

La resistenza multipla ai farmaci antitumorali

La refrattarietà di un tumore alla chemioterapia potrebbe dipendere da una pompa proteica che espelle i farmaci dalle cellule: chiarendo questo meccanismo si potranno forse approntare nuove strategie farmacologiche

di Norbert Kartner e Victor Ling

Quando la signora Smith si lamentò con il suo medico curante di crampi addominali questi, dopo un attento esame, la indirizzò a una clinica del luogo, specializzata nella cura del cancro; qui le venne diagnosticato un cancro addominale e la paziente fu messa subito in lista per essere operata. Nonostante il buon esito dell'asportazione del tumore primario, il cancro, come spesso accade, si era già ampiamente disseminato in altri tessuti. La paziente fu sottoposta a chemioterapia con una combinazione di farmaci antitumorali, metodo di elezione in caso di metastasi non curabili chirurgicamente o con radioterapia. La risposta della paziente sembrò un miracolo. A giudicare da tutti gli esami diagnostici, il cancro sembrava scomparso. Tre mesi dopo, nel corso di un normale controllo, la signora Smith mostrò una ricaduta: erano comparse metastasi in diversi organi. Fu sottoposta a un secondo ciclo di chemioterapia, ma la risposta fu scarsa. Un mese dopo le venne praticato un terzo ciclo di chemioterapia, con farmaci diversi, ma senza alcun effetto sulla proliferazione tumorale. Dopo tre settimane ella morì.

Perché la chemioterapia, che inizialmente aveva dato risultati così positivi, doveva alla fine fallire? E perché alcuni tumori sono curabili con il solo trattamento chemioterapico, mentre altri non rispondono ai farmaci e paiono incurabili? Queste domande non sono una novità. In effetti, la resistenza dei parassiti e degli agenti di malattie infettive agli antibiotici è vecchia quanto la stessa chemioterapia. Il patologo tedesco Paul Ehrlich, padre di quest'ultima, aveva pensato di realizzare «pallottole magiche» per colpire molte malattie che affliggevano l'umanità, ma dopo aver sperimentato per decenni farmaci antimicrobici fu costretto ad ammettere che la resistenza ai farmaci aveva seguito «come un'ombra fedele» il loro sviluppo.

Dato che il trattamento chemioterapico del cancro ha le sue radici nella chemioterapia antimicrobica in continuo sviluppo dall'inizio del secolo, la resistenza clinica ai farmaci antitumorali non si presentò come un fenomeno del tutto inatteso. Un decennio prima che la chemioterapia per il cancro venisse introdotta in campo clinico (il che avvenne subito dopo la seconda guerra mondiale), esperimenti con tumori trapiantati nei topi avevano già dimostrato la comparsa di una resistenza progressiva a farmaci sperimentali. Da allora in poi si continuarono a isolare tumori sperimentali resistenti a ogni classe di farmaci antitumorali e sembra che tutti gli esseri viventi, comprese le cellule che costituiscono un tumore, siano in grado di rendersi resistenti ai farmaci che altrimenti li ucciderebbero.

La causa della progressiva resistenza ai farmaci, nel caso sia di malattie infettive sia di malattie tumorali, è sempre la stessa. In tutte le cellule viventi accadono mutazioni genetiche spontanee che danno origine a caratteri che possono essere trasmessi alle generazioni successive. In qualunque popolazione cellulare, i mutanti resistenti a un dato farmaco sono presenti con una frequenza compresa tra uno su 10^5 e uno su 10^8 cellule. Come può un evento così raro influire sul risultato della chemioterapia? Per dare una risposta a questa domanda, occorre innanzitutto considerare le dimensioni microscopiche della cellula e i limiti dei metodi per la diagnosi precoce del cancro.

Un tumore di dimensioni medie, per esempio con un diametro di un centimetro, contiene già centinaia di milioni di cellule, alcune delle quali sono probabilmente resistenti ai farmaci. Pertanto, malgrado la rarità delle mutazioni che producono resistenza ai farmaci, sembra che i tumori che contengono qualche cel-

lula resistente già al momento della diagnosi costituiscano con tutta probabilità la norma. Si può prevedere così quale risultato si otterrà trattando un simile tumore con un singolo farmaco. All'inizio si osserverà una remissione: come risultato della morte delle cellule sensibili al farmaco, che sono predominanti, il tumore si contrarrà fino a raggiungere una dimensione non più riconoscibile. Ma le cellule superstiti resistenti al farmaco, le cui discendenti sono anch'esse tutte resistenti, continueranno a moltiplicarsi e, alla fine, prevarranno nella popolazione delle cellule tumorali; pertanto il tumore crescerà fino a raggiungere una dimensione tale da provocare la morte del paziente. È stato confermato che anche una sola cellula resistente ai farmaci, introdotta in un tumore altrimenti curabile trapiantato in un topo, continua a moltiplicarsi nel corso della chemioterapia fino a predominare nella popolazione delle cellule tumorali e a dar luogo a un tumore incurabile.

La soluzione al problema sembrerebbe piuttosto semplice. In teoria, il trattamento iniziale con una combinazione di farmaci che agiscono in modo diverso dovrebbe precludere lo sviluppo di un tumore resistente, perché la probabilità che due o più mutazioni che danno resistenza a differenti farmaci compaiano spontaneamente nella stessa cellula è esigua. La chemioterapia basata su una combinazione di farmaci sembrava dunque la soluzione del problema.

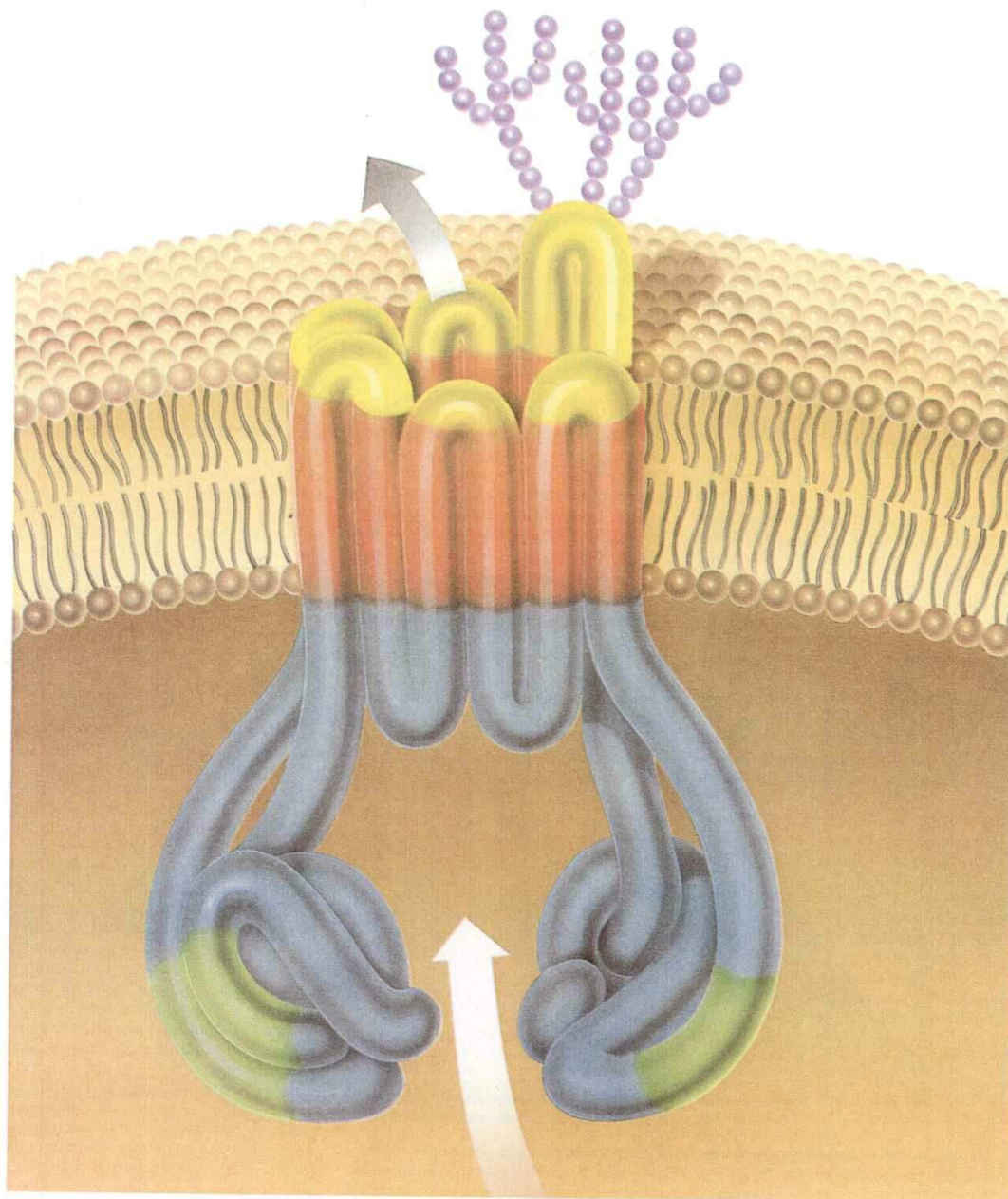
Nella prima metà di questo secolo, una delle pietre miliari della ricerca farmacologica fu il riconoscimento della necessità di disporre di un arsenale di farmaci senza insistere nella ricerca di una singola «pallottola magica» da utilizzare per la cura di malattie infettive in fase avanzata. La maggior parte dei principi della chemioterapia antimicrobica fu adottata di buon grado dagli oncologi che da una parte sollecitavano la ricerca

e la produzione di nuovi farmaci e dall'altra studiavano protocolli per la somministrazione combinata di farmaci. Sia la produzione di nuovi farmaci sia la chemioterapia basata su una combinazione

di farmaci diversi permisero, circa due decenni fa, di conseguire concreti successi, con tassi elevati di guarigione in alcune forme di leucemia dell'infanzia e nel morbo di Hodgkin. Ma i tumori più

mortali e diffusi, come i carcinomi del polmone, della mammella e dell'apparato gastrointestinale, rimasero refrattari a questo genere di cure.

Questi insuccessi sconcertanti, soprat-



La glicoproteina P si trova nella membrana cellulare, dove probabilmente serve a pompare le tossine fuori dalla cellula. Questo modello della sua struttura si basa sulla sequenza nota degli amminoacidi componenti. Si pensa che la catena di amminoacidi si snodi attraverso il doppio strato lipidico della membrana per 12 volte, for-

mando un poro a 12 lati. La breve parte della proteina sporgente all'esterno porta le catene dei carboidrati (*in viola*) mentre due domini grandi e quasi identici «pescano» nella cellula. Essi includono regioni (*in verde*) che si legano all'ATP, il composto che probabilmente fornisce l'energia necessaria all'espulsione delle tossine (*freccie*).

tutto quelli della chemioterapia basata sulla combinazione di farmaci, sembravano sfidare ogni capacità di comprensione. Per spiegare le osservazioni furono proposte molte teorie, ma poche poterono essere verificate in modo adeguato. Mentre la chemioterapia sperimentale nei topi muoveva i suoi primi passi, si riconobbe che la resistenza simultanea a diversi farmaci era inaspettatamente frequente. La ricerca si concentrò, tuttavia, sul fenomeno più facilmente comprensibile della resistenza a singoli agenti. Solo alla fine degli anni sessanta, quando si cominciarono a effettuare esperimenti *in vitro* con cellule tumorali resistenti ai farmaci, il problema della resistenza multipla riaffiorò e si ebbero le prime scoperte sul «fenotipo della resistenza multipla ai farmaci».

Le osservazioni compiute consentirono di definire le caratteristiche fondamentali della resistenza multipla ai farmaci. Anche se i mutanti resistenti venivano selezionati per mezzo di un singolo farmaco antitumorale, spesso essi erano simultaneamente resistenti a farmaci del tutto diversi tra loro (possedevano cioè una resistenza incrociata). Numerosi esperimenti genetici indipendenti consentirono di osservare che in tutti i casi la resistenza multipla era dovuta a un'unica mutazione. In altre parole, un singolo

gene poteva essere responsabile della resistenza incrociata multipla a farmaci non affini.

Questo concetto ebbe tre conseguenze importanti. Spinse la ricerca a trovare il gene per la resistenza multipla in tumori sperimentali, stimolò le indagini sull'effetto di quel gene e fornì una spiegazione razionale degli insuccessi in cui era incorsa la chemioterapia combinata. Poiché la mutazione che provoca la resistenza a un singolo farmaco è un evento raro, l'acquisizione di mutazioni multiple da parte di una stessa cellula, con conseguente resistenza a farmaci diversi, dovrebbe essere estremamente improbabile. L'esistenza di un fenotipo della resistenza multipla conseguente a una singola mutazione poteva spiegare perché la resistenza alla chemioterapia basata sulla combinazione di molti farmaci fosse un evento frequente. Ma come poteva un singolo gene avere un effetto così ampio?

Lavorando con vari sistemi biologici, i ricercatori avevano trovato che le cellule resistenti a un farmaco in un modo o nell'altro riuscivano a «escluderlo». Questa osservazione suggerì l'esistenza di un meccanismo in grado di spiegare il fenomeno: sembrava che vi fosse una barriera che teneva il farmaco fuori dalla cellula; se esso fosse penetrato nell'interno avrebbe esercitato un effetto leta-

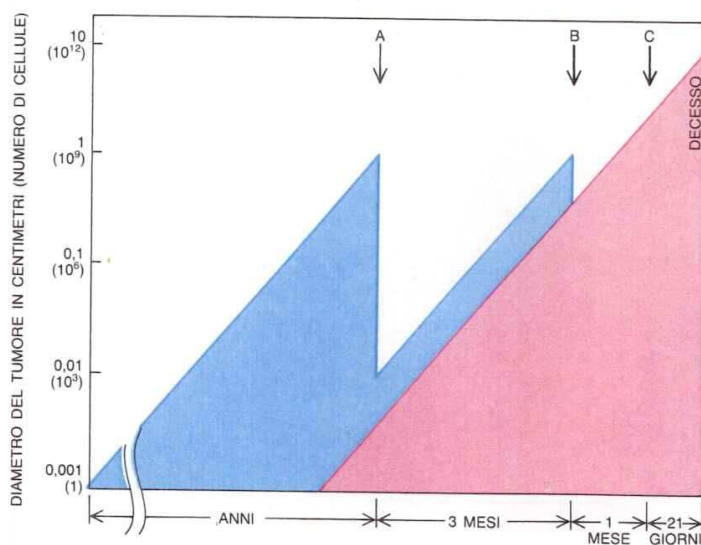
le. Per spiegare questa osservazione furono avanzate due teorie.

Una teoria proponeva l'esistenza nelle cellule resistenti di una barriera in grado di impedire l'ingresso del farmaco. L'altra suggeriva che in quelle cellule fosse presente una «pompa di efflusso», cioè un meccanismo in grado di espellere attivamente il farmaco dalla cellula dopo che esso era penetrato al suo interno. Questo secondo modello era basato su osservazioni riguardanti la cinetica del flusso di farmaci verso l'interno e l'esterno della cellula. Si riscontrò che, quando una cellula resistente veniva temporaneamente intossicata con cianuro per inibire la sua produzione di energia, essa si comportava come se fosse sensibile ai farmaci, cioè non riusciva a impedire che essi penetrassero nel suo interno. Quando il cianuro veniva eliminato e si reintegrava il normale metabolismo della cellula, questa riusciva di nuovo a escludere i farmaci. Inoltre riusciva a pompare fuori anche i farmaci che si erano accumulati nel suo interno mentre era intossicata dal cianuro. Pertanto la spiegazione più semplice sembrava essere quella di una pompa per l'espulsione dei farmaci dipendente dall'energia.

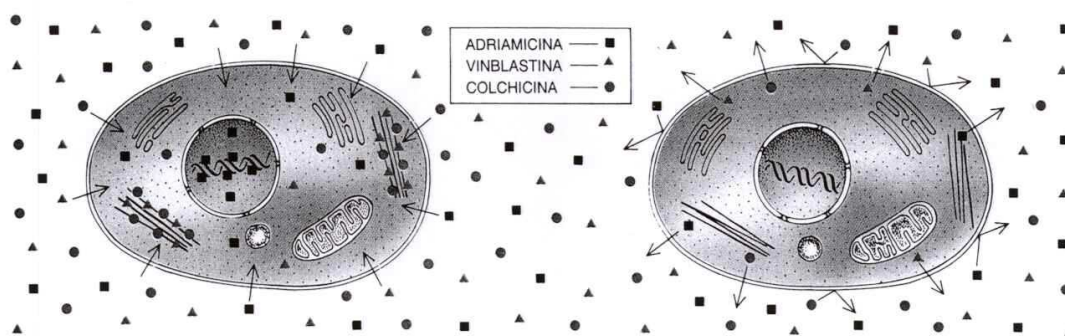
Qualunque fosse realmente il meccanismo che consentiva di tener fuori i farmaci dalla cellula, due punti sembravano chiari. Da una parte, esso doveva essere piuttosto aspecifico, cioè in grado di funzionare con farmaci aventi struttura molecolare diversa. Dall'altra, essendo la membrana superficiale della cellula (la membrana plasmatica) la prima linea di difesa contro l'ingresso dei farmaci, la differenza tra cellule sensibili e cellule resistenti ai farmaci doveva probabilmente essere cercata in questa struttura.

Forse la prima prova diretta di un'alterazione specifica della membrana plasmatica nella resistenza multipla ai farmaci emerse dai nostri studi sulle cellule di criceto cinese resistenti alla colchicina, effettuati in collaborazione con Rudolph L. Juliano e poi con John R. Rordam, entrambi dell'Hospital for Sick Children di Toronto. Decidemmo di separare i componenti della membrana plasmatica delle cellule di criceto cinese mediante elettroforesi su gel, una tecnica in cui le molecole vengono spostate nel gel da un campo elettrico e quindi separate in base alle loro dimensioni.

Il procedimento rivelò che nelle cellule resistenti ai farmaci era presente una glicoproteina particolare, che sembrava invece assente nelle cellule sensibili. Le glicoproteine sono molecole complesse, che sono composte da una proteina e da un carboidrato e sono generalmente associate alla membrana plasmatica. La glicoproteina in questione era piuttosto grande (il suo peso molecolare si aggirava sui 170 000 dalton) ed era associata in modo specifico alla membrana plasmatica. Per la sua associazione con la barriera di permeabilità ai farmaci che accompagnava il fenomeno della resistenza



L'insuccesso della chemioterapia spesso segue un successo iniziale. In questo modello semplificato della progressione del cancro, il primo ciclo di chemioterapia (A) ha successo: il tumore si riduce a dimensioni non più riconoscibili per l'uccisione di quasi tutte le cellule sensibili al farmaco (in azzurro). Una piccolissima popolazione di cellule mutanti resistenti al farmaco (in rosso), però, cresce esponenzialmente via via che la popolazione sensibile al farmaco si ricostituisce. La ricomparsa del tumore porta a un secondo ciclo di chemioterapia (B). Esso riduce di nuovo la popolazione di cellule sensibili al farmaco, ma non ha effetto sulla popolazione, ormai cospicua, di cellule resistenti. Un ciclo finale di chemioterapia (C) non ha più effetti evidenti e la crescita tumorale incontrollata uccide il paziente.



La resistenza multipla ai farmaci consente a una cellula di far fronte a molecole tossiche diverse per dimensione, struttura e sito d'azione nella cellula. Un comune farmaco antitumorale, l'adriamicina, agisce nel nucleo di una cellula sensibile (a sinistra) interferendo con la trascrizione del DNA e con la sua sintesi nella divisione cellulare.

La vinblastina e la colchicina, usate in chemioterapia e negli studi sulla resistenza ai farmaci, agiscono sui microtubuli, che hanno un ruolo importante nella divisione cellulare. L'esistenza di una barriera passiva o di una pompa attiva nella membrana cellulare spiegherebbe la resistenza simultanea ad agenti così diversi (a destra).

multipla la chiamammo glicoproteina P.

Non molto dopo il nostro primo annuncio della scoperta della glicoproteina P in cellule di criceto cinese, altri gruppi riferirono di avere ottenuto risultati analoghi. Ogni gruppo lavorava con un diverso sistema di coltivazione *in vitro*. Numerose cellule di topo, di criceto e umane furono selezionate per la resistenza all'uno o all'altro di una vasta gamma di farmaci: adriamicina, colchicina, daunomicina, vinblastina, vincristina e così via. Tutti questi sistemi mostrarono un'ampia resistenza incrociata a farmaci diversi, un minor accumulo intracellulare dei farmaci in questione e alterazioni a livello della membrana plasmatica. Tra tutte le alterazioni osservate, la più costante era la comparsa di una glicoproteina della superficie cellulare ad alto peso molecolare, analoga per dimensioni alla glicoproteina P. Questi risultati ci indussero a chiederci se i vari fenomeni potessero essere collegati.

Per poter rispondere a questa domanda occorre strumenti più specifici e quindi abbiamo deciso di adottare il metodo immunochimico. Questo procedimento comporta la disponibilità di anticorpi riconoscibili che aderiscono a una molecola specifica, per esempio la glicoproteina P, in modo da poterla isolare e studiare. Per poter produrre questi anticorpi dotati di un'elevata specificità, detti anticorpi monoclonali, abbiamo iniettato innanzitutto in topi membrane plasmatiche purificate provenienti da cellule dotate di resistenza multipla ai farmaci. Quindi, fondendo cellule di milza di questi topi immunizzati con cellule tumorali immortali, abbiamo ottenuto cloni di cellule ibride identiche secernti anticorpi. Infine abbiamo isolato i cloni che secernevano gli anticorpi monoclonali per la glicoproteina P.

Successivamente, abbiamo cercato di determinare se una maggiore quantità di

glicoproteina P fosse correlata con un elevato grado di resistenza incrociata. Per fare questo abbiamo utilizzato la tecnica denominata «immunoassorbimento», in cui gli anticorpi servono per identificare la glicoproteina P in un miscuglio complesso di proteine e di glicoproteine separate mediante elettroforesi su gel. Come ci aspettavamo, nelle cellule di criceto cinese sensibili ai farmaci la tecnica di immunoassorbimento ha dimostrato una scarsissima presenza di glicoproteina P, mentre una quantità progressivamente maggiore è stata osservata in linee cellulari che risultavano sempre più resistenti alla colchicina.

Avevamo previsto questo risultato. Quando utilizzammo lo stesso metodo per indagare su svariate linee cellulari forniteci da altri gruppi di ricerca, tuttavia, fummo sorpresi nel constatare che le linee cellulari di criceto cinese, di criceto siriano, di topo e umane, selezionate in base alla resistenza a una varietà di farmaci, mostravano tutte, nella membrana plasmatica, componenti simili alla glicoproteina P. Non solo queste componenti erano indistinguibili per le dimensioni, ma reagivano con gli stessi anticorpi che erano dotati di specificità elevata per la glicoproteina P delle cellule di criceto cinese.

Appariva dunque evidente che la glicoproteina P era una molecola conservativa, cioè una molecola che aveva mantenuto la sua identità strutturale in differenti specie di mammiferi. Inoltre, indipendentemente dalla specie di origine o dal farmaco usato per la selezione, le cellule resistenti mostravano tutte un notevole aumento del livello di espressione della glicoproteina P, in parallelo con lo sviluppo della resistenza ai farmaci. La conservazione della struttura nelle molecole biologiche sta a indicare di solito un importante ruolo funzionale di tali molecole; questa premessa, insieme al concetto dell'universalità dell'espressio-

ne della glicoproteina P in parallelo alla resistenza multipla ai farmaci, ebbe un'importanza fondamentale nello stabilire l'indirizzo delle nostre ricerche successive.

Sembrava dimostrato che la glicoproteina P avesse un ruolo importante nella resistenza multipla ai farmaci. Pertanto ci rivolgemmo agli strumenti della biologia molecolare che potevano darci la possibilità di osservare in dettaglio la struttura della molecola, con lo scopo di chiarirne la funzione. Il modo più proficuo per determinare l'ipotetica struttura di una proteina consiste nel trovare la sequenza genetica che la codifica e lo strumento più adatto per espletare questo compito è il DNA complementare, o c-DNA, corrispondente al DNA che codifica per la proteina le cui proprietà sono oggetto di studio.

Preparammo il c-DNA di cui avevamo bisogno in collaborazione con Riordan, il quale aveva allestito una genoteca di c-DNA estratto da cellule di criceto cinese molto resistenti alla colchicina. Una genoteca è una specie di archivio vivente di materiale genetico. Quella di Riordan consisteva di un miscuglio di batteri, ognuno dei quali era stato infettato da un batteriofago (virus batterico). I batteriofagi utilizzati erano ricombinanti, cioè il loro materiale genetico era portatore di un frammento di DNA estraneo: c-DNA derivato da RNA messaggero attivamente tradotto in varie proteine dalle cellule resistenti ai farmaci. (L'RNA messaggero, o m-RNA, fa da intermediario nel trasferimento dell'informazione genetica dal DNA alle proteine.) I frammenti di c-DNA erano inseriti in un gene virale che codificava per un enzima, la beta-galattosidasi. Quando il gene virale si inseriva nel materiale genetico dei batteri, questi esprimevano una beta-galattosidasi alterata, che conteneva un frammento protei-

co in più, quello codificato dal c-DNA.

Trovare il c-DNA che corrispondeva alla glicoproteina P in piastre contenenti decine di migliaia di colonie batteriche, ciascuna delle quali produceva un differente frammento proteico, sembrerebbe analogo a trovare il proverbiale ago nel pagliaio. Ma, muniti di un anticorpo monoclonale marcato con un tracciante radioattivo, che fungeva da «calamita» specifica per la glicoproteina P, riuscimmo rapidamente a identificare le cellule giuste. La coltivazione della colonia selezionata, in cui tutti i batteri erano originati da una singola cellula contenente un unico frammento di c-DNA, portò all'isolamento di un frammento clonato di c-DNA della glicoproteina P. Questo frammento poté quindi servire da sonda con cui eseguire l'ibridazione per assorbimento (*blotting hybridization*), uno dei metodi analitici più efficaci della biologia molecolare attuale.

L'ibridazione per assorbimento, in cui una sonda di c-DNA permette di identificare sequenze corrispondenti nei DNA o negli RNA separati per elettroforesi, consentì di intuire sia la natura della molecola di glicoproteina P sia le sue modalità di funzionamento. Furono effettuati due tipi di ibridazione per assorbimento. Nel primo, noto come *Northern blotting*, il c-DNA isolato fu utilizzato come sonda per l'm-RNA derivato da differenti linee cellulari. Risultò evidente che una specie di m-RNA, lunga circa 4,5 chilobasi (cioè un m-RNA che includeva circa 4500 delle subunità chimiche chiamate basi), era associata a varie cellule dotate

di resistenza multipla ai farmaci e non alle loro controparti sensibili: quanto più le cellule erano resistenti, tanto maggiore era la quantità della specie di m-RNA. Era logico supporre che questo RNA fosse associato alla produzione di glicoproteina P.

Un secondo metodo, che viene denominato *Southern blotting*, utilizza invece il c-DNA come sonda per il DNA genomico, cioè il DNA contenuto nel nucleo cellulare. Dai risultati conseguiti in questa indagine, risultò evidente che la maggiore quantità di glicoproteina P rilevata in cellule dotate di resistenza multipla derivava da un processo di amplificazione genica, cioè un aumento del numero di copie di un gene. Nelle cellule resistenti si poterono notare fino a 60 copie dello stesso gene per la glicoproteina P. Questa osservazione confermò un dato indipendente, secondo il quale la resistenza multipla ai farmaci deriva da un'amplificazione genica. Nel nostro sistema furono messe in evidenza bande multiple sia nelle cellule resistenti sia in quelle sensibili ai farmaci invece dell'unica banda o delle due bande prevedibili nel caso di un gene singolo. La spiegazione più semplice era che, nella normale costituzione genetica della cellula, vi fosse più di un solo gene per la resistenza multipla ai farmaci: non geni identici, ma geni molto simili tra loro costituenti una famiglia multigenica.

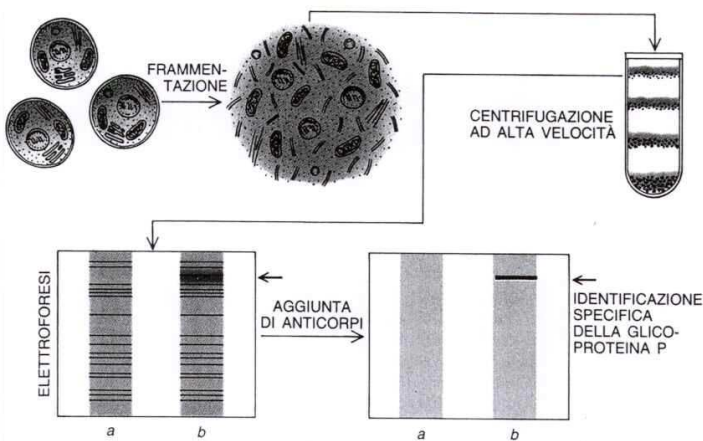
Mentre questo lavoro era in corso, altri gruppi si dedicavano allo studio della resistenza multipla ai farmaci. Una diversa impostazione venne proposta da

Igor B. Roninson del Massachusetts Institute of Technology e da Piet Borst dell'Istituto del cancro di Amsterdam. Questi due ricercatori clonarono frammenti di DNA associati alla resistenza multipla ai farmaci utilizzando metodi diversi. Indipendentemente dalla metodologia seguita, il loro lavoro confermò i nostri risultati: in ogni caso furono notate l'amplificazione genica e l'espressione in eccesso di un m-RNA da 4,5 chilobasi. La dimensione dell'm-RNA forniva un indizio sulla proteina codificata: era la lunghezza prevedibile per un m-RNA che codificasse per una proteina avente le stesse dimensioni della glicoproteina P.

Gli anticorpi monoclonali ci consentirono di identificare, al di fuori di ogni dubbio, la nostra sonda di c-DNA con la glicoproteina P. Il prodotto genico parziale ottenuto dai batteri si combinava con tre anticorpi monoclonali indipendenti che riconoscevano differenti siti sulla glicoproteina P. Uno scambio di informazioni sulla sequenza parziale di DNA mise in luce che i tre gruppi di ricercatori avevano clonato indipendentemente, e con metodi e ragioni diverse, i geni per la glicoproteina P. Sembrava così dimostrato il ruolo funzionale della glicoproteina P nel fenotipo: essa era responsabile della resistenza multipla ai farmaci.

Da un punto di vista scientifico rigoroso questi dati, così dipendenti dalle circostanze, non sembravano del tutto soddisfacenti; era necessaria una prova diretta e venne trovata. Essa venne dal laboratorio di Philippe Gros della McGill University. Da una cellula di topo resistente ai farmaci Gros prese un frammento di c-DNA che conteneva tutta la regione codificante per la glicoproteina P e lo inserì in una normale cellula di criceto sensibile ai farmaci, con un processo noto come *trasfezione genica*. Quando la progenie della cellula trasfettata si sviluppò in presenza di un farmaco selezionante, Gros giunse alla conclusione che le cellule discendenti erano resistenti ai farmaci. Isolò da esse DNA e m-RNA e li esaminò poi con il metodo di ibridazione per assorbimento. Trovò che le cellule di criceto contenevano copie multiple del gene di topo per la glicoproteina P ed esprimevano quel gene. Poiché nessun altro cambiamento era avvenuto in quella che era originariamente una cellula sensibile ai farmaci, risultò che i livelli elevati di espressione della glicoproteina P potevano spiegare da soli la resistenza ai farmaci.

Quando nelle cellule di criceto venne ricercata la resistenza a farmaci non affini, si trovò che esse mostravano la stessa estesa resistenza incrociata che era stata notata in cellule con resistenza multipla ai farmaci insorta spontaneamente. Poiché era stato inserito un solo gene, un singolo membro della famiglia multigenica per la glicoproteina P, fu chiaro



La composizione della superficie cellulare permette di distinguere le cellule sensibili ai farmaci da quelle resistenti. Le proteine di superficie vengono estratte frammentando le cellule e ponendone i componenti in una soluzione di saccarosio la cui densità aumenta dall'alto in basso. Quando la soluzione viene centrifugata, i componenti della membrana cellulare, che hanno una densità bassa, formano una banda presso la sommità. Con l'elettroforesi su gel si separano poi le proteine di membrana in base alla dimensione. Le cellule con resistenza multipla ai farmaci (b) presentano una proteina (banda verde) che è assente, invece, in quelle sensibili ai farmaci (a). La produzione di un anticorpo specifico per questa proteina, detta glicoproteina P, ha avuto fondamentale importanza nelle ricerche degli autori.

che un solo tipo di molecola di glicoproteina P può essere responsabile dell'ampia resistenza incrociata a farmaci non affini che è tipica della resistenza multipla ai farmaci.

Come può una singola specie molecolare come la glicoproteina P realizzare un compito in apparenza così complicato? I primi passi verso la comprensione dettagliata del funzionamento della glicoproteina P furono compiuti deducendo la struttura primaria completa di quella proteina, cioè la sequenza degli amminoacidi. La definizione della sequenza del DNA è ormai una pratica corrente e così si poté determinare ben presto la sequenza di basi del c-DNA che rappresenta in tutta la sua lunghezza l'm-RNA per la glicoproteina P. Una volta conosciuta la sequenza codificante, fu possibile tradurla in una sequenza di amminoacidi. Il codice genetico è ormai noto e si sa che un codone di tre basi nella sequenza del DNA codifica per un amminoacido specifico. La sequenza o struttura primaria della glicoproteina P risultò così costituita da circa 1280 amminoacidi. Una volta conosciuta la sequenza primaria, si può cercare la sequenza di certe caratteristiche strutturali che hanno funzioni specifiche. Il fatto di poter utilizzare il calcolatore e un'ampia banca dati riguardante le sequenze delle proteine rende questo compito relativamente semplice.

Determinate caratteristiche della glicoproteina P furono facilmente evidenziate. Furono trovate corte sequenze che costituiscono i siti di attacco delle molecole glucidiche che trasformano la proteina in glicoproteina. Un altro indizio importante venne dal fatto che differenti amminoacidi hanno affinità diverse per i lipidi o per l'acqua. È possibile costruire un grafico che permette di identificare le regioni di una sequenza amminoacidica primaria che sarebbero associate con il doppio strato lipidico della membrana plasmatica (regioni idrofobe). Quando queste regioni hanno una lunghezza continua di circa 21 amminoacidi si dice che sono regioni «transmembrana», che cioè possono estendersi attraverso l'intero spessore della membrana, dall'interno all'esterno della cellula o viceversa. Nella sequenza della glicoproteina P furono identificate numerose regioni di questo tipo.

Cominciammo a capire il significato di queste strutture caratteristiche confrontando le loro sequenze con quelle di altre regioni della stessa molecola proteica e con sequenze di altre proteine note. Questi confronti, oltre a dimostrare che le sequenze della glicoproteina P ottenute da differenti laboratori erano molto simili, rivelarono alcuni aspetti interessanti della sua struttura. La molecola di questa proteina è duplicata al suo interno: la prima metà della sequenza è molto simile alla seconda. Ciò suggerisce che un gene ancestrale semplice si sia duplicato formando una sequenza ripetitiva

in tandem, la quale avrebbe prodotto poi la proteina più complessa visibile oggi.

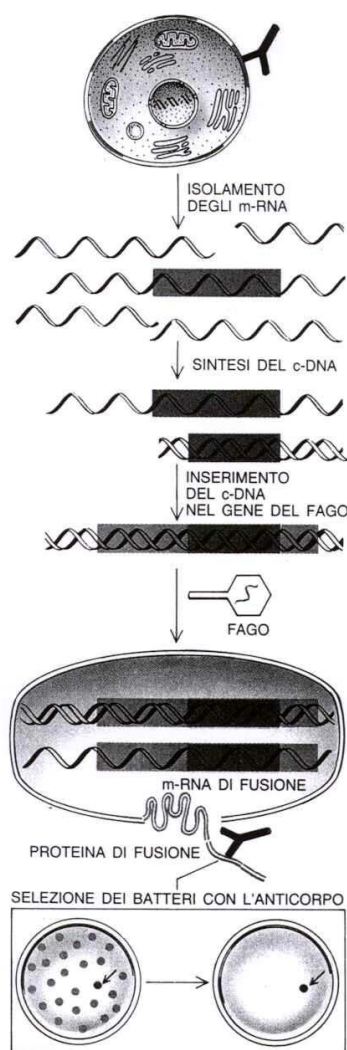
Ogni metà sequenza ha sei ipotetiche regioni transmembrana, il che significa che una sola molecola di glicoproteina P può snodarsi attraverso la membrana per ben 12 volte. Questa complessa configurazione transmembrana è caratteristica delle proteine che formano canali, o pori, e che sono implicate nel trasporto di sostanze nutritive, di ioni e di metaboliti cellulari attraverso la membrana superficiale della cellula, sia verso l'interno sia verso l'esterno della cellula.

Il confronto con una banca dati per le proteine confermò l'ipotesi che la glicoproteina P assomigliasse a una proteina di trasporto attraverso la membrana. Furono identificate regioni simili in proteine di trasporto note presenti in organismi diversi, dai batteri agli insetti. La regione primaria per la quale venne riscontrato un alto grado di conservazione tra specie ampiamente divergenti risultò essere un sito di legame per l'ATP. (L'ATP, o adenosintrifosfato, è una molecola che fornisce energia per le attività biochimiche della cellula.) Entrambe le metà della glicoproteina P contengono una lunga regione idrofila, la quale ha maggiori probabilità di trovarsi in contatto con un ambiente acquoso che con un ambiente lipidico. Si sapeva che questa regione è localizzata sul lato interno della membrana superficiale dove, in effetti, fu individuato il sito di legame per l'ATP.

La scoperta più sorprendente, cercando nella banca dati già disponibile per le proteine, fu che le metà omologhe della glicoproteina P assomigliavano notevolmente a una proteina precedentemente descritta, l'emolisina B. L'emolisina B è presente nella membrana superficiale di certi batteri ed è responsabile del trasporto di una proteina, l'emolisina alfa, all'esterno delle cellule.

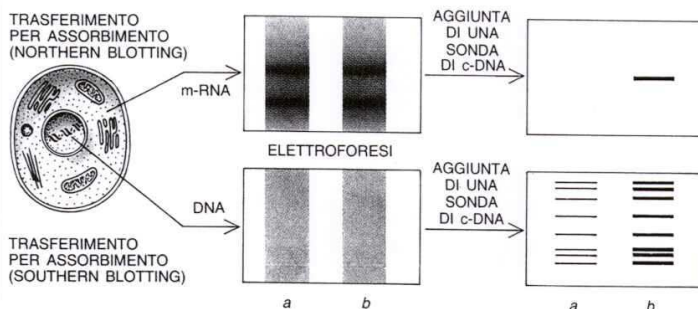
Questi studi di sequenze di amminoacidi e i confronti con altre proteine condussero a un modello per la struttura della glicoproteina P, che suggerisce i possibili modi con i quali la proteina provocherebbe la resistenza multipla ai farmaci. È probabile che le 12 regioni transmembrana della glicoproteina P convergano a formare un poro con 12 lati. All'esterno della cellula la proteina sporge leggermente esponendo un sito al quale si attaccano le catene di carboidrati, trasformandola in una glicoproteina. All'interno della cellula invece vi sono due grossi domini omologhi che sporgono nel citoplasma e che presentano i siti di legame per l'ATP. La presenza di questi siti suggerisce che la glicoproteina P abbia una funzione di trasduzione dell'energia, per esempio per svolgere il processo di espulsione di sostanze tossiche dalla cellula, un'attività che richiede dispendio di energia.

È possibile immaginare due meccani-

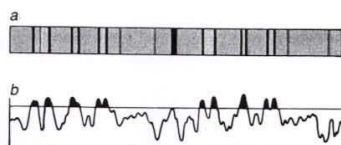
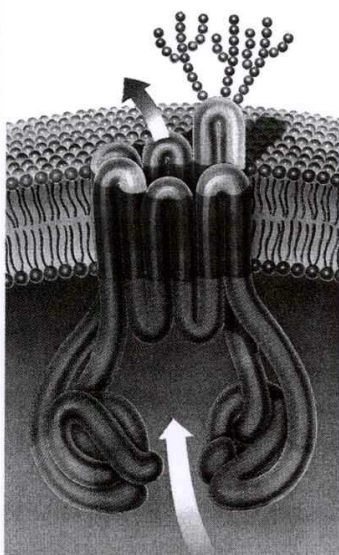


La clonazione del DNA della glicoproteina P inizia con l'identificazione, tramite un anticorpo monoclonale (in rosso), di una cellula che produce la glicoproteina (in verde) e con l'isolamento degli m-RNA che codificano per le proteine cellulari. DNA complementare a doppio filamento (c-DNA) viene poi sintetizzato per una porzione di ciascun m-RNA; ogni c-DNA è quindi inserito in un gene (in blu) di fago lambda, un virus che infetta i batteri. Un batterio infettato trascrive il risultante «gene per la fusione» in m-RNA e traduce l'm-RNA in una proteina di fusione, che include parte di una proteina della cellula originale. Ogni batterio che contiene un gene per la fusione produce un clone di batteri geneticamente identici, che esprimono lo stesso gene. L'anticorpo identifica il clone con la proteina di fusione che incorpora una parte della glicoproteina P. Questo clone può allora servire come fonte del DNA che codifica per la glicoproteina P.

smi con cui la glicoproteina P pompa i farmaci fuori dalla cellula: o legandosi a una vasta gamma di farmaci ed espellendoli direttamente attraverso la membrana mediante l'ipotetico poro transmembrana, o utilizzando una seconda molecola (un vettore proteico) in grado di legarsi al farmaco e di essere poi eliminata sotto forma di complesso farmaco-vettore attraverso la membrana. Questa seconda possibilità si basa sull'osservazione che la glicoproteina P assomiglia all'emolisina B, la quale espelle l'emolisina alfa attraverso la membrana della cellula batterica. Finora non è stata trovata alcuna prova diretta di un vettore proteico ausiliario per la glicoproteina P. Si è dimostrato invece che alcuni farmaci possono legarsi direttamente alla glicoproteina P, probabilmente come primo passo nel loro trasporto definitivo attraverso la membrana superficiale.



La base genetica della resistenza multipla ai farmaci può essere esaminata grazie al c-DNA clonato della glicoproteina P. Nel metodo di trasferimento per assorbimento detto *Northern blotting*, l'm-RNA è estratto dalle cellule, separato per elettroforesi e quindi trasferito su carta da filtro. Quando questa viene impregnata con c-DNA marcato con un tracciante radioattivo, il c-DNA si lega al corrispondente m-RNA (in questo caso l'm-RNA della glicoproteina P) e lo marca. Si dimostra così che, mentre le cellule sensibili ai farmaci (a) producono poco m-RNA per la glicoproteina P, le cellule resistenti ai farmaci (b) ne producono una quantità proporzionale al loro grado di resistenza. La fonte di questo m-RNA viene rivelata da un secondo metodo di trasferimento per assorbimento, detto *Southern blotting*, che ricerca il DNA invece dell'm-RNA. Il DNA è frammentato e i vari frammenti sono separati per elettroforesi, poi trasferiti su carta da filtro e posti a contatto con c-DNA radioattivo. Sia nelle cellule sensibili sia in quelle resistenti, il c-DNA sonda identifica otto frammenti di DNA, il che fa pensare che la glicoproteina P sia codificata da una famiglia di geni. I frammenti si colorano molto più intensamente nelle cellule resistenti (b), suggerendo che la resistenza si sviluppi quando i geni sono amplificati (cioè duplicati più volte).



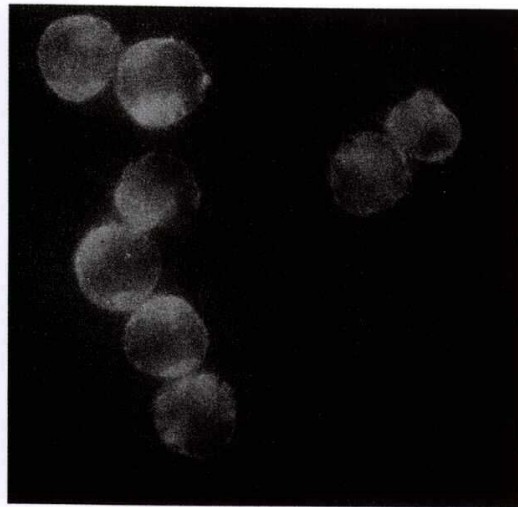
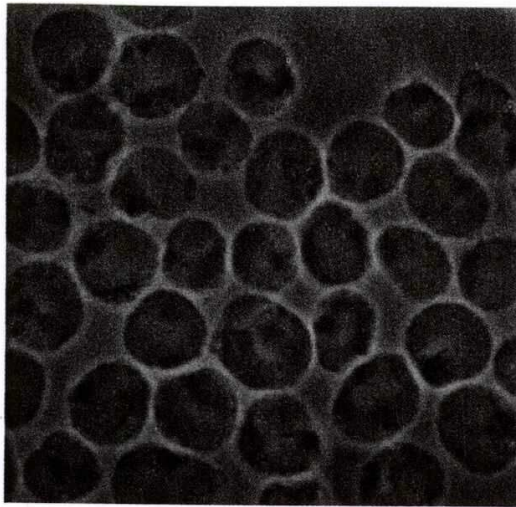
La struttura della glicoproteina P è stata dedotta dalla sequenza degli aminoacidi costituenti: la catena risulta composta (a) da due metà simili. A ogni aminoacido si assegna un valore di idrofobia, cioè di affinità per un ambiente lipidico come quello della membrana cellulare, anziché per uno acquoso come l'interno o l'esterno della cellula. Un grafico di idrofobia della catena (b) suggerisce che 12 segmenti separati (in rosso) siano inclusi nella membrana cellulare. Lo studio della sequenza rivela anche l'esistenza di segmenti (in verde), che probabilmente si legano all'ATP, molecola per il trasporto di energia all'interno della cellula, e una regione (in viola) cui è probabile si attacchino le catene di carboidrati. Queste informazioni hanno suggerito il modello (qui a fianco) della struttura della proteina.

La determinazione di ulteriori sequenze di geni per la glicoproteina P effettuata su specie diverse da un numero sempre crescente di laboratori operanti nel settore ha permesso di eseguire confronti tra geni, sia all'interno di una singola specie sia tra specie differenti. Questi confronti hanno fatto un poco di luce sull'evoluzione della glicoproteina P e sull'organizzazione dei suoi geni. L'organizzazione simile delle sequenze codificanti e delle sequenze intercalari in differenti geni per la glicoproteina P, appartenenti alla stessa specie, suggerisce che la duplicazione interna del gene ancestrale sia avvenuta prima della formazione di una famiglia multigenica. Le somiglianze nell'organizzazione di membri omologhi della famiglia multigenica in differenti specie di mammiferi suggeriscono, invece, che la formazione di una famiglia multigenica abbia preceduto la divergenza delle specie, agli albori dell'evoluzione dei mammiferi.

La storia evolutiva apparentemente lunga e la struttura conservativa della glicoproteina P pongono due interrogativi: qual è la funzione normale della molecola e come si esplica la sua attività? Finora le risposte sono puramente ipotetiche, ma sono state comunque avanzate due teorie. L'una afferma che la glicoproteina P svolge lo stesso compito in cellule normali e in cellule resistenti ai farmaci: rimuove le tossine dall'interno della cellula. Una strategia di sopravvivenza che risale molto all'indietro nella storia evolutiva è la secrezione da parte di un organismo di composti tossici ai quali è immune: lo scopo è quello di uccidere gli organismi che si avvicinano ed entrano in competizione con esso. Alcuni farmaci antitumorali oggi in uso - e molti antibiotici - sono di fatto tossine prodotte da organismi inferiori esattamente con questo scopo.

L'evoluzione di un gene per proteggere l'organismo da simili tossine avrebbe fornito un enorme vantaggio per la sopravvivenza. Il gene della glicoproteina P potrebbe essere un discendente molto evoluto di un simile gene primordiale, che protegge gli organismi superiori dalle tossine naturali alle quali sono esposti normalmente tramite l'ingestione di cibo deteriorato oppure contaminato dall'uno o dall'altro di una miriade di vegetali tossici.

Una seconda possibilità è che la glicoproteina P sia coinvolta in qualche processo di trasporto avente un'importanza fondamentale per la fisiologia o per lo sviluppo di un organismo complesso qual è un mammifero. Mediante sonde di c-DNA e anticorpi monoclonali si è accertato che la glicoproteina P si esprime normalmente nei reni, nelle ghiandole surrenali, nel fegato e in alcune parti dell'apparato gastrointestinale dell'adulto normale. Questi tessuti sono interessati nel trasporto di sostanze nutritive e di soluti e nella secrezione di numerose sostanze proteiche e steroidee; forse la



È impossibile distinguere in una microfotografia come quella qui sopra le cellule leucemiche sensibili ai farmaci da quelle resistenti. Quando le stesse cellule sono esposte a un anticorpo fluorescente che si lega in modo specifico alla glicoproteina P, una fotografia al microscopio a fluorescenza, in luce ultravioletta (a destra), rivela solo le cellule resistenti ai farmaci, rese fluorescenti perché conten-

gono alti livelli di glicoproteina P. Questo test con gli anticorpi può servire per identificare cellule resistenti ai farmaci in preparati tumorali biotici; in futuro si spera di poter impiegare gli anticorpi come vettori per liberare tossine in grado di distruggere le cellule resistenti ai farmaci. Le microfotografie sono state fornite da Grace Bradley dell'Ontario Cancer Institute e dell'Università di Toronto.

glicoproteina P svolge un ruolo in alcuni di questi processi.

La presenza di glicoproteina P nei tessuti sopra detti non esclude la prima teoria, dato che alcuni degli organi citati sono anche impegnati nei processi di disintossicazione. È interessante, tra parentesi, notare che questi organi sono spesso sede di tumori che hanno un'innata resistenza ai farmaci, cioè fin dall'inizio non rispondono alla chemioterapia combinata. Può darsi che l'espressione normale della glicoproteina P in questi tessuti si conservi anche nelle cellule tumorali che si sviluppano da essi. Qualunque possa essere la funzione normale della glicoproteina P, sembra probabile che essa svolga un certo tipo di trasporto attraverso la membrana, si tratti dell'espulsione di sostanze tossiche esogene o della secrezione di prodotti cellulari endogeni, fisiologicamente importanti.

Un altro importante interrogativo è quello che ci riporta al punto di partenza, alla ragione fondamentale per la quale, in primo luogo, si studia la resistenza a un farmaco sperimentale: la glicoproteina P è coinvolta nell'insuccesso a cui va incontro la chemioterapia nei malati di cancro? È stato stabilito che i carcinomi ovarici, le cellule leucemiche e svariati tipi di sarcomi possiedono livelli elevati di glicoproteina P. Nel ristretto numero di casi in cui sono stati possibili controlli successivi dei pazienti, sono state notate quantità crescenti di questa proteina a mano a mano che au-

mentava la resistenza alla chemioterapia; in circa il 10-20 per cento dei tumori tenuti sotto controllo si è constatato che i livelli di glicoproteina P si sono innalzati. Basandosi su questi studi preliminari, si può concludere che una frazione significativa degli insuccessi nella cura potrebbe essere attribuita a una resistenza multipla ai farmaci mediata dalla glicoproteina P, anche se saranno necessarie ulteriori ricerche per dimostrare la fondatezza di questa conclusione.

Con una più approfondita conoscenza della resistenza multipla ai farmaci e della funzione della glicoproteina P sarà più facile migliorare l'efficacia dei farmaci somministrati in chemioterapia. Di recente si è trovato che svariati composti possono inibire l'attività della glicoproteina P, rendendo le cellule tumorali dotate di resistenza multipla ai farmaci sensibili a farmaci che sarebbero altrimenti inefficaci. Questi composti sono stati chiamati «chemiosensibilizzanti». Ricerche preliminari suggeriscono che alcuni di essi possano agire interferendo con il legame dei farmaci alla glicoproteina P. Probabilmente questo legame è un primo passo importante nel trasporto del farmaco fuori dalla cellula, e di conseguenza il suo blocco fa accumulare il farmaco all'interno portando, come previsto, alla morte della cellula. Quando si troveranno sistemi più raffinati per manipolare la funzione della glicoproteina P diventerà possibile utilizzare in tutta la loro potenzialità i farmaci antitumorali che, nei casi in cui non si ha resistenza,

risultano spesso estremamente efficaci.

Un altro modo per debellare le cellule tumorali con resistenza multipla ai farmaci potrebbe essere quello di sfruttare proprio il fatto che esse contengono la glicoproteina P. Per uccidere le cellule tumorali non curabili con i mezzi convenzionali forse si potrebbero progettare anticorpi monoclonali per questa proteina che contengano un composto radioattivo o un farmaco tossico. Il sogno della pallottola magica di Paul Ehrlich potrebbe allora diventare realtà.

BIBLIOGRAFIA

DEVITA VINCENT T., Jr., *The Relationship between Tumor Mass and Resistance to Chemotherapy: Implications for Surgical Adjuvant Treatment of Cancer* in «Cancer», 51, n. 7, 1 aprile 1983.

GOLDIE JAMES H. e COLDMAN ANDREW J., *The Genetic Origin of Drug Resistance in Neoplasms: Implications for Systemic Therapy* in «Cancer Research», 44, n. 9, settembre 1984.

GERLACH JAMES H., KARTNER NORBERT, BELL DAVID R. e LING VICTOR, *Multidrug Resistance* in «Cancer Surveys», 5, n. 1, 1986.

GOTTESMAN MICHAEL M. e PASTAN IRA, *Resistance to Multiple Chemotherapeutic Agents in Human Cancer Cells* in «Trends in Pharmacological Science», 9, febbraio 1988.