

VZŤAH MEDZI EXPRESIOU PROTEÍNOV ASOCIOVANÝCH S LIEKOVOU REZISTENCIOU A VÝSLEDKAMI IN VITRO CYTOTOXICKÉHO MTT TESTU U PACIENTOV S NSCLC

RELATION BETWEEN EXPRESSION OF DRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEINS AND RESULTS OF CYTOTOXIC IN VITRO MTT-ASSAY IN NSCLC PATIENTS

ŠKARDA J.¹, +HAJDÚCH M.², BOUCHAL J.¹, NOSKOVÁ V.², LUDKOVÁ A.², DŽUBÁK P.², TICHÝ T. \ KLEIN J.³, KOLEK V.⁴, KOLÁR Z.¹, KRÁL V.³, MIHAL V.²

¹LABORATOR MOLEKULÁRNI PATOLÓGIE, CMBM UP & ÚSTAV PATOLÓGIE LF UP OLOMOUČ

²LABORATOR EXPERIMENTÁLNI MEDICÍNY PRI DETSKÉ KLINIKE LF UP A FN OLOMOUČ

³I. CHIRURGICKÁ KLINIKA FN OLOMOUČ

⁴KLINIKA TUBERKULÓZY A RESPIRACNÍCH NEMOCI

+korespondujúci autor: Laboratoľ experimentálnej medicíny pri Detskej klinike LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc, hajduchm@atlas.cz

Súhrn: Mnohopočetná lieková rezistencia (MDR) je častou príčinou neúspešnosti chemoterapie nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC). U NSCLC rozlišujeme 2 základné typy MDR: typickú MDR asociovanú s expresiou P-glykoproteínu a atypickú MDR asociovanú s expresiou proteínu MRP, alternovanou expresiou topoizoméráz II, expresiou lung rezistance proteínu (LRP), aktivitou glutathion S transferázového systému. Predkladaná práca pojednáva o vzťahu medzi imunohistochemickou expresiou vybraných markerov MDR (MRP, Pgp, topoizomérázy Ha.) a niektorých regulátorov bunčného cyklu a apoptózy - p53, p27, kaspázy3 (pcasp3), tkanivovej transglutaminázy (Tga) s výsledkami testu in vitro chemosenzitivity nádorových buniek pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej chemoterapii. Expresia vyššie uvedených faktorov bola stanovená nepriamou imunoperoxidázovou metódou na parafinovom bioptickom materiáli od 64 pacientov s NSCLC po neoadjuvancii na báze karboplatiny (CDDP) a taxolu (TAX) alebo cisplatinu (DDP) a navelbínu. K stanoveniu in vitro citlivosti nádorových buniek na cytostatiká boli použité natívne resekáty od uvedených pacientov. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu, Mann-Whitneyho testu a t-testu. Zistili sme pozitívnu koreláciu medzi imunohistochemickou expresiou MRP/p53 ($p=0,006$), pcasp3/p53 ($p=0,0001$) a inverznú koreláciu p27/Tga ($p=0,027$). Expresia MRP zároveň negatívne korelovala s in vitro citlivosťou na TAX ($p=0,043$). Expresia p53 pozitívne korelovala s in vitro rezistenciou na aktinomycín D ($p=0,01$), daunorubicín ($p=0,026$) a vinkristín ($p=0,044$).

Kľúčové slová: nemalobunčný karcinóm pMc, mnohopočetná lieková rezistencia, apoptóza, bunkový cyklus, terapia

Summary: Multidrug resistance is one of the major causes of treatment failure in NSCLC. Two types of multidrug resistance (MDR) have been detected in lung cancer: typical multidrug resistance associated with the overexpression of P-glycoprotein (Pgp) and atypical MDR associated with the expression of MRP (multidrug resistance protein), altered activity of topoisomerase IIa, increased expression of LRP (lung resistance protein), activation of glutathione S transferase system, etc. This work deals with mutual correlation of immunohistochemical expression of selected markers of MDR (Pgp, MRP, and topoisomerase IIa) and several markers of tumor differentiation and/or apoptosis - p27, p53, procaspase3 (pcasp3), tissue transglutaminase (Tga) with results of in vitro chemosensitivity assay. 64 formaldehyde fixed and paraffin embedded biptic specimens were used for indirect immunoperoxidase detection of the above mentioned markers. MTT test was carried out from native tumors of the same group. Significant positive relationships were detected in between p53/MRP ($p=0,006$), p53/pcasp3 ($p=0,0001$), inverse correlation was found between p27/Tga ($p=0,027$). Expression of p53 was positively associated with the resistance to actinomycin-D ($p=0,01$), daunorubicin ($p=0,026$) and vincristine ($p=0,044$). Expression of MRP negatively correlated with in vitro sensitivity to taxol ($p=0,043$).

Keywords: non-small cell lung carcinoma, multidrug resistance, apoptosis, cell cycle, therapy

Zoznam použitých skratiek:

ACT-D - aktinomycín-D; CDDP - karboplatina (karbo-diaminodichlor platina); DAU - daunorubicín; DDP - cisplatina (diaminodichlorplatina); G MC - gemcitabín; LRP - lung resistance protein; MDR - mnohopočetná lieková rezistencia (multi-drug resistance); MRP - multi-drug resistance protein; MW - Mann Whitney test; NSCLC - non-small cell lung carcinoma; NVB - navelbín; pcasp3 - proenzým kaspázy3; Pgp - P-glykoproteín; TAX - taxol; TCS₅₀ - tumor cell survival 50%; Tga - transglutamináza; TopoII - topoizoméráza IIa; VIN - vincristín

Úvod

Jednou z hlavných príčin neúspešnosti chemoterapie NSCLC je výskyt konštitutívnej a získanej liekovej rezistencie. Medzi významné vlastnosti nádoru, ktoré sa podieľajú na mechanizmoch liekovej rezistencie, patria napr. stupeň vaskularizácie, percento buniek v senescencii ašpecifické mechanizmy MDR (1,2,3). Rozlišujeme 2 základné typy MDR: typickú MDR zapríčinenú funkciou ATP dependentného transportného proteínu P-glykoproteínu (Pgp) a atypickú MDR asociovanú s expresiou MRP proteínov, alternovanou aktivitou topoizoméráz U, zmenou intracelulárnej distribúcie cytostatík asociovanou s expresiou lung rezistance proteínu (LRP) (5,6), glutathion S transferázovým systémom (27), atď. Pgp je membránový transportér zo substrátovou špecifitou napr. pre doxorubicín, vinca alkaloidy a taxány (7,8). Zvýšená expresia mdr1/Pgp nekoreluje s klinickými parametrami u pacientov s NSCLC (9,10,11). Z uvedeného vyplýva, že daný mechanizmus MDR sa na klinickej rezistencii u pacientov s NSCLC výraznou mierou pravdepodobne nepodieľa (12,13). Ďalším MDR asociovaným génom je mrp1 kódujúci proteín MRP (multidrug resistance protein). Funkcia MRP v bronchiálnom epiteli spočíva v transporte cytostatík konjugovaných s glutatiónom v glutathion S-transferázovom systéme (14,15,16). U pacientov s NSCLC korelovala expresia mrp1 mRNA a mrp3 mRNA s in vitro rezistenciou na vinkristín, etoposid a DDP (17). Zároveň bol zistený významný vzťah medzi expresiou MRP a prognózou pacientov s NSCLC, ktorých nádory boli resekované v štádiu JU bez neoadjuvantnej chemoterapie (18). Uvedenému súboru paci-

entov bola následne aplikovaná adjuvantná chemoterapia na báze DDP v kombinácii s vindesinom (VDS) alebo CDDP v kombinácii s etopozidom (VP-16).

Ďalším významným mechanizmom MDR, ktorý sa uplatňuje v rezistencii na niektoré cytostatiká ako napr. DDP a doxorubicín (DOX) je zmena v ich intracelulárnej distribúcii, ktorá spočíva v zabránení vstupu do jadra rezistentných nádorových buniek. Na uvedenom mechanizme sa pravdepodobne výraznou mierou podieľa LRP. Zvýšená expresia LRP bola detekovaná napr. v bunkovej línii A-549 rezistentnej na VP-16. Prognostický význam LRP u pacientov s NSCLC však nie je zatiaľ objasnený (19).

Mechanizmus rezistencie na inhibítory topoizoméráz II spočíva v ich zníženej intracelulárnej akumulácii spôsobenej zníženou aktivitou a expresiou daných enzýmov. Génové mutácie topoizomérázy IIa (TopoII) boli pozorované v líniiach NSCLC rezistentných na daunorubicín (DAU) a VP-16. Výskyt uvedených mutácií v klinických vzorkách pacientov s NSCLC je však veľmi sporadický (20).

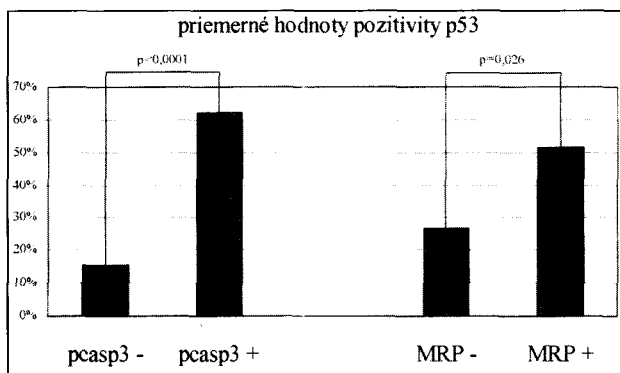
Expresia tkanivovej transglutaminázy bola popisovaná v súvislosti s indukciou rezistencie na DOX a skríženou rezistenciou na VIN v bunkovej línii PC-14/ADR. Prognostický význam exprese daného enzýmu vo vzorkách pacientov s NSCLC taktiež nie je objasnený (21,22,23).

K vzniku MDR prispievajú kvantitatívne a kvalitatívne alterácie v expresii onkogénov a génov fungujúcich ako nádorové supresory. Expresia uvedených génov hrá kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu a apoptózy. Nemutovaný gén p53 (wild-type) je akti-

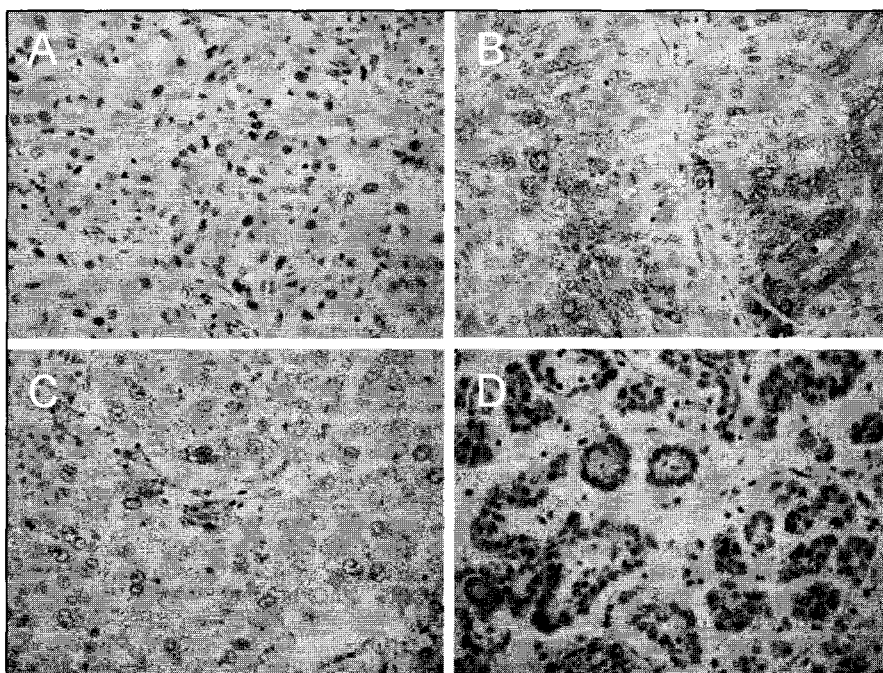
vovaný poškodením DNA v súvislosti s chemoterapiou a rádioterapiou. Následkom aktivácie daného génu dochádza k zastaveniu bunecného cyklu vo fáze G₁ a k indukcií apoptózy. Štúdie in vitro potvrdili, že väčšina protinádorových liečiv je účinnejšia pri prítomnosti wild-type p53 než pri prítomnosti mutantných foriem. Fujivara et al. (11) zistili, že adenovírusový transfer génu p53 do bunkových línií odvodených od NSCLC výrazne zvýšil ich senzitivitu na DDP. In vitro štúdie potvrdili, že znalosť funkčného stavu p53 je významným znakom chemosenzitivity. Doposiaľ bola publikovaná len jediná štúdia zaoberajúca sa alteráciou génu p53

Tabuľka 1: Signifikantne významné hodnoty (p) Spearmanova korelačného koeficientu (r) pre indikované dvojice parametrov; n-počet vyšetrení.

korelované znaky	n	r	p
p53 - MRP	65	0,34	0,006
p53 - procasp3	55	0,52	0,0001
p27-Tga	59	-0,29	0,027
p53 - ACT-D	29	0,47	0,010
p53 - DAU	40	0,35	0,026
p53 - VIN	35	0,34	0,044
MRP - TAX	48	-0,29	0,043



Obrázok 1. Ilustrácia pozitívneho vzťahu medzi expresiou p53/pcasp3 a p53/MRP (p-hladina významnosti t-testu). Negativita pcasp3 ($r=0,52$) i MRP ($r=0,34$) koreluje s nízkou expresiou p53 a naopak.



Obrázok 2. Ilustrácia imunohistochemickej exprese niektorých proteínov pri zväčšení 400x: nukleárna expresia MRP (A), cytoplazmatická expresia p53 (B), nukleárna expresia Topo 2α (C), cytoplazmatická expresia Pgp (D).

a chemosenzitivitou in vivo. Oshika et al. (26) vyšetrovali vzťah medzi overexpresiou (overexpresia = mutácia) p53 a chemosenzitivitou in vivo u pacientov s NSCLC v štádiu IIIa, ktorí sa podrobili neoadjuvantnej chemoterapii. Zistili signifikantný vzťah medzi overexpresiou p53 a rezistenciou na chemoterapiu.

Taktiež expresia inhibítorov cyklin-dependentných kináz p16 a p27 vo vzorkách pacientov s NSCLC sa ukázala byť významným pozitívnym prognostickým faktorom (22,23,24). Strata ich funkcie je často pozorovaná u nádorov po neoadjuvantnej terapii (22,23). Niektoré štúdie uvádzajú, že expresia p16 a p27 koreluje u nádorov pľúc s chemorezistenciou in vitro. Volm et al. (22) naproti tomu zaznamenali signifikantne výraznejšiu klinickú odpoveď na DDP u pacientov s recidivujúcimi NSCLC, ktorých nádory exprimovali p27.

Cieľom predkladanej práce je overenie vzájomnej korelácie imunohistochemickej exprese parametrov asociovaných MDR s výsledkami testu in vitro chemosenzitivity u pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej terapii. Uvedené výsledky môžu prispieť k posúdeniu prediktívnej hodnoty vyšetrenia imunohistochemickej exprese MRP, Pgp, p53, Tga, p27, pcasp 3 a TopoII vzhľadom k in vitro rezistencii na bežné protinádorové liečivá u pacientov s karcinómom po neoadjuvantnej terapii.

Materiál a metódy

Súbor pacientov

Do štúdie bol zaradený biopsický materiál od 64 pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej chemoterapii na báze CDDP+TAX alebo CDDP+NVB. Vek pacientov sa pohyboval od 40-60 rokov, z toho bolo 51 mužov a 13 žien, histopatologická diagnóza zahŕňovala adenokarcinómy (n=21) spinocelulárne karcinómy (n=37) a veľkobunkové karcinómy (n=6).

Imunohistochemická detekcia proteínov MDR

Rutinne pripravené vzorky v parafrínových blokoch boli narezané a prenesené na silanizované sklá, následne odparafrínované a rehydratované. Odmaskovanie antigénnych epitopov vzoriek bolo docieľené v mikrovlnom generátore o výkone 800 W, v 0,01M citrátovom pufrí po dobu 15min. Po následnom premytí v destilovanej vode bola aktivita endogénnej peroxidázy odstránená v 10% roztoku H₂O₂ po dobu 3x10 minút. Po následnom premytí destilovanou vodou boli nešpecifické väzbové miesta zablokované prevrstvením vzoriek 5% odtučneným mliekom v TRIS pufrí pH 7,6. Po odstránení prebytočného mliečného pufru z povrchu rezu, boli na jednotlivé rezy následne aplikované primárne protilátky. Protilátky boli riedené v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) následovne: monoklonálna myšia protilátka anti-p53 typ DO-1 1:1000 (MOÚ Brno), monoklonálna myšia protilátka anti-p53 typ FP 3111 1:500 (MOÚ Brno), monoklonálna myšia anti-Pgp klon UIC2 1:100 (Dako), monoklonálna myšia anti-Topo IIα klon SWT3D1 1:100 (Dako), monoklonálna myšia anti-p27 klon SX5368 1:100 (Dako), polyklonálna králičia anti-procaspáza3 klon NCL-CPP32p 1:100 (Dako), myšia anti-kaniová transglutamináza klon CUB7402 1:50 (Dako) a polyklonálna králičia anti-MRP klon MRPm5 1:20 (Alexis). Vzorky boli následne inkubované pri teplote 4°C po dobu 12 hodín. Po premytí (3x5 min) v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) bol následne aplikovaný farbiaci systém anti-myšia/králičia EnVision (Dako) na dobu 30 minút. Po premytí vzoriek v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) bola vizualizovaná aktivita peroxidázy pomocou 0,01M diaminobenzidínu v TRIS pufrí s 0,01% H₂O₂. Rezy boli dofarbené hematoxylinom, dehydratované, prejasnené a zamontované do kanadského balzámu. Pozitivita bola hodnotená v 10 zorných poliach pri 400-násobnom zväčšení a vyjadrená percentuálne.

Stanovenie in vitro citlivosti pomocou MTT testu

Na stanovenie in vitro citlivosti primárných nádorových buniek NSCLC na protinádorové liečivá bol použitý MTT test (29). Jeho princípom je premena MTT (3,4,5-dimethythiazol-2yl-2,5 difenyl-tetrazolium bromid) vitálnymi bunkami na nerozpustný formazán. Po rozpustení kryštálov formazánu bola stanovená absorbancia v pomocou ELIS A readeru pri 540 nm. Následne sme pre jednotlivé cytostatiká počítačovo vyhodnotili letálne dávky zabíjajúce 50% buniek (TCS_{50}).

Štatistická analýza

Výsledky imunohistochemickej detekcie boli spracované a porovnané medzi sebou a taktiež s výsledkami testu in vitro citlivosti na cytostatiká v programe GraphPad Prism pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu, Mann-Whitneyho testu a t-testu.

Výsledky

Porovnali sme imunohistochemickú expresiu sledovaných znakov navzájom a s výsledkami MTT testu. Signifikantné korelácie sú zachytené v tabuľke 1. Zo všetkých sledovaných znakov boli zistené korelácie len medzi expresiou p53/MRP ($r=0,33$, $p=0,006$), p53/pasp3 ($r=0,52$, $p<0,0001$), p27/Tga ($r=-0,29$, $p=0,027$). Expresia p53 korelovala s in vitro rezistenciou na ACT-D ($r=0,47$, $p=0,01$), DAU ($r=0,35$, $p=0,026$) a VIN ($r=0,34$, $p=0,044$). Zároveň bola zistená korelácia medzi expresiou MRP a citlivosťou na TAX ($r=-0,29$, $p=0,043$). Súbory vykazujúce štatisticky významné korelácie boli rozdelené podľa jedného z parametrov a ich mediány/priemery porovnané Mann-Whitney testom/t-testom. V tejto analýze sme potvrdili významný vzťah iba medzi p53/pasp3 (MW $p<0,0001$, t-test $p<0,0001$) a p53/MRP (MW $p=0,015$, t-test $p=0,026$). Na obrázku 1 sú zobrazené priemerné hodnoty p53 po rozdelení podľa pozitivity/negativity prokaspázy3 alebo MRP. Obrázok 2 zobrazuje typickú imunohistochemickú expresiu vybraných znakov.

Diskusia

V našej práci sme dospeli k niekoľkým záverom. Zistili sme, že expresia Pgp nekorelovala s in vitro rezistenciou na žiadne z testovaných cytostatík. Uvedené zistenie je v súlade s početnými štúdiami, ktoré uvádzajú, že expresia Pgp a hladiny mdr1 mRNA nekoreluje s in vitro rezistenciou u NSCLC (1). Jedným z možných vysvetlení je skutočnosť, že až 40 % nádorov exprimujúcich Pgp je citlivých na DNR (30). V podstate to znamená, že nie je možné z exprese Pgp usudzovať na jeho funkčnú aktivitu. Táto skutočnosť pravdepodobne zodpovedá za množstvo sklamaní, ktoré nám priniesla aplikácia blokátorov Pgp (cyklosporín A, verapamil, atď.) s Pgp transportovanými cytostatikami v klinickej praxi.

Ďalším významným zistením bol signifikantný vzťah medzi expresiou MRP a citlivosťou na TAX. Súčasná štúdia potvrdzuje, že taxol nie je transportovaný MRP (3). V našej štúdii bol zároveň potvrdený vzťah medzi expresiou p53 a MRP. Dokázali sme, že mutantné formy p53 spôsobujú zvýšenú syntézu MRP, čo je pravdepodobne jeden z mechanizmov, ktorým nefunkčnosť proteínu p53 prispieva k vzniku MDR. Expresia p53 taktiež korelovala s in vitro rezistenciou na ACT-D, DAU a VIN. Recentné in vitro štúdie ukazujú, že väčšina protinádorových liečiv je účinnejšia v prítomnosti wild type p53, v porovnaní s mutantnou formou (28). Jedinou výnimkou v tomto smere je taxol (3). Domnievame sa, že táto skutočnosť súvisí s väzbou medzi expresiou mutovanej formy p53 a MRP. Ako už bolo uvedené, MRP nie je spojený s transportom TAX, ale celej škály iných cytostatík. Na potvrdenie prognostického významu p53 sú potrebné prospektívne štúdie na veľkej skupine prípadov so sledovaním klinickej odpovede na chemoterapiu. Paradoxné je naše zistenie, že expresia p53 súvisí s expresiou prokaspázy 3. Uvedený fenomén sa dá pravdepodobne vysvetliť tým, že akumulácia prokaspázy ešte nemusí znamenať apoptózu. Pre spresnenie daného vzťahu je nutné vyšetriť p53-independentné apoptotické mechanizmy spolu s ostatnými kaspázami aktivovanými kaspázou 3.

Podakovanie

Práca bola čiastočne podporená grantami IGA MZČR 4132-5, MSMVTJ14/981511 00001, VŠ 96154 a Nadáciou pre výskum rakoviny v Olomouci.

Literatúra:

1. Crino L, Corgoña E, Porrozi S, Palladino MA, Darwish S, Ninotti V: A better therapeutic profile for the combination of mitomycin C, ifosfamide and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a useful dose schedule modification. *Ann Oncol* 1997; 8:709-711.
2. Kubota K, Furuse K, Kawahara M, Kodama N, Ogawara M, Takada M: Cisplatin-based combination chemotherapy for elderly patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40:469-474.
3. Berger W, Elbling L, Hauptmann E, Micksche M: Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and chemoresistance of human non-small-cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 1997; 73:84-93.
4. Ohmori T, Nishio K, Ohta S, Kubota N, Adachi M, Komiya K, Saio N: Ouabain-resistant non-small-cell lung cancer cell line shows collateral sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (U) (CDDP). *Int J Cancer* 1994; 57:111-116.
5. Morikage T, Ohmori T, Nishio K, Fujiwara Y, Takeda Y, Saio N: Modulation of cisplatin sensitivity and accumulation by amphotericin B in cisplatin-resistant human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53:3302-3307.
6. Tomonari A, Nishio K, Kurokawa H, Fukumoto H, Fukuoaka K, Iwamoto Y: Proximal 5'-flanking sequence of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is involved in cisplatin-induced transcriptional up-regulation in a lung cancer cell line SBC3. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:522-527.
7. Shen H, Kauvar L, Tew KD: Importance of glutathione associated enzymes in drug response. *Oncology Res* 1997; 9:295-302.
8. Yokomizo A, Kohno K, Wada M, Ono M, Morrow CS, Cowan KH, Kuwano M: Markedly increased expression of glutathione S-transferase p mRNA in human cancer cell lines resistant to buthionine sulfoximine, an inhibitor of cellular glutathione synthesis. *J Biol Chem* 1995; 270:19451-19457.
9. Nakagawa K, Yokota J, Wada M, Sasaki Y, Fujiwara Y: Levels of glutathione S transferase mRNA in human cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79:301-304.
10. Kelly SL, Basu A, Teiger BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS: Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988; 241:1813-1815.
11. Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara, Bungo M, Yamakido M, Tew KD, Saio N: Determinants of drug response in a cisplatin-resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:527-535.
12. Bruhn SL, Pii PM, Essigmann JM, Housman DE, Lippard SJ: Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2307-2311.
13. Huang JC, Zambie DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A: HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:10394-10398.
14. Ohga T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagaki Y, Tanimoto M: Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996; 56:4224-4228.
15. Kasahara K, Fujiwara Y, Sugimoto Y, Nishio K, Tamura T, Matsuda T, Saio N: Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:113-118.
16. Wessel I, Jensen PB, Falck J, Mirski SE, Cole SP, Sehested M: Loss of amino acids 1490Lys-Ser-Lys 1492 in the COOH-terminal region of topoisomerase IIa in a human small cell lung cancer cells selected for resistance to etoposide results in an extranuclear enzyme localization. *Cancer Res* 1997; 57:4451-4454.
17. Kanzawa F, Nishio K, Kubota N, Saio N: Antitumor activities of a new indolocarbazole substance, NB-506, and establishment of NB-506-resistant cell lines. *SBC-3/NB. Cancer Res* 1995; 55:2806-2813.
18. Akerley W, Glantz M, Choy H, Rege V, Sambandam S, Joseph P: Phase I of weekly paclitaxel in advanced lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:153-158.
19. Kirkbride P, Gelmon K L, Eisenhauer E, Fisher B, Dulude H: A phase I/II study of paclitaxel (TAXOL) and concurrent radiotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Phys* 1997; 39:1107-1111.
20. Ohta S, Nishio K, Kubo S, Nishio M, Ohmori T, Takahashi T, Saio N: Characterisation of a vindesine-resistant human small-cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 1993; 68:74-79.
21. Ginopoulos P, Spyropoulos K, Kardamakis D, Dougenis D, Onyeadum A, Gogos CH, et al.: Advanced non-small cell lung cancer chemotherapy: a randomized trial of two active regimens (MVP and PE). *Cancer Lett* 1997; 119:241-247.
22. Volm M, Rittgen W, Drings P: Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77:663-669.
23. Marchetti A, Dogliani C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellergini S, Gaeta P: Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 75:187-192.
24. Hama S, Heike Y, Naruse I, Takahashi M, Yoshioka H, Arita K: Adenovirus-mediated p16 gene transfer prevents drug-induced cell death through G1 arrest in human glioma cells. *Int J Cancer* 1998; 77:47-54.
25. Fukuoaka K, Adachi J, Nishio K, Arioka H, Kurokawa H, Fukumoto H: p16^{INK4} expression is associated with the increased sensitivity of human non-small cell lung cancer cells to DNA topoisomerase I inhibitors. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:1009-1016.
26. Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, Fukushima Y, Abe Y, Ozeki Y, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y: Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 1998; 11(11): 1059-63.
27. Savas B, Arslan G, Gelen T, Karpuzoglu G, Ozkaynak C: Multidrug resistant malignant melanoma with intracranial metastasis responding to immunotherapy. *Anticancer Res* 1999 Sep-Oct; 19(5C):4413-20.
28. I. Komiya T, Hirashima T, Kawase I: Clinical significance of p53 in non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 1999 6(1):19-28.
29. Hajdúch M, Mihal V, Minarik J, Faber E, Safarova M, Weigl E, Antalek P.: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with poor prognosis. *Cytotechnology* 1996; 19(3):243-5.
30. Marie JP, Zittoun R, Sikik BI.: Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991 Aug 1; 78(3):586-92.