uvedených výše. Na destičkách byly i kontrolní jamky, kde byly buňky kultivovány pod vlivem 40 % DMSO pro dosažení nulové viability a také v čistém DMEM pro stanovení 100% viability buněk. Po kultivaci se medium z jamek odsálo a k buňkám se přidalo 100 μ l připravené směsi XTT mixu. Ten se skládal z XTT, PMS (přidal se k aktivaci přeměny XTT na formazan) a Opti-MEM. Na 5 ml XTT připadlo 100 μ l PMS. Poměr XTT a PMS ku Opti-MEM byl 1:5. Po jedné hodině další kultivace se vzniklý oranžově zabarvený formazan hodnotil spektrofotometricky na přístroji TECAN při 470 nm.

Tato metoda byla použita při studiích překonání mnohočetné lékové rezistence (6.2) a při studiu vzniku rezistence přes ABC transportéry (6.3). V případě studií překonání MDR se sledovala cytotoxicita (a výsledná IC₅₀) substrátu daného transportéru (daunorubicin pro ABCB1, mitoxantron pro ABCG2). Nejprve se kultivovaly linie MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par s těmito substráty v různých koncentracích. Poté se provedly experimenty na exprimujících liniích s proměnlivou koncentrací substrátu, ale se stabilní koncentrací testovaného inhibitoru.

V případě studií vzniku rezistence se sledovala cytotoxicita našich zkoumaných inhibitorů. Kultivace probíhaly s proměnlivou koncentrací inhibitorů na liniích MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-par.



Obr. 14: **Destička s buňkami po provedení metody XTT.** Na destičce jsou vidět různé odstíny vzniklého oranžového formazanu. Čím tmavší jamka, tím více formazanu vzniklo, tj. tím více se v jamce nachází živých buněk. Koncentrace zkoumané látky klesala po řádcích dolů. Každé tři sloupce destičky kultivovány pod vlivem jiné látky. Vpravo pak k vidění kontrola: ve sloupci 11 je pozitivní kontrola (buňky inkubované jen se živným médiem), ve sloupci 12 poté negativní kontrola (buňky vystavené 40% DMSO).

5.2.3 Statistická analýza dat

Naměřená data byla zpracována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism 7. (GraphPad Software, Inc., San Diego, California USA).

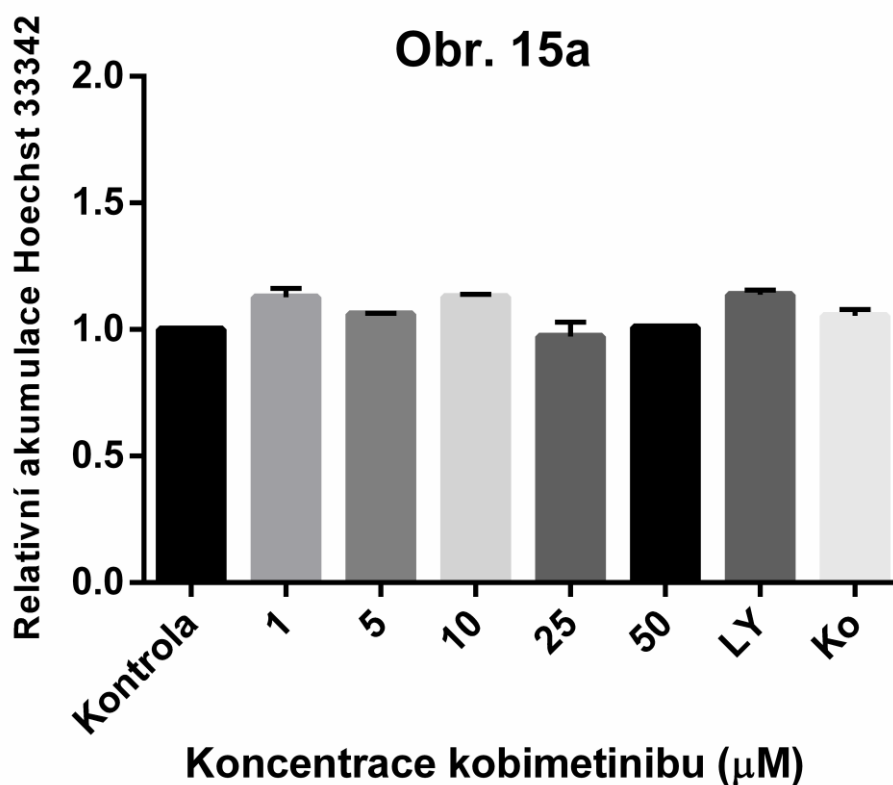
Statistická významnost výsledných dat byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem *P < 0,05, ***P < 0,001.

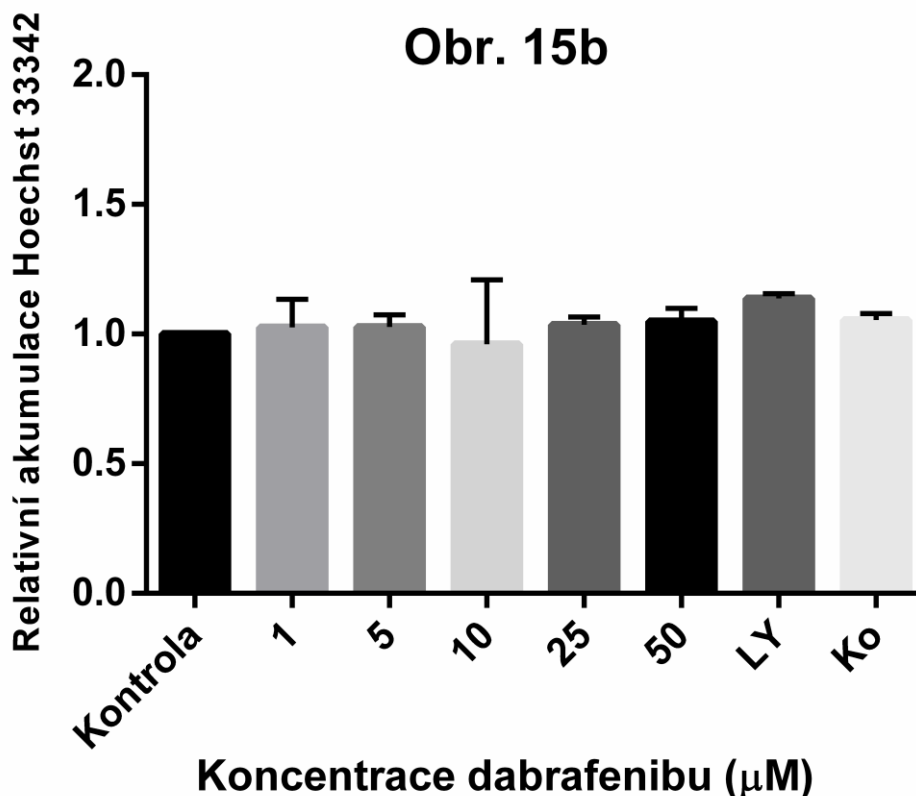
6 Výsledky

6.1 Inhibice ABC efluxních transportérů

Cílem bylo zjistit, jestli námi vybrané inhibitory CDK kobimetinib a dabrafenib jsou schopné inhibovat ABC efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2. K těmto experimentům byla použita metoda akumulární efluxní studie (viz 5.2.1).

Nejprve jsme naše inhibitory otestovali na buněčné linii MDCKII-par. To sloužilo k potvrzení, že u těchto linií nedochází ke změnám transportu použitého substrátu v přítomnosti našich testovaných látek vlivem endogenních transportérů (jiných než ABCB1 a ABCG2) a nedojde tak ke zkreslení výsledků dalších pokusů. Tento vliv endogenního transportu nebyl u parentních buněk pozorován (akumulace barviva byla maximální a totožná v případě kontroly, kde byly buňky bez vlivu inhibitoru, i v případě přidání testované látky k buňkám) jak při použití kobimetinibu (obr. 15a), tak dabrafenibu (obr. 15b).

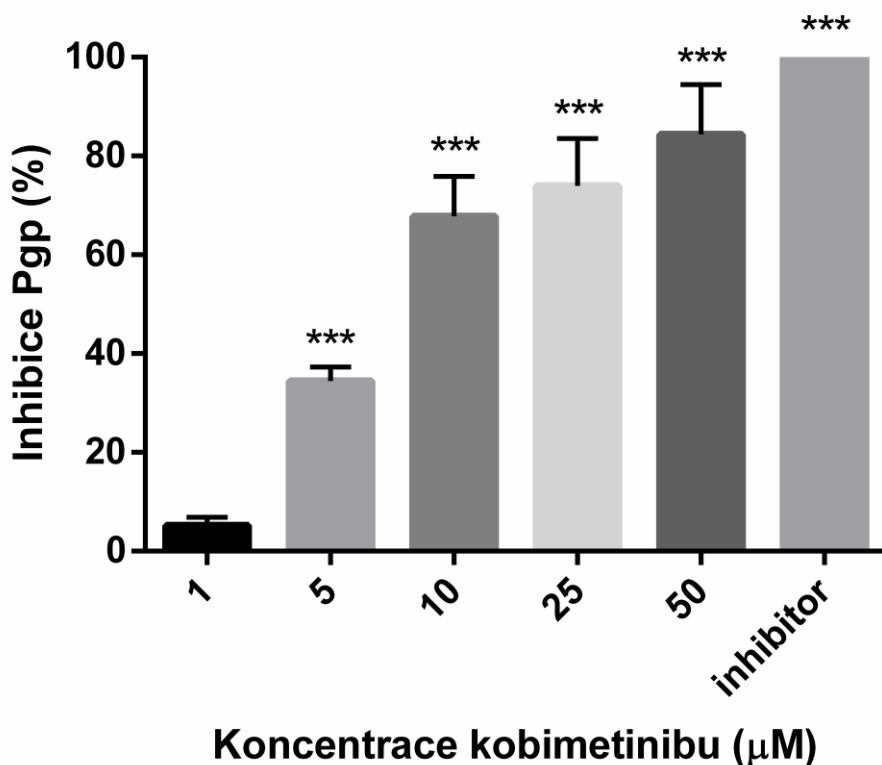




Obr. 15a, 15b: **Akumulace Hoechst 33342 u MDCKII-par buněčné linie.** Při použití kobimetinibu (obr. 15a) a dabrafenibu (obr. 15b). Jako pozitivní kontrola byl použit modelový inhibitor LY335979 a KO143. Negativní kontrola byla bez přidaného inhibitoru (k ní byly výsledky relativizovány, tato kontrola se rovná 100% akumulaci Hoechst 33342). Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Pak proběhly pokusy na buněčné linii MDCKII-ABCB1, která exprimuje transportér ABCB1. Z výsledků při použití kobimetinibu (obr. 16) jsme zjistili, že tento má schopnost inhibice ABCB1 transportérů, která se zvyšuje s jeho použitou koncentrací. Při koncentraci 50 μM je míra inhibice transportérů vyšší než 80 % (vztaženo k pozitivní 100% kontrole, což bylo použití modelových inhibitorů, v případě buněčných linií exprimujících ABCB1 se jednalo o

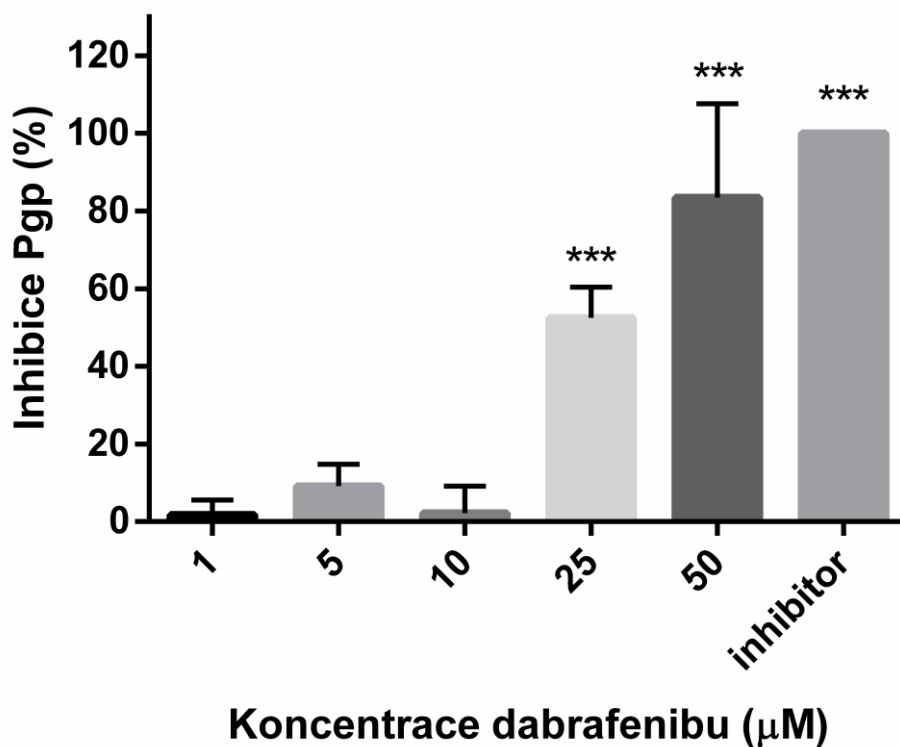
LY335979). Hodnota EC_{50} (koncentrace, která způsobila 50% inhibici transportérů) zde byla 7,84 μM .



Obr. 16: Inhibice ABCB1 transportérů kobimetinibem u MDCKII-ABCB1 buněčné linie. Jako pozitivní kontrola (100% inhibice) byl použit modelový inhibitor LY335979. Negativní kontrola byla bez přidaného inhibitoru. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

V případě dabrafenibu u MDCKII-ABCB1 buněčných linií (obr. 17) se ukázalo, že také on zde má inhibiční vlastnosti, i když v menší míře než kobimetinib. V nižších koncentracích se míra inhibice pohybovala pouze pod 20 % vzhledem ke kontrolnímu inhibitoru LY335979. Míra inhibice při koncentraci 25 μM stoupla, až se dostala přibližně na 80 % při naší nejvyšší koncentraci 50 μM . Zde je pak míra inhibice dabrafenibu na ABCB1 transportér u MDCKII-

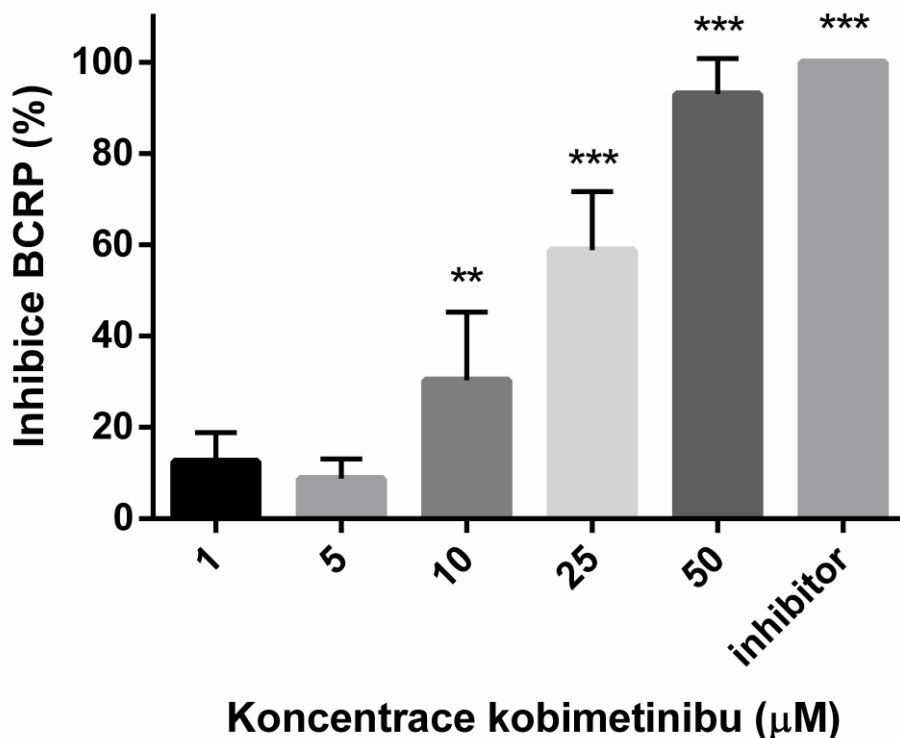
ABCB1 buněk srovnatelná s mírou inhibice kobimetinibem ve stejné koncentraci. Hodnota EC₅₀ byla 25,12 μM.



Obr. 17: **Inhibice ABCB1 transportérů dabrafenibem u MDCKII-ABCB1 buněčné linie.** Jako pozitivní kontrola (100% inhibice) byl použit modelový inhibitor LY335979. Negativní kontrola byla bez přidaného inhibitoru. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem *P < 0,05, ***P < 0,001.

Kobimetinib jsme otestovali i na MDCKII-ABCG2 buněčných liniích (obr. 18), jež exprimují ABCG2 transportér. Kobimetinib ukázal, že je schopen inhibovat i tento transportér. V nižších koncentracích je míra jeho inhibice nižší než při srovnání jeho inhibice ABCB1 transportéru u MDCKII-ABCB1 buněk. V koncentraci 50 μM je míra inhibice obou transportérů přibližně stejná (vzhledem k použitým kontrolním inhibitorům, kdy u MDCKII-ABCG2 buněk byl

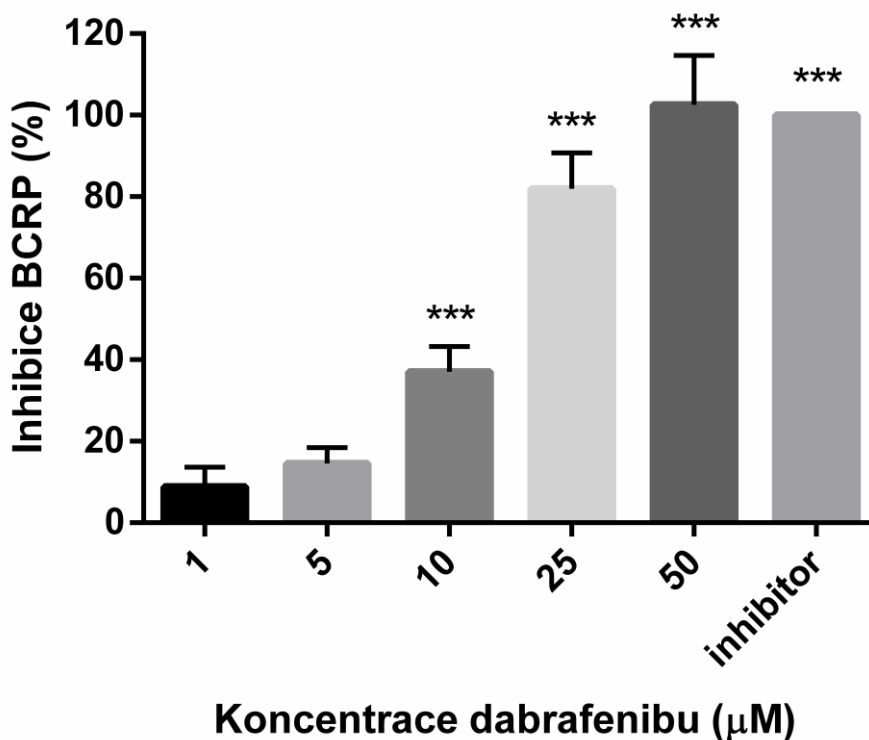
použit inhibitor KO143 a v případě MDCKII-ABCB1 inhibitor LY335979). EC_{50} byla 17,87 μ M.



Obr. 18: **Inhibice ABCG2 transportérů kobimetinibem u MDCKII-ABCG2 buněčné linie.** Jako pozitivní kontrola (100% inhibice) byl použit modelový inhibitor KO143. Negativní kontrola byla bez přidaného inhibitoru. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

I dabrafenib jsme otestovali na MDCKII-ABCG2 buněčných liniích (obr. 19). Míra inhibice ABCG2 transportérů je při srovnání s kobimetinibem v nízkých koncentracích podobná. Ve vyšších je schopnost dabrafenibu inhibovat ABCG2 transportéry u MDCKII-ABCG2 buněk až o 20 % vyšší. Při koncentraci dabrafenibu 50 μ M je míra inhibice srovnatelná s modelovým inhibitorem KO143. Pokud srovnáme vliv dabrafenibu na ABCB1 transportéry u MDCKII-ABCB1

buněk a na ABCG2 transportéry u MDCKII-ABCG2 buněk, tak má dabrafenib schopnost efektivněji inhibovat ABCG2 transportéry, přičemž hodnota EC_{50} byla 12,42 μ M.

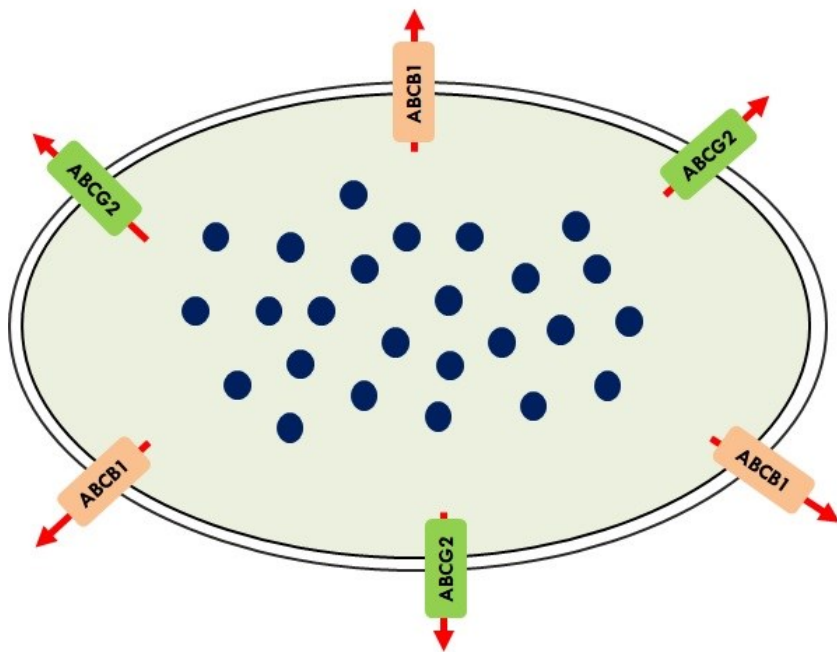


Obr. 19: **Inhibice ABCG2 transportérů dabrafenibem u MDCKII-ABCG2 buněčné linie.** Jako pozitivní kontrola (100% inhibice) byl použit modelový inhibitor Ko143. Negativní kontrola byla bez přidaného inhibitoru. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplikátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

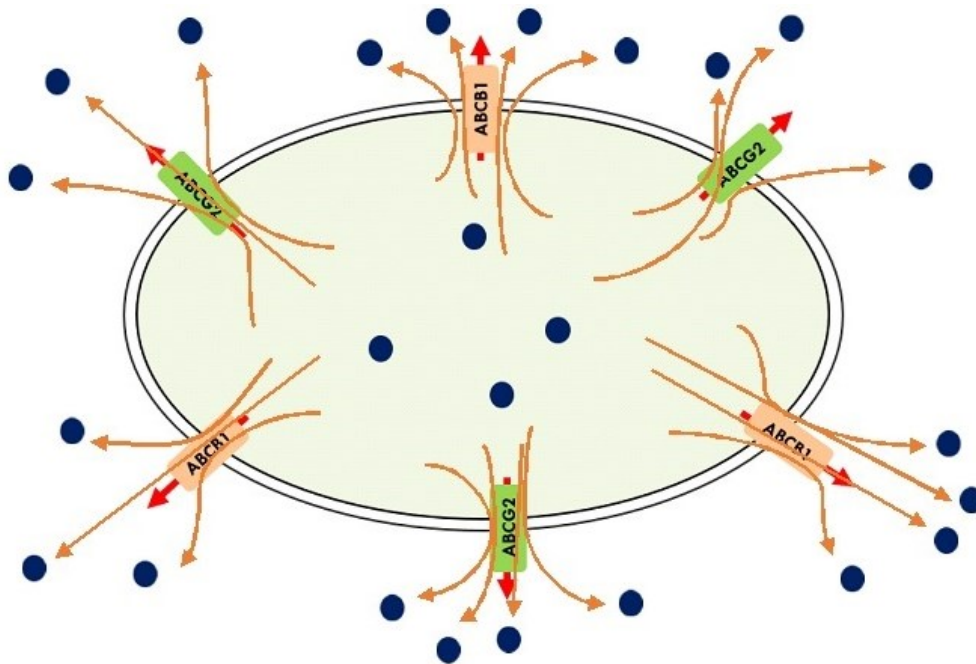
6.2 Překonání mnohočetné lékové rezistence

Zjistili jsme, že kobimetinib a dabrafenib jsou schopny inhibovat ABCB1 a ABCG2 efluxní transportéry u MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 buněk (viz 6.1). Naším dalším cílem bylo zjistit, jestli tyto látky, díky schopnosti inhibice výše

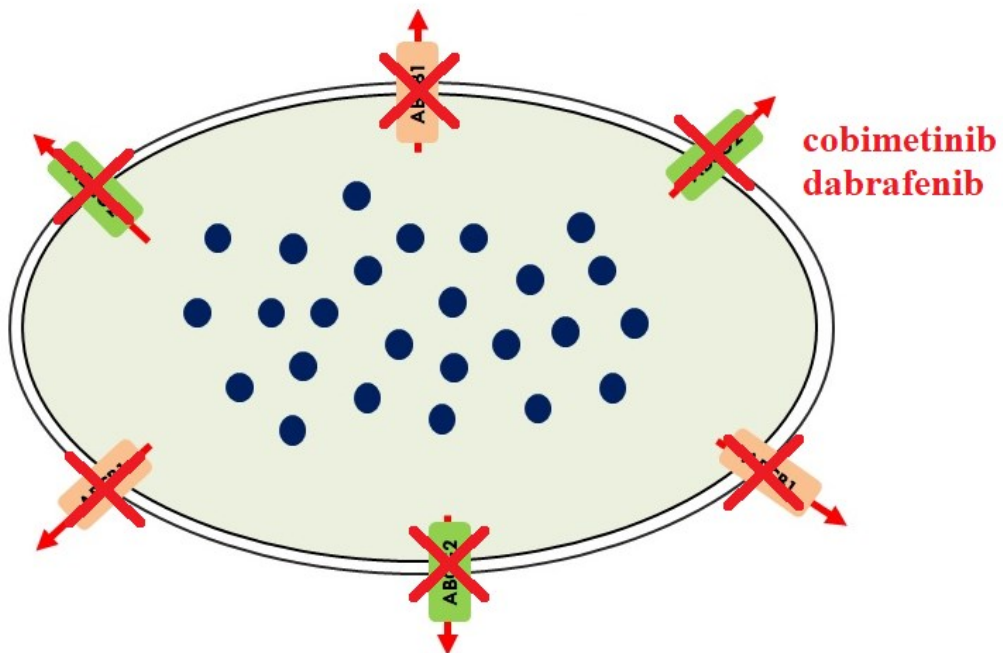
zmíněných transportérů, mohou zvrátit buněčnou rezistenci na substrát ABC transportérů (pro ABCB1 jsme použili jeho substrát daunorubicin a pro ABCG2 mitoxantron). Očekávaným principem zde bylo to, že uvedené CDKi (kobimetinib a mitoxantron) inhibují funkci efluxních transportérů. Díky tomu pak léčivo, které je substrátem těchto transportérů, zůstává uvnitř buňky, takže se zvýší účinek protinádorové léčby (obr. 20a, 20b, 20c). K pokusům byla použita metoda proliferační studie (viz 5.2.2). K buňkám jsme přidávali stabilní koncentraci CDKi, která je u každého výsledku uvedena, a rozdílné koncentrace substrátu.



Obr. 20a: **Buňka s exprimovanými transportéry.** Obrázek znázorňuje buňku exprimující na povrchu efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2. Modré puntíky zobrazují léčivo, které je substrátem efluxních transportérů, ale zatím zůstává uvnitř buňky.



Obr. 20b: **Aktivita efluxních transportérů.** Buňka díky aktivitě svých efluxních transportérů aktivně přenáší léčivo ven z buňky. Uvnitř buňky je tak jeho nízká koncentrace a jeho účinnost se snižuje. Efluxní transportéry tak vytváří MDR.



Obr. 20c: **Zvrat rezistence inhibicí funkce efluxních transportérů.** Po zablokování aktivity efluxních transportérů zůstává léčivo uvnitř buňky. Zvyšuje

se tak jeho účinek oproti situaci, kdy je aktivitou efluxních transportérů přenášeno ven z buňky.

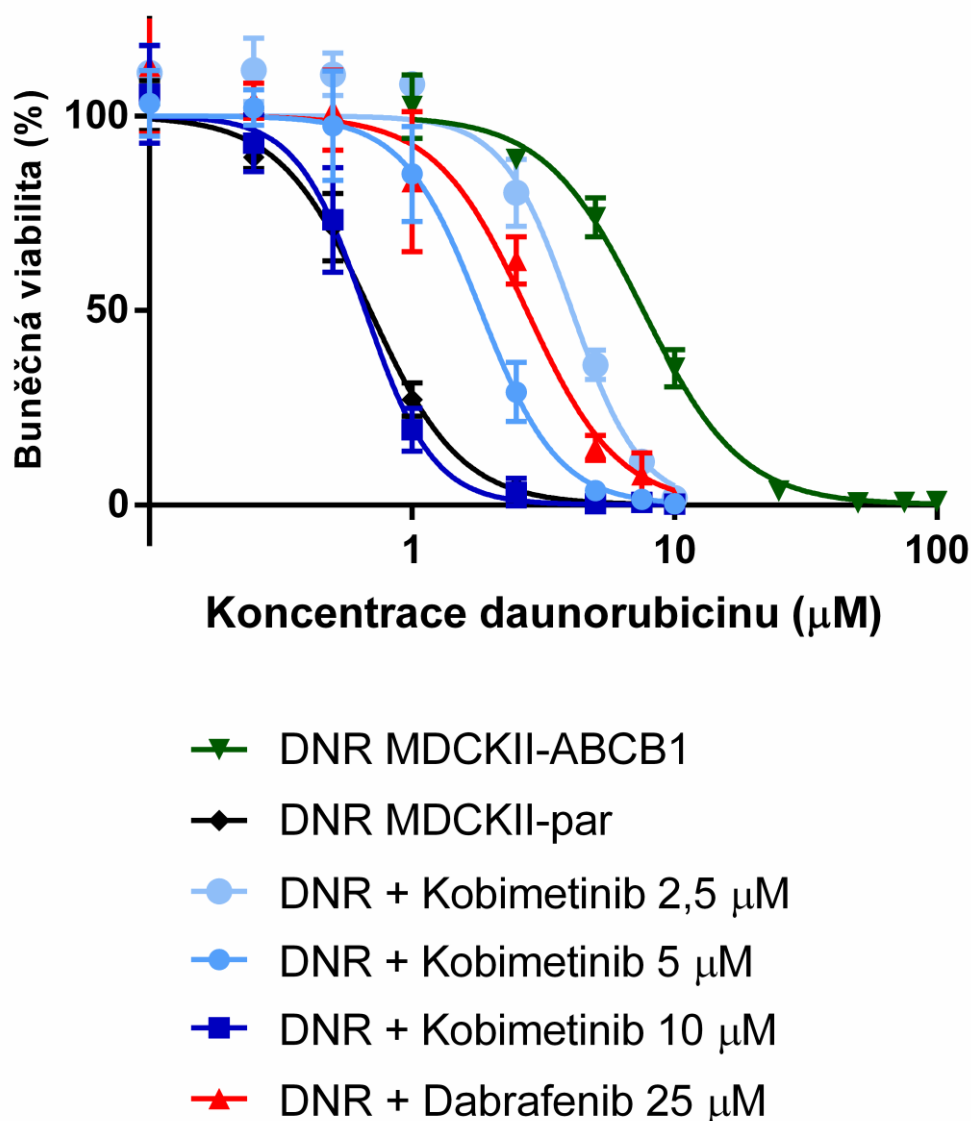
Nejprve jsme provedli experimenty s daunorubicinem na MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par buněčných liniích (obr. 21). Proliferační křivka vlivu samotného daunorubicinu na parentní linie nám ukazuje jeho cytotoxicitu na MDCKII buňky bez ovlivnění efluxním transportem. Naproti tomu křivka samotného daunorubicinu u MDCKII-ABCB1 buněk nám ukazuje, že jeho IC_{50} je zde v porovnání s parentní linií vyšší (tab. 3) a je zde možné pozorovat, že na tento stav má vliv funkce ABCB1 efluxního transportéru, jehož je daunorubicin substrátem. Naším cílem tedy bylo zainhibovat tento transportér tak, aby se hodnota IC_{50} daunorubicinu snížila (a jeho cytotoxicita se tak zvýšila). A to pokud možno až na úroveň parentní linie.

Z výsledků vidíme, že IC_{50} se nám povedlo snížit ve všech případech. Už koncentrace kobimetinibu 2,5 μ M snížila vliv ABCB1 transportéru na eflux jeho substrátu daunorubicinu. Přibližně v polovině cesty mezi MDCKII-ABCB1 a MDCKII-par buňkami jsou kombinace daunorubicinu s kobimetinibem 5 μ M a dabrafenibem 25 μ M. A poslední věc, kterou nám tento experiment ukázal, bylo, že při inhibici transportérů 10 μ M kobimetinibem je proliferační křivka daunorubicinu v podstatě totožná s tou v případě parentních linií. Odpovídá tomu i hodnota IC_{50} .

Tab. 3: Hodnoty IC₅₀ proliferačních křivek MDCKII-ABCB1 s inhibítozem ABCB1 a jeho substrátem (daunorubicin).

	IC ₅₀ (μM)
DNR MDCKII-ABCB1	7,606
DNR MDCKII-par	0,6925 ***
DNR + Kobimetinib 2,5 μM	4,068 ***
DNR + Kobimetinib 5 μM	1,829 ***
DNR + Kobimetinib 10 μM	0,6642 ***
DNR + Dabrafenib 25 μM	2,739 ***

Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem *P < 0,05, ***P < 0,001.



Obr. 21: **Proliferační křivky MDCKII-ABCB1 s inhibítorem ABCB1 a jeho substrátem (daunorubicin).** Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplikátech.

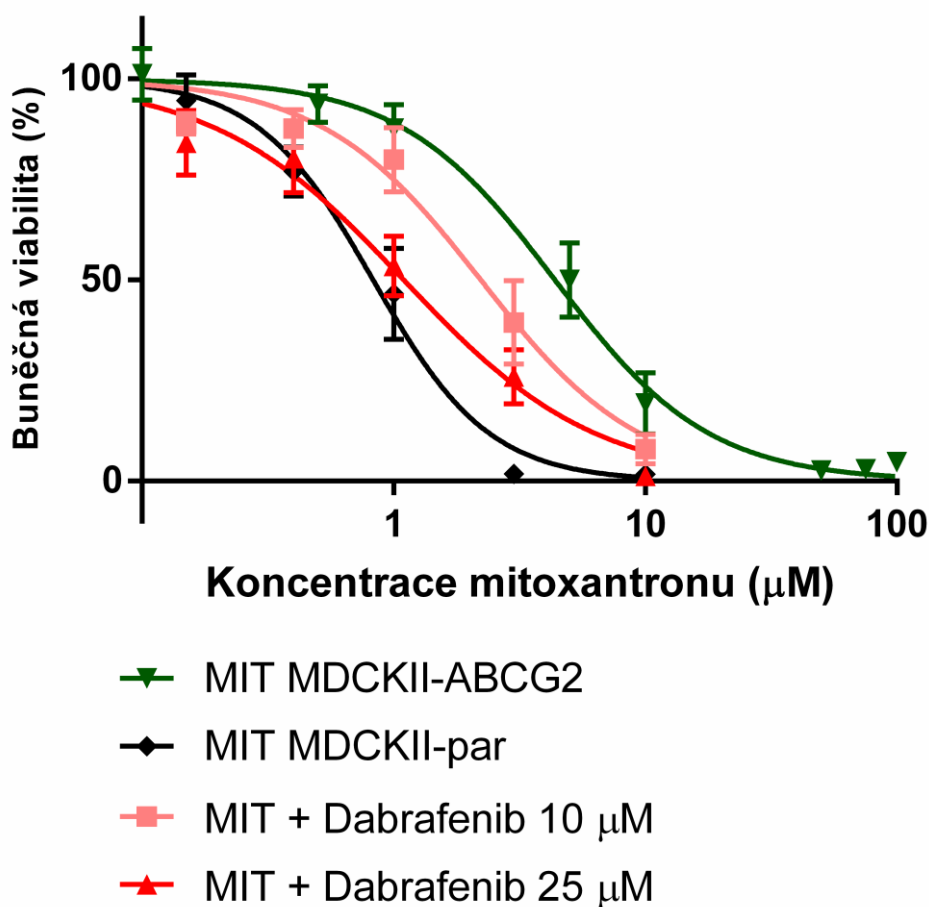
Podobně jsme postupovali i při použití mitoxantronu jako substrátu ABCG2 transportéru u MDCKII-ABCG2 buněk (obr. 22). Proliferační křivky při aplikaci samotného mitoxantronu na MDCKII-par a MDCKII-ABCG2 nám opět slouží jako srovnání. Vidíme zde, že IC_{50} u exprimující linie je vyšší než u parentní (tab. 4), a podobně jako při aplikaci daunorubicinu pozorujeme vliv ABCG2 transportéru na vznik MDR.

Pokusy inhibovat ABCG2 transportér proběhly s jeho inhibitorem dabrafenibem. A to konkrétně v koncentracích 10 μM a 25 μM . U obou je na proliferační křivce i na hodnotě IC_{50} vidět její snížení. Potvrzuje se zde tak naše hypotéza, že zablokujeme transportér a jeho substrát tak zůstane v buňce. Výrazněji tento efekt můžeme pozorovat u dabrafenibu v koncentraci 25 μM .

Tab. 4: Hodnoty IC_{50} proliferačních křivek MDCKII-ABCG2 s inhibitorem ABCG2 a jeho substrátem (mitoxantron).

	IC_{50} (μM)
MIT MDCKII-ABCG2	4,378
MIT MDCKII-par	0,8290 ***
MIT + Dabrafenib 10 μM	2,221 *
MIT + Dabrafenib 25 μM	1,098 ***

Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.



Obr. 22: Proliferační křivky MDCKII-ABCG2 s inhibítorem ABCG2 a jeho substrátem (mitoxantron). Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech.

6.3 Studium vzniku rezistence skrze ABC transportéry

Cílem bylo zjistit, jestli ABC efluxní transportéry ABCB1 a ABCG2 mohou hrát roli při vzniku buněčné rezistence na námi použité CDKi kobimetinib a dabrafenib. Tzn., jestli tyto transportéry svou aktivitou mohou snižovat účinek podaného CDKi jeho aktivním transportem ven z buňky (viz obr. 20a, 20b). K těmto experimentům jsme použili metodu proliferační studie (viz 5.2.2).

Nejprve jsme inhibitory v různých koncentracích vyzkoušeli na MDCKII-par liniích, abychom zjistili, jaký vliv tyto inhibitory mají na neexprimující buňky.

Z výsledků jsme stanovili proliferační křivky, kde je zobrazena závislost buněčné viability na koncentraci použitého inhibitoru. Z této křivky pak byla odečtena hodnota IC_{50} , což je inhibiční koncentrace látky, která způsobí 50% snížení proliferace buněk.

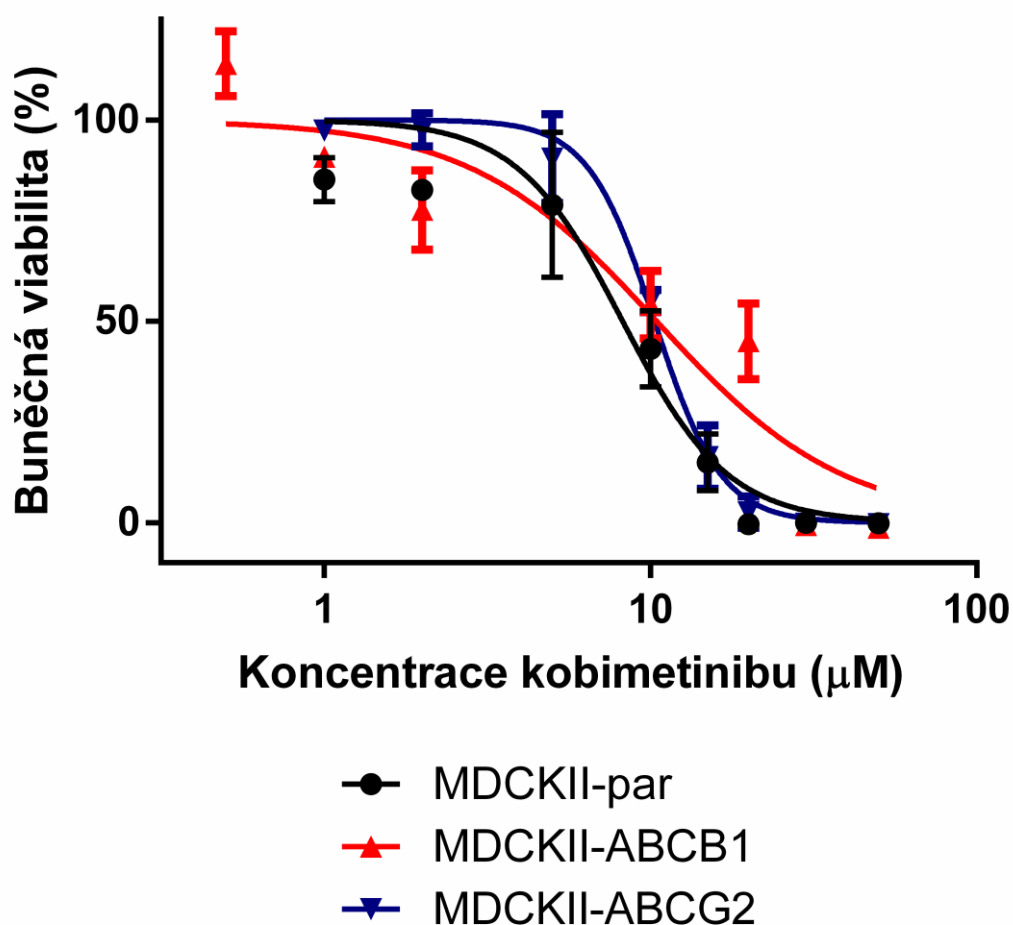
Hodnota IC_{50} získaná z experimentů s parentními liniemi pak byla použita ke srovnání s liniemi exprimujícími, jako hodnota kontrolní. Pokud by IC_{50} exprimující linie byla vyšší než IC_{50} parentní, může zde hrát roli MDR navozená aktivitou efluxních transportérů.

Proliferační křivka (obr. 23) při použití kobimetinibu u MDCKII-par linií ukázala, že hodnota IC_{50} byla 8,225 μM (tab. 5). Kobimetinib jsme dále zkoušeli na MDCKII-ABCB1 buněčných liniích exprimujících ABCB1 efluxní transportér. Hodnota IC_{50} zde byla 10,45 μM . Proliferační křivka kobimetinibu u MDCKII-ABCG2 linií ukázala, že IC_{50} je v tomto případě 10,30 μM . Tato hodnota je stejně jako u MDCKII-ABCB1 buněk vyšší než u parentní linie, i když ne o nějakou výraznou hodnotu. Můžeme však říci, že by zde mohla hrát roli MDR navozená aktivitou ABCB1 a ABCG2 transportéru. Bylo by však třeba provést další experimenty, aby se zjistila významnost tohoto výsledku, jelikož se jedná o velice blízké hodnoty IC_{50} .

Tab. 5: Hodnoty IC_{50} proliferačních křivek kobimetinibu u MDCKII buněk.

	IC_{50} (μM)
MDCKII-par	8,225
MDCKII-ABCB1	10,45
MDCKII-ABCG2	10,30

Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota \pm směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech. Statistická významnost byla stanovena one-way ANOVA testem s Dunnettovým srovnávacím testem *P < 0,05, ***P < 0,001.

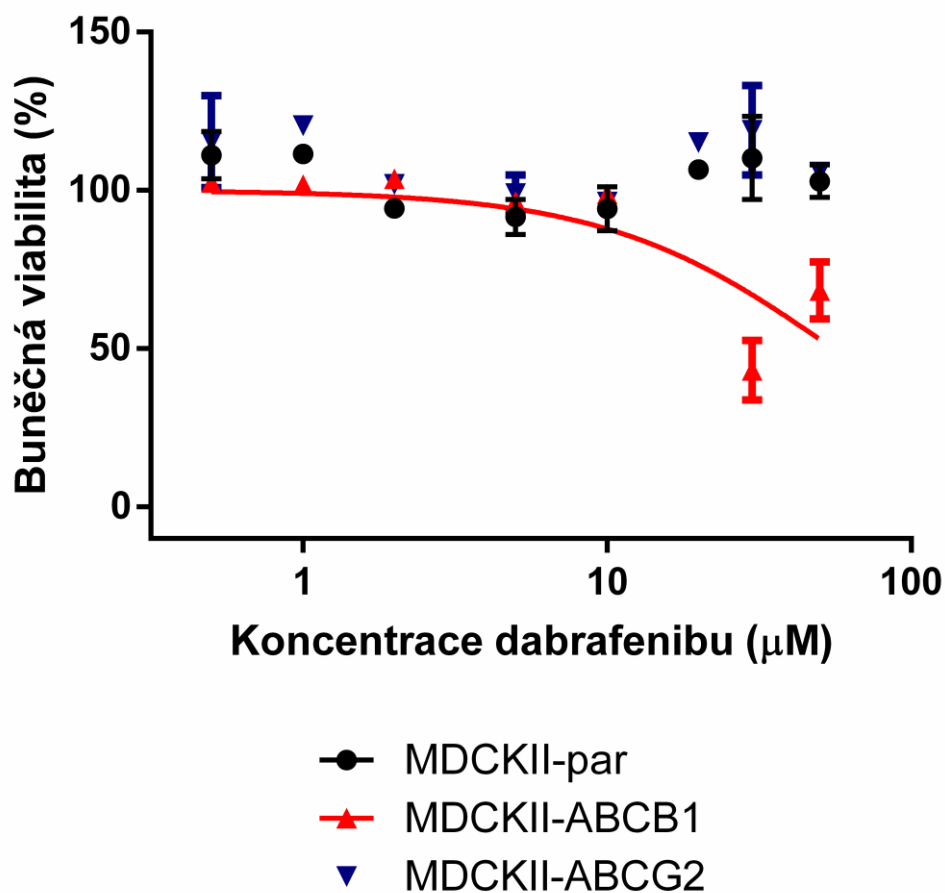


Obr. 23: **Závislost buněčné viability na koncentraci kobimetinibu u MDCKII buněk.** Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech.

Dabrafenib u MDCKII-par linií naopak v námi použitých koncentracích nevykazoval žádnou antiproliferační aktivitu (obr. 24). Viability buněk se pohybovala kolem 100 % (v porovnání s pozitivní kontrolou, kdy buňky byly kultivovány v čistém DMEM).

Hodnota IC_{50} dabrafenibu u MDCKII-ABCB1 buněk byla 55,42 μM. V experimentech jsme jako nejvyšší koncentraci dabrafenibu použili 50 μM. Zjištěná IC_{50} je tedy vypočítaná z předpokládaného průběhu proliferační křivky. Můžeme však říci, že, stejně jako u parentní linie, nevykazoval dabrafenib ani zde antiproliferační aktivitu.

U MDCKII-ABCG2 buněk dabrafenib opět, jako ve všech předchozích případech, nevykazoval antiproliferační aktivitu u námi použitých koncentrací. Buněčná viabilita se pohybovala kolem 100 %.



Obr. 24: **Závislost buněčné viability na koncentraci dabrafenibu u MDCKII buněk.** Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± směrodatné odchylky vždy nejméně ze tří pokusů provedených v triplicátech.

7 Diskuze

Již léta je známo, že ABC efluxní transportéry jsou jedním z důležitých obranných mechanismů nádorových buněk a podílejí se tak u nich na vzniku MDR. (Ferreira *et al.*, 2017) Tímto snižují účinek podaného cytostatika a způsobují tak selhávání účinnosti protinádorové léčby. (Baguley, 2010)

Je tedy logickým krokem snažit se těmto situacím předcházet. Ať už z hlediska vyšší účinnosti léčby, nižšímu zatěžování pacienta protinádorovými chemoterapeutiky či z ekonomického hlediska. Proto se výzkumy zaměřily na hledání možností blokad těchto transportérů. Jednou z možných cest je podání jiné látky, která se bude chovat jako modulátor těchto transportérů, zablokuje je, a zvýší tak uvnitř buňky koncentraci léčiva, jež je substrátem těchto transportérů.

Studie odhalily několik generací slibných inhibitorů ABC efluxních transportérů. Všechny měly *in vitro* uspokojivé modulační schopnosti, avšak při klinickém použití u pacientů se ukázalo, že mají závažné nežádoucí účinky. (Sun *et al.*, 2012) Při podání s cytostatiky například nastávaly lékové interakce vzájemným uvolňováním léčiv z plazmatických proteinů či ovlivňováním metabolismu přes cytochrom P450. Dále se zjistilo, že modulační koncentrace byly pro pacienty příliš toxické, a že celkový poměr risk/benefit převažoval na straně nežádoucích účinků. (Shukla, Ohnuma and Ambudkar, 2011; Sun *et al.*, 2012)

Hledání takovýchto modulátorů tedy dále pokračuje. Výzkumy se zaměřily i na již známé látky, které se používají v protinádorové terapii. Výhodou by zde byl jejich dvojitý účinek. Za prvé jejich samostatná protinádorová aktivita a za druhé jejich modulační schopnosti vůči ABC transportérům. Zjistilo se, že některé látky ze skupiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz takovéto modulační schopnosti mají (jako svůj vedlejší účinek). (An *et al.*, 2009; Cihalova *et al.*, 2013, 2015; Cihalova, Staud and Ceckova, 2015; Sorf *et al.*, 2018)

Tato práce se v návaznosti na výše citované zaměřila na proteinkinázové inhibitory, a to na kobimetinib a dabrafenib. Ukázalo se, že tyto látky nejen dokáží inhibovat ABCB1 a ABCG2 transportéry u MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2

buněk, ale také jsou schopny je modulovat a zvrátit tak MDR na substráty těchto transportérů. Podobné vlastnosti se prokázaly i u strukturně podobných látek. Trametinib je podobný kobimetinibu. Má stejný mechanismus účinku a indikaci. Používá se v kombinaci s dabrafenibem. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017) Ukázalo se, že trametinib, stejně jako kobimetinib v naší práci, inhibuje a moduluje ABCB1 transportéry. (Qiu *et al.*, 2015)

Vemurafenib je zase strukturně příbuzný dabrafenibu a také má stejný mechanismus účinku a indikaci. (S. Kim *et al.*, 2016; Wishart *et al.*, 2017) Podobně jako dabrafenib, je modulátorem ABCB1 a ABCG2 transportérů. (Vispute *et al.*, 2013)

Vzhledem k tomu, že při terapeutickém použití kobimetinibu, dabrafenibu, trametinibu a vemurafenibu na ně nádorové buňky vykazují rezistenci (proto se také ke zvýšení účinnosti podávají v kombinaci) (Menzies and Long, 2014; Tran *et al.*, 2016), je otázka, jestli tato rezistence také nevzniká právě aktivitou ABCB1 a ABCG2 transportérů. Naše práce ukázala, že tyto transportéry nemají vliv na vznik rezistence na kobimetinib u MDCKII buněk. U strukturně podobného trametinibu nejsou k dispozici podobná data.

MDCKII linie zase podle našich zjištění nevykazovaly na dabrafenib žádnou antiproliferační aktivitu. Podle studií na jiných buněčných liniích za použití jiné metodiky nevykazovaly ABCB1 ani ABCG2 vliv na vznik rezistence na strukturně podobný vemurafenib. Ovšem u lidských melanomových buněčných linií A375 byl prokázán vliv ABCG2 transportérů na vznik rezistence na vemurafenib. (Wu *et al.*, 2013)

Tyto poznatky by mohly být využity v protinádorové léčbě, která zahrnuje použití kobimetinibu nebo dabrafenibu. Bylo by však třeba dalších studií k potvrzení našich zjištění *in vivo*. V tomto případě stanovuje mezinárodní transportérové konsorcium (ITC, International Transporter Consortium) podmínky, kdy je směrodatné provádět takovéto pokusy. Uvádí, že hodnota IC_{50} dosažená *in vitro* musí být alespoň 10x větší než hodnota C_{max} (maximální stabilní dosažitelná koncentrace při běžném dávkování) látky v plazmě. (Giacomini *et al.*, 2010)

Plazmatická c_{max} kobimetinibu byla v klinických studiích změřena na 0,514 μM (RESEARCH, 2014), naše nejnižší inhibiční IC_{50} , která modulovala citlivost MDCKII-ABCB1 buněk, byla 2,5 μM . To neodpovídá podmínkám ITC pro studie *in vivo*, takže bychom museli použít koncentraci vyšší, avšak žádná z nich v plazmě sama dosažitelná není.

Pro dabrafenib byla studiem c_{max} stanovena na 1,551 μM (Waddell and Solimando, 2013), naše efektivní IC_{50} s modulačními schopnostmi byla 25 μM pro ABCB1 a 10 μM pro ABCB2. Hodnota pro ABCB1 splňuje podmínku ITC pro ověření jejích schopností *in vivo*, kdežto u ABCG2 by bylo nutné také použít koncentraci vyšší.

Takovéto studie nicméně zatím nebyly provedeny, ale na základě našich výsledků by bylo vhodné ověřit, zda má modulační schopnost obou látek, dabrafenibu i kobimetinibu, vůči transportérům ABCB1 a ABCG2 relevanci též *in vivo* a může se v klinických podmínkách podílet na překonání lékové rezistence melanomových buněk.

8 Závěr

Inhibitory proteinkináz kobimetinib a dabrafenib jsou moderní látky, které se v praxi používají k léčbě metastazujícího melanomu s mutací BRAF V600E. Kobimetinib byl spolu s vemurafenibem v kombinační terapii schválen FDA v roce 2015, dabrafenib v kombinaci s trametinibem v roce 2014.

Zjistili jsme, že tyto látky mají, podobně jako jiné inhibitory proteinkináz, schopnost inhibovat ABC efluxní transportéry, konkrétně ABCB1 a ABCG2. Kobimetinib lépe inhibuje ABCB1, zatímco dabrafenib je efektivnější inhibitor ABCG2 transportéru.

Na základě tohoto zjištění jsme vyslovili hypotézu, že by tyto látky mohly zablokovat funkci efluxních transportérů ABCB1 a ABCG2 a nepřímo tak zvýšit koncentraci protinádorového léčiva, které je substrátem těchto transportérů (jako modelový substrát ABCB1 jsme použili daunorubicin, modelový substrát ABCG2 byl mitoxantron), a překonat tak ABC transportéry navozenou MDR na tyto substráty.

Ukázalo se, že jak kobimetinib, tak dabrafenib mají schopnost tuto rezistenci zvrátit v porovnání s podáním samotného inhibitoru k exprimujícím buňkám. Kobimetinib v koncentraci 10 μM je dokonce schopen inhibicí ABCB1 transportéru snížit hodnotu IC_{50} dabrafenibu u MDCKII-ABCB1 buněk na úroveň parentních buněk.

Naše výsledky u posledního vytyčeného cíle také ukázaly, že ABCB1 ani ABCG2 transportéry nehrají roli ve vzniku MDR na kobimetinib u MDCKII buněčných linií. A také, že všechny testované buněčné linie vykazovaly vysokou necitlivost k dabrafenibu, a to bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost transportérů. V námi použitých koncentracích jsme nepozorovali žádný antiproliferativní efekt. Hodnota IC_{50} je tedy zřejmě vyšší než 50 μM .

9 Reference

Alberts, B. *et al.* (2005) *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing.

An, R. *et al.* (2009) 'Cellular phototoxicity evoked through the inhibition of human ABC transporter ABCG2 by cyclin-dependent kinase inhibitors in vitro', *Pharmaceutical Research*, 26(2), pp. 449–458. doi: 10.1007/s11095-008-9738-5.

Arora, A. and Scholar, E. M. (2005) 'Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy', 315(3), pp. 971–979. doi: 10.1124/jpet.105.084145.have.

Ascierto, P. A. *et al.* (2012) 'The role of BRAF V600 mutation in melanoma', *Journal of Translational Medicine*, 10(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1479-5876-10-85.

Baguley, B. C. (2010) 'Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer', *Mol Biotechnol*, (46), pp. 308–316. doi: 10.1007/s12033-010-9321-2.

Borst, P. and Elferink, R. O. (2002) 'Mammalian ABC Transporters in Health and Disease', *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), pp. 537–592. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055.

Cihalova, D. *et al.* (2013) 'Purvalanol A, Olomoucine II and Roscovitine Inhibit ABCB1 Transporter and Synergistically Potentiate Cytotoxic Effects of Daunorubicin In Vitro', *PLOS One*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0083467.

Cihalova, D. *et al.* (2015) 'Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 98(3), pp. 465–472. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.099.

Cihalova, D., Staud, F. and Ceckova, M. (2015) 'Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AT-7519, flavopiridol and SNS-032 with ABCB1, ABCG2 and ABCC1 transporters and their potential to overcome multidrug resistance in vitro', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin

- Heidelberg, 76(1), pp. 105–116. doi: 10.1007/s00280-015-2772-1.
- Dagher, R. *et al.* (2002) 'Approval Summary : Imatinib Mesylate in the Treatment of Metastatic and / or Unresectable Malignant Gastrointestinal Stromal Tumors 1', 8(October), pp. 3034–3038.
- Davies, H. *et al.* (2002) 'Mutations of the BRAF gene in human cancer', *Nature*, 417(6892), pp. 949–954. doi: 10.1038/nature00766.
- DeVita, V. T. and Chu, E. (2008) 'A history of cancer chemotherapy', *Cancer Research*, 68(21), pp. 8643–8653. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- Doyle, A. *et al.* (1998) 'A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells', *Proc Natl Acad Sci*, 95(lane 2), pp. 15665–15670.
- Ferlay, J. *et al.* (2015) 'Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012', *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Ferreira, R. J. *et al.* (2017) 'About P-glycoprotein: a new drugable domain is emerging from structural data', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(5). doi: 10.1002/wcms.1316.
- Ficková, D., Vlček, J. and Topinková, E. (2002) 'Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích', *Remedia*, (3), pp. 207–213.
- Fischl, M.A., Richman, D. (1987) 'Multiple-Drug Resistance in Human Cancer', *The New England Journal of Medicine*, 316(22), pp. 1388–1393.
- Fox, E. J. (2004) 'Mechanism of action of mitoxantrone', *Neurology*, 63(12 suppl 6), p. S15 LP-S18. Available at:
http://www.neurology.org/content/63/12_suppl_6/S15.abstract.
- Garnock-Jones, K. P. (2015) 'Cobimetinib: First Global Approval', *Drugs*. Springer International Publishing, 75(15), pp. 1823–1830. doi: 10.1007/s40265-015-0477-8.
- Giacomini, K. M. *et al.* (2010) 'Membrane transporters in drug development',

Nature Reviews Drug Discovery, 9(3), pp. 215–236. doi: 10.1038/nrd3028.

Gillet, J. and Gottesman, M. M. (2010) 'Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer', *Methods in Molecular Biology*, 596, pp. 47–76. doi: 10.1007/978-1-60761-416-6.

Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002) 'Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters', *Nature Reviews Cancer*, 2(1), pp. 48–58. doi: 10.1038/nrc706.

Hofman, J. *et al.* (2016) 'Placental passage of olomoucine II, but not purvalanol A, is affected by p-glycoprotein (ABCB1), breast cancer resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance-associated proteins (ABCCs)', *Xenobiotica*, 46(5), pp. 416–423. doi: 10.3109/00498254.2015.1086039.

Juliano, R. L. and Ling, V. (1976) 'A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants', *BBA - Biomembranes*, 455(1), pp. 152–162. doi: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.

Kim, K.-W. *et al.* (2016) *Cancer Drug Discovery*. Dordrecht: Springer Netherlands.

Kim, M. *et al.* (2002) 'The Multidrug Resistance Transporter ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein 1) Effluxes Hoechst 33342 and Is Overexpressed in Hematopoietic Stem Cells Advances in Brief The Multidrug Resistance Transporter ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein 1) E', *Clinical Cancer Research*, 8(January 2002), pp. 22–28.

Kim, S. *et al.* (2016) 'PubChem substance and compound databases', *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp. D1202–D1213. doi: 10.1093/nar/gkv951.

Koshihara, S. *et al.* (2008) 'Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4', *Xenobiotica*, 38(7–8), pp. 863–888. doi: 10.1080/00498250801986944.

Krapcho, A. P. *et al.* (1995) 'Anthracene-9,10-Diones and Aza Bioisosteres as Antitumour Agents', *Current Medicinal Chemistry*, 2(4), pp. 803–824.

Laderian, B. and Fojo, T. (2018) 'CDK4/6 Inhibition as a Therapeutic Strategy in

Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib', *Seminars in Oncology*. Elsevier Inc. doi: 10.1053/j.seminoncol.2018.03.006.

Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*, 141(7), pp. 1117–1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

Lin, J. H. and Yamazaki, M. (2003) 'Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: Clinical implications', *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1), pp. 59–98. doi: 10.2165/00003088-200342010-00003.

Lito, P., Rosen, N. and Solit, D. B. (2013) 'Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1401–1409. doi: 10.1038/nm.3392.

Lovly, C. M. *et al.* (2012) 'Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials', *PLoS ONE*, 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0035309.

Manuscript, A. (2010) 'A new understanding in the epidemiology of melanoma', *Expert Rev Anticancer Ther.*, 10(11), pp. 1811–1823. doi: 10.1586/era.10.170.A.

Di Marco, A., Cassinelli, G. and Arcamone, F. (1981) 'The Discovery of Daunorubicin', *Cancer Treatment Reports*, 65(Suppl 4), pp. 3–8.

Martínková, J. *et al.* (2007) *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing.

Meister, M. *et al.* (2013) 'Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), pp. 4854–4884. doi: 10.3390/ijms14034854.

Menzies, A. M. and Long, G. V. (2014) 'Dabrafenib and Trametinib, alone and in combination for BRAF-Mutant metastatic melanoma', *Clinical Cancer Research*, 20(8), pp. 2035–2043. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2054.

Mittapalli, R. K. *et al.* (2012) 'Impact of P-Glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) on the Brain Distribution of a Novel BRAF Inhibitor: Vemurafenib (PLX4032)', *Journal of Pharmacology and Experimental*

- Therapeutics*, 342(1), pp. 33–40. doi: 10.1124/jpet.112.192195.
- Ni, Z. *et al.* (2010) 'Structure and function of the human breast cancer resistance protein ({BCRP}/{ABCG}2)', *Curr Drug Metab*, 11(7), pp. 603–617.
- Papac, R. J. (2001) 'Origins of cancer therapy', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 74(6), pp. 391–398. doi: 10.1038/onc.2009.347.
- Pearson, G. *et al.* (2014) 'Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions', *Endocrine Reviews*, 22(2), pp. 153–183.
- Pechandová, K. *et al.* (2006) 'Efluxní transmembránový transportér - P-glykoprotein', *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 14(4), pp. 196–201.
- Pratilas, C. A., Xing, F. and Solit, D. B. (2012) 'Targeting Oncogenic BRAF in Human Cancer', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, (355), pp. 83–98. doi: 10.1007/82_2011_162.
- Qiu, J.-G. *et al.* (2015) 'Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter', *Oncotarget*, 6(17), pp. 15494–15509. doi: 10.18632/oncotarget.3820.
- Ralhan, R. and Kaur, J. (2007) 'Alkylating agents and cancer therapy', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), pp. 1061–1075. doi: 10.1517/13543776.17.9.1061.
- Rastrelli, M. *et al.* (2014) 'Melanoma : Epidemiology , Risk Factors , Pathogenesis , Diagnosis and Classification', *In Vivo*, 28(6), pp. 1005–1011.
- RESEARCH, C. F. D. E. A. (2014) 'CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S), APPLICATION NUMBER: 206192Orig1s000', pp. 1–116.
- Román, E. *et al.* (2007) 'MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence', *Trends in Microbiology*, 15(4), pp. 181–190. doi: 10.1016/j.tim.2007.02.001.
- Roovers, K. and Assoian, R. K. (2000) 'Integrating the MAP kinase signal into

the G1 phase cell cycle machinery', *BioEssays*, 22(9), pp. 818–826.

Rubinstein, J. C. *et al.* (2010) 'Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032', *Journal of Translational Medicine*, 8, pp. 2–4. doi: 10.1186/1479-5876-8-67.

Sever, R. and Brugge, J. S. (2015) 'Signal transduction in cancer', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(4), pp. 1–21. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.012.

Shapiro, A. B. and Ling, V. (1997) 'Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein.', *Eur J Biochem.*, 250(1), pp. 122–9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00122.x.

Shchemelinin, I., Šefc, L. and Nečas, E. (2006) 'Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases', *Folia Biologica*, 52(3), pp. 81–101. doi: CAN0010.

Shukla, S., Ohnuma, S. and Ambudkar, S. V. (2011) 'Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters', *Curr Drug Targets*, 12(5), pp. 621–630. doi: 10.1002/ana.22528.Toll-like.

Skinner, H. A. (1949) *The origin of medical terms*. Baltimore: Williams & Willkins Company.

Sorf, A. *et al.* (2018) 'Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms in vitro', *Biochemical Pharmacology*, 154(April), pp. 10–17. doi: 10.1016/j.bcp.2018.04.013.

Sun, Y. L. *et al.* (2012) 'Role of ABC transporters in cancer chemotherapy', *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), pp. 51–57. doi: 10.5732/cjc.011.10466.

Torre, L. A. *et al.* (2015) 'Global Cancer Statistics, 2012', *CA: a cancer journal of clinicians.*, 65(2), pp. 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.

Tran, K. A. *et al.* (2016) 'MeK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy', *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 43–52. doi: 10.2147/DDDT.S93545.

ÚZIS (2015) *Cancer Incidence in the Czech Republic, 2015*. Prague.

Vispute, S. G. *et al.* (2013) 'Vemurafenib (PLX4032, Zelboraf®), a BRAF Inhibitor, Modulates ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-Mediated Multidrug Resistance', *J Can Res Updates*, 2(4), pp. 306–317. doi: 10.6000/1929-2279.2013.02.04.9.

Waddell, J. A. and Solimando, D. A. (2013) 'Drug Monographs: Dabrafenib and Trametinib', *Hospital Pharmacy*, 48(10), pp. 818–821. doi: 10.1310/hpj4810-818.

Wain, H. (1958) *The story behind the word; some interesting origins of medical terms*. Springfield, Ill.: Charles C Thomas.

WHO (2014) *World Health Organisation - Cancer Country profiles - Czech republic*. Available at: http://www.who.int/cancer/country-profiles/cze_en.pdf?ua=1.

WHO (2017) 'WHO Model List of Essential Medicines', *20th Edition*, 14(August), p. 39. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.

Wishart, D. S. *et al.* (2017) 'DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, (December 2017), pp. 1–9. doi: 10.1093/nar/gkx1037.

Wu, C. *et al.* (2013) 'Overexpression of ATP-binding cassette transporter ABCG2 as a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAF (V600E) mutant cancer cells', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 85(3), pp. 325–334. doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.003.

<http://membranereceptors.com/transduction-process/enzyme-linked-receptors/>
(ke dni 6. 1. 2018)