

FOLÁTY: FYZIOLOGIE, METABOLISMUS A MECHANISMUS REZISTENCE NA JEJICH ANTAGONISTY

FOLATES: PHYSIOLOGY, METABOLISM AND MECHANISM OF RESISTANCE TO THEIR ANTAGONISTS

DEMLOVÁ R.¹, RADINA M.², ŠTĚRBA J.³, VALÍK D.⁴

¹ ODDĚLENÍ KLINICKÝCH HODNOCENÍ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

² ONKOLOGICKÉ CENTRUM J.G.MENDELA, NOVÝ JIČÍN

³ KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGICE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, DĚTSKÁ NEMOCNICE, ČERNOPOLNÍ 9

⁴ ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

e-mail: valik@mou.cz, autor pro korespondenci

Souhrn: Antifoláty byly prvními metabolickými antagonisty uvedenými do klinické praxe přibližně před šedesáti lety. Již tehdy se vědělo, že aminopterin a jeho methylderivát, methotrexat (4-amino, 10-methylpterin) zasahují do metabolismu folátů inhibicí enzymu dihydrofolátreduktázy. Zlomem v pohledu na metabolismus a působení jak přirozených forem folátů, tak jejich antagonistů, byl objev jejich polyglutamylace v 80. letech minulého století. Významnými momenty v procesu porozumění antifolátového účinku methotrexatu bylo objasnění kinetické podstaty jeho interakce s enzymem dihydrofolátreduktáza a základních principů transportních mechanismů. V této době byl již methotrexat standardní součástí celé řady klinicky používaných chemoterapeutických režimů. Zejména v dětské onkologii se do popředí dostala otázka objasnění možných mechanismů rezistence na antifoláty, která je spolu s toxicitou základním a často limitujícím klinickým problémem chemoterapie.

Klíčová slova: antifoláty, folát, polyglutamáty, metotrexat, folátové receptory, thymidylátsyntáza, dihydrofolátreduktáza

Summary: Antifolates were the first metabolic antagonists that were brought to the clinical practice about sixty years ago. By that time it was known that aminopterin and its methyl derivative, methotrexate, can interfere with folate metabolism by inhibiting the enzyme dihydrofolate reductase. The discovery of polyglutamylation that came during the eighties brought a breakthrough in understanding both physiology of natural folates and pharmacology of folate inhibitors as well. Another important milestone was elucidation of interactions of antifolates with its target enzyme, dihydrofolate reductase, and discovery of folate transport processes. By that time methotrexate was already a standard component of a number of chemotherapy regimens used in the clinic. In pediatric oncology, where the high-dose administration schemes have been successfully used, toxicity and mechanisms of resistance emerged as significant problems that often limit clinical use of folate antagonists.

Key words: antifolates, folates, polyglutamates, methotrexate, folate receptors, thymidylate synthase, dihydrofolate reductase

Úvod

Antifoláty byly prvními metabolickými antagonisty uvedenými do klinické praxe již koncem čtyřicátých let minulého století (1). Přestože se již tehdy vědělo, že aminopterin a methotrexat (4-amino, 10-methylpterin) zasahují do metabolismu folátů inhibicí enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR), hlubší pochopení mechanismu jejich účinku se vyvíjelo postupně a poměrně zdlouhavě. Zlomem v pohledu na metabolismus a působení jak přirozených forem folátů, tak jejich antagonistů, byl objev jejich polyglutamylace v 80. letech minulého století. Dalšími významnými momenty v procesu porozumění antifolátového účinku methotrexatu bylo objasnění kinetické podstaty jeho interakce s enzymem dihydrofolátreduktáza a základních principů transportních mechanismů (2). V této době byl již methotrexat standardní součástí celé řady klinicky používaných chemoterapeutických režimů a s jeho rostoucí úlohou v terapii některých malignit, zejména v dětské onkologii, se do popředí dostala také otázka objasnění možných mechanismů rezistence na antifoláty (3), která je spolu s toxicitou základním a často limitujícím klinickým problémem v chemoterapii nádorových chorob (4).

Foláty

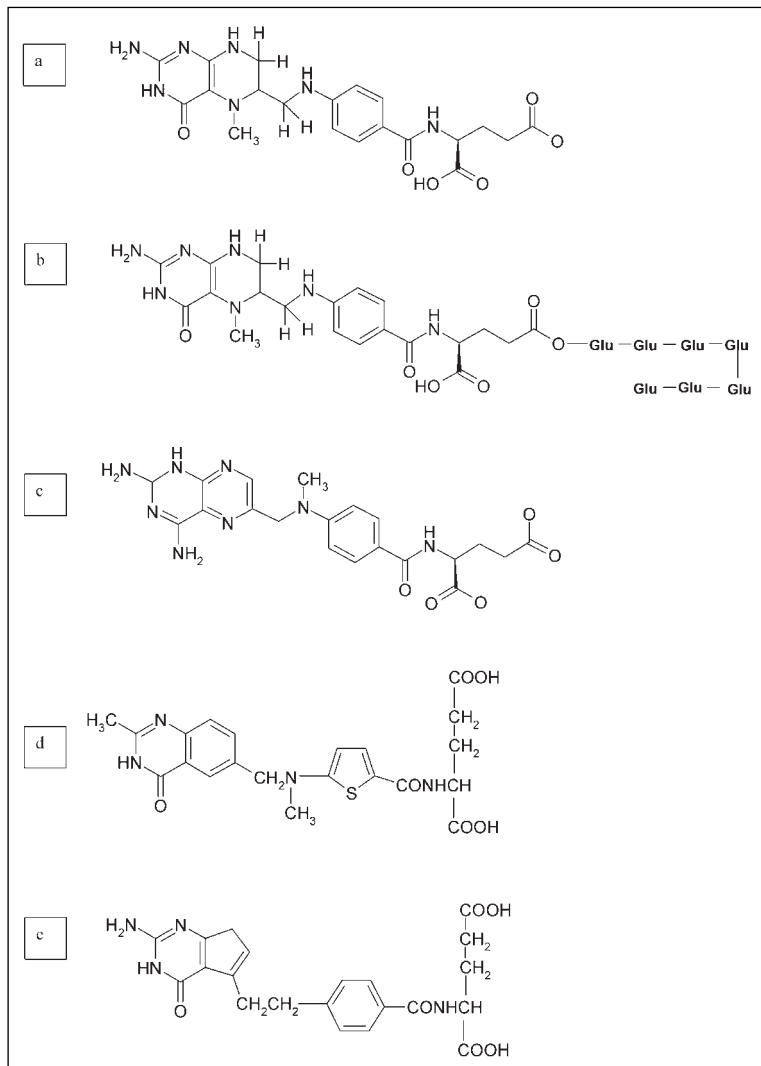
Obecným pojmem „foláty“ označujeme skupinu příbuzných látek obsahujících ve své molekule pteridinový heterocyclus,

kteří se jako kofaktory (přesněji kosubstráty, protože v průběhu reakcí, kterých se účastní, dochází k jejich chemické změně) účastní celé řady klíčových reakcí v metabolickém přenosu jednonukleotidových zbytků a jsou nepostradatelné pro řadu pochodů v živých organismech. Jde zejména o biosyntézu purinů a pyrimidinů, interkonverze glycinu, serinu a methioninu a degradace histidinu (5). Pojem „foláty“ je tedy obecně zažité synonymum pro kyseliny pteroylglutamovou a celou skupinu pteroylglutamátů, které se vzájemně liší stupněm redukce pteridinového kruhu, jednonukleotidovými substituenty a počtem glutamátových zbytků. Pteroylpolyglutamáty vznikají navázáním glutamátů gama-peptidickou vazbou na pteridinový kruh a bude o nich pojednáno později. Foláty se v buňce vyskytují fyziologicky v koncentracích pohybujících se od 10^{-8} až více než 10^{-5} mol/l (4,5). Hlavním plazmatickým folátem je 5-methyltetrahydrofolát (MTHF, struktura viz obr. 1a, funkce v metabolismu viz obr. 2 a obr. 3), který vzniká redukcí a methylací folátů z potravy v buňkách střevní sliznice (8). V plazmě se vyskytuje v nanomolární koncentraci, tedy v koncentraci nižší než jsou dosahované koncentrace intracelulární.

Transport folátů

V transportu folátů, stejně tak jako v transportu folátových antagonistů (antifolátů), přes buněčnou membránu hrají roli dva odlišné systémy (10,11). Prvním systémem je vysoko-

Obr. 1. Strukturní vzorce přirozené plasmatické formy 5-methyltetrahydrofolátu (a), jeho intracelulární polyglutamylované formy (b) – znázorněn 5-MTHF-heptaglutamát, methotrexatu (c), raltitrexedu (d) a pemetrexedu (e).



zomu 9 kóduje dva proteiny, jež mají oba syntázovou aktivitu a které zprostředkovávají vazbu gama-karboxylu jednoho glutamátu a alfa-aminokupiny další molekuly glutamátu. Tato reakce je ATP-dependntní a jako substráty se při nich spotřebovávají tetrahydrofoláty i další formy folátů (19). Jsou-li foláty v buňce přítomny v podobě polyglutamátů, nestávají se substrátem transportních systémů a je tak omezen jejich únik z mitochondrií do cytoplazmy. Byly již popsány buněčné linie, které mají defektní syntézu polyglutamátů; v analogii s tímto se předpokládá defektní polyglutamylace methotrexatu a z ní vyplývající rezistence na methotrexat např. u buněčných linií karcinomu prsu. Plasmatické foláty, zejména MTHF, jak bylo již zmíněno výše, se v plazmě nacházejí ve formě monoglutamátů.

Metabolické cesty folátů, jejich interakce s transulfuračními reakcemi a jejich klíčové enzymy

Základní procesy interkonverze folátů a jejich role při zapojení do folát-dependntních metabolických reakcí jsou znázorněny na obr. 2 – popis funkce a zkratky jsou uvedeny v legendě a jsou shodné s označením v textu. Při pohledu na diagram metabolismu je nutno si také uvědomit, že při syntéze thymidylátu je MeTHF oxidován na dihydrofolát (DHF), a tak je k jeho zpětné regeneraci nutné zapojení enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR). V případě snížené aktivity DHFR se rapidně snižuje hladina THF-kosubstrátů; tato situace vede během několika minut k zastavení THF-dependntních reakcí. Z tohoto důvodu se enzym DHFR stal cílovým místem při vývoji chemoterapeutik, jež řadíme do skupiny folátových antagonistů (6,7).

Antifoláty

Antifoláty jsou látky, jejichž obecným mechanismem účinku je ovlivnění specifického enzymu zapojeného do folátového metabolismu. Klasickým příkladem – a také mateřskou látkou celé skupiny – je methotrexat (MTX, struktura viz

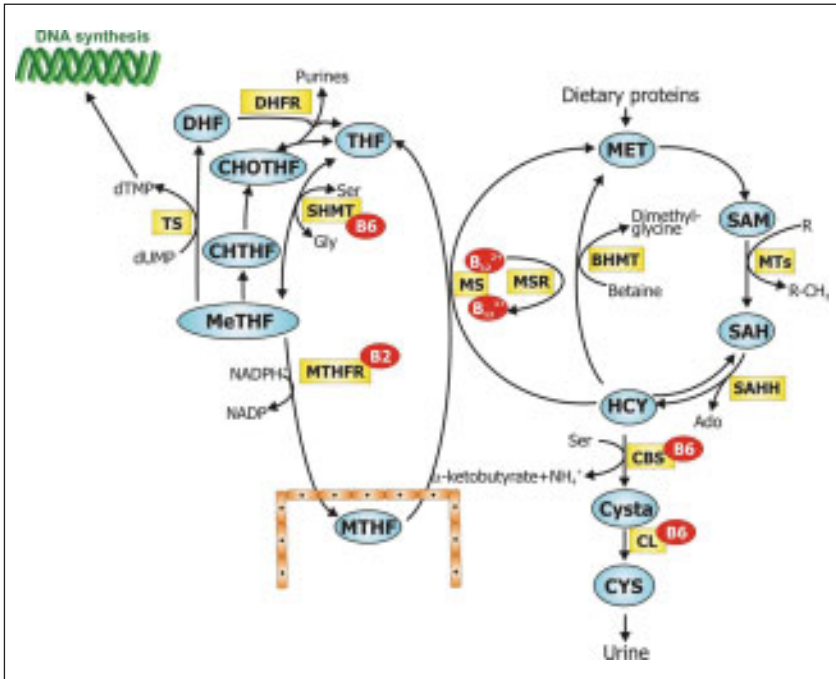
obr. 1c, jeho funkce viz obr. 3), který je silným inhibitorem enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR, ref. 21). Jsou-li v buňce přítomny vysoké koncentrace MTX, dochází k zástavě syntézy tetrahydrofolátu, jejímž důsledkem je deplece substrátů kriticky důležitých k syntéze DNA. MTX se v klinické praxi používá již přes 50 let a je součástí léčebných schémata zejména u hematologických malignit, nádorů prsu, nádorů ORL oblasti, nádorů plic, ale také řady neonkologických onemocnění, např. autoimunitních. V průběhu 80. a 90. let se stala předmětem výzkumu nová generace folátových antagonistů. Jejich společným mechanismem účinku je přímé ovlivnění dalších enzymů zapojených do metabolismu folátů, nejčastěji enzymu thymidylátsyntázy (TS) a glycinamid-ribonucleotidtransformylázy (GARFT) (2). Příkladem může být raltitrexed (Tomudex, ZD 1694), který je přímým inhibitorem enzymu TS a je již používán v klinické praxi (22). Raltitrexed (obr. 1d) je v buňce přeměněn na polyglutamát a je zde tak retinován minimálně 24 hodin, což se metabolicky projevuje protrahovanou inhibicí TS. Přípravek je indikován zejména v léčbě kolorektálních nádorů, v klinickém zkoušení se ale testuje účinnost i u jiných solidních nádorů (24). Pemetrexed (obr. 1e) je další, nově zaváděné antifolikum, které se označuje také jako MTA – multitarget antifolate, neboť je schopen kromě thymidylátsyntázy slabě inhibovat také enzym GARFT (23). Jeho kumulativním efektem je blokáda syntézy purinů a thymidy-

Folátové polyglutamáty

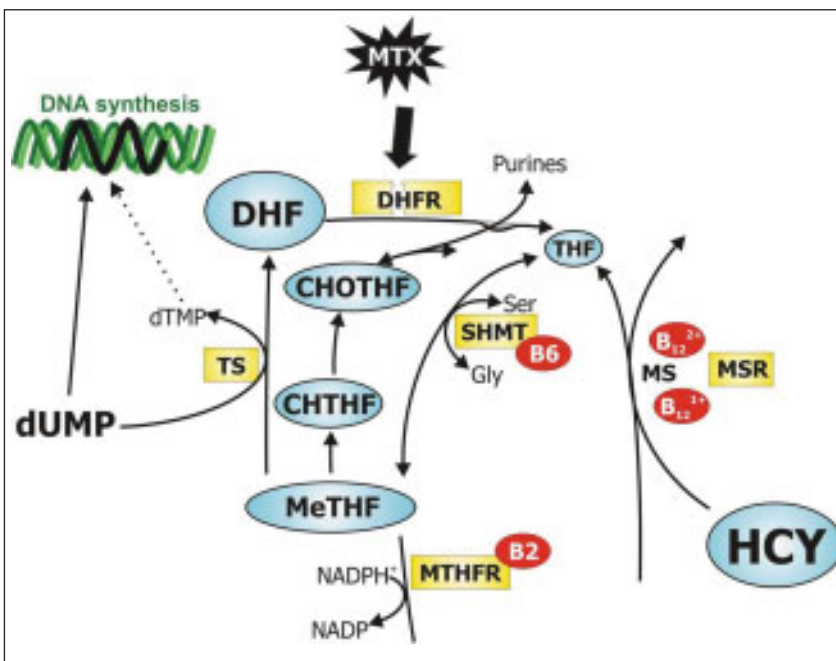
Lidské buňky vyžadují určitou kritickou koncentraci intracelulárních folátů tak, aby byla zachována aktivita folát-dependntních enzymových systémů. Tato koncentrace kolísá od hodnot 50 nmol/l v lidských fibroblastech k hodnotě kolem 1 μmol/l v lidských lymfocytech a nádorových buňkách (16). Jsou-li foláty v buňce přítomny v podobě polyglutamátů s delším řetězcem, je pro zachování veškerých kritických pochodů v buňce dostatečná mnohem nižší koncentrace folátů (3). Proces polyglutamylace je zprostředkován enzymem folylpolyglutamátsyntázou (FPGS), která je přítomna jak v cytoplazmě tak v mitochondriích (obr. 1b). Gen lokalizovaný na chromo-

kapacitní, nízkoafinitní systém přenosu redukovaných forem folátů a methotrexatu, který se označuje jako tzv. Reduced Folate Carrier (RFC, ref. 10, 11, 12, 13, 14, 15). Jeho gen byl lokalizován na 21. chromozomu a byl studován především v nádorových buňkách. Druhý systém představuje rodina membránově lokalizovaných folát-vazebných proteinů (FBP) neboli folátových receptorů (FR), jejichž gen byl identifikován na 11 chromozomu (11,16). Tyto glykoproteiny zprostředkovávají vysokoafinitní, nízkoafinitní systém přenosu exogenních folátů v nižších koncentracích. Současně byla popsána také úloha pasivního transportu, jež se uplatňuje například při transplacentárním přenosu folátů (17).

Obr. 2. Metabolické cesty a jejich klíčové enzymy: 5,10-methylentetrahydrofolát (MeTHF) poskytuje jednoruký zbytek pro syntézu deoxythymidylátu (dTMP) z deoxyuridylátu (dUMP); tato konverze je katalyzována enzymem thymidylátsyntázou (TS) a je iniciálním krokem při syntéze DNA. MeTHF může být dále redukován na MTHF za účasti methioninsyntázy (MS); tato reakce vede k B12-dependentní syntéze methioninu, nebo může být naopak oxidován na 10-formyltetrahydrofolát (CHOTHF), což je kosubstrát de novo syntézy purinů; tyto reakce jsou katalyzovány enzymy phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid ribonukleotid transformylázou (AICARFT) a glycinamid ribonucleotide transformylázou (GARFT). Spotřeba jednorukých zbytků při syntéze purinů nebo methioninu vyžaduje jejich rychlé doplnění, což je zajišťováno obnovou tetrahydrofolátového poolu, zejména pomocí enzymů formyl-THF-syntetázy a serinhydroxymethyltransferázy, jež zpětně formují 10-CHOTHF a MeTHF – tyto reakce již nejsou pro přehlednost ve schématu znázorněny. Další použité zkratky v obrázku: DHF – dihydrofolát, DHFR – dihydrofolátreduktasa, THF – tetrahydrofolát, CHTHF – methenyltetrahydrofolát, SHMT – serin-glycin hydroxymethyltransferasa, NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, MTHFR – methylenetetrahydrofolát reduktasa, B2 – riboflavinový kofaktor, B6 – pyridoxinový kofaktor, Met – methionin, BHMT – betain hydroxymethyltransferasa, MSR – MS reduktasa, B12 – kobalaminový kofaktor, SAM – S-adenosylmethionin, MTs – methyltransferasy obecně, SAH – S-adenosylhomocystein, SAHH – S-adenosylhomocystein hydrolasa, Ado – adenosine, HCY – homocystein, CBS – cystathionin-beta synthasa, Cysta – cystathionin, CL – cystathionin gama lyasa, Cys – cystein.



Obr. 3. Metabolická změna po zásahu DHFR methotrexatem; zkratky stejné jako v obr. 2 a textu.



látu (24). K dalším inhibitorům TS, které jsou zatím ve fázi klinického zkoušení, patří například látky ZD 9331 nebo AG337 (Thymitaq), k novějším zkoušeným inhibitorům enzymu dihydrofolátreduktázy patří například PT-523.

Jaké jsou možné příčiny rezistence na methotrexat a příbuzné 4-aminofoláty?

al' zvýšená exprese DHFR: Za podmínek zvýšené exprese tohoto enzymu je velmi obtížné dosáhnout takové intracelulární hladiny MTX, jež by byla dostatečná pro téměř kompletní inhibici tohoto cílového enzymu; taková situace by vyžadovala navodit velmi vysokou extracelulární koncentraci léčiva, což je v podmínkách in vivo obtížně možné (20) vzhledem k nastupující toxicitě. Zvýšená exprese cílového enzymu je v tomto případě důsledkem amplifikace genu, který byl lokalizován v lokusu DHFR chromozomu 21 (24, 25). Celý proces je spojen se zvýšením počtu genových kopií, mRNA a vlastního enzymu. Amplifikace genu byla prokázána například v tkáňových vzorcích pacientů s ALL (26) nebo s ovariálním Ca (27), kteří byli léčeni MTX a u kterých byla pozorována rezistence na podávanou léčbu. Li a spolupracovníci zmiňuje (28), že prokázána amplifikace genu pro DHFR před léčbou pacientů se sarkomy měkkých tkání je důvodem pro volbu vysokodávkované chemoterapie. Tento mechanismus možné rezistence se vysoce pravděpodobně uplatňuje nejen u MTX, ale také i u jiných antifolátů, a v neposlední řadě také u novějších skupin léčiv jako například STI-571 (29).

bl' snížená afinita DHFR k MTX: Snížená afinita DHFR k MTX byla prokázána v celé řadě zvířecích i lidských buněčných liniích a byla spojena s nižší vnitřní aktivitou léčiva, jejímž výsledkem je rezistence buněk na podávaný MTX (30). Jako možný mechanismus vzniku těchto změn ve vlastnostech DHFR byly označeny změny struktury proteinu způsobené mutacemi, což bylo také experimentálně potvrzeno (31, 32, 33). Jako podstatný se jeví fakt, že mutace ovlivňuje především vazbu enzym-inhibitor, přičemž zůstává zachována dostatečná aktivita pro DHF jako substrát, což vede právě k rezistenci na podávaný MTX nebo další 4-aminofoláty. V literatuře je popsána celá řada mutací na buněčných liniích, příkladem uveďme Phe31 → Ser mutaci v oblasti ligand-vazebného místa u MOLT-3 leukemie (34) a HTC-8R4 (human colon cancer cell lines, ref. 35) nebo Phe31 → Trp mutaci u myších leukemických buněk (36). Velmi často je mutace DHFR spojena s amplifikací genu, pravděpodobně z důvodu potře-

by buněk zachovat katalytickou aktivitu za podmínek, kdy je snížena afinita enzymu pro svůj substrát, DHF.

cl/ narušený membránový transport: Transportní mechanismy regulují influx a eflux MTX přes buněčnou membránu, přičemž hladina volného intracelulárního MTX je kritickým parametrem v interakci s cílovým enzymem. Alterace membránového transportu se tak může stát dalším možným mechanismem vzniku rezistence na podávané antifoláty. Jak již bylo zmíněno výše, v transportu folátů přes membránu se uplatňují dva základní transportní mechanismy: i) systém RFC (Reduced Folate Carrier) a systém FBP (Folate Binding Protein). Gen pro RFC byl lokalizován na 21 chromozomu (21q22.2-q.22.3). Sekundární struktura FBProteinu je charakterizována 12 transmembránovými doménami. RFC zprostředkovává vysoce senzitivní transport závislý na redukované formě folátů, přičemž jejich influx může být ovlivněn celou řadou organických i anorganických anionů (37, 38, 39, 40, 41). Při přenosu zprostředkovaném tímto typem nosiče se vytváří malý transmembránový chemický gradient, výměnou za organické fosfáty a částečně adeninové nukleotidy, jež jsou syntetizovány a akumulovány uvnitř buňky (42). Tento předpoklad byl potvrzen i tím, že v buňkách, které měly inaktivní nebo mutovaný RFC, byly naměřeny nejvyšší intracelulární koncentrace thiaminpyrofosfátu (43). Narušení transportní schopnosti RFC se tak stává dalším podstatným mechanismem, který může být zodpovědný za rezistenci na MTX nebo další antifoláty. V literatuře je uvedena řada *in vitro* i *in vivo* studií, které se zabývaly možnými vlivy na porušení transportní schopnosti RFC (44,45,46,47). Možné změny zahrnují zvýšení K_m , snížení V_{max} , popřípadě změny obou parametrů, které byly objasněny postupujícími možnostmi detekce mutací na molekulární úrovni. Řada prací se zabývá a popisuje různé typy mutací genu pro RFC, zejména těch, které ovlivňují strukturu některé z transmembránových domén v nádorových buňkách (48,49,50). Rovněž v případě folátových receptorů (tedy FBP-roteins) byla vcelku detailně popsána jejich struktura a úloha. Byly klonovány 2 humánní membránově lokalizované folátové receptory, FR- α a FR- β (51,52). Jejich gen byl identifikován na 11 chromozomu (11q13.3-3.5) (53). Membránové FBPs mají vysokou afinitu pro kyselinu listovou (FA) s rozdílnou specificitou pro různé formy redukovaných folátů. Obecně lze říci, že oba subtypy receptorů mají k redukovaným formám folátů nižší aktivitu, než je tomu v případě kyseliny folinové (54,55). Oba subtypy mají také nižší afinitu k MTX v porovnání s afinitou k nové generaci antifolátů (56). Transport folátů zprostředkovaný FBPs je obecně pomalejší, s poměrem cca 1:100, ve srovnání s transportem prostřednictvím RFC (57,58). Alterace exprese membránových receptorů (FBPs) může hrát svou roli v získané rezistenci na MTX a příbuzné antifoláty. Informace o tomto možném typu rezistence jsou relativně kusé (59,60).

dl/ Snížení syntézy thymidylátu: Aktivita DHFR je závislá na regeneraci THF cestou oxidace 5,10-methylenTHF na dihydrofolát. V případě snížené aktivity TS (jako např. v klidové G_0 fázi) je rovněž snížena potřeba aktivity DHFR a je navozen stav relativní rezistence na MTX. Opačně, v případě suprese TS například fluoropyrimidiny, nebo některými látkami z nové generace antifolátů, je blokována tvorba DHF, a tak je intracelulární pool jednonukleotidových kosubstrátů obsahujících THF chráněn před degradací, resp. konzumpcí. Celá nová generace antifolátů (ZD1694, ZD9331, pemetrexed nebo AG337) jsou, jak víme, velmi potentními inhibitory TS. Získaná rezistence na tyto antifoláty je spojena ve velké většině případů se zvýšenou expresí TS nebo méně často s mutací, která pak na úrovni enzymu ovlivňuje především vazbu vlastního léčiva. Overexprese TS je podobně jako v případě DHFR nejčastěji spojena s amplifikací genu. Jako příklad můžeme uvést prokázanou rezistenci linií MCF-7 a některých linií ovarialního

karcinomu na podávání látky ZD1694, u kterých byla potvrzena amplifikace genu pro TS (61, 62, 63).

el/ poškození polyglutamylace: Jak již bylo zmíněno dříve, i v nádorových buňkách podléhají antifoláty procesu polyglutamylace. Celý proces je katalyzován enzymem folylpolyglutamátsynthasou (FPGS), který je přítomný jak v cytosolu tak v mitochondriích. Polyglutamylace molekuly je pro efektivitu antifolátů zásadním krokem – v této formě jsou antifoláty déle retinovány uvnitř buňky, protože v této podobě nejsou substrátem pro RFC podobně jako přirozené foláty. Polyglutamylací se také zvyšuje jejich afinita k cílovým enzymům. Příkladem můžeme uvést afinitu ZD1694 nebo pemetrexedu k enzymu TS v pentaglutamátové formě, která je až 100-násobně vyšší ve srovnání s monoglutamátem (64). LY309887 je potentním inhibitorem enzymu GARFT i v monoglutamátové formě, efekt polyglutamylace je v tomto případě podstatný především pro zvýšení retence a koncentrace léčiva uvnitř buňky (65, 66). Proces polyglutamylace může být ovlivněn změnami na úrovni klíčového enzymu folylpolyglutamátsynthasy (FPGS), ať již z důvodu alterace exprese FPGS nebo mutace ovlivňující její katalytickou aktivitu. FPGS mutace byly nalezeny například v obou alelách DDATHF-rezistentních leukemických buněčných liniích L1210 (67). Tyto buněčné linie vykazovaly zkříženou rezistenci na podávání LY308887, ZD 1694 i pemetrexedu. Dalším mechanismem ovlivnění polyglutamylace může být také narušení transportu volných monoglutamátů, ať již snížením jejich influxu nebo zvýšením jejich exportu z buňky. Výsledkem těchto spřažených dějů je vždy snížení dostupnosti volných forem, což omezuje celý proces polyglutamylace.

fl/ metabolická dostupnost thymidylátu a purinů: tyto metabolické intermediáty jsou klíčovými koncovými produkty reakcí využívajících kosubstráty obsahující THF. Pokud jsou v buňce přítomny v dostatečné kvantitě, není aktivita potřebná DHFR, a tak se její suprese stává irelevantní.

Závěr

Jak je vidět, existuje celá řada více či méně složitých mechanismů, které se podílejí na udržení homeostázy v metabolismu folátů, ať již na úrovni jejich transportu, procesu polyglutamylace nebo interkonverze folátů při zapojení do folát-dependenčních metabolických reakcí. Řada těchto procesů vykazuje poměrně velkou míru inter-individuální variability a tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory. Příkladem uveďme genetický polymorfismus jednoho z klíčových enzymů, thymidylátsyntházy nebo geneticky podmíněné varianty „reduced folate carrier“ (RFC). (68). Farmakogeneticky podmíněná variabilita metabolizujících enzymů je jednou z hlavních determinant, určujících benefit terapie pro pacienta. V krajním případě se při podání standardní dávky můžeme setkat s nedostatečným efektem s následným selháním kurativního záměru onkologické léčby, v opačném případě s nepředvídatelnou excesivní toxicitou (MTX v léčbě dětských malignit). Paleta toxických příznaků, které můžeme pozorovat po např. high-dose MTX terapii může být velmi široká a v některých případech může progredovat až do život ohrožujícího stavu (69). Jedním z přístupů, které mohou v budoucnu umožnit individualizovat stávající standardní dávkovací schémata, je modifikace dávky na základě určení genotypu a fenotypu specifických drah ovlivňujících interkonverzi, aktivaci, resp. metabolismus podané látky u konkrétního pacienta (70). Instrumenty, které bude možno v budoucnu použít ke sledování efektu podané terapie, jsou biomarkery efektu podané látky (71), jejichž výzkum a potenciální aplikace jsou v současnosti ve středu pozornosti v aplikované (translational) onkologii.

Poděkování: realizováno s podporou grantu IGA MZČR NC 7104-3.

Literatura

- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF and Wolf VA. (1948). *N. Engl. J. Med.*, 238, 787 – 793
- Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate. (1978). *Cancer*, 41, 36-42.
- Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. (2003). *Oncogene*, 22, 7431-7457
- Perry MC. Toxicity of chemotherapy. (1992). Baltimore:Williams and Wilkins
- Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds). (2001). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th edition. New York, McGraw-Hill, 3898.
- White JC and Goldman ID. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12, 711-719
- Seither RL, Trent DF, Mikulleczy DC, Rape TJ and Goldman ID. (1989). *J. Biol. Chem.*, 264, 17016-17023
- Zhao R and Goldman ID. (2003). *Oncogene*, 22, 7431-7457
- Rosenblatt DS: Inherited disorders of folate transport and metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). (1995). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, p.3111
- Antony AC. (1996). Folate receptors. *Annu Rev Nutr.*, 16, 501
- Williams FMR, Flintoff WF. Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. (1995). *J Biol Chem.*, 270, 2987
- Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixion KH, Anzick SL, Meltzer JA, Cowan KH: Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. (1995). *Cancer Res.*, 55, 3790.
- Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNA that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective chinese hamster ovary cells. (1995). *J Biol Chem.*, 270(29), 17468.
- Tolner B, Roy K, Sirotnak FM. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. (1998). *Gene*, 211, 331.
- Wang H, Ross JF, Ratnam M. Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type (γ/γ). (1998). *Nucleic acids Res.*, 26, 2132
- Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyl-THF by the perfused human placental cotyledon. Evidence for a concentrative role by placental folate receptor in fetal folate delivery. (1995). *J Lab Clin Med.*, 126, 184.
- Watkins D, Cooper BA. A critical intracellular concentration of fully reduced non-methylated folate polyglutamates prevents macrocytosis and diminished growth rate of human cell line K562 in culture. (1983). *Biochem J.*, 214, 465.
- Mackenzie RE. Summary. Pteroylpolylglutamate metabolism, chemistry and biology of pteridines, in Coper BA, Whitehead VM (eds). (1986). *Pteridines and folic acid derivatives*. Berlin, de Gruyter, p.767.
- Jackson RC and Harrap KR. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 827-841
- Goldman ID, Metherly LH. The cellular Pharmacology of methotrexate. (1985). *Pharmacol Ther.*, 28, 77-81
- Jackman AL, Kimbell R, Aherne GW, Brunton L, Jansen G, Stephens TC, Smith MN, Wardleworth JM and Boyle FT. (1997). *Clin Cancer Res.*, 3, 911 – 921
- Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, Shackelford KA, Mendelsohn LG, Soose DJ, Patel VF, Andis SL, Bewley JR, Rayl FA, Moroson BA, Beardsley GP, Kohler W, Ratnam M and Schultz RM. (1997). *Cancer Res.*, 57, 1116-1123
- Klener P. Klinická onkologie, Galén (2002), 163-167
- Dolnick BJ, Berenson RJ, Bertino JR, Kaufman RJ, Nunberg JH and Schimke RT. (1979). *J Cell Biol.*, 83,394-402
- Mini E, Srimatkandada S, Medina WD, Moroson BA, Carman MD and Bertino JR. (1985). *Cancer Res.*, 45, 317-324
- Horns Jr RC, Dower WJ and Schimke RT. (1984). *J Clin Oncol.*, 2, 2-7
- Trent JM, Buick RN, Olson S, Horns Jr RC and Schimke RT. (1984). *J Clin Oncol.*, 2, 8-15
- Li W-W, Lin JT, Schweitzer BI, Tong WP, Niedzwiecki D and Bertino JR. (1992a). *Cancer Res.*, 52, 3908-3913
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN and Sawyers CL. (2001). *Science*, 293, 876-880
- Jackson RC, Hart LI and Harrap KR. (1976). *Cancer Res.*, 36, 1991-1997
- Albrecht Am, Biedler JL and Hutchison DJ. (1972). *Cancer Res.*, 32, 1539-1546
- Flintoff Wf, Davidson SV and Siminovitch L. (1976). *Somatic Cell Genet.*, 2, 245-261
- Goldie JH, Krystal G, Hartley D, Gudauskas G and Dedhar S. (1980). *Eur J Cancer*, 16, 1539-1546
- Miyachi H, Takemura Y, Kobayashi H and Ando Y. (1995). *Cancer Lett.*, 88, 93-99
- Srimatkandada S, Schweitzer BI, Moroson BA, Dube S and Bertino JR. (1989). *J Biol Chem.*, 264, 3524-3528
- McIvor RS and Simonsen CC. (1990). *Nucleic acids Res.*, 18, 7025-7032
- Goldman ID. (1971). *Ann NY Acad Sci.*, 186, 400-422
- Henderson GB and Zevely EM. (1981). *Biochem Biophys Res Commun.*, 99, 163-169
- Henderson GB and Zevely EM. (1982a). *Biochem Int.*, 4, 493-502
- Henderson GB and Zevely EM. (1982b). *Biochem Biophys Res Commun.*, 104, 474-482
- Henderson GB and Zevely EM. (1983). *Arch Biochem Biophys.*, 221, 438-446
- Yang C-H, Sirotnak FM and Dembo M. (1984). *J Membr Boil.*, 79, 85-292
- Yang C-H, Sirotnak FM and Dembo M. (1984). *J Membr Biol.*, 79, 285-292
- Sirotnak FM, Kurita S and Hutchinson DJ. (1968). *Cancer Res.*, 28, 75-90
- Neithammer D and Jackson RS. (1975). *Eur J Cancer*, 11, 845-854 1975
- Hill BT, Builey BD, White JC nad Goldman ID. (1979). *Cancer Res.*, 39, 2440-2446
- Sirotnak FM, Moccio Dm, Kelleher LE and Goutas LJ. (1981b). *Cancer Res.*, 41, 4447-4452
- Jansen G, Mauritz R, Drori S, Sprecher H, Kathman I, Bunni M, Priest DG, Noordhuis P, Schornagel JH, Pinedo HM, Peters GJ and Assaraf YG. (1998). *J Biol Chem.*, 273, 30189-30198
- Drori S, Jansen G, Mauritz R, Peters GJ and Assaraf YG. (2000). *J Biol Chem.*, 275, 30855-30863
- Zhao R, Assaraf YG and Goldman ID. (198a). *J Biol Chem.*, 373, 19065-19071
- Ratnam M, Marquardt H, Duhring JL and Freisheim JH. (1989). *Biochemistry*, 28, 8249-8254
- Sadasivan E and Rothenberg SP. (1989). *J Biol Chem.*, 264, 5806-5811
- Ragoussis J, Senger G, Trowsdale J and Campbell IG. (1992). *Genomics*, 14, 423-430
- Wang X, Shen F, Freisheim JH, Gentry LE and Ratnam M. (1992). *Biochem Pharmacol.*, 44, 1898-1901
- Brigle KE, Spinella MJ, Westin EH and Goldman ID. (1994). *Biochem Pharmacol.*, 47, 337-345
- Westerhof GR, Schornagel JH, Kathmann I, Jackman AL, Rosowsky A, Forsch RA, Hynes JB, Boyle FT, Peters GJ, Pinedo HM and Jansen G. (1995). *Mol Pharmacol.*, 48, 459-471
- Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE and Goldman ID. (1995). *J Biol Chem.*, 270, 7842-7849
- Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ and Goldman ID. (1997). *Biochem Pharmacol.*, 53, 223-231
- Saikawa Y, Knight CB, Saikawa T, Page ST, Chabner BA and Elwood PC. (1993). *Biol Chem.*, 268, 5293-5301
- Hsueh C-T and Dolnick BJ. (1994). *Biochem Pharmacol.*, 47, 1019-1027
- O'Connor BM, Jackman AL, Crossley PH, Freemantle SJ, Lunec J and Calvert AH. (1992). *Cancer Res.*, 52, 1137-1143
- Freemantle SJ, Jackman AL, Kelland LR, Calvert Ah and Lunec J. (1995). *Br J Cancer.* 71, 925-930
- Kitchens ME, Forshoefel AM, Barbour KW, Spencer HT and Berger FG. (1999a). *Mol Pharmacol.*, 56, 1063-1070
- Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, Shackelford KA, Mendelsohn LG, Soose DJ, Patel VF, Andis SL, Bewley JR, Rayl EA, Moroson BA, Beardsley GP, Kohler W, Ratnam M and Schultz RM. (1997). *Cancer Res.*, 57, 1116-1123
- Sanghani SP and Moran RG. (1997). *Biochemistry*, 36, 10506-10516
- Zhao R, Gao F and Goldman ID. (2001). *Biochem Pharmacol.*, 61, 857-865
- Zhao R, Titus S, Gao F, Moran RG and Goldman ID. (2000e). *J Biol Chem.*, 275, 26599-26606
- Ulrich CM, Robien K and McLeod HL. (2003). *Nature*, 3, 912-920
- Valik D, Zapletal O, Demlová R. (2002). *Klinická onkologie*, 6, 230-233.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH, Crom WR, Boyett JM, Pui CHH. (1998). *N Engl J Med.*, 338, 499-505.
- TDM Renaissance and Pharmacogenomic Forum III: Managing the Future. American Association of Clinical Chemistry, Baltimore 2004