

- Informace (úvod, metodiky)



- Práce s anglickým textem



- Hodnověrnost dat



- Odborná mluva na „veřejnosti“



- Orientace v problematice spolupracovníků



- „Team building“



- 1 výběr článku/úvod za semestr/osoba
- Kdy?
- Kde?
- Kredity
- Výběr článku – 8 obrázků, dobrý teoretický úvod, bez suplementů, recentní, dobrý časopis – konzultace předem
- Teoretický úvod - Proč byl článek vybrán
 - Představení pracoviště
 - Detailnější vysvětlení tématu
 - Upozornit na zajímavé metody

Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression

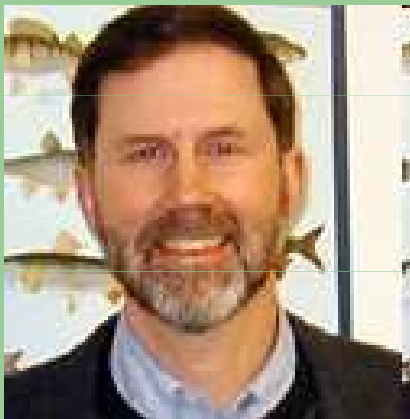
Rangan MAITRA^{*1}, Patricia A. HALPIN^{†1}, Katherine H. KARLSON[†], Rodney L. PAGE^{*2}, Daniel Y. PAIK^{*}, Matthew O. LEAVITT^{*},
Bryan D. MOYER[†], Bruce A. STANTON[†] and Joshua W. HAMILTON^{*3}

^{*}Department of Pharmacology and Toxicology, Dartmouth Medical School, Hanover, NH 03755-3835, U.S.A., and [†]Department of Physiology, Dartmouth Medical School, Hanover, NH 03755-3835, U.S.A.



Dartmouth Medical School

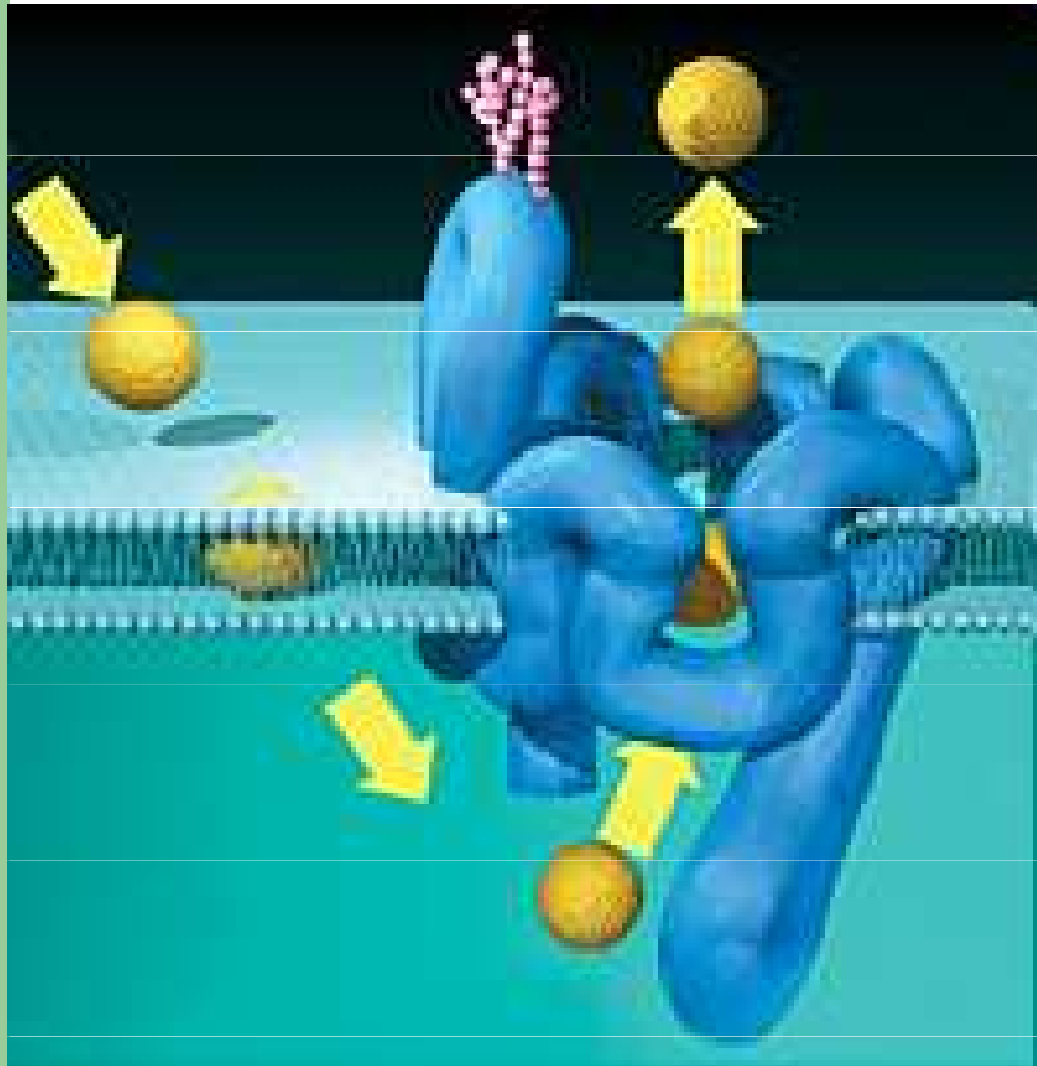
BA Stanton



JW Hamilton



- Selhání chemoterapie (nádorové b. jsou obvykle citlivější než „zdravé“ buňky)
- *De novo*/získaný fenotyp MDR (cytotoxic *in vitro* MTT-assay)
- Mechanizmy:
 - Změny v metabolických drahách, které se podílejí na detoxifikaci látek
 - Změny v reakci organismu na poškození DNA
 - Změny v aktivitě topoizomerázy II
 - Změny v drahách regulujících apoptózu
 - **Zvýšená produkce ABC transportérů**
- Nádorová b. se vymyká vlivu svého prostředí (obsahujícího chemoterapeutikum), získává „evoluční“ výhodu

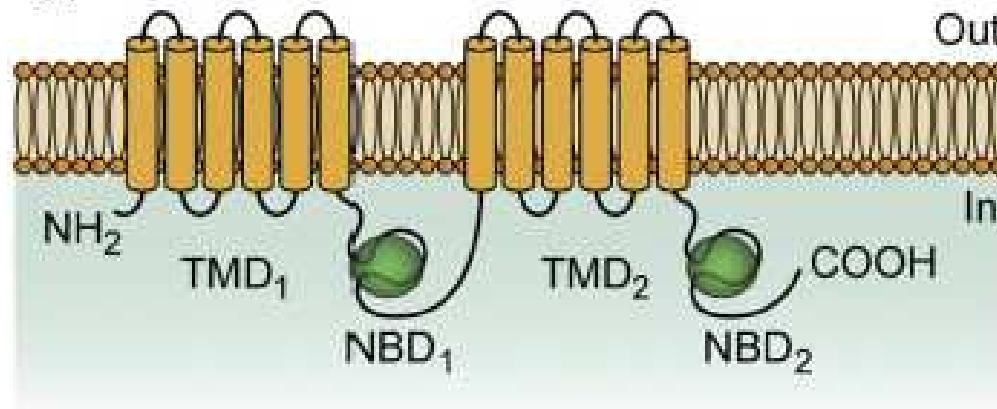


http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch1_mdr.jpg

- **ATP-binding cassette**
- Za spotřeby **ATP** pumpují toxické látky/metabolické produkty **VEN** z buňky (výjimka CFTR)
- 48 různých proteinů u lidí
- 7 rodin (A-G) podle homologie
- Fyziologická funkce – sekrece látek produkovaných buňkou + obrana proti xenobiotikám
- ! Různé substráty -> **MULTI**léková rezistence!
 - **ABC-B1 – Pgp, MDR1**
 - ABC-C1 – MRP1
 - ABC-G2 - BCRP

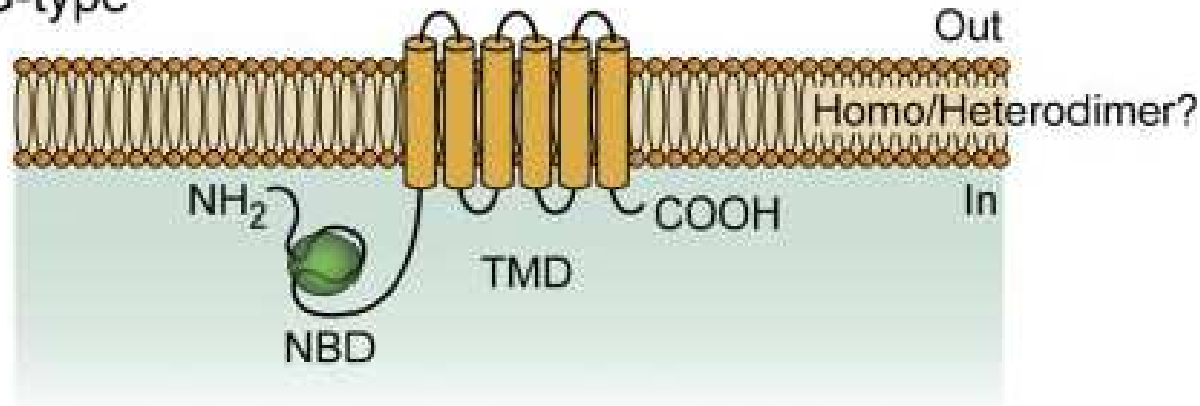
Struktura

ABCB-type



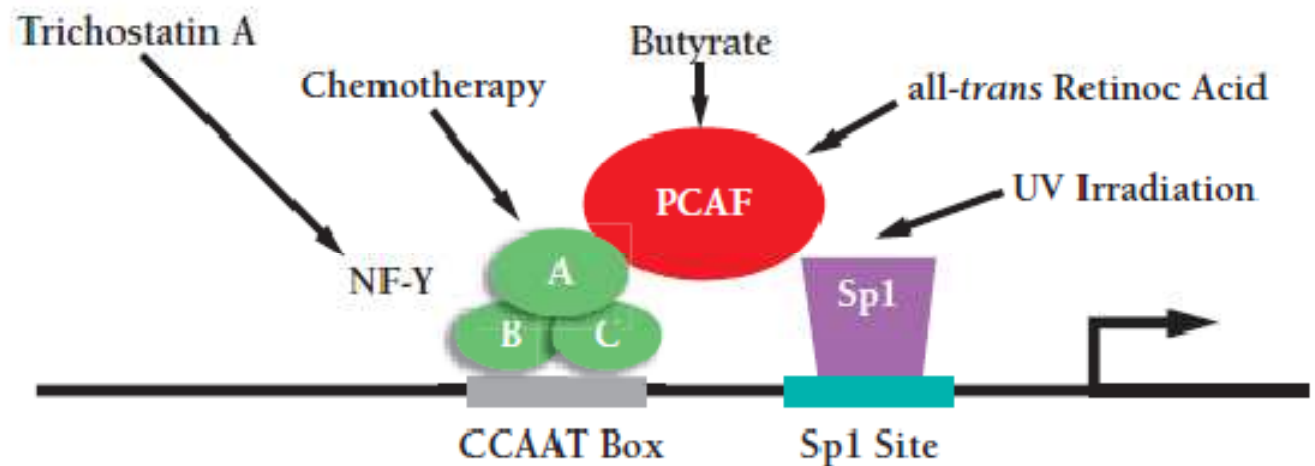
FULL
Transporter
MDR1, MRP1

ABCG-type



HALF
Transporter
BCRP

MDR1



MDR1 enhancosome: Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. Mol Interv. 2001 Jun;1(2):117-25

- Fyziologicky exprimován v játrech, ledvinách, střevě, placentě, krevně-mozkové bariéře, SC
- Stres (teplo, zánět, hypoxie, UV záření, diferenciacní činidla) vedou k zvýšení jeho exprese - enhancosome
- Rychlé zvýšení exprese po inkubaci s jeho substráty (doxorubicin, vinca alkaloidy, etoposid, taxely) = **jak zamezit zvýšení exprese dřív než nastane???**

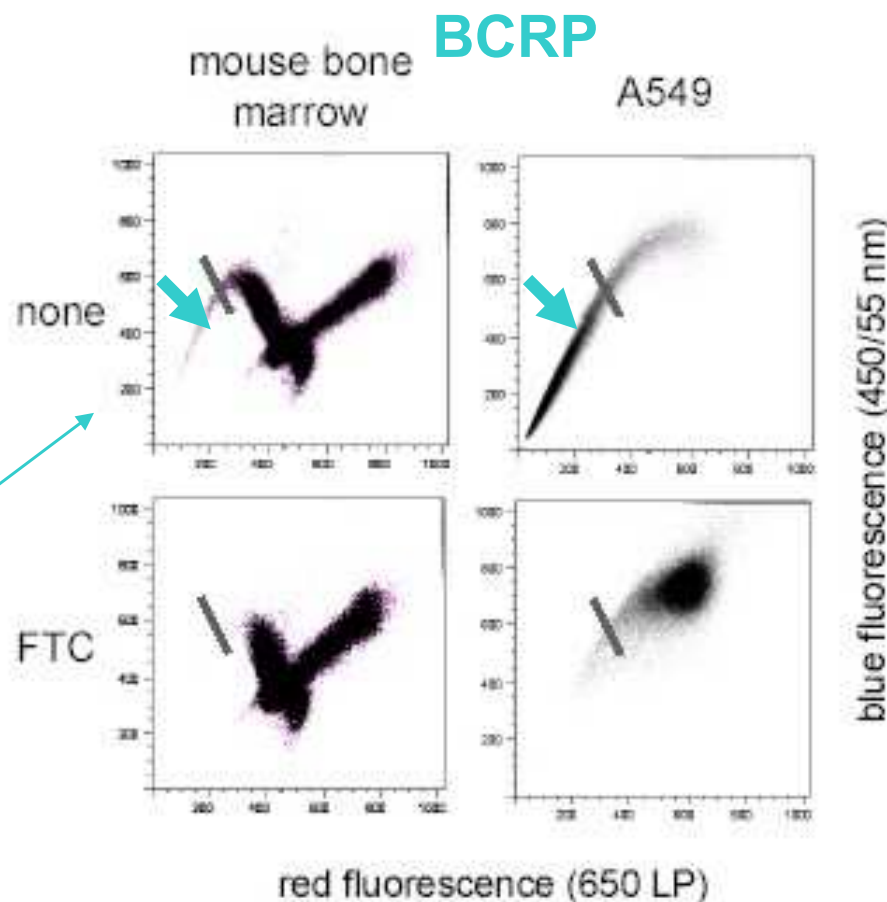
- Marker SC – snížená barvitelnost způsobená zvýšenou expresí ABC transportérů

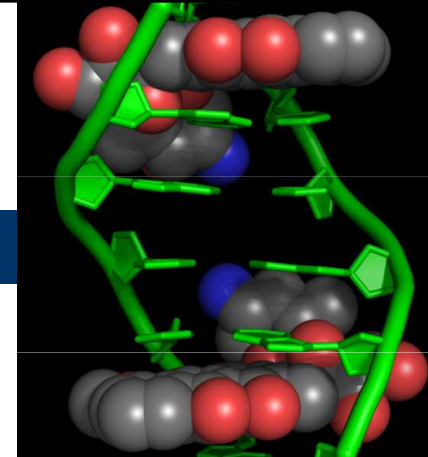
ABC substrát/barvivo

**MDR1 - Rhodamin 123
- JC1**

MRP1 - Calcein AM

**BCRP - Hoechst 33342
- Bodipy-prazosin
- Pheophorbid a
- mitoxantron**

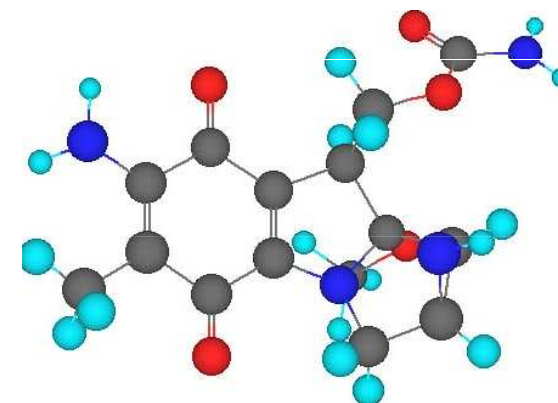




<http://en.wikipedia.org/>

● Doxorubicin (adriamycin)

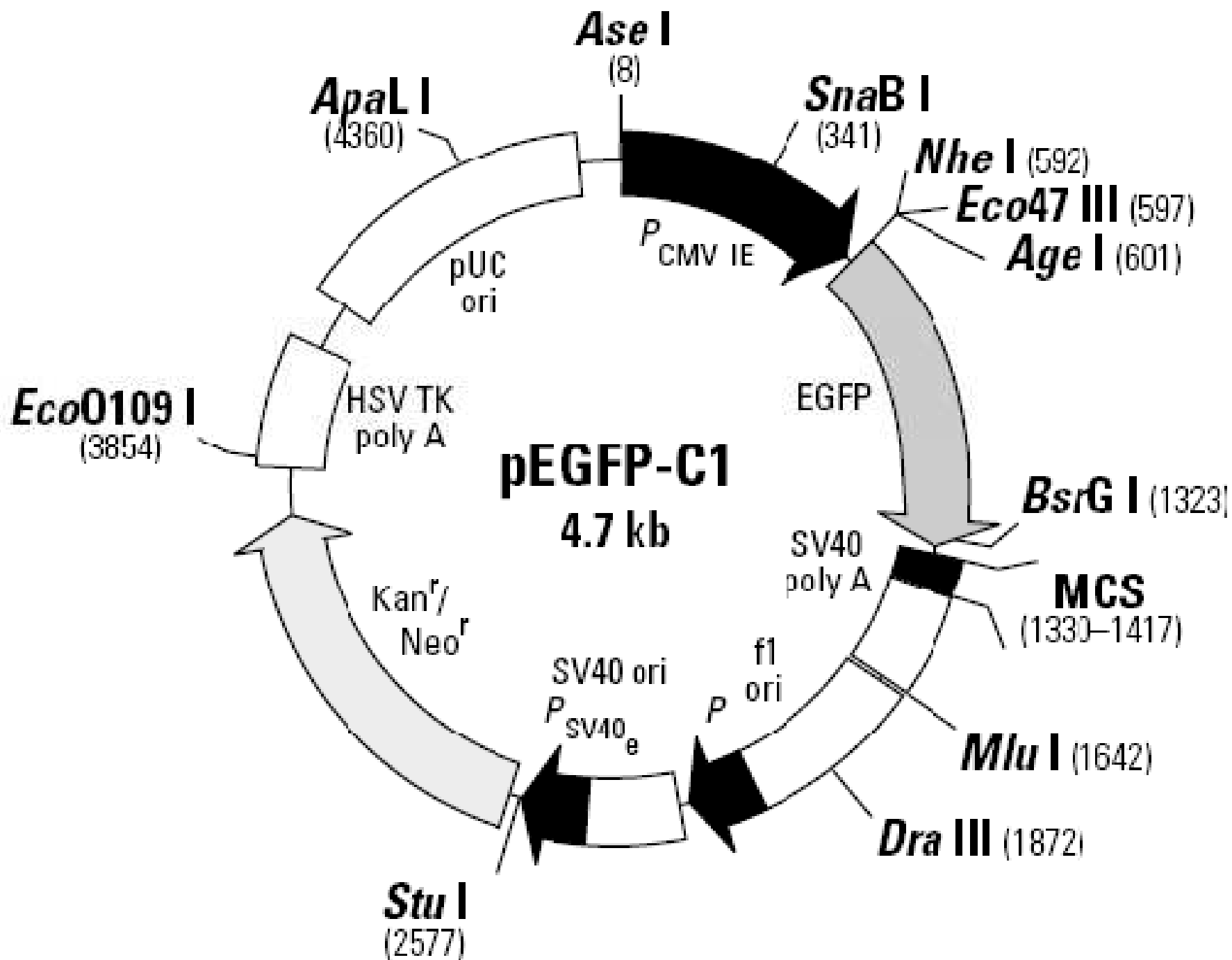
- Derivát daunorubicinu (*Streptomyces peucetius*)
- Antracyklinové antibiotikum
- Interkalace do DNA – zabraňuje topoizomeráze II rozvinout DNA pro replikaci či transkripci
- Léčba solidních nádorů, leukemií, lymfomů (x kardiotoxicita)
- Rychlá upregulace exprese MDR1



<http://www.oup.com>

Mitomycin C

- Produkt *Streptomyces lavendulae*
- Aktivován redukcí, následuje alkylace a pak vazba na DNA (5'-CpG-3') = „Cross-linking“ činidlo
- Léčba nádorů GIS, moč. měchýře, prsu



- Membránový extrakt – lyzační pufr + centrifugace = oddělení cytosolu a membránové frakce
- Cytotoxicita (AQueous One Solution Reagent) – redukce tetrazoliové soli na formazán + stabilizátory reakce + elektronový coupler
- Akumulace daunorubicinu – substrát MDR1, fluorescenční (FL-2)
 - (1. 20uM verapamil – umožní vstup daunorubicinu do b.- 1,5h)
 2. 1 uM daunorubicin - 1h

- Doxorubicin (a další DNA poškozující látky) zvyšuje expresi mRNA i proteinu MDR1

X

- Mitomycin C (a další cross-linkující látky) potlačují expresi mRNA i proteinu MDR1 – ale přechodná fáze, kdy je zvýšeno množství MDR1 na membráně, ale ne jeho exprese)

=

- **Existují mechanismy regulující „dopravu“ MDR1 z cytoplazmy na membránu po vystavení cytotoxiku?**

Fig. 1

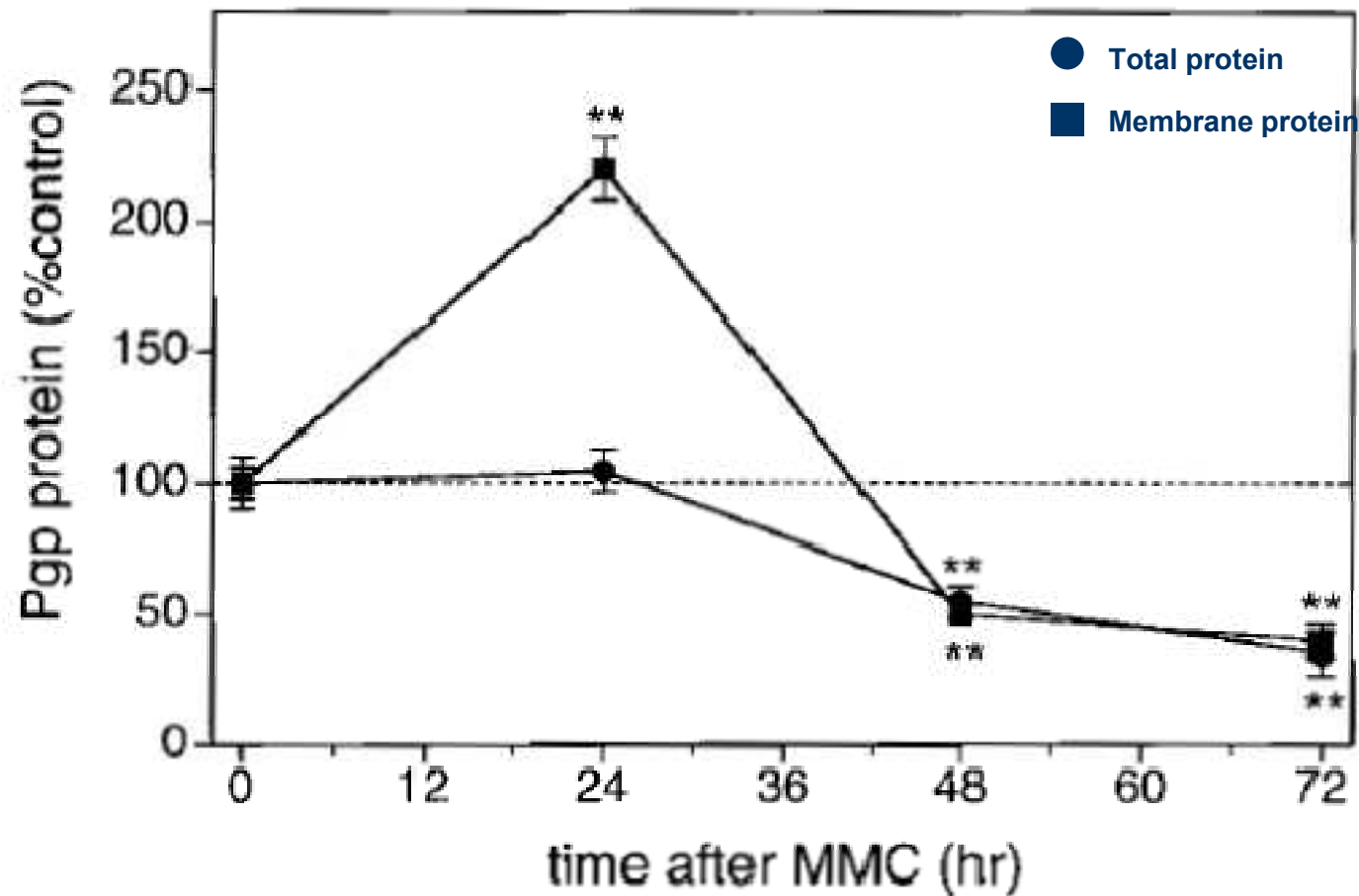


Figure 1 Differential effects of MMC on total cellular and membrane associated Pgp levels

Fig. 2

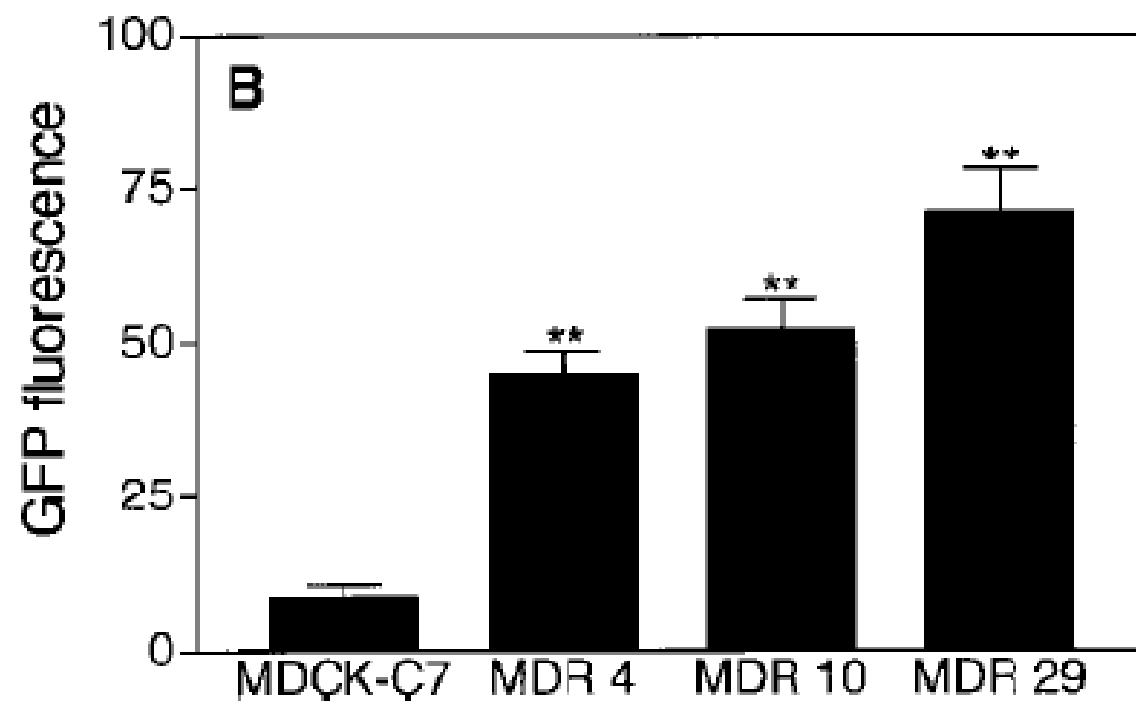
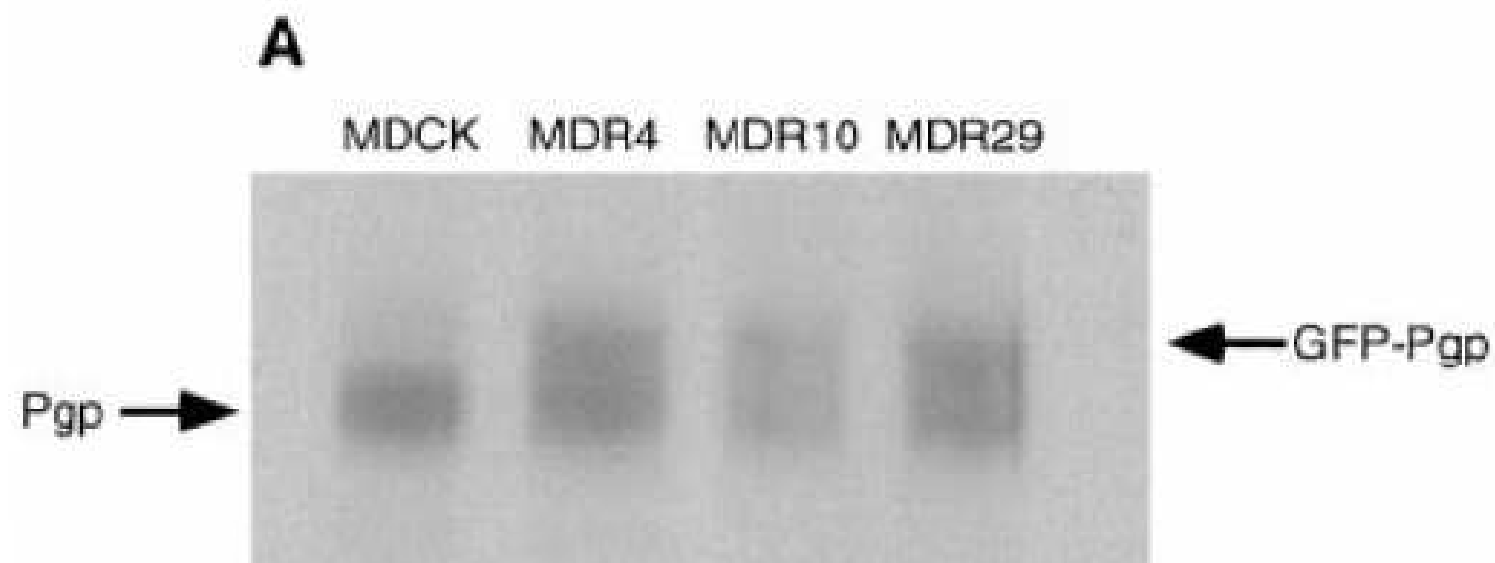


Fig. 3

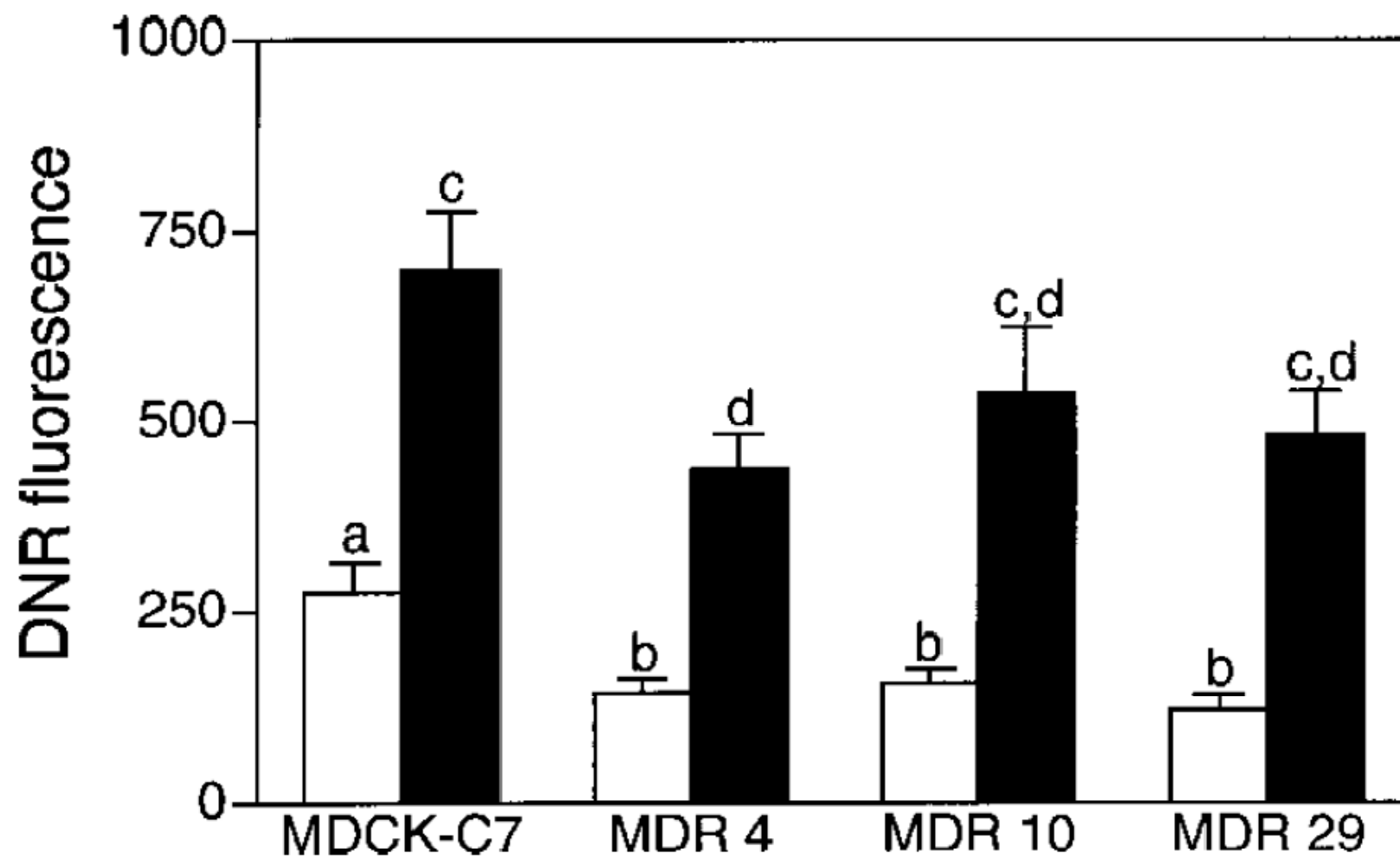
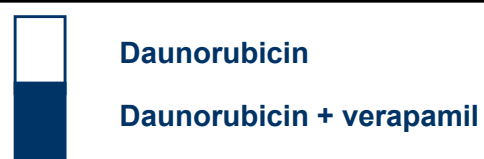


Table 1 Relative toxicity of doxorubicin and cisplatin in the parental and stably transfected MDCK cell lines

Cytotoxicity was measured by a colony-forming assay as described in [12] and in the Experimental section. Cytotoxicity dose–response curves were generated for each drug in each cell line by treating triplicate cultures for each concentration (4 h) over a 100-fold range of doses (results not shown); the EC_{50} for cytotoxicity was calculated from each curve by using the standard dose–response curve-fitting equations of Prism statistical software (version 2.0b; Graphpad Software).

Cell line	EC_{50} for doxorubicin (μM)	EC_{50} for cisplatin (μM)
MDCK-C7	1.2	12
MDR4	3.0	12
MDR10	4.0	12
MDR29	4.0	12

Fig. 4

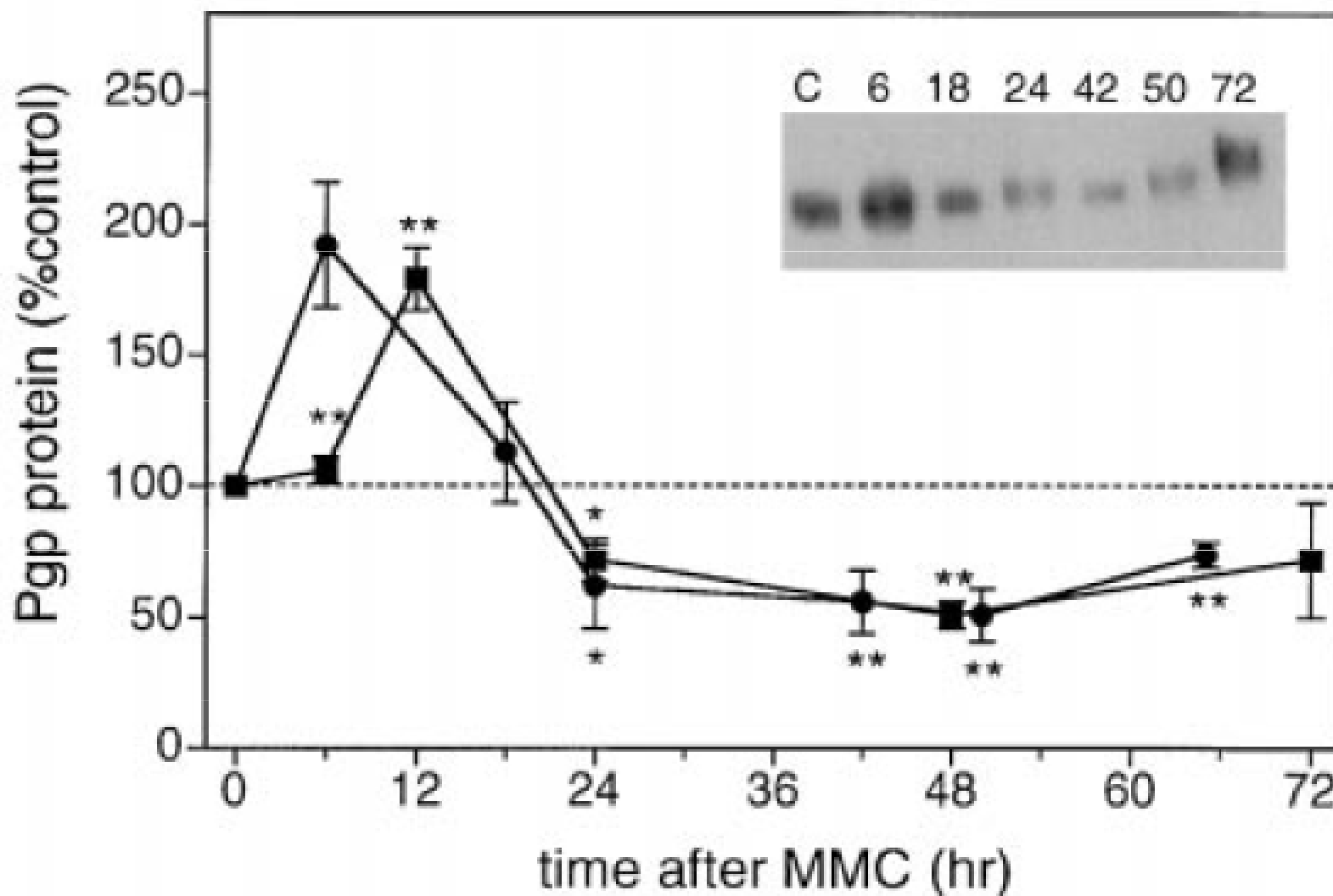


Figure 4 Effects of MMC on plasma-membrane GFP-Pgp expression in MDR29 cells

Fig. 5

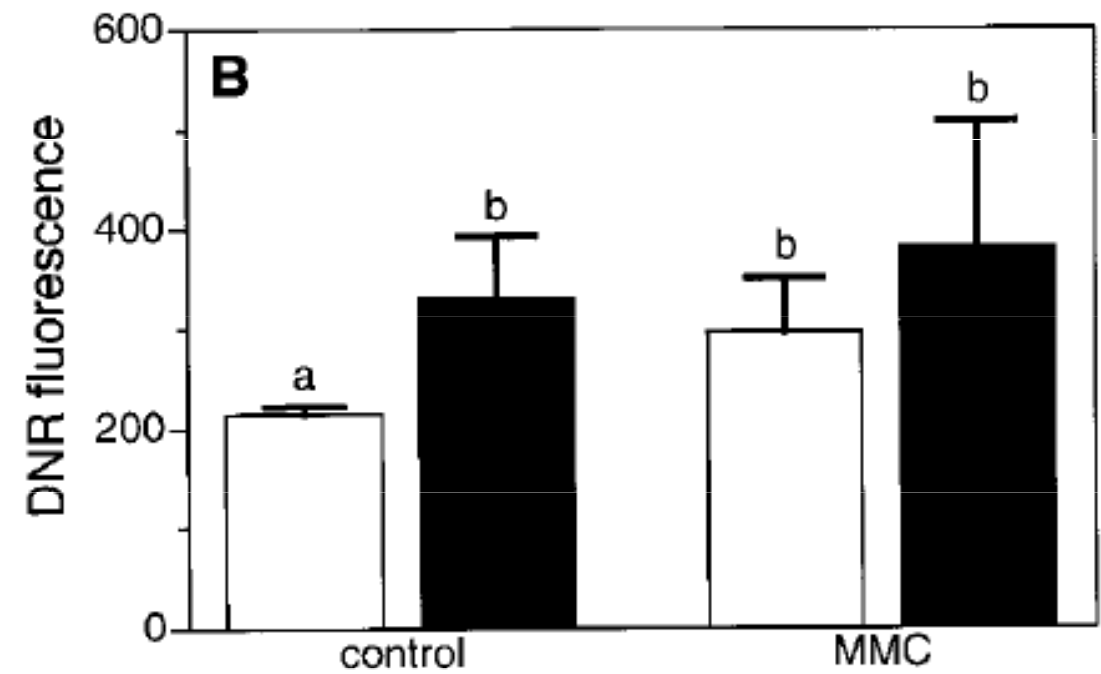
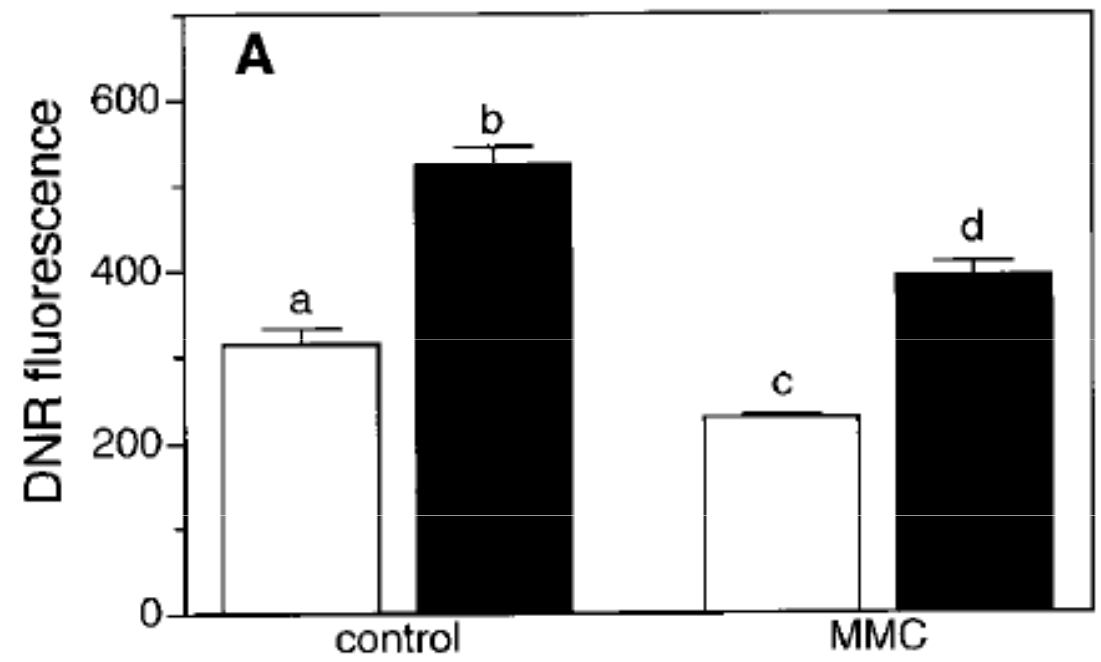
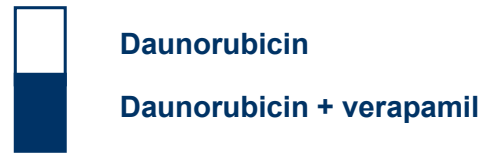


Figure 5 Effects of MMC on drug accumulation in MDR29 cells

Fig. 6

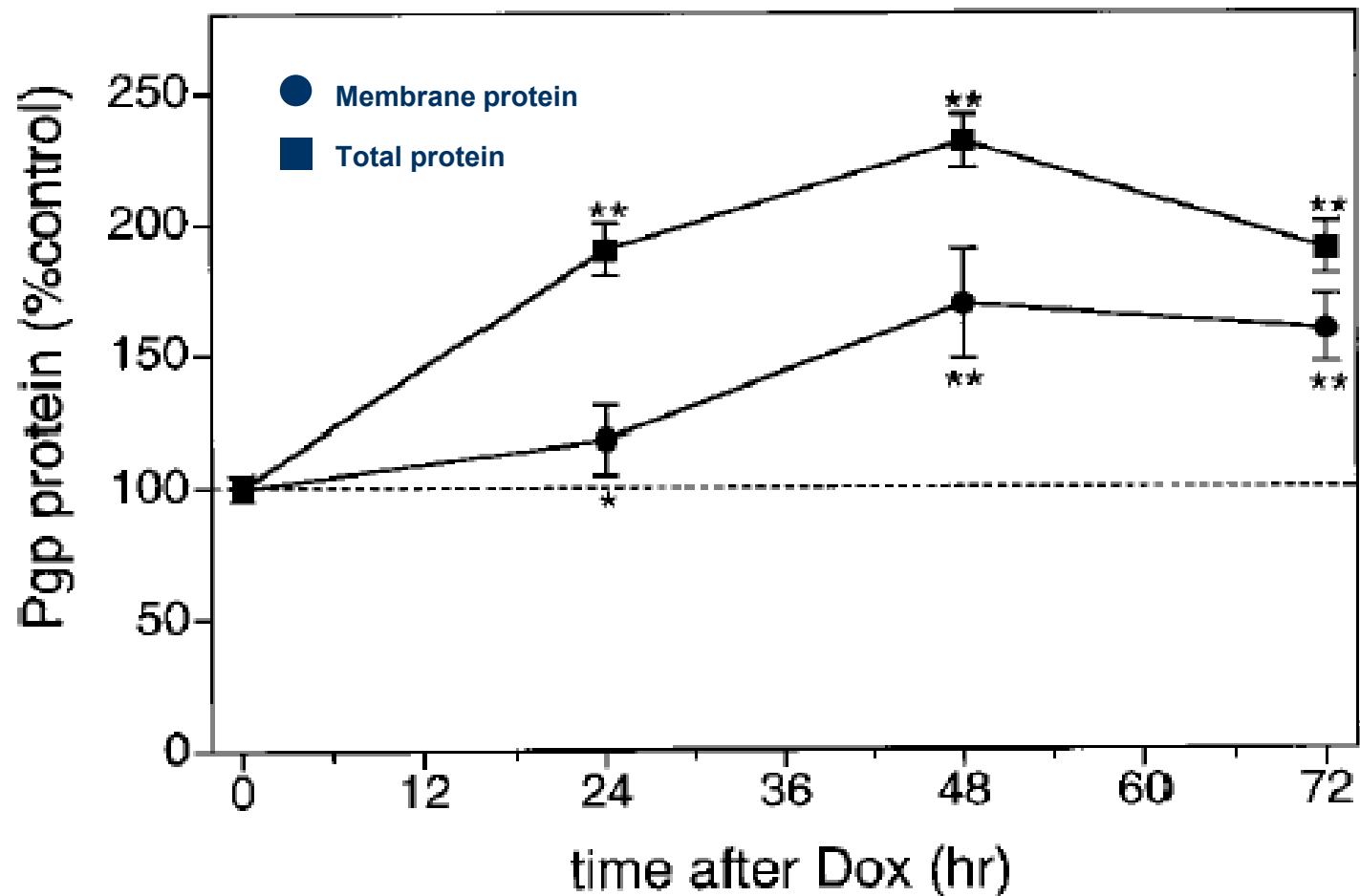


Figure 6 Effects of doxorubicin on total cellular and membrane-associated GFP-Pgp expression in MDR29 cells

Fig. 7

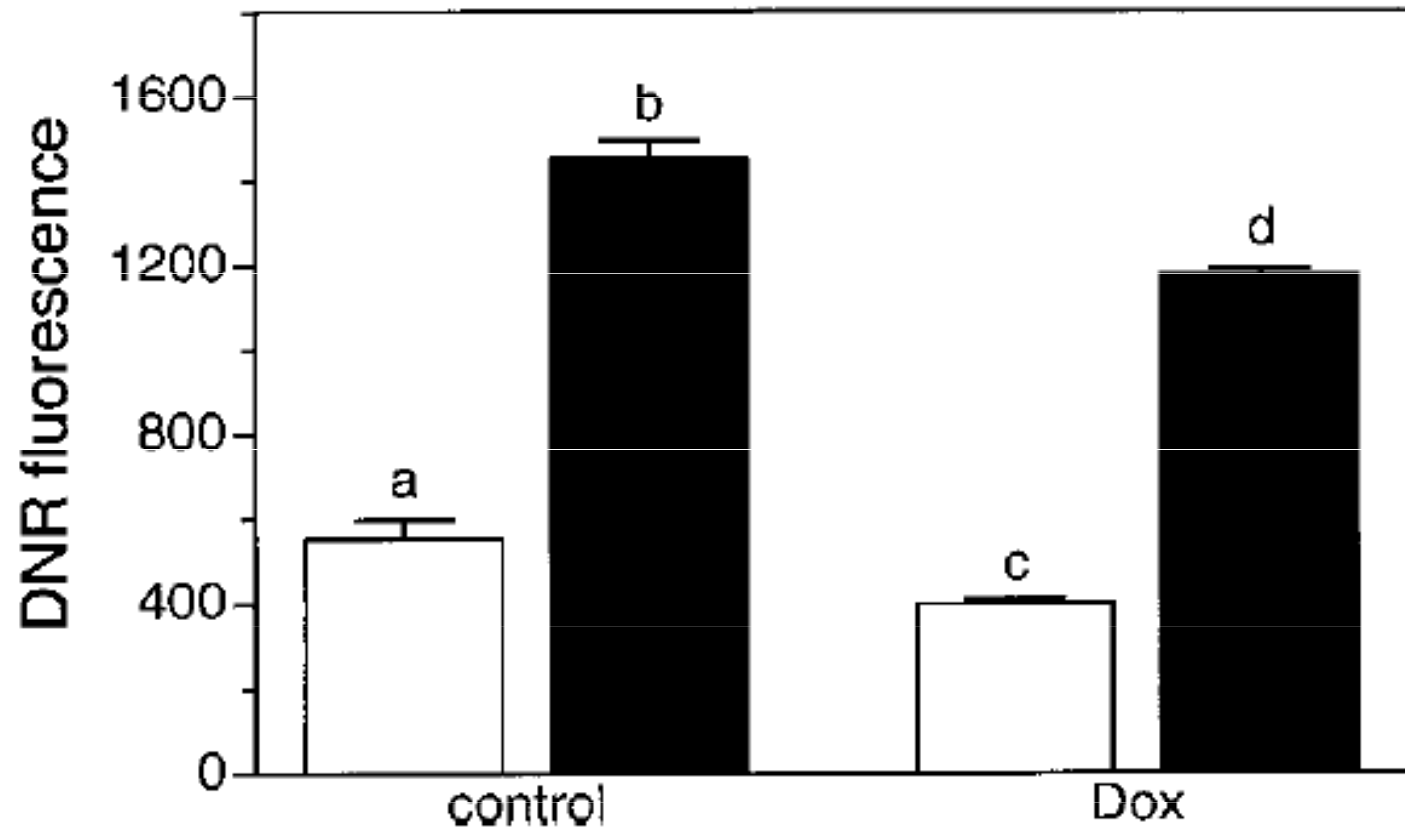
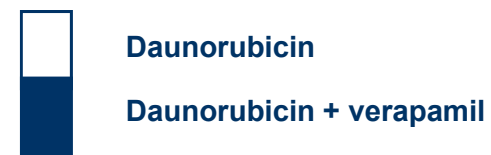


Figure 7 Effects of doxorubicin on drug accumulation in MDR29 cells