

Received: 2013.07.30
Accepted: 2014.03.10
Published: 2014.05.20

Białka w oporności wielolekowej nowotworów

Proteins in cancer multidrug resistance

Marta Popęda¹, Elżbieta Płuciennik², Andrzej K. Bednarek²

¹Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Wielolekooporność definiowana jest jako brak wrażliwości na podawane leki, które nie wykazują strukturalnego podobieństwa, a ponadto mają zróżnicowane molekularne punkty uchwytu. Nowotwory dysponują licznymi mechanizmami oporności na leki, które obejmują różnorodne aspekty biologii komórki. Jednak niezmiennie główną rolę w rozwoju zjawiska odgrywają białka, pełniące w komórkach funkcje enzymatyczne lub strukturalne.

Transportery błonowe, omówione na przykładzie głównych przedstawicieli rodziny ABC – P-gp, MRP1 oraz BCRP, a także budujące strukturę krypt komórkowych LRP, warunkują wielolekooporny fenotyp przez obniżanie wewnątrzkomórkowego stężenia cząsteczek terapeutyków lub też zmianę ich rozmieszczenia między poszczególnymi przedziałami wewnątrzkomórkowymi. Za nadmierną intensywność procesów detoksykacji podawanych cytostatyków odpowiedzialna jest izoforma π białkowego enzymu S-transferazy glutationu (GSTP1). Najpowszechniejszym przykładem zmodyfikowanego punktu uchwytu cytostatyków, który nie odpowiada na prowadzoną chemioterapię, jest topoizomeraza II α (TopoII α). Z zaburzeniami apoptozy jest związana natomiast ekspresja białek, takich jak hamująca proces metalotioneina (MT), a także cytokeratyna 18 (CK18), której nadmierne stężenie uniemożliwia ukierunkowanie komórki na proces apoptozy.

Opracowano różnorodne metody obniżania aktywności wspomnianych białek, mające na celu zniesienie zjawiska MDR w komórkach nowotworowych. Jednak z wielu powodów ich przydatność kliniczna jest wciąż zbyt mała, co wiąże się ze stale rosnącą śmiertelnością wśród chorych zmagających się z chorobami nowotworowymi.

W pracy przedstawiono najistotniejsze białka odpowiedzialne za występowanie zjawiska MDR w komórkach nowotworowych oraz molekularnych mechanizmów ich działania.

Słowa kluczowe:

oporność wielolekowa • komórka nowotworowa • chemioterapia • transporter błonowy • detoksykacja • apoptoza

Summary

Multidrug Resistance (MDR) is defined as insensitivity to administered medicines that are structurally unrelated and have different molecular targets. Cancers possess numerous mechanisms of drug resistance, involving various aspects of cell biology. A pivotal role in this phenomenon is played by proteins – enzymatic or structural parts of the cell.

Membrane transporters, including the main members of ABC protein family – P-gp, MRP1 and BCRP, as well as LRP, which builds structure of vaults, determine the multidrug-resistant phenotype by decreasing drug concentration within the cell or modifying its distribution to intracellular compartments. The π isoform of protein enzyme – glutathione S-transferase (GSTP-1), is responsible for excessive intensity of detoxification of cytostatics. A common

example of altered drug target site that does not respond to chemotherapy is topoisomerase II α (TopoIIa). Alterations of programmed cell death result from expression of metallothionein (MT) – inhibitor of the process, and cytokeratin 18 (CK18), which, if in high concentration, also prevents apoptosis of cells.

Several methods of decreasing activity of these proteins have been developed, aiming to overcome MDR in cancer cells. However, for a variety of reasons, their clinical suitability is still very low, leading to continuous increase in death rate among patients.

This paper presents current state of knowledge on the most important examples of proteins responsible for MDR of cancer cells and molecular mechanisms of their action.

Keywords: multidrug resistance • cancer cell • chemotherapy • membrane transporter • detoxification • apoptosis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1103268>

Word count: 5435
Tables: 2
Figures: 10
References: 107

Adres autorki: dr Elżbieta Płuciennik, Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny, 90-752 Łódź; e-mail: elzbieta.pluciennik@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **5Y-CAP** – domena katalityczna; **ABC** – rodzina białek wiążących ATP (ATP-binding cassette); **ABCC** – podrodzina C białek wiążących ATP; **AP-1** – białko aktywujące 1 czynnik transkrypcyjny (activator protein 1); **BCRP** – białko oporności raka piersi (breast cancer resistant protein); **BSO** – sulfoksymina butioniny (buthionine sulfoximine); **c-Fos** – składowa czynnika transkrypcyjnego AP-1; **c-Jun** – składowa czynnika transkrypcyjnego AP-1; **CD** – antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation); **CK** – cytokeratyna (cytokeratin); **CYP3A4** – cytochrom P450 3A4 (cytochrome P450 3A4); **DBS** – miejsce wiążące lek (drug binding site); **Fas** – receptor śmierci; **FTC** – fumitremorgina C (fumitremorgin C); **GFAP** – kwaśne białko fibrylarne gleju (glial fibrillary acidic protein); **GHKL** – domena wiążąca (gyrase, Hsp90, histidine kinase, MutL); **GSH** – glutation (glutathione); **GST** – S-transferaza glutationu (glutathione S-transferase); **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HSP** – białko szoku cieplnego (heat-shock protein); **Hsp90** – białko szoku cieplnego 90 (heat shock protein 90); **IF** – filamenty pośrednie (intermediate filaments); **IFN- γ** – interferon γ (interferon γ); **IL-1, -6** – interleukina 1, 6 (interleukin-1, -6); **LRP** – białko oporności raka płuc (lung resistance protein); **LTC4** – leukotrien C4 (leukotriene C4); **MCF-7** – linia komórkowa raka piersi; **MDR** – wielolekooporność (multidrug resistance); **MDR1** – gen kodujący glikoproteinę P; **MRP** – białko oporności wielolekowej (multidrug resistance protein 1); **MSD** – domena obejmująca błonę (membrane spanning domain); **MT** – metalotioneina (metallothionein); **MutL** – białko naprawy DNA; **MVP** – główne białko krypt (major vault protein); **MXR** – białko oporności na mitoksantron (mitoxantrone resistance protein); **NBD** – domena wiążąca nukleotydy (nucleotide binding domain); **NK** – komórka NK (natural killer); **NTE** – przedłużenie N – końca (N-terminal extension); **ODN** – oligonukleotyd (oligodeoxyribonucleotide); **P-gp** – glikoproteina P (P-glycoprotein); **PAK-104P** – pochodna pirydynowa; **PGE2** – prostaglandyna E (prostaglandin E); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **PTEN** – gen supresorowy kodujący białko PTEN (phosphatase and tensin homolog); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **siRNA** – mały interferujący RNA (small interfering RNA); **T** – apotioneina (thionein); **TEP1** – białko związane z telomerazą 1 (telomerase-associated protein 1); **TM** – domena transbłonowa (transmembrane domain); **TNF- α** – czynnik martwicy guza α (tumor necrosis factor α); **Topo** – topoizomeraza (topoisomerase I); **TP53** – gen supresorowy kodujący białko p53; **VPARP** – kryptowa polimeraza poli (ADP-rybozy) (vault poly (ADP-ribose) polymerase); **vRNA** – kryptowe RNA (vault RNA).

WSTĘP

Zjawisko wielolekooporności (MDR – multidrug resistance), stanowi jedną z przyczyn nieskutecznej farmakoterapii. Polega ono na jednoczesnym występowaniu braku wrażliwości na wiele terapeutyków o odrębnej strukturze chemicznej oraz mechanizmie działania [86]. Przez lata MDR była cechą właściwą patogennych bakterii oraz grzybów. Jednak, w związku z wydłużeniem średniej długości życia oraz obecnością licznych czynników kancerogennych w środowisku, od drugiej połowy XX w. obserwuje się znaczący przyrost liczby zachorowań na nowotwory. U ich podstaw leżą mutacje genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego, powodujące nadmierną oraz niekontrolowaną proliferację komórek. Intensywny postęp w dziedzinie onkologii, stanowiący odpowiedź na wzrost zachorowalności na choroby nowotworowe, przyczynia się do rozwoju i ewolucyjnego utrwalania zjawiska MDR w komórkach poddawanych różnym rodzajom systemowej terapii przeciwnowotworowej. W wyniku tego procesu dochodzi do znacznego obniżenia skuteczności chemioterapii i zwiększenia liczebności zgonów wśród osób dotkniętych chorobą nowotworową [8].

Wielolekooporne komórki wykorzystują różnorodne mechanizmy obronne [56]. W większość prezentowanych przez nowotwory strategii MDR są zaangażowane cząsteczki białek, występujące w komórce zarówno w postaci elementów strukturalnych, jak i enzymów.

OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA I JEJ MECHANIZMY

Wielolekooporność komórek nowotworowych może być zarówno cechą pierwotną, wynikającą z uwarunkowań genetycznych, jak i nabytą – bezpośrednio związaną z prowadzonym leczeniem. Początkowo wrażliwy na podawany terapeutyk nowotwór może nabrać lekoopornego fenotypu pod wpływem nieprawidłowego dawkowania, a także zmian biodostępności lub metabolizmu leku [45]. Jednak nie u wszystkich nowotworów przejawia się takie samo prawdopodobieństwo wykształcenia MDR. Jej wtórna postać szczególnie często rozwija się w nowotworach nerek, jajnika, pęcherza moczowego, a także w białaczce limfoblastycznej czy drobnokomórkowym raku płuc [48,99]. Pierwotna MDR jest charakterystyczna dla nowotworów narządów wydzielniczych – wątroby, jelita grubego czy nadnerczy [29].

Mechanizmy MDR podzielić można na pozakomórkowe (zewnętrzne) oraz komórkowe (wewnętrzne). Zewnętrzne wynikają ze szczególnych uwarunkowań na poziomie strukturalnym, takich jak obniżona przepuszczalność naczyń krwionośnych czy występowanie barier tkankowych, które uniemożliwiają wniknięcie cząsteczek leku do wnętrza komórek docelowych. Mechanizmy wewnętrzne wynikają natomiast bezpośrednio z właściwości komórek – zmian wartości pH ich środowiska wewnętrznego, nasiloniej aktywności „miataczy wolnych rodników”, zaburzeń procesu aktywacji leku lub jego nadmiernej inaktywacji [2].

Wewnętrzne strategie MDR wykorzystują liczne aspekty funkcjonowania komórki. W chorobach nowotworowych najczęściej jest spotykana MDR zależna od mechanizmów transportu, w przypadku której cytostatyki nie osiągają stężenia terapeutycznego w komórkach. Postać ta obejmuje zmniejszony wychwyty leków ze środowiska zewnętrznego, który wynika ze zmian struktury błony cytoplazmatycznej, a co za tym idzie jej przepuszczalności dla ksenobiotyków. Zalicza się do niej także zjawisko tzw. efluksu komórkowego, polegające na aktywnym usuwaniu cząsteczek terapeutyków z wnętrza komórek za pośrednictwem białkowych transporterów błonowych. Utrudnienia mogą również występować podczas wewnątrzkomórkowego transportu cytostatyków, między jądrem komórkowym a cytoplazmą.

Ponadto MDR może być związana z nadmierną aktywnością systemu detoksykacji ksenobiotyków w komórkach nowotworowych, która prowadzi do całkowitej inaktywacji podawanej dawki leku. Zjawisko to może wynikać z modyfikacji powstałych w obrębie punktu uchwytu podawanego terapeutyku – zmiany aktywności enzymów docelowych i ich powinowactwa do cząsteczek leku [8,56].

Terapia antynowotworowa ma na celu zahamowanie podziałów komórek guza oraz skierowanie ich na szlak programowanej śmierci, m.in. na skutek uszkodzeń powstałych w materiale genetycznym. W odpowiedzi na zastosowaną chemioterapię, w komórkach nowotworowych wykazujących MDR dochodzi do aktywacji mechanizmów naprawy DNA. Zaburzeniom ulega również aktywność białek uczestniczących w apoptozie, związane z mutacjami w obrębie genów supresorowych, takich jak *TP53* i *PTEN*, co powoduje zachwiania równowagi białek pro – i antyapoptotycznych [8,56,73,74].

Zewnętrzne mechanizmy MDR nowotworów są wynikiem występujących w ustroju naturalnych barier, ograniczających przepływ krwi do tkanek docelowych, a także jej niedostatecznego przepływu przez struktury niektórych guzów, który wynika z ich słabego unaczynienia. To ostatnie zjawisko występuje w nowotworach litych o niskim stopniu waskularyzacji, gdzie dostępność leków ograniczona jest z powodu zahamowania transportu cząsteczek do wnętrza komórek na skutek obniżenia pH, które wynika ze stanu niedotlenienia oraz akumulacji kwasu mlekowego [20].

BIAŁKA WIELOLEKOOPORNOŚCI W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Rodzina białek ABC

Większość z poznanych dotychczas białek odpowiedzialnych za występowanie zjawiska MDR należy do rodziny ABC (ATP-binding cassette family). Zaliczane do niej cząsteczki mają charakter transporterów przezbłonowych, zawierają ponadto swoistą domenę wiążącą ATP, która umożliwia przeprowadzanie ich hydrolizy [25]. Energia uwalniana w procesie rozkładu ATP wykorzystywana jest

następnie do transportu substratów przez zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowe błony lipidowe [86].

Obecnie w proteomie człowieka znajduje się 49 zidentyfikowanych transporterów z rodziny ABC. Ich cząsteczki zawierają dwa podstawowe elementy strukturalne: region przezbłonowy MSD (membrane spanning domain) oraz domenę NBD (nucleotide binding domain) wiążącą ATP [38,90]. MSD tworzy łańcuch polipeptydowy przechodzący przez błonę komórki, z wykształceniem przeważnie sześciu helikalnych fragmentów przezbłonowych – TMS (transmembrane domains), dzięki czemu odgrywa rolę w przenikaniu substratu przez błonę komórkową. Hydrofilowy region NBD jest odpowiedzialny natomiast za wiązanie i hydrolizę ATP [38]. W obrębie tej domeny wyróżnić można: motyw Walkera A i B, pętle H i Q oraz motyw C, zwany regionem podpisu. Sekwencja tego ostatniego jest podstawą klasyfikacji białek ABC do siedmiu podrodzin, oznaczonych literami od A do G (tabela 1) [98].

Ze względu na liczbę kompleksów domen MSD-NBD w obrębie rodziny ABC wyróżnia się transportery pełne (ryc. 1), półtransportery (ryc. 2) oraz transportery rozbudowane. Fizjologiczną funkcją białek rodziny ABC jest obrona komórki przed toksycznym działaniem substancji środowiskowych [50]. Wyróżnia się trzy kategorie funkcyjne transporterów. Pierwszą z nich tworzą białka mające zdolność transportu do wnętrza komórki, tzw. importery, które występują wyłącznie w organizmach prokariotycznych [55]. Odpowiedzialne są za pobieranie z otoczenia niezbędnych składników odżywczych (peptydów, witamin czy cukrów), a także jonów i innych związków, które nie mogą zostać pozyskane w procesie dyfuzji [98].

Tymczasem u organizmów pro- i eukariotycznych, występują białkowe pompy o charakterze eksporterów. Odpowiadają one za usuwanie substancji szkodliwych – ksenobiotyków i toksyn naturalnych z cytoplazmy poza komórkę lub do określonych przedziałów wewnątrzkomórkowych [24,34]. To właśnie ich zwiększona ekspresja jest odpowiedzialna za występowanie zjawiska niewrażliwości na farmakoterapię u patogennych bakterii

i w komórkach nowotworowych. Białka te znaleźć można w komórkach narządów mających bezpośrednią styczność z cząsteczkami ksenobiotyku: w odpowiedzialnym za wchłanianie jelicie cienkim, w wątrobie i nerkach – przewodzących procesy eliminacji oraz w warunkujących dystrybucję komórkach śródbłonka, które tworzą barierę krew-mózg oraz barierę łożyskową [87].

Ponadto u człowieka transportery ABC warunkują obecność licznych barier tkankowych, m.in. w obrębie mózgu, nerek, wątroby czy narządów przewodu pokarmowego, które zabezpieczają te organy przed działaniem czynników szkodliwych [24]. Dysfunkcje białek rodziny ABC spotyka się w licznych dziedzicznych schorzeniach, takich jak zaburzenia transportu cholesterolu – choroba tangierska oraz żółci – rodzinna cholestaza, a także mukowiscydoza, anemia czy zespół Grönblada-Strandberga – choroba tkanki sprężystej [90,91]. Do ostatniej grupy funkcjonalnej transporterów zalicza się białka zaangażowane w procesy translacji i naprawy DNA [55].

W obrębie rodziny białek ABC najistotniejszą rolę w rozwoju zjawiska MDR w komórkach nowotworowych odgrywają glikoproteina P, MRP1 oraz BCRP [76].

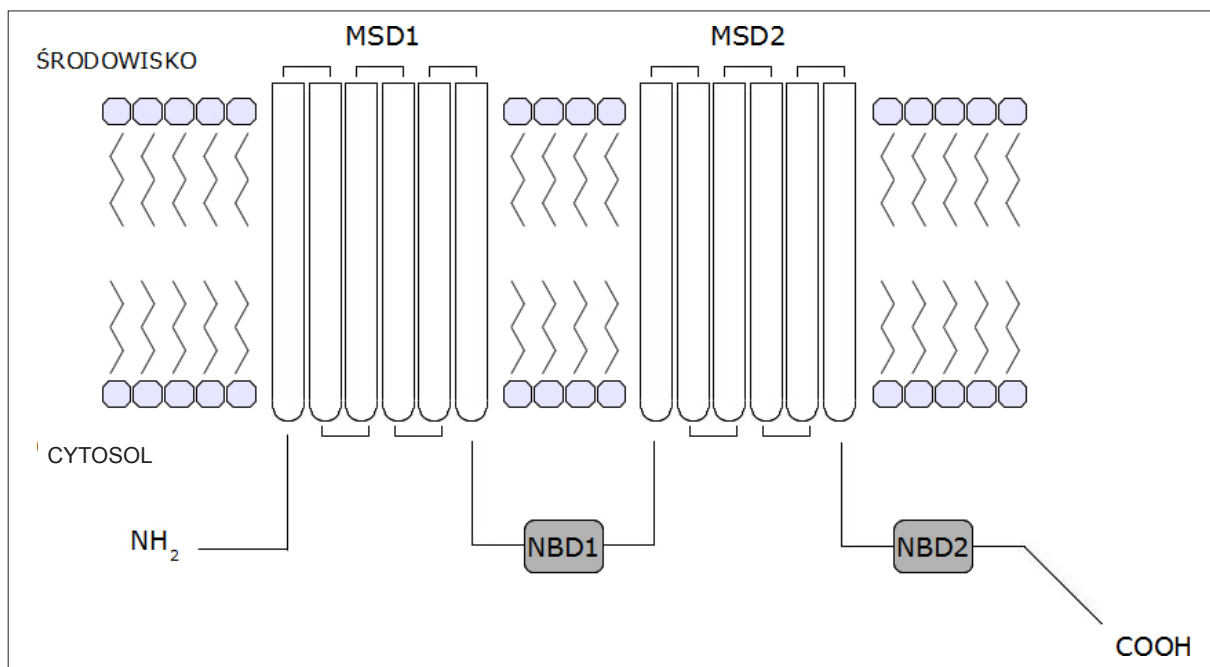
Glikoproteina P

Glikoproteina P (P-gp) była pierwszym zidentyfikowanym w proteomie człowieka transporterem należącym do rodziny ABC, opisanym w 1976 r. na podstawie badań nad nowotworem jajnika u chomików chińskich [39]. P-gp należy do podrodziny B białkowych transporterów błonowych wiążących ATP. Kodowana jest przez gen *MDR1*, umiejscowiony na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21), jej cząsteczka ma masę 170 kDa i złożona jest z 1280 aminokwasów [49].

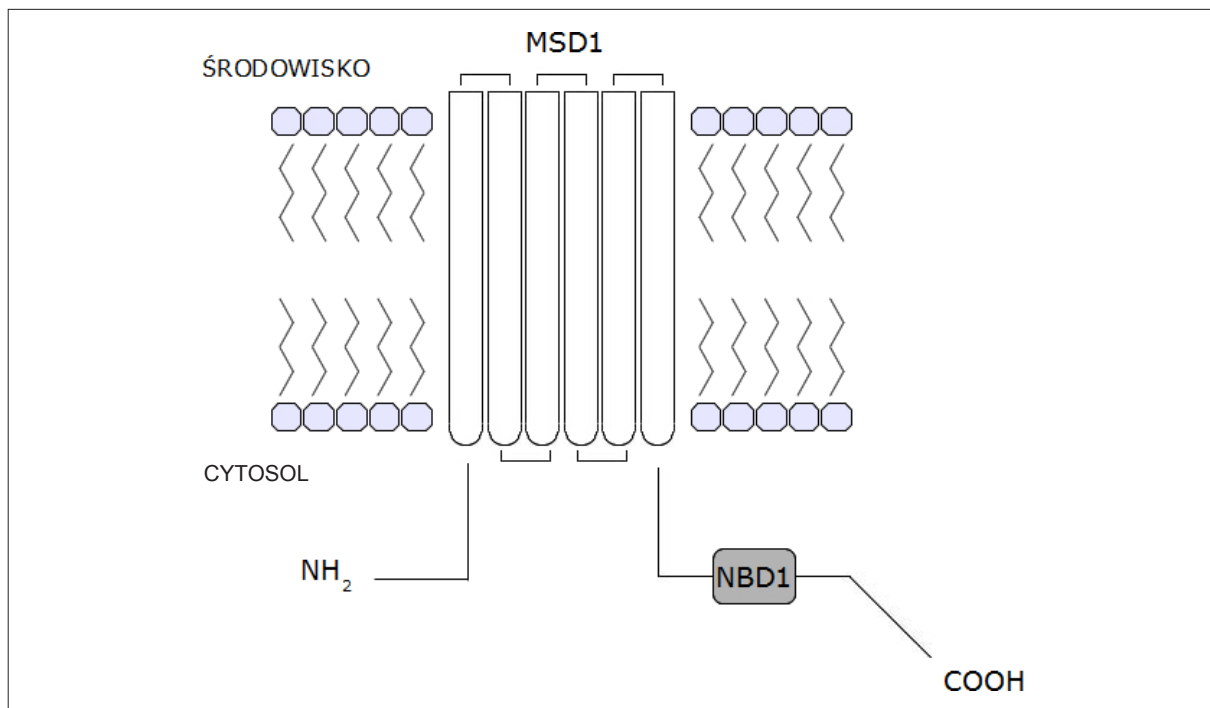
W strukturze P-gp wyróżnić można elementy swoiste dla wszystkich transporterów rodziny ABC. Cząsteczka składa się z dwóch podjednostek, z których każda zawiera hydrofobową domenę MSD złożoną z sześciu

Tabela 1. Charakterystyka podrodzin białek ABC (na podstawie [90,98])

Podrodzina	Nazwa	Liczba białek	Białka wielolekooporności
ABCA	ABC1	12	ABCA2 (ABC2) ABCA3 (ABC-C)
ABCB	MDR	11	ABCB1 (P-gp) ABCB4 (MDR2) ABCB11 (BSEP, SPGP)
ABCC	MRP	13	ABCC1 (MRP1) ABCC2-6 (MRP2-6) ABCC10-13 (MRP7-10)
ABCD	ALD	4	–
ABCE	OABP	1	–
ABCF	GCN20	3	–
ABCG	White	5	ABCG2 (BCRP)



Ryc. 1. Struktura pełnego transportera z rodziny ABC (wg [90,98]); cząsteczka składa się z czterech domen, tworzących strukturę (MSD-NBD)₂, umiejscowiona jest w zewnętrznej błonie komórkowej

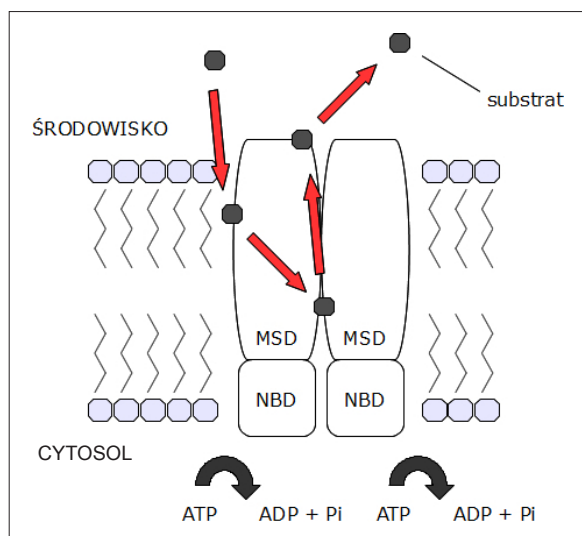


Ryc. 2. Struktura półtransportera z rodziny (wg [90,98]); cząsteczka zawiera tylko jeden kompleks MSD-NBD, występuje głównie w błonach wewnątrzkomórkowych

fragmentów przezbłonowych oraz region NBD – ulokowany w pętłach po cytoplazmatycznej stronie błony. Tak zbudowane homologiczne kompleksy są połączone ze sobą pojedynczym łańcuchem polipeptydowym [8]. Regiony transmembranowe MSD, zawierające co najmniej dwa miejsca wiążące cząsteczki substratu – DBS (drug binding sites), są rozdzielane przez pierwszą z domen NBD, podczas gdy druga jest umiejscowiona na cytoplazmatycznym C – końcu cząsteczki.

Mechanizm działania P-gp jako białka odpowiedzialnego za wyrzut substancji z komórki nie został wyjaśniony. Obecnie obowiązuje tzw. model „odkurzacza molekularnego” czy też „zmiatacza hydrofobowego (ryc. 3) [45].

Spektrum substratowe P-gp obejmuje głównie substancje hydrofobowe, zdolne do napływu do wnętrza komórki w wyniku dyfuzji biernej – elektrycznie obojętne lub kationowe formy cząsteczek związków organicznych



Ryc. 3. Mechanizm działania „molekularnego odkurzacza” – wyrzut substratu z błony komórkowej (wg [8,25,30,45,101]); cząsteczki substratu są rozpoznawane i przechwytywane przez transporter w czasie zgodnego z gradientem stężeń, biernego przepływu do cytoplazmy przez błonę lipidową, a następnie zostają wyrzucone poza komórkę. Energia niezbędna do prawidłowej aktywności P-gp jest pozyskiwana w wyniku jednoczesnej hydrolizy dwóch cząsteczek ATP, która zachodzi w obrębie połączonych domen NBD. Domeny MSD natomiast tworzą kanał umożliwiający przepływ cząsteczek substratu P-gp przez błonę lipidową oraz ich wyrzut na zewnątrz komórki. W silnie hydrofobowych substancjach obserwuje się tzw. „futile cycling” polegający na powrotnym napływie usuniętych cząsteczek substratu w wyniku dyfuzji, a następnie ich ponownym wyrzuceniu ze struktur błony, co pochłania znaczne ilości energii

o charakterze amfifilnym [1,8,85]. Pierwszymi lekami, których obniżoną skuteczność powiązano z aktywnością tej glikoproteiny, były alkaloidy Vinca oraz antracykliny. Oprócz leków przeciwnowotworowych substraty P-gp są m.in. lekami immunosupresyjnymi, przeciwhistaminowymi, nasercowymi oraz stosowanymi w chorobach inwazyjnych i zakażeniach (tabela 2) [53].

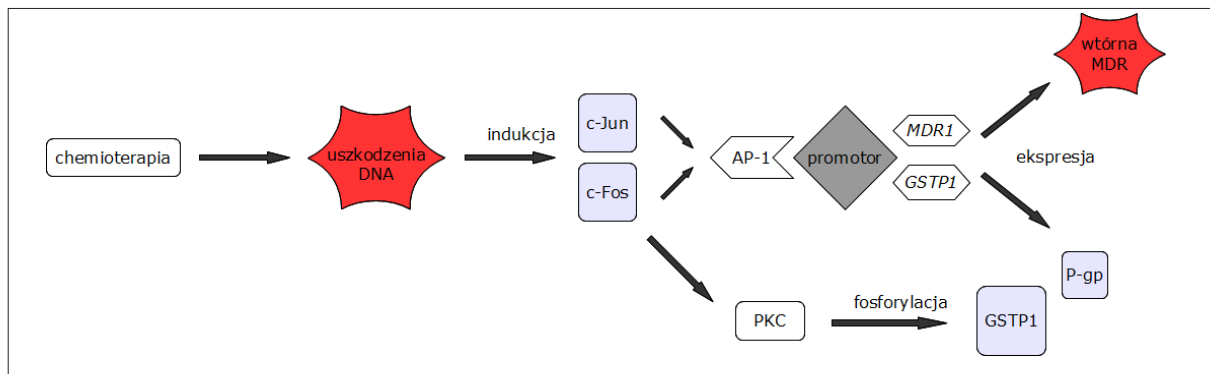
Fizjologiczną funkcją P-gp jest ochrona komórek przed działaniem szkodliwych substancji – metabolitów czy toksyn, zarówno egzogennej jak i endogennej pochodzenia [85], co jest związane z umiejscowieniem cząsteczek tego transportera w błonach plazmatycznych, rzadziej w błonach organelli wewnątrzkomórkowych [53,90]. Obecność błonowej glikoproteiny przyczynia się do powstania bariery przepuszczalności dla określonych substratów, przez co warunkuje poprawne funkcjonowanie m.in. bariery jelitowej, nerkowej, wątrobowej czy bariery krew-mózg [8].

Duże stężenie P-gp stwierdzono też na powierzchni komórek wydzielniczych, odpowiedzialnych za sekrecję i transport czynników endogennych w narządach wydzielania wewnętrznego – kory nadnerczy czy też wątroby [51]. P-gp jest zaangażowane także w regulację odpowiedzi immunologicznej – bierze udział w transporcie cytokin w limfocytach T, warunkuje aktywność cytotoksyczną limfocytów CD8⁺ i komórek NK [80]. Ponadto, obecna na powierzchni macierzystych komórek krwiotwórczych, glikoproteina wpływa na ich proliferację i różnicowanie za pomocą swoistych czynników regulatorowych [77].

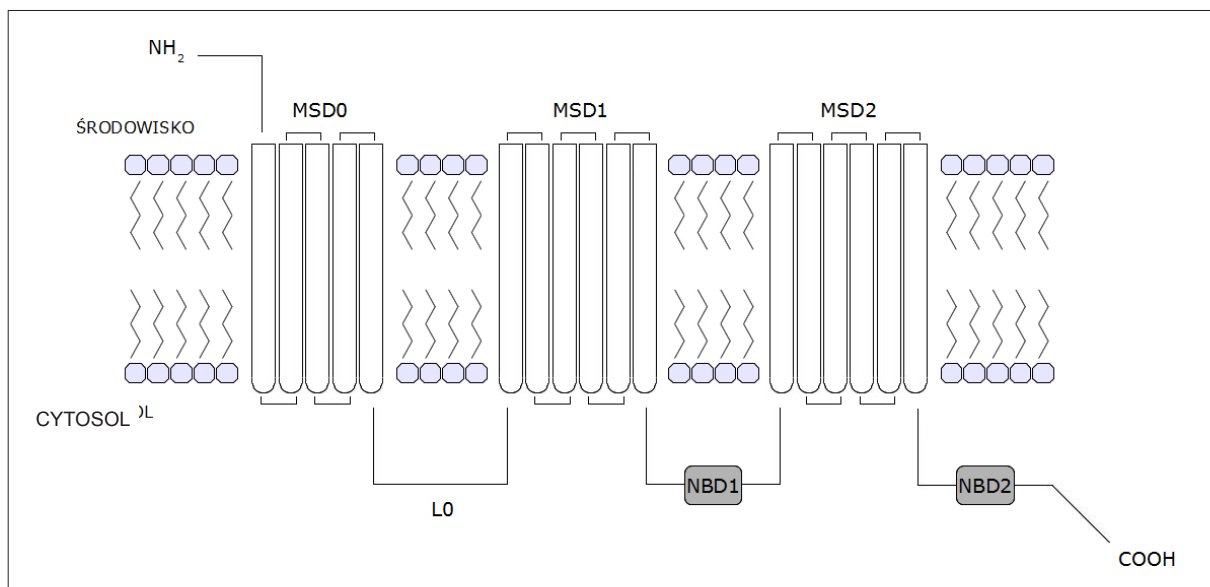
Dokładnie poznano mechanizm wytwarzania wtórnej MDR z udziałem kinazy białkowej PKC, a także białka c-Fos, którego podwyższone stężenie w komórce koreluje dodatnio z nasiloną ekspresją genu kodującego P-gp [100] (ryc. 4).

Tabela 2. Wybrane substraty P-gp o zastosowaniu terapeutycznym (na podstawie [56])

Grupa leków	Nazwa leku
Przeciwnowotworowe	daunorubicyna, doksorubicyna, winblastyna, winkrystyna, aktynomycyna D, paklitaksel, etopozyd, tenipozyd
Immunosupresyjne	cyklosporyna, FK506
Hipolipemizujące	lowastatyna
Przeciwhistaminowe	terfenadyna
Steroidy	aldosteron, hydrokortykosteron, kortyzol, kortykosteron, deksametazon
Antagoniści dopaminy	domperidon
Inhibitory proteazy HIV-1	rytonawir, indynawir, amprenawir, nelfinawir
Nasercowe	digoksyna, chinidyna
Przeciwwymiotne	ondanseron
Przeciwbiegunkowe	loperamid
Przeciwdnawe	kolchicyna
Antybiotyki	erytromycyna, rifampicyna
Przeciw pasożytnicze	iwermektyna



Ryc. 4. Schemat rozwoju wielolekooporności wtórnej na przykładzie P-gp i GSTP1 (wg [11, 100]); c-Fos, kodowane przez protoonkogen *FOS*, wraz z białkiem c-Jun, tworzy czynnik transkrypcyjny AP-1. Ten ostatni bezpośrednio aktywuje transkrypcję genów *MDR1* i *GSTP1*



Ryc. 5. Struktura „długiego” białka z podrodziny AB (wg [9]); region NTE to umiejscowiona na N – końcu cząsteczki, hydrofobowa domena przez błonową, zbudowana z około 200 aminokwasów, które układają się w 5 helis przez błonowych. Te tworzą domenę MSD0 oraz krótką pętlę LO, która znajduje się w obrębie cytosolu. Domena MSD0 odpowiada za przeniesienie cząsteczki transportera z retikulum endoplazmatycznego do prawidłowego miejsca w błonie komórkowej. Cytoplazmatyczna pętlę LO umożliwia transport cząsteczek substratu, stąd też jej utrata powoduje retencję cząsteczek białka w retikulum plazmatycznym

MDR wynikającą z wysokiej ekspresji P-gp w komórkach nowotworowych dodatkowo nasila antyapoptotyczne działanie tego białka, związane z obniżonym wytwarzaniem ceramidów na skutek zmniejszenia ilości sfingomieliny w komórce. Przy niedoborze tych lipidów nie dochodzi do aktywacji procesu apoptozy pod wpływem chemioterapeutyków będących ligandami jednego z receptorów śmierci – receptora Fas, które jednak nie należą do substratów P-gp [107].

Wysoka ekspresja P-gp, warunkująca występowanie MDR, jest obserwowana w komórkach nowotworowych, które wywodzą się z narządów o fizjologicznie wysokiej ekspresji tego transportera białkowego, np. z trzustki, nerki, wątroby. Nowotwory tych narządów wykazują uwarunkowaną genetycznie oporność pierwotną, która przejawia się już przy pierwszej ekspozycji na dany lek. Pod wpływem prowadzonej chemioterapii wtórna postać MDR z udziałem P-gp rozwijają białaczki i chłoniaki,

a także nowotwory jajników, piersi czy pęcherzyka żółciowego [48,99].

MRP1

W 1992 r., w linii komórkowej ludzkiego drobnokomórkowego raka płuc H69/AR, w obecności dokсорubicyny wyizolowano i zidentyfikowano białkowy transporter wielolekowy, wykazujący duże podobieństwo funkcji do P-gp i w związku z tym nazwano białkiem oporności wielolekowej 1 – MRP1 (multidrug resistance protein 1) [9,15].

MRP1 jest przedstawicielem podrodziny ABCC, drugiej co do wielkości w rodzinie transporterów ABC. Obejmuje 13 białek, z czego 10 to białka MRP, opatrzone numerami zgodnie z kolejnością ich odkrywania. MRP1 kodowane jest przez gen *MRP1*, położony na ramieniu krótkim chromosomu 16 (16p13.1) [13]. Cząsteczka tej fosfogliko-

proteiny ma masę 190 kDa i jest zbudowana z 1531 aminokwasów [15].

Transportery podrodziny ABCC składają się z dwóch homologicznych podjednostek białkowych – MSD-NBD, spełniających takie same funkcje, jak wszystkie inne białka rodziny ABC. MRP1 należy do tzw. „długich” białek ABCC, których symetrię zaburza dodatkowy region NTE (N-terminal extension) (ryc. 5) [9,70].

MRP1 zaklasyfikowano do grupy tzw. pomp GS-X, odpowiedzialnych za transport koniugatów powstałych w czasie II fazy detoksykacji [9,21,24]. Miejsce wiązania reszt glutationu (GSH – glutathione), znajduje się w rdzeniu cząsteczki MRP1, zbudowanej z dwóch podjednostek MSD-NBS [70]. Jednak działanie tego białka na poziomie molekularnym jeszcze nie zostało opisane.

Do leków, których stężenie w komórce ulega obniżeniu na skutek aktywności tego transportera, należą m.in. cytostatyki pochodzenia naturalnego – antracykliny, alkaloidy Vinca, taksony, a także irynotekan, metotreksat oraz związki metali ciężkich – arsenu i antymonu [9,76].

Białko MRP1 bierze udział w tworzeniu bariery krew-mózg, jego obecność w błonach komórek narządów, takich jak syncytiotrofoblast, łożysko, pneumocyty typu II czy jądra, warunkuje także prawidłowy rozwój i funkcjonowanie organizmu człowieka. Białko to jest zaangażowane także w transport toksycznych produktów procesów utleniania lipidów, powstałych w warunkach stresu oksydacyjnego [92].

Najważniejszym naturalnym substratem białka MRP1 jest leukotrien C4 (LTC4). Pozostałe endogenne substancje, usuwane z komórek organizmu w wyniku efluksu, to bilirubina, koniugaty glukuronidowe oraz siarczanowe sole żółci [70].

MDR, związaną z nadmierną ekspresją MRP1 w komórkach, zaobserwowano w znacznej grupie chorób nowotworowych. Istnieje przypuszczenie, iż transporter ten może brać udział w rozwoju hormonoopornej postaci raka stercza. Duże stężenie MRP1 jest natomiast charakterystyczne dla pewnych grup nowotworów, takich jak niedrobnokomórkowy rak płuca [15], ostra białaczka szpikowa, rak pęcherza, nerwiak płodowy (neuroblastoma) [71], rak okrężnicy, czy też mastocytoma [37].

BCRP

W 1998 r., w linii komórkowej raka piersi MCF-7, wykazującej MDR, zidentyfikowano nowy transporter z rodziny ABC – białko BCRP (breast cancer resistant protein) [63]. BCRP jest drugim spośród białek należących do podrodziny G transporterów zawierających kasetę wiążącą ATP [87]. Kodowane jest przez gen *ABCG2*, znajdujący się na ramieniu długim chromosomu 4 (4q22). Cząsteczka tego transportera ma masę około 75 kDa i składa się z 655 aminokwasów [63]. Białko BCRP to klasyczny półtran-

sporter z rodziny ABC [90], ponieważ jest zbudowane z pojedynczego kompleksu domen MSD-NBD (ryc. 2) [63]. Dotychczas nie udało się poznać molekularnego mechanizmu działania tego transportera. Przypuszcza się, iż pełną aktywność osiąga dopiero po homodimeryzacji w obrębie błony komórkowej. W takiej postaci wykazuje nieco niższą od P-gp, ale znacznie wyższą od MRP1 aktywność ATP-azy [63].

Białko to ma zdolność transportu zarówno cząsteczek o charakterze hydrofobowym, jak i hydrofilowych koniugatów nieorganicznych, zawierających reszty siarczanowe. Przez tą zdolność jest podobne funkcyjnie do białka MRP1 [58]. Pierwszym zidentyfikowanym substratem tego transportera był mitoksantron, przez co BCRP oznaczane bywa również skrótem MXR (mitoxantrone resistance protein) [63]. Transporter ten jest zdolny jednak do wyrzutu poza komórkę cząsteczek wielu innych chemioterapeutyków, takich jak doksorubicyna, daunorubicyna [87], metotreksat, topotekan, irynotekan, inhibitory kinazy tyrozynowej – imatynib i gefitynib [63]. Ponadto odpowiada za obniżenie stężenia cząsteczek leków innych niż antynowotworowe, np. prazosyny, gli-benklamidu, dipirydamolu, a także statyn i syntetycznych bakteriostatyków, takich jak nitrofurantoina [63].

W organizmie człowieka BCRP funkcjonuje jako pompa ochronna, usuwająca z komórek toksyczne substancje pochodzenia egzo – i endogennego [87], dlatego też jego duże stężenie obserwuje się w tkankach narządów odpowiedzialnych za procesy detoksykacji [63]. Wysoka ekspresja w komórkach śródbłonna mózgu, nabłonka jelit oraz jąder warunkuje natomiast istnienie tkankowych barier tych narządów [76], jak również chroniącej płód bariery łożyska [58]

Ponadto cząsteczki tego transportera odpowiadają za utrzymanie komórkowej homeostazy substancji endogennych, takich jak hem, porfiryny, ryboflawiny czy estrogeny [63].

BCRP charakteryzuje samodzielne występowanie w komórkach danego nowotworu – brak w nich obecności innych podstawowych białek MDR, takich jak P-gp czy MRP1 [63]. Nadekspresję BCRP zanotowano w komórkach ostrych białaczek limfo – i mieloblastycznych, szpiczaka mnogiego [95], raka stercza oraz piersi, płuc, nerek i endometrium [63,87].

LRP

Ze zjawiskiem MDR są również związane białka zaangażowane w transport cząsteczek leków, jednak nienależące do rodziny transporterów ABC. W 1993 r., w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc, odkryto jedno z nich – LRP (lung resistance-related protein) [10,18,75], zwane białkiem krypt – MVP (major vault protein) [75].

LRP jest kodowane przez gen *MVP*, umiejscowione proksymalnie do genu *MRP1* – na ramieniu krótkim chro-

mosomu 16 (16p11.2) [10]. Jego cząsteczka ma masę 110 kDa [18,43] i stanowi 70% całościowej masy krypt [10] – największych z dotychczas poznanych komórkowych rybonukleoprotein, które odkryto w komórkach pęcherzyków wydzielniczych wątroby szczura [75]. Są to beczkowate, puste w środku struktury cytoplazmatyczne złożone z 8 podjednostek, w których skład wchodzi po sześć cząsteczek LRP oraz jedna cząsteczka małego, nieulegającego translacji RNA – vRNA. Każda krypta zawiera dwie cząsteczki białek – TEP1 (telomerase-associated protein 1) oraz VPARP (vault poly (ADP-ribose) polymerase), o masach odpowiednio 240 i 193 kDa [10,43,75].

Mechanizm działania LRP nie został jak dotąd jednoznacznie określony (ryc. 6). W odróżnieniu od omówionych uprzednio transporterów błonowych, białko to jest umiejscowione głównie w cytoplazmie, choć niewielka liczba krypt znajduje się również w błonach jądra komórkowego oraz porach jądrowych [10,18]. Dzięki temu mogą one uczestniczyć w wewnątrzkomórkowym transporcie cząsteczek [45,75]. Ponadto mogą przekazywać transportowane cząsteczki do struktur komórkowych zaangażowanych w szlak egzocytozy, takich jak pęcherzyki wydzielnicze czy lizosomy [82] bądź też dostarczać je do pomp błonowych odpowiedzialnych za wyrzut substancji do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [62]. Jednak przyjmuje się, że aktywność LRP jest zaangażowana głównie w proces rozmieszczania cząsteczek leku w strukturach komórki [18].

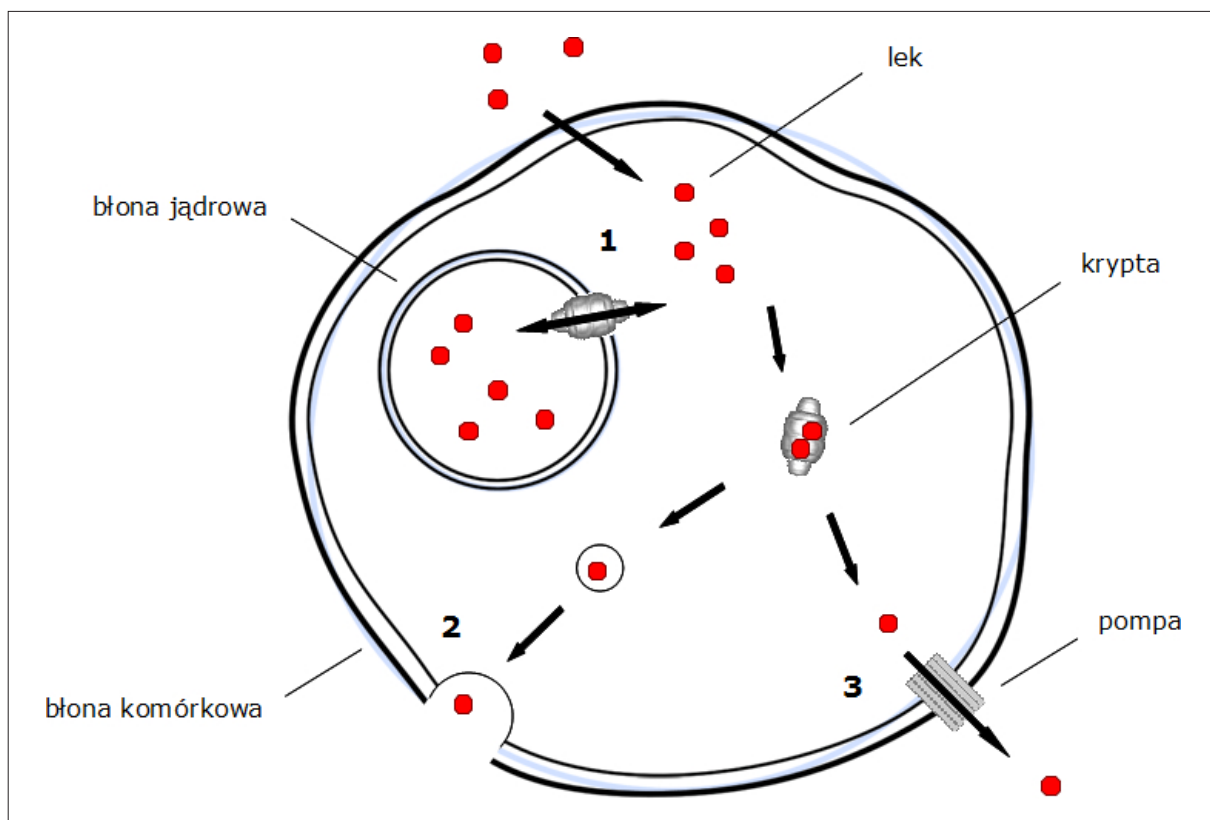
Zakres przyłączanych substratów do LRP wykazuje znaczne podobieństwo do P-gp. W komórkach nowotworowych jest odpowiedzialna za występowanie oporności na chemioterapeutyki zawierające platynę – cisplatynę i karboplatynę [75], a także pozostałe cytostatyki, takie jak melfalan, winkrystyna, doksorubicyna oraz daunorubicyna [26,104].

Podobnie jak w omówionych uprzednio transporterów rodziny ABC, LRP ulega fizjologicznej ekspresji w komórkach zdrowych narządów, które są narażone na ekspozycję na toksyczne metabolity i ksenobiotyki [10]. Obecność tego białka odnotowano m.in. w hepatocytach [75], keranocytach i komórkach nabłonka oskrzeli [49].

Badania nad zjawiskiem MDR wykazały zwiększone stężenie cząsteczek LRP w komórkach glejaka, a także raka oskrzeli [75], jelita grubego, jajnika oraz nerki [49]. Szczególnie niekorzystnie obecność tego białka wpływa na skuteczność terapii nowotworów układu hematopetycznego – szpiczaka mnogiego czy też ostrej białaczki szpikowej [43,82].

S-transferaza glutationu π

MDR komórek nowotworowych może być związana również z nasileniem metabolizmu oraz procesów detoksykacji cytostatyków podawanych w ramach chemioterapii. Przykładem cząsteczki odpowiedzialnej za



Ryc. 6. Mechanizm oporności wielolekowej związanej z aktywnością krypt (wg [62]); 1 – wewnątrzkomórkowy transport między jądrem i cytoplazmą, 2 – transport za pośrednictwem egzocytozy, 3 – transport z udziałem pomp błonowych

rozwój takiego mechanizmu jest izoforma π białkowego enzymu S-transferazy glutationu, w skrócie GSTP1 (glutathione S-transferase P1) [21,69].

GST w organizmie człowieka występuje w postaci licznych izoenzymów, które podzielono na klasy z uwzględnieniem umiejscowienia w obrębie komórki, a następnie różnic w sekwencji aminokwasów, położeniu genów oraz swoistości substratowej. Wyróżniono sześć polimorficznych klas S-transferaz cytoplazmatycznych – α (GSTA), μ (GSTM), ω (GSTO), π (GSTP), θ (GSTT) i ζ (GSTZ) oraz jedną mikrosomalną klasę S-transferaz błonowych [22]. W klasie π , wykazującej najwyższą ekspresję w komórkach lekoopornych nowotworów, jak dotąd zidentyfikowano jeden gen – *GSTP1*. Znajduje się on na ramieniu długim chromosomu 11 (11q13) [79]. *GSTP1* ma masę cząsteczkową 25 kDa i zbudowana jest z 208 aminokwasów [7].

W strukturze GST można wyróżnić dwie domeny białkowe, które pełnią odmienne funkcje katalityczne. Na N-końcu cząsteczki znajduje się mała domena I, która składa się z 74 aminokwasów (1-74) i zaangażowana jest w interakcję między GST a cząsteczką GSH. Na C-końcu cząsteczki jest umiejscowiona domena II, złożona z reszt aminokwasowych (82-208) odpowiedzialnych za wiązanie substratu [7].

Aktywność enzymatyczną cytoplazmatyczne białka GST, w tym *GSTP1*, wykazują w postaci homodimeru [7]. Funkcją białka *GSTP1* jest zobojętnianie cząsteczek reaktywnych związków elektrofilowych, przez przyłączenie ich do wolnej grupy tiolowej cząsteczki GSH [22].

Cechą charakterystyczną GST jest bardzo niewielka swoistość substratowa tego enzymu oraz jego izoform. Katalizują one reakcję sprzężania substancji o hydrofobowej strukturze i dużej reaktywności, wynikającej z obecności w ich cząsteczkach atomu elektrofilowego [32]. Należą do nich przede wszystkim związki alkilujące – iperyt, chlorambucyl, melfalan, cyklofosfamid czy karmustyna [61,89], jak i pozostałe cytostatyki, takie jak cisplatyna, etopozyd [4] i doksorubicyna [21].

Rola GST nie ogranicza się jednak wyłącznie do detoksykacji elektrofilowych leków i innych substancji toksycznych pochodzenia egzogenne. Dodatkowo enzym ten chroni organizm przed szkodliwymi produktami stresu oksydacyjnego, zapobiegając uszkodzeniom kwasów nukleinowych oraz lipidów [36]. Ponadto bierze udział w metabolizmie hormonów steroidowych, biosyntezie leukotrienu C4 (LTC4) i prostaglandyny E2 (PGE2) [32], a także w utrzymaniu homeostazy GSH [36].

Mechanizm rozwoju wtórnej postaci MDR, uwarunkowanej nadmierną ekspresją *GSTP1* w komórkach nowotworowych, zachodzi z udziałem PKC oraz c-Fos. Takie samo podłoże ma MDR wynikającą z podwyższonej aktywności P-gp (ryc. 4).

Zwiększoną ekspresję GST obserwuje się zwykle w nowotworach, które wykazują jednocześnie duże stężenie P-gp i MRP1 [93]. Izoformę *GSTP1* zidentyfikowano m.in. w nowotworach, takich jak rak krtani [78], piersi [79], stercza, jąder, glejaka czy kostniakomięsaka [69], a także w erytrocytach i limfocytach [23].

Topoizomeraza II α

Enzym topoizomeraza II α -TopoIIa (topoisomerase II α), jest przykładem białka docelowego dla wielu terapeutyków, którego modyfikacje wykształcają MDR komórek [56].

Topoizomerazy (Topos) to enzymy zaangażowane w wielu procesach związanych z metabolizmem DNA, a także utrzymaniem prawidłowej struktury macierzy i cytoszkieletu w obrębie jądra komórkowego [3]. Ze względu na zróżnicowanie struktury i funkcji, enzymy te zostały przyporządkowane do dwóch klas – TopoI i TopoII [84]. Białka zaliczane do pierwszej z nich uczestniczą w regulacji przestrzennej struktury DNA, usuwając z niej superskręty. Enzymy należące do drugiej klasy są istotne dla procesu replikacji – wprowadzają superskręty w strukturę cząsteczki DNA [57].

W organizmie człowieka występują dwie izoformy TopoII – α (TopoIIa) i β (TopoIIb) [33]. TopoIIa, w odróżnieniu od TopoIIb, wykazuje zmienny poziom ekspresji w zależności od fazy cyklu komórkowego. Enzym ten kodowany jest przez gen *TOP2A*, umiejscowiony na ramieniu długim chromosomu 17 (17q21). Jego cząsteczka ma masę 170 kDa i składa się z 1530 reszt aminokwasowych [28].

Topos eukariotyczne przyjmują postać homodimerów, w których N-końce podjednostek są złożone z funkcyjnego segmentu GHKL (gyrase, Hsp90, histidine kinase, MutL) oraz segmentu głowicy. Mają one wspólną aktywność ATP-az – wiążą cząsteczki ATP i przeprowadzają ich hydrolizę, z uwolnieniem energii umożliwiającej przebieg całego procesu. Rdzeń podjednostki, zaangażowany bezpośrednio w wiązanie i przecinanie substratowej cząsteczki DNA, składa się z dwóch domen – 5Y-CAP oraz topim (topoisomerase-primase). Na C-końcu jest umiejscowiona tzw. „brama”, przez którą po zakończeniu replikacji przechodzi wydostająca się z kompleksu cząsteczka DNA [16,84].

W komórce TopoIIa jest zaangażowana w procesy związane z replikacją DNA [39] – kondensację i formowanie szkieletu nowo zreplikowanych chromosomów oraz segregację ich par po zakończeniu mitozy [33]. Enzym ten wytwarza krótkotrwałe, podwójne pęknięcia nici, które uzupełnia zaraz po zakończeniu procesu [64]. W związku z tym właśnie elementem swojej enzymatycznej aktywności, TopoIIa stała się molekularnym celem wielu cytostatyków o charakterze inhibitorów [84]. Ze względu na mechanizm działania tych leków, podzielono je na inhibitory typu „poison” oraz inhibitory katalityczne [64].

Do pierwszej grupy zalicza się większość inhibitorów TopoIIa – antracykliny m.in. doksorubicyna [85], mitoksantron, aktynomycyna D, etopozyd czy amsakryna [28], które stabilizują rozszczepialny kompleks TopoIIa/DNA (tzw. „cleaveable complex”) (ryc. 7) [105]. Cytostatyki tej grupy dodatkowo hamują zachodzące w komórce procesy replikacji i transkrypcji [64].

Działanie drugiej grupy leków – katalitycznych inhibitorów TopoIIa, np. merbaronu czy bisdioksopiperazyny, opiera się na blokowaniu enzymatycznej aktywności TopoIIa, jednak nie powoduje zwiększenia liczby powstających rozszczepialnych kompleksów tego enzymu z DNA [6,64].

Wielolekooporny fenotyp komórek nowotworowych jest uwarunkowany zaburzeniami zarówno aktywności, jak i ekspresji TopoIIa [83,105]. Mutacje w obrębie genu *TOP2A* mogą obniżyć wrażliwość zmodyfikowanej postaci enzymu na jego inhibitory, a przez to spadku skuteczności prowadzonej chemioterapii [64,83]. Również modyfikacje potranslacyjnej fosforylacji cząsteczek TopoIIa, wywołujące zaburzenia ich funkcji, mogą się przyczyniać do rozwoju MDR [83].

Wykazano również, że obniżone stężenie TopoIIa w komórkach nowotworowych warunkuje występowania niewrażliwości na inne cytostatyki, takie jak cisplatyna, gemcytabina czy też chemioterapeutyki oddziałujące z mikrotubulami wrzeciona podziałowego [105].

Rozwój wtórnej postaci MDR, związany ze spadkiem ekspresji genu *TOP2A*, wykazano w wielu chorobach nowotworowych, które poddawane były terapii z wykorzystaniem terapeutyków należących do grupy inhibitorów katalitycznych [28]. Przypadki oporności uwarunkowanej zaburzeniami aktywności TopoIIa zano-towano w raku pęcherza [31], piersi oraz płuc [64].

Metalotioneina

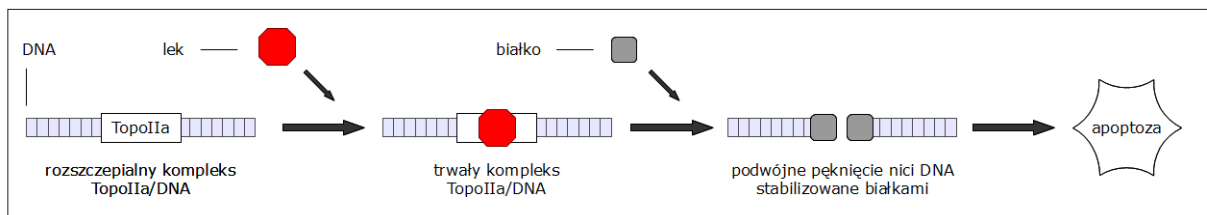
Powszechnie obserwowany w chorobach nowotworowych typ MDR opiera się na zaburzeniach regulacji apoptotycznej śmierci komórek [56]. Białkiem, które najprawdopodobniej wykazuje takie działanie, jest metalotioneina – w skrócie MT (metallothionein), odkryta w 1957 r. [59,94].

W organizmie człowieka występują cztery izoformy MT – MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4 [78], które różnią się między sobą rodzajem wiązanego substratu – kationu metalu, strukturą miejsca wiążącego oraz masą cząsteczkową [94]. Izofomy MT przyporządkowano do dwóch grup – tzw. grupy „głównej”, zawierającej MT-1 i MT-2 oraz grupy „mniejszej”, do której należą MT-3 i MT-4.

Kodująca MTs grupa genów jest położona na ramieniu długim chromosomu 16 (16q13) [19,94]. Dotychczas wykryto czternaście genów *MT*, z czego jedenaście koduje MT-1, a trzy pozostałe to geny MT-2A, MT-3 i MT-4. W organizmie człowieka najpowszechniej występującą jest izoforma MT-2A, która stanowi 80% wszystkich cząsteczek tego białka [19].

MTs to białka zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego, którego masa cząsteczkowa zawiera się w zakresie 6-7 kDa [88,94]. Składa się z 60-68 aminokwasów, z czego 30% stanowią konserwatywne reszty cytozyny [59,101]. Charakterystyczne dla danej rodziny MTs są fragmenty kilkuaminokwasowe, w których reszty cysteiny są oddzielone od siebie jednym lub dwoma innymi aminokwasami. W strukturze drugorzędowej MTs wyróżnia się dwie domeny – α (11 reszt Cys) i β (9 reszt Cys), stanowiące odseparowane od siebie gniazda molekularne. Wiążą one odpowiednio cztery i trzy kationy dwuwartościowe. Co więcej, możliwe jest wiązanie jonów różnych metali przez jedną cząsteczkę MT [97].

MT jest odpowiedzialna za utrzymanie w ustroju homeostazy pierwiastków śladowych – cynku i miedzi. Spełnia też funkcję ochronną przez udział w detoksykacji metali ciężkich, takich jak rtęć i kadm [101], stąd duże stężenie tego białka w nerkach oraz wątrobie [94]. MT-1 i MT-2 są zaangażowane w funkcję układu immunologicznego oraz przewodu pokarmowego [59,81], odpowiadają również za nasilenie procesu angiogenezy [101]. Dodatkowo, jako tzw. „zmiatacz wolnych rodników”, MT uczestniczy w wielu komórkowych mechanizmach obronnych. Wykorzystując wolne grupy tiolowe reszt cysteiny, białko to wchodzi w reakcję z reaktywnymi formami tlenu – ROS (reactive oxygen species), przez co zapobiega uszkodzeniom DNA [59,81]. W procesie tym uczestniczy niezwiązana z jonami metalu postać białka – apotioneina (T – thionein) [97].



Ryc. 7. Mechanizm działania inhibitorów TopoIIa typu „poison” (wg [61,64,103,105]); przyłączenie cząsteczki leku stabilizuje kompleks TopoIIa/DNA. Uniemożliwia to naprawę powstałych pęknięć nici DNA, do których dodatkowo kowalencyjnie przyłączają się białka. Zwiększenie liczby kompleksów TopoIIa/DNA pod wpływem inhibitorów typu „poison” prowadzi do nagromadzenia uszkodzeń DNA i do eliminacji komórki w wyniku apoptoza

Do indukcji ekspresji genów kodujących MTs są zdolne różnorodne czynniki chemiczne [14] oraz warunki stresowe – zimno, gorąco czy głód [88]. Do substancji zwiększających stężenie tych białek w komórkach organizmu należą zawarte w pożywieniu witamina D [101] i cynk [19], a także czynniki wzrostu oraz hormony kokortykosteroidowe [88,101]. Podobne działanie wykazują cytokiny – IFN- γ , TNF- α , IL-1 i IL-6 oraz wiele innych bodźców zapalnych, takich jak ROS, białka szoku ciepłego (HSP – heat-shock protein) czy endotoksyny [101].

Dokładny mechanizm MDR związanej z aktywnością MT jak dotąd nie został poznany. Dowiedziono jednak antyapoptycznego działania tego białka w odpowiedzi na stosowaną chemioterapię (ryc. 8). Zwiększone stężenie komórkowej MT [59,88] powoduje rozwój oporności na czynniki alkilujące – cyklofosfamid i melfalan i inne chemioterapeutyki, np. cisplatynę, bleomycynę, [81], doksorubicynę [88] czy irynotekan [14].

Występowanie wielolekoopornego fenotypu, związanego z nasiloną ekspresją MT, wykazano w licznych chorobach nowotworowych, takich jak: rak żołądka [14], odbytnicy [88], piersi, nerki, płuca, jajnika, jądra, pęcherza moczowego, szyjki macicy, endometrium, trzustki, pęcherzyka żółciowego, a także czerniak i pozostałe raki skóry [94].

Cytokeratyna 18

Właściwości antyapoptyczne, warunkujące występowanie zjawiska MDR, ma również jedno z białek cytoszkieletu komórek nabłonka – cytokeratyna 18 (CK18) [2,12]. Cytokeratyny (CKs) są największą i najbardziej zróżnicowaną grupą filamentów pośrednich (w skrócie IF – intermediate filaments). Obejmuje ona 20 białek o wysokim stopniu homologii [47], które podzielono ze względu na wartość punktu izoelektrycznego. Do cytokeratyn typu I zalicza się CK9-23 – białka kwasowe o masie cząsteczkowej 40-56,5 kDa. Typ II tych białek (CK1-8) charakteryzuje się większą masą cząsteczkową (53-76 kDa) oraz odczynem zasadowym lub obojętnym

[12,68]. Wyróżnia się ponadto typ III CKs, do którego zaklasyfikowano wimentynę, desminę, GFAP i peryferynę, typ IV – neurofilamenty, nestynę oraz interneksynę, a także typ V – lamininy [12].

W komórce cytokeratyny występują w postaci heterodimerów o średnicy 10 nm, stabilizowanych przez wzajemne, hydrofobowe oddziaływania dwóch cząstek białka, z których każda przynależy do odrębnego z przedstawionych uprzednio typów [12,68]. Występowanie odpowiedniego dimeru wykazuje dużą swoistość tkankową, uwarunkowaną fazą cyklu komórkowego [60].

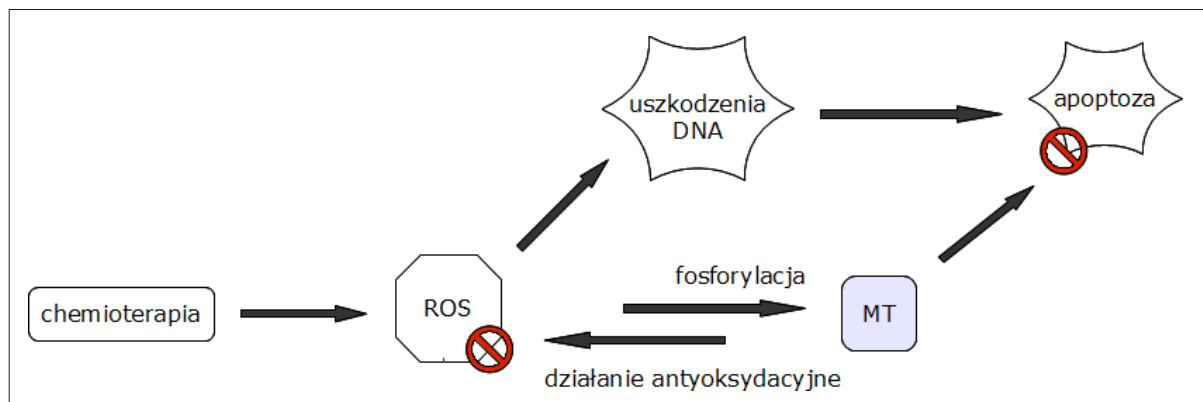
CK18, należąca do typu I, ma masę cząsteczkową 48 kDa i zawiera w swym łańcuchu 430 aminokwasów [12] (ryc. 9). Kodowana jest przez gen *KRT18*, zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 12 (12q13) [102] w sąsiedztwie genu *CK8* [66].

W prawidłowym nabłonku ludzkim najczęściej spotykane dimery to CK8/CK18 oraz CK19/CK18 [47]. Heterodimer CK8/CK18 jest głównym komponentem IF [60] swoistym dla komórek nabłonka jednowarstwowego skóry oraz warstwy epitelialnej w obrębie jelit i wątroby [12].

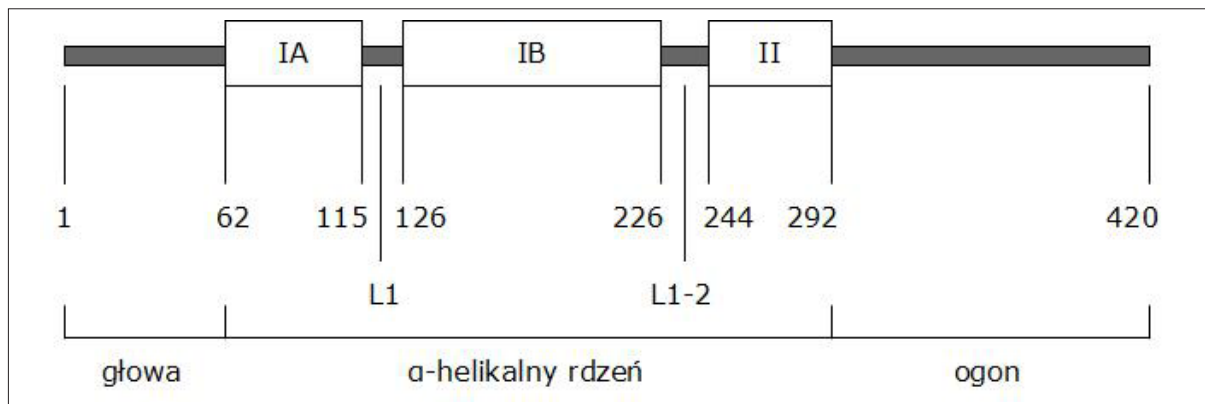
Cytokeratyny wraz z mikrofilamentami i mikrotubulami tworzą cytoszkielet komórek nabłonkowych [40], który zapewnia ich prawidłowy kształt i morfologię [102]. Ponadto wytwarzają sieć łączącą błonę cytoplazmatyczną, jądro oraz pozostałe organella [47], są zaangażowane także w regulację transportu komórkowego [68].

W początkowym etapie procesu apoptozy elementy cytoszkieletu ulegają procesom reorganizacji do samodzielnie występujących struktur ziarnistych. W heterodimerze CK8/CK18 trawieniu przez kaspazy podlega cząsteczka CK18 (ryc. 10). Nieznane są natomiast dalsze losy wykazującej oporność proteolityczną CK8 [12,60].

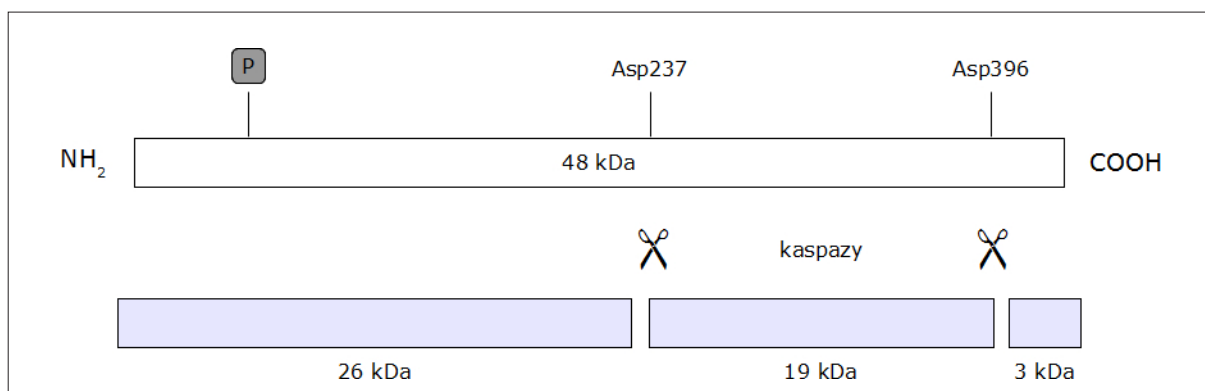
W nowotworach przejawiających MDR wykazano podwyższony poziom ekspresji zarówno CK18, jak i CK8. Przypuszcza się jednak, że wielolekooporny fenotyp



Ryc. 8. Schemat antyapoptycznego działania MT w odpowiedzi na chemioterapię (wg [42,59,81,94,101]); większość stosowanych cytostatyków indukuje nasilonie powstawanie ROS w komórce. Ze względu na swój antyoksydacyjny charakter, MT chroni komórki przed powstawaniem stresu oksydacyjnego. Zapobiega przez to uszkodzeniom DNA, a tym samym pozwala uniknąć eliminacji komórek nowotworowych w wyniku apoptozy



Ryc. 9. Struktura CK18 (wg [12,44,65]); α-helikalny rdzeń podzielony jest na trzy poddomeny – IA, IB i II, zespolone sekwencjami łączącymi L1 i L1-2. Rdzeń otaczają dwie domeny – N-końcowa (tzw. „głowa”) oraz C-końcowa (tzw. „ogon”)



Ryc. 10. Schemat proteolizy CK18 w procesie apoptozy (wg [12,44]); obecność ufosforylowanej reszty Ser53 umożliwia rozpoznanie filamentu keratynowego przez kaspazy. W wyniku działania tych proteolitycznych enzymów powstają trzy fragmenty – N-końcowy, o masie 26 kDa, oraz dwa C-końcowe, o masie 19 i 3 kDa

komórek nowotworowych jest związany z proteolityczną wrażliwością CK18 [2,5]. Wykazują one pierwotną postać MDR, wynikającą z nasilonej ekspresji CK18, która zmniejsza ogólny skutek działania kaspaz na IF [16].

Typ MDR uwarunkowany aktywnością CK18 cechuje się brakiem wrażliwości na cytostatyki oddziałujące z mikrotubulami wrzeczona kariokinetycznego, takimi jak taksol [68] czy kolcemid, ale też na terapii o odmiennym działaniu – acetaminofen [12], mitoksantron [2] bądź antracykliny [68].

Nadmierną ekspresję CK18 stwierdza się w raku piersi [54], płuc [2], nerki oraz przewodu pokarmowego [102].

PRÓBY ZNIENIENIA OPORNOŚCI WIELELEKOWEJ W NOWOTWORACH

W odpowiedzi na coraz powszechniejsze występowania zjawiska MDR w chorobach nowotworowych trwają intensywne prace nad metodami, które umożliwiłyby zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapię. W związku z tym, że MDR jest zjawiskiem uzależnionym od licznej grupy czynników, badania nad możliwymi sposobami jej zniesienia dotyczą wielu aspektów biologii komórki nowotworowej jak i jej odpowiedzi na wprowadzane do ustroju leki.

MDR może wynikać m.in. z obniżenia stężenia podawanego terapeutycznego w komórce nowotworowej. Zjawisku temu można zapobiec przez nasilenie dokomórkowego transportu cząsteczek leku, modyfikując struktury i właściwości błony komórkowej, które przyczyniają się do wzrostu jej przepuszczalności i łatwiejszego wejścia cząsteczek do komórki za pośrednictwem biernego przepływu przez jej błonę.

Hydrofobowe substancje napływają do wnętrza komórki przez dyfuzję prostą – szybki proces, umożliwiający przemieszczenie wielu cząsteczek w krótkim czasie. Dzięki temu, taki dokomórkowy transport przeważa ilościowo nad aktywnym wyrzutem terapeutycznego przez transportery błonowe, dlatego też cząsteczkom nowo projektowanych leków przeważnie nadaje się hydrofobowy charakter. Alternatywą jest obniżenie wyrzutu cząsteczek leku poza komórkę nowotworową przez nadanie im struktury, która nie jest rozpoznawana przez transporter. Proces ten jest oparty na znajomości budowy cząsteczek antymetabolitów danego białka [8].

Wykazano również, że cząsteczki niektórych cytostatyków są zdolne do wywołania działania terapeutycznego w wykazujących oporność komórkach, jeśli zostaną wprowadzone do ustroju w postaci koniugatów z biał-

kami, takimi jak albuminy osocza bydłęcego. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku jest możliwe również dzięki zastosowaniu specjalnego systemu transportu jego cząsteczek do wnętrza komórki. Jest on oparty na nanocząsteczkach, takich jak liposomy czy polimeryczne micelle, które wykazują zwiększoną stabilność we krwi oraz możliwość wprowadzenia licznych modyfikacji, dzięki którym transportowany terapeutyczny może być dostarczony bezpośrednio do określonej grupy komórek.

Aktywność transporterów białkowych, odpowiedzialnych za wyrzut cząsteczek cytostatyku z wnętrza komórki, może ulec zatrzymaniu na kilku płaszczyznach jej funkcjonowania. Na poziomie transkrypcji ekspresja może być zahamowana w wyniku modyfikacji promotora genu czy też blokowania czynników uczestniczących w jego transkrypcji. Translacji białek MDR można zapobiec przez zastosowanie oligodeoksyrybonukleotydów – ODNs (oligodeoxyribonucleotides), które tworzą z mRNA nieulegające translacji hybrydy, rybozymów – przeprowadzających proces rozpadu transkryptów genu danego transportera, czy wyciszanie genów przez degradację mRNA za pomocą siRNA [8].

Cząsteczki, które są zdolne do modulowania czy też hamowania aktywności białkowych transporterów, a przez to znoszenia MDR komórek, nazywa się chemouczulaczami (chemosensitizers), inhibitorami lub modulatorami MDR [8,41]. Należą do wielu grup związków chemicznych [96] i wykazują podobieństwo struktury – dużą hydrofobowość, małą masę cząsteczkową oraz obecność pierścienia aromatycznego w cząsteczce [67]. Aktywność wszystkich transporterów z rodziny białek ABC obniżają związki, takie jak cyklosporyna A oraz inhibitory proteazy wirusa HIV – nalfinawir i ritonawir [63].

W związku z mechanizmem działania oraz powinowactwem do docelowego białka transporterowego, wyróżnia się trzy generacje inhibitorów P-gp. Inhibitory pierwszej generacji, do których zaliczają się cyklosporyna A, erytromycyna czy werapamil [27], to leki o pierwotnie odmiennym przeznaczeniu terapeutycznym. W strukturze cząsteczki wykazują duże podobieństwo do substratów docelowych transporterów [106], dzięki czemu dochodzi do hamowania ich aktywności kompetencyjnej. Jednak ze względu na niewielkie powinowactwo do białek MDR, skuteczność działania chemouczulaczy tej generacji wymaga ich podawania w dużych dawkach, co prowadzi do silnej toksyczności [8,46].

Mniejsza toksyczność, lepszy profil farmakologiczny, lecz wciąż małe powinowactwo do P-gp [35] cechują związki, takie jak valsopodar, R-werapamil czy deksgul-dypina, należące do grupy inhibitorów drugiej generacji. Niestety, substancje te wykazują brak swoistości i działanie kompetencyjne w stosunku do enzymów cytochromu P450 3A4 (CYP3A4). Dochodzi przez to do osłabienia metabolizmu wszystkich znajdujących się

w ustroju ksenobiotyków, a także zaburzenia profilu farmakokinetycznego podawanych cytostatyków.

W związku z niepowodzeniem terapii prowadzonej z udziałem chemouczulaczy dwóch pierwszych grup, opracowana została trzecia generacja tych leków. Charakteryzuje je duże powinowactwo do P-gp, wykluczające ryzyko związania z innymi transporterami oraz zaburzenia ich czynności. Ponadto, podawane już w małych ilościach wiążą się z docelowym białkiem w sposób niekompetencyjny, wymuszając konformacyjną zmianę cząsteczki transportera, przez co hamują jego aktywność i wyrzut molekuł cytostatyku na zewnątrz komórki nowotworowej [8]. Do tej właśnie, najbardziej obiecującej grupy inhibitorów, zaliczane są substancje, takie jak tariquidar, birikodar, annamycyna, mitotan oraz laniquidar [52].

Opracowano także modulatory pozostałych białek transportowych, warunkujących występowanie zjawiska MDR. Aktywność białek rodziny MRP hamuje MS209 – fumaran dofequidaru [72], a MRP1, wykazujące aktywność pompy GS-X, sulfoksymina butioniny – BSO (buthionine sulfoximine), która bezpośrednio blokuje tworzenie koniugatów glutationowych przez GST [8]. W przypadku oporności wielolekowej wynikającej z czynności krypt komórkowych oraz LRP, stosowana jest pochodna pirydynowa – PAK-104P [8]. Inhibicję BCRP umożliwiają elakridar, tariquidar, birikodar, czyli inhibitory wspólne z P-gp [76], a także fumitremorgina C (FTC) oraz flawonoidy pochodzące z pożywienia – biochanina A i chryzyna [63].

Inną metodą znoszenia MDR związanej z aktywnością pomp błonowych jest zastosowanie przeciwciał przeciwko cząsteczkom danego transportera [8], a także drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz – sunitynibu czy apatynibu. Mają one zdolność hamowania białek transportowych z rodziny ABC przez blokowanie ich miejsc aktywnych, odpowiedzialnych za hydrolizę ATP i dostarczenie energii niezbędnej do przeprowadzenia wyrzutu cząsteczek substratu poza komórkę [17].

MDR wynikać może także z zaburzeń regulacji apoptotycznej śmierci komórki, do której prowadzi większość ze stosowanych cytostatyków. Nasilenie tego procesu może zostać wywołane podaniem inhibitorów proteasomów, struktur odpowiedzialnych za degradację czynników transkrypcyjnych oraz cyklin. Substancje o takim działaniu, np. bortezomib – dipeptyd borowy, pobudzają ścieżkę sygnałową apoptozy [8].

PODSUMOWANIE

Oporność komórek nowotworowych na chemioterapię jest jedną z przyczyn nieskuteczności obecnie stosowanych farmakoterapii.

Komórki nowotworowe mają zdolność modyfikacji aktywności licznych białek, uczestniczących w procesach transportu, metabolizmu ksenobiotyków, naprawy

DNA czy też zaangażowanych w przebieg apoptozy [56]. Zmiany ich ekspresji są następnie utrwalane ewolucyjnie, dzięki czemu problem MDR systematycznie zyskuje na powszechności. Dodatkowym utrudnieniem w walce z MDR jest jednoczesne występowanie w komórkach danego nowotworu kilku odpowiedzialnych za nią mechanizmów [8].

PIŚMIENICTWO

- [1] Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G.: Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 2009; 323: 1718-1722
- [2] Anderson J.M., Heindl L.M., Bauman P.A., Ludi C.W., Dalton W.S., Cress A.E.: Cytokeratin expression results in a drug-resistant phenotype to six different chemotherapeutic agents. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 97-105
- [3] Asano T., Nakamura K., Fujii H., Horichi N., Ohmori T., Hasegawa K., Isoe T., Adachi M., Otake N., Fukunaga Y.: Altered expression of topoisomerase II α contributes to cross-resistant to etoposide K562/MX2 cell line by aberrant methylation. *Br. J. Cancer*, 2005; 92: 1486-1492
- [4] Ban N., Takahashi Y., Takayama T., Kura T., Katahira T., Sakamaki S., Niitsu Y.: Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.*, 1996; 56: 3577-3582
- [5] Bauman P.A., Dalton W.S., Anderson J.M., Cress A.E.: Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 5311-5314
- [6] Beck W.T., Morgan S.E., Mo Y.Y., Bhat U.G.: Tumor cell resistance to DNA topoisomerase II inhibitors: new developments. *Drug Resist. Updat.*, 1999; 2: 382-389
- [7] Bhargavi R., Vishwakarma S., Murty U.S.: Modeling analysis of GST (glutathione-S-transferases) from *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Bioinformatics*, 2005; 1: 25-27
- [8] Borowski E., Bontemps-Grac M.M., Piwkowska A.: Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim. Pol.*, 2005; 52: 609-627
- [9] Borst P., Evers R., Koel M., Wijnholds J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1295-1302
- [10] Bouhamyia L., Chantot-Bastarad S., Zaidi S., Roynard P., Prengel C., Bernaudin J.F., Fleury-Feith J.: Immunolocalization and cell expression of lung resistance-related protein (LRP) in normal and tumoral human respiratory cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 2007; 55: 773-782
- [11] Bredel M.: Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2001; 35: 161-204
- [12] Caulin C., Salvesen G.S., Oshima R.G.: Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.*, 1997; 138: 1379-1394
- [13] Chen Z.S., Tiwari A.K.: Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.*, 2011; 278: 3226-3245
- [14] Chun J.H., Kim H.K., Kim E., Kim I.H., Kim J.H., Chang H.J., Choi I.J., Lim H.S., Kim I.J., Kang H.C., Park J.H., Bae J.M., Park J.G.: Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer. *Cancer Res.*, 2004; 64: 4703-4706
- [15] Clifford S.C., Neal D.E., Lunec J.: Alterations in expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer*, 1996; 73: 659-666
- [16] Cress A.E., Dalton W.S.: Multiple drug resistance and intermediate filaments. *Cancer Metastasis Rev.*, 1996; 15: 499-506
- [17] Dai C.L., Tiwari A.K., Wu C.P., Su X.D., Wang S.R., Liu D.G., Ashby C.R.Jr., Huang Y., Robey R.W., Liang Y.J., Chen L.M., Shi C.J., Ambudkar S.V., Chen Z.S., Fu L.W.: Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. *Cancer Res.*, 2008; 68: 7905-7914
- [18] Dalton W.S., Scheper R.J.: Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91: 1604-1605
- [19] Davis S.R., Cousins R.J.: Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.*, 2000; 130: 1085-1088
- [20] Demant E.J., Sehested M., Jensen P.B.: A model for computer simulation of P-glycoprotein and transmembrane delta pH-mediated anthracycline transport in multidrug-resistant tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1055: 117-125
- [21] Depeille P., Cuq P., Mary S., Passagne I., Evrard A., Cupissol D., Vian L.: Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol. Pharmacol.*, 2004; 65: 897-905
- [22] Depeille P., Cuq P., Passagne I., Evrard A., Vian L.: Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br. J. Cancer*, 2005; 93: 216-223
- [23] Dusinska M., Staruchova M., Horska A., Smolkova B., Collins A., Bonassi S., Volkovova K.: Are glutathione S transferases involved in DNA damage signalling? Interactions with DNA damage and repair revealed from molecular epidemiology studies. *Mutat. Res.*, 2012; 736: 130-137
- [24] Eilers M., Roy U., Mondal D.: MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells. *Exp. Biol. Med.*, 2008; 233: 1149-1160
- [25] Ferte J.: Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 277-294
- [26] Filipits M., Drach J., Pohl G., Schuster J., Stranzl T., Ackermann J., Konigsberg R., Kaufmann H., Gisslinger H., Huber H., Ludwig H., Pirker R.: Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2426-2430
- [27] Ford J. M., Hait W.N.: Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.*, 1990; 42: 155-199
- [28] Fortune J.M., Osheroff N.: Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2000; 64: 221-253
- [29] Goldstein L.J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S.L., Gazdar A., Pirker R., Green A., Crist W., Brodeur G.M.: Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989; 81: 116-124
- [30] Hall M.D., Handley M.D., Gottesman M.M.: Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2009; 30: 546-556
- [31] Hasegawa S., Abe T., Naito S., Kotoh S., Kumazawa J., Hipfner D.R., Deeley R.G., Cole S.P., Kuwano M.: Expression of multidrug resistance-as-

- sociated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 1995; 71: 907-913
- [32] Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005; 45: 51-88
- [33] Hochhauser D., Kotecha M., O'Hare C., Morris P.J., Hartley J.M., Taherbhai Z., Harris D., Forni C., Mantovani R., Lee M., Hartley J.A.: Modulation of topoisomerase II α expression by a DNA sequence-specific polyamide. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 346-354
- [34] Hoffmann U., Kroemer H.K.: The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab. Rev.*, 2004; 36: 669-701
- [35] Holtt V., Kouba M., Diel M., Vogt G.: Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.*, 1992; 43: 2601-2608
- [36] Islam T., Berhane K., McConnell R., Gauderman W.J., Avol E., Peters J.M., Gilliland F.D.: Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children. *Thorax*, 2009; 64: 197-202
- [37] Jedlitschky G., Keppler D.: Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam. Horm.*, 2002; 64: 153-184
- [38] Jones P.M., George A.M.: Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 12639-12644
- [39] Juliano R.L., Ling V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 455: 152-162
- [40] Kanaji N., Bando S., Fujita J., Ishii T., Ishida T., Kubo A.: Compensation of type I and type II cytochrome pools in lung cancer. *Lung Cancer*, 2007; 55: 295-302
- [41] Kellen J.A.: The reversal of multidrug resistance: an update. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 2003; 3: 5-13
- [42] Kizek R., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Smutny S., Burda J.V., Frei E., Stiborova M.: Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol. Ther.*, 2012; 133: 26-39
- [43] Krishnakumar S., Mallikarjuna K., Desai N., Muthialu A., Venkatesan N., Sundaram A., Khetan V., Shanmugam M.P.: Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma. *Br. J. Ophthalmol.*, 2004; 88: 1521-1526
- [44] Ku N.O., Omary M.B.: Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 26792-26798
- [45] Kuo M.T.: Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2009; 11: 99-133
- [46] Lampidis T.J., Krishan A., Planas L., Tapiero H.: Reversal of intrinsic resistance to adriamycin in normal cells by verapamil. *Cancer Drug Deliv.*, 1986; 3: 251-259
- [47] Lau A.T., Chiu J.F.: The possible role of cytochrome 8 in cadmium-induced adaptation and carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2007; 67: 2107-2113
- [48] Lehne G.: P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr. Drug Targets*, 2000; 1: 85-99
- [49] Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E.: The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 2003; 8: 411-424
- [50] Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.: Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005; 204: 216-237
- [51] Ling V.: Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997; 40, Suppl: S3-S8
- [52] Liscovitch M., Lavie Y.: Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *Drugs*, 2002; 5: 349-355
- [53] Litman T., Druley T.E., Stein W.D., Bates S.E.: From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001; 58: 931-959
- [54] Liu F., Chen Z., Wang J., Shao X., Cui Z., Yang C., Zhu Z., Xiong D.: Overexpression of cell surface cytochrome 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix. *Neoplasia*, 2008; 10: 1275-1284
- [55] Locher K.P.: Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2009; 364: 239-245
- [56] Luqmani Y.A.: Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med. Princ. Pract.*, 2005; 14, Suppl. 1: 35-48
- [57] Meyer K.N., Kjeldsen E., Straub T., Knudsen B.R., Hickson I.D., Kikuchi A., Kreipe H., Boege F.: Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol.*, 1997; 136: 775-788
- [58] Mitra P., Audus K.L.: MRP isoforms and BCRP mediate sulfate conjugate efflux out of BeWo cells. *Int. J. Pharm.*, 2010; 384: 15-23
- [59] Mitropoulos D., Kyroudi-Voulgari A., Theocharis S., Serafetinides E., Moraitis E., Zervas A., Kittas C.: Prognostic significance of metallothionein expression in renal cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.*, 2005; 3: 5
- [60] Monge M., Vilaseca M., Soto-Cerrato V., Montaner B., Giralt E., Perez-Tomas R.: Proteomic analysis of prodigiosin-induced apoptosis in a breast cancer mitoxantrone-resistant (MCF-7 MR) cell line. *Invest New Drugs*, 2007; 25: 21-29
- [61] Morrow C.S., Smitherman P.K., Diah S.K., Schneider E., Townsend A.J.: Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1 - and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 20114-20120
- [62] Mossink M.H., van Zon A., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A.: Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene*, 2003; 22: 7458-7467
- [63] Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M.F., Mao Q.: Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab.*, 2010; 11: 603-617
- [64] Nitiss J.L.: Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 338-350
- [65] Omary M.B., Ku N.O., Strnad P., Hanada S.: Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1794-1805
- [66] Oshima R.G.: Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 486-492
- [67] Pajeva I.K., Wiese M.: Structure-activity relationships of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators. *AAPS J.*, 2009; 11: 435-444
- [68] Parekh H.K., Simpkins H.: The differential expression of cytochrome 18 in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian adenocarcinoma cells and its association with drug sensitivity. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5203-5206
- [69] Pasello M., Michelacci F., Scionti I., Hattinger C.M., Zuntini M., Caccuri A.M., Scotlandi K., Picci P., Serra M.: Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res.*, 2008; 68: 6661-6668
- [70] Paumi C.M., Chuk M., Snider J., Stagljar I., Michaelis S.: ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABC (MRP) subfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009; 73: 577-593
- [71] Peaston A.E., Gardaneh M., Franco A.V., Hocker J.E., Murphy K.M., Farnsworth M.L., Catchpole D.R., Haber M., Norris M.D., Lock R.B., Marshall G.M.: MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. *Br. J. Cancer*, 2001; 85: 1564-1571

- [72] Perez-Tomas R.: Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr. Med. Chem.*, 2006; 13: 1859-1876
- [73] Podolski-Renic A., Jadranin M., Stankovic T., Bankovic J., Stojkovic S., Chiourea M., Aljancic I., Vajs V., Tesevic V., Ruzdijic S., Gagos S., Tanic N., Pesic M.: Molecular and cytogenetic changes in multi-drug resistant cancer cells and their influence on new compounds testing. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2013; 72: 683-697
- [74] Raguz S., Yague E.: Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *Br. J. Cancer*, 2008; 99: 387-391
- [75] Raidl M., Berger W., Schulte-Hermann R., Kandioler-Eckersberger D., Kappel S., Wrba F., Micksche M., Grasl-Kraupp B.: Expression of the lung resistance-related protein in human and rat hepatocarcinogenesis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002; 283: G1117-G1124
- [76] Robey R.W., Massey P.R., Amiri-Kordestani L., Bates S.E.: ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. *Anti-cancer Agents Med. Chem.*, 2010; 10: 625-633
- [77] Ross D.D.: Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2004; 17: 641-651
- [78] Ruwali M., Singh M., Pant M.C., Parmar D.: Polymorphism in glutathione S-transferases: susceptibility and treatment outcome for head and neck cancer. *Xenobiotica*, 2011; 41: 1122-1130
- [79] Sakoda L.C., Blackston C.R., Xue K., Doherty J.A., Ray R.M., Lin M.G., Stalsberg H., Gao D.L., Feng Z., Thomas D.B., Chen C.: Glutathione S-transferase M1 and P1 polymorphisms and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions in Chinese women. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2008; 109: 143-155
- [80] Sankatsing S.U., Beijnen J.H., Schinkel A.H., Lange J.M., Prins J.M.: P-glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 1073-1081
- [81] Satoh M., Cherian M.G., Imura N., Shimizu H.: Modulation of resistance to anticancer drugs by inhibition of metallothionein synthesis. *Cancer Res.*, 1994; 54: 5255-5257
- [82] Scheffer G.L., Wijngaard P.L., Flens M.J., Izquierdo M.A., Slovak M.L., Pinedo H.M., Meijer C.J., Clevers H.C., Scheper R.J.: The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.*, 1995; 1: 578-582
- [83] Schneider E., Horton J.K., Yang C.H., Nakagawa M., Cowan K.H.: Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res.*, 1994; 54: 152-158
- [84] Schoeffler A.J., Berger J.M.: Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005; 33: 1465-1470
- [85] Shen F., Chu S., Bence A.K., Bailey B., Xue X., Erickson P.A., Montrose M.H., Beck W.T., Erickson L.C.: Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008; 324: 95-102
- [86] Simon S.M., Schindler M.: Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 3497-3504
- [87] Singh A., Wu H., Zhang P., Happel C., Ma J., Biswal S.: Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 2365-2376
- [88] Skarda J., Hajduch M., Kolek V.: Drug resistance in lung cancer. *Cancer Ther.*, 2008; 6: 377-388
- [89] Stavrovskaya A.A.: Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc.)*, 2000; 65: 95-106
- [90] Stavrovskaya A.A., Stromskaya T.P.: Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc.)*, 2008; 73: 592-604
- [91] Stefkova J., Poledne R., Hubacek J.A.: ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.*, 2004; 53: 235-243
- [92] Takahashi K., Shibata T., Oba T., Ishikawa T., Yoshikawa M., Tatsunami R., Takahashi K., Tampo Y.: Multidrug-resistance-associated protein plays a protective role in menadione-induced oxidative stress in endothelial cells. *Life Sci.*, 2009; 84: 211-217
- [93] Tew K.D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, 1994; 54: 4313-4320
- [94] Thirumoorthy N., Shyam S.A., Manisenthil K.K., Senthil K.M., Ganesh G., Chatterjee M.: A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J. Surg. Oncol.*, 2011; 20: 9-54
- [95] Turner J.G., Gump J.L., Zhang C., Cook J.M., Marchion D., Hazlehurst L., Munster P., Schell M.J., Dalton W.S., Sullivan D.M.: ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 2006; 108: 3881-3889
- [96] Ullah M.F.: Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2008; 9: 1-6
- [97] Vasak M.: Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005; 19: 13-17
- [98] Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D.W.: Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics*, 2009; 3: 281-290
- [99] Vilaboa N.E., Galan A., Troyano A., de Blas E., Aller P.: Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 24970-24976
- [100] Volm M., Kastel M., Mattern J., Efferth T.: Expression of resistance factors (P-glycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer*, 1993; 71: 3981-3987
- [101] Weinlich G., Eisendle K., Hassler E., Baltaci M., Fritsch P.O., Zelger B.: Metallothionein – overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 835-841
- [102] Weng Y.R., Cui Y., Fang J.Y.: Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2012; 10: 485-493
- [103] Wilstermann A.M., Osheroff N.: Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 46290-46296
- [104] Wyler B., Shao Y., Schneider E., Cianfriglia M., Scheper R.J., Frey B.M., Gieseler F., Schmid L., Twentymann P.R., Lehnert M.: Intermittent exposure to doxorubicin in vitro selects for multifactorial non-P-glycoprotein-associated multidrug resistance in RPMI 8226 human myeloma cells. *Br. J. Haematol.*, 1997; 97: 65-75
- [105] Yan S., Shun-Chang J., Li C., Jie L., Ya-Li L., Ling-Xiong W.: Topoisomerase II alpha expression and the benefit of adjuvant chemotherapy for postoperative patients with non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2010; 10: 621
- [106] Yang K., Wu J., Li X.: Recent advances in the research of P-glycoprotein inhibitors. *Biosci. Trends*, 2008; 2: 137-146
- [107] Zhan M., Yu D., Liu J., Glazer R.I., Hannay J., Pollock R.E.: Transcriptional repression of protein kinase Cα via Sp1 by wild type p53 is involved in inhibition of multidrug resistance 1 P-glycoprotein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 4825-4833

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.