

Immunohistochemical detection of LRP protein in the normal human lung

Rybarova S, Batekova M, Hodorova I, Mirossay A, Kluchova D, Bobrov N, Kocisova M

Imunohistochemický dôkaz proteínu LRP v zdravom tkanive pľúc človeka

Abstract

Rybarova S, Batekova M, Hodorova I, Mirossay A, Kluchova D, Bobrov N, Kocisova M:

Immunohistochemical detection of LRP protein in the normal human lung

Bratisl Lek Listy 2001; 102 (2): 66–72

In this study, we have determined the LRP (lung resistance-related protein) by immunohistochemical method. LRP belongs to proteins which cause the multidrug resistance (MDR). It has been found in various normal human tissues, where it plays a protective role against toxic compounds. Multidrug-resistant cells distribute the cytotoxic drug into the perinuclear region and then redistribute it back into the cytoplasm. It is just a hypothesis today that LRP can mediate drug resistance by regulating both the cytoplasmic redistribution and the nucleocytoplasmic transport of drugs.

In order to detect LRP we have used the paraffin-embedded sections of the normal human lung tissue. LRP was predominantly located in two regions: 1) in bronchial epithelial cells and 2) in alveolar macrophages. Positive cells were coloured brown and showed strong reactivity. Negative control included the omitting of primary antibody and replacing it by buffer solution. Bronchial epithelial cells and alveolar macrophages stayed uncoloured, i.e. unreactive. (Fig. 5, Ref. 17.)

Key words: LRP — lung resistance-related protein, immunohistochemistry, lung tissue.

Abstrakt

Rybárová S., Bateková M., Hodorová I., Miroššay A., Kluchová D., Bobrov N., Kočíšová M.:

Imunohistochemický dôkaz proteínu LRP v zdravom tkanive pľúc človeka

Bratisl. lek. Listy, 102, 2001, č. 2, s. 66–72

Cieľom tejto práce bol imunohistochemický dôkaz LRP (lung resistance-related protein), ktorý patrí medzi proteíny spôsobujúce mnohobočetnú liekovú rezistenciu (MDR). LRP sa nachádza vo vysokých koncentráciách v mnohých tkanivách zdravých orgánov, je lokalizovaný perinukleárne a plní dôležitú úlohu pri ochrane tkanív pred účinkom xenobiotík. Rezistentná nádorová bunka dopraví cytostatikum do perinukleárnej oblasti, odkiaľ ho následne redistribuuje späť do cytoplazmy. Zatiaľ je to len hypotéza, že regulácia cytoplazmatickej redistribúcie a nukleocytoplazmatický transport cytotoxických liekov sa deje prostredníctvom LRP.

Za účelom dôkazu LRP sme použili parafínové rezy zdravého pľúcného tkaniva, kde sme pozorovali jeho prítomnosť v dvoch lokalitách: 1. v bunkách bronchiálneho epitelu s riasinkami, 2. v alveolárnych makrofágoch. Pozitívne reagujúce bunky boli výrazne hnedo sfarbené. Negatívnu kontrolu sme vykonali nahradením primárnej protilátky základným premývacím roztokom. Výsledkom negatívnej kontroly bola negatívita epitelálnych buniek bronchov, ako aj alveolárnych makrofágov, ktoré zostali po ofarbení svetlé a nezmenené voči pozadiu, teda nereaktívne. (Obr. 5, lit. 17.)

Kľúčové slová: LRP — lung resistance-related protein, imunohistochemia, pľúcne tkanivo.

Many therapeutic methods and a lot of chemotherapeutic drugs were discovered, but the effectiveness of chemotherapy is often ineffective. Multidrug resistance — MDR is one of the most frequent causes of ineffectiveness of chemotherapy. MDR can deve-

Ojav mnohých terapeutických metód a prípravkov ešte nezaručuje úspešnosť liečby nádorových ochorení. Mnohobočetná lieková rezistencia známa pod skratkou „MDR“ — multidrug resistance vzniká ako odpoveď na liečbu cytostatikami a vyvíja sa individuál-

Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Safarikensis University, Kosice. rybars@pobox.sk

Institute of Pharmacology and Institute of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Safarikensis University, Kosice

Address for correspondence: S. Rybarova, MVD, PhD, Institute of Anatomy, LF UPJS, Srobarova 2, SK-040 01 Košice, Slovakia.

Phone: +421.95.622 8866

Ústav anatómie, Ústav farmakológie a Ústav súdneho lekárstva Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

Adresa: MVDr. S. Rybárová, PhD., Ústav anatómie LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice.

lope individually during chemotherapy. Tumour cells are able to redistribute the cytotoxic drugs within intracellular structures, even so they can act as cytotoxic drug efflux pumps and they transport drugs to the outside. Mechanism of drug efflux pumps depends on the utilization of energy from ATP hydrolysis to pump substrate (cytotoxic drug) across the cell membrane. From chemical point of view the efflux pumps are proteins. The first discovered was P-glycoprotein (Pgp), which is the cell membrane glycoprotein. It was identified by Juliano and Ling in 1976. Pgp belongs to a superfamily of ABC proteins (ATP-binding cassette), which use ATP as the energy source. ABC proteins have been strongly conserved across many species (Juliano and Ling, 1976).

The gene encoding the multidrug resistance-associated protein — MRP, was cloned in 1992. Similarly as Pgp it is a membrane glycoprotein belonging to the ATP-binding cassette superfamily of membrane proteins (Cole et al., 1992; Grant et al., 1994; Krishnamachary and Center, 1993). Previously mentioned proteins are both localized in the plasma membrane.

The next MDR protein is LRP — lung resistance-related protein, which was recently identified in resistant lung cancer cell line (Scheper et al., 1993). The LRP gene is located on chromosome 16, close to the gene coding for multidrug resistance-associated protein — MRP (Slovak et al., 1993; Komarov et al., 1998). Molecular weight of LRP is 110-kDa. LRP is not a member of ABC superfamily of proteins and it does not belong to the plasma membrane proteins, because it is located in the perinuclear cell area. LRP is one of four human “vault” proteins which are shaped as hollow, barrel-like structures, being composed of two identical cup-like halves joined at their open ends. Vaults were discovered by Kedersha and Rome in 1986 when electron microscopy showed small ovoid bodies in rat liver vesicle preparations (Kedersha and Rome, 1991).

LRP may regulate nucleocytoplasmic as well as vesicular transport of different substrates including cytotoxic drugs. LRP was found to be present in most normal human tissues. The highest density of LRP was observed in epithelial cells with secretory and excretory functions, as well as in cells chronically exposed to xenobiotics.

Clinically, LRP expression was found to correlate with poor response to chemotherapy and adverse clinical outcome in acute myeloid leukemia and in advanced ovarian carcinoma (List et al., 1993; Izquierdo et al., 1994).

Material and methods

Positive control

Indirect enzymatic immunohistochemical method was used to detect LRP in paraffine sections of normal human lung tissue. Paraffine sections of tissue samples were cut 4 µm, they were then deparaffinized and washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing Tween. Then endogenous peroxidase was quenched in 3 % H₂O₂ for 30 min. Slides were placed in citrate buffer and treated in the microwave oven 2x5 min. Tissue sections were washed in PBS and sequentially exposed to the blocking solution containing 3 % casein and 2 % BSA (bovine serum albumin).

Anti-LRP mouse monoclonal antibody was used as a primary antibody (Transduction Laboratories, USA), at a concen-

ne rýchlo po začatí podávania týchto liekov. Nádorové bunky majú schopnosť redistribuovať liečivo v rámci intracelulárnych štruktúr, prípadne ho priamo eliminovať v pôvodnej alebo zmenenej forme späť do extracelulárneho priestoru. Na tomto procese sa zúčastňujú molekulárne štruktúry bunky, ktoré pracujú na spôsob efluxných púmp a sú závislé na dodávke energie. Z chemického hľadiska sú to proteíny, z ktorých najznámejší a najskôr objavený bol P-glykoproteín (Pgp). Opísali ho Juliano a Ling pred vyše 20 rokmi a patrí k rodine ABC-proteínov, t.j. ATP viažucich proteínov (ATP-binding cassette), ktoré sú stabilnou súčasťou živých organizmov na rozličnom stupni vývoja (Juliano a Ling, 1976). Oveľa neskôr roku 1992 bol opísaný gén pre „multidrug resistance-associated protein“ so skratkou MRP, ktorý tiež patrí do ABC rodiny (Cole a spol., 1992; Grant a spol., 1994; Krishnamachary a Center, 1993). Uvedené dva proteíny sú lokalizované v plazmatickej membráne buniek.

Pred niekoľkými rokmi bol v rezistentnej bunkovej línii karcinómu pľúc identifikovaný „lung resistance-related protein“ — LRP (Scheper a spol., 1993). Jeho gén je lokalizovaný na 16. chromozóme blízko génu kódujúceho MRP (Slovak a spol., 1993; Komarov a spol., 1998). Molekulová hmotnosť tohto proteínu je 110 kD. LRP nie je členom ABC rodiny proteínov a nepatrí ani medzi plazmatické membránové proteíny, pretože sa nachádza v perinukleárnej oblasti bunky. Je jedným zo štyroch „vault“ (klenbových) proteínov, ktoré majú súdkovitú štruktúru a skladajú sa z dvoch rovnakých polovic v tvare misiek. „Vaulty“ objavili roku 1986 Kedersha a Rome, ktorí v elektrónovom mikroskope pri pozorovaní vezikúl v bunkách pečene potkana videli malé ovoidné telieska (Kedersha a Rome, 1986; Rome a spol., 1991) lokalizované hlavne v cytoplazme buniek.

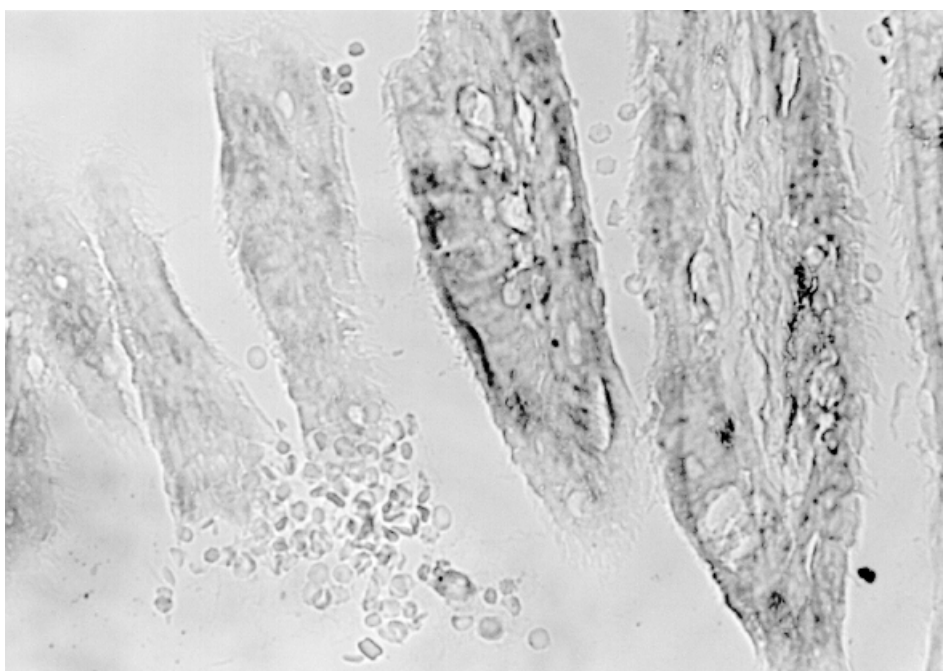
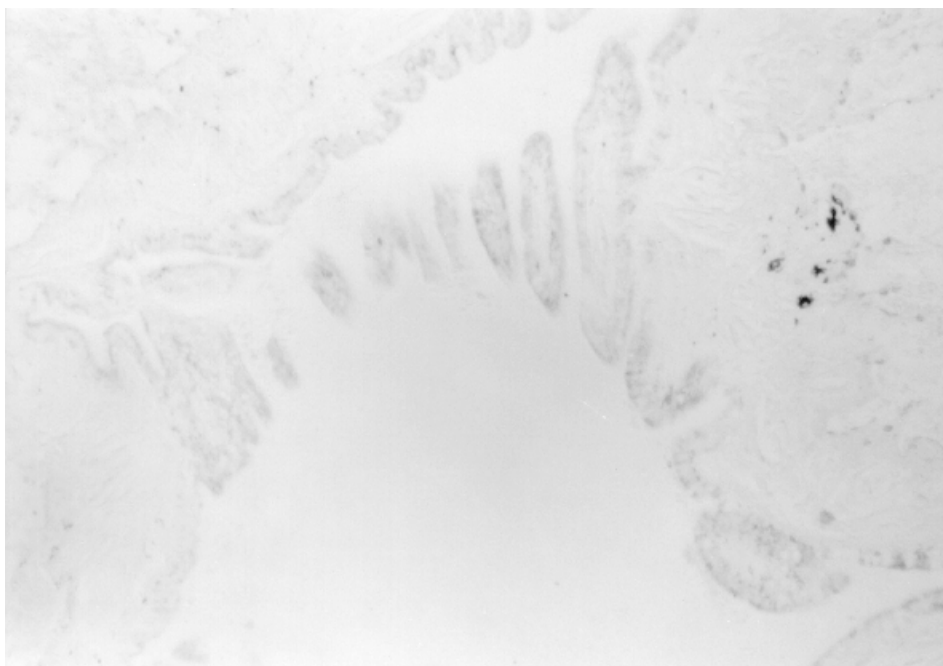
LRP reguluje nukleocytoplazmatický, ako aj vezikulárny transport rôznych substrátov vrátane cytotoxických liekov. Zistilo sa, že LRP sa nachádza vo vysokých množstvách vo väčšine zdravých ľudských tkanív. Jeho najvyššie koncentrácie sa však našli v epiteliálnych bunkách so sekrečnými a exkrečnými funkciami, ako aj v bunkách chronicky vystavených pôsobeniu xenobiotík.

Pri niektorých nádorových ochoreniach (akútna myeloidná leukémia, ovariálny karcinóm) je prítomnosť LRP nepriaznivým ukazovateľom, čoho dôsledkom je slabá odpoveď organizmu na chemoterapiu a zlá prognóza (List a spol., 1993; Izquierdo a spol., 1994).

Materiál a metódy

Pozitívna kontrola

Prítomnosť nami sledovaného proteínu LRP sme dokázali na parafínových rezoch zdravého pľúcneho tkaniva človeka, ktoré sme zafarbili nepriamou enzymatickou imunohistochemickou metódou. Použili sme rezy s hrúbkou 4 µm, ktoré sme odparafinovali a prepláchli základným premývacím roztokom (PBS + Tween). Nasledovalo zablokovanie endogénnej peroxidázovej aktivity 0,3 % H₂O₂ v metanole 30 min. Rezy sme prepláchli citrátovým tlmivým roztokom a v tom istom tlmivom roztoku krátko zohriali v mikrovlnnej rúre (približne 2x5 min). Po následnom opláchnutí v základnom premývacom roztoku sme blokovali nešpecifické farbenie blokačným roztokom, ktorý obsahoval 3 % odtučnené potravinárske mlieko a 2 % hovädzí sérový albumín. Ako primárnu protilátku sme použili myšiu monoklonálnu protilátku anti-LRP (Transduction Laboratories, USA) v koncentrácii 10 µg/ml riediaceho roztoku a ponechali pôsobiť vo vlhkej komôrke cez noc pri 4 °C. Po zliatí primárnej protilátky sme rezy opláchli a navrstvili na ne koziu sekun-



Figs 1, 2. Demonstration of LRP in normal human lung tissue in various magnifications. Bronchial epithelial cells are highly LRP positive, and coloured brown (magn. Fig. 1 x4, Fig. 2 x20).

Obr. 1, 2. Na tkanivovom reze zdravými pľúcami sledujeme pri rôznych zväčšeniach cylindrický epitel bronchu, ktorého bunky preukazujú výraznú expresiu LRP. Prítomnosť LRP sa prejavuje hnedým sfarbením buniek (zväčš. obr. 1 4-krát, obr. 2 20-krát).

tration 10 µg/ml PBS + Tween containing FCS (fetal calf serum) overnight at 4 °C. The secondary antibody, goat anti-mouse HRP (horseradish peroxidase) conjugated (Transduction La-

dárnu protilátku označenú enzýmom HRP (chrenová peroxidáza) (Transduction Laboratories, USA) nariedenú s riediacim roztokom v pomere 1:2000. Ponechali sme ju pôsobiť tiež vo vlhkej komôrke

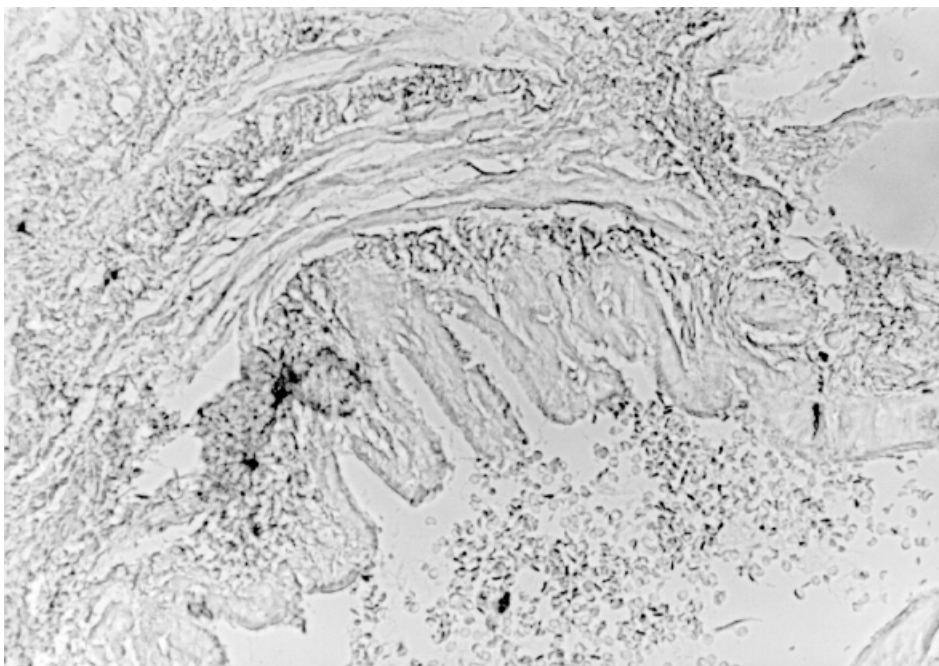


Fig. 3. Negative control of bronchial epithelium — epithelial cells are negative, the same as the background (magn. x10).

Obr. 3. Negatívna kontrola epitelu bronchov — bunky cylindrického epitelu zostali nesfarbené a teda nezmené voči okoliu (zväčš. 10-krát).

boratories, USA) was diluted with the same solution as primary antibody at a concentration 1:2000. The secondary antibody was applied for 60min at room temperature in humidified chamber. After rinsing the slides were incubated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) for 20 min. The sections were finally rinsed and coverslipped. Light microscopy was used for final examination.

Negative control

Negative control included PBS alone in place of the primary antibody. The next steps were the same as the positive control.

Results

Presence of LRP was observed in the areas which contain this protein as a brown and dark brown staining (Fig. 1—5). We have concentrated in the normal human lung to the bronchial epithelium, where we detected the expression of LRP in cylindrical epithelial cells with their cilia. Bronchial epithelial cells showed strong positivity within the whole epithelium. High expression of LRP was found also in the alveolar macrophages. In this area we observed a difference between alveolar macrophages and adjacent tissue, which was light grey coloured and showed no reactivity.

Negative control served as a proof of correct immunostaining methodology, sensitivity of antibodies and other chemicals we have used. In this case no reactivity was observed and no one LRP positive structure was found. Within the whole tissue section bronchial cylindrical epithelial cells, alveolar macrophages

1 h pri izbovej teplote. Po následnom opláchnutí v premývacom roztoku sme aplikovali roztok DAB-u (Sigma, Germany), ktorý sme nechali pôsobiť 20 min. Rezy sme opäť premyli a mokré zamontovali do montážneho média. Zhotovené preparáty sme prehliadali vo svetelnom mikroskope a vyhodnocovali.

Negatívna kontrola

Negatívna kontrola pozostávala z vynechania aplikácie primárnej protilátky a jej nahradenia základným premývacím tlmivým roztokom. Ďalší postup bol rovnaký ako pri pozitívnej kontrole.

Výsledky

Prítomnosť LRP sa nám javila vo forme hnedého až tmavohnedého sfarbenia lokalít, ktoré obsahujú sledovaný proteín. V zdravom pľúcnom tkanive sme sa sústredili na výstelku bronchov, kde sme pozorovali expresiu LRP v bunkách cylindrického epitelu s riasinkami. LRP pozitivita sa prejavila hnedým (na čiernobielym obraze tmavým) sfarbením týchto buniek v rozsahu celej výstelky bronchov. Vysokú koncentráciu LRP sme zaznamenali v alveolárnych makrofágoch, ktoré sú ďalšou lokalitou výskytu tohto proteínu. Ich jasné tmavohnedé sfarbenie sa výrazne odlišovalo od okolitého svetlého tkaniva, ktoré preukazovalo negativitu.

Negatívna kontrola nám potvrdila správnosť metodického postupu a funkčnosť chemikálií, ktoré sme použili, pretože v tomto prípade sme v zhotovených preparátoch nepozorovali žiadnu pozitivitu, čiže expresiu proteínu LRP. Bunky cylindrického epitelu bronchov, alveolárne makrofágy, ako aj ostatné tkanivo zostali

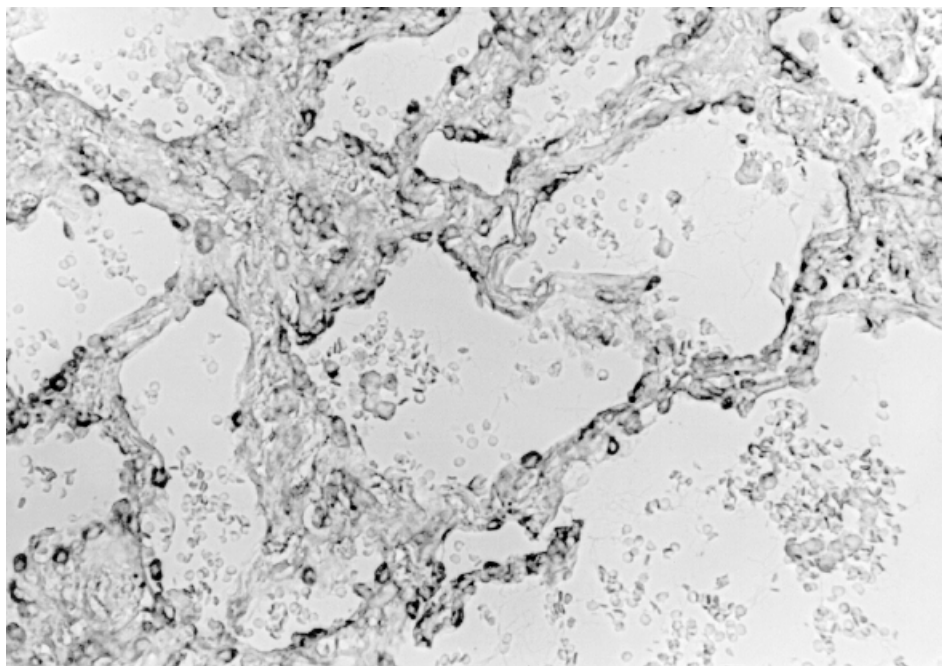


Fig. 4. Dark coloured alveolar macrophages express high level of LRP (magn. x10).

Obr. 4. Tmavo sfarbené alveolárne makrofágy sú dôkazom prítomnosti LRP v týchto bunkách (zvčš. 10-krát).

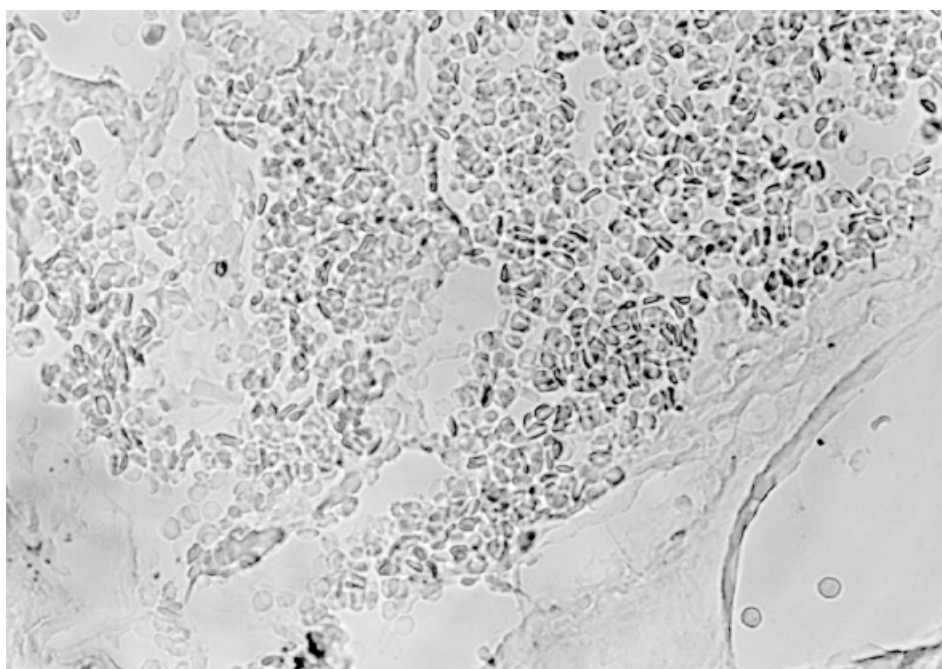


Fig. 5. Negative control included the omitting of primary antibody. Negative reaction was proved correct immunostaining methodology. Alveolar macrophages showed no reactivity (magn. x10).

Obr. 5. Negatívna kontrola bez použitia primárnej profilátky potvrdila správnosť metodického postupu. Ani v tomto prípade nepozorujeme prítomnosť LRP v alveolárnych makrofágoch, tieto sú rovnorodo svetlosivo sfarbené, nevykazujúce reaktivitu (zvčš. 10-krát).

and other adjacent tissue stayed light grey coloured showed no LRP positivity.

Discussion

Using immunohistochemistry we have proved the density of LRP in normal human lung. We have used classical immunohistochemical method. Despite of our previous experiences to immunohistochemistry there were some difficulties in staining procedure.

According to our needs, some details have been partly modified and obtained results were excellent with intense color reaction.

The highest concentration of LRP was detected in bronchial cylindrical epithelial cells and in the alveolar macrophages. In agreement with LRP distribution, vaults are most abundant in epithelial cells and macrophages (Kedersha and Rome, 1991). Most vaults are present in the cytoplasm and most cells contain thousands of vaults, but their exact function is still not fully understood. A small fraction of vaults is localized to the nuclear membrane and "nuclear pore complexes" — NPC (Chugani et al., 1993). Localization and structural similarities of vaults and NPC raises the possibility that vaults constitute the central plugs of the NPCs. This supports the hypothesis that vaults mediate the bidirectional transport of substrates between the nucleus and the cytoplasm (Chugani et al., 1993).

High LRP expression was observed in tissues chronically exposed to xenobiotics (e.g. bronchial epithelium, epithelia of digestive tract, keratinocytes), in metabolically active tissues (e.g. cortex of adrenal gland) and in macrophages. Varying levels of LRP were detected in other organs (Izquierdo et al., 1996).

In normal cells LRP plays a protective role against xenobiotics. There is evidence, that in human malignancies cells retain this function and thus neutralize the cytotoxic effect of anticancer drugs. LRP distribution is not uniform among different types of tumors. LRP is expressed in a minority of cases in highly chemosensitive cancers (e.g. leukemias, neuroblastoma). Partially chemosensitive cancers (e.g. ovarian carcinoma) show LRP in a large proportion of cases. Largely LRP positive are cancers refractory to chemotherapy, e.g. colon, renal and pancreatic cancers (Izquierdo et al., 1996).

It is just hypothesis today, that LRP and other drug resistance-associated proteins as Pgp and MRP, play a very important role in defence against xenobiotics. The relation of LRP, as well as of Pgp and MRP, to drug resistance was studied in a model of 61 human cancer cell lines at the National Cancer Institute (USA) for screening of new anticancer drugs. They have used immunocytochemistry and found that 78 % and 87 % of the cell lines express LRP and MRP. These findings suggest that LRP and MRP are wide — spread in human malignancies (Izquierdo et al., 1996). In contrast, P-gp was observed at relatively low concentrations in 24 % of the cell lines. If compared to Pgp and MRP, LRP showed the greatest individual value as a marker of *in vitro* resistance to both MDR-related drugs, doxorubicine and vincristine (Izquierdo et al., 1996). Drug resistance associated to LRP seems to be broad, it includes drugs which are not transported by Pgp or MRP (Izquierdo et al., 1996).

rovnorodo svetlosivo sfarbené bez akéhokol'vek náznaku reaktivity v celom rozsahu tkanivových rezov.

Diskusia

Použili sme klasický model imunohistochemickej metódy, ktorý sme však museli v jednotlivých krokoch zmeniť, prispôbiť a sfunkčniť tak, aby výsledok bol vierohodný a spĺňal naše predstavy o kvalite vyhotovených imunohistochemických preparátov.

Dôvodom výberu zdravého pľúcneho tkaniva ako modelového orgánu pre imunohistochemický dôkaz LRP bolo, že tento proteín sa nachádza vo vysokých koncentráciách v orgánoch, ktoré prichádzajú najčastejšie do styku s cudzorodými látkami, akými pľúca nepochybne sú.

Najvyššie koncentrácie LRP sme detegovali v bunkách cylindrického epitelu bronchov a v alveolárnych makrofágoch. Táto distribúcia priamo súvisí všeobecne s veľkým výskytom „vaultov“ v epiteliálnych bunkách (Kedersha a Rome, 1991). „Vaulty“, ktoré sú nosičmi LRP, sa nachádzajú predovšetkým v cytoplazme a väčšina buniek obsahuje tisíce „vaultov“. Ich presná funkcia však dnes ešte nie je známa. Malé frakcie „vaultov“ sa nachádzajú v jadrovej membráne a v jadrových pórových komplexoch — nuclear pore complexes (NPC) (Chugani a spol., 1993). Lokalizácia a štruktúrna podobnosť „vaultov“ s NPC súvisí zrejme s ich funkciou, ktorá pravdepodobne spočíva v obojsmernom transporte rôznych substrátov medzi jadrom a cytoplazmou (Chugani a spol., 1993).

Vysoká expresia LRP bola dokázaná v bunkách tkanív, ktoré boli chronicky vystavené pôsobeniu xenobiótik (bronchiálny epitel, epitel tráviaceho traktu, keratinocyty), v metabolicky aktívnych tkanivách (napr. kôra nadobličky) a v alveolárnych makrofágoch. V ostatných orgánoch sa zistili varírujúce hladiny LRP (Izquierdo a spol., 1996).

V prípade maligných zmien si bunky uvedených tkanív zachovávajú tie isté hodnoty LRP, ktorý má v tomto prípade negatívnu úlohu, pretože neutralizuje cytotoxický efekt cytostatík. Je potrebné zdôrazniť, že distribúcia tohto proteínu je odlišná pri rôznych typoch tumorov. Vysokochemosenzitivne tumory (napr. leukémie, neuroblastóm) exprimujú LRP len v zriedkavých prípadoch, čiastočne chemosenzitivne nádory (napr. ovariálny karcinóm) v oveľa väčšej miere, a nádory refraktérne voči chemoterapii (kolorektálny, renálny a karcinóm pankreasu) boli výrazne LRP pozitívne vo väčšine prípadov (Izquierdo a spol., 1996). Za súčasného stavu poznatkov o LRP a jemu príbuzných proteínoch (MRP a Pgp) sa dnes mnohé práce zaoberajú otázkou, nakoľko a či vôbec ovplyvňuje prítomnosť LRP v nádorových bunkách ich odpoveď na chemoterapiu a prognózu nádorových ochorení. V Národnom inštitúte pre výskum rakoviny v USA (National Cancer Institute) sledovali na modeli 61 typov humánných rakovinových bunkových línií expresiu LRP, MRP a P-gp v nich a ich vzťah k novým protinádorovým liekom. Použitím imunocytochémie zistili, že 78 % bunkových línií exprimuje LRP a až 87 % obsahuje MRP, pričom P-glykoproteín bol detegovaný len v 24 % bunkových línií. Z toho vyplýva, že LRP a MRP a s nimi spojený mechanizmus rezistencie je veľmi rozšírený pri humánných malignitách (Izquierdo a spol., 1996).

Spomedzi troch najznámejších MDR-proteínov má LRP najvyššiu individuálnu hodnotu ako marker rezistencie proti liekom vinkristín a doxorubicín *in vitro* (Izquierdo a spol., 1996).

Zdá sa, že mnohopočetná lieková rezistencia spôsobená proteínom LRP má oveľa širší záber ako pri MRP a P-gp, pretože

The expression of LRP in the ovarian tumors of 57 women indicated that LRP-positive tumors had a significantly low response to chemotherapy based on platinum and alkylating — agents. It was associated with shorter interval until tumor progression and shorter overall survival (Izquierdo et al., 1995). Hart and co-workers obtained similar results from 60 patients with acute myeloid leukemia (Hart et al., 1996).

According to these findings LRP has a strong prognostic value in different cancers treated with various chemotherapeutics. Certainly, full proof for whether and how this mechanism actually transports drugs still remains unknown. Nevertheless, the molecular, genetic and clinical data are good reasons for further studies the role of LRP — vault protein, in clinical anticancer drug resistance.

Literatúra

Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M.V., Deeley R.G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug — resistente human lung cancer cell line. *Science*, 258, 1992, s. 1650—1654.

Grant C.E., Valdimarsson G., Hipfner D.R., Almquist K.C., Cole S.P.C., Deeley R.G.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.*, 54, 1994, s. 357—361.

Hart S.M., Ganeshaguru K., Scheper R.J., Hoffbrand A.V., Mehta A.B.: Expression of the human major vault protein in haematological malignancy. *Blood*, 86, 1996, Suppl. 1, s. 40a.

Chugani D.C., Rome L.H., Kedersha N.L.: Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.*, 106, 1993, s. 23—29.

Izquierdo M.A. et al.: Prognostic significance of the drug resistance associated protein LRP in advanced ovarian carcinoma. *Ann. Oncol.*, 5, 1994, Suppl. 8, s. 98.

Izquierdo M.A., Vanderzee A.G.J., Vermorken J.B.: Drug resistance-associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognosis in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 1995, s. 1230—1237.

Izquierdo M.A., Shoemaker R.H., Flens M.J.: Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int. J. Cancer*, 65, 1996, s. 230—237.

Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J.: Expression of the non-P-glycoprotein multidrug resistance associated protein LRP in normal human tissues and tumors. *Amer. J. Pathol.*, 148, 1996, s. 877—887.

zahňa aj také lieky, ktoré nie sú vypudzované proteínmi MRP a P-glykoproteínom (Izquierdo a spol., 1996).

Izquierdo a spol. (1995) sledovali 57 žien s ovariálnym karcinómom a zistili, že LRP pozitívne tumory mali výrazne zníženú odpoveď na chemoterapiu na báze platiny a alkylačných látok, čas progresie nádoru bol oveľa kratší a celková doba prežívania výrazne skrátená. Podobné výsledky získali Hart a spol. (1996) u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou.

Tieto výsledky, ako aj poznatky iných autorov nasvedčujú, že LRP má vysokú prognostickú hodnotu pri rôznych typoch tumorov. Jednoznačný dôkaz mechanizmu, akým tento proteín pracuje na transporte a efluxe liečiv, dnes ešte nemáme, napriek tomu známe molekulárne, genetické a klinické údaje sú dostatočným dôvodom pre ďalšie štúdium funkcie LRP — „vault“ proteínu, pri rezistencii nádorových buniek proti cytostatickej liečbe.

Juliano R.L., Ling V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 1976, s. 152—162.

Kedersha N.L., Rome L.H.: Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle-large structures contain a single species of small RNA. *J. Cell Biol.*, 103, 1986, s. 699—709.

Kedersha N.L., Heuser J.E., Chugani D.C., Rome L.H.: Vaults III. Vault ribonuclein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J. Cell Biol.*, 112, 1991, s. 225—235.

Komarov P.G., Shtil A.A., Holian O., Tee L., Buckingham L., Mechtner E.B., Roninson I.B., Coon J.S.: Activation of the LRP (lung resistance-related protein) gene by short-term exposure of human leukemia cells to phorbol ester and cytarabine. *Oncol. Res.*, 10, 1998, s. 185—192.

Krishnamachary N., Center M.S.: The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.*, 53, 1993, s. 3658—3661.

List A.F. et al.: Non-P-glycoprotein (Pgp) mediated multidrug resistance (MDR): Identification of a novel drug resistance phenotype with prognostic relevance in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 82, 1993, Suppl. 1, s. 443a.

Rome L.H., Kedersha N.L., Chugani D.C.: Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol.*, 1, 1991, s. 47—50.

Scheper R.J., Broxterman H.J., Scheffer G.L.: Overexpression of a M_r 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*, 53, 1993, s. 1475—1479.

Slovak M.L., Pelkey H.J., Bhardwaj G., Kurz E.U., Deeley R.G., Cole S.P.C.: Localization of a novel multidrug resistance associated gene in the HT 1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer Res.*, 53, 1993, s. 3221—3225.

Received January 11, 2001.

Accepted February 14, 2001.