

MECHANISMY MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU PRAXI

II. ATYPICKÁ MDR

MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE AND THEIR CLINICAL IMPLICATIONS

II. ATYPICAL MDR

NOSKOVÁ V.¹, *HAJDÚCH M.¹, MIHÁL V.¹, CWIERTKA K.²

¹LABORÁTOR EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLMOUC

²ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

Souhrn: Článek se podrobně zabývá třemi proteiny, které způsobují atypickou lékovou rezistenci (atMDR) v nádorových buňkách. Multidrug resistance protein (MRP) je ATP-dependentní membránová pumpa patříci stejně jako P-glykoprotein (Pgp) do rodiny ABC-transportních proteinů. Lung resistance protein (LRP) je hlavní komponenta ribonukleoproteinových částic vaults, které jsou schopné transponovat toxické látky z jádra neoplastických buněk do lyzozómů. Zvýšená aktivita detoxifikačního enzymu glutathion-S-transferázy (GST-p) a následně zvýšená koncentrace redukováného glutathionu (GSH) chrání buňku především před působením volných radikálů. Jsou uvedeny základní charakteristiky každého z výše jmenovaných proteinů (jejich struktura, funkce, přirozený výskyt v lidských tkáních) a studie zabývající se významností exprese každého z nich pro klinickou MDR.

Klíčová slova: mnohočetná léková rezistence, atypická mnohočetná léková rezistence, multidrug resistance protein, MRP, lung resistance protein, LRP, glutathion-S-transferáza (GST-p), glutathion, GSH, ABC transportní proteiny, chemoterapie

Summary: This paper deals with three proteins known to associate with atypical multidrug resistance (atMDR) of tumor cells. Multidrug resistance protein (MRP) works as an ATP-dependent membrane „pump” and belongs, together with P-glycoprotein (Pgp), to a superfamily of ABC-transport proteins. Lung resistance protein (LRP) is a major component of organelles called „vaults”. Vaults are able to transport toxic agents from the nuclei of neoplastic cells to lysosomes. Additionally increased activity of glutathion-S-transferase enzyme (GST-p) followed by increased concentration of reduced form of glutathion (GSH) protects tumor cells from oxidative damage. Basic characteristics of MRP, LRP and GST-p are given including their structures, functions and expressions in normal/malignant human tissues. Studies focused on the significance of mentioned proteins for clinical MDR are reported as well.

Keywords: multidrug resistance, atypical multidrug resistance, multidrug resistance protein, lung resistance protein, glutathion-S-transferase, glutathion, ABC-transport proteins, chemotherapy

Předkládaná část přehledového článku o mnohočetné lékové rezistenci je věnována atypické MDR, zejména proteinům MRP, LRP a GST- π . Ke každému mechanismu je podán výklad jeho funkce a příklady využití v klinické praxi.

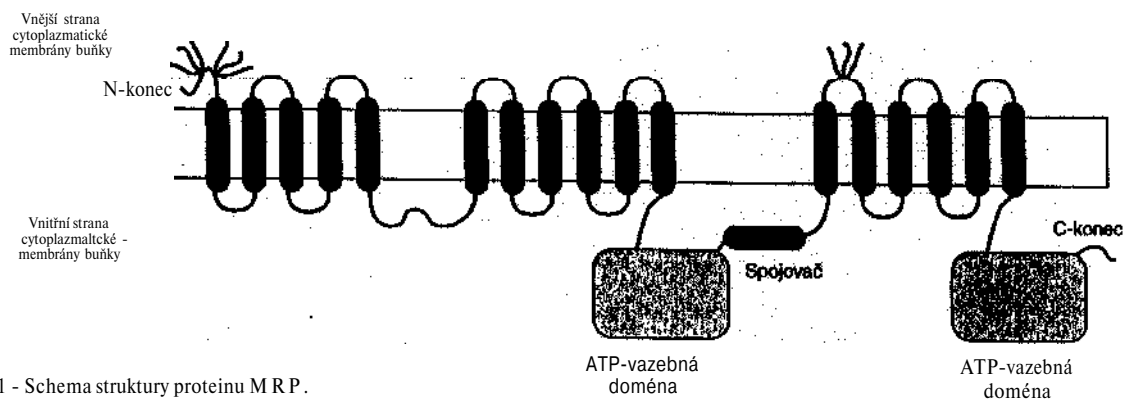
1.1) Multidrug resistance protein (MRP)

V roce 1992 Cole et al.⁽³⁵⁾ objevili na buněčné linii lidského malobuněčného karcinomu plic H69 rezistentní na adriamycin gen kódující další z ABC transportních bílkovin a pojmenovali ho MRP (multidrug resistance associated protein). Po detailnějším prozkoumání transfekovaných buněčných linií bylo zjištěno, že: 1) snížení exprese MRP je doprovázeno obnovením chemosensitivity, 2) transfekce buněčných linií MRP cDNA vedoucí k nadměrné expresi MRP prokazatelně zvyšuje rezistenci transfektantů vůči antracyklinům, vinkristinu a etoposidu⁽⁶⁴⁾, 3) MRP je exprimován, stejně jako Pgp, na cytoplazmatické membráně⁽¹⁸⁷⁾ a na membránách endoplazmatického retikula, 4) v buňce plní funkci jednosměrné ATP-dependentní membránové pumpy pro glutathion-S-konjugáty⁽¹²²⁾.

Bylo identifikováno 6 multidrug resistance proteinů (MRP 1-6), z nichž pouze protein MRP1 má význam pro navození lékové rezistence⁽⁶⁾. MRP protein se skládá z 1531 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 190 kDa⁽¹⁰⁶⁾. Hybridizací *in situ* bylo zjištěno, že MRP gen je lokalizován na 16. chromozómu v oblas-

ti p13.1⁽³⁵⁾. V MDR rezistentních buněčných liniích nadměrně exprimujících MRP bývá gen rovněž amplifikován⁽⁴⁸⁾.

Zcela překvapivě je MRP spíše vzdálený příbuzný genu mdrl a je více podobný CFTR genu. Největší sekvenční homologie mezi MRP a Pgp byla nalezena v oblasti ATP vazebných domén, které jsou také v rámci celé nadrodiny nejvíce evolučně konzervovány. Avšak terciární struktura obou proteinů je rozdílná. Topologický model MRP znázorňuje obr. 1. Na N-konci molekuly je membránová doména složená z 5 transmembránových segmentů (a-helixů), následují 2 homologní části každá složená z 6 transmembránových segmentů (a-helixů) a ABC domény^(106,173). Má se za to, že obě homologní části proteinu se v průběhu evoluce vyvinuly ze společného genového předka kódujícího ABC-transportní proteiny. V případě MRP podskupiny zřůzňoval tento gen s jiným genem/geny kódujícím jiný membránový protein, čímž se k oběma homologním polovinám připojilo 5 transmembránových domén na N-konci molekuly. N-konec MRP proteinu je umístěn extracelulárně, což je velmi atypická topologie pro nadrodinu ABC transportních proteinů. Avšak současná data naznačují, že právě extracelulárně umístěný N-konec může být charakteristickým znakem MRP podskupiny⁽⁷³⁾. Obě poloviny molekuly MRP jsou glykosylovány. Čerstvě nasyntetizovanému 170 kDa velkému MRP polypeptidu trvá zhruba 90 minut než se glykosyluje na svoji 190 kDa formu. Glykosylovány



Obr. 1 - Schema struktury proteinu MRP.

protein má poločas rozpadu 20 hodin, což je pro membránové proteiny typické⁽⁶⁸⁾. Ma et al.⁽¹¹¹⁾ rovněž prokázali *in vivo* fosforylacii MRP několika různými kinázami především na setinových zbytcích. Dalším rozdílem, kterým se MRP liší od Pgp, je velmi nízká transportní specifická pro paklitaxel a kolchicin přesto, že obě zmíněná Protinádorová léčiva náleží mezi nejlepší „substráty“ pro Pgp⁽³⁶⁾. Na druhé straně MRP způsobuje rovněž sníženou akumulaci léčiva v buňce a jeho zvýšený export mimo buňku⁽¹¹⁶⁾. MRP transportuje široké spektrum hydrofobních, záporně nabitých substrátů, ačkoliv jeho afinita k cysteinu 1 leukotrienu (LTC₄) je ze všech zkoušených substrátů nejvyšší⁽¹⁰³⁾. LTC₄ je syntetizován z leukotrienu A₄ poté, co je leukotrien A₄ konjugován s GSH. Samotný leukotrien C₄ se podílí na kontrole kontrakce hladkých svalů a na vaskulární permeabilitě. Fyziologická funkce MRP jako přenašeče leukotrienu C₄ v leukocytech syntetizujících leukotrieny dává vznik dohadu, že inhibitory MRP by mohly hrát úlohu v regulaci zánětlivých procesů⁽¹⁸⁴⁾. LTC₄ je tedy konjugát glutathionu. Bylo prokázáno, že MRP může transportovat široké spektrum látek patřících do skupiny glutathione konjugátů, od samotné oxidované formy glutathionu přes kyselinu ethakrynovou, záporně nabitě sulfáty, glukuronidy a některé žlučové soli až po aktivovaný aflatoxin B₁⁽¹⁰⁷⁾. Ukazuje se, že spektrum substrátů přenášených MRP se velmi shoduje s přenašečem MOAT (či MRP2) nacházejícím se mimo jiné v tkáni intrahepatálních žlučodův⁽¹¹⁵⁾ a v cytoplasmatické membráně žírných buněk⁽¹⁰⁴⁾. Předpokládá se, že MRP je alespoň částečně zodpovědný za MOAT aktivitu v buňkách mimo intrahepatální žlučodovy⁽⁹²⁾.

Důkaz, zda se MRP podílí v buňce i na regulaci iontových kanálů, nebyl ještě podán. Nicméně u H69/ADR buněk exprimujících MRP byla pozorována zvýšená aktivita Cl⁻ a K⁺ kanálů⁽⁸³⁾. Navíc, stejně jako Pgp, obsahuje struktura MRP „spojovač“, který je fosforylován několika Ser/Thr proteinkinázami (např. proteinkináza C). Uvedený fakt rovněž podporuje domněnku o možné regulační roli tohoto proteinu v iontovém transportu⁽¹¹¹⁾.

K inhibici rezistence asociované s MRP bylo použito stejných chemosenzitorů jako pro Pgp (verapamil, trifluoperazine, PSC 833), avšak s minimální efektivitou⁽⁸⁾. Schopnost buněk exprimujících MRP transportovat LTC₄ vedlo k návrhu, že sloučeniny ovlivňující množství redukováného glutathionu v buňce (GSH) by mohly modulovat MRP asociovanou rezistenci. Skutečně se ukázalo, že při fyziologické koncentraci GSH v buňce se zvyšuje schopnost vinca alkaloidů inhibovat transport LTC₄ do buněk nadměrně exprimujících MRP⁽¹⁰³⁾. U MDR buněčných linií nadměrně exprimujících MRP vedlo snížení GSH ke zvýšení vnímavosti na některá léčiva včetně vinkristinu, VP-16 a doxorubicinu⁽¹¹²⁾. Buthionin sulfoximid (BSO) je irreversibilním inhibitorem γ-glutamyl-cystein syntetázy (γ-GCS), což je limitující enzym biosyntetické dráhy GSH. Nicméně studie zabývající se touto problematikou došly k rozporuplným závěrům^(34,180). Teprve Kuo et al.⁽³⁷⁾ objasnili asociaci mezi GSH syntézou a MRP expresí. Pozoroval totiž současně nadměrnou expresi proteinů MRP a γ-GCS ve vybraných vzorcích normální tkáně, rezistentních nádorových buněk i buněk, které ještě nepřišly do styku s protinádorovými léčivy. Autoři dokázali, že zvýšená aktivita enzymu γ-GCS je tedy potřebná pro syntézu dostatečného množství GSH, a tedy pro transport běžící přes MRP molekulu.

MRP bylo detekováno v tkáních i buněk pomocí monoklonálních protilátek a cDNA prob. Přirozený výskyt MRP byl pozorován v epitelálních buňkách bronchů, plic, trávicího traktu, močového měchýře, kůže nadledvinek, varlat, v tkáni kosterního a srdečního svalu. Rovněž makrofágy, stromální buňky různých orgánů a hemopoetické buňky byly pozitivní na MRP⁽³²⁾. Vzhledem k přirozenému výskytu MRP v mnoha epitelích se usuzuje, že stejně jako Pgp hraje MRP důležitou úlohu při ochraně buňky před toxiny zevního prostředí. Expres MRP v nádorech různého histogenetického původu je uvedena v Tab. 1.

Jednoznačná asociace MDR s expresí různých genů byla zatím jednoznačně *in vivo* prokázána pouze u Pgp a MRP v modelech knock-out myši. Tato zvířata s delecí obou alel MRP genu bezpečně přežívaly a autoři uzavírají, že jakékoliv potencionální inhibitory MRP mohou být bezpečně použity v léčbě nádorových onemocnění lidí⁽¹³⁴⁾. Hladiny sérových enzymů, proteinů, elektrolytů a dalších biochemických či hematologických parametrů se v modelu s úplným knockoutem MRP nijak nelišily od kontrol. Myši a lidské MRP proteiny sdílejí 88% sekvenční identitu

Tab.1: Lidské nádory exprimující MRP

Hematologické malignity	MRP exprese	Solidní tumory	MRP exprese
Akutní myeloidní leukémie	+/-	NSCLC	+/-
Akutní lymfoblastická leukémie	+/-	Spinocel. ca plic málo/dobře diferencovaný	-/+
Chronická lymfocytární leukémie	+	Ca štítné žlázy	+
Chronická B-lymfocytární leukémie	+	Neuroblastom	+
Trichocelulární leukémie	+/-	Spinocel ca jícnu	+/-
Chronická myelocytární leukémie	-	Sarkomy měkkých tkání	-
Mnohočetný myelom	-	Ca prsu, ledvin, ovaria, střeva	-
Non-Hodgkinský lymfom	-	Melanom, ca prostaty, moč. měchýře, varlat	-

a u obou byla prokázána indukce MDR fenotypu po transfekci jejich cDNA do přirozeně senzitivních buněk⁽¹⁶²⁾. V MRP knock-out buňkách (mrp^{-/-}) byla zjištěna hypersenzitivita kmenových embryonálních buněk *in vitro* na množství přírodních toxinů včetně epipodofylotoxinů, vinkristinu, doxorubicinu a daunorubicinu. Knockoutované myši byly *in vivo* 2krát více vnímavější na vepesid⁽¹⁰⁹⁾. Delece jedné alely (mrp^{-/-}) měla za následek kvantitativní zvýšení vnímavosti oproti mrp^{+/-} buňkám⁽¹⁰⁸⁾. V erytrocytech myši s knockoutem v MRP genu byla pozorována ztráta funkce vysoko afinitní S-glutathionové pumpy. Rovněž mastocyty těchto myši vykazovaly částečný defekt v sekreci leukotrienu C₄⁽¹⁸⁴⁾. Autoři se na tomto myším modelu rovněž pokusili o objasnění vztahu mezi MRP a GSH. V embryonálních kmenových buňkách mrp^{-/-} snížili hladinu GSH na 10% fyziologické koncentrace. Buňky kultivovali v médiu s radioaktivně značeným vepesidem. Zjistili, že intracelulární koncentrace vepesidu v těchto buňkách se zdvojnásobila. Zatímco v embryonálních kmenových buňkách mrp^{-/-} nemělo snížení hladiny GSH žádný vliv na intracelulární koncentraci vepesidu⁽¹³³⁾. V souladu s tímto pozorováním je jiný *in vivo* experiment popisující u MDR rezistentních tumorů nadměrně exprimujících MRP zvýšenou terapeutickou účinností doxorubicinu poté, co byla s pomocí BSO snížena hladina intracelulárního GSH⁽¹⁷⁸⁾. V roce 1997 se Taguchimu et al. (165) podařilo prokázat přímou interakci mezi MRP a GSH dokazující, že MRP je fyziologickým kotransportérem GSH a protinádorových léčiv.

Molekula MRP je tedy ATP-dependentní membránová pumpa exporující z buňky glutathion-S konjugáty v nemodifikované formě i ve formě solí⁽⁴⁾.

2) Výskyt MRP v lidských nádorech

MRP je často exprimován v anaplastických karcinomech štítné žlázy⁽¹⁶⁴⁾, u různých forem akutních a chronických leukémií⁽²⁴⁾. Zajímavou výjimkou jsou některé případy AM L subtypu M4Eo u nichž došlo k inverzi na 16. chromozomu. Tato inverze je považována za dobrý prognostický znak. MRP gen je lokalizován blízko bodu zlomu a v důsledku chromozomální inverze dochází k jeho delecí. V předběžné studii byla tato delece asociována se 4-5krát delším disease free survival obdobím, které následovalo po iniciální terapii⁽⁹⁹⁾.

Zvýšené množství MRP je jednoznačně negativním prognostickým faktorem u dětského neuroblastomu⁽²¹⁾. Tato studie prokázala i signifikantní korelaci mezi MRP expresí v primárním nádoru a amplifikací N-myc onkogenu, nejsilnějšího negativního prognostického faktoru u těchto pacientů⁽¹²⁶⁾.

Už v roce 1995 byly popsány na buněčných liniích případy jež nadměrně exprimovaly jak Pgp tak MRP proteiny^(23,69). Chan et al.⁽¹²⁸⁾ dokumentoval tentýž jev na primárních nádorových buňkách retinoblastomu, které neodpovídaly na chemoterapii. Dokonce exprese jednoho z výše jmenovaných MDR proteinů před zahájením léčby korelovala s neodpovědí na léčbu, zatímco nepřítomnost obou proteinů korelovala s dlouhodobým přežitím.

Snad nejčastěji byla nadměrná exprese MRP studována u nemalobuněčných karcinomů plic, zvláště u adeno- a spinocelulárních histologických typů⁽¹²⁴⁾. Častěji bývají MRP pozitivní dobře diferencované nádory. Studie prokázaly negativní korelaci mezi nadměrnou expresí MRP a klinickou odpovědí na chemoterapii⁽¹²⁸⁾. U malobuněčných karcinomů plic je však pozitivita MRP podstatně vzácnější⁽⁴⁰⁾.

Přibližně 30% žen s uziňovně negativním karcinomem prsu relabuje. Nooter et al.⁽¹²⁵⁾ zjišťovali frekvenci a intenzitu MRP exprese pomocí monoklonální protilátky u 259 vzorků invazivního karcinomu prsu. V tomto souboru bylo 34% vzorků pozitivních na MRP. Po rozdělení pacientů do skupin podle věku, velikosti nádoru, množství estrogenových a progesteronových receptorů či stupně zasažení lymfatických uzlin se objevila asociace MRP se špatnou odpovědí na léčbu především u pacientů s malými nádory, u uziňovně negativních pacientek a u žen s pozitivním uziňovým nálezem, kterým byla podána adjuvantní chemoterapie v režimu CMF (cyklofosamid, metotrexát, 5-fluorouracil). Riziko relapsu bylo u pacientů exprimujících MRP statisticky významně vyšší. Rovněž dlouhodobé přežití bylo u MRP exprimujících nemocných kratší. Přítomnost MRP v nádorových buňkách může být tedy nepříznivým znakem u skupiny pacientů s lepší prognózou v rámci TNM klasifikace. Expres MRP se zdá být v případě karcinomu prsu známkou nenormálního chování buňky, agresivnějšího fenotypu a lékové rezistence.

II. 1) Lung resistance-related protein (LRP)

Na začátku 90. let byla MDR asociována zejména s Pgp a MRP. Avšak přibývalo stále více důkazů jak z *in vitro*, tak z klinických studií o tom, že na MDR fenoménu se podílí ještě další mechanismy. Scheper et al.⁽¹⁴⁸⁾ popsali nový protein ze skupiny transportních proteinů uplatňujících se v navození MDR a pojmenovali ho lung resistance protein (LRP), protože byl poprvé identifikován na buněčné linii plicního karcinomu. Tento protein má molekulovou hmotnost 110 kDa. Z výsledků komparativní sekvenční analýzy bylo jasné, že nově objevený LRP má 87,7% identitu s krysím major vault proteinem^(93,147). Nově objevený protein byl tedy identifikován jako lidský major vault protein a tedy jako nejpočetněji zastoupená složka v posledních objevených subcelulárních organelách pojmenovaných „vaults“.

Vaults byly poprvé pozorovány v roce 1986⁽⁸⁷⁾ a následně byly izolovány z mnoha organismů od nižších eukaryot po savce. V souladu s přirozenou distribucí LRP v organismu se vaults vyskytují nejčastěji v epitelálních buňkách, makrofázích... atd. I když je jejich skladba a struktura poměrně komplexní, jsou tyto organely vysoce konzervovány i mezi fylogeneticky nepříbuznými druhy. Jejich funkce je tedy pravděpodobně nezbytná pro všechny eukaryotické buňky⁽⁸⁸⁾.

Vaults jsou ribonukleoproteinové částice skládající se u krys z následujících 3 složek: 1) z major vault proteinu (molekulová hmotnost 104 kDa), který tvoří více než 70% této organely, 2) ze tří typů minor proteinů jejichž molekulová hmotnost je 210,192

a 54 kDa, 3) z malých molekul RNA. Uspořádání jednotlivých složek organel vaults je znázorněno na Obr. 2. Celá organela má molekulovou hmotnost 13 MDa, rozměry 35x65 nm a jde o největší známou ribonukleoproteinovou částici (3krát větší než ribozom). Vaults jsou přítomny v cytoplazmě buňky a buňky jich obsahují řádově tisíce. Na základě strukturálních studií a na základě přítomnosti vaults na jaderné membráně a v jaderných pórech se domníváme, že organely vaults se podílí na nukleocytoplazmatickém transportu širokého spektra substrátů⁽¹⁴²⁾. Zdá se, že tyto organely mohou transponovat toxické látky z jádra neoplastických buněk do lysosomů. U buněk nadměrně exprimujících LRP byla skutečně pozorována snížená schopnost akumulovat daunorubicin v jádře⁽¹⁵⁰⁾. K získání MDR fenotypu je potřebná s největší pravděpodobností celá funkční organela vault⁽¹⁴⁷⁾, což je i důvodem proč buněčné linie transfekované LRP genem nevykazovaly žádnou lékovou rezistenci.

Izquierdo et al.⁽⁷⁹⁾ testovali expresi LRP u 61 nádorových buněčných linií různého histologického původu, které nepodstoupily selekci žádným z protinádorových léčiv. LRP vyšel z této studie jako silný prediktor *in vitro* rezistence (silnější než Pgp a MRP) na léčiva podléhající MDR. Přítomnost LRP v ovšem asociovala i s rezistencí na Pgp/MRP netransportovaná léčiva, např. deriváty platiny.

LRP byl s pomocí *in situ* hybridizace lokalizován do krátkého raménka chromozómu 16^(147,158). Ve stejné oblasti jsou lokalizovány i geny pro MRP a proteinkinázu C-b (PKC). Ačkoliv nadměrná exprese LRP jde často ruku v ruce se zvýšenou expresí MRP, jsou oba geny regulovány nezávisle na sobě a nepatří do stejného amplikonu^(78,80). Na druhé straně většina Pgp-pozitivních MDR buněčných linií neexprimuje současně LRP⁽¹⁴⁸⁾. LRP protein je přirozeně exprimován v tkáních vystavených toxickým vlivům (trávicí trakt, keratinocyty, bronchy), v metabolicky aktivních tkáních (kůra nadledvinek), v makrofázích⁽⁸¹⁾. Jeho přirozená distribuce je tedy podobná distribuci Pgp a MRP. Nádory vycházející z tkání přirozeně exprimujících LRP bývají rovněž LRP pozitivní. Z testovaných 27 rozdílných druhů nádorových onemocnění exprimovalo 63% vzorků LRP.

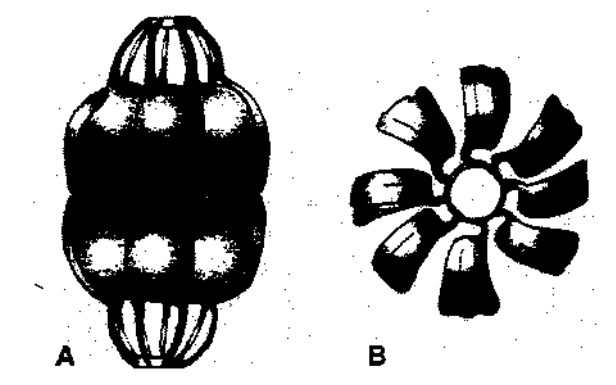
2) Výskyt LRP proteinu v lidských nádorech

Nadměrná exprese LRP byla zjištěna u dospělých pacientů trpících akutní myeloidní leukémií a u pacientek s ovarialním karcinomem. U obou diagnóz předpovídala špatnou odpověď na chemoterapii^(78,103). Na základě silné prognostické hodnoty nadměrné exprese LRP u tak rozdílných diagnóz léčených velmi rozdílnými protokoly můžeme předpokládat, že nadměrná LRP exprese je odrazem rezistence na široké spektrum protinádorových léčiv. Klíčovým zjištěním je, že negativní exprese LRP není v lidských nádorech uniformní, ale odráží vnímavost maligních buněk na léčbu. Relativně chemosenzitivní nádorová onemocnění téměř neexprimují LRP (testikulární nádory, neuroblastom, AML). Nádory tradičně špatně odpovídající na léčbu a refrakterní onemocnění bývají silně LRP pozitivní (karcinomy střeva, ledvin, pankreatu)⁽⁸¹⁾. LRP se tedy zdá být dobrým markerem klinické rezistence na léčbu. Studie zabývající se 30 případy relabující A L L zjistila, že nikoliv exprese Pgp, nýbrž LRP je statisticky signifikantně asociována s *in vitro* rezistencí čerstvých leukemických buněk na daunorubicin⁽⁷⁹⁾. LRP exprese byla rovněž spojená s kratším dlouhodobým přežitím a kratším obdobím do progresu nemoci.

III. 1) π izoenzym glutathion-S-transferázy a glutathion (GSH)

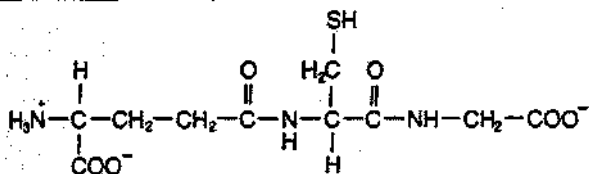
Kromě transportních proteinů se na detoxifikaci cytostatik podílí rovněž zvýšená aktivita detoxifikačních izoenzymů glutathion-S-transferáz (GST). Savčí rodina glutathion-S-transferáz obsahuje několik izoform označovaných α , π , μ a θ (théta)⁽¹⁶⁰⁾. Všechny tyto izoformy GST jsou v cytoplazmě přítomny ve formě monomerních podjednotek a katalytickou aktivitu získávají až jako homodimery. Isoformy GST jsou zodpovědné za konjugaci glutathionu (GSH) se širokým spektrem elektrofilních částic.

Glutathion je klíčovým redukčním činidlem v buňce a účastní se detoxifikace volných radikálových forem, zejména kyslíkových radikálů⁽¹³⁸⁾, podílí se na různých metabolických pochodech včetně syntézy leukotrienů. Leukotrieny jsou syntetizovány leukocyty a zprostředkovávají zánětlivé a alergické reakce. Syntézy se účastní i enzym glutathion-S-transferáza katalyzující adici thiolové skupiny glutathionu na nestálý leukotrien A_4 za vzniku prvního z peptidoleukotrienů, leukotrienů C_4 . Rovnováha mezi redu-



Obr. 2 - Struktura subcelulárních organel vaults.

A - Pohled ze strany na nerozloženou organelu, B - Pohled z vrchu na otevřenou polovinu (podobu „rozvitého květu“). Vault je souměrná, dutá organela. Každá její polovina se může otevřít do podoby „rozvitého květu“ s 8 petálními lístky obklopujícími centrální prstenec⁽⁸⁶⁾. Tato dynamická struktura má pravděpodobně funkční význam.



Obr. 3 - Struktura glutathionu (GSH)

kovanou formou glutathionu (GSH) a oxidovanou formou (GSSG) napomáhá udržovat správný oxidační stav sulfhydrylových skupin proteinů uvnitř buněk.

Glutathion je tripeptid (γ-glutamylcysteinylglycine) obsahující neobvyklou γ-amidovou vazbu (Obr.3). V buňkách je syntetizovaný *de novo* v γ-glutamyllovém cyklu. Gama-glutamyllový cyklus byl objeven Altonem a Meisterem a jde o mechanismus přenosu aminokyselin do buněk tzv. translokací. GSH je při něm syntetizován z glutamátu, cysteinu a glycinu za postupné katalýzy γ-glutamylcysteinsyntetázy (γGCS - limitujícího enzymu této syntézy) a GSH-syntetázy (Obr.4). Volnou energii pro každou z reakcí poskytuje hydrolýza ATP.

GSH má tedy ochrannou roli a patří v buňce mezi nejpočetnější zastoupené thiole nebílkovinné povahy⁽¹²⁷⁾. Ačkoliv některé radikálové formy (např. hydroxylový radikál) mohou přímo reagovat s redukovanou formou glutathionu (GSH), řada dalších je s ním konjugována pomocí záporně nabitých izoenzymů glutathion-S-transferázy (GST). Výsledkem jsou sloučeniny méně toxické, více hydrofilní a tedy snadněji z buňky vylučitelné. Jiné reaktivní molekuly tvořené v rámci oxidačně/redukčních procesů (např. peroxid vodíku) jsou redukovány druhou glutathionovou metabolickou cestou a to pomocí enzymu glutathionperoxidázy (GSH Px) za

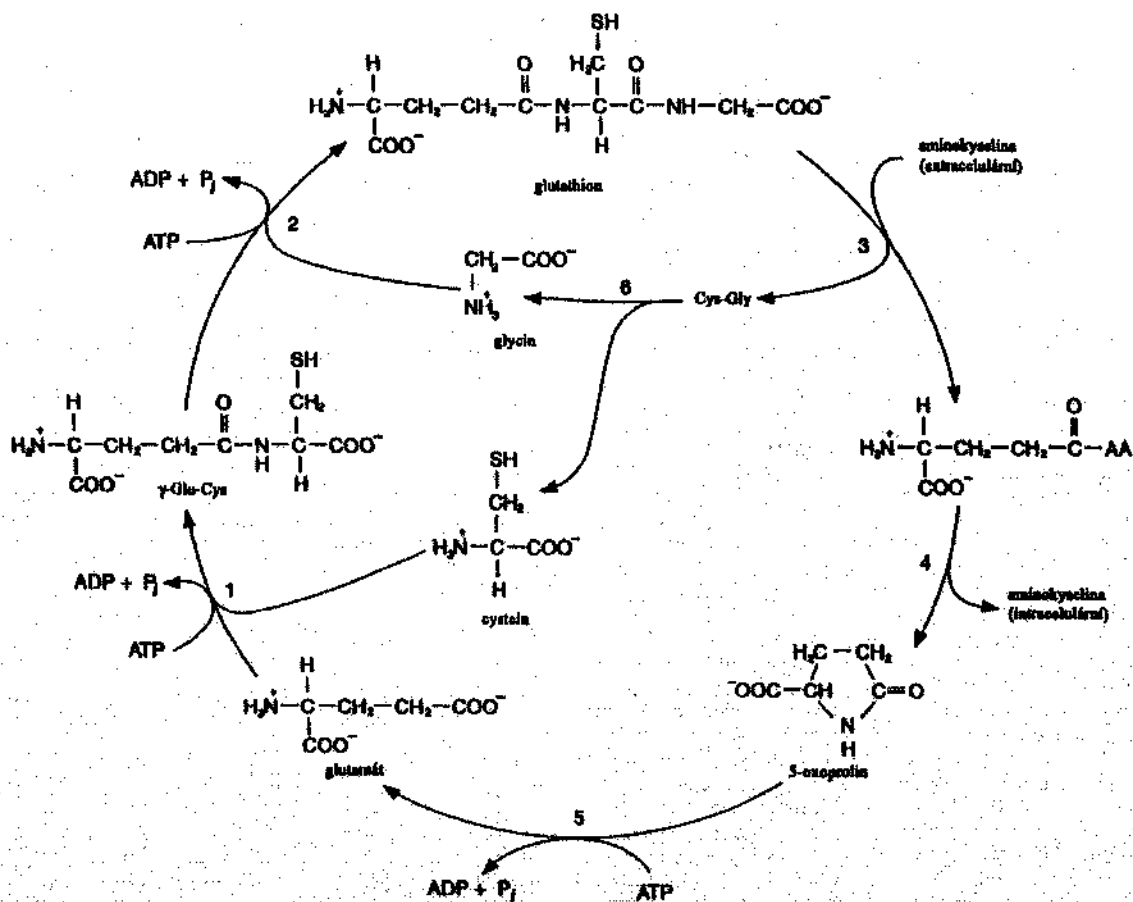
vzniku oxidované, disulfidické formy glutathionu (GSSG, GSSH). GSSG může být následně redukován na svoji monomernickou formu glutathionreduktázou (GR). Tento proces normálně poskytuje GSH a GSSG v poměru 100:1, což umožňuje GSH, aby působil jako vnitrobuněčná redukční látka.

Volné radikálové formy se tvoří v průběhu podávání alkylujících látek nebo při radioterapii. Základní vlastností většiny DNA alkylujících sloučenin je jejich elektrofilita. U některých protinádorových léčiv patřících do této skupiny bylo prokázáno, že skutečně jsou substrátem pro GST (např. chlorambucil, cyklofosamid, BCNU, thiotepa, melfalan...atd). Alkylující látky jsou redukovány buď přímo GSH nebo prostřednictvím GST v glutathionovém redoxním cyklu. Metabolický obrát glutathionu je poměrně rychlý s poločasem kolem 1 hodiny. Inhibice syntézy GSH (např. BSO) vede v krátké době k depleci buněčného GSH a k inhibici glutathionových detoxifikačních mechanismů.

Ne všechny izoformy GST se podílí na lékové rezistenci. GST-α je asociována s detoxifikací hořčičného dusíku, GST-μ s detoxifikací nitrosomočoviny. Zvýšená exprese GST-Π (placentami typ) u MDR buněčných linií vedla k závěru, že právě tato izoforma je klíčová pro lékovou rezistenci. U izoformy α byla pozorována i peroxidázová aktivita⁽³⁷⁾.

Regulace genů GST je multifaktoriální. Podílí se na ní věk, pohlaví, typ tkáně, přítomnost induktorů - chemických sloučenin rozdělitelných do 4 skupin (planární aromatické, oxidanty na bázi fenolu, barbituráty, glukokortikoidy) či metylace genů kódujících GST-azy⁽¹⁰¹⁾.

Schopnost modulovat hladinu GSH či aktivitu GST-π v buňce má BSO (irreverzibilní inhibitor γ-GCS enzymu), který v kombinaci s melfalanem snižuje hladinu GSH^(32,100). Další sloučenina, sulfasalazin, moduluje přímo aktivitu GST-7t a synergicky zvyšovala cytotoxicitu cis-platiny u 2 buněčných linií malobuněčného karcinomu plic⁽⁷⁾.



Obr.4 - γ-glutamyllový cyklus a syntéza glutathionu.

Legenda: Jednotlivé reakce cyklu jsou katalyzovány: (1) γ-glutamylcysteinsyntetázou, (2) glutathionsyntetázou, (3) γ-glutamyltranspeptidázou, (4) γ-glutamylcyclohydrolázou, (5) oxyprolinázou, (6) vnitrobuněčnou proteinázou.

V kapitole o MRP proteinu byl již popsán vztah mezi MRP a GSH-xenobiotickou (GSH-X) pumpou. Podtrhneme tedy alespoň fakt, že u množství GSH konjugátů a několika nemodifikovaných léčiv (např. doxorubicinu, etopozidu, vinblastinu) byla pozorována afinita k MRP proteinu. Rovněž byla zjištěna kolokalizace GSH konjugátů do těch oblastí buňky kde se nachází MRP^(22,132).

Zvýšená intracelulární koncentrace GSH či zvýšená aktivita GST- Π má za následek konjugaci GSH s vybranými cytostatiky, čímž se snižuje jejich biologická účinnost a dostupnost. Tento trend byl pozorován u 58 ze 60 nádorových buněčných linií⁽¹⁶⁹⁾. U rezistentních buněk byla nalezena v důsledku 2-krát vyššího množství GST-TC mRNA i zvýšená katalytická aktivita tohoto enzymu. Vyšší množství mRNA však nebylo způsobeno amplifikací GST-p genu⁽²⁹⁾. Jiná studie analyzující 25 buněčných linií rezistentních na doxorubicin a exprimujících GST-TC našla pouze u 10 linií zvýšenou aktivitu GST-TC oproti mateřským liniím. Pouze u 5 linií byla GST-TC aktivita alespoň 2krát větší. Zbýlých 15 sublinií mělo GST-TC aktivitu nezměněnou či dokonce sníženou, tedy přesný opak toho co se očekávalo⁽¹²¹⁾. Sublinie rezistentní na BSO (35-40x rezistentnější v porovnání s mateřskou linií) připravené z buněčné Linie lidských hepatocytů vykazovaly nadměrnou expresi γ -GCS, dále v důsledku snížené transkripční aktivity měly snížené množství GST-TC, tím pádem bylo pozorováno i méně GSH-konjugátů a tedy zvýšená hladina samotného GSH v buňce (v prostředí BSO exprimovaly tyto sublinie až 4krát více GSH). Otázka, zda je snížená exprese GST-TC odpovědí buňky na podání GSH inhibitorů a další otázky vyvstávající z této studie nebyly ještě zcela zodpovězeny⁽¹⁶⁹⁾.

Transformační studie provedené *in vitro* na kvasinkách, kdy byly různé formy GST vneseny do senzitivních buněk, prokázaly jejich účast v lékové rezistenci⁽¹⁶⁾. Transfekce buněčné linie MCF-7 (lidský karcinom prsu) vektory nesoucími geny různých izoforem GST sice zvýšily hladinu GST v buňkách, nicméně hladina rezistence nebyla signifikantně zvýšena⁽¹²⁰⁾. V jiné studii u MCF-7 buněk transfekovaných GST-TC byla pozorována zvýšená míra konjugace thiotepu s GSH v porovnání s kontrolami. Vazba thiotepu na GSH měla za následek snížení cytotoxicity thiotepu⁽³³⁾. Výsledky těchto experimentálních studií jsou natolik rozporuplné, že nedávají dostatečný důkaz o přímém vztahu mezi lékovou rezistencí a GST-TC aktivitou. Změny GST aktivit mohou být specifické pro každou jednotlivou buněčnou linii. Otázkou také zůstává do jaké míry je zvýšená GST-TC aktivita dostačující pro navození MDR. Velmi specifická pro jednotlivá xenobiotika je rovněž míra jejich cytotoxicity ztracená v důsledku konjugace s GSH^(71,119). Proto eliminace konjugátů GS-X pumpou bude zřejmě nezbytná pro kompletní detoxifikaci⁽⁷⁷⁾. Ahmad et al.® popsali různé alelické varianty GST-TC. V roce 1997 byl podán první důkaz o tom, že polymorfismus v GST-TC je odpovědný za různé silnou odpověď buňky na toxický stres⁽⁷⁶⁾. Polymorfismus GST-TC v lidské populaci může tedy alespoň částečně vysvětlit různou hladinu vnímavosti jedinců na sloučeniny konjugující se s GSH.

2) Výskyt GST-TC a GSH v lidských nádorech

Na základě rozporuplných výsledků získaných z experimentů na buněčných liniích není studií zabývajících se klinickou rezistencí v souvislosti s GST-TC aktivitou mnoho. Avšak nadměrná exprese GST-TC a tedy zvýšená míra detoxifikačních procesů s následnou sníženou efektivností léčby byla popsána u mnoha nádorových onemocnění (karcinom ovaria, prsu, CLL, nemalobuněčný karcinom plic, kolorektální karcinom)⁽¹²⁷⁾.

Bylo pozorováno zvýšení exprese GST- Π u buněk neuroblastomu odebraných po léčbě v porovnání se stavem před léčbou⁽⁹⁸⁾. Rovněž u pacienta s chemosenzitivním malobuněčným karcinomem plic byla GST-TC aktivita nižší v porovnání s pozdějším odběrem, kdy se onemocnění vyvinulo v rezistentní formu⁽⁴⁵⁾.

U 240 vzorků karcinomu prsu byla pozorována nepřímá úměra mezi GST-TC expresí a počtem estrogenových receptorů. Navíc byla pozitivita na GST-TC identifikována jako silný prediktor relapsu či smrti v podskupině uzlinově negativních pacientek po chemoterapii⁽⁵⁷⁾. GSH, GST-TC a aldehyd dehydrogenáza jsou asociovány u buněčných linií s rezistencí na karboplatinu a cyklofosfamid. Tanner et al.⁽¹⁶⁷⁾ zjišťovali, zda je přítomnost těchto 3 markerů spojena s rezistencí ovariálního karcinomu na léčebnou kombinaci cyklofosfamid-karboplatina. Studie byla provedena na 139 pacientkách. Nebylo nalezeno žádné spojení mezi

množstvím GSH, přítomností obou proteinů v nádorové buňce a přežitím. Medián přežití byl však signifikantně delší u pacientů, kteří měli intracelulární obsah GSH menší než 4,9 μ -g/mg proteinu. Glutathion se však nejevil jako nezávislý prognostický faktor, nýbrž byl signifikantně asociován se stázováním tumoru. Množství GSH v buňce bylo rovněž vázáno s progresí nádoru. Ani u jedné ze sledovaných sloučenin však nebyl prokázán vztah k rezistenci na léčbu cyklofosfamid-karboplatinu. Pozitivní korelace GST-TC exprese s nepříznivými prognostickými znaky lidských sarkomů⁽¹⁷¹⁾, naznačuje, že exprese GST-TC může korespondovat se špatnou klinickou odpovědí některých pacientů. Zvýšenou expresi GST-TC v lidských nádorech spojují se špatnou prognózou i další studie^(29,90).

Literatura uvádí zvýšenou expresi GST-TC v prognosticky nepříznivých lidských nádorech, avšak nepotvrzuje její úlohu v navození MDR. Tento fakt je v souladu s laboratorními pozorováními⁽¹⁴⁴⁾ prohláujícími GST-TC jako znak preneoplastické transformace buňky. Hlubší poznání mechanismů jakými se GST-TC exprese může podílet na maligní transformaci by zřejmě pomohlo lépe pochopit proces samotné onkogeneze⁽⁹⁴⁾.

IV. Další proteiny odpovědné za specifickou rezistenci na některá Protinádorová léčiva či jejich skupiny

V úvodu I. části bylo zmíněno, že kromě mnohočetné lékové rezistence existuje ještě rezistence zkřížená (na skupinu strukturálně příbuzných léčiv či na skupinu léčiv se stejným mechanismem účinku) a rovněž specifická rezistence kjednomu určitému cytostatiku. Tato problematika přesahuje rámec předkládaných prací a bude jí věnována zvláštní pozornost v některém z našich příštích sdělení. Nicméně bychom zde rádi uvedli alespoň jmenovitě některé z nich.

Molekuly enzymů topoizomerázy I a topoizomerázy II jsou cílovou strukturou řady protinádorových léčiv, např. epipodofylotoxinů, antracyklinů, derivátů camptothecinu. Snížené množství topoizomeráz nebo mutace v jejich primární struktuře neumožňuje interakci s inhibitory. Jelikož cytotoxicita většiny inhibitorů topoizomeráz přímo závisí na množství aktivních molekul enzymu, redukce jejich počtu se projeví vznikem lékové rezistence. Rada autorů přiřazuje rezistenci na inhibitory topoizomeráz k atypické mnohočetné lékové rezistenci

Do této problematiky se dále řadí následující mechanismy:

1. rezistence na inhibitory dihydrofolát reduktázy (DHFR), např. metotrexát, způsobená poruchou transportních mechanismů pro foláty a antifolika.
2. zvýšená koncentrace cytidindeaminázy vyúsťující v rezistenci na ARA-C.
3. thymidylátsyntetáza a rezistence na 5-fluorouracil (5-FU).
4. zvýšená aktivita DNA reparačních enzymů např. alkyltransferázy a rezistence na deriváty platiny a další alkylační látky.
5. amplifikace genu pro aspartát transkarbamylázu a rezistence na sůl kyseliny N-fosfonacetyl-L-asparagové (PALA).
6. amplifikace ribonukleotid reduktázy a rezistence na hydroxyureu (HU)...atd.

Poděkování

Práce na projektu *lékové rezistence jsou financovány granty IGAMZ4132-5, MŠMT VZJ14/98151100001, VS 96154 a Nadační pro výzkum rakoviny v Olomouci.*

LITERATURA

1. Abraham E.H., Prat, A.G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arcenci, R.J., Kramer, R., Guidotti, G., Cantello, H.F.: The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90(1), pp. 312-316
2. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., et al.: Cloning of the b cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science, 1995, 268, pp. 423-426
3. Ahmad, A., Wilson, D.E., Fritz, R.R., Singh, S.V., Medh, R.D., Nagle, G.T., Awasthi, Y.C., Kurosky, A.: Primary and secondary structural analyses of glutathione-S-transferase pi from human placenta. Arch. Biochem. Biophys., 1990, 278(2), pp. 396-408
4. Altenberg, G.A., Vanoye, C.G., Horton, J.K., Reuss, L.: Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug resistance cells: Evidence against direct extrusion from the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, pp. 4654-4657
5. Ambudkar, S.V., Lelong, I.H., Zhang, J., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M., Pastan, I.: Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89(18), pp. 8472-8476
6. Arcenci, R.J.: Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. Blood, 1993, 81, pp. 2215-2222

7. Awasthi, S., Sharma, R., Singhal, S.S., Herzog, N.K., Chaubey, M., Awasthi, Y.C.: Modulation of cisplatin cytotoxicity by sulphasalazine. *Br. J. Cancer*, 1994, 70, pp. 190-194
8. Barrand, M.A., Rhodes, T., Center, M.S., Twentyman, P.R.: Chemosensitization and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC 833, and verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190 kDa membrane protein distinct from P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer*, 1993, 29A, pp. 408-415
9. Bech-Hansen, N.T., Sarangi, F., Sutherland, D.J.A., Ling, V.: Rapid assays for evaluating the drug sensitivity of tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, 59, pp. 21-27
10. Beck, W.T., Cirtain, M.: Continued expression of vinca alkaloid resistance by CCR F-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase. *Cancer Res.*, 1982, 42, pp. 184-189
11. Beck, W.T.: The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol.*, 1987, 36(18), pp. 2879-2887
12. Bell, D.R., Gerlach, J.H., Kartner, N., Buick, R.N., Ling, V.: Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug-resistance. *J. Clin. Oncol.*, 1985, 3, pp. 311-315
13. Bell, D.R., Trent, J.M., Willard, H.F., Riordan, J.R., Ling, V.: Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1987, 25, pp. 141-148
14. Bellamy, W.T., Dalton, W.S.: Multidrug resistance in the laboratory and clinic. *Adv. Clin. Chem.*, 1994, 31(1), pp. 1-61
15. Biedler, J.L., Riehm, H.: Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 1970, 30, 1174
16. Black, S.M., Beggs, J.D., Hayes, J.D., et al.: Expression of human glutathione-S-transferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. *Biochem. J.*, 1990, 268, pp. 309-315
17. Boesch, D., Muller, K., Pourtier-Manzanedo, A., Loo, F.: Restoration of daunomycin retention in multidrug-resistant P388 cells by submicromolar concentration of SDZ PSC 833, a nonimmunosuppressive cyclosporine derivative. *Exp. Cell Res.*, 1991, 196(1), pp. 26-32
18. Bolhuis, H., van Veen, H.V., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N.: Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J.*, 1996, 15, pp. 4239-4245
19. Borst, P., Schinkel, A.H.: Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet.*, 1997, 13(6), pp. 217-222
20. Boscoboinik, D., Gupta, R.S., Epand, R.M.: Investigation of the relationship between altered intracellular pH and multidrug resistance in mammalian cells. *Br. J. Cancer*, 1990, 61(4), pp. 568-572
21. Bordow, S.B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G.M., Norris, M.D.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression on the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res.*, 1994, 54, pp. 5036-5040
22. Breuninger, L.M., Paul, S., Gaughan, K., et al.: Expression of multidrug resistance associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 5342-5347
23. Brock, I., Hipfner, D.R., Nielsen, B.S., et al.: Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and mdr1 and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 459-462
24. Burger, H., Nooter, K., Zaman, G.J., Sonneveld, P., van Wingerden, K.E., Oostrum, R.G., Stoter, G.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia*, 1994, 8(6), pp. 990-997
25. Chambers, T.C., Zheng, B., Kuo, J.F.: Regulation by pnbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.*, 1992, 41, pp. 1008-1015
26. Chan, H.S., Thorne, P.S., Haddad, G., Ling, V.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.*, 1990, 8(4), pp. 689-704
27. Chan, H.S.L., Haddad, G., Thorne, P.S., DeBoer, G., Lin, Y.P., Ondrusek, N., Yeger, H., Ling, V.: P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325, pp. 1608-1614
28. Chan, H.S.L., Lu, Y., Grogan, T.M., Haddad, G., Hipfner, D.R., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., Ling, V., Gallie, B.L.: Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 1997, 57, pp. 2325-2330
29. Chao, C.C., Huang, Y.T., Ma, C.M., Chou, W.Y., Lin-Chao, S.: Overexpression of glutathione-S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug resistant human colon cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 1992, 41(1), pp. 69-75
30. Chen, C.-J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 1986, 47, pp. 381-389
31. Chin, J.E., Soffir, R., Noonan, K.E., Choi, K., Roninson, I.B.: Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol.*, 1989, 9, pp. 3808-3820
32. Ciaccio, P.J., Tew, K.D., LaCreta, F.P.: The spontaneous and glutathione-S-transferase mediated reaction of chlorambucil with glutathione. *Cancer Commun.*, 1990, 2, pp. 279-286
33. Cnubben, N.H., Rommens, A.J., Oudshoorn, M.J., Van Bladeren, P.J.: Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiopeta and transport of its metabolite monogluthionylthiopeta in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 1998, 58(20), pp. 4616-4623
34. Cole, S.P.C., Downes, H.F., Mirski, S.E.L., Clements, D.J.: Alterations in glutathione and glutathione related enzymes in multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 1990, 37, pp. 192-197
35. Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Steward, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V., Deeley, R.G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 1992, 258, pp. 1650-1654
36. Cole, S.P.C., Sparks, K.E., Fraser, K. et al.: Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.*, 1994, 54, pp. 5902-5910
37. Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E.: Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione-S-conjugates. *Pharmacol. Rev.*, 1995, 47, pp. 271-294
38. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, Bertino, J.R.: Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, pp. 695-698
39. Currier, S.J., Ueda, K., Willingham, M.C., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Deletion and insertion mutants of the multidrug transporter. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, pp. 14376-14381
40. Deeley, G.R., Cole, S.P.C.: Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin. Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 193-204
41. Dekant, W.: Biosynthesis and cellular effects of toxic glutathione-S-conjugates. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, 387, pp. 297-312
42. Devault, A., Gros, P.: Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10(4), pp. 1652-1663
43. De Vries, E.G.E., Meijer, C., Timmer-Bosscha, H., Berendsen, H.H., de Leij, L., Mulder, N.H.: Resistance mechanisms in three human small cell lung cancer cell lines established from one patient during clinical follow-up. *Cancer Res.*, 1989, 49, pp. 4175-4178
44. Diah, S.K., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S.: Detoxification of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in MCF7 breast cancer cells expressing glutathione-S-transferase P1-1 and/or multidrug resistance protein 1. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 1999, 157, pp. 85-93
45. Di Marco, A., Casazza, A.M., Dasdia, T., Necco, A., Pratesi, G., Rivolta, P., Velich, A., Zaccara, A., Zunino, F.: Changes of activity of daunorubicin, adriamycin and stereoisomers following the introduction or removal of hydroxyl groups in the amino sugar moiety. *Chem. Biol. Interact.*, 1977, 19(3), pp. 291-302
46. Dorr, R.T., Loddil, J.D., Trent, J.M., Dalton, W.S.: Mitomycin C resistant L1210 leukaemia cells: association with pleiotropic drug resistance. *Biochem Pharmacol.*, 1987, 36, 3155
47. Dudler, R., Hertig, C.: Structure of and mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *J. Bio. Chem.*, 1992, 267, pp. 5882-5888
48. Eijdens, E.W.H.M., De Haas, M., Coco-Martin, J.M., et al.: Mechanism of MRP overexpression in four human lung cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int. J. Cancer*, 1995, 60, pp. 676-684
49. Endicott, J.A., Ling, V.: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, 58, pp. 137-171
50. Epstein, J., Xiao, H.Q., Oba, B.K.: P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood*, 1989, 74(3), pp. 913-917
51. Felmlee, T., Pellett, S., Welch, R.A.: Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.*, 1985, 163, pp. 94-105
52. Flens, M.J., Zaman, G.J.R., Van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijers, A.B., Scheffer, G.L., Van der Groep, P., De Haas, M., Meijer, C.J.L.M., Scheper, R.J.: Tissue distribution of the multidrug resistance associated protein (MRP). *Am. J. Pathol.*, 1996, 148(4), pp. 1237-1247
53. Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Keiser, H.R., Gottesman, M.M., Pastan, I.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, pp. 265-269
54. Ford, J.M., Hait, W.N.: Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.*, 1990, 42(3), pp. 155-199
55. Foxwell, B.M., Mackie, A., Ling, V., Ryffel, B.: Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 36(4), pp. 543-546
56. Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V.: Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature*, 1986, 324, pp. 485-489
57. Gilbert, L., Elwood, L., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S., Lazarus, D., Pierce, L., d'Angelo, T., Moscow, J.A., Townsend, A.J., Cowan, K.H.: A pilot study of Pi-clas glutathione S-transferase (GSTp) in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11, pp. 49-58
58. Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., Valverde, M.A., Mintenig, G.M., Sepulveda, F.M.: Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, 1992, 71, pp. 23-32
59. Goasguen, J.E., Dossot, J.M., Fardel, O., Le Mee, F., Le Gall, E., Leblay, R., LePrise, P.Y., Chaperon, J., Fauchet, R.: Expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood*, 1993, 81(9), pp. 2394-2398
60. Goldstein, L.J., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Multidrug resistance in human cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1992, 12(3), pp. 243-253
61. Gottesman, M.M., Pastan, I.: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62, pp. 385-427
62. Goodfellow, H.R., Sardini, A., Ruetz, S., Callaghan, R., Gros, P., McNaughton, P.A., Higgins, C.F.: Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, pp. 13668-13674
63. Grana, X., Reddy, E.P.: Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Blood*, 1995, 11, pp. 211-219
64. Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P., Deeley, R.G.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.*, 1994, 54(2), pp. 357-361
65. Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M., Housman, D.E.: Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 1986, 323(6090), pp. 728-731
66. Hamada, H., Hagiwara, K., Nakajima, T., Tsuruo, T.: Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.*, 1987, 47, pp. 2860-2865
67. Hardy, S.P., Goodfellow, H.R., Valverde, M.A., GUI, D.R., Sepulveda, F.V., Higgins, C.F.: Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J.*, 1995, 14, pp. 68-75
68. Hare, J.F.: Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 1031, pp. 71-90

69. Hasegawa, S., Abe, T., Naito, S., et al.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP), MDR1, and DNA Topoisomerase II in human multidrug resistant bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 1995,71, pp. 907-913
70. Higgins, C.F.: A B C transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev. Cell Biol.*, 1992, 8 pp. 67-113
71. Higgins, C.F., Gottesman, M. M.: Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.*, 1992,17, pp. 18-21
72. Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F., Ford, R.C.: Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin. Cancer Biol.*, 1997,8, pp. 135-142
73. Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Leslie, E.M., Gerlach, J.H., Grant, C.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: Membrane topology of the multidrug resistance protein, MRP: a study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂-terminus. *J. Biol. Chem.*, 1997,272, pp. 23623-23630
74. Holzmayer, T.A., Hilsenbeck, S., Von Hoff, D.D., Roninson, I.B.: Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1992, 84(19), pp. 1486-1491
75. Horio, M., Gottesman, M. M., Pastan, I.: ATP-dependent transport of vinblastin in vesicles from human multidrug-resistance cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85(10), pp. 3580-3586
76. Hu, X., Ji, X., Srivastava, S.K., Xia, H., Awasthi, S., Nanduri, B., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., Singh, S.V.: Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione-S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 345(1), pp. 32-38
77. Ishikawa, T.: The ATP-dependent glutathione-S-conjugate export pump. *Trends Biol. Sci.*, 1992,17, pp. 463-468
78. Izquierdo, M.A., Van der Zee, A.G.J., Vermorken, J.B., Van der Valk, P., Belien, J.A.M., Giaccone, G., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Pinedo, H.M., Kenemans, P., Meijer, C.J.M.L., De Vries, E.G.E., Scheper, R.J.: Drug resistance associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87, pp. 1230-1237
79. Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Shoemaker, R.H., Rome, L.H., Scheper, R.J.: Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology*, 1996,19, pp. 191-197
80. Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R., Scheper, R.J.: Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, 1996,65(2), pp. 230-237
81. Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J.M.L., Van der Valk, P., Scheper, R.J.: Broad distribution of the multidrug resistance related vault protein LRP in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.*, 1996,148(3), pp. 877-887
82. Jaffrezou, J.P., Laurent, G.: Ceramide: A new target in anticancer research. *Electron. J. Oncol.*, 1999,2, pp. 1-32
83. Jirski, J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., Steward, A.J., Fedida, D.: Inwardly rectifying K⁺ channels and volume-regulated anion channels in multidrug resistant small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 1993,53, pp. 4156-4160
84. *Journal of Clinical Oncology*, Editorial: Modulation of Multidrug Resistance: At the Treshold. *J. Clin. Oncol.*, 1993,11(9), pp. 1629-1635
85. Juliano, R.L., Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. *Biochem. Biophys. Acta*, 1976,455,152-162
86. Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V.: Cell surface P-glycoprotein is associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 1983,221,1285
87. Kedersha, N.L., Rome, L.H.: Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structure contains single species of small RNA. *J. Cell Biol.*, 1986,103, pp. 699-709
88. Kedersha, N.L., Miquel, M.C., Bittner, D., Rome, L.H.: Vaults II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J. Cell Biol.*, 1990,110, pp. 895-901
89. Kedersha, N.L., Heuser, J.E., Chugani, D.C., Rome, L.H.: Vaults III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J. Cell Biol.*, 1991,112, pp. 225-235
90. Keith, W.N., Stallard, S., Brown, R.: Expression of mdr-1 and gst-pi in human breast tumours: comparison to in vitro chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, 1990, 61(5), pp. 712-716
91. Keizer, H.G., Joenje, H.: Increased cytosolic pH in multidrug-resistant human lung tumor cells: effect of verapamil. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989, 81(9), pp. 706-709
92. Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., Mayer, R., Buchler, M.: The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv. Enzyme Reg.*, 1996, 36, pp. 17-29
93. Kickhoefer, V.A., Rome, L.H.: The sequence of a cDNA encoding the major vault protein from *Rattus norvegicus*. *Gene*, 1994,151, pp. 257-260
94. Kitahara, A., Satoh, K., Noshimura, K., Ishikawa, T., Kazuo, R., Sato, K., Tsuda, H., Ito, N.: Purification, induction and distribution of placental glutathione-S-transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 82, pp. 3964-3968
95. Kleiner, P.: Protinádorová chemoterapie. Prague, Czech Republic, Galén Publisher, 1st edition, 1996,614 pp.
96. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, G.R., van Eijk, M.J.T., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P.: Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5 homologues of the multidrug resistance associated protein gene (MRP1) in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 1997,57, pp. 3537-3547
97. Kuo, M.T., Bao, J., Furuichi, M., Yamane, Y., Gomi, A., Savaraj, N., Masuzawa, T., Ishikawa, T.: Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and glutamylcysteine synthetase mRNA in drug resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 1998,55, pp. 605-615
98. Kuroda, H., Sugimoto, T., Ueda, K., Tsuchida, S., Hori, Y., Inazawa, J., Sato, K., Sawada, T.: Different drug sensitivity in two neuroblastoma cell lines established from the same patient before and after chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 1991,47, pp. 732-737
99. Kuss, B.J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., et al.: Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. *Lancet*, 1994,343, pp. 1531-1534
100. LaCreta, F.P., Brennan, J.M., Hamilton, T.C., Ozols, R.F., O'Dwyer, P.J.: Stereoselective pharmacokinetics of L-buthionine SR-sulfoximine in patients with cancer. *Drug. Metab. Dispos.*, 1994,22, pp. 835-842
101. Lee, W-H, Morton, R.A., Epstein, J.I., et al.: Cytidine methylation of regulatory sequences near the p-class glutathione-S-transferase gene accompanies human prostatic cancer. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 1994,91, pp. 11733-11737
102. Lehnert, M.: Multidrug resistance in human cancer. *J. of Neuro-Oncol.*, 1994,22, pp. 239-243
103. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, Z., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., Keppler, D.: The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.*, 1994,269, pp. 27807-27810
104. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Keppler, D.: Characterization of the ATP dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. *Eur. J. Biochem.*, 1994,220, pp. 599-606
105. List, A.F., Spier, C.S., Grogan, T.M., Johnson, C., Roe, D.J., Greer, J.P., Wolff, S.N., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Dalton, W.S.: Overexpression of the major vault transporter protein LRP predicts treatment outcome in AML. *Blood*, 1996, 87(6), pp. 2464-2469
106. Loe, D.W., Deeley R.G., Cole, S.P.C.: Biology of the Multidrug Resistance-associated Protein, MRP. *Europ. J. Cancer.*, 1996,32A(6), pp. 945-957
107. Loe, D.W., Stewart, R.K., Massey, T.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the MRP gene. *Mol. Pharmacol.*, 1997,51,1034-1041
108. Lorico, A., Rappa, G., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res.*, 1996,56, pp. 5351-5355
109. Lorico, A., Rappa, G., Finch, R.A., Yang, D., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res.*, 1997,57, pp. 5238-5242
110. Lucci, A., Han, T., Liu, Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C.: Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer*, 1999, 86(2), pp. 300-311
111. Ma, L., Krishnamachary, N., Center, M.S.: Phosphorylation of the multidrug resistance associated protein gene encoded protein P190. *Biochemistry*, 1995,34, pp. 3338-3343
112. Manzano, R.G., Wright, K.A., Twentyman, P.R.: Modulation by acrolein and chloroacetaldehyde of multidrug resistance mediated by the multidrug resistance associated protein (MRP). *Clin. Cancer Res.*, 1996,2, pp. 1321-1326
113. Marie, J.P., Zittoun, R., Sikic, B.I.: Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlation with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood*, 1991, 78(3), pp. 586-592
114. Marie, J.P., Bastie, J.N., Coloma, F., Fausat Suberville, A.M., Delmer, A., Rio, B., Delmas-Marsalet, B., Leroux, G., Casassus, P., Baumelou, E., et al.: Cyclosporine A as a modifier agent in the salvage treatment of acute leukemia (ALL). *Leukemia*, 1993,7(6), pp. 821-824
115. Mayer, R., Kartenbeck, J., Buchler, M., Jedlitschky, G., Leier, I., Keppler, D.: Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell. Biol.*, 1995,131, pp. 137-150
116. McGrath, T., Center, M.S.: Mechanism of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.*, 1988, 48, pp. 3959-3963
117. McGrath, J.P., Varshavsky, A.: The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistant P-glycoprotein. *Nature*, 1989, 340(6232), pp. 400-404
118. Mellado, V., Horwitz, S.B.: Phosphorylation of the multidrug resistance associated glycoprotein. *Biochemistry*, 1987,26, pp. 6900-6904
119. Meyer, D.J.: Significance of an unusually low Km for glutathione in glutathione transferases of the a, m and p classes. *Xenobiotica*, 1993, 23, pp. 823-834
120. Moscow, J.A., Townsend, A.J., Cowan, K.H.: Elevation of pi class glutathione-S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 36, pp. 22-28
121. Moscow, J.A., Dixon, K.H.: Glutathione-related enzymes, glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology*, 1993,12, pp. 155-170
122. Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., De Vries, E.G.E., Jansen, P.L.M.: Overexpression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene results in increased ATP-dependent glutathione-S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995,91, pp. 13033-13037
123. Myers, C.E., Minnaugh, E.G., Yeh, G.C., Sinha, D.K.: In Anthracycline and Anthracenedione-Based Anticancer Agents. 1988, ed. Lown, J.W. (Elsevier, New York), pp. 527-569
124. Nooter, K., Bosman, F.T., Burger, H., van Wingerden, K.E., Flens, M.J., Scheper, R.J., Oostrum, R.G., Boersma, A.W.M., van der Gaast, A., Stoter, G.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, 1996,7, pp. 75-81
125. Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G.M., Stoter, G., Foekens, J.A.: The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1997,76(4), pp. 486-493
126. Norris, M.D., Bordow, S.B., Marshall, G.M., Haber, P.S., Cohn, S.L., Haber, M.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) and outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 1996,334, pp. 231-238
127. O'Brien, M.L., Tew, K.D.: Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Europ. J. Cancer*, 1996, 32A(6), pp. 967-978
128. Ota, E., Abe, Y., Oshika, Y., Ozeki, Y., Iwasaki, M., Inoue, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Takagi, K., Ogata, T., et al.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 1995, 72, pp. 550-554
129. Owellen, R.J., Donigian, D.W., Hartke, C.A., Hains, F.O.: Correlation of biologic data with physico-chemical properties among the vinca alkaloids and their congeners. *Biochem. Pharmacol.*, 1977,26(13), pp. 1213-1219
130. Parham, P.: Antigen presentation. Flying the first class flag. *Nature*, 1992, 357(6375), pp. 193-194
131. Pirker, R., Wallner, J., Geissler, K., Linkesch, W., Haas, O.A., Bettelheim, P., Hopfner, M., Scherrer, R., Valent, P., Havelec, L., et al.: MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 83(10), pp. 708-712
132. Radkowsky, A.E., Kosower, E.M.: (Haloalkyl)-l,5-diazabicyclo[3.3.0]octa-dienones (halo-9,10-dioxabimanes): reactivity towards the tripeptide thiol, glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986,108, pp. 4527-4531

133. Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural products toxins. *Cancer Res.*, 1997, 57, pp. 5232-5237
134. Rappa, G., Finch, R.A., Sartorelli, A.C., Lorico, A.: New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 56, pp. 557-562
135. Raviv, Z., Pollard, H.B., Bruggeman E.P., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumor cells. *J. Bio. Chem.*, 1990, 265, pp. 3975-3980
136. Raymond, M., Rose, E., Housman, D.E., Gros, P.: Physical mapping, amplification and overexpression of the mouse mdr gene family in multidrug-resistant cells. *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10, pp. 1646-1651
137. Raymond, M., Gros, P., Whiteway, M., Thomas, D.Y.: Functional complementation of yeast *ste6* by a mammalian multidrug resistance *mdr* gene. *Science*, 1992, 256, pp. 232-234
138. Reed, D.J.: Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990, 30, pp. 603-631
139. Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N.: Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug resistant mammalian cell lines. *Nature*, 1985, 319, 817
140. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsky, N., Chou, I.L., et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, 245(4922), pp. 1066-1073
141. Rischin, D., Ling, V.: Multidrug resistance in leukemia. *Cancer Treat. Res.*, 1993, 64, pp. 269-293
142. Rome, L.H., Kedersha, N.L., Chugani, D.C.: Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol.*, 1991, 1, pp. 47
143. Ruetz, S., Gros, P.: A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet? *TPS*, 1994, 15, pp. 260-263
144. Sakai, M., Okuda, A., Hatayama, I., Sato, K., Nishi, S., Muramatsu, M.: Structure and expression of the rat *c-jun* messenger RNA: Tissue distribution and increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 1989, 49, pp. 5633-5637
145. Salmon, S.E., Dalton, W.S., Grogan, T.M., Plezia, P., Lehnert, M., Roe, D.J., Miller, P.: Multidrug-resistant myeloma: Laboratory and clinical effects of Verapamil as a chemosensitizer. *Blood*, 1991, 78(1), pp. 44-50
146. Sarkadi, B., Muller, M.: Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. *Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 171-182
147. Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L.J., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J.M.L., Clevers, H.C., Scheper, R.J.: The resistance related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.*, 1995, 1, pp. 578-582
148. Scheffer, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., van Heijningen, T.H.M., van Kalken, C.K., Slovak, M.L., de Vries, E.G.E., van der Valk, P., Meijer, C.J.M.L., Pinedo, H.M.: Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*, 1993, 53, pp. 1475-1479
149. Schinkel, A.H., Roelofs, M.E.M., Borst, P.: Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 1991, 51, pp. 2628-2635
150. Schuurhuis, G.J., Broxterman, H.J., Ossenkoppele, G.J., Baak, J.P.A., Eekman, C.A., Kuiper, C.M., Feller, N., Heijningen, T.H.M., Klumper, E., Pieters, R., Lankelma, J., Pinedo, H.M.: Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with l-b-D-arabinofuranosyl sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, pp. 81-93
151. Schurr, E., Raymond, M., Bell, J.C., Gros, P.: Characterization of the multidrug resistance protein expressed in cell clones stably transfected with the mouse *mdr1* cDNA. *Cancer Res.*, 1989, 49(10), pp. 2729-2733
152. Seebor, S., Asieka, R., Schmidt, C.G., Achterath, W., Crooke, G.T.: In vitro resistance towards anthracyclines, etoposide and cis-diaminedichloro platinum. *Cancer Res.*, 1982, 42, 4719
153. Sehested, M., Skovsgaard, T., van Deurs, B., Winther-Nielsen H.: Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil. *Br. J. Cancer*, 1987, 56(6), pp. 747-751
154. Simon, S., Roy, D., Schindler, M.: Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994, 91(3) pp. 1128-1132
155. Simon, S.M., Schindler, M.: Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, pp. 3497-3504
156. Skovsgaard, T.: Transport and binding of daunorubicin, adriamycin and rubidazole in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26(3), pp. 215-222
157. Skovsgaard, T., Nielsen, D., Maere, Ch., Wassermann, K.: Cellular resistance to cancer chemotherapy. *Int. Rev. Cytol.*, 1994, 156, pp. 77-157
158. Slovak, M.L., Peley Ho, J., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., de Vries, E.G.E., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J.: The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: Evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 4214-4119
- 4*59. Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon M.A., et al.: Homozygous disruption of the murine *mdr1* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 1993, 75(3), pp. 451-462
160. Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Hu, X., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., Singh, S.V.: Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione-S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiopepa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 366(1), pp. 89-94
161. Staat, J., Marquardt, D., Center, M.S.: Characterization of a membrane associated protein kinase of multidrug-resistant HL60 cells which phosphorylates P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, pp. 4084-4090
162. Stride, B.D., Grant, C.E., Loe, D.W., Hipfner, D.R., Cole, S.P.C., Deeley, R.G.: Pharmacological characterization of the murine and human orthologs of multidrug resistance protein in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. Pharmacol.*, 1997, 52, pp. 344-353
163. Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S., Mori, S.: Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res.*, 1988, 48, pp. 1926-1929
164. Sugawara, I., Arai, T., Yamashita, T., Yoshida, A., Masunaga, A., Itoyama, S.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) on anaplastic carcinoma of the thyroid. *Cancer Lett.*, 1994, 82(2), pp. 185-188
165. Taguchi, Y., Yoshida, A., Takada, Y., Komano, T., Ueda, K.: Anti-cancer drugs and glutathione stimulate vanadate-induced trapping of nucleotide in multidrug resistance-associated protein (MRP). *FEBS Lett.*, 1997, 401, pp. 11-14
166. Tanaka, T., Uchiyama, T., Kohno, K., Tomonari, A., Nishio, K., Saijo, N., Kondo, T., Kuwano, M.: Glutathione homeostasis in human hepatic cells: overexpression of g-glutamylcysteine synthetase gene in cell lines resistant to buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1998, 246, pp. 398-403
167. Tanner, B., Hengstler, J.G., Dietrich, B., Henrich, M., Steinberg, P., Weikel, W., Meinert, R., Kaina, B., Oesch, F., Knapstein, P.G.: Glutathione, glutathione-S-transferase a and p, and aldehyde dehydrogenase content in relationship to drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 1997, 65, pp. 54-62
168. Taubert, H., Meye, A., Wurl, P.: Prognosis is associated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res.*, 1996, 56, pp. 4134-4136
169. Tew, K.D., Monks, A., Barone, L., et al.: Glutathione associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Mol. Pharmacol.*, 1996, 50(1), pp. 149-159
170. Thiebaut, F., Currier, S.J., Whitaker, J., Haugland, R.P., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C.: Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of pH-sensitive dye. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, 38(5), pp. 685-690
171. Toffoli, G., Frustaci, S., Tumiotto, L., Talamini, R., Gherlinzoni, F., Picci, P., Boiocchi: Expression of MDR1 and GST-p in human soft tissues sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Ann. Oncol.*, 1992, 3, pp. 63-69
172. Trezise, A.E.O., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepulveda, F.V., Buchwald, M., Higgins, C.F.: The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.*, 1992, 11(12), pp. 4291-4303
173. Tuszynski, G.E., Bakos, E., Vradi, A., Sarkadi, B.: Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.*, 1997, 402, pp. 1-3
174. Valverde, M.A., Diaz, M., Sepulveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F.: Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*, 1992, 355(6363), pp. 830-833
175. van Adelsberg, J., Al-Awqati, Q.: Regulation of cell pH Ca²⁺-mediated exocytotic insertion of H⁺-ATPases. *J. Cell Biol.*, 1986, 102(5), pp. 1638-1645
176. van der Bleeck, A.M., Baas, F., de Lange, T.T.H., Koiman, P.M., Van der Veld-Koerts, T., Borst, P.: The human MDR3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J.*, 1987, 11, pp. 3325-3331
177. van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprang, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G.: MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, 1996, 87(3), pp. 507-517
178. Vanhoef, U., Cao, S., Minderman, H., Toth, K., Skenderis, B.S., Slovak, M.L., Rastum, Y.M.: D,L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates *in vivo* the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumours. *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2, pp. 1961-1968
179. van Veen, H.W., Konings, W.N.: Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin. Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 183-191
180. Versantvoort, C.H.M., Broxterman, H.J., Bagrij, T., Scheper, R.J., Twentyman, P.R.: Regulation by glutathione of drug transport in multidrug resistant human lung tumour cell lines overexpressing MRP. *Br. J. Cancer*, 1995, 72, pp. 82-89
181. Waldman, T., Lengauer, C., Bunz, F., Kinzler, K., Vogelstein, B.: The role of p21 in cell cycle control and drug sensitivity. *Cell Cycle Therapeutics: The Conference held in November 6-7, 1997, Washington, D.C., USA. Book of abstracts. Published by International Business Communications (225 Turnpike Road, Southborough, MA 01772-1749, USA)*
182. Weaver, J.L., Pine, P.S., Aszalos, A., Schoenlein, P.V., Currier, S.J., Padmanabhan, R., Gottesman, M.M.: Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells. *Exp. Cell Res.*, 1991, 196(2), pp. 323-329
183. Wigler, P.W.: PSC833, Cyclosporine A, and Dexamethasone Effects on Cellular Calcine Retention and Inhibition of the Multidrug Resistance Pump in Human Leukemic Lymphoblasts. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 1999, 257, pp. 410-413
184. Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., Borst, P.: Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance associated protein. *Nat. Med.*, 1997, 3, pp. 1275-1279
185. Wilson, W.H., Bryant, G., Bates, S., Fojo, A., Wittes, R.E., Steinberg, S.M., Kohler, D.R., Jaffe, E.S., Herdt, J., Cheson, B.D., et al.: EPOCH chemotherapy: toxicity and efficacy in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11(8), pp. 1573-1582
186. Wu, C.-T., Budding, M., Griffin, M., Croop, J.: Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologues. *Mol. Cell Bio.*, 1991, 11, pp. 3940-3948
187. Zaman, G.J.R., Flens, M.J., Leusden, M.R., van Haas, M.D., Mulder, H.S., Lankelma, J., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., Baas, F., Broxterman, H.J., Borst, P.: The human multidrug resistance associated protein MRP1 is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, pp. 8822-8826