

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK NA LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

WSTĘP

Chemioterapia, stosowana od lat jako jeden z niezbędnych elementów w leczeniu chorób nowotworowych, ma na celu zniszczenie komórek nowotworowych przy jak najmniejszych uszkodzeniach komórek nosiciela nowotworu. Jak dotąd nie ma jednak związków, które by wybiórczo niszczyły komórki nowotworowe. Obecnie stosowane strategie chemioterapeutyczne są ukierunkowane, na ogół, na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych poprzez upośledzenie procesów metabolicznych, niezbędnych dla prawidłowego przebiegu podziałów komórkowych. Stosuje się też procedury prowadzące do upośledzenia procesów biochemicznych charakterystycznych wyłącznie dla określonego typu nowotworu (RIMINGTON i RILEY 1993, DIETEL 1991). Mówi się wówczas o biochemicznej kontroli proliferacji przez leki, które stanowią bądź naturalne, bądź też syntetyczne analogi podstawowych metabolitów i kofaktorów. Szerokie zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe znalazły:

- związki hamujące syntezę prekursorów kwasów nukleinowych — puryn i pirymidyn,
- związki oddziałujące z DNA i zakłócające dzięki temu przebieg replikacji i translacji,
- związki hamujące syntezę białek czy też lipidowych składników błon komórkowych,
- ostatnio także związki przeciwdziałające stymulacji komórek do podziałów przez czynniki egzogenne.

Skuteczność działania takich leków ogranicza jednak pojawiająca się oporność, to jest brak wrażliwości komórek na podawany lek. Oporność stwierdzaną już po pierwszym podaniu leku określa się jako oporność wrodzoną. Częściej jednak oporność pojawia się jako niekorzystny efekt wielokrotnego podawania leku — mówimy wówczas o oporności nabytej. Wytworzona oporność bywa nietrwała lub trwała, występująca również w komórkach po usunięciu leku.

Oporność komórek może także wynikać z różnej wrażliwości na lek komórek będących w różnych fazach cyklu komórkowego.

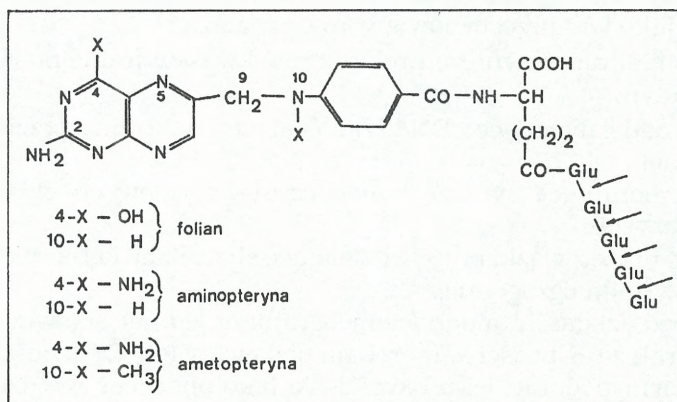
Najczęściej populacje komórek opornych otrzymuje się jako wynik selekcji komórek opornych, obecnych pierwotnie w badanej populacji. Mogą też pojawiać się one w rezultacie zmian ekspresji pewnych genów pod wpływem różnych czynników środowiskowych. Niestabilność genomu komórek nowotworowych sprawia, że właśnie w ich populacjach często pojawiają się komórki odporne. Mechanizmy prowadzące do powstawania oporności są różnorodne i wydaje się, że podobne mechanizmy mogą powodować zarówno oporność wrodzoną komórek, jak i nabytą. Mechanizmy te mogą polegać przede wszystkim na zmianach ilości i właściwości wewnątrzkomórkowych składników, przeciw którym podany lek został zastosowany. Mogą dotyczyć zmian charakterystyki transportu leków do komórek, jak i ich usuwania. Mogą też być związane ze zmienioną wewnątrzkomórkową aktywacją lub dezaktywacją leku. Często też polegają na zwiększeniu wydolności szlaków zastępczych. Mechanizmy warunkujące oporność komórek na leki przedstawię omawiając oporność na: antymetabolity, a w szczególności na analogi folianu i fluoropirymidyny, związki alkilujące — na przykładzie cis-platyny oraz związki heterocykliczne odpowiedzialne za wystąpienie tak zwanej oporności wielolekowej.

OPORNOŚĆ NA ANTYMETABOLITY

ANALOGI FOLIANU

Budowa i działanie

Analogi folianu stanowią ważną grupę związków o działaniu terapeutycznym, stosuje się je jako leki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i antyzapalne. W odróżnieniu od analogów puryn, pirymidyn i ich nukleozydów, antyfoliany nie są włączane do kwasów nukleinowych i w związku z tym nie przejawiają własności karcynogennych. Jako antyfoliany traktuje się różne pochodne kwasu foliowego, w tym analogi aminowe (aminopteryna, ametoptyeryna, ryc. 1), chi-

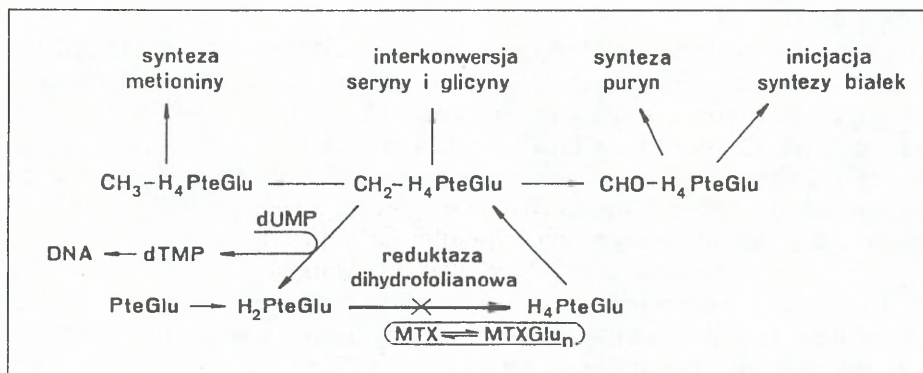


Ryc. 1. Struktura folianów i aminofolianów — aminopteryny i ametoptyeryny.

Strzałką oznaczono wiązania rozkładane przez γ -glutamylhydrolazę.

nazolinowe (na przykład metaskwin, CB 3717), pirymidynowe (trimetoprim, DDMP), trójazynowe (analog Bakera-T2T) i homofoliany (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b). Niemalże wszystkie stosowane dotychczas analogi folianu są inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej, enzymu kluczowego w powstawaniu tetrahydrofolianu i koenzymatycznych form folianu, a w efekcie w biosyntezie tymidylanu i syntezie DNA. Niektóre tylko antyfoliany (antyfoliany chinazolino- we) są inhibitorami bezpośrednio syntazy tymidylanowej.

Konsekwencje metaboliczne zahamowania przez antyfoliany powstawania tetrahydrofolianu nie ograniczają się jedynie do zahamowania syntezy DNA (ryc. 2). Obniżenie wewnątrzkomórkowej puli uwodorowanych pochodnych foliano- wych pociąga też za sobą zaburzenia biosyntezy szeregu aminokwasów i puryn, co w efekcie może prowadzić do śmierci komórek (MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1978, ZIELIŃSKA 1981, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1977, 1983a i b, BALIŃSKA 1988). Aminowe analogi folianu, aminopteryna i ametoptyeryna, zsyntetyzowane już w połowie lat czterdziestych, są jednymi z najczęściej stosowanych do chwili obecnej leków przeciwnowotworowych w leczeniu przede wszystkim limfomy Burkitta, kosmówczaka i ostrej białaczki limfocytarnej, a także nowotworów piersi, głowy i pęcherza (SCHWEITZER i współaut. 1990, BERTINO 1993). Stosowa- nie antyfolianów jako cytostatyków w dużym stopniu ogranicza jednak ich toksyczność. Jest to przede wszystkim mielosupresja i zaburzenia funkcjonowa- nia przewodu pokarmowego. Ponadto pojawia się oporność zarówno wrodzona, jak i nabywana w czasie trwania terapii.



Ryc. 2. Udział koenzymatycznych pochodnych folianowych w procesach metabolicznych.

Przekreślona strzałka oznacza hamowanie aktywności reduktazy dihydrofolianowej przez ameto- pteryne (MTX) i jej poliglutamylowe pochodne. Skróty: PteGlu — folian; H₂PteGlu — dihydrofolian; H₄PteGlu — tetrahydrofolian; CH₃-H₄PteGlu, CH₂-H₄PteGlu, CHO-H₄PteGlu — odpowiednio metylo-, metyleno- i formylo-tetrahydrofoliany; dUMP — deoksyuridyndymonofosforan; dTMP — deoksy- tymidynomonofosforan.

Oporność komórek na działanie antyfolianów może wynikać z upośledzenia ich transportu do komórek, zaburzeń ich wewnątrzkomórkowego metabolizmu, a zwłaszcza zmian ilości i właściwości enzymu docelowego, reduktazy dihydrofo- lianowej i/lub syntazy tymidylanowej. Poziom oporności komórek może też

zależać od wielkości wewnątrzkomórkowej puli folianu oraz puli metabolitów, puryn i tymidylanu, których biosyntezę upośledzają antyfoliany.

Oporność wynikająca ze wzrostu ilości i zmian właściwości reduktazy dihydrofolianowej

Wzmożenie syntezy reduktazy dihydrofolianowej, a w konsekwencji wzrost jej zawartości w hodowanych *in vitro* mysich komórkach po traktowaniu antyfolianami wykryto już na początku lat sześćdziesiątych. Podobny wzrost syntezy tego enzymu znaleziono następnie w wielu komórkach nowotworowych poddanych działaniu antyfolianów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, HAUS 1990a). Ilość reduktazy dihydrofolianowej w komórkach opornych na antyfoliany może sięgać nawet od kilku do kilkunastu procent rozpuszczalnych białek komórkowych. Wzrost ilości reduktazy dihydrofolianowej jest często wynikiem zwielokrotnienia w komórkach liczby kopii genu kodującego ten enzym (SCHIMKE 1986). Amplifikację genu reduktazy dihydrofolianowej znaleziono również w nowotworach pacjentów leczonych ametoptyryną (SCHWEITZER i współaut. 1990). Należy zaznaczyć, że zwielokrotnienie liczby kopii genu prowadzące do wzrostu syntezy enzymów docelowych może zachodzić także pod wpływem innych niż antyfoliany leków i związków, takich jak na przykład hydroksymocznik, pALA, 6-azaurydyna, DFMO i inne (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983b). Umieszczenie zwielokrotnionego genu reduktazy dihydrofolianowej bądź to w chromosomach (w homogenicznie barwiących się fragmentach), bądź też w elementach pozachromosomalnych, tak zwanych chromosomach minutowych, decyduje o trwałości bądź też nietrwałości pojawiającej się oporności (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, BIEDLER 1994).

Gen reduktazy dihydrofolianowej jest transkrybowany konstytutywnie (FARNHAM i SCHIMKE 1985), a szereg fizjologicznych i środowiskowych czynników jest zdolnych do modulowania jego ekspresji (LEVINE i współaut. 1985, MARIANI i SCHIMKE 1984, COWAN i współaut. 1986). Jako aktywatory transkrypcji genu reduktazy dihydrofolianowej działają też produkty białkowe onkogenów *c-myc* (DENIS i współaut. 1991) i *Ha-ras* (WANI i współaut. 1994), jednakże mechanizm tej aktywacji pozostaje jeszcze niewyjaśniony. W promotorze genu reduktazy występują dwie sekwencje „G/C box” (CHEN i współaut. 1984), specyficznie wiążące czynnik transkrypcyjny SP1. Obecność tych sekwencji jest niezbędna dla aktywności transkrypcyjnej genu reduktazy (DYNAN i współaut. 1986, FARNHAM i SCHIMKE 1985, 1986, BLUME i współaut. 1991).

Transkryptem genu reduktazy dihydrofolianowej jest na ogół kilka różniących się wielkością (± 1600 nukleotydów) cytoplazmatycznych mRNA, których translacja prowadzi do syntezy dwóch form reduktazy różniących się nieco ciężarem cząsteczkowym (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, SCHWEITZER i współaut. 1990). W większości komórek opornych na antyfoliany, charakteryzujących się obecnością zwiększonych ilości reduktazy dihydrofolianowej, nie obserwuje się na ogół zmian właściwości tego enzymu. W niektórych jednak komórkach może dojść do zintensyfikowania syntezy reduktazy dihydrofolianowej o zmienionych właściwościach (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a, SCHWEITZER i współaut. 1990), opisywano również komórki, w których wykrywa się jednocześnie prawidłową i zmienioną formę tego enzymu (MELERA i współaut. 1984). „Zmienione” reduktazy dihydrofolianowe charakteryzuje przede wszystkim zna-

czący wzrost wartości stałej inhibicji K_i dla ametoptyryny, a więc obniżenie powinowactwa enzymu do inhibitora i niewielki spadek powinowactwa do substratów — dihydrofolianu i NADPH (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b). W ostatnich latach wyjaśniono, że za obniżenie powinowactwa reduktazy dihydrofolianowej wobec antyfolianów są odpowiedzialne mutacje prowadzące do zastąpienia leżących w centrum aktywnym enzymu fenyloalanin (SCHWEITZER i współaut. 1989, MORRIS i McIVOR 1994), leucyny (MELERA i współaut. 1984, MORRIS i McIVOR 1994) bądź asparaginianu (YU i MELERA 1993) przez inne aminokwasy. Doniesiono też o wystąpieniu oporności na antyfoliany *in vivo* będącej efektem mutacji i zmian aminokwasowych poza centrum aktywnym reduktazy dihydrofolianowej (DICKER i współaut. 1993).

Oporność wynikająca ze zmian w charakterystyce transportu leków

Za pojawienie się oporności na antyfoliany mogą być również odpowiedzialne zmiany właściwości i ilości białek błonowych uczestniczących w ich transporcie do komórek. W transporcie antyfolianów do komórek uczestniczy błonowy nośnik, który w warunkach fizjologicznych przenosi przede wszystkim uwodowane koenzymatyczne pochodne folianowe (HUENNEKENS i współaut. 1978). Transportowi tych związków towarzyszy przemieszczanie przez błonę anionów (HENDERSON 1986). Szereg komórek, zwłaszcza adaptowanych do wzrostu w obecności bardzo niskich stężeń folianu, posiada również odrębny błonowy nośnik transportujący zarówno nieuodowane, jak i uwodowane pochodne folianowe (ELWOOD 1989). Internalizacja liganda następuje w tych komórkach w wyniku endocytozy kompleksu transportującego (KAMEN i współaut. 1988). Komórki odporne może cechować obniżenie powinowactwa błonowych nośników do transportowanych antyfolianów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, SCHWEITZER i współaut. 1990) lub zmniejszenie ilości nośników, prawdopodobnie w wyniku obniżonej ekspresji genu kodującego białko transportujące (SAIKAWA i współaut. 1993, HSUEH i DOLNICK 1994).

Oporność związana z metabolizmem leków

Antyfoliany zawierające w swej cząsteczce resztę kwasu glutaminowego, podobnie jak koenzymatyczne pochodne folianowe, ulegają po dostaniu się do komórek poliglutamylacji przeprowadzanej przez syntetazę poliglutaminianową (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1977, BALIŃSKA 1988). Poliglutaminianowe pochodne antyfolianów są znacznie lepiej zatrzymywane w komórkach niż związki zawierające tylko jedną resztę kwasu glutaminowego. Zwiększona retencja poliglutaminianów antyfolianowych przyczynia się do zwiększenia wywoływanych przez nie efektów cytotoksycznych (CHABNER i współaut. 1985). Co więcej, poliglutaminiany folianowe są na ogół efektywniejszymi inhibitorami enzymów docelowych niż formy monoglutaminowe (ALLEGRA i współaut. 1985a, SIKORA i współaut. 1988). Mogą one także stać się inhibitorami enzymów nie hamowanych przez pochodne monoglutaminianowe (ALLEGRA i współaut. 1985b). W ostatnich latach wykazano, że obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu poliglutaminianów antyfolianowych może być odpowiedzialne za wystąpienie oporności. Może być ono wynikiem drastycznego obniżenia aktywności syntetazy poliglutaminianowej (McCLOSKEY i współaut. 1991, SCHWEITZER i współaut. 1990), bądź też zwiększenie aktywności glutamylhydroazy, enzymu odszczepiającego od poli-

glutaminianów reszty kwasu glutaminowego (RHEE i współaut. 1993). Należy podkreślić, że komórki odporne „uruchamiają” najczęściej jednocześnie różne mechanizmy unieczynnijające lek lub uniemożliwiające jego działanie. Coraz więcej danych świadczy o tym, że zastosowany przez eksperymentatora sposób selekcji komórek opornych może decydować, który z mechanizmów ulegnie aktywacji (VAN DER LAAN i współaut. 1991). Komórki odporne, w których upośledzenie poliglutamylacji antyfolianu jest główną przyczyną ich niewrażliwości na ametoptynę, uzyskano w wyniku traktowania ich przez krótki czas antyfolianem w dużych dawkach (PIZZORNO i współaut. 1988), a więc w sposób analogiczny do postępowania klinicznego. Fakt ten, jak również wykazanie, że za wrodzoną oporność na ametoptynę ludzkich komórek fibrosarkomy może być odpowiedzialny także brak poliglutamylacji leku (LI i współaut. 1992), wydaje się mieć duże implikacje kliniczne.

Przewycięzanie oporności na antyfoliany

Procedury stosowane do przewycięzania oporności na antyfoliany są równie liczne jak mechanizmy odpowiedzialne za jej wystąpienie. Jeśli główną przyczyną oporności jest podwyższony poziom reduktazy dihydrofolianowej, to można by stosować lek, który po uwodrośnieniu przeprowadzonym przez reduktazę, hamowałby efektywnie inny ważny metabolicznie enzym, na przykład syntazę tymidylanową. Jak dotąd nie znaleziono jednakże takiego związku, a próby z zastosowaniem homofolianu nie powiodły się. Myśli się też o stosowaniu inhibitorów specyficznie hamujących wyłącznie „zmienioną” reduktazę, a coraz lepsze poznanie struktury zmienionych reduktaz dihydrofolianowych może doprowadzić do zaprojektowania syntezy takich inhibitorów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b).

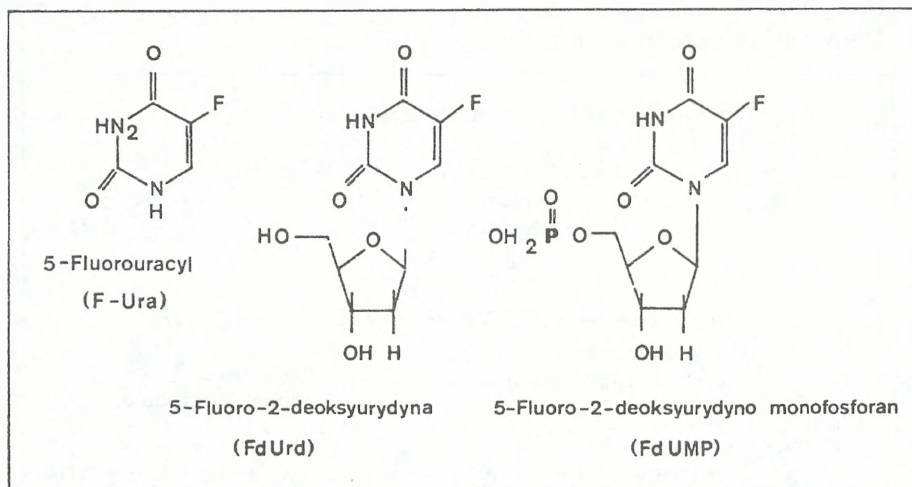
W przypadku, gdy główną przyczyną wystąpienia oporności są zaburzenia pobierania folianu, to celem jej przewycięzania można próbować zwiększać stężenie stosowanego antyfolianu, stosować kompleksy leku z polimerem o dużej zdolności penetracji przez błonę lub stosować lek umieszczony w liposomach. Bardziej jednak efektywne wydaje się stosowanie innych leków, które dostają się do komórek przy udziale innych mechanizmów niż lek, na który wytworzono oporność. Coraz większe zastosowanie znajdują lipofilne antyfoliany, na przykład trimetrexat, lek o szerszym niż ametoptyna spektrum działania, nie ulegający poliglutamylacji (KAMEN i współaut. 1984).

FLUOROPYRIMIDYNY

Budowa i działanie

Fluoropirymidyny — 5-fluorouracyl (FUra) i 5-fluorodeoksyurydyna (FdUrd) (ryc. 3), są od ponad trzydziestu lat stosowane w terapii wielu nowotworów, zwłaszcza nowotworów przewodu pokarmowego (HEIDELBERGER i współaut. 1983, GREM i COLLINS 1990). W odróżnieniu od antyfolianów, które działają cytostatycznie bez aktywacji (poza polyglutamylacją), pobierane przez komórki fluoropirymidyny wymagają w komórce licznych przekształceń metabolicznych zanim przejawia się ich działanie hamujące podziały komórkowe. Związkami efektywnymi są bowiem bądź to mononukleotyd (FdUMP) bądź też trójnukleotyd fluoropirymidyn (FUTP i FdUTP). W przekształceniu fluoropirymidyn

w „aktywne inhibitorowo” pochodne uczestniczą liczne enzymy, metabolity i ko-faktory (ryc. 4), jest więc oczywiste, że odpowiedź komórki na działanie fluoropirymidyn, jak i mechanizmy leżące u podstaw oporności (zarówno wrodzonej jak i nabytej) zależą od wielu czynników i są bardzo złożone (ZHANG i współaut. 1992, Fox i współaut. 1991).



Ryc. 3. Struktura fluoropirymidyn

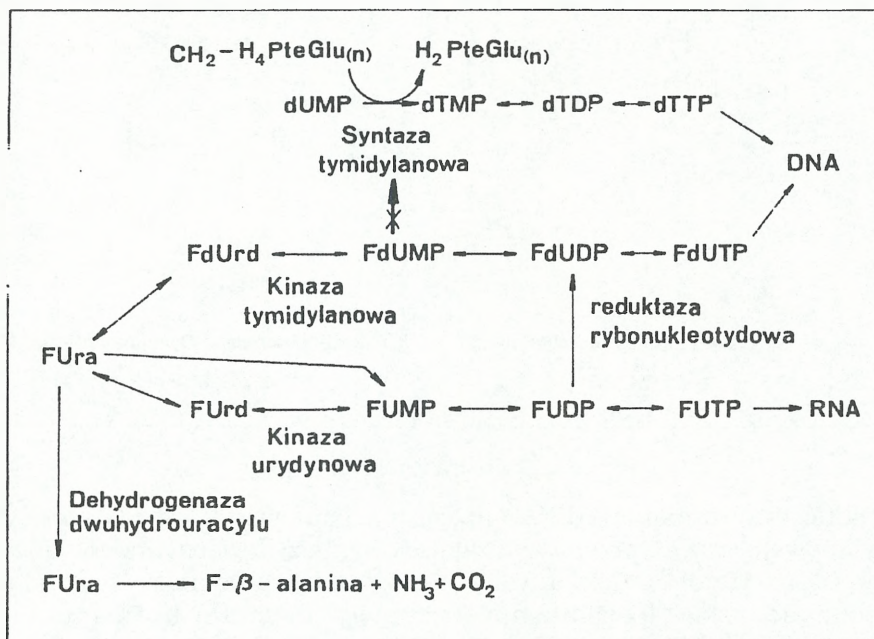
Inhibitorowe działanie FdUMP polega na hamowaniu aktywności syntazy tymidylanowej, enzymu przeprowadzającego syntezę *de novo* nukleotydów tyminowych (RODE 1986). Dzięki utworzeniu kompleksu syntazy tymidylanowej z pochodną folianową (poliglutaminianem metylenotetrahydrofolianu) i inhibitorem nie powstaje dTMP, w efekcie zaś dalszym następują zaburzenia syntezy DNA i jego transkrypcji oraz zakłócenia podziałów komórkowych. Natomiast trójnukleotydy fluorodeoksyurydyny (FdUTP) i fluorourydyny (FUTP) mogą być inkorporowane do DNA i RNA zamiast dTTP i UTP oraz powodować różnego typu uszkodzenia w cząsteczkach kwasów nukleinowych, między innymi pęknięcia nici DNA (CANMAN i współaut. 1992, 1993).

Oporność wynikająca ze wzrostu ilości i właściwości syntazy tymidylanowej

Najlepiej, jak dotąd, zbadanym i często występującym mechanizmem oporności na fluoropirymidyny jest wzrost poziomu syntazy tymidylanowej (WAHSTEIN 1984, JASTREBOFF i współaut. 1983, BERGER i współaut. 1985), lub/i zmiany jej właściwości, jak na przykład obniżenie powinowactwa enzymu do FdUMP (MULKINS i HEIDELBERGER 1982, BAPAT i współaut. 1983, JASTREBOFF i współaut. 1983). Wzrost poziomu syntazy tymidylanowej, wynikający z amplifikacji genu, nie jest na ogół tak duży, jak w przypadku reduktazy dihydrofolianowej. Nie mniej jednak komórki zawierające więcej syntazy tymidylanowej niż komórki macierzyste uzyskują oporność wystarczającą do przeżywania w obecności FdUMP w stężeniach nawet 10^{-5} M (ROSSANA i współaut. 1982).

Inne mechanizmy oporności na fluoropirymidyny i próby ich przewycięzania

Brak cytotoksyczności fluoropirymidyn w stosunku do niektórych komórek opornych może również wiązać się z obniżeniem w nich poziomu aktywności enzymu fosforylującego FdUrd, a mianowicie kinazy tymidyłowej (ROSSANA i współaut. 1982, JASTREBOFF i współaut. 1983). W rezultacie w komórkach nie powstaje FdUMP, inhibitor syntazy tymidyłowej, i w efekcie synteza tymidylanu i DNA nie ulega zakłóceniu.



Ryc. 4. Metaboliczne przekształcenia i miejsca działania fluoropirymidyn.

Przekreślona strzałka oznacza hamowanie syntazy tymidyłowej przez FdUMP. Skróty: dTMP, dTDP i dTTP — odpowiednio mono-, di- i trifosforany deoksytymidyny; FdUrd — 5-fluoro-2-deoksyurydyna; FdUMP, FdUDP, FdUTP — fluorowe pochodne mono-, di- i trifosforanów deoksyurydyny; FdUra — fluorouracyl; FdUrd — fluorourydyna; FUMP, FUDP i FUTP — fluorowe pochodne mono-, di- i trifosforanów urydyny; F-β-alanina — fluoro-β-alanina. Pozostałe skróty wyjaśniono pod ryc. 2.

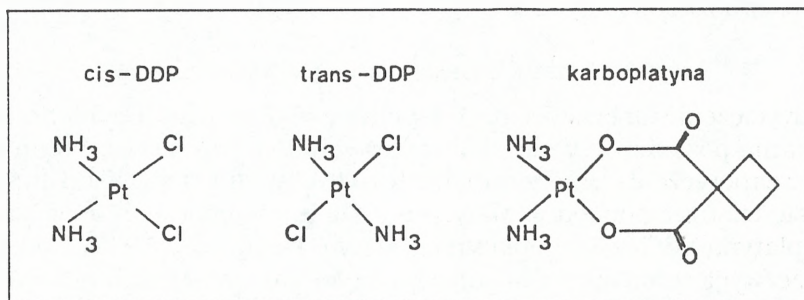
Ostatnio doniesiono, że do oporności komórek na fluoropirymidyny może przyczyniać się także wzrost aktywności trójfosfatazy deoksyurydynowej pociągający za sobą spadek wewnątrzkomórkowej akumulacji dUTP (CANMAN i współaut. 1993). Jako nowy mechanizm oporności na fluorouracyl można też traktować obniżoną zdolność komórek do tworzenia właściwego folianowego substratu syntazy tymidyłowej, na skutek obniżenia ekspresji genu syntetazy poliglutaminianowej przeprowadzającej poliglutamylację metylenotetrahydrofolianu (WANG i współaut. 1993).

Przeciwdziałanie oporności na fluoropirymidyny najczęściej polega na próbach zwiększenia ich cytotoksyczności. Dokonuje się to przede wszystkim poprzez podwyższenie wewnątrzkomórkowej puli zredukowanych folianów, będących jednymi z substratów w reakcji katalizowanej przez syntazę tymidyłową.

wą (na przykład SPEARS i współaut. 1988). Ułatwia to powstanie trójskładnikowego kompleksu syntazy tymidylanowej z pochodną folianową i inhibitorem i „wyłączenie” funkcjonowania enzymu.

OPORNOŚĆ NA ZWIĄZKI ALKILUJĄCE NA PRZYKŁADZIE CIS-PLATYNY

Liczne dwufunkcyjne związki alkilujące, takie jak na przykład melfalan, chlorambucil, czy też cyklofosfamid oraz podobne do nich pod względem chemicznym aminowe pochodne platyny, cis-platyna i karboplatyna (ryc. 5), są związkami elektrofilnymi stosowanymi od lat siedemdziesiątych w terapii nowotworowej. Ich cytotoksyczność wynika przede wszystkim z interakcji z DNA i powstawania wewnątrzkomórkowych i międzyciniowych wiązań krzyżowych oraz nietypowych połączeń DNA-białko (CHU 1994, OLIŃSKI i ZASTAWNY 1991). Cis-platyna w dawkach letalnych zatrzymuje komórki w fazie G2 cyklu komórkowego, w których następnie ulegają uruchomieniu procesy programowanej śmierci (CHU 1994). Natomiast cis-platyna w dawkach subletalnych często indukuje w komórkach oporność.



Ryc. 5. Struktura cis-platyny (cis-DDP), trans-platyny (trans-DDP) oraz karboplatyny (cis-diamino-1,1-cyklobutano-dikarboksypłaty II).

Jako podstawowe przyczyny odpowiedzialne za wystąpienie oporności na cis-platynę traktuje się: zwiększoną zdolność komórek do naprawy DNA, intensyfikację procesów unieczynnających lek, niekiedy obniżoną wewnątrzkomórkową akumulację leku (CHU 1994, OLDENGURG i współaut. 1994). Niektóre komórki odporne mogą też tolerować obecność większej ilości uszkodzonego DNA niż komórki wrażliwe.

Komórki o wysokim stopniu oporności cechuje przede wszystkim intensywniejsza reperacja DNA, polegająca na szybszym enzymatycznym usuwaniu (wycinaniu) adduktów cis-platyny z DNA, a także podwyższona ekspresja genów kodujących polimerazy DNA i ligazy (DIETEL 1991) oraz syntazę tymidylanową (SCANLON i KASHANI-SABET 1988). Może w nich również zachodzić indukcja specyficznego białka jądrowego XPE-BF (CHU 1994).

Natomiast komórki o niskim stopniu oporności na cis-platynę, charakteryzuje zwykle niższa wewnątrzkomórkowa akumulacja leku (OLDENGURG i współaut. 1994, JEKUNEN i współaut. 1994). Jak dotąd nie jest znany specyficzny nośnik uczestniczący w transporcie cis-platyny do komórek lub w jej usuwaniu. Wydaje

się, że w procesach tych mogą uczestniczyć dwa białka błonowe — 48 kDa (BERNAL i współaut. 1990) i 200 kDa (KAWAI i współaut. 1990). To ostatnie białko nie jest identyczne z glikoproteiną P (170 kDa) uczestniczącą w usuwaniu leków wywołujących oporność wielolekową (patrz rozdział *Oporność na związki heterocykliczne, czyli tak zwana oporność wielolekowa*). Jaki jest jego udział w usuwaniu cis-platyny z komórek pozostaje jeszcze nie wyjaśnione.

Wiele linii komórek opornych na cis-platynę charakteryzuje się też podwyższoną zdolnością do znoszenia jej toksyczności, poprzez tworzenie kompleksów z glutationem (OGUCHI i współaut. 1994) lub też z metalotioneiną (MT), małym białkiem (61-62 AA) zawierającym aż 20 reszt cysteinowych (KUZMICH i TEW 1991, KELLEY i współaut. 1988). Związanie cis-platyny z metalotioneiną powoduje odszczepienie od cząsteczki leku ligandów aminowych, co powoduje znaczne obniżenie jego aktywności.

Badania ostatnich lat wskazują także na udział w wytwarzaniu oporności na cis-platynę białkowych produktów onkogenów *c-ras* (SKLAR 1988) i *c-fos* (KASHANI-SABET i współaut. 1990) oraz genu supresorowego *p53* (BROWN i współaut. 1993). Na czym polega działanie tych białek jeszcze nie wiadomo. Być może ich zwiększone ilości przyczyniają się do tolerowania przez komórki odporne większych ilości uszkodzonego DNA.

PRZEWYCIEŻANIE OPORNOŚCI KOMÓREK NA CIS-PLATYNĘ

Przewyciężenie oporności na cis-platynę jest trudne. Czynione są próby modulowania poziomu wewnątrzkomórkowych tioli, przede wszystkim glutationu, w celu zapobieżenia unieczynniania leku (KUZMICH i TEW 1991, DIETEL 1993). Stosuje się też inne pochodne platyny znoszące w komórkach oporność wywołaną cis-platyną czy też karboplatiną (KELLAND i współaut. 1992). Podjęto także próby przewyciężenia oporności na cis-platynę zastosowaniem rybozemu antyfos, RNA o właściwościach enzymatycznych, które degraduje mRNA będący transkryptem genu *c-fos* (FUNATO i współaut. 1992). Zaburzało to powstanie czynnika transkrypcyjnego AP-1, który reguluje ekspresję wielu genów. Efektem transfekcji komórek opornych rybozymbem antyfos było przywrócenie im wrażliwości na cis-platynę i powrót morfologii komórek do stanu charakteryzującego komórki wrażliwe. Co więcej, znaleziono w nich obniżoną ekspresję genów syntazy tymidylanowej, polimerazy β i topoizomerazy I, a więc tych genów, które ulegały nadekspresji w komórkach opornych. Nie wiadomo jednak czy zastosowanie tego typu strategii znajdzie zastosowanie kliniczne.

OPORNOŚĆ NA ZWIĄZKI HETEROCYKLICZNE CZYLI TAK ZWANA OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

Wśród komórek opornych na działanie cytostatyków często pojawia się subpopulacja komórek wykazujących krzyżową oporność w stosunku do cytotoksycznych związków o bardzo różnej budowie i mechanizmie działania. Oporność ta, zwana opornością wielolekową (MDR od multidrug resistance), powstaje na ogół na drodze selekcji komórek w środowisku zawierającym tylko jeden z leków z grupy wywołujących MDR i jest zwykle najsilniej wyrażona w stosunku

do leku indukującego. Wywołują ją przede wszystkim leki należące do grupy antracyklin (doksorubicyna, daunorubicyna), alkaloidy izolowane z roślin rodzaju *Vinca* (winkrystyna, winblastyna), czy też antybiotyki (aktynomycyna D) (ryc. 6). Oporność taka może pojawiać się również po traktowaniu komórek kolchicyną, pochodnymi epipodofylotoksyn (etopozyd — VM26, tenipozyd — VP16), inhibitorami enzymu topoizomerazy II (amsakryna) i wieloma innymi lekami.

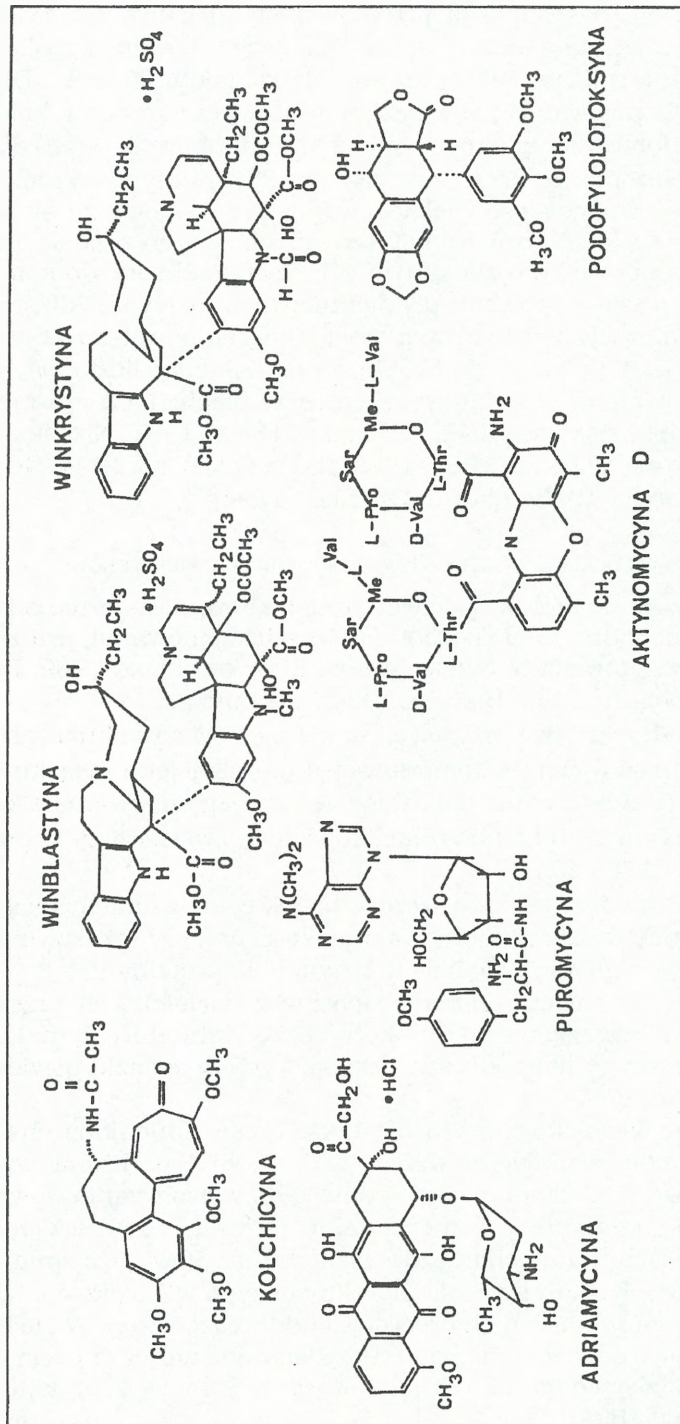
Związki wywołujące oporność wielolekową są hydrofobowe na skutek obecności w ich cząsteczce pierścieni aromatycznych; charakteryzują się też ładunkiem dodatnim w środowisku o obojętnym pH. Dostają się one do komórek na drodze pasywnej dyfuzji. W polskim piśmiennictwie ukazały się kilka lat temu opracowania na temat wielolekowej oporności komórek nowotworowych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a i b, HAUS 1990b); są też dostępne liczne przeglądowe opracowania na ten temat w światowej literaturze biochemicznej i medycznej (ENDICOTT i LING 1989, RONINSON 199,; SCHINKEL i BORST 1991, NIELSEN i SKOVSGAARD 1992, GOTTESMAN i PASTAN 1988, 1993, DEVINE i MELERA 1994, GOTTESMAN 1993, GROS i BUSCHMAN 1993a i b, RUETZ i GROS 1994).

FENOTYPOWA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK OPORNYCH WIELOLEKOWO

Fenotyp większości komórek opornych wielolekowo, niezależnie od rodzaju tkanki z których pochodzą, jak i sposobu ich wyselekcjonowania, jest zadziwiająco podobny (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ENDICOTT i LING 1989, RONINSON 1992, BASHIR i współaut. 1993, BIEDLER 1994). Cechuje go:

- zbliżony profil oporności krzyżowej na wiele leków wywołujących MDR,
- obniżony stopień wewnątrzkomórkowej akumulacji leku związany najczęściej z jednoczesnym wzrostem intensywności jego usuwania z komórek,
- nadekspresja różnych błonowych glikoprotein, zwłaszcza glikoproteiny P o aktywności ATP-azowej,
- zmiany ilościowe i jakościowe szeregu białek cytoplazmatycznych, w tym pewnych białek wiążących jony wapnia (sorcyne), czy też enzymów przeprowadzających glikozylację białek, w tym glikoproteiny P,
- modulowanie, a nawet znoszenie oporności wielolekowej przez szereg różnorodnych związków, wśród których są inhibitory kanałów wapniowych, inhibitory kalmoduliny, cyklosporyna A, związki powierzchniowo czynne i inne.

Komórki odporne wielolekowo wyróżnia także często zmieniona charakterystyka wzrostu *in vivo*, wolniejszy wzrost w hodowli i obniżona wydajność klonowania, a także niekiedy obniżona zdolność do wywoływania nowotworów *in vivo* i dawania przerzutów. Komórki takie mogą się również odznaczać wzmożoną wrażliwością na mechaniczne uszkodzenia. Powyższe zmiany mogą wynikać ze zmian w płynności błon komórek opornych wielolekowo, ich ultrastruktury oraz ze wzmożenia w nich procesów endo- i egzocytozy. Wiele komórek opornych wielolekowo odznacza się ponadto zwiększoną adhezyjnością zarówno od podłoża, jak i między komórkami (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ENDICOTT i LING 1989, BIEDLER 1994).



Ryc. 6. Struktura niektórych heterocyklicznych leków wywołujących oporność wielolekową.

GLIKOPROTEINA P

Geny *mdr* kodujące glikoproteinę P, regulacja ich ekspresji

Glikoproteina P, której zwiększone ilości występują w błonach większości opornych wielolekowo komórek, jest kodowana przez kilka genów tworzących grupę tak zwaną genów *mdr*. W komórkach ludzkich występują 2 geny *mdr* umiejscowione na chromosomie 7, u gryzoni zaś 3 geny na chromosomie 5 (GROS i BUSCHMAN 1993, RONINSON 1992). W komórkach gryzoni tylko geny *mdr1* i *mdr2* a w komórkach ludzkich jedynie gen *MDR1* są bezpośrednio związane z opornością. Geny *mdr* wykazują znaczny stopień homologii i kodują 4,5 kb mRNA. Podwyższony poziom mRNA często koreluje ze stopniem oporności komórek i może być skutkiem zamplifikowania genu *mdr*, jak i zintensyfikowania jego ekspresji (ENDICOTT i LING 1989, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, HAUS 1990b). Najczęściej zwielokrotnione geny *mdr* występują w elementach pozachromosomalnych, tak zwanych chromosomach minutowych oraz w homogenie barwiących się regionach (HSR) jednego lub kilku chromosomów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, HAUS 1990b).

W ostatnich latach sklonowano i zsekwencjonowano ludzkie, mysie (GROS i współaut. 1988, DEVAULT i GROS 1990, HSU i współaut. 1990) i chomicze (NG i współaut. 1989) geny *mdr*. Poznano też strukturę promotora mysiego genu *mdr1* (UEDA i współaut. 1987), co pozwala na precyzyjne badania regulacji jego ekspresji. Badania te są tym bardziej ważne, że w niektórych komórkach opornych wielolekowo stwierdza się znaczne zwiększenie transkrypcji genu *mdr1* bez jego amplifikacji (SCOTTO i współaut. 1986, SHEN i współaut. 1986). Jak dotąd nie wykazano w genie *mdr1* obecności takich typowych sekwencji regulatorowych jak CAAT czy TATA. Niemniej jednak stwierdzono w ostatnich latach, że sekwencje nukleotydowe promotora, zarówno poniżej jak i powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, są istotne dla regulacji transkrypcji genu (KOHNO 1990). Są nimi miejsca rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny AP1 (TEETER i współaut. 1991, YU i współaut. 1993), czynnik SP1 (CORNWELL i SMITH 1993a) oraz dwa inne niezidentyfikowane dotąd białka jądrowe (YU i współaut. 1993).

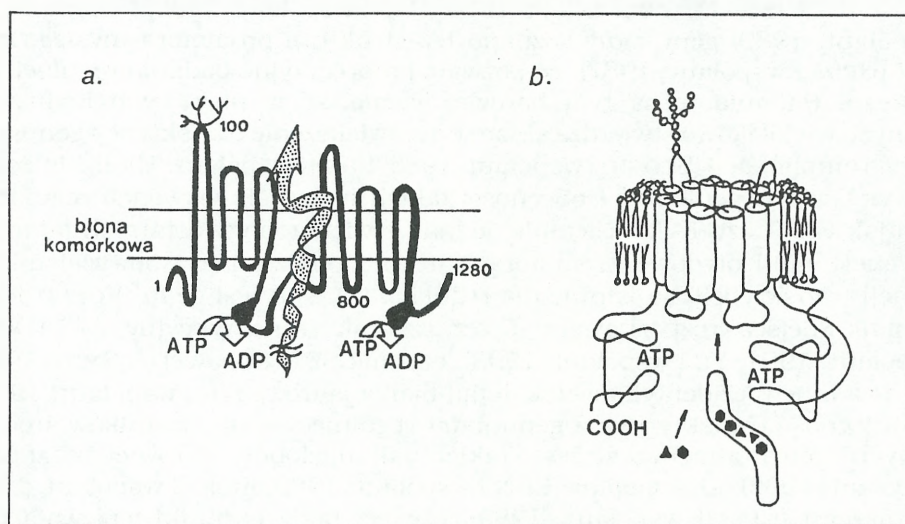
Aktywność transkrypcyjna genu *mdr1* reguluje szereg „czynników środowiskowych” (environmental stress), takich jak niedobór surowicy (TANIMURA i współaut. 1992), szok cieplny (CHIN i współaut. 1989, KIOKA i współaut. 1992), jony arsenu (CHIN i współaut. 1989), czy też takie czynniki wpływające na różnicowanie się komórek, jak na przykład kwas retinowy czy maślan sodu (BATES i współaut. 1989). Ponadto, ekspresję genu *mdr1* mogą stymulować różne hormony sterydowe (ALTUVIA i współaut. 1993, PIEKARZ i współaut. 1993, FARDEL i współaut. 1993, ARCECI i współaut. 1990). Aktywację genu *mdr* mogą również powodować leki przeciwnowotworowe, na przykład antracykliny, czy alkaloidy usuwane z komórek przez glikoproteinę P (KOHNO i współaut. 1989, ASAKUNO i współaut. 1994), jak też leki nie transportowane przy jej udziale (cis-platyna, cytoarabina, ametopteryna, 5-fluorouracyl; CHAUDHARY i RONINSON 1993). Modulację aktywności promotora ludzkiego genu *mdr1* wywołują także onkogeny *raf* i *ras* oraz gen supresorowy *p53* (CORNWELL i SMITH 1993b, CHIN i współaut. 1992). Wskazuje to na możliwości zmian stopnia oporności komórek podczas

progresji nowotworu. Doniesiono również o regulacyjnym wpływie składu i struktury przestrzennej macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix) na poziom ekspresji genu *mdr* w hodowanych *in vitro* szczurzych hepatocytach (SCHUETZ i SCHUETZ 1993).

Występowanie i budowa glikoproteiny P

Produkt ekspresji genu *mdr1*, czyli glikoproteina P, jest nie tylko w błonach komórek nowotworowych. Występuje ona także w błonach powierzchniowych prawidłowych komórek, które przylegają do kompartmentów wydzielniczych („excretory compartments”), na przykład w kanalikach żółciowych, nerkowych oraz w nabłonkach w przewodzie pokarmowym; w niektórych naczyniach krwionośnych, kanalikach jąder, znajduje się ona także po wewnętrznej stronie błon aparatu Golgiego. Spolaryzowane usytuowanie glikoproteiny P w komórkach wyraźnie przemawia za jej udziałem także w sekrecji naturalnych metabolitów i toksyn (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, GOTTESMAN i PASTAN 1993, GROS i BUSCHMAN 1993).

„Prototypowa” glikoproteina P, kodowana przez myszy gen *mdr1*, przedstawiona jest na rycinie 7 (GOTTESMAN i PASTAN 1988). Poliptyd ten, zbudowany z 1276 aminokwasów, odznacza się bardzo dużą metaboliczną stabilnością



Ryc. 7. Struktura glikoproteiny P.

a) Łańcuch polipeptydowy ludzkiej glikoproteiny P, przedstawiony jako wytłuszczona linia ciągła, cyfry oznaczają pozycje aminokwasów. Zaznaczono miejsca wiązania ATP po cytoplazmatycznej stronie błony oraz fragmenty łańcuchów węglowodanowych (cienką linią) dołączonych do pierwszej pętli polipeptydu na zewnątrz błony komórkowej. Zakropkowana strzałka oznacza drogę przejścia usuwanego związku przez hipotetyczny kanał błonowy (wg DIETEL 1991); b) model glikoproteiny P jako energo-zależnej pompy tworzącej kanał w błonie komórkowej. Zaznaczono w postaci cylindrów 12 transbłonowych domen, fragment węglowodanowy dołączony do peptydu (—) oraz dwa miejsca wiązania ATP. Związki (pełne wielokąty), które dostały się do komórki mogą być usuwane przez otwór kanału bądź bezpośrednio, bądź po związaniu z hipotetycznym białkiem nośnikowym (—) (wg Bradley i współaut. 1988, zmodyf.).

(okres półtrwania 348 h; RICHERT i współaut. 1988, YOSHIMURA i współaut. 1989). Można w nim wyróżnić dwa obszary o bardzo dużej homologii. Każdy z nich zawiera duży cytoplazmatyczny fragment hydrofilowy oraz domenę hydrofobową. W każdym fragmencie hydrofilowym znajduje się miejsce wiązania ATP, a każda domena hydrofobowa zawiera sześć segmentów tworzących trzy pętle przebijające błonę komórki. Aminokwasy tworzące zewnątrz błonową część pierwszej pętli od N-końca peptydu są glikozylovane. Sekwencje aminokwasowe homologiczne z miejscem wiążącym ATP w glikoproteinie P znajdują się także w wielu permeazach, to jest białkach periplazmatycznych, transportujących drobnocząsteczkowe związki, a występujących także w nabłonkowych komórkach pacjentów z mukowiscydozą (AMES i współaut. 1992, TREZISE i współaut. 1992).

Przypuszczalne mechanizmy działania glikoproteiny P

Zastosowano różnorodne genetyczne, biochemiczne i fizjologiczne podejścia do badań mechanizmu działania glikoproteiny P, traktowanej jako „pompa” wytransportowująca lek na zewnątrz komórek (ryc. 7). Postuluje się, że 12 transbłonowych fragmentów, przedstawionych jako cylindry zanurzone w dwuwarstwie lipidowej, tworzy w błonie kanał. Zakłada się, że związki, które dostały się do komórek na drodze dyfuzji są usuwane przez kanał bezpośrednio bądź też pośrednio, w kompleksach z cytoplazmatycznymi białkami nośnikowymi na koszt energii uwalnianej w czasie hydrolizy ATP. W czasie usuwania leku mają zachodzić zmiany allosteryczne w glikoproteinie P. Obecnie nie ma już wątpliwości, że glikoproteina P jest ATP-azą (HAMADA i TSURUO 1988a i b, DOIGE i współaut. 1992, GROS i BUSCHMAN 1993), która może ulegać inaktywacji w wyniku określonych mutacji, nawet tylko w jednym miejscu wiązania ATP (AZZARIA i współaut. 1989). Ten ostatni wynik wskazuje na niezbędność dwóch nienaruszonych miejsc wiązania nukleotydu do prawidłowego funkcjonowania tej ATPazy. Czy inne trinukleotydy mogą zastąpić ATP jako źródło energii jest, jak dotąd, niejasne (LELONG i współaut. 1992). Dokonana w ostatnich latach rekonstrukcja glikoproteiny P w komórkach drożdży (UEDA i współaut. 1993) i w pęcherzykach błonowych (SHAROM i współaut. 1993, SHAPIRO i LING 1994) oraz opisane funkcjonowanie tego układu jako pompy usuwającej lek z pęcherzyków na koszt hydrolizy ATP ostatecznie dokumentuje słuszność hipotezy o takiej funkcji glikoproteiny P.

W hipotezie tej zakłada się, że usuwany lek przedostaje się przez kanał glikoproteiny P od strony cytoplazmy, a więc ze środowiska hydrofilnego. Zараzеm wiadomo, że związki wywołujące oporność wielolekową są bardzo lipofilne i znaczna ich część może nie przedostawać się przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Można więc przypuszczać, że wchodzi one w kontakt z kanałem transporterów pozostając w obrębie błony. Wysłunięto również atrakcyjne przypuszczenie, że leki te w ogóle nie przedostają się do cytoplazmy, a do ich efektywnego usuwania z błony dochodzi wskutek działania glikoproteiny P jako flipazy odpowiedzialnej za przemieszczenia lipidów z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy lipidowej błony komórkowej (HIGGINS i GOTTESMAN 1992).

Trudna do wytłumaczenia, jak dotąd, jest bardzo mała specyficzność substratowa glikoproteiny P. W związku z tym była wysuwana hipoteza postulująca, że substraty usuwane z komórek przy udziale glikoproteiny P miały być we-

wnątrzkomórkowo „znakowane”, na przykład przez dołączanie do nich glutationu dzięki aktywności transferaz glutationowych (ISHIKAWA 1990, WEST 1990). Za hipotezę tą przemawia udział nośnika błonowego w usuwaniu z komórek związków skoniugowanych z glutationem i to także w procesie zależnym od ATP. Dyskutowano nawet możliwość, że powyższy nośnik i glikoproteina P są identyczne. Jednakże wydaje się, że są to odrębne błonowe jednostki transportujące, wykazujące specyficzność w stosunku do kationowych substratów w przypadku glikoproteiny P i anionowych kompleksów z glutationem usuwanych przy udziale odrębnego nośnika.

Nasuwa się pytanie, czy w cząsteczce glikoproteiny P można wyróżnić określone regiony uczestniczące w wiązaniu substratów. Wydaje się, że w wiązaniu substratów mogą uczestniczyć aminokwasy znajdujące się w pierwszym hydrofobowym fragmencie glikoproteiny P, a mianowicie aminokwas znajdujący się w pozycji 185 (CHOI i współaut. 1988). Są też inne dane wskazujące na udział w wiązaniu i usuwaniu leków także aminokwasów znajdujących się przede wszystkim w szóstym (DEVINE i współaut. 1992) a także jedenastym (KAJIMI i współaut. 1993) transbłonowym fragmencie glikoproteiny P.

Regulacja funkcjonowania glikoproteiny P

Funkcjonowanie glikoproteiny P regulują w znacznym stopniu modyfikacje posttranslacyjne, takie jak fosforylacja i glikozylacja. Szczególnie istotna wydaje się fosforylacja. Stwierdzono, że glikoproteina P podlega cyklom fosforylacji i defosforylacji przy udziale kinazy A, jak i kinazy C, przy czym fosforylowane są przede wszystkim reszty serynowe obecne w peptydzie łączącym obie części glikoproteiny (FINE i współaut. 1988, MA i współaut. 1991, ORR i współaut. 1993, CHAMBERS i współaut. 1992, 1994). Zagadnienie związku stopnia ufosforylowania glikoproteiny P z jej funkcjonowaniem, ocenianym na podstawie akumulacji leków w komórkach opornych, jest przedmiotem bardzo licznych badań i równie licznych kontrowersji. W przypadku szeregu komórek dokumentowano, że hyperfosforylacja glikoproteiny P zdaje się pociągać za sobą spadek jej aktywności (SATO i współaut. 1990, EPAND i STAFFORD 1993). Jednak szereg nowych danych przemawia za tym, że zwiększeniu stopnia fosforylacji glikoproteiny P towarzyszy wzmożenie jej aktywności.

W 1992 roku wysunięto hipotezę, że podwyższona aktywność glikoproteiny P, wykazywana po zwiększeniu stopnia jej ufosforylowania, może mieć związek z aktywacją przez szereg leków błonowej fosfolipazy C, katalizującej rozpad fosfatydyloinozytolu do IP₃ i diacyloglicerolu (DAG) (HAIT i AFTAB 1992). Wzrost stężenia w błonie DAG miałby wywoływać z kolei translokację kinazy C w pobliże glikoproteiny P, gdzie następowałaby fosforylacja transportera i jego uaktywnienie. Usunięcie leku z komórki inaktywowałoby fosfolipazę C, a specyficzne fosfatazy (aktywowane jonami wapnia uwalnianymi z endoplazmatycznego retikulum pod wpływem IP₃) miałyby przeprowadzać defosforylację glikoproteiny P. Szereg obserwacji wskazuje, że być może w przypadku niektórych leków i pewnych komórek proponowany mechanizm przekazywania wewnątrzkomórkowego sygnału, prowadzący do aktywacji glikoproteiny P, może być prawdziwy. Świadczy o tym między innymi zwiększenie poziomu DAG w błonach komórek pod wpływem doksorubicyny (TRITTON i współaut. 1991), aktywacja kinazy C

przez estry forbolu lub doksorubicynę (FINE i współaut. 1988, CHAMBERS i współaut. 1992, OHKAWA i współaut. 1994) i jednocześnie pojawianie się oporności wielolekowej, a także aktywacja ekspresji genu *mdr* przez agonistów kinazy C (CHAUDHARY i RONINSON 1990, 1993).

Postuluje się także, że związanie EGF z receptorami na błonie komórek opornych wielolekowo może modulować stopień ich oporności na niektóre leki (KWOK i SUTHERLAND 1991). Jednakże, jak dotąd, brak jest spójnej hipotezy wyjaśniającej powiązania pomiędzy związaniem EGF, liczbą jego powierzchniowych receptorów i poziomem oporności. Postulowana jest zarówno aktywacja przez EGF fosfolipazy C i kinazy białkowej C, wywołującą następczą fosforylację glikoproteiny P, jak również wpływ EGF na intensywność internalizacji fragmentów błon (membrane-recycling) i przebieg endocytozy (KWOK i SUTHERLAND 1991, MEYERS i współaut. 1993).

Czy tylko działanie glikoproteiny P odpowiada za niski poziom leków w komórkach opornych?

Niewątpliwie ogólnie jest przyjęty pogląd, że komórki odporne wielolekowo, hodowane w środowisku zawierającym leki, odznaczają się niższym wewnątrzkomórkowym poziomem leków niż komórki wrażliwe. Występują natomiast kontrowersje co do tego, czy fakt ten wynika jedynie z aktywnego usuwania leków z komórek przy udziale glikoproteiny P i/lub innych błonowych glikoprotein. Szereg danych wskazuje bowiem, że i inne mechanizmy mogą przyczyniać się do obniżonej akumulacji leków w tych komórkach. Rozpatruje się tu obserwowany nierzadko w procesie pasywnej dyfuzji lub transportu nośnikowego obniżony transport leków do komórek. Rozważa się też nagromadzenie się leków w różnego typu pęcherzykach cytoplazmatycznych o kwaśnym pH — takich jak lizosomy, endozomy, pęcherzyk aparatu Golgiego, które nie są miejscami „docelowymi” działania leku, a następnie usuwanie ich z komórek podczas egzocytozy (BECK 1987). Ostatnio ponownie jest podnoszone zagadnienie znaczenia zmian pH w różnych kompartmentach komórki jako czynnika uczestniczącego w kontroli oporności wielolekowej komórek, jednakże wnioski nie są jednoznaczne (ALTENBERG i współaut. 1993, SIMON i współaut. 1994).

„ATYPOWA” OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

Nie zawsze oporność wielolekową komórek można wytłumaczyć nadekspresją genu *mdr1* i zwiększonym poziomem aktywności błonowej glikoproteiny P (BECK i współaut. 1987, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a). W przypadkach takich mówi się o „atypowej” oporności wielolekowej. Termin ten jest równie nieprecyzyjny, jak „typowa” oporność wielolekowa, ponieważ nie ma jej uniwersalnego wzorca. Stosunkowo najlepiej zostały scharakteryzowane dwa mechanizmy atypowej oporności wielolekowej:

- mechanizm „detoksyfikacyjny”, w którym znoszenie cytotoksyczności leku ma związek ze zmianami w ekspresji i aktywności transferaz glutationowych i ze zmianami wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu,
- mechanizm „enzymatyczny” polegający na zmianach właściwości i poziomu topoizomerazy II.

Zwiększenie aktywności transferaz glutationowych, enzymów katalizujących powstawanie połączeń leków ze zredukowanym glutationem, wydaje się być

szczególnie istotne w przypadku leków generujących wolne rodniki, na przykład antracyklin. Powiązania wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu ze stopniem oporności komórek są nadal przedmiotem intensywnych badań i kontrowersji, gdyż zahamowanie syntezy glutationu nie zawsze prowadzi do uwrażliwienia komórek na podawane leki (COLE i współaut. 1990, KRAMER i współaut. 1988, ROMINE i KESSEL 1986).

Aktywność topoizomerazy II, enzymu niezbędnego do prawidłowej replikacji DNA (SZMIGIERO 1988), hamuje szereg leków przeciwnowotworowych, w tym doksorubicyna, etopozyd, tenipozyd czy amsakryna. Liczne komórki odporne wielolekowo charakteryzuje bądź to obniżony poziom tego enzymu, bądź też obecność enzymu o obniżonym powinowactwie do stosowanych leków (GLISSON i współaut. 1987, DANKS i współaut. 1988). W komórkach takich nie stwierdza się na ogół zmian w stopniu akumulacji leków i ekspresji glikoproteiny P (GLISSON i współaut. 1987, POTMESIL i współaut. 1987). Wykrywa się w nich natomiast mniejszą niż w komórkach wrażliwych liczbę uszkodzeń DNA, w tym także maskowanych przez białka pęknięć nici DNA (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ZIJLSTRA i współaut. 1987) oraz szybszy niekiedy przebieg naprawy uszkodzonego DNA (SUPINO i współaut. 1988). Opisywano także komórki odporne wielolekowo, które cechuje zarówno zmiana poziomu i właściwości topoizomerazy II, jak i wzrost poziomu glikoproteiny P i zaburzenia cyklu glutationowego (ZIJLSTRA i współaut. 1987, SPIRIDONIDIS i współaut. 1989).

Ostatnio doniesiono, że ludzkie komórki nowotworowe prostaty (PC3R), wykazujące wrodzoną oporność na liczne leki przeciwnowotworowe, charakteryzuje także zwiększona ekspresja protoonkogenów *c-jun*, *c-myc* i *H-ras* (YAMAZAKI i współaut. 1994). Natomiast nie wykryto w tych komórkach zmian ekspresji ani genu *mdr1*, ani też topoizomerazy II. Nie wiadomo, jak dotąd, na czym polega rola produktów tych genów we wrodzonej oporności komórek.

INNE ZMIANY BIOCHEMICZNE W KOMÓRKACH OPORNYCH WIELOLEKOWO

Szereg innych biochemicznych zmian może odróżniać komórki odporne wielolekowo od komórek wrażliwych. Może to być przede wszystkim pojawianie się innych, niż glikoproteina P, glikoprotein błonowych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a), w tym wykrytej ostatnio błonowej glikoproteiny MRP (MDR-related-protein), wiążącej ATP (GRANT i współaut. 1994, ZAMAN i współaut. 1993) przypuszczalnie uczestniczącej, jako transbłonowy transporter, w usuwaniu leków z opornych komórek płucnych. Ewentualny związek z opornością podwyższonego poziomu białka p110, towarzyszącego wewnątrzkomórkowym pęcherzykowym zmianom komórek nabłonkowych tkanek chronicznie poddawanych działaniu czynników toksycznych, jest nadal badany (SCHEPER i współaut. 1993). Wykazywane są również pewne zmiany składu i metabolizmu lipidów błonowych w komórkach opornych (RAMU i współaut. 1984). Duże zainteresowanie wzbudza obecność innych białek cytosolowych, takich jak na przykład sorcyna, małe (19–22 kDa), kwaśne białko wiążące wapń (HAMADA i współaut. 1988c, MEYERS i współaut. 1987, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a). W niektórych komórkach opornych wielolekowo sorcyna może nawet stanowić główne białko wiążące wapń i wpływać znacząco na metabolizm wapniowy komórek. Nadprodukcja sorcyny

jednak nie jest ani wystarczającym, ani niezbędnym warunkiem do wystąpienia oporności i jest najprawdopodobniej przypadkowa, wynikająca z usytuowania genu *sorcyny* w pobliżu genu *mdr*. Może natomiast mieć znaczenie dla modulowania i utrzymywania fenotypu komórek opornych.

Z dokonanego przeglądu wynika, że badania komórek opornych wielolekowo pozwalają na wykrycie wielu mechanizmów, dzięki którym komórki bronią się przed szkodliwym działaniem leków. Z klinicznego punktu widzenia jest ważne nie tylko poznanie ich, lecz także stwierdzenie kolejności ich pojawiania się po ekspozycji komórek na lek. Jeśli bowiem udałooby się wykryć różnice w kolejności i intensywności ich pojawiania się w komórkach opornych i wrażliwych, mogłoby to stanowić „miejsce docelowe” działania innych leków stosowanych do zapobiegania pojawianiu się oporności.

MODULOWANIE OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ KOMÓREK

Pierwsze doniesienie o farmakologicznej modulacji stopnia oporności wielolekowej ukazało się w 1981 roku (TSURUO i współaut. 1981). Wykazano wówczas, że werapamil, inhibitor kanałów wapniowych oraz trifluoroperazyna, antagonistą kalmoduliny, potęgują antyproliferacyjne działanie winkrystyny na mysie komórki leukemiczne i zwiększają w nich wewnątrzkomórkowe stężenie (akumulację) leku. Od tego czasu datuje się olbrzymie zainteresowanie opracowywaniem strategii modulowania oporności, przede wszystkim wynikającej z nadprodukcji glikoproteiny P (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989b, KAYE 1993, KELLEN 1993, LING 1989, BECK 1990). Badania koncentrują się na związkach chemicznych, tak zwanych „uczulaczach” (chemosensitizers), czy też „modulatorach oporności” (resistance modifiers), które wpływają na poziom akumulacji leków w komórkach opornych nie potęgując natomiast ich cytotoksyczności w stosunku do komórek wrażliwych (FORD i HAIT 1990, BELLAMY i współaut. 1990).

Poznane do dziś modulatory oporności można zaliczyć do kilku podstawowych klas: nietoksycznych analogów leków cytotoksycznych — antracyklin i alkaloidów, inhibitorów kanałów wapniowych, antagonistów kalmoduliny, analogów hormonów, czy też różnego typu hydrofobowych, kationowych związków (w tym szeregu amin i jonoforów). Jako modulatory oporności wielolekowej można traktować też związki obniżające wewnątrzkomórkowy poziom ATP (CITRO i współaut. 1991) oraz związki wpływające na biofizyczne właściwości błon (CALLAGHAN i współaut. 1993). Strukturalnie modulatory oporności nie są do siebie podobne, jednakże są to na ogół związki lipofilne, heterocykliczne, amfipatyczne o bardzo różnym działaniu farmakologicznym (ZAMORA i współaut. 1988).

Równie liczne, jak rodzaje modulatorów oporności, są mechanizmy ich działania na komórki odporne wielolekowo. Jako podstawowe mechanizmy działania modulatorów oporności wymienić trzeba:

- interakcję z glikoproteiną P i hamowanie jej działania,
- hamowanie procesów metabolicznych, których przebieg zależny jest od jonów wapnia,
- zmiany struktury i płynności błon,
- hamowanie aktywności kinazy białkowej C,

- hamowanie funkcji lizosomów,
- zmiany wewnątrzkomórkowej kompartmentacji leków.

Najbardziej obiecującym obecnie podejściem do przewycięzania oporności wydają się być, przynajmniej teoretycznie, ingerencje na drodze inżynierii genetycznej w strukturę i aktywność transkrypcyjną genu *mdr*, prowadzące do obniżenia syntezy glikoproteiny P. Są próby wprowadzenia do genu *mdr* antysensownych nukleotydów (THIERRY i współaut. 1993), stosowania rybozemu specyficznie unieczynnającego mRNA i hamującego syntezę glikoproteiny P (KOBAYASHI i współaut. 1994, KIEHNTOFF i współaut. 1994), myśli się też o specyficznym blokowaniu w genie *mdr* miejsc inicjacji transkrypcji (KELLEN 1993). Wysuwane są też sugestie, że istotne dla przewycięzania oporności mogą być zaburzenia w tworzeniu czynnika transkrypcyjnego AP1 działaniem rybozemu antyfos (DIETEL 1993). Należy jednak zdawać sobie sprawę, że większość badań mechanizmów działania modulatorów oporności jest prowadzona *in vitro*. Nie można zatem przenosić bezpośrednio wyników uzyskanych w tego typu badaniach na sytuację *in vivo*. Trzeba się liczyć z wystąpieniem ogólnej toksyczności stosowanych związków, gdyż wpływają one na bardzo różne funkcje metaboliczne komórek, jak również z pojawianiem się szkodliwych objawów ubocznych, wynikających, na przykład, z zahamowania funkcjonowania glikoproteiny P w komórkach prawidłowych.

Są też czynione próby modulowania oporności przez podawanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko powierzchniowym epitopom cząsteczki glikoproteiny P. Szereg doniesień dokumentuje bowiem pozytywny wpływ takich przeciwciał, wolnych lub skoniugowanych z toksynami, na przeżywalność zwierząt z różnymi nowotworami (na przykład BROXTERMAN i współaut. 1988, BECK 1991). Nie wiadomo jednak jeszcze, czy przeciwciała skierowane przeciwko glikoproteinie P znajdują zastosowanie w terapii nowotworów ludzkich. Nie rozpoznają one selektywnie glikoproteiny P obecnej w błonach komórek nowotworowych, a trudno jest w obecnej chwili przewidzieć jakie konsekwencje dla pacjentów będzie miało unieczynnienie przez przeciwciała funkcjonowania glikoproteiny P obecnej w błonach komórek prawidłowych.

Stwierdzenie, że wiele czynników przeciwdziała oporności wywołanej nadprodukcją glikoproteiny P, stwarza jednak nadzieję na możliwość modulacji tej oporności u pacjentów z nowotworami.

Znaczne ilości glikoproteiny P wykrywa się bowiem w niewrażliwych na chemioterapię nowotworach nerek, nadnerczy, jelita grubego i płuc, a więc w narządach, które charakteryzują się także i w normalnym stanie podwyższonym poziomem glikoproteiny P (LING 1989, KAYE 1993). Zwiększone jej ilości są znajdowane także w pobieranych od pacjentów różnego typu komórkach białaczkowych (GOLDSTEIN i współaut. 1989). Pomimo intensywnych badań klinicznych (GOLDSTEIN i współaut. 1989, ARCECI 1993) nie ma jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, na ile obecność zwiększonych ilości glikoproteiny P w błonach komórek nowotworowych może przesądzać o skuteczności chemioterapii (ARCECI 1993, KAYE 1993, LING 1989, POUPON 1994). Rozwój technik stosowanych do wykrywania niewielkich nawet zmian w ekspresji genu *mdr1*, w tym technik PCR, a także metod umożliwiających szybkie badania funkcjono-

wania glikoproteiny P w komórkach opornych, niewątpliwie stają się coraz bardziej pomocne do monitorowania oporności komórek.

UWAGI KOŃCOWE

W artykule omówiono różnorodność biochemicznych mechanizmów uczestniczących w powstawaniu oporności na liczne leki nowotworowe. Przedstawiono przykłady upośledzonego pobierania lub zwiększonego wydalania leków, zwiększonego poziomu i zmian właściwości enzymów docelowych, jak również zmienionych aktywności enzymów aktywujących lub inaktywujących leki. Zrozumienie tych mechanizmów, jak też i próby ich przewycięzania stały się możliwe dzięki rozwojowi i zastosowaniu technik biologii molekularnej, w szczególności ukierunkowanej mutagenезy i metod badania struktury i regulacji ekspresji genów. Szczególnie dużo uwagi poświęcono omówieniu funkcjonowania glikoproteiny P, której nie wszystkie funkcje w komórce z pewnością zostały jeszcze poznane. Ostatnio ukazały się bowiem doniesienia o powiązaniach między pojawianiem się glikoproteiny P i ujawnianiem się w błonach komórek aktywności kanału chlorkowego (GILL i współaut. 1992, VALVERDE i współaut. 1992, RASOLA i współaut. 1994), coraz częściej też sugeruje się udział glikoproteiny P w procesach metastazy (WEINSTEIN i współaut. 1991, FERRANDIS i współaut. 1994). Ten intrygujący związek glikoproteiny P z inwazyjnością, chociażby tylko niektórych komórek nowotworowych, stanowi wyzwanie i wytycza nowy kierunek badań tego wielofunkcyjnego niezwykłego białka.

MECHANISMS OF CELLULAR RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS

Summary

Mechanisms of cellular resistance to anticancer drugs are outlined. They may be manifested as changes in the concentrations and properties of intracellular "targets", changes in the drug transport characteristics, or be connected with drug activation or inactivation. The detailed description of these mechanisms is given, taking as examples the resistance to antimetabolites (antifolates and fluoropyrimidines), to alkylating drugs (cis-platinum) and to different heterocyclic compounds responsible for the occurrence of the so-called multidrug resistance. The strategies used for overcoming drug resistance have also been discussed.

LITERATURA

- ALLEGRA C. J., CHABNER B. A., DRAKE J. C., LUTZ R., RODBOARD D., JOLIVET J., 1985a. *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J. Biol. Chem. 260, 9720-9726.
- ALLEGRA C. J., DRAKE J. C., JOLIVET J., CHABNER B. A., 1985b. *Inhibition of phosphoribosyl-aminoimidazole-carboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4882-4885.
- ALTENBERG G. A., YOUNG G., HORTON J. K., GLASS D., BELLI J. A., REUSS, D. L., 1993. *Changes in intracellular or extracellular pH do not mediate P-glycoprotein-dependent multidrug resistance*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 9735-9738.
- ALTUVIA S., STEIN W. D., GOLDENBERG S., KANE S. E., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1993. *Targeted disruption of the mouse mdr1b gene reveals that steroid hormones enhance mdr gene expression*. J. Biol. Chem. 268, 27127-27132.

- AMES G. F. L., 1992. *Bacterial periplasmic permeases as model systems for the superfamily of traffic ATPases which includes MDR and CFTR*. Int. Rev. Cytol., 137a, 1-35.
- ARCECI R. J., 1993. *Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies*. Blood 81, 2215-2222.
- ARCECI R. J., BOLAS F., RAPONI R., HORWITZ S. B., HAUSMAN D., CROOP J. M., 1990. *Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus*. Mol. Reprod. & Develop. 25, 101-109.
- ASAKUNO K., KOHNO K., UCHIUMI T., KUBO T., SATO S., ISONO M., KUWANO M., 1994. *Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 1428-1435.
- AZZARIA M., SCHURR E., GROS P., 1989. *Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide — binding sites of the mdrl gene abolish its ability to confer multidrug resistance*. Mol. Cell Biol. 9, 5289-5297.
- BALIŃSKA M., 1988. *Metabolizm ametoptyriny w komórkach ssaków*. Post. Biochem. 34, 417-427, 1988.
- BAPAT A. R., ZAROW C., DANENBERG P. V., 1983. *Human leukemic cells resistant to 5-fluoro-2¹-deoxyuridine contain a thymidylate synthetase with lower affinity for nucleotides*. J. Biol. Chem. 258, 4130-4136.
- BASHIR I., SIKORA K., FOSTER C. S., 1993. *Multidrug resistance and behavioural phenotype of cancer cells*. Cell Biol. Intern., 17, 907-917.
- BATES S. E., MICKLEY L. A., CHEN Y., RICHERT N., RUDICK J., BIEDLER J. L., FOJO A. T., 1989. *Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: modulation by retinoic acid-induced differentiation*. Mol. Cell Biol. 9, 4337-4344.
- BECK W. T., 1987. *The cell biology of multiple drug resistance*. Biochem. Pharmacol. 36, 2879-2887.
- BECK W. T., 1990. *Strategies to circumvent multidrug resistance due to P-glycoprotein or to altered DNA topoisomerase II*. Bull. Cancer 77, 1131-1141.
- BECK W. T., 1991. *Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance?* J. Nat. Cancer Inst. 83, 1364-1366.
- BECK W. T., CIRTAIN M. C., DANKS M. K., FELSTED R. L., SAFA A. R., WOLVERTON J. S., SUTTLE D. P., TRENT J. M., 1987. *Pharmacological molecular and cytogenetic analysis of „atypical” multidrug-resistant human leukemic cells*. Cancer Res. 47, 5455-5460.
- BELLAMY W. T., DALTON W. S., DORR R. T., 1990. *The clinical relevance of multidrug resistance*. Cancer Invest. 8, 545-560.
- BERGER S. H., JENH C. H., JOHNSON L. F., BERGER F. G., 1985. *Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells*. Mol. Pharmacol. 28, 461-467.
- BERNAL S. D., SPEAK J. A., BOEHEIM K., DREYFUSS A. I., TEICHER B. A., ROSOWSKY A., TSAO S. W., WONG Y. C., 1990. *Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cis-platinum*. Mol. Cell. Biochem. 95, 61-70.
- BERTINO J., 1993. *Ode to methotrexate*. J. Clin. Oncol., 11, 5-14.
- BIEDLER J. L., 1994. *Drug resistance: genotype versus phenotype: thirty second G. H. A. Clowes memorial award lecture*. Cancer Res. 54, 666-678.
- BLUME S. W., SNYDER R. C., RAY R., THOMAS S., KOLLER C. A., MILLER D. M., 1991. *Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo*. J. Clin. Invest. 88, 1613-1621.
- BRADLEY G., JURANKA P. F., LING V., 1988. *Mechanism of multidrug resistance*. Biochim. Biophys. Acta 948, 87-128.
- BROWN R., CLUGSTON C., BURNS P., EDLIN A., VASEY P., VOJTESEK B., KAYE S. B., 1993. *Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines*. Int. J. Cancer 55, 678-684.
- BROXTERMAN H. J., KUIPER C. M., SCHUURHUIS G. J., TSURUO T., PINEDO H. M., LANKELMA J., 1988. *Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein*. Biochem. Pharmacol. 37, 2389-2393.
- CALLAGHAN R., STAFFORD A., EPAND R. M., 1993. *Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties*. Biochim. Biophys. Acta 1175, 277-282.
- CANMAN C. E., TANG H. Y., NORMALLE D. P., LAWRENCE T. S., MAYBAUM J., 1992. *Variations in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine — implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10474-10478.
- CANMAN C. E., LAWRENCE T. S., SHEWACH D. S., TANG H. Y., MAYBAUM J., 1993. *Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyu-*

- ridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res.* 53, 5219-5224.
- CHABNER B. A., ALLEGRA C. J., CURT G. A., CLENDENIN N. J., BARAN J., KOIZUMI S., DRAKE J. C., JOLIVET J., 1985. Polyglutamation of methotrexate: is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest.* 76, 907-912.
- CHAMBERS T. C., ZHENG B., KUO J. F., 1992. Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphate inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.* 41, 1008-1015.
- CHAMBERS T. C., POHL J., GLASS D. B., KUO J. F., 1994. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem. J.* 299, 309-315.
- CHAUDHARY P. M., RONINSON I. B., 1990. Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol. Res.* 4, 281-290.
- CHAUDHARY P. M., RONINSON I. B., 1993. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Nat. Cancer Inst.* 85, 632-639.
- CHEN M., SHIMADA T., MOULTON A. D., CLINE A., HUMPHRIES R. K., MAJZEL J., NIENHUIS A. W., 1984. The functional human dihydrofolate reductase gene. *J. Biol. Chem.* 259, 3933-3943.
- CHIN K. V., TANAKA S., DARLINGTON G., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1989. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 221-226.
- CHIN K. V., UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1992. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459-462.
- CHOI K., CHEN C. J., KRIEGLER M., RONINSON I. B., 1988. An altered pattern of cross-resistance in multidrug resistance human cells results from spontaneous mutations in the MDR1 (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529.
- CHU G., 1994. Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.* 269, 787-790.
- CITRO G., CUCCO C., VERDINA A., ZUPI G., 1991. Reversal of adriamycin resistance by lonidamine in a human breast cancer cell line. *Br. J. Cancer* 64, 534-536.
- COLE S. P. C., DOWNES H. F., MIRSKI S. E. L., CLEMENTS D. J., 1990. Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Mol. Pharmacol.* 37, 192-197.
- CORNWELL M. M., SMITH D. E., 1993a. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J. Biol. Chem.* 268, 19505-19511.
- CORNWELL M. M., SMITH D. E., 1993b. A signal transduction pathway for activation of the *mdr 1* promoter involves the proto-oncogene *c-ras* kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 15347-15350.
- COWAN K. H., GOLDSMITH M. E., RICCIARDONE M. D., LEVINE R., RUBALCABA E., JOLIVET J., 1986. Regulation of dihydrofolate reductase in human breast cancer cells and in mutant hamster cells transfected with a human dihydrofolate reductase minigene. *Mol. Pharmacol.* 30, 69-76.
- DANKS M. K., SCHMIDT C. A., CIRTAIN M. C., SUTTLE D. P., BECK W. T., 1988. Altered catalytic activity and DNA cleavage by DNA topoisomerase II from human leukemic cells selected for resistance to VM-26. *Biochemistry* 27, 8861-8869.
- DENIS N., KITZIS A., KNUH J., DANTRY F., CORCAS D., 1991. Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by *c-myc*. *Oncogene* 6, 1453-1457.
- DEVAULT A., GROS P., 1990. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1652-1663.
- DEVINE S. E., LING V., MELERA P. W., 1992. Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4564-4568.
- DEVINE S. E., MELERA P. W., 1994. Diversity of multidrug resistance in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6133-6139.
- DICKER A. P., WALTHAM M. C., VOLKENANDT M., SCHWEITZER B. I., OTTER G. M., SCHMID F. A., SIROTNAK F. M., BERTINO J. R., 1993. Methotrexate resistance in an *in vivo* mouse tumor due to a non-active-site dihydrofolate reductase mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11797-11801.
- DIETEL M., 1991. What's new in cytostatic drug resistance and pathology. *Path. Res. Pract.* 187, 892-905.
- DIETEL M., 1993. Second international symposium on cytostatic drug resistance. *Cancer Res.* 53, 2683-2688.
- DOIGE C. A., YU X., SHAROM F. J., 1992. ATP-ase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1109, 149-160.

- DYNAN W. S., SAZAR S., TJIAN R., SCHIMKE T., 1986. *Transcription factor SP1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter*. *Nature* 319, 246-248.
- ELWOOD P. C., 1989. *Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells*. *J. Biol. Chem.* 264, 14893-14901.
- ENDICOTT J. E., LING V., 1989. *The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance*. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 137-171.
- EPAND R. M., STAFFORD A. R., 1993. *Protein kinases and multidrug resistance*. *Cancer J.* 6, 154-158.
- FARDEL O., LECUREUR V., GUILLOUZO A., 1993. *Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes*. *FEBS Lett.* 327, 189-193.
- FARNHAM P. J., SCHIMKE R. T., 1985. *Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle*. *J. Biol. Chem.* 260, 7675-7680.
- FARNHAM P. J., SCHIMKE T., 1986. *In vitro transcription and delimitation of promoter elements of murine dihydrofolate reductase gene*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2392-2401.
- FERRANDIS E., DA SILVA J., RIOU G., BENARD I., 1994. *Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mice*. *Cancer Res.* 54, 2256-2261.
- FINE R. L., PATEL J., CHABNER B. A., 1988. *Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 582-586.
- FORD J. M., HAIT W. N., 1990. *Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer*. *Pharmacol. Rev.* 42, 155-199.
- FUNATO T., YOSHIDA E., JIAO L., TONE T., KASHANI-SABET M., SCANLON K. J., 1992. *The utility of an antisense ribozyme in reversing cisplatin resistance in human carcinomas*. *Adv. Enzyme Regul.* 32, 195-209.
- FOX M., BOYLE J. M., KINSELLA A. R., 1991. *Nucleoside salvage and resistance to antimetabolite anticancer agents*. *Br. J. Cancer* 64, 428-436.
- GILL D. R., HYDE S. C., HIGGINS C. F., VALVERDE M. A., MINTERIG G. M., SEPULVEDA F. V., 1992. *Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. *Cell* 71, 23-32.
- GLISSON B. S., SULLIVAN D. M., GUPTA R., ROSS W. E., 1987. *Mediation of multi-drug resistance in a Chinese hamster ovary cell line by a mutant type II topoisomerase*. *NCI Monographs* 4, 89-93.
- GOLDSTEIN L. J., GALSHI H., FOJO A., WILLINGHAM M., LAI S. L., GAZDAR A., PIRKER R., GREEN A., CRIST W., BRODEUR G. M., LIEBER M., COSSMAN J., GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1989. *Expression of a multidrug resistance gene in human cancer*. *J. Nat. Cancer Inst.* 81, 116-124.
- GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1988. *The multidrug transporter, a double-edged sword*. *J. Biol. Chem.* 263, 12163-12166.
- GOTTESMAN M. M., 1993. *How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture*. *Cancer Res.* 53, 747-754.
- GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1993. *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
- GRANT C. E., VALDIMARSSON G., HIPFNER D. R., ALMQUIST K. C., COLE S. P. C., DEELY R. G., 1994. *Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs*. *Cancer Res.* 54, 357-361.
- GREM J. L., COLLINS J. M., 1990. *Fluorinated pyrimidines: w Cancer Chemotherapy: principles and practise* (red. B. A. CHABNER, J. M. COLLINS), 180-224, Philadelphia, J. B. Lippincott.
- GROS P., RAYMOND M., BELL J., HOUSMAN D. E., 1988. *Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family*. *Mol. Cell Biol.* 8, 2770-2778.
- GROS P., BUSCHMAN E., 1993. *The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis*. *Int. Rev. Cytol.* 137C, 169-197.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1977. *Metabolizm aminanalogów folianu*. *Post. Biochem.* 23, 559-578.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1983a. *Molecular mechanisms of cellular resistance to folate analogs*. *Biology of Cancer* 72, 213-222.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1983b. *Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany*. *Post. Biochem.* 29, 167-190.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1989a. *Oporność wielolekowa komórek nowotworowych — fakty i hipotezy*. *Post. Biochem.* 35, 513-541.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1989b. *Modulatory oporności wielolekowej komórek nowotworowych*. *Post. Biochem.* 35, 543-561.
- HAIT W. N., AFTAB D. T., 1992. *Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance*. *Biochem. Pharmacol.* 43, 103-107.

- HAMADA H., TSURUO T., 1988a. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton glycoprotein is an ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 1454-1458.
- HAMADA H., TSURUO T., 1988b. Characterization of the ATPase activity of the M_r 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in k562/ADM cells. *Cancer Res.* 48, 4926-4932.
- HAMADA H., OKOCHI E., OHARA T., TSURUO T., 1988c. Purification of the M_r 22,000 calcium binding protein (sorctn) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 48, 3173-3178.
- HAUS O., 1990a. Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. I. Mechanizmy oporności na pojedyncze cytostatyki. *Post. Biol. Komórki* 17, 113-128.
- HAUS O., 1990b. Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. II. Oporność wielolekowa. *Post. Biol. Komórki.*, 17, 129-146.
- HENDERSON G. B., 1986. Transport of folate compounds into cells. [W:] *Folates and Pterins* 3, 207-250.
- HEIDELBERGER C., DANENBERG P. V., MORAN R. G., 1983. Fluorinated pyrimidines and their nucleotides. *Adv. Enzymol.* 54, 58-119.
- HIGGINS C. F., GOTTESMAN M. M., 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *TIBS* 17, 18-21.
- Hsu S. J., COHEN D., KIRSCHNER L. S., 1990. Structural analysis of the mouse *mdr1 a* (P-glycoprotein) promoter reveals the basis for differential transcript heterogeneity in multidrug-resistant J774.2 cells. *Mol. Cell Biol.*, 10, 3596-3606.
- HSUEH C. T., DOLNICK B. J., 1994. Regulation of folate binding protein gene expression by DNA methylation in methotrexate-resistant KB cells. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1019-1027.
- HUENNEKENS F. M., VITOLS K. S., HENDERSON G. B., 1978. Transport of folate compounds in bacterial and mammalian cells. *Adv. Enzymol.* 47, 313-346.
- ISHIKAWA T., 1990. Is the glutathione S-conjugate carrier an *mdr1* gene product? *TIBS* 15, 219-220.
- JASTREBOFF M. M., KĘDZIERSKA B., RODE W., 1983. Altered thymidylate synthetase in 5-fluorodeoxyuridine — resistant Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2259-2267.
- JEKUNEN A. P., HOM D. K., ALCARAZ J. E., EASTMAN A., HOWELL S. B., 1994. Cellular pharmacology of dichloro(ethylenediamine)platinum (II) in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 54, 2680-2687.
- KAJJI S., TALBOT F., GRIZZUTI K., VAN DYKE-PHILLIPS V., AGRETI M., SAFA A. R., GROS P., 1993. Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry* 32, 4185-4194.
- KAMEN B. A., EIBL B., CASHMORE A. R., BERTINO J. R., 1984. Uptake and efficacy of trimetrexate, a non-classical antifolate in methotrexate-resistant leukemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1697-1699.
- KAMEN B. A., WANG M. T., STRECKFUSS A. J., PERVEY X., ANDERSON R. G. W., 1988. Delivery of folates to the cytoplasm of MA 104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. *J. Biol. Chem.* 263, 13602-13609.
- KASHANI-SABET M., LU Y., LEONG L., HAEDICKE K., SCANLON K. J., 1990. Differential oncogene amplification in tumor cells from a patient treated with cisplatin and 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 26, 383-390.
- KAWAI K., KAMATANI N., GEORGES E., LING V., 1990. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.* 265, 13137-13142.
- KAYE S. B., 1993. P glycoprotein (P-gp) and drug resistance — time for reappraisal? *Br. J. Cancer* 67, 641-643.
- KELLAND L. R., MISTRY P., ABEL G., LOH S. Y., O'NEILL C. F., MURRER B. A., HARRAP K. R., 1992. Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum (IV) dicarboxylates. *Cancer Res.* 52, 3857-3864.
- KELLEN J. A., 1993. The reversal of multidrug resistance in cancer (review). *Anticancer Res.*, 13, 959-961.
- KELLEY S. L., BASU A., TEICHER B. A., HACKER M. P., HAMER D. H., LAZO J. S., 1988. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241, 1813-1815.
- KIEHNTOFF M., BRACH M. A., LICHT T., PETSCHAUER S., KARAWAJEW L., KIRSCHNING C., HERRMANN F., 1994. Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-1 transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells. *The EMBO J.*, 13, 4645-4652.
- KIOKA N., YAMANO Y., KONANO T., UEDA K., 1992. Heat-shock response elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* 301, 37-40.

- KOBAYASHI H., DORAI T., HOLLAND J. F., OHNUMA T., 1994. *Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme*. *Cancer Res.* 54, 1271-1275.
- KOHNO K., SATO S., TAKANO H., MATSUI K., KUWANO M., 1989. *The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165, 1415-1421.
- KOHNO K., SATO S., UCHIUMI T., TAKANO H., KATO S., KUWANO M., 1990. *Tissue-specific enhancer of the human multidrug-resistance (MDR1) gene*. *J. Biol. Chem.* 265, 19690-19696.
- KRAMER R. A., ZAKHER J., KIM G., 1988. *Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance*. *Science* 241, 694-697.
- KUZMICH S., TEW K. D., 1991. *Detoxification mechanisms and tumor cell resistance to anticancer drugs*. *Med. Research Reviews* 11, 185-217.
- KWOK T. T., SUTHERLAND R. M., 1991. *Epidermal growth factor reduces resistance to doxorubicin*. *Int. J. Cancer* 49, 73-76.
- VAN DER LAAN B. F. A. M., JANSEN G., KATHMANN I., SCHORNAGEL J. H., HORDIJK G. J., 1991. *Mechanism of acquired resistance to methotrexate in a human squamous carcinoma different treatment schedules*. *Eur. J. Cancer* 27, 1274-1277.
- LELONG I. H., PADMANABHAN R., LOVELACE E., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1992. *ATP and GTP as alternative energy sources for vinblastine transport by P-170 in KB-V1 plasma membrane vesicles*. *FEBS Lett.* 304, 256-260.
- LEVINE R. M., RUBALCABA E., LIPPMAN M. E., COWAN K. H., 1985. *Effects of estrogen and tamoxifen on the regulation of dihydrofolate reductase gene expression in a human breast cancer cell line*. *Cancer Res.* 45, 1644-1650.
- LI W. W., LIN J. T., SCHWEITZER B. I., TONG W. P., NIEDZWIECKI D., BERTINO J. R., 1992. *Intrinsic resistance to methotrexate in human soft tissue sarcoma cell lines*. *Cancer Res.* 52, 3908-3913.
- LING V., 1989. *Does P-glycoprotein predict response to chemotherapy?* *J. Nat. Cancer Inst.* 81, 84-85.
- MA L. D., MARQUARDT L., TAKEMOTO L., CENTER M. S., 1991. *Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine*. *J. Biol. Chem.* 266, 5593-5599.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1978. *Biochemiczne podstawy cytotoksycznego działania ametopteryny*. *Post. Biochem.* 24, 93-115.
- MARIANI B. D., SCHIMKE R. T., 1984. *Gene amplification in a single cell cycle in Chinese hamster ovary cells*. *J. Biol. Chem.* 259, 1901-1910.
- MCCLOSKEY D. E., MCGUIRE J. J., RUSSEL C. A., ROWAN B. G., BERTINO J. R., PIZZORNO G., MINI E., 1991. *Decreased folylglutamate synthetase activity as a mechanism of methotrexate resistance in CCRF-CEM human leukemia sublines*. *J. Biol. Chem.* 266, 6181-6187.
- MELERA P. W., DAVIDE J. P., HESSON P. A., SCOTTO K. W., 1984. *Phenotypic expression in Escherichia coli and nucleotide sequence of two Chinese hamster lung cell cDNAs encoding different dihydrofolate reductases*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 38-48.
- MEYERS M. B., SCHNEIDER K. A., SPENGLER B. A., CHANG T. D., BIEDLER J. L., 1987. *SORCIN (V19) a soluble acidic calcium-binding protein overproducer in multidrug-resistant cells. Identification of the protein by anti-sorcine antibody*. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2373-2380.
- MEYERS M. B., YU P., MENDELSON J., 1993. *Crosstalk between epidermal growth factor receptor and P-glycoprotein in actinomycin D-resistant chinese hamster lung cells*. *Biochem. Pharmacol.* 46, 1841-1848.
- MORRIS J. A., MCIVOR R. S., 1994. *Saturation mutagenesis at dihydrofolate reductase codons 22 and 31. A variety of amino acid substitutions conferring methotrexate resistance*. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1207-1220.
- MULKINS M. A., HEIDELBERGER C., 1982. *Isolation of fluoropyrimidine — resistant murine leukemic cell lines by one-step mutation and selection*. *Cancer Res.* 42, 956-964.
- NG W. F., SARANGI F., ZASTAWNY R. L., VEINOT-DREBOT L., LING L., 1989. *Identification of members of the P-glycoprotein multigene family*. *Mol. Cell Biol.* 9, 1224-1232.
- NIELSEN D., SKOVSGAARD T., 1992. *P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines*. *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 169-183.
- OGUCHI H., KIKKAWA F., KOJIMA M., MAEDA O., MIZUNO K., SUGANUMA N., KAWAI M., TOMODA Y., 1994. *Glutathione related enzymes in cis-diamminedichloroplatinum (II) — sensitive and — resistant human ovarian carcinoma cells*. *Anticancer Res.*, 14, 193-200.
- OHKAWA K., HATANO T., ISONISHI S., TAKADA K., JOH K., MATSUDA M., 1994. *Doxorubicin enhances transient expression of P-glycoprotein and modulates activity and isoform expression of protein kinase C in AH66 rat hepatoma cells*. *Int. J. Oncol.* 4, 655-659.

- OLDENGURG J., BEGG A. C., VAN VUGT M. J. H., RUEVEKAMP M., SCHORNAGEL J. H., PINEDO H. M., LOS G., 1994. Characterization of resistance mechanisms to cis-diamminedichloroplatinum (III) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line in vitro. *Cancer Res.* 54, 487-493.
- OLIŃSKI R., ZASTAWNY T. H., 1991. Reakcje leku przeciwnowotworowego: cis-diaminodichloroplatyny (II) z DNA. *Post. Biochem.* 37, 40-47.
- ORR G. A., HAN E. K. -H., BROWNE P. C., NIEVES E., O'CONNOR B. M., YANG C. -P. H., HOROWITZ S. B., 1993. Identification of the major phosphorylation domain of murine *mdr1b* P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 25054-25062.
- PIEKARZ R. L., COHEN D., HORWITZ S. B., 1993. Progesterone regulates the murine multidrug resistance *mdr1b* gene. *J. Biol. Chem.* 268, 7613-7616.
- PIZZORNO G., MINI E., CORONELLO M., MCGUIRE J. J., MOROSON B. A., CASHMORE A. R., DREYER R. N., LIN J. T., MAZZEI T., PERITI P., BERTINO J. R., 1988. Impaired polyglutamation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug. *Cancer Res.* 48, 2149-2155.
- POTMESIL M., HSIANG Y. H., LIU L. F., WU H. Y., TRAGANOS F., BANK B., SILBER R., 1987. DNA topoisomerase II as a potential factor in drug resistance of human malignancies. *NCI Monographs* 4, 105-109.
- POUPON M. F., MARIE J. P., CHEVILLARD S., 1994. Rapport du symposium international: „Resistance against anticancer drugs: molecular mechanisms and clinical opportunities”. *Bull. Cancer* 81, 145-156.
- RAMU A., GLAUBIGER D., WEINTRAUB H., 1984. Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and-resistant P388 cells. *Cancer Treat. Rep.* 68, 637-641.
- RASOLA A., GALIETTA L. J. V., GRUENERT D. C., ROMEO G., 1994. Volume-sensitive chloride currents in 4 epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J. Biol. Chem.* 269, 1432-1436.
- RHEE M. S., WANG Y., NAIR M. G., GALIVAN J., 1993. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced γ -glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res.* 53, 2227-2230.
- RICHERT N. D., ALDWIN L., NITECKI D., GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1988. Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. *Biochemistry* 27, 7607-7613.
- RIMINGTON C., RILEY P. A., 1993. The biochemical approach to cancer therapy: a short essay. *Int. J. Biochem.* 25, 1385-1393.
- RODE W., 1986. Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych. *Post. Biochem.* 32, 401-420.
- ROMINE M. T., KESSEL D., 1986. Intracellular glutathione as a determinant of responsiveness to antitumor drugs. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3323-3326.
- RONINSON I. B., 1992. The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 43, 95-102.
- ROSSANA C., RAO L. G., JOHNSON L. F., 1982. Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1118-1125.
- RUETZ S., GROS P., 1994. A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet? *Trends in Pharm. Sci.*, 15, 260-263.
- SAIKAWA Y., KNIGHT C. B., SAIKAWA T., PAGE S. T., CHABNER B. A., ELWOOD P. C., 1993. Decreased expression of the human folate receptor mediates transport-defective methotrexate resistance in KB cells. *J. Biol. Chem.* 268, 5293-5301.
- SATO W., YUSA K., NAITO M., TSURUO T., 1990. Staurosporine, a potent inhibitor of C-kinase, enhances drug accumulation in multidrug resistant cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1252-1257.
- SCANLON K. J., KASHANI-SABET M., 1988. Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A2780 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 650-653.
- SCHIMKE R. T., 1986. Methotrexate resistance and gene amplification. *Cancer (Phila.)* 57, 1912-1917.
- SCOTTO K. W., BIEDLER J. L., MELERA P. W., 1986. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* 232, 751-755.
- SCHEPER R. J., BROXTERMAN H. J., SCHEFFER G. L., KAAJIK P., DALTON W. S., VAN HEIJNINGEN T. H. M., VAN KALKEN C. K., SLOVAK M. L., DE VRIES E. G. E., VAN DER VALK P., MEIJER CH. J. L. M., PINEDO H. M., 1993. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 53, 1475-1479.
- SCHINKEL A. H., BORST P., 1991. Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins. *Cancer Biol.* 2, 213-226.
- SCHUETZ J. D., SCHUETZ E. G., 1993. Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Growth & Differ.* 4, 31-40.

- SCHWEITZER B. L., SRIMATKANDADA S., GRITSMAN H., SHERIDAN R., VENKATARAGHAVAN R. B., BERTINO J. R., 1989. *Probing the role of two hydrophobic active-site residues in the human dihydrofolate reductase by site directed mutagenesis*. J. Biol. Chem. 264, 20786-20795.
- SCHWEITZER B. J., DICKER A. P., BERTINO J. R., 1990. *Dihydrofolate reductase as a therapeutic target*. FASEB J. 4, 2441-2452.
- SHAPIRO A. B., LING W., 1994. *ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem. 269, 3745-3754.
- SHAROM F. J., YU X., DOIGE C. A., 1993. *Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein*. J. Biol. Chem. 268, 24197-24202.
- SHEN D., CARDARELLI C., HWANG J., CORNWELL M., RICHERT N., ISHII S., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1986. *Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins*. J. Biol. Chem. 261, 7762-7770.
- SIKORA E., JACKMAN A. L., NEWELL D. R., CALVERT A. H., 1988. *Formation and retention and biological activity of N¹⁰-propargyl-5,8-dideazafolic acid (CB 3717) polyglutamates in L1210 cells in vitro*. Biochem. Pharmacol. 37, 4047-4054.
- SIMON S., ROY D., SCHINDLER M., 1994. *Intracellular pH and the control of multidrug resistance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1128-1132.
- SKLAR M. D., 1988. *Increased resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in NIH 3T3 cells transformed by ras oncogenes*. Cancer Res. 48, 793-797.
- SPEARS C. P., GUSTAVSSON B. G., FROHING R., BERNSTEIN L., HAYES A. A., 1988. *Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil*. Cancer Res. 48, 5894-5900.
- SPIRIDONIDIS Ch. A., CHATTERJEE S., PETZOLD S. J., BERGER N. A., 1989. *Topoisomerase II-dependent and -independent mechanisms of etoposide resistance in Chinese hamster cell lines*. Cancer Res. 49, 644-650.
- SUPINO K., MARIANI M., CAPRANICO G., COLOMBO A., PARMIANI G., 1988. *Doxorubicin cellular pharmacokinetics and DNA breakage in a multidrug resistant B16 melanoma cell line*. Br. J. Cancer 57, 142-146.
- SZMIGIERO L., 1988. *Topoizomeraza II jako komórkowy receptor niektórych leków przeciwnowotworowych*. Post. Biochem. 34, 147-152.
- TANIMURA H., KOHNO K., SATO S., UCHIUMI T., MIYAZAKI M., KOBAYASHI M., KUWANO M., 1992. *The human multidrug resistance 1 promoter has an element that responds to serum starvation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 183, 917-924.
- TEETER L. D., ECKERSBERG T., TSAI Y., KUO M. T., 1991. *Analysis of the Chinese hamster P-glycoprotein/multidrug resistance gene pgp1 reveals that the AP-1 site is essential for full promotor activity*. Cell Growth Differ. 2, 429-437.
- THIERRY A. R., RAHMAN A., DRITSCHILLO A., 1993. *Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 190, 952-960.
- TREZISE A. E. O., ROMANO P. R., GILL D. R., HYDE S. C., SEPULVEDA F. V., BUCHWALD M., HIGGINS C. F., 1992. *The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression*. EMBO J., 11, 4291-4303.
- TRITTON T. R., 1991. *Cell surface actions of adriamycin*. Pharmacol. Ther. 49, 293-309.
- TSURUO T., IIDA H., TSUKAGOSHI S., SAKURAI Y., 1981. *Overcoming vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine*. Cancer Res. 41, 1967-1972.
- UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1987. *Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug resistance (P-glycoprotein) gene*. J. Biol. Chem. 262, 17432-17436.
- UEDA K., SHIMABUKU A. M., KONISHI H., FUJII Y., TAKEBE S., NISHI K., YOSHIDA M., BEPPU T., KOMANO T., 1993. *Functional expression of human P-glycoprotein in Schizosaccharomyces pombe*. FEBS Lett. 3, 279-282.
- VALVERDE M. A., DIAZ M., SEPULVEDA F. V., GILL D. R., HYDE S. C., HIGGINS C. F., 1992. *Volume regulated chloride channels associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein*. Nature 355, 830-833.
- WAHSTEN W. L., 1984. *Increased levels of thymidylate synthetase in cells exposed to 5-fluorouracil*. Mol. Pharmacol. 25, 171-177.
- WANI M. A., XU X., STAMBROOK P. J., 1994. *Increased methotrexate resistance and dhfr gene amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells*. Cancer Res. 54, 2504-2508.

- WANG F. S., ASCHELE C., SOBRERO A., CHANG Y. M., BERTINO J. R., 1993. *Decreased folylpolyglutamate synthetase expression: a novel mechanism of fluorouracil resistance*. Cancer Res. 53, 3677–3680.
- WEINSTEIN R. S., JAKATE S. M., DOMINGUEZ J. M., LEBOVITZ M. D., KOUKOULIS G. K., KUSZAK J. R., KLUSENS L. E., GROGAN T. M., SACLARIDES T. J., RONINSON I. B., COON J. S., 1991. *Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis*. Cancer Res. 51, 2720–2726.
- WEST I. C., 1990. *What determines the substrate specificity of the multi-drug-resistance pump?* TIBS 15, 42–46.
- YAMAZAKI H., SCHNEIDER E., MYERS E., SINHA B. K., 1994. *Oncogene overexpression and de novo drug-resistance in human prostate cancer cells*. Biochim. Biophys. Acta 1226, 89–96.
- YOSHIMURA A., KUWAZURU Y., SUMIZAWA T., IRYEDA S. I., ICHIKAWA M., USAGAWA T., AKIYAMA S. I., 1989. *Biosynthesis, processing and half-life of P-glycoprotein in a human multidrug-resistant KB cell*. Biochim. Biophys. Acta 992, 307–314.
- YU L., COHEN D., PIEKARZ R. L., HOROWITZ S. B., 1993. *Three distinct nuclear protein binding sites in the promoter of the murine multidrug resistance *mdr1b* gene*. J. Biol. Chem. 268, 7520–7526.
- YU M., MELERA P. W., 1993. *Allelic variation in the dihydrofolate reductase gene at amino acid position 95 contributes to antifolate resistance in Chinese hamster cells*. Cancer Res. 53, 6031–6035.
- ZAMAN G. J. R., VERSANTVOORT C. H. M., SMIT J. J. M., ELJDEMS W. H. M., DE HAAS M., SMITH A. J., BROXTERMAN H. J., MULDER N. H., DE VRIES E. G. E., BAAS F., BORST P., 1993. *Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines*. Cancer Res. 53, 1747–1750.
- ZAMORA J. M., PEARCE H. L., BECK W. T., 1988. *Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells*. Mol. Pharmacol. 33, 454–462.
- ZHANG Z. G., HARSTRICK A., RUSTUM Y. M., 1992. *Mechanism of resistance to fluoropyrimidines*. Seminars in Oncology 19, 4–9.
- ZIELIŃSKA Z. M., 1981. *Interferencja antymetabolitów z metabolizmem komórkowym jako podstawa chemioterapii*. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego DCXLVI, Prace z biologii molekularnej 8, 207–223.
- ZIJLSTRA J. G., DE VRIES E. G. E., MULDER N. H., 1987. *Multifactorial drug resistance in an adriamycin-resistant human small lung carcinoma cell line*. Cancer Res. 47, 1780–1784.