

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi, znakomitemu Uczonemu, wspaniałemu Człowiekowi jako maleńki wyraz ogromnego podziwu i szacunku artykuł ten dedykuje

GRZEGORZ BARTOSZ

*Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź*

MRP: NOWY TRANSPORTER WIELOLEKOWY

Zjawisko oporności wielolekowej jest główną przyczyną niepowodzeń w chemioterapii nowotworów. Obecnie około 50% pacjentów, u których stwierdza się nowotwory jest poddawanych terapii operacyjnej i napromieniowaniu. Pozostałe przypadki wymagają leczenia systemowego ze względu na zasięg nowotworu czy liczne przerzuty. Leczenie systemowe polega zwykle na podawaniu kombinacji leków cytotoksycznych. Chemioterapia taka jest z reguły skuteczna w przypadkach nowotworów układu krwiotwórczego i nowotworów występujących u dzieci, jednak większość nowotworów pochodzących z przerzutów wykazuje samoistną bądź pojawiającą się w odpowiedzi na podawanie leków oporność na chemioterapię. Oporność ta dotyczy wielu leków, nie wykazujących podobieństwa strukturalnego i dlatego jest nazywana opornością wielolekową (CASS 1995). Ocenia się, że zjawisko oporności wielolekowej jest odpowiedzialne co roku za około 450 000 zejść śmiertelnych chorych na nowotwory w samych Stanach Zjednoczonych (GREENBERGER i ISHIKAWA 1994).

Zjawisko oporności wielolekowej ma wieloczynnikowe podłoże. Może być uwarunkowane mutacyjnymi zmianami struktury topoizomerazy I i topoizomerazy II, podwyższeniem stężenia glutationu i aktywności transferazy glutationowej, zmianami aktywności białek zaangażowanych w procesy naprawy DNA czy nadekspresja białka LRP (białka sklepień, o niezupełnie jeszcze jasnej funkcji) (HILL 1996), jednak najważniejszą i najbardziej intensywnie badaną przyczyną oporności wielolekowej jest nadekspresja w komórkach nowotworowych pomp aktywnie eksportujących z komórek cytostatyki stosowane w terapii.

W 1968 roku zauważono po raz pierwszy, że komórki wyselekcjonowane pod względem

oporności na daunomycynę gromadziły mniej tego leku niż komórki wyjściowe (KESSEL i współaut. 1968). Podobne obserwacje dotyczyły aktynomycyny D (BIEDLER i RIEHM 1970). Jakkolwiek kilka lat później wykazano aktywny transport daunomycyny na zewnątrz komórek raka wydzielniczego Ehrlicha (DANO 1973), to jednak białko, które ulegało nadekspresji w komórkach jajnika chomika chińskiego opornych na kolchicynę i wydawało się warunkować tę oporność przypisano funkcję zmniejszania przepuszczalności błony i nazwano je glikoproteiną P (od słowa permeability — przepuszczalność) (JULIANO i LING 1976).

W świetle wyników intensywnych badań jest obecnie jasne, że glikoproteina P jest transporterem typu ABC, usuwającym cytostatyki i szereg innych substancji na zewnątrz komórek, choć mechanizm działania tego białka i zadziwiający szeroki zakres transportowanych przez nie związków ciągle oczekuje wyjaśnienia (BEL-LAMY 1996, GOTTESMAN i PASTAN 1993).

Przez szereg lat sądzono, że glikoproteina P, produkt genu *MDR1*, jest jedynym białkiem odpowiedzialnym za wypompowywanie chemioterapeutyków z komórek nowotworowych. Stwierdzono jednak, że wiele linii komórek nowotworowych (zwłaszcza pochodzących z drobnokomórkowych nowotworów płuc) nie wykazuje nadekspresji glikoproteiny P, choć widmo oporności wielolekowej tych komórek jest zbliżone do tej, jaką warunkuje glikoproteina P. W komórkach wielolekowo odpornej linii NCI-H69 wyprowadzonej z nowotworu płuca stwierdzono nadekspresję innego białka błonowego o względnej masie cząsteczkowej 190 000, nazwanego następnie białkiem towarzyszącym oporności wielolekowej MRP (multidrug resistance-associated protein). Rola tego białka w oporności wie-

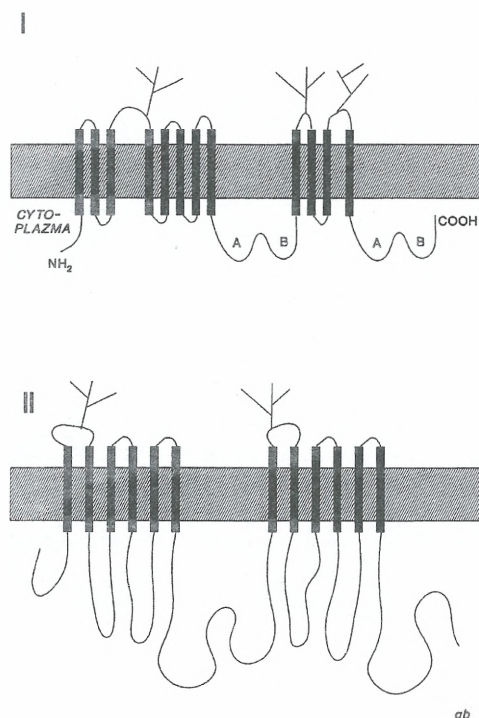
lolekowej może być o tyle istotniejsza, że — jak się wydaje — jego ekspresja ulega wzmoczeniu już pod wpływem działania stosunkowo niskich stężeń leków, podczas gdy nadekspresja glikoproteiny P wymaga zwykle wyższych stężeń terapeutyków (BROXTERMAN i współaut. 1995). Spontaniczną i indukowaną oporność wielolekową, uwarunkowaną nadekspresją MRP stwierdzono w przypadkach nowotworów różnego pochodzenia tkankowego, obejmujących raki drobnokomórkowe i niedrobnokomórkowe płuc, włókniako-mięsaki, białaczki (HILL 1996, NOOTER i współaut. 1996, THOMAS i współaut. 1994), pierwotne nerwiaki niedojrzałe (NORRIS i współaut. 1996), glejaki oraz raki piersi, tarczycy, pęcherza moczowego, prostaty i szyjki macicy (STRIDE i współaut. 1996, SUGAWARA i współaut. 1995). MRP wykryto w około 50% badanych przypadków czerniaka, zarówno w guzach pierwotnych, jak i wtórnych (SCHADENDORF i współaut. 1995). Dotychczas uzyskane dane wskazują, że nadekspresja glikoproteiny P i MRP nie są współzależne (BURGER i współaut. 1994; HART i współaut. 1994).

MRP jest kodowane przez gen zlokalizowany w paśmie p13.1 chromosomu 16. Nadekspresji białka towarzyszy amplifikacja kodującego go genu (COLE i współaut. 1992). MRP występuje powszechnie w komórkach. Jego obecność stwierdzono we wszystkich badanych tkankach i narządach, między innymi w płucach, żołądku, nerce, śledzionie, jelicie, tarczycy, jądrach, pęcherzu moczowym, nadnerczach, trzustce, woreczku żółciowym, łożysku, mięśniach szkieletowych (ZAMAN i współaut. 1993) i komórkach krwi (ABBASZADEGAN i współaut. 1994), w tym w krwinkach czerwonych (PUŁASKI i współaut. 1996). Szczególnie wysoka ekspresja MRP cechuje nadnercza, a stosunkowo niska wątrobę i jelito grube (BROXTERMAN i współaut. 1995, ZAMAN i współaut. 1993). Spośród komórek krwi wyższą zawartość MRP wykazują granulocyty i limfocyty T (BURGER i współaut. 1994), podczas gdy więcej glikoproteiny P mają cytotoksyczne limfocyty CD56+ i CD8+ (BROXTERMAN i współaut. 1995). MRP znajduje się w regionach podstawno-bocznych komórek nerki, w przeciwieństwie do glikoproteiny P rozlokowanej apikalnie (EVERS i współaut. 1996).

Sekwencja aminokwasowa MRP dowodzi, że białko to również należy do rodziny transporterów ABC (ATP binding cassette), białek transportowych zawierających kasetę wiążącą ATP. Białko jest zbudowane z 1531 reszt aminokwasowych (COLE i DEELEY 1993) i zawiera 12 segmentów hydrofobowych, które mogą odpowiadać rejonom cząsteczki przebiegającym dwuwarstwą lipidową błony. Zaproponowany model to-

pologii MRP nie odpowiada kanonicznemu symetrycznemu schematowi transporterów ABC błon plazmatycznych komórek Eukaryota, oddającemu ich genezę drogą duplikacji pierwotnego genu, w którym dwa rejony przezbłonowe (każdy zawierający 6 α -helikalnych segmentów hydrofobowych, przebiegających dwuwarstwą lipidową błony) są oddzielone od siebie dwoma segmentami wystającymi do cytoplazmy: kasetą wiążącą ATP i rejonem łącznikowym (HIGGINS 1992). Model struktury MRP zaproponowany na podstawie analizy profilu hydrofobowości białka zakłada występowanie w cząsteczce dwu nierównych obszarów przezbłonowych oddzielonych od siebie kasetą wiążącą ATP i rejonem łącznikowym: jeden obszar przezbłonowy ma być złożony z ośmiu, a drugi z czterech segmentów przechodzących przez błonę (ALMQUIST i współaut. 1995). Ostatnio zaproponowano jednak konkurencyjny model struktury MRP, zgodny z kanonicznym modelem zduplikowanych transporterów ABC (BAKOS i współaut. 1996) (ryc. 1). Charakterystyczną cechą sekwencji MRP (oraz receptora sulfonilomoczników SUR i białka YCF1 *Saccharomyces cerevisiae*) jest obecność N-końcowego segmentu złożonego z około 230 reszt aminokwasowych, który zawiera 5 lub 6 dodatkowych segmentów hydrofobowych, mogących przebiegać błonę. Nie można więc wykluczyć, że MRP posiada 18, a nie 12–13 przezbłonowych segmentów α -helikalnych (STRIDE i współaut. 1996). Sekwencja aminokwasowa białka wykazuje trzy potencjalne miejsca glikozylacji (ALMQUIST i współaut. 1995). Zahamowanie glikozylacji MRP działaniem tunikamycyny nie wpływa na jego funkcję transportową, natomiast zmniejsza względną masę cząsteczkową białka do 150 000 (BAKOS i współaut. 1996). Stopień identyczności sekwencji aminokwasowej MRP z sekwencją glikoproteiny P jest niski (15%); nieco wyższy jest stopień identyczności MRP i białka (CFTR), którego mutacje powodują mukowiscydozę (19%) (COLE i współaut. 1992). Znacznie większa identyczność sekwencji wiąże MRP z transporterem YCF1 drożdży *Saccharomyces cerevisiae* transportującym S-koniugaty glutationu (42,6%) (SZCZYPKA i współaut. 1994) oraz białkiem Lt/PGPA *Leishmania tarentolae*, odpowiedzialnym za oporność na oksyaniony metali ciężkich (PAPADOPOULOU i współaut. 1994).

Transfekcja komórek wektorem ekspresyjnym, zawierającym cDNA dla MRP, powoduje nabycie przez te komórki oporności na takie związki, jak doksorubicyna, daunomycyna, aktynomycyna D, etopozyd, winkrystyna, winblastyna i kolchicyna, a także oksyaniony niektórych metali ciężkich, takich jak arsen czy



Ryc. 1. Dwa modele struktury cząsteczki MDR zaproponowane w oparciu o analizę sekwencji aminokwasowej.

Według ALMQUIST i współpracowników (1995) (I) oraz (II), BAKOS i współpracowników (1966) zmodyfikowane. A — region wiążący ATP, B — region łącznikowy.

antymon lecz nie na cisplatynę czy taksol (BREUNINGER i współaut. 1995, COLE i współaut. 1994, GRANT i współaut. 1994, ZAMAN i współaut. 1994). Transfekcja genem MRP powoduje obniżenie wewnątrzkomórkowej akumulacji związków, na które komórki nabywają oporność i zwiększenie eksportu tych związków z komórek (ZAMAN i współaut. 1994). Odwrócone (inside-out) pęcherzyki transfekowanych komórek akumulują takie związki w sposób zależny od ATP (LOE i współaut. 1996b). Dane te sugerują, że MRP, podobnie jak glikoproteina P, jest aktywnym transporterem usuwającym z komórek związki stosowane w chemioterapii. Jednakże komórki linii H69/AR, pierwsze, w których klonowano MRP, nie wykazują zmniejszenia wewnątrzkomórkowych stężeń cytostatyków. Sugerowano, że w tych komórkach MRP może pompować leki nie na zewnątrz komórki, lecz do ziarnistości cytoplazmatycznych, z których są one następnie usuwane drogą egzocytozy. W niektórych komórkach, wykazujących silną nadekspresję MRP, obecność tego białka stwierdzono nie tylko w błonie plazmatycznej, lecz także w aparacie Golgiego i w innych strukturach wewnątrzkomórkowych (FLENS i współaut. 1994, HIPFNER i współaut. 1994), co mogłoby potwierdzać tę hipotezę.

Oceniano, że szybkość transportu daunomycyny przez MRP odpowiada przenoszeniu przez cząsteczkę tego białka 2–4 cząsteczek substratu w ciągu sekundy. Szybkość ta jest zbliżona do szybkości transportu przez glikoproteinę P (BROXTERMAN i współaut. 1995). Specyficzność substratowa i wrażliwość na działanie inhibitorów obu białek są podobne lecz nie identyczne. Taksol jest dobrym substratem glikoproteiny P, lecz nie MRP; oporność wielolekowa zależna od glikoproteiny P jest znoszona przez werapamil, cyklosporynę A i analogi cyklosporyny, lecz te substancje słabo wpływają na oporność wielolekową zależną od MRP (BARRAND i współaut. 1993, COLE i współaut. 1989, COLEY i współaut. 1991, ZAMAN i współaut. 1994). Natomiast izoflawonoid genisteina hamuje silniej MRP niż glikoproteinę P (VERSANTVOORT i współaut. 1993, 1994). Transport anionów organicznych przez MRP jest hamowany przez probenecyd, a transport leukotrienu C₄ przez antagonistę receptora leukotrienu D₄, kwas 3-((3-(2-[7-chloro-2-chinolinyl]etylo)-fenylo)-((3-dimetyloamino-3-oksopropyl)-tio)-metylo)tio)propanowy (związek MK571) (BROXTERMAN i współaut. 1995). Porównanie wpływu różnych inhibitorów na transport, odpowiednio kalceiny i acetoksymetylokalceiny przez glikoproteinę P i MRP (tab. 1), sugeruje różnice we wrażliwości obu białek na działanie także szeregu innych inhibitorów.

Istotną właściwością i, być może, główną rolą fizjologiczną MRP jest transport S-koniugatów glutationu i innych anionowych koniugatów ksenobiotyków, powstających w wyniku wewnątrzkomórkowych procesów detoksykacji. Komórki wykazujące nadekspresję MRP charakteryzują się znacznie podwyższoną aktywnością aktywnego transportu leukotrienu C₄ i innych S-koniugatów glutationu (JEDLITSCHKY i współaut. 1994, LEIER i współaut. 1994, MÜLLER i współaut. 1994, SHEN i współaut. 1996). Transport S-koniugatów glutationu przez MRP jest hamowany kompetycyjnie przez takie leki cytostatyczne, jak daunomycyna, winkrystyna czy etopozyd (SHEN i współaut., 1996). MRP wydaje się więc być białkiem tożsamym z „pompą S-koniugatów glutationu” (ISHIKAWA 1992), aktywnym transporterem tych związków, którego molekularna identyczność przez wiele lat była przedmiotem kontrowersji (BARTOSZ 1994a, b). Ekspresja MRP człowieka w komórkach mutantu *S. cerevisiae* pozbawionych endogennego transportera S-koniugatów glutationu, jakim u drożdży piekarniczych jest białko YCF1, przywraca aktywny transport S-koniugatów glutationu do pęcherzyków mikrosomalnych tych komórek (TOMMASINI i współ-

Tabela 1. Stałe kinetyczne charakteryzujące transport substratów przez MRP

Związek	Komórki	Metoda badania	$K_m[\mu M]$	V_{max}	Odnosnik
Leukotrien C ₄	HeLa T5	akumulacja w pęcherzykach	0,097	100 pmol/(mg białka × min)	JEDLITSCHY i współaut. 1996
Leukotrien C ₄	HeLa T14	akumulacja w pęcherzykach	0,105	529 pmol/ (mg białka × min)	LOE i współaut. 1996b
Azydofenacylo-glutation	HL60/ADR	akumulacja w pęcherzykach	15	180 pmol/(mg białka × min)	SHEN i współaut. 1996
Dinitrofenylo-S-glutation	HeLa T5	akumulacja w pęcherzykach	3,6	409 pmol/ (mg białka × min)	JEDLITSCHKY i współaut. 1996
Etopozyd	WEHI-3B/NOVO	eksport z komórek	255	62 pmol (10 ⁶ komórek × min)	LORICO i współaut. 1995
17β- glukoronylo-estradiol	HeLa T5	akumulacja w pęcherzykach	1,5	63 pmol/ (mg białka × min)	JEDLITSCHKY i współaut. 1996
17β- glukoryno-estradiol	HeLa T14	akumulacja w pęcherzykach	2,5	1,4 nmol/ (mg białka × min)	LOE i współaut. 1996a
Daunomycyna	GLC ₄ /ADR	eksport z komórek	1,4	200 pmol/ (10 ⁶ komórek × min)	VERANTSVOORT i współaut. 1994

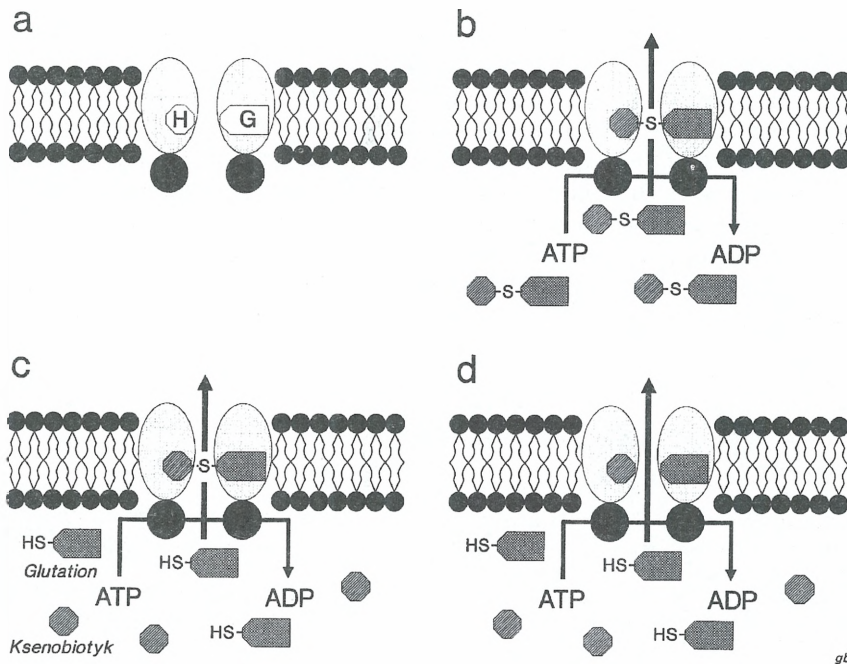
aut. 1996). Ksenobiotyki ulegające wewnątrzkomórkowemu sprzęganiu z glutationem stymulują ekspresję MRP: stwierdzono 2–3-krotny wzrost poziomu MRP w komórkach nowotworu jelita grubego DT6-8 w wyniku przewlekłej ekspozycji komórek na działanie kwasu etakrynowego (CIACCIO i współaut. 1996). Oprócz S-koniugatów glutationu MRP transportuje również utleniony glutation (disulfid glutationu; GSSG) (LEIER i współaut. 1996), glukuronidy steroidów oraz koniugaty kwasów żółciowych (JEDLITSCHKY i współaut. 1996).

Trudno jest jeszcze definitywnie powiedzieć, czy MRP jest jedyną „pompą S-koniugatów glutationu”. W krwinkach czerwonych wykazano istnienie dwóch składowych kinetycznych transportu S-koniugatów glutationu, jednej o wysokim powinowactwie i niskiej szybkości maksymalnej transportu i drugiej o niskim powinowactwie i wysokiej szybkości maksymalnej transportu (AKERBOOM i współaut. 1992, BARTOSZ i współaut. 1993, ECKERT i EYER 1986). Dane kinetyczne dotyczące transportu S-koniugatów glutationu przez MRP (tab. 2) sugerują, że białko to odpowiada składowej kinetycznej transportu S-koniugatów glutationu o wyższym powinowactwie. Jakie białko jest więc transporterem o niższym powinowactwie?

Eksport z komórek daunomycyny przez MRP (lecz nie przez glikoproteinę P) jest hamowany w następstwie obniżenia stężenia glutationu w komórkach (ZAMAN i współaut. 1995). Szybkość transportu winkrystyny do odwróconych pęcherzyków błonowych komórek HeLa transfekowanych genem *MRP* ulega zwiększeniu w obecności zredukowanego glutationu

(LOE i współaut. 1996b). JEDLITSCHKY i współautorzy (1966) nie byli w stanie stwierdzić transportu daunomycyny i winblastyny do pęcherzyków otrzymanych z błon komórek wykazujących nadekspresję MRP; pomiary te były prowadzone w nieobecności glutationu. Może to sugerować, że również substraty MRP nie będące koniugatami (takie jak leki cytostatyczne) są transportowane przez MRP w formie koniugatów z glutationem. Powstawania takich koniugatów nie udało się wprowadzić wykazać, jednak protagoniści tej koncepcji postulują istnienie nietrwałych niekowalencyjnych połączeń bądź też kotransport glutationu i ksenobiotyków warunkowany koniecznością obecności ligandów w obu hipotetycznych miejscach wiążących białka, hydrofobowym i glutationowym, dla zajścia aktu translokacji substratu(-ów) przez błonę (ryc. 2). Nie udało się jednak stwierdzić, by transportowi daunomycyny towarzyszyło zwiększenie uwalniania glutationu do środowiska (BROXTERMAN i współaut. 1995, VERSANTVOORT i współaut. 1995). Poza tym obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu nie wpływało na transport innego substratu MRP, kalceiny (FELLER i współaut., 1995, HOLLÓ i współaut. 1996). Inne tłumaczenie zależności pomiędzy poziomem glutationu a aktywnością transportową MRP zakłada, że białko to jest wrażliwe na stres oksydacyjny wywołany obniżeniem poziomu glutationu w komórkach (FELLER i współaut. 1995).

Jeżeli transport cytostatyków przez MRP istotnie wymaga ich kompleksowania z glutationem, otwierałoby to pole do działań terapeutycznych, które winny kojarzyć podawanie le-



Ryc. 2. Koncepcja mechanizmu działania MRP jako transportera koniugatów reszt hydrofobowych i anionów.

W myśl koncepcji, białko to ma miejsce wiążące ujemnie naładowaną resztę glutationu (i zapewne inne aniony; G) oraz miejsce wiążące reszty hydrofobowe (H) (a). MRP transportuje trwale kowalencyjne S-koniugaty glutationu (b). MRP może transportować również nietrwałe połączenia kowalencyjne lub niekowalencyjne kompleksy ksenobiotyków i glutationu (c) lub prowadzić symport ksenobiotyków i glutationu (d). Warunkiem transportu jest związanie ligandów przez oba miejsca wiążące.

gb

Tabela 2. Stężenia różnych inhibitorów hamujące w 50% transport acetoksymetylokalceiny przez glikoproteinę P z komórek 3 TY MDR i komórek K562 MDR oraz kalceiny przez MRP z komórek HL60 ADR (wg HOLLÓ i współautorów 1996). CCCP: karbonylocyjanido-3-chlorofenylophydrazon.

Inhibitor	IC ₅₀ [μM]	
	MRP	Glikoproteina P
Winblastyna	2-5	2-3
Tamoksyfen	3-6	2-5
Cyklosporyna A	2-4	0,5-1
Werapamil	4-8	2-5
Ekonazol	3-10	1-3
Chinina	50-100	20-30
Oligomycyna	1-2	1-2
CCCP	10-30	> 200
2,4-dinitrofenol	30-50	> 200
Probenecyd	500-800	> 2000
Sulfinopirazon	300-500	> 2000
Benzobromaron	5-100	> 500
Indometacyna	10-20	> 800
Cholan sodu	200-300	> 1000
Bromosulfoftaleina	100-150	> 1000
Kwas etakrynowy	20-30	> 800
Mertiolan	10-20	> 200
N-etylomaleimid	0,2-0,5	> 50
N-pirenomaleimid	0,1-0,2	> 20
Genisteina	150-200	> 1000
Chlorambucyl	30-50	> 500
Prostglandyna A ₁	3-5	> 100

ków cytostatycznych z podawaniem związków obniżających w komórkach stężenie zredukowanego glutationu (BROXTERMAN i współaut. 1995).

Jednym z miejsc najbardziej intensywnego aktywnego transportu S-koniugatów glutationu i innych anionów organicznych w organizmie są regiony kanalikularne błon hepatocytów, poprzez które związki te są wydalone do żółci. Kinetyczne badania transportu nie mogły rozstrzygnąć kwestii, czy „pompa S-koniugatów glutationu” z kanalikularnych regionów błon hepatocytów jest tożsama z białkiem obecnym w błonach komórek innych typów (BARTOSZ 1994a). Analiza sekwencji nukleotydowej cDNA kodującego transporter S-koniugatów glutationu z wątroby wykazała, że odpowiada ona białku podobnemu do MRP, lecz nie identycznemu z nim (PAULUSMA i współaut. 1996, BÜCHLER i współaut. 1996). Jest ono określane jako kanalikularne białko związane z opornością wielolekową cMRP (canalicular MRP) (BÜCHLER i współaut. 1996) lub kanalikularny wielospecyficzny transporter anionów organicznych cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter,) (PAULUSMA i współaut. 1996). cMRP z wątroby szczura zawiera 1541 reszt aminokwasowych, wykazuje 47,8% identyczności sekwencji aminokwasowej z MRP człowieka, 41,9% identyczności sekwencji z białkiem YCF1 *S. cerevisiae* (BÜCHLER i współaut. 1996) i 30,2% identyczności sekwencji z białkiem CFTR człowieka (PAULUSMA i współaut. 1996). cMRP nie ulega ekspresji u osób z zespołem Dubina-Johnsona (dziedziczny defekt wydalania S-koniugatów glutationu i innych anio-

nów organicznych do żółci, przejawiający się chroniczną hiperbilirubinemią i intensywną czarną lub fioletową pigmentacją wątroby) oraz w liniach szczurów będących zwierzęcymi modelami zespołu Dubina-Johnsona (szczury Wistar GY/TR-) (BÜCHLER i współaut. 1996, PAULUSMA i współaut. 1996), choć w tych przypadkach w regionach lateralnych błon hepatocytów jest obecne MRP (KARTENBECK i współaut. 1996). Brak ekspresji cMRP w wątrobie szczurów GY/TR- jest wynikiem delecji jednego z nukleotydów kodujących aminokwas 393, co

powoduje przesunięcie ramki odczytu i pojawienie się kodonu stop w pozycji 401 (PAULUSMA i współaut. 1996).

Jak dotychczas MRP i cMRP nie zostały wyizolowane, a dane dotyczące mechanizmu ich działania są fragmentaryczne i rozbieżne. Należy oczekiwać, że to pole badań przyniesie w najbliższych latach interesujące wyniki, przybliżające zrozumienie molekularnej fizjologii transporterów ABC. Znaczenie kliniczne MRP z pewnością będzie bodźcem do intensyfikacji tych badań.

MRP: A NEW MULTIDRUG TRANSPORTER

Summary

One of the main causes of multidrug resistance of tumors is the overexpression of export pumps which actively extrude cytostatic drugs. Apart from glycoprotein P (product of the *MDR1* gene), another ABC transporter involved in this phenomenon is the Multidrug Resistance-associated Protein (MRP). Physiological function of MRP, distributed

ubiquitously in all tissues studied, is the transport of glutathione S-conjugates and of other anionic conjugates of xenobiotics. A closely related but different protein (cMRP), found in the canalicular region of the hepatocyte membrane, is responsible for the biliary extrusion of the conjugates.

LITERATURA

- ABBASZADEGAN M. R., FUTSCHER B. W., KLIMECKI W. T., LIST A., DALTON W. S., 1994. Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells. *Cancer Res.* 54, 4676–4679.
- AKERBOOM T. P. M., BARTOSZ G., SIES H., 1992. Low- and high- K_m transport of dinitrophenyl glutathione in inside-out vesicles from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 115–119.
- ALMQUIST K. C., LOE D. W., HIPFNER D. R., MACKIE J. E., COLE S. P. C., DEELEY R. G., 1995. Characterization of the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 55, 102–110.
- BAKOS E., HEGEDÜS T., HOLLÓ Z., WELKER E., TUSNÁDY G. E., ZAMAN G. J. R., FLENS M. J., VÁRADI A., SARKADI B., 1996. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 271, 12322–12326.
- BARRAND M. A., RHODES T., CENTER M. S., TWENTYMAN P. R., 1993. Chemosensitization and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC-833 and verapamil in human MDR large lung cancer cells expressing a 190k membrane protein distinct from P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer* 29, 408–415.
- BARTOSZ G., 1994a. Membrane transport of glutathione conjugates. *Curr. Top. Biophys.* 18, 232–237.
- BARTOSZ G., 1994b. Pompa S-koniugatów glutationu. *Curr. Top. Biophys.* 18S, 31–45.
- BARTOSZ G., SIES H., AKERBOOM T. P. M., 1993. Organic anions exhibit distinct inhibition patterns on the low- K_m and high- K_m transport of S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione through the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 292, 171–174.
- BELLAMY W. T., 1996. P-Glycoproteins and multidrug resistance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 161–183.
- BIEDLER J., RIEHM H., 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30: 1174–1184.
- BREUNINGER L. M., PAUL S., GAUGHAN K., MIKI T., CHAN A., AARONSON S. A., KRUH G. D., 1995. Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.* 55, 5342–5347.
- BROXTERMAN H. J., GIACCONE G., LANKELMA J., 1995. Multidrug resistance protein and other drug transport-related resistance to natural product agents. *Curr. Opin. Oncol.* 7, 532–540.
- BÜCHLER M., KÖNIG J., BROM M., KARTENBECK J., SPRING H., HORIE T., KEPPLER D., 1996. cDNA cloning of the multidrug resistance protein, cMRP, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271, 15091–15098.
- BURGER H., NOOTER K., ZAMAN G. J. R., SONNEVELD P., VAN WINGERDEN K. E., OOSTRUM R. G., STOTER G., 1994. Expression of the multidrug resistance protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 6, 990–997.
- CASS C. E., 1995. Membrane transport of anticancer drugs and drug resistance. [W:] *Pharmacological Sciences: Perspectives for Research and Therapy in the Late 1990s*, CUELLO A. C., COLLIER B. (red.), Birkhäuser Verlag, Basel, 418–431.
- CIACCIO P. J., SHEN H., KRUH G. D., TEW K. D., 1996. Effects of chronic ethacrynic acid exposure on glutathione conjugation and MRP expression in human colon tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222, 111–115.
- COLE S. P. C., BHARDWAJ G., GERLACH J. H., MACKIE J. E., GRANT C. E., ALMQUIST K. C., STEWART A. J., KURZ E. U., DUNCAN A. M. V., DEELEY R. G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650–1654.
- COLE S. P. C., DEELEY R. G., 1993. Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. *Science* 260, 879.
- COLE, S. P. C., DOWNES H. F., SLOVAK M. L., 1989. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug-resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* 59, 42–46.
- COLE S. P. C., SPARKAS K. E., FRASER K., LOE D. W., GRANT C. E., WILSON G. M., DEELEY R. G., 1994. Pharmacological

- characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 54, 5902–5910.
- COLEY H. M., WORKMAN P., TWEENTYMAN P. R., 1991. Retention of activity by selected anthracyclines in a multidrug resistant human large cell lung carcinoma line without P-glycoprotein hyperexpression. *Br. J. Cancer* 63, 351–357.
- DANO K., 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 466–483.
- ECKERT K. G., EYER P., 1986. Formation and transport of xenobiotic glutathione S-conjugates in red cells. *Biochem. Pharmacol.* 35, 325–329.
- EVERS R., ZAMAN G. J. R., VAN DEEMTER L., JANSEN H., CALAFAT J., OOMEN L. C. J. M., OUDE ELFERINK R. P. J., BORST P., SCHINKEL A. H., 1996. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cell. *J. Clin. Invest.* 97, 1211–1218.
- FELLER N., BROXTERMAN H. J., WÄHRER D. C. R., PINEDO H. M., 1995. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): No inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett.* 368, 385–388.
- FLENS M. J., IZQUIERDO M. A., SCHEFFER G. L., FRITZ J. M., MEIJER C. J. L. M., SCHEPER R. J., ZAMAN G. J. R., 1994. Immunohistochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 54, 4557–4563.
- HILL B. T., 1996. Drug resistance: An overview of the current state of the art. *Int. J. Oncol.* 9, 197–203.
- GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 385–427.
- GRANT C. E., HIPFNER D. R., PALDIMARSSON G., ALMQUIST K. C., COLE S. P. C., DEELEY R. G., 1994. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 54, 357–361.
- GREENBERGER L. M., ISHIKAWA Y., 1994. ATP-binding proteins. Common denominators between ion channels, transporters and enzymes. *Trends Cardiovasc. Med.* 4, 193–198.
- HART S. M., GANESHAGURU K., HOFFBRAND A. V., PRENTICE H. G., MEHTA A. B., 1994. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute leukemia. *Leukemia* 8, 2163–2168.
- HIGGINS C. F., 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8, 67–113.
- HILL B. T., 1996. Drug resistance: An overview of the current state of art. *Int. J. Oncol.* 9, 197–203.
- HIPFNER D. R., GAULDIE S. D., DEELEY R. G., COLE S. P. C., 1994. Detection of the Mr 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 54, 578–5792.
- HOLLÓ Z., HOMOLYA L., HEGEDŰS T., SARKADI B., 1996. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett.* 383, 99–104.
- ISHIKAWA T., 1992. The ATP-dependent glutathione export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463–468.
- JEDLITSCHKY G., LEIER I., BUCHHOLZ U., BARNOUIN K., KURZ G., KEPPLER D., 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56, 988–994.
- JEDLITSCHKY G., LEIER I., BUCHHOLZ U., CENTER M., KEPPLER D., 1994. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res.* 54, 4833–4836.
- JULIANO R. L., LING V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- KARTENBECK J., LEUSCHNER U., MAYER R., KEPPLER D., 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23, 1061–1066.
- KESSEL D., BOTTERIL V., WODINSKY I., 1968. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.* 28, 938–941.
- LEIER I., JEDLITSCHKY G., BUCHHOLZ U., COLE S. P. C., DEELEY R. G., KEPPLER D., 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 269, 27807–27810.
- LEIER I., JEDLITSCHKY G., BUCHHOLZ U., CENTER M., COLE S. P. C., DEELEY R. G., KEPPLER D., 1996. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* 314, 433–437.
- LOE D. W., ALMQUIST K. C., COLE S. P. C., DEELEY R. G., 1996a. ATP-dependent 17-estradiol 17-(D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. *J. Biol. Chem.* 271, 9683–9689.
- LOE D. W., ALMQUIST K. C., DEELEY R. G., COLE S. P. C., 1996b. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* 271, 9675–9682.
- LORICO A., RAPP A. G., SRIAMTAKANDANA S., CATAPANO C. V., FERNANDES D. J., GERMINO J. F., SARTORELLI A. C., 1995. Increased rate of adenosine triphosphate-dependent etoposide (VP-16) efflux in a murine leukemia cell line overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene. *Cancer Res.* 55, 4352–4360.
- MÜLLER M., MEIJER C., ZAMAN G. J. R., BORST P., SCHEPER R. J., MULDER N. H., DE VRIES E. G. E., JANSEN P. L. M., 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 13033–13037.
- NOOTER K., BURGER H., STOTER G., 1996. Multidrug resistance-associated protein (MRP) in haematological malignancies. *Leukemia Lymphoma* 20, 381–387.
- NORRIS M. D., BORDOW S. B., MARSHALL G. M., HABER P. S., COHN S. L., HABER M., 1996. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *New Engl. J. Med.* 334, 231–238.
- PAPADOPOULOU B., ROY G., DEY S., ROSEN B. P., OUELLETTE M., 1994. Contribution of the Leishmania P-glycoprotein-related gene *ltpgpA* to oxyanion resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 11980–11986.
- PAULUSMA C. C., BOSMA P. J., ZAMAN G. J. R., BAKKER C. T. M., OTTER M., SCHEFFER G. L., SCHEPER R. J., BORST P., OUDE ELFERINK R. P. J., 1996. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271, 1126–1128.
- PULASKI Ł., JEDLITSCHKY G., LEIER I., BUCHHOLZ U., KEPPLER D., 1996. Identification of the multidrug resistance protein (MRP) as the glutathione S-conjugate export pump of erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 241, 644–648.
- SCHADENDORF D., MAKI A., STAHR C., VAN DYCK A., WANNER R., SCHEFFER G. L., FLENS M. J., SCHEPER R., HENZ B. M., 1995. Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. *Am. J. Pathol.* 147, 1545–1552.
- SHEN H., PAUL P., BREUNINGER L. M., CIACCIO P. J., LAING N. M., HELT M., TEW K. D., KRUH G. D., 1996. Cellular and in vitro transport of glutathione conjugates by MRP. *Biochemistry* 35, 5719–5725.
- STRIDE B. D., PALDIMARSSON G., GERLACH J. H., WILSON G. M., COLE S. P., DEELEY R. G., 1996. Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug

- resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol. Pharmacol.* 49, 962–971.
- SUGAWARA I., MASUNAGA A., ITOYAMA S., SUMIZAWA T., AKIYAMA S., YAMASHITA T., 1995. *Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in thyroid cancers.* *Cancer Lett.* 95, 135–138.
- SZCZYPKA M. S., WEMMIE J. A., MOYE-ROWLEY W. S., THIELE D. J., 1994. *A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein.* *J. Biol. Chem.* 269, 22853–22857.
- THOMAS G. A., BARRAND M. A., STEWART S., RABBITTS P. H., WILLIAMS E. D., TWENTYMAN P. R., 1994. *Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human tumours and normal tissue as determined by in situ hybridisation.* *Eur. J. Cancer* 30A, 1705–1709.
- TOMMASINI R., EVERS R., VOGT E., MORNET C., ZAMAN G. J. R., SCHINKEL A. H., BORST P., MARTINOIA E., 1996. *The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 6743–6748.
- VERSANTVOORT C. H. M., BROXTERMAN H. J., BAGRIJ T., SCHEPER R. J., TWENTYMAN P. R., 1995. *Regulation by glutathione of drug transport in multidrug resistant human lung tumour cell lines overexpressing MRP.* *Br. J. Cancer* 72, 82–89.
- VERSANTVOORT C. H. M., BROXTERMAN H. J., LANKELMA J., FELLER N., PINEDO H. M., 1994. *Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small lung cancer cells.* *Biochem. Pharmacol.* 48, 1129–1136.
- VERSANTVOORT C. H. M., SCHUURHUIS G. J., PINEDO H. M., EEKMAN C. A., KUIPER C. M., LANKELMA J., BROXTERMAN H. J., 1993. *Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells.* *Br. J. Cancer* 68, 939–946.
- ZAMAN G. J. R., FLENS M. J., VAN LEUSDEN M. R., DE HAAS M., MULDER H. S., LANKELMA J., PINEDO H. M., SCHEPER R. J., BAAS F., BROXTERMAN H. J., BORST P., 1994. *The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 8822–8826.
- ZAMAN G. J. R., LANKELMA J., VAN TELLINGEN O., BEIJNEN J., DEKKER H., PAULUSMA C., OUDE ELFERINK R. P. J., BAAS P., BORST P., 1995. *Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug resistance-associated protein.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 7690–7694.
- ZAMAN G. J. R., VERSANTVOORT J. J., SMIT J. J. M., EIJDENS E. W. H. M., DE HAAS M., SMITH A. J., BROXTERMAN H. J., MÜLDER 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.