

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV 0290–10**Zmeny v metabolizme bunky vyvolané nadexpresiou transportéra liečiv -
P-glykoproteínu v leukemických bunkách**Zodpovedný riešiteľ **Ing. Zdena Sulová, DrSc.**

Príjemca

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV**Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**

1. Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
2. Ústav experimentálnej endokrinológie SAV
3. Chemický ústav SAV
4. Ústav pre výskum srdca SAV
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Šereš M., Cholujová D., Bubenčíková T., Breier A., Sulová Z. Tunicamycin depresses P-glycoprotein glycosylation without an effect on its membrane localization and drug efflux activity in L1210 cells. Int. J. Mol. Sci. 2011, 12, p. 7772-7784, doi: 10.3390/ijms 12117772.
2. Gibalová L., Šereš M., Rusnák A., Ditte P., Labudová M., Uhrík B., Pastorek J., Sedlák J., Breier A., Sulová Z. P-glycoprotein depresses cisplatin sensitivity in L1210 cells by inhibiting cisplatin-induced caspase-3 activation. Toxicology in Vitro 2012, 26, p. 435–44
3. Breier A., Gibalová L., Šereš M., Barančík M., Sulová Z. New insight into p-glycoprotein as a drug target. Anti-cancer Agents Med Chem. 2013, 13, p. 159-70
4. Sulová Z., Brtko J., Macejová D., Breier A. Are Nuclear Receptors for Retinoids Involved in

the Control of the Expression and Activity of P-Glycoprotein? In Retinoic Acid: Structure, Mechanisms and Roles in Disease (Cheng, L.H., It, Y. eds.) NOVA Publisher, 2012, p. 29-52

5. Breier A, Štetka J, Boháčová V, Macejová D, Brtko J, Sulová Z. Effect of 9-cis retinoic acid and all-trans retinoic acid in combination with verapamil on P-glycoprotein expression in L1210 cells. Neoplasma. 61 (2014) :553-565. doi: 10.4149/neo_2014_068

Uplatnenie výsledkov projektu

V rámci riešenia projektu sme zaviedli metódy, ktoré nám umožnili nadviazať spoluprácu s Hematologickou ambulanciou I. Internej kliniky Všeobecnej fakultnej nemocnice Univerzity Karlovej v Prahe. V rámci tejto spolupráce sme sledovali expresiu markerov liekovej rezistencie u pacientov s myelodysplastickým syndrómom 5q- liečených v rámci klinickej štúdie lenalidomidom. V spolupráci s oddelením Lekárskej genetiky NOÚ v Bratislave sme vyšetrili u cca 100 pacientov s diagnózou suspektný myelodysplastický syndróm expresiu markerov liekovej rezistencie. Títo pacienti boli liečení štandardnými liekmi používanými na túto diagnózu. Výsledky tohto projektu môžu byť užitočné aj pri klinickom výskume týkajúcom sa krvných malignancií, u ktorých sa prejavuje rezistencia na cytostatiká.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

1. Inhibitor N-glykozylácie tunikamycín je toxickejší pre P-gp negatívne bunky ako P-gp pozitívne bunky L1210. Po kultivácii buniek s tunikamycínom detegujeme deglykozylovaný, ale plne funkčný P-gp v membráne P-gp pozitívnych buniek. Z našich výsledkov vyplýva, že glykozylácia P-gp neovplyvňuje transportnú aktivitu a nie je nevyhnutná pre jeho funkčné zabudovanie do membrány.
2. P-gp pozitívne bunky L1210 sú menej citlivé nielen na substráty P-gp (vinkristín, doxorubicín) ale aj na cisplatinu, ktorá nie je transportovaná pomocou P-gp. Potlačenie citlivosti P-gp pozitívnych buniek na cisplatinu pravdepodobne súvisí so zmenami v expresii a funkcii proteínov, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii apoptózy ako p53, Bcl-2, kaspáza 3.
3. Výsledky uvedené v bodoch 1 a 2 súvisia priamo s expresiou P-gp v bunkách L1210 a nie sú závislé od spôsobu, akým k expresii P-gp došlo, keďže rovnaké výsledky sme získali s bunkami exprimujúcimi P-gp po adaptácii na vinkristín (VCR) aj s bunkami, ktoré exprimujú P-gp po transfekcii génom kódujúcim P-gp. Pravdepodobne sa jedná o sekundárnu odpoveď buniek na expresiu P-gp.
4. Kombinácia kyseliny all trans retinovej a verapamilu potláča expresiu P-gp len v bunkách, ktoré sme získali adaptáciou na VCR nie však v bunkách, ktoré exprimujú P-gp po transfekcii.
5. Adaptáciou dvoch AML bunkových línií (SKM-1 a MOLM-13) na azacytidín, vinkristín a mitoxantrón sme získali línie rezistentné na tieto liečivá. Všetky rezistentné bunky exprimujú funkčný P-gp. Lenalidomid indukoval expresiu P-gp len v bunkách SKM-1 nie však v MOLM-13 bunkách. P-gp pozitívne sublínie SKM-1 a MOLM-13 koexprimujú nestín a p53.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

This project brings following results:

1. Inhibitor of N-glycosylation – tunicamycin induced more pronounced cell damage effects on P-gp negative than P-gp positive variants of L1210 cells. In plasma membrane of P-gp positive cell variants we detect deglycosylated but fully active P-gp transporter after tunicamycin treatment. Thus P-gp glycosylation is not necessary for its functional incorporation to cell membranes.
2. L1210 P-gp positive cell variants are less sensitive not only to P-gp substrates (like vincristine or doxorubicin), but also to cisplatin that is unsuitable for P-gp driven transport. Depression in P-gp positive variant of L1210 cell to cisplatin seems to be related to alteration in expression/ function of crucial players of apoptosis progression like p53, Bcl-2, caspase3.

3. Results described in point 1 and 2 seems to be related directly to presence of P-gp in L1210 cells independently on way of P-gp induction in these cells via selection for resistance by vincristine or transfection with gene encoding P-gp.
4. In P-gp positive L1210 cells obtained by adaptation to vincristine, but not by transfection with P-gp encoding gene, all-trans retinoic acid combined with verapamil induced downregulation of P-gp.
5. Selection of cells for resistance with AzaC, VCR and MTX we obtained drug resistant variants of two following AML cell lines: SKM-1 and MOLM-13. All drug resistant cells express fully active P-glycoprotein. Lenalidomide was able to induce P-gp expression only in SKM-1 but not in MOLM-13 cells. P-gp positive variants of SKM-1 and MOLM-13 cells coexpress nestin and p53.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Ing. Zdena Sulová, DrSc.

V Bratislave 26. 11. 2014

Štatutárny zástupca príjemcu

doc. Ing. Oľga Križanová, DrSc.

V Bratislave 26. 11. 2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu