

MDR1/PGP GÉN Z POHLADU EPIGENETIKY, FARMAKOGENETIKY A JEHO ÚLOHA VO FARMAKOTERAPII V KONTEXTE MNOHOPOČETNEJ LIEKOVEJ REZISTENCIE

MDR1/PGPG GENE IN EPIGENETICS, PHARMACOGENETICS AND ITS IMPACT IN PHARMACOTHERAPY OF MULTIDRUG RESISTANCE PHENOMENON

MIROŠŠAY A., MIROSSAY L.

ÚSTAV FARMAKOLÓGIE, UNIVERZITA P. J. ŠAFÁRIKA, LF KOŠICE

Súhrn

Zavedenie konceptu farmakogenetiky alebo farmakogenomiky do klinickej praxe má význam pri individualizácii liečby a tým signifikantne ovplyvní bezpečnosť a účinnosť terapie. Enzýmy podieľajúce sa na metabolizme liečiv boli prvé, ktoré boli z tohto pohľadu intenzívne študované. Predpokladá sa, že genotypizácia poskytuje novú možnosť v predikcii individuálnej metabolickej schopnosti už pred začatím liečby. Nové technológie a rapídne vzrastajúce vedomosti o molekulovom základe chorôb otvárajú obrovské možnosti v medicíne. Dnes asi 30% pacientov dostáva neúčinnú liečbu. Toto je čiastočne spôsobené tým, že jedno liečivo sa používa pre celú populáciu, ktorá sa však v jednotlivcoch geneticky odlišuje, a tým sa znižuje jeho efektívnosť. Pochopenie molekulových mechanizmov ochorení a variability exprese génov a ich vplyv na celkovú farmakokinetiku liečiva v individuálnom prípade nám dáva možnosť liečiť oveľa efektívnejšie. Hovoríme o individualizácii terapie.

Kľúčové slova: MDR1/Pgp gén, mnohopočetná lieková rezistencia, farmakogenetika.

Summary

Introduction of concepts of pharmacogenetics to the clinical settings has had an impact on individualization of drug treatment, and could therefore contribute significantly to enhanced drug safety and efficacy. Drug-metabolizing enzymes are typical representatives that have been intensively investigated. Thus, genotyping is expected to provide a new tool for predicting individual drug-metabolizing capabilities before treatment begins. New technologies and the rapidly increasing knowledge about the molecular basis of diseases provide an important opportunity for the future of medicine. Today, on average, 30% of patients receiving medicines derive no benefit. This is partly due to the fact that one drug is used to treat a whole range of genetically different individuals and the drug is not equally effective for all. A molecular understanding of the basis of diseases plus overall as well as cellular pharmacokinetics of a drug in an individual will allow the disease to be treated much more effectively. We refer to this as individualized therapy.

Key words: MDR1/Pgp gene, multidrug resistance, pharmacogenetics.

Epigenetika

Termín epigenetika, ktorý v preklade znamená „mimo konvenčnej genetiky“ sa dnes používa najmä pri popisovaní stabilných zmien v potenciáli exprese génov, ktoré sú dôležité pre správnu proliferáciu a vývoj bunky. V minulosti sa termín „epigenetika“ používal ako forma interpretácie genotypu, počas vývoja jedinca, ktorý sa prejavuje určitým fenotypom. Epigenetické procesy sú nevyhnutné a zrejme počas normálneho vývoja a diferenciácie buniek, ale vyskytujú sa aj v dospelosti resp. zrelosti buď ako náhodné zmeny alebo zmeny vyvolané vplyvom prostredia. Epigenetické mechanizmy a procesy taktiež ochraňujú organizmus pred virálnym genómom, ktorý by potenciálne napadol funkcie buniek a viedol by k ich zániku. S rozširujúcim sa poznaním sú epigenetické deje identifikované ako postsyntetické modifikácie DNA buď samotnou DNA alebo pomocou proteínov úzko spojených s DNA ako mediátorom. Tieto modifikácie môžu byť sprostredkované proteínmi, ktoré rozpoznávajú čiastkové rozdiely a umožňujú primeraný biologický účinok [1].

Epigenetika je teda dedičná zmena v expresii génov bez alterácií v sekvencii DNA, nedochádza ani k bodovým mutáciám nukleotidov. Výskum za posledných 10 rokov dokázal, že epigenetika hrá významnú úlohu najmä v tumorigenéze. Medzi najväčšie epigenetické zmeny, ktoré sú popisované pri vývoji rakoviny sú chybné metylácie DNA génov a histónové modifikácie chromatinu.

Všeobecne môžeme povedať, že pri epigenetickom fenoméne poznáme dve kategórie kedy na úrovni chromatinu nastáva tzv. transkripčný stav, v ktorom buď dochádza k aktivácii génov alebo k ich odmlke. Históny sú stabilizačné jednotky (proteíny) formujúce chromatin pre tieto dve formy transkripčného stavu. Pomocou histónových modifikácií vznikajú vyššie formy usporiadania chromatinu, ktoré sú definované ako euchromatin (aktívna forma, aktívna transkripcia génu) a heterochromatin (pasívna forma, pasívna transkripcia, odmlka génu). Hypotéza podľa Allisa a Jenuweina (2001) predpokladá, že: a) rozdielne modifikácie na koncoch histónov môžu viesť k afinite chro-

matín asociovaných proteínov, b) modifikácie na rovnakých alebo rozdielnych koncoch histónov môžu byť navzájom závislé a generovať rôzne kombinácie na ktoromkoľvek nukleozóme, c) rozdielna kvalita vysoko usporiadaného chromatinu, ako je euchromatín a heterochromatín, je závislá na lokálnej koncentrácii a kombinácii rozdielne modifikovaných nukleozómov. Tento nukleozomálny kód je množinou rôznych epigenetických stavov, ktoré vedú k rozdielnej interpretácii genetickej informácie, ako je aktivácia génu alebo jeho inaktivácia v globálnej rovine, v bunkovej proliferácii alebo bunkovej diferenciácii [2].

Modifikácia histónov sa deje ich acetyláciou. Acetylácia histónov je dynamický proces, ktorý je regulovaný dvoma skupinami enzýmov: histónacetyltransferázou (HAT) a históndeacetylázou (HDA). Kruhlak a kol. (2001) popísali tento málo špecifický jav u buniek, ktoré vstupovali a vystupovali z mitózy [3]. Je to v kontraste s hypotézou o tom, že HAT a HDA ostávajú naviazané na mitotickom chromozóme ako epigenetickým znaku pre postmitotickú aktiváciu genómu. Títo vedci zistili, že enzýmy sa priestorovo reorganizujú a premiestňujú z kondenzovaného chromozómu vtedy, keď bunka vstúpi do mitózy. Význam epigenetickej inaktivácie génu pri rakovine je zrejmý z poznania, že takéto zmeny sú aktuálne v predispozícii pre mutačné zásahy počas progresie tumoru. Všeobecne môžeme povedať, že acetylácia N-koncov histónov vedie k aktívnej forme chromatinu (aktivácia transkripcie, zatiaľ čo metylácia naopak). Metylácia, je druhý mechanizmus pre modifikáciu histónov, kedy sú metylované zvyšky aminokyselín histónov, najčastejšie lyzín. Ďalším epigenetickým dejom je metylácia DNA, pri ktorej dochádza ku naviazaniu metylovej skupiny na sekvenciu DNA, bohatej na výskyt cytozínu a guanínu. Regulácia transkripcie génov týmito epigenetickými mechanizmami sa vyskytuje hlavne u nádorov (Tab.č.1). Napríklad, pre mismatch-repair gén MLH1 (mutL homologue 1, colon cancer, non-polyposis type 2), ktorý je často hypermetylovaný v tumoroch vyznačujúcich sa mikrosatelitnou instabilitou („min“). Karcinómy s „min“ fenotypom sú spojené s defektami DNA- mismatch repair génov [4]. Tieto zmeny v metylácii 5' konca MLH1 boli objavené aj v normálnych epiteliálnych bunkách čreva pacientov s rakovinou hrubého čreva. Metylguanínmetyltransferáza (MGMT) je ďalším z DNA-repair génov, ktorých deaktivácia je spojená s metyláciou promótoru v karcinóme hrubého čreva, pľúc, lymfatických uzlín, atď. Tumory s neaktívnymi MGMT alelami, sú predisponované pre mutácie kľúčových génov ako je p53 a K-RAS [5;6].

Farmakogenetika MDR1/ABCB1 génu

Farmakogenetika bola spočiatku striktnie vyhradená výskumu enzýmov zúčastňujúcich sa metabolizmu liečiv. V súčasnosti sa jej záber rozšíril na transportéry liečiv, receptory a rôzne iné cieľové molekuly, ktoré môžu nejakým spôsobom modulovať odpoveď na liečivo. Cieľom farmakogenetiky v nasledujúcich rokoch bude zreteľné objasnenie klinických konsekvencií 2-3 miliónov polymorfizmov jedného nukleotidu (SNP, single nucleotide polymorphisms).

Za posledné roky sa urobil obrovský pokrok v porozumení procesov zahrnutých do absorpcie a distribúcie liečiv. Doposiaľ sa predpokladalo, že absorpcia z gastrointesti-

nálneho traktu do organizmu je prevažne pasívny proces, závislý hlavne od veľkosti molekúl, rozpustnosti, lipofility, disociačnej konštanty liečiva a pH intestinálnej tekutiny. Ďalší prestup liečiva z krvi do tkaniva sa odohrával pomocou fyzikálno-chemických dejov a väzbových proteínov. Dnes je však jasné, že transportné proteíny lokalizované v plazmatickej membráne rôznych tkanív hrajú rovnako dôležitú úlohu vo farmakokinetike liečiv. Lokalizované sú v čreve, hepatálnych a renálnych epiteliálnych bunkách. Majú významnú úlohu pri zacielení liečiva na konkrétny orgán, pretože sú lokalizované v hematoencefalickej a placéntárnej bariére. Patria sem proteíny v súčasnosti radené k mechanizmom mohopčetnej liekovej rezistencie (MDR), ako sú MDR1, MRP, LRP, nukleozid transportné proteíny, ktoré prenášajú nielen endogénne zlúčeniny, ale aj exogénne látky, hlavne už spomenuté liečivá. Produktu MDR1 génu, P-gp, sa venuje najväčšia pozornosť.

Tabuľka č.1.: Typy nádorov a génov regulovaných epigenetickými mechanizmami

NÁDOR	GÉNY
Prsník	p16, BRCA1, GSTP1, DAPK, CDH1, TIMP-3
Mozog	p16, p14ARF, MGMT, TIMP-3
Močový mechúr	p16, DAPK, APC
Hrubé črevo	p16, p14ARF, MGMT, hMLH1, TIMP-3, DAPK, APC
Oblčky	p16, p14ARF, MGMT, GSTP1, TIMP-3, APC
Leukémia	p15, MGMT, DAPK1, CDH1, p73
Lymfóm	p16, p15, MGMT DAPK, p73
Pľúca	p16, p14ARF, MGMT, GSTP1, DAPK, FHIT, TIMP-3, RARB, RASSF1A
Ovária	p16, BRCA1, DAPK

Vysvetlivky: BRCA1 breast carcinoma 1, GSTP1 glutathione S-transferase P1, DAPK death-associated protein kinase, CDH1 E cadherin, TIMP-3 tissue inhibitor of metalloprotease 3, MGMT O6-methylguanine DNA methyltransferase, APC adenomatous polyposis coli, FHIT fragile histidine triad, RARB retinoic acid receptor beta, RASSF1A RAS association domain family protein 1A.

Význam MDR1/Pgp polymorfizmu vo farmakoterapii

Proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR1/Pgp) sme ako objekt nášho vedeckého záujmu vybrali zo skupiny proteínov pre jeho vzrastajúcu úlohu ako transportéra liečiv vo farmakokinetickom a farmakodynamickom profile určitých liečiv. Je produktom MDR1 génu a je jednou z najlepšie charakterizovaných molekúl zo skupiny MDR proteínov. Je prototypom membránového transportného systému v MDR. Zúčastňuje sa transportu širokého spektra substrátov, zahŕňujúc aj niektoré antineoplastické látky, resp. liečivá. MDR1/Pgp sa exprimuje v normálnom ľudskom tkanive ako sú obličky, pečeň, tenké črevo a endotelové bunky hemato-encefalickej bariéry. Doposiaľ sa nepodarilo signifikantne potvrdiť, či je funkčnosť závislá od celkovej cytoplazmatickej expresie versus selektívnej membránovej expresie. Klinický význam MDR1/Pgp závisí od lokalizácie v ľudskom tkanive, terapeutického indexu substrátov liečiv a individuálnej variability.

Gén MDR1 je lokalizovaný na chromozóme 7q21, s 28 exónmi. Produkt je tvorený 1280 aminokyselinami.

V súčasnosti boli popísané niektoré prirodzene sa vyskytujúce polymorfizmy MDR1 génu, ktoré boli korelované s potenciálnym klinickým významom, hladinou expresie MDR1/Pgp v tkanive alebo biologickej dostupnosti orálne podaných liečiv. Objavili sa náznaky, že miera indukcie MDR1/Pgp a interaktívny profil MDR1/Pgp substrátov je závislá od MDR1 polymorfizmu. Všetky doteraz známe mutácie MDR1 génu sú polymorfizmy jedného nukleotidu, a niektoré sú spojené so zámenou aminokyselín. Celková delécia génu, delécia nukleotidu alebo zmeny, ktoré spôsobujú nenormálnu transkripciu zatiaľ neboli popísané. C/T tranzícia v mieste 3435 na exóne (C3435T) nemení sekvenciu aminokyselín. Prvému systematickému triedeniu mutácií MDR1 génu sa venoval Hoffmeyer so spolupracovníkmi [6], ktorí objavili a popísali 15 mutácií. V súčasnosti je známych 28 SNP, pričom mutácie na exóne 21 (G2677T) a na exóne 26 (C3435T) sú najzaujímavejšie, pretože súvisia s rozdielnou expresiou a/alebo funkciou MDR1/Pgp [7]. V čreve bola dokázaná napríklad dvojnásobne znížená expresia MDR1/Pgp u pacientov, ktorí boli homozygoti pre 3435T alelu na exóne 26. Na základe tejto nízkej expresie MDR1 génu môžeme predpokladať pomer a stupeň biologickej dostupnosti MDR1/Pgp substrátov, ktorý by mal byť vyšší ako u tých, čo majú divoký typ génu. Toto tvrdenie, že rozdiely sú v C_{max} (maximálna koncentrácia v plazme), T_{max} (čas vrcholu plazmatickej koncentrácia) a AUC (plocha pod krivkou) pre digoxín, ktorý je substrátom MDR1/Pgp, bolo dokázané v mnohých štúdiách [8]. Molekulárny mechanizmus zodpovedný za zníženú expresiu MDR1/Pgp spojenú s SNP na exóne 26 nie je doteraz známy. Mutácia na exóne 26 je tzv. „tichá“ mutácia a je na kodóne lokalizovaná v pozícii „wobble“, čo znamená nestálejšie, kmitavejšie. Nízka expresia proteínu spojená s 3435T genotypom by mohla byť dôsledkom buď redukcie translačnej efektivity (pretože tento kodón je zriedkavo využitý) alebo dochádza k alelovo-špecifickej rozdielnosti v skladaní RNA vplyvom pozitívnej regulácie a mRNA zostrihu, spracovania a translačnej kontroly. Ďalšou možnosťou je existencia väzby nerovnováhy s druhou mutáciou na MDR1 géne. Taktiež boli pozorované etnické rozdiely vo frekvencii niekoľkých SNP MDR1 génu.

Epigenetické zmeny regulujúce expresiu MDR1/Pgp génu

V jednej z prvých štúdií je génová regulácia transkripcijnej aktivity MDR1/Pgp génu demonštrovaná v experimentoch s použitím senzitivných a rezistentných bunkových línii. Predpokladalo sa, že bunka senzitivná na liečivo by nemala mať aktivovaný promótor, zatiaľ čo rezistentné bunky by mali mať túto aktivitu zvýšenú a mala by byť odrazom rozdielnosti endogénnej expresie aktivátorov v týchto bunkách. Prekvapujúce však bolo, že aktivita promótoru bola v protirečení s endogénne zvýšenou expresiou MDR1/Pgp. Tieto diskrepancie v zápise a endogénnej expresii génu boli prisúdené rozdielnej schéme metylácie. Je pravdepodobné, že absencia metylácie CpG miest, úseky DNA bohaté na cytozín a guanín, v zápise štruktúry génovej expresie sa odráža v oboch typoch buniek, rezistentných alebo senzitivných. Z publikovaných výsledkov sa dá predpokladať, že MDR1/Pgp promótor je chránený metyláciou [9-12]. Promótor MDR1/Pgp génu je rozdielne metylovaný v senzitivných bunkách (neexprimujú MDR1) a rezistentných

bunkách (exprimujú MDR1). Promótor je hypometylovaný v bunkách rezistentných na chemoterapiu a hypermetylovaný v bunkách, ktoré sú negatívne na prítomnosť MDR1. Mapa metyl-CpG štruktúr v promótoch ľudského MDR1/Pgp bola kompletizovaná a ukazuje, že promótor je vždy hypermetylovaný v bunkách senzitivných na liečivo (lína CEM-CCRF), kým v rezistentných bunkách (lína CEM-A7) je vždy hypometylovaný. Ak boli senzitivné bunky CEM-CCRF vystavené účinku demetylačného činidla 5_aza-2_deoxycytidínu (5-adC), bolo zistené, že výsledkom demetylácie je aktivácia génu a taktiež, metylačný profil promótoru v takto liečených bunkách sa začal podobáť na rezistentné bunky [13].

Epigenetický status MDR1/Pgp je významný aj napriek nepoznaným parametrom, ktoré by ho mohli charakterizovať. V zmysle sledovania rôznych molekulárnych determinantov spojených s MDR1 promótorom, sú senzitivné a rezistentné bunkové línie epigeneticky ovplyvňované 5-azacytidínom (demetylačné činidlo, inhibitor metyltransferázy, látka s mutagénym a cytotoxickým účinkom), alebo TSA, trichostatin A (inhibitor histón deacetylázy HDA, indukuje apoptózu, inhibuje bunkový cyklus v S a S/M fáze). DNA metylácia udržiava neaktívny stav MDR1/Pgp génu v senzitivných bunkách tým, že chromatinová štruktúra je neprístupná transkripcijným dejom.

Klinický význam metylácie MDR1 génu

Je potrebné zdôrazniť, že najlepším modelom pre DNA metylačné analýzy sú immortalizované bunkové línie získané z nádorových buniek. Tieto bunkové kultúry permanentne poskytujú homogénnu bunkovú populáciu, s ktorou sa pohodlne pracuje a vytvára sa tak priestor pre množstvo experimentov. Inkubácie nádorových buniek s metylačnými inhibítormi priamo poukazujú na významnú úlohu metylácie v procese transkripcie. Táto úloha je veľmi kvalitne etablovaná v represii génov buniek nádorových línii. Ako je to však s epigenetickým profilom MDR1/Pgp v primárnych bunkách nádorov? Táto otázka bola študovaná aj v jednej z posledných prác o metylácii MDR1/Pgp génu pri akútnej myeloidnej leukémii (AML) [14]. Približne 20% pacientov s AML vykazuje rezistenciu na primárnu liečbu a táto je súčasne spojená so zvýšenou expresiou MDR1/Pgp [15;16]. Nakayama a kol. (1998) demonštrovali inverznú koreláciu medzi expresiou MDR1 génu a metylačným statusom 5_konca promótoru u AML pacientov [17]. V tej istej štúdií títo autori skúmali metyláciu a expresiu génu počas klinickej liečby s prekvapujúcimi výsledkami. Počet pacientov s charakteristickým hypermetylovaným promótorom klesal zo 66% pri stanovení diagnózy do 0% pri dosiahnutí relapsu s neúčinnou terapiou. Metylačný stav bol skúmaný v ďalšej AML štúdií, kde bolo potvrdené, že metylácia hrá dôležitú úlohu pri deaktivácii a umlčaní génu [18]. Všeobecne by sa dalo povedať, že pri AML rezistentnej na terapiu alebo v relapse je expresia MDR1 génu vyššia ako u *de novo* leukémií a súvisí s metyláciou génu. Netreba však zabúdať na to, že okrem MDR1 génu sa mnohopočetnej liekovej rezistencie zúčastňujú aj iné mechanizmy ako napr. MRP (multidrug resistance-associated protein) alebo LRP (lung resistance related protein), kde aj u týchto bola pozorovaná zvýšená expresia [19]. Imunohistochemicky bola zvýšená expresia vyššie spomínaných proteínov detekovaná u solídnych tumorov (kolorektálneho karcinómu, ale

hlavne u pľúcneho karcinómu), kde bola nájdená korelácia medzi typom karcinómu a pozitívnou expresiou LRP a MRP [20-22].

Stupeň a rozsah DNA demetylácie MDR1 a neprimeranú aktiváciu exprese po chemoterapii je potrebné čo najskôr objasniť. Nie je zjavné, či sa demetylácia vyskytuje v subpopulácii buniek, ktoré aktívne proliferujú. Známe však je, že expresia MDR1 génu je často zvýšená počas klinickej liečby myeloidnej leukémie a karcinómu močového mechúra [23;24]. Získanie MDR1 sprostredkovanej liekovej rezistencie počas chemoterapie sa deje pomocou selekcie rezistentných kmeňov buniek a rýchle zvýšenie regulácie génu je pozorované po priamej expozícii antracyklínom a ich analógom [25].

Perspektíva štúdia polymorfizmov MDR1 génu

Viacero štúdií sa venovalo zisteniu asociácií MDR1 exónu 21 a 26 genotypu, resp. haplotypu, s dispozíciou účinku alebo nežiaduceho účinku MDR1/Pgp substrátov. Stále však pretrvávajú kontroverzie či, a v akom rozmere, je farmakokinetika a farmakodynamika liečiv modifikovaná rozličnými genotypmi (haplotypmi). Tak ako aj pre ostatné klinické alebo laboratórne testy platí otázka, akú informáciu nimi získame. Pozitívna alebo negatívna výpoveď genetických testov bude závislá od toho, či daný gén pôsobí na expresiu proteínu a/alebo funkciu enzýmu s veľkým, stredným alebo minimálnym účinkom. Je dôležité vedieť, že existuje rozdiel medzi polymorfizmami MDR1 a génmi zodpovednými za metabolizmus liečiv. V prípade cytochrómu P450D6, sú mutácie spôsobujúce stratu funkcie alebo amplifikáciu génu častejšie a v populácii sa viac manifestujú jasným fenotypom. Ide o nízky, stredný a ultrarýchly metabolizér. Toto je však v kontraste s mutáciami v MDR1 géne, kde nedochádza k jednoznačnej strate funkcie. Rozdiely pri jednotlivých genotypoch sú s ohľadom na expresiu proteínu veľmi mierne v porovnaní s inými génmi (CYP2D6). V tomto konkrétnom prípade je rozdiel 8-10 násobne väčší v porovnaní s iba dvojnásobným

rozdielom v expresii MDR1/Pgp u rôznych tkanív s genotypom 3435CC vs 3435TT [26]. Táto skutočnosť nám s ohľadom na genetiku naznačuje, že pri modifikácii exprese a funkcie MDR1/Pgp hrajú dôležitú úlohu aj negatívne faktory. Napriek tomu však, spojenie SNP s expresiou proteínu alebo zmenou kinetiky MDR1/Pgp substrátov naznačuje, že MDR1/Pgp je hlavným determinantom v absorpcii, distribúcii a eliminácii niektorých liečiv. Rôzne množstvo faktorov ako je stravovanie, rasa a stav ochorenia, môže interindividuálne vplývať na variabilitu farmakokinetiky a farmakodynamiky výsledného efektu liečby substrátmi MDR1/Pgp. Predpokladáme, že genetické variácie v MDR1 géne sú primárnym determinantom tejto variability a potvrdzuje to aj mnoho spomínaných vedeckých štúdií. Z predbežných výsledkov našich štúdií sme zistili, že C3435T polymorfizmus môže vplývať na klinickú odpoveď u detskej ALL. Homozygoti pre CC alelu majú horšiu prognózu prežívania a odpovede na liečbu v porovnaní s jedincami, ktorí sú nositeľmi CT alebo TT alel [27]. Klinické využitie genotypizácie by mohlo teda v budúcnosti zvýšiť precíznosť pri predpovedi transportnej aktivity nielen MDR1/Pgp. Je zjavné, že je potrebná identifikácia špecifickejších liečiv pre MDR1/Pgp. Interpretácia takto syntetizovaných výsledkov bude oveľa presnejšia a bude sa bližšie k všeobecnému cieľu modernej onkologickej liečby - „terapie šitej na mieru pacienta“.

Ďakovanie

Dovoľujeme si poďakovať spolupracovníkom na Ústave farmakológie LF UPJŠ za cenné rady a pripomienky. Za spoluprácu pri riešení projektov ďakujeme doc. MUDr. Márii Wágnerovej CSc., prim. MUDr. Irine Oravkinevej, prof. MUDr. Vladimírovi Mihálovi, CSc., doc. MUDr. Marianovi Hajdúchovi PhD.

Grantová úloha je podporovaná grantom VEGA 1/2266/05, VEGA 1/3372/06

Za finálnu pomoc a podporu ďakujeme aj Lige proti rakovine SR.

Literatúra

- 1 Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-254.
- 2 Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 10-8-2001;293:1074-1080.
- 3 Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang XJ, Verdine E, Bazett-Jones DP: Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem* 12-10-2001;276:38307-38319.
- 4 Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1-3-1997;57:808-811.
- 5 Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaur-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodriguez R, Capella G, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylín SB, Herman JG: DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 15-12-2001;10:3001-3007.
- 6 Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28-3-2000;97:3473-3478.
- 7 Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF: Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
- 8 Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P, Funck-Brentano C, Becquemont L: Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;58:809-812.
- 9 El Osta A, Kantharidis P, Zalcberg JR, Wolffe AP: Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 2002;22:1844-1857.
- 10] Desiderato L, Davey MW, Piper AA: Demethylation of the human MDR1 5' region accompanies activation of P-glycoprotein expression in a HL60 multidrug resistant subline. *Somat Cell Mol Genet* 1997;23:391-400.

- 11 Kusaba H, Nakayama M, Harada T, Torigoe K, Green ED, Scherer SW, Kohno K, Kuwano M, Wada M: Maintenance of hypomethylation status and preferential expression of exogenous human MDR1/PGY1 gene in mouse L cells by YAC mediated transfer. *Somat Cell Mol Genet* 1997;23:259-274.
- 12 Kantharidis P, El Osta A, deSilva M, Wall DM, Hu XF, Slater A, Nadelin G, Parkin JD, Zalcberg JR: Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 1997;3:2025-2032.
- 13 Kantharidis P, El Osta A, deSilva M, Wall DM, Hu XF, Slater A, Nadelin G, Parkin JD, Zalcberg JR: Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 1997;3:2025-2032.
- 14 Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R, Kuwano M: Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1-12-1998;92:4296-4307.
- 15 Marie JP, Zittoun R, Sikic BI: Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1-8-1991;78:586-592.
- 16 Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, Utsunomiya A, Makino T, Ishibashi K, Kodama M, Iwahashi M, Arima T, Akiyama S: Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* 1-9-1990;66:868-873.
- 17 Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R, Kuwano M: Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1-12-1998;92:4296-4307.
- 18 Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP: Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 1-5-2001;97:2823-2829.
- 19 Sonneveld P: Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med* 2000;247:521-534.
- 20 Rybarova S, Hajdukova M, Hodorova I, Kocisova M, Boor A, Brabcenova E, Kasan P, Biroš E, Mojzis J, Mirossay L: Expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and the lung resistance-related protein (LRP) in human lung cancer. *Neoplasma* 2004;51:169-174.
- 21 Rybarova S, Boor A, Jurkovic I, Kocan P: Expression of LRP—lung resistance-related protein in the normal colorectal mucosa and in colorectal carcinoma. *Bratisl Lek Listy* 2003;104:179-183.
- 22 Rybarova S, Batekova M, Hodorova I, Mirossay A, Kluchova D, Bobrov N, Kocisova M: Immunohistochemical detection of LRP protein in the normal human lung. *Bratisl Lek Listy* 2001;102:66-72.
- 23 Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R, Kuwano M: Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1-12-1998;92:4296-4307.
- 24 Tada Y, Wada M, Kuroiwa K, Kinugawa N, Harada T, Nagayama J, Nakagawa M, Naito S, Kuwano M: MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clin Cancer Res* 2000;6:4618-4627.
- 25 Hu XF, Slater A, Rischin D, Kantharidis P, Parkin JD, Zalcberg J: Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line. *Br J Cancer* 1999;79:831-837.
- 26 Hitzl M, Drescher S, van der KH, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF: The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11:293-298.
- 27 Mirossay A., Oravkinova, I., Galova, N., Jenco, I., Sarický, M., Mojzis, J., Hajduch, M., Mihal., V., Novak, Z., Mirossay, L.: Impact of C3435T MDR1 polymorphism on clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ped. Blood Cancer* 45, p. 403, 2005.

Došlo: 31. 5. 2006
Přijato: 15. 8. 2006