

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ing. Jiří Vávra

Struktura a funkce transmembránových proteinů ABCG2
The structure and function of transmembrane proteins ABCG2

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Mgr. Andrea Mančíková

Praha, 2017

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Andree Mančíkové za rady a pomoc poskytnutou při psaní této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato bakalářská práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.7.2017

Ing. Jiří Vávra

Abstrakt:

Transportní proteiny ABCG2 (ABCP/MXR/BCRP) vytvářejí homodimery v plazmatické membráně a hrají zde důležitou roli v transmembránovém přenosu řady molekul. Jsou zásadní pro funkci ledvin, tenkého střeva, placenty a hematoencefalické bariéry, kde plní zejména exkreční funkci, zajišťující ochranu buněk před toxickými látkami, kumulací xenobiotik a v neposlední řadě se podílejí na regulaci metabolismu kmenových buněk. Bakalářská práce shrnuje poznatky o funkci ABCG2 proteinů a jejich fyziologické roli v organismu savců a člověka.

Klíčová slova: ABCG2, BCRP, membránové transportéry, mnohočetná léková rezistence (MDR), rodina ATP vázajících kazet

Abstract:

ABCG2 (ABCP/MXR/BCRP) transporters create homodimers through the plasma membrane. They play an important role in transmembrane transport of a wide spectrum of biological substrates. They are essential for renal, intestinal, placental and haematoencephalic barrier function. In particular they perform an excretory function, protect cells against toxic compounds and xenobiotic cumulation. They are also involved in metabolic regulation of stem cells. This bachelor thesis summarizes information about ABCG2 protein function, their physiological role in humans and other mammals.

Keywords: ABCG2, BCRP, membrane transporters, multidrug resistention (MDR), ATP binding cassette family (ABC)

Seznam zkratek

4-MUS A549	4-methylbelliferon sulphate adenocarcinomic human alveolar cells	4-methylbelliferon sulfát Buňky lidského alveolárního adenokarcinomu
ABC	ATP binding cassette	ATP vázající kazety
ADP	Adenosindiphosphate	Adenosindifosfát
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	Aryl hydrokarbonový receptor
ATP	Adenosintriphosphate	Adenosintrifosfát
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	Protein mnohočetné lékové rezistence
BeWo	Homo sapiens placenta choriocarcinoma cells	buňky lidského chorionkarcinomu
CRAC	cholesterol recognition aminoacid consensus sequence	Cholesterol rozeznávající aminokyselinová konsenzus sekvence
DHES	dihydroepiandrosterone	dihydroepiandrosteron
DNP-SGS	dihydro-5-methoxy-9-oxo-4--(2,4- dinitrophenyl)glutathion	
E2	17-β estradiol	17-β estradiol
E2S	17-β estradiol sulphate	17-β estradiol sulfát
E3040	6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl)benzothiazole	
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation	Degradace proteinů asociovaná s endoplazmatickým retikulem
Era	Estrogen receptor alpha	Estrogenový receptor alfa
GF120918	N-[4-[2-(3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-2-(1H)-isochinoliny)etyl]fenyl]-9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-4-acridinecarboxamide	
GLUT 9	Human glucose transporter 9 (SLC2A)	Lidský glukózový transportér 9
GSH	Glutathione	Glutation
GW9662	2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide	
HEK 293	Human embryonic kidney cells	Buňky z lidských embryonálních ledvin
HERV-W	Human edogenous retrovirus W protein	Protein lidského endogenního endoviru W
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1	Hypoxií indukovaný faktor 1
HRE	Hypoxia responsible element	Na hypoxii odpovídající element

IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MCF-7	Breast cancer cells	Buňky lidského karcinomu prsu
MDCK	Madine Darby canine kidney cells	Madinovy a Darbyho buňky psích ledvin
MG132	Benzyl <i>N</i> -[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-[[[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-[[[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate	
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1	Protein způsobující holékovou rezistenci 1
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1	Protein způsobující holékovou rezistenci 1
MSX-2	Msh homeobox 2	Msh homeobox 2
MXR	Mitoxantron rezistence protein	Protein mnohočetné lékové rezistence
MutS	Mutator S	Protein z mutátora S
PA-1	Human ovarian teratocarcinoma cells	Buňky lidského teratokarcinomu vaječníku
P-gp	P-glycoprotein (ABCB1)	P-glykoprotein
PNPS	para-nitrophenyl sulphate	para-nitrofenylsulfát
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors	Receptory aktivované peroxizomálními proliferátory
PR	Progesteron receptor	Receptor pro progesteron
PSC833	6-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-4-Methyl-2-(methylamino)-3-oxo-6-octenoic acid]cyclosporin D	6-[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-4-Methyl-2-(methylamino)-3-oxo-6-octenoic acid]cyclosporin D
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin	7-Etyl-10-hydroxy-camptotecin
T47D	Human breast tumor cells	Buňky lidského tumoru prsu
TATA	TATA box	TATA box
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol	3-amino-1,4-dimetyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
URAT 1	Urate transporter 1 (SLC22A12)	Urátový transportér 1
UvrA	UvrA endonuclease	UvrA endonukleáza
White	White gene / mutation	Gen/mutace White
XBP-1	Xbox binding protein 1	Xbox vázající protein 1

Obsah

1. ÚVOD	1
2. RODINA TRANSPORTÉRŮ ABC A VÝZNAM PODRODINY G	1
3. HISTORIE OBJEVU ABCG2.....	1
4. REGULACE EXPRESE A STRUKTURA ABCG2.....	2
4.1. Molekulární biologie transportéru	2
4.2. Struktura a funkce jednotlivých domén.....	5
5. TYPY PŘENÁŠENÝCH SUBSTRÁTŮ	10
6. VÝZNAM TRANSPORTÉRU V JEDNOTLIVÝCH BUNĚČNÝCH TYPECH.....	13
6.1. Tkáň varlat	13
6.2. Jaterní tkáň	14
6.2.1. Substráty a xenobiotika přenášená ABCG2 v jaterních buňkách	15
6.3. Epiteliální ledvinné buňky	16
6.4. Mozek a hematoencefalická bariéra.....	18
6.5. Epiteliální buňky střeva.....	19
6.6. Žláznatá tkáň.....	21
6.7. Placenta a syncytiotrofoblast	21
6.8. Kmenové buňky	23
7. ZÁVĚR	23
8. LITERATURA	24

1. Úvod

Transportní protein ABCG2 (zvaný též BCRP – breast cancer resistance Protein, MXR – mitoxantron resistance, ABCP) je součástí velké rodiny proteinů ABC (ATP binding cassette). Účastní se odstraňování toxických látek z intracelulárního prostoru, a to jak látek přirozeně se vyskytujících ve tkáních živočichů, produktů metabolismu organismu, tak případně látek podávaných jako léčiva. K jeho nabohacení dochází u buněk odvozených ze tkáně tumorů, které jsou rezistentní k léčbě cytostatiky. Proto je současný výzkum zaměřen především na klinické využití, nalezení účinných inhibitorů, případně nových protirakovinných léčiv. K pochopení souvislostí je nezbytné objasnění úlohy tohoto transportéru jednak na fyziologické úrovni, jednak i z hlediska molekulárně biologických principů jeho funkce. Stručný přehled poznatků o fyziologické a molekulárně biologické funkci tohoto proteinu přináší tato bakalářská práce. Vzhledem k tomu, že je práce vypracovávána na Přírodovědecké fakultě UK, je zaměřena na poznatky základního výzkumu.

2. Rodina transportérů ABC a význam podrodiny G

Proteiny ABC (ATP-binding cassette) patří zřejmě mezi jedny z nejhojnějších buněčných proteinů. Do této rodiny spadají proteiny účastnící se transkripce (například ribozómalní sestřihový faktor ABCE1), proteiny zajišťující opravy DNA (například MutS nebo UvrA) a také proteiny transportní. Všechny proteiny se skládají ze dvou podjednotek, buď stejných či jiných. Na každé z těchto podjednotek se nachází část ATP vazebné domény, kde štěpením ATP na ADP a Pi dojde ke konformační změně proteinu a k uvolnění volné energie, která následně vykoná nějakou práci. V případě transportních proteinů přenesou substrát. (Hopfner 2016) Podrodina G obsahuje celkem pět transportních proteinů: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8, přičemž transportéry ABCG1, ABCG2, ABCG4 jsou homodimery a transportéry ABCG4, ABCG5 heterodimery. (Kusuhara, Sugiyama 2007)

3. Historie objevu ABCG2

Transportér ABCG2 byl poprvé popsán Doylem a spolupracovníky na kultuře buněk MCF-7 (buňky karcinomu prsu) a jejich linii rezistentní k daunorubicinu (MCF-7/AdrVp). Z této rezistentní linie byla izolována mRNA a z ní následně provedena reverzní transkripce do cDNA. Pomocí primerů navržených s ohledem na sekvenci proteinu *White* (z *Drosophila melanogaster*) byla provedena polymerázová řetězová reakce a amplifikovaný produkt byl transfekován do buněk MCF-7, které ale před ní nevykazovaly rezistenci k daunorubicinu. Po transfekci vektorem nesoucím izolovanou sekvenci DNA pro ABCG2 tyto buňky vykazovaly asi dvakrát až třikrát menší akumulaci daunorubicinu než kontrolní buňky MCF-7. Navíc po odstranění ATP došlo k vymizení efluxu rhodaminu 123, což dokazuje, že transport je ATP závislý. Ukázalo se také, že transportér přenáší z buňky mitoxantron a doxorubicin (Doyle et al. 1998). Jak bylo uvedeno výše, transportér ABCG2 má svůj homologický protějšek u mouchy *Drosophila melanogaster*, který je z 31% homologický proteinu *White* co do sekvence

aminokyselin (Allikmets et al. 1998). Následně Miyake a kolektiv prokázali výskyt genu homologického genu *White* u buněk S1-MX-80 a MCF-7/ AdVp3000 rezistentních k mitoxantronu. Důkaz byl proveden izolací mRNA z rezistentních buněk, následnou reverzní transkripcí a hybridizací, přičemž sekvenací byla potvrzena homologie s ABC transportéry na základě výskytu Walkerova A a B motivu a také dvou transmembránových domén (Miyake et al. 1999).

4. Regulace exprese a struktura ABCG2

4.1. Molekulární biologie transportéru

Gen pro transportér ABCG2 je u člověka lokalizován na dlouhém raménku na chromozómu 4, konkrétně v pozici q21-q22 (Knutsen et al. 2000). Vlastní gen má délku 66 kbp a skládá se ze 16 exonů o délce 60 až 532 párů bází. Do genu je vmezeřeno 15 intronů o délkách 587 až 18 000 párů bází. Translace začíná na exonu 2 sestřižené mRNA. Autoři našli Walkerův motiv A v exonu 3 a Walkerův motiv B v exonu 6, kde se také nalézá ATP vázající oblast (Obr. 1). Transmembránové domény jsou kódovány v exonech 10,13,14,15 a 16. Předpokládaný promotor byl nalezen v pozici 236 až 115 upstream od místa počátku transkripce, přičemž promotor neobsahuje TATA box. Před promotorem se nachází CpG ostrov (Bailey-Dell et al. 2001). U rakovinných buněk kolorektálního karcinomu pěstovaných in-vitro bylo při stoupající koncentraci inhibitoru topoizomérazy I SN38 zjištěno, že na jejich membránách stoupá exprese ABCG2 a také syntéza mRNA pro tento protein (asi 133 -krát). Tento vzestup syntézy mRNA nelze vysvětlit genovou amplifikací, ale spíše mutací v promotoru nebo transkripčním faktoru (Candeil et al. 2004). U buněk SF295 (linie pocházející z lidského glioblastomu) byla při stoupající hladině cytostatika mitoxantronu zaznamenána rovněž stoupající exprese ABCG2 a také zvýšená hladina příslušné mRNA. Za pomoci techniky FISH se ukázalo, že došlo k amplifikaci genu pro ABCG2 a to sice vytvořením tzv. double minute chromosomes, což jsou okrsky DNA mimo vlastní chromozóm. U vyšší koncentrace cytostatika byla pozorována také polyploidie (Rao et al. 2005). U buněk MCF-7 je gen pro tento protein vícenásobně amplifikován (Knutsen et al. 2000).

Expresi ABCG2 je nepochybně řízena rovněž epigeneticky. Metylace promotoru snižuje expresi proteinu, kdežto demetylace, experimentálně vyvolaná inhibicí DNA-methyltransferázy 5-aza-2-deoxycytidinem, expresi proteinu signifikantně zvyšuje. U lidských myelomových buněk byla zjištěna nízká úroveň metylace oproti nenádorovým buňkám, což korelovalo současně i s expresí ABCG2 (Turner et al. 2006). U buněk PC-6, které jsou citlivé k cytostatiku SN38, rovněž došlo po experimentální demethylaci promotorové oblasti k navýšení exprese proteinu i mRNA (Nakano et al. 2008). Dále bylo toto pozorování potvrzeno u buněk karcinomu ledvin, kdy po experimentální demethylaci došlo ke zvýšení exprese ABCG2. Navíc se ukázalo, že metylace promotoru genu pro transportér je doprovázena i trojnásobnou metylací lysinu 9 histonu H3. Naopak při experimentální demethylaci dochází i k demethylaci tohoto histonu, respektive jeho acetylaci, což je v souladu s obecně známým faktem, že modifikace histonů mohou umlčovat aktivitu genů. Této aktivitě může napomáhat i vazba metyl-CpG vázajících proteinů na CpG ostrov, jež slouží coby vazebné proteiny pro

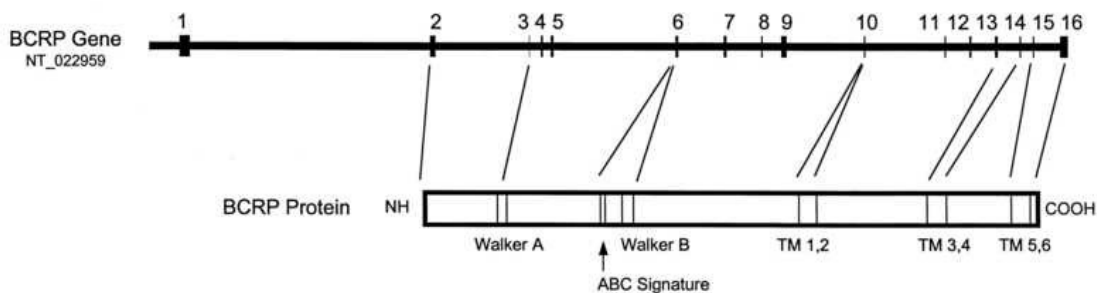
chromatin remodelační komplex (To, Zhan, and Bates 2006). Metylace histonu H3 na lizinů 4 třemi metylovými skupinami a současná fosforylace serinu 10 naopak zvyšuje expresi proteinu, což vede k rozvoji fenotypu rezistence k protinádorovým léčivům. Také vyšlo najevo, že i inhibice histondeacetylázy a acetylované histony nemusí znamenat up-regulaci exprese. Je nutné, aby byly ještě odstraněny inhibiční metylační značky z histonů a také aby byl aktivní Brg-1 chromatin remodelační faktor a samozřejmě RNA polymeráza typu II. Pokud jsou tyto podmínky splněny, může dojít k transkripci genu ABCG2 (To et al. 2008).

Při hypoxii dochází k transkripci nejrůznějších genů, přičemž tato transkripce je spouštěna transkripčním faktorem HIF-1, který se skládá z podjednotky alfa (ta je odbourávána za přítomnosti kyslíku) a podjednotky beta. Při snížené koncentraci kyslíku obě podjednotky dimerizují a HIF-1 spouští transkripci. Současně musí být ale regulována intracelulární koncentrace hemu, neboť při jeho velké koncentraci může dojít k poškození železem (Lu et al., 2013). Ross a kolektiv prokázali, že ABCG2 transportuje porfyriny (tedy i hem) a že právě nabohacení tohoto transportéru u nádorových buněk vede k jejich zvýšené odolnosti proti nízkému parciálnímu tlaku kyslíku. ABCG2 je také přímou interakcí s hemem upregulován, tedy navázáním hemu se rychlost transportu substrátu zvyšuje. Bylo objasněno, že promotor genu obsahuje úsek pro vazbu faktoru HIF-1, tzv. HRE (hypoxia responsible element). Ze tří vytipovaných míst mělo zdaleka největší vliv úsek 116–112 bp upstream. Lze tedy říci, že exprese BCRP je zvýšena při nedostatku kyslíku a to sice prostřednictvím faktoru HIF-1 (Krishnamurthy et al. 2004). Dále je zřejmě exprese ABCG2 indukována prostřednictvím aryl - hydrokarbonového receptoru (AhR), který při experimentální stimulaci syntetickými agonisty zvyšuje expresi transportéru. Naopak inkubace buněk v médiu se syntetickým antagonistou expresi snižuje (Ebert et al. 2005). Přirozenými in vivo ligandy receptoru AhR mohou být některé látky vyskytující se v životním prostředí, jako třeba 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) a mohou tudíž indukovat syntézu ABCG2 (Wang et al. 2010). U člověka byl nalezen regulační element této dráhy v pozici 194 až 190 upstream od promotoru. Tento element však nebyl nalezen v myši variantě transportéru BCRP1, což značí, že tento homolog není regulován AhR drahou (Tan et al. 2010). Dalším receptorem a zároveň transkripčním faktorem ovlivňujícím expresi ABCG2, je peroxizómální proliferací aktivovaný faktor (PPAR). Stimulací PPAR pomocí syntetického ligandu (Rosiglitazon) došlo k navýšení exprese mRNA i vlastního proteinu ABCG2 a naopak po podání antagonisty receptoru (GW9662) došlo k útlumu syntézy. Rovněž byly identifikovány tři elementy v sekvenci o velikosti 150 bp, kde je možná vazba. Tato sekvence (enhancer) je umístěna 3946 – 3796 bp upstream od počátku transkripce. Experiment byl prováděn na dendritických buňkách (Szatmari et al. 2006). U buněk BeWo experimentálně transfekovaných jednou z izoform receptoru pro progesteron (PR), a to buď A (PRA) nebo B (PRB), došlo při jejich stimulaci k navýšení exprese proteinu pouze při stimulaci PRB, nikoliv však PRA. Autoři také zjistili, že ve vzdálenosti 234 až 115 bp upstream od genu existuje oblast DNA sloužící pro vazbu obou těchto receptorů, při její experimentální delecí došlo k vymizení indukčního efektu stimulací PRB receptoru. Možná oblast pro nasednutí receptoru je i na pozici 1285 až 685 upstream, tato při delecí způsobuje pouze relativně malý pokles exprese BCRP (Wang et al. 2008). Při experimentálně vyvolaném stresovém poškození

endoplazmatického retikula (prostřednictvím tunicamycinu nebo 2-deoxyglukosy) došlo u plazmatických buněk ke zvýšení exprese ABCG2. Stejný efekt měla stimulace IL-6, jež u tohoto typu buněk zvyšuje proteosyntézu. U buněk knockoutovaných pro ABCG2 byla snížena jejich životaschopnost. Nadměrná proteosyntéza v buňce aktivuje transkripci ABCG2 prostřednictvím faktoru HIF-1 a faktoru XBP-1 (Xbox binding protein), přičemž oblast nasednutí těchto proteinů je lokalizována 172 až 167 bp upstream od promotoru. Tento fakt lze vysvětlit snahou buňky zbavit se substrátů nadměrně aktivujících proteosyntézu (zde např. IL-6) (Nakamichi et al. 2009). Dalším transkripčním faktorem spouštějícím transkripci genu pro ABCG2 je transkripční faktor MSX-2. U pankreatických rakovinných buněk byla zjištěna vysoká úroveň mRNA pro tento faktor a zároveň vysoká hladina exprese ABCG2, kdežto u buněk normálního epitelu pankreatických vývodů byly obě hladiny relativně nízké. Vazba faktoru MSX-2 se ovšem u genu ABCG2 děje v rámci oblasti SP1, jež je součástí promotoru (Hamada et al. 2012). Na endogenní expresi ABCG2 má vliv také 17- β estradiol (E2). Ukázalo se totiž, že v jeho přítomnosti jisté typy buněk vykazují výrazně sníženou expresi tohoto proteinu (tzv. down regulace). Konkrétně například buňky MCF-7 (jež byly izolovány z nádoru prsu) snižují expresi, kdežto například u buněk A549 (buňky připravené z karcinomu plic) je vliv přítomnosti této molekuly minimální. Imai a jeho spolupracovníci došli k závěru, že za sníženou expresi ABCG2 je zodpovědná vazba 17- β estradiolu na receptor ER α , který je právě v buňkách A549 nepřítomen. Dále byl proveden knockout proteinu Er α pomocí siRNA u buněk MCF-7. Došlo k vymizení down regulace, což naznačuje, že právě Er α je dalším významným regulátorem exprese ABCG2. Vzhledem k tomu, že v buňkách po aplikaci E2 nedošlo ke snížení přítomnosti ABCG2 mRNA je možné, že v tomto případě se vlastní regulace děje posttranskripční regulací, například degradací nativního proteinu (Imai et al. 2005). Oblast pro vazbu Er α , se nachází v pozici 243 až 115 bp upstream od promotoru. V této práci naopak stimulace receptoru signifikantně zvyšovala množství mRNA pro transportér. K experimentu byly použity buňky T47D:A18 a PA-1 (Lai et al. 2004).

Po vlastní syntéze na ribozómech drsného endoplazmatického retikula je transportér exportován k membráně. Vlastní protein je homodimer, který je spojen disulfidickými můstky (Obr.2). Pokud ovšem dojde k mutaci v oblasti některého cysteinu, který tyto vazby vytváří je protein ubikvitinován a degradován v proteasomu. Při experimentálním narušení disulfidické vazby v rámci jedné podjednotky a selektivním zablokování činnosti proteasomu pomocí MG132 (Benzyl *N*-[(2*S*)-4-metyl-1-[[[(2*S*)-4-metyl-1-[[[(2*S*)-4-metyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]karbamát)) vzrostla rezistence buněk k cytostatiku SN-38, čili takto poškozený (a zároveň ubikvitinovaný) protein nemohl být degradován v proteasomu a byl dopraven až na membránu. Hladina proteinu naopak vzrostla asi 5 - krát oproti kontrole při selektivním zablokování funkce lysosomu (pomocí Bafilomycinu A) (Wakabayashi et al. 2007). Lze tedy říci, že exprese transportéru na membráně může být fyziologicky regulována postranskripční degradací v lysosomu. Nesprávně dimerizovaný transportér je naopak degradován v proteasomu. Také nesynonymní varianty F208S a S441N jsou ubikvitinovány a transportovány do proteasomu. Bylo ukázáno, že obě tyto varianty byly degradovány ubikvitinací a proteolýzou rovnou v proteasomu (tj. tzv. ERAD dráhou) (Nakagawa et al. 2008). Degradaci lze

urychlit například použitím inhibitoru PZ-39 (N-(4-chlorofenyl)-2-[[6-[[[4,6-di(4-morfoli-nyl)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-1,3-benzothiazol-2-yl)sulfanyl]acetamid), který mění konformaci proteinu a působí jeho endocytosu do lysosomu (Peng et al. 2009; Peng et al. 2010). Transportér syntetizovaný v endoplasmatickém retikulu je glykosylován na asparaginu 596. Dojde – li v této aminokyselině k bodové záměně, například za glutamin, nedojde ke glykosylaci, což je provázeno zvýšenou ubiquitinací a následnou degradací proteinu v proteasomu (Nakagawa et al. 2009). Starší studie naopak uvádějí, že N-glykosylace není potřebná pro zabudování transportéru do membrány (Mohrmann et al. 2005). Zřejmě se ale jedná o experimentální artefakt způsobený použitou metodou transfekce. Na degradaci nesprávně glykosylovaného proteinu ABCG2 má vliv rovněž protein Derlin – 1. Pokud je nativní protein špatně glykosylován, je jeho degradace drahou ERAD zprostředkována právě proteinem Derlin – 1, což bylo zjištěno na buněčné kultuře buněk HEK293. Při experimentálním knockoutu Derlinu – 1 se zvýšil výskyt nedegradovaného proteinu. Naopak, přirozeně se vyskytující vnitrobuněčný protein Derlin – 1 neinteraguje s wild type transportérem ABCG2. Pokud je ale buněčná kultura, jejíž buňky přirozeně exprimují Derlin-1, navíc uměle transfekována tímto proteinem, pak přímo fyzicky interaguje s transportérem ABCG2 a snižuje jeho podíl na membráně (Sugiyama et al. 2011). Na internalizaci transportéru mají vliv i xantiny (jako kofein, theofylin a diphilin). Po jejich experimentálním podání dochází k degradaci proteinu v lysosomu (Ding et al. 2012). Myš domácí (*Mus musculus*), jakožto hojně používaný modelový organismus, rovněž má ve svém genomu gen pro transportér homologický lidskému ABCG2. Tento transportní protein byl nazván BCRP1 a je z 81% identický v sekvenci aminokyselin (kterých transportér obsahuje celkem 657) a z 86% homologní, co do struktury. Stejně tak jsou identické hydrofobní oblasti proteinu, které tvoří celkem šest transmembránových smyček. (Allen et al. 1999)



Obrázek 1 Struktura genu ABCG2 (Bailey-Dell et al. 2001)

4.2. Struktura a funkce jednotlivých domén

Transportní proteiny rodiny ABC jsou obecně složeny z transmembránové domény (TMD) a nukleotidy vázající domény (NBD). Tyto domény jsou spojeny prostřednictvím spojovacích smyček v rámci jednoho polypeptidu do tetrameru TMD1–NBD1–TMD2–NBD2. Ovšem u proteinu ABCG2 je pouze jedna TMD spojená s NBD, které

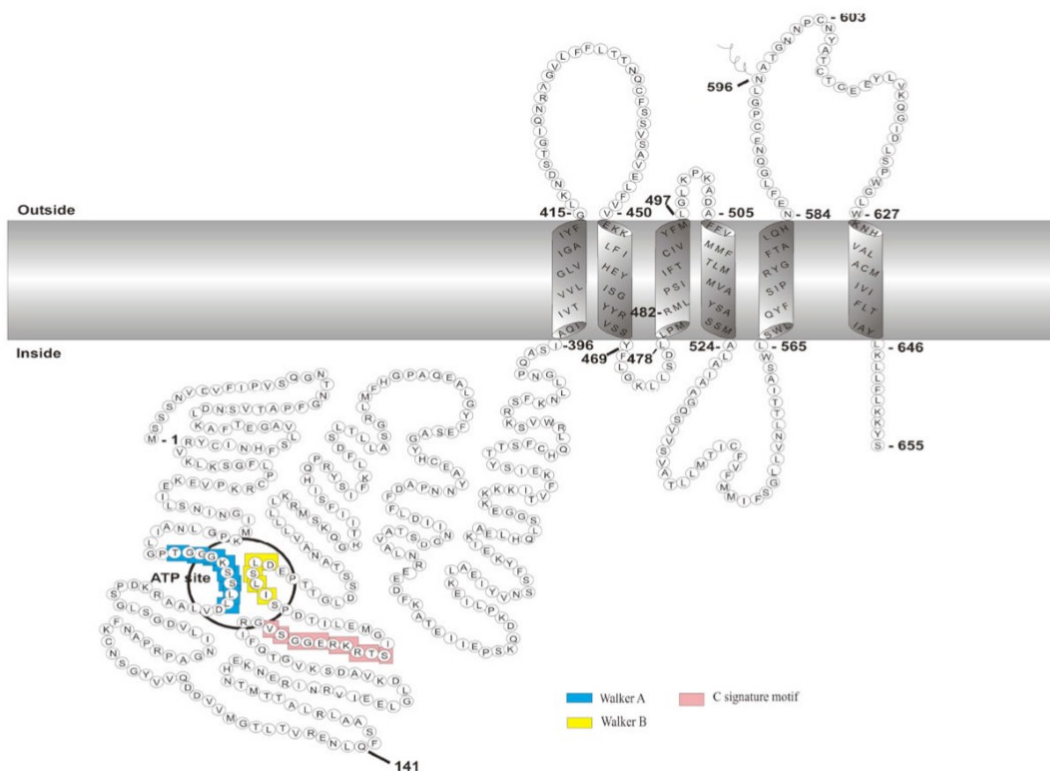
dohromady tvoří jednu podjednotku. Proto je také ABCG2 nazýván polo-transportérem. Jeho molekulová hmotnost činí přibližně 140 kDa, molekulová hmotnost jedné podjednotky pak 70 kDa. Pro zajištění své funkčnosti vyžaduje dimerizaci (K. K. Kage et al. 2002). Existují však také ale experimentální výsledky, že ABCG2 se v membráně buněk může nacházet jako dimer, ale uspořádaný po čtyřech dimerech do jedné jednotky (Dezi et al. 2010; Mcdevitt et al. 2006). Polypeptid tvořící transportér sestává s 655 aminokyselin. Celkově se každá podjednotka dimeru skládá ze šesti transmembránových šroubovic (aminokyseliny 396 – 655) a intracelulární smyčky (NBD, aminokyseliny 1-395), která obsahuje nukleotid vázající místo. N-konec i C-konec proteinu je umístěn uvnitř cytoplazmy (Honggang Wang, Lee, Cai, et al. 2008). Transportér obsahuje také Walkerův motiv A (v pozici G80 – S89) a Walkerův motiv B (v pozici I206 – D210) (Miyake et al. 1999). Protein ABCG2 se podařilo experimentálně krystalizovat a poté pomocí elektronové krystalografie na krystalech s rozlišením 2nm ukázat jeho strukturu. Ukázalo se, že ABCG2 protein je tvaru V, směřující svou otevřenou částí dovnitř, otevřená část je tvořená dvěma NBD doménami. Na tomto modelu vynikají dvě oblasti, které jsou nejspíš tvořeny spojovacími úseky mezi NBD a TMD tvořenými asi 100 aminokyselinami (Rosenberg et al. 2015). Za zmínku stojí vysoce konzervovaná část, takzvaná ABC struktura, lokalizovaná mezi Walkerův A a B motiv na nukleotid vázající části. Tato struktura má (u ABC transportérů obecně) vysoce konzervovanou sekvenci LSGGQ a je odpovědná za vazbu ATP. U ABCG2 je s touto konzervovanou strukturou homologní sekvence 186VSGGE190, ale u člověka a savců také ještě sekvence C2-motivu 352LSGGE356 (Macalou et al. 2016). Zdá se, že serin 187 má klíčový vliv pro transport. Například jeho substitucí za threonin se ztrácí transportní aktivita (Nakanishi et al. 2003).. Specifický inhibitor ABCG2 fumitremogin C inhibuje ATPázovou aktivitu proteinu. U mutací s jednobodovou záměnou argininu 482 za glycin či threonin byla pozorována (na rozdíl od divoké varianty proteinu) silná závislost hydrolyzy ATP na přítomnosti substrátů jako je prazosin, mitoxantron či doxorubicin. Mutant v lysinu 86 (K86M) zaměněný za methionin (tedy ve Walkerově A motivu) není vůbec funkční. Tato varianta je také v buňkách přednostně umístěna v Golgiho aparátu, místo buněčného povrchu. (Özvegy et al. 2002; Henriksen et al. 2005) U ABCG2 jsou celkem dvě ATP vázající domény (dále NBD; na každé podjednotce jedna), přičemž obě jsou aktivní. K hydrolyze ATP je třeba interakce obou domén a ATP. Laszlo a kolektiv publikovali strukturu ABCG2 založenou na bioinformatickém modelu srovnávajícím ABCG2 a homology ABCG5 a ABCG8. Transmembránová (TMD) a nukleotid vázající doména (NBD) jsou spojeny dvěma párujícími alfa-helixy a spojovacími alfa – helixy. Párovací helix je homologní s jinými proteiny rodiny ABC, ale i přesto má poněkud jinou konformaci. Jejich účelem je spojení NBD a TMD, ale oproti jiným proteinům z téže rodiny je interakce mezi oběma doménami zajištěna ještě dalšími, spojovacími alfa helixy, které jsou kolmé k helixům párovacím a jejich poloha je udržována působením hydrofobní interakce mezi hydrofilní a hydrofobní částí fosfolipidů tvořících membránovou vrstvu. Součástí transmembránové domény jsou extracelulární smyčky, které spojují membránové šroubovice. Jako podstatná se zdá zejména smyčka ECL3 mezi šroubovicemi (značenými th5 a th6) vymezená aminokyselinami 552 až 621 a která se díky své primární struktuře se zpětně zanořuje do membrány. Tato smyčka se u ABCG2 vyznačuje dvěma cysteiny v poloze 592 a 608 . Další mutace, záměna valinu 12 za methionin (V12M), nemá zřejmě měřitelný efekt na funkci transportéru. Vliv jednobodové

záměny glutaminu 141 za lysin (Q141K) na strukturu proteinu spočívá v interakci zbytku aminokyseliny Q141 v jedné ze šroubovic tvořící NBD doménu s postranními zbytky aminokyselin ve spojovací šroubovici (K382 a R383). Dojde-li totiž k této záměně, pozitivní náboje na zbytcích v obou šroubovicích se začnou odpuzovat, což vede k destabilizaci rozhraní mezi NBD a TMD. (László et al. 2016). Tato smyčka má podstatný vliv na transport hemu a je ze 14 % identická a z 15 % homologická hem – vázající doměně cytochromu b1. (Desuzinges-mandon et al. 2010) Výše zmíněné cysteinové zbytky 608 a 603 se zřejmě podílí na tvorbě disulfidických vazeb mezi oběma doménami. (Shigeta et al. 2010; Kage et al. 2005) Aminokyselinový zbytek argininu 383 je důležitý i co do stability proteinu. Při jeho záměně za alanin je protein z endoplasmatického retikula směřován k degradaci ERAD dráhou (Polgar et al. 2009). Na již zmíněné smyčce spojující membránové helixy Th5 a Th6 se nachází také asparagin 596, který je N-glykosylován (Nakagawa et al. 2009). Jednobodová záměna Q141K nemá vliv na lokalizaci transportéru v buňce, kdežto mutace V12M způsobuje spíš jeho nesprávnou lokalizaci také na bazolaterální membráně i v cytoplazmě (Izuarai, Ozasa, and Otani 2004). Na základě počítačového modelu byla určena možná místa pro vazbu substrátu. Dvě možná vazebná místa se nachází na NBD doměně, jedno mezi TMD obou podjednotek a jedno na extracelulární straně (toto ale zřejmě substrát v reálu neváže). Zvláště vazebné místo mezi oběma podjednotkami se zdá důležité pro transport substrátů (László et al. 2016). ABCG2 je unikátní svojí smyčkou (tzv. linkerem). Tato smyčka je svým způsobem výjimečná a není homologická s jinými proteiny rodiny ABC. Obsahuje totiž sekvenci 352LSGGGE356 (tzv. C2-sekvenci), která je již konzervovaná v rámci celé rodiny (označuje se jako kanonický C-motiv). Bodová mutace prvních dvou aminokyselin této sekvence inhibuje ATPázovou aktivitu proteinu. Mutanti v C2-motivu vykazují rozdílnou míru funkčnosti. Mutace v L352 a S353 vede ke ztrátě funkce. Zajímavé je, že tento C2-motiv u jiných organismů chybí: např. u ryb, prvoků či rostlin. Naopak je konzervovaná u savců a částečně u ptáků (Macalou et al. 2016). Konstrukty (např. experimentálně připojený polyhistidinový konec) připojené na N-konec transportéru, nemají podstatný vliv na jeho činnost (Telbisz et al. 2013). Další možnou regulací přenašeče je prostřednictvím množství membránového cholesterolu. Vhodným experimentálním modelem se staly hmyzí buňky Sf9, které mají v membránách obdobný obsah cholesterolu jako buňky savců. Navýšení koncentrace membránového cholesterolu zvyšuje transportní rychlost až cca 20-krát. Toto zvýšení ale nebylo patrné u proteinu s jednobodovou záměnou argininu 482 za glycin (R482G). Nutno ovšem dodat, že výsledky vycházejí z experimentu s izolovanými membránovými váčky, neboť experimentální odstranění cholesterolu (cyklodextrinem) z membrán buněk vede k jejich sníženému přežívání. Autoři také popsali rozdíl mezi citlivostí transportéru exprimovaného v membránových váčkách savčích buněk MCF a hmyzích Sf9, u druhého jmenovaného je citlivost transportéru ke stimulujícím látkám nižší. Významný vliv na citlivost k membránovému cholesterolu má arginin obsažený v třetí transmembránové smyčce proteinu. Jeho substitucí za threonin či glycin se citlivost k cholesterolu vytrácí (Telbisz et al. 2007). Cholesterol se často váže na proteiny v evolučně konzervovaném motivu (konsensus sekvenci) CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus) o sekvencním vzorci (L/V-(X)(1–5)-Y-(X)(1–5)-R/K). Gál a spolupracovníci našli v primární struktuře proteinu pět CRAC míst pro možnou vazbu cholesterolu (všechny buď přímo uvnitř nebo poblíž

transmembránových smyček). Zdá se, že cholesterol je nezbytný pro funkčnost transportéru. Záměny v pozicích Y469S a Y645S způsobují nejspíš špatné sbalení proteinu a nezdá se, že by byly součástí CRAC motivů. Mutant v Y570S nemá sníženou transportní kapacitu ani citlivost k cholesterolu. Konečně mutant Y413S má menší citlivost ke žlučovým kyselinám a cholesterolu a mohl by se tedy účastnit vazby cholesterolu (Gál et al. 2015). Jiní autoři rovněž zkoumali vliv mutací v pozici R482, což je u lidské varianty transportéru pozice důležitá pro rozpoznávání cholesterolu. Pokud je tato pozice mutována na izoleucin, metionin, lysin, tyrosin nebo je-li v pozici standardní arginin, je transportní funkce u proteinu výrazně citlivá k cholesterolu. Naopak u mutací v této pozici nesoucích aspartát, glycin, asparagin, serin či threonin vykazují pouze mírnou závislost transportní funkce na obsahu cholesterolu v membráně. Autoři rovněž zkoumaly vliv mutací v cholesterol vázající oblasti L555A a L558A. Ukázalo se však, že ani jedna z těchto mutací nemá vliv na ATPázovou aktivitu (Telbisz et al. 2014). Transportér ABCG2 lze fosforylovat, ale tato fosforylace není pro zachování jeho funkce nutná. Mohrman a jeho spolupracovníci testovali fosforylaci na buňčné linii karcinomu vaječníků(T8) a rovněž na buňkách MDCK a to tak, že srovnávali fosforylaci transportéru ABCC2 a ABCG2. Transportér ABCC2 je fosforylován, transportér ABCG2 nikoliv. Ve stejné práci se rovněž zabývali nutností glykosylace transportéru. U eukaryontních buněk je N-glykosylován motiv Asn-?-Thr/Ser (kde ? znamená libovolnou aminokyselinu, vyjma prolinu). Autoři pomocí bioinformatických metod našli celkem čtyři vhodná místa po tomto typ glykosylace, přičemž jedno z nich ovšem leží v intracelulární oblasti proteinu (N338), resp. v lumen endoplasmatického retikula. Připravili čtyři mutované proteiny s jednobodovou záměnou v asparaginech na pozici 418,557, 596 a mutanta ve všech třech zbytcích za alanin (na aminokyselinách v těchto pozicích autoři předpokládají možnost případné N-glykosylace proteinu). Jelikož nebyl nascentní protein N-glykosilován pouze v případě, že šlo o mutanta v pozici 596 a v případě trojnásobného mutanta, lze se domnívat, že právě N596 je oním místem glykosylace. Rovněž v myších buňkách je homologický BCRP1 transportér glykosylován v pozici 596 (Mohrman et al. 2005). Přehled některých mutací a jejich účinků na funkci transportéru uvádí tabulka 1. Častou pracovní technikou při zpracování biologických vzorků je jejich fixace, v případě imunohistologických vyšetření fixace v paraformaldehydu. Jako zajímavost s praktickým využitím lze uvést, že transportér ABCG2 je funkční co do přenosu Rhodaminu 123 až do 0,5% koncentrace paraformaldehydu.(Hegedu et al. 2008)

Mutace	Její účinek	Reference
V12M	Bez efektu na transport	(Tamura et al. 2006)
G51C	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
K86M	Transportér inaktivní	(Henriksen, Gether, and Litman 2005)
Q12stop	Defektní transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
Q141K	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
T153M	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
Q166E	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
I206L	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
F208S	Defektní transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
S248P	Defektní transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
E334stop	Defektní transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
F431L	Transportér nepřenáší metotrexát	(Tamura et al. 2006)
S441N	Defektní transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
E446 ?	Nevzniká rezistence	(Miwa et al. 2003)
R482G,T	Transportér nepřenáší metotrexát, změna substrátové specifity	(Pozza et al. 2006; Özvegy et al. 2002; Honjo et al. 2001)
R482G	Rezistence k antifolátům in-vitro	(Shafran et al. 2005)
F489L	Poškozený transport porfyrinů	(Tamura et al. 2006)
G553L,E	Poškozený trafficking, exprese a N-glykosylace	(Polgar et al. 2006)
L554P	Dominantně negativní vliv na mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR)	(K. K. Kage et al. 2002)
N557D	Buňky rezistentní k metotrexátu, pokles transportu SN-38	(Miwa et al. 2003)
F571I	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
N590Y	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
C592A	Poškozená funkce a exprese	(Henriksen et al. 2005)
C592A/C608A	Defektní transport BODIPY – Prazosinu, metotrexát normální	(Henriksen et al. 2005)
C603A	Nefunkční a se změnou zacílení proteinu	(Henriksen et al. 2005)
C608A	Poškozená funkce a exprese	(Henriksen et al. 2005)
D620N	Bez efektu na transport metotrexátu a hematoporfirynu	(Tamura et al. 2006)
H630?	Beze efektu na transport	(Miwa et al. 2003)
N – a C - konec	Jeho zkrácení má následek v nesprávném zacílení proteinu	(Takada et al. 2005)

Tabulka 1 Vliv některých jednobodových mutací na činnost transportéru. Upraveno podle (Hazai and Bikádi 2008)



Obrázek 2 Struktura jedné podjednotky (70 kDa) transportéru ABCG2 s vyznačením Walkerových motivů, C-signatury a některých aminokyselinových zbytků (Kang et al. 2010)

5. Typy přenášených substrátů

Jako jedny z prvních substrátů přenášených transportérem byly identifikovány mitoxantron, doxorubicin, daunorubicin a Rhodamin 123. Tyto substráty byly aktivně transportovány ven z buněk MCF-7 transfekovaných cDNA pro transportér ABCG2 (Doyle et al. 1998). Významným substrátem je cytostatikum metotrexát, jehož mechanismem účinku je kompetitivní inhibice enzymu dihydrofolát reduktázy (Rajagopalan et al. 2002). Tento substrát je přenášen transportérem s $K_m=1,34 (+18)$ mM a $v_{max}=687 (+87)$ pmol/mg.min. Protein mutovaný v R482T nebo R482G není schopen metotrexát vůbec přenášet. Konjugovaná metotrexát ve formě di- a triglutamátu je přenášen, ale tetraglutamát již ne. Dále je transportována kyselina listová (folát) a to sice s $v_{max}=87$ pmol/mg.min. Mutanty R482T nebo R482G nejsou schopny, stejně jako v případě metotrexátu, vůbec tento substrát přenášet. Transport metotrexátu je snížen v přítomnosti mitoxantronu, jenž je také substrátem tohoto proteinu. Tato skutečnost naznačuje kompetitivní inhibici mezi oběma substráty (Chen et al. 2003; Volk and Schneider 2003). Dalším substrátem, který je přenášen prostřednictvím ABCG2 je cytostatikum mitoxantron(1,4-dihydroxy-5,8-bis((2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl)-amino)9,10-anthracenedion-dihydrochlorid). Mechanismus jeho účinku je inhibice topoisomerázy II prostřednictvím interkalace mezi báze DNA (Mazerski J, Martelli S 1998). U buněk MCF-7/LF a MCF-7/MR-LF u nichž není exprimován protein BCRP dochází k vyšší akumulaci mitoxantronu oproti buňkám původní linie MCF-7. U této linie vykazující zvýšenou

expresi BCRP dojde po jeho experimentální inhibici k prudkému nárůstu akumulace mitoxantronu (Ifergan et al. 2004). Výše zmíněné cytostatikum daunorubicin funguje také jako interkalační inhibitor topoisomerázy II (Fornari et al. 1994). U buněk MCF-7 hojně exprimujících ABCG2 docházelo k redukci vnitrobuněčné akumulace daunorubicinu (Litman et al. 2000). Z výsledků měření akumulace tohoto fluorescenčního substrátu vyplývá, že není přenášen standardní variantou (wild typem), ale pouze mutovanou, ve které je arginin na pozici 482 zaměněn za glycin či threonin. Stejná situace nastává i pro Rhodamin 123 (Robey et al. 2003). Je tedy možné, že v předešlém experimentu na buněčných liniích immortalizovaných buněk došlo současně k mutaci v aminokyselině na této pozici. Ve stejné studii byl zjištěn i transport doxorubicinu, inhibitoru topoisomerázy II. (Doyle et al. 1998). V pokusu s použitím buněčné kultury buněk PA317/Tet-on/Tre byl rovněž prokázán eflux doxorubicinu ven z buněk a nárůst inhibiční koncentrace cytostatika u buněk s exprimovaným BCRP (Yuan et al. 2009). Inhibitor topoisomerázy I topotecan je dalším ze substrátů transportovaných ABCG2. U buněk MX3 a T8 pocházejících z ovariálního karcinomu bylo pozorováno snížení intracelulárního obsahu topotecanu přibližně 4–5 krát. Autoři uvádějí, že ke snížení vnitrobuněčné koncentrace tohoto léčiva o 70 % došlo do 30 sekund. (Line et al. 1999) Další z léčiv inhibujících topoisomerázu I je SN-38 (7-ethyl-10-hydroxykamptotecin). I tato látka je substrátem ABCG2, jak bylo zjištěno na buněčné kultuře odvozené z buněk rakoviny plic PC-6, u nichž bylo zjištěno, že míra rezistence k SN-38 stoupá s expresí ABCG2. Při experimentálním knockoutu pomocí RNA interference byla zvětšena citlivost buněk k tomuto substrátu (Kawabata et al. 2001). V membránových váčcích připravených z buněk PC-6, které byly selektovány v přítomnosti SN-38 bylo zjištěno, že je transportována tato látka i jako glukuronid, avšak s nižší afinitou ($K_m=26 \mu\text{M}$; $v_{\text{max}}=833 \text{ pmol/mg.min}$). Transport nekonjugovaného SN-38 má parametry ($K_m=4 \mu\text{M}$; $v_{\text{max}}=714 \text{ pmol/mg.min}$) (Nakatomi et al. 2001). Tyrozin kinázový inhibitor Sorafenib, používaný v léčbě karcinomů ledvin, je dalším substrátem transportovaným prostřednictvím ABCG2 (Wilhelm et al. 2008). Polarizované buňky MDCK-II byly transfekovány vektory pro lidský ABCG2 i jeho myší variantu. Při aplikaci sorafenibu na bazolaterální stranu došlo k jeho transportu směrem k apikální straně, přičemž tento transport byl vyšší pro myší variantu transportéru (zhruba třikrát) (Lagas et al. 2010). Závěr, že je sorafenib transportován apikálním směrem z buňky podporuje i další obdobný experiment založený na expresi myší varianty BCRP1 opět v buňkách MDCK-II, přičemž pro tento transportér byla změřena $K_m=5,5 \text{ nM}$ (+1,2nM). V buněčné kultuře buněk PA317/Tet-on/Tre byl testován přenos 5-fluoro uracilu, což je látka, která blokuje enzym thymidilátsyntázu, jež syntetizuje thymidin z uridinu jeho metylací. Této skutečnosti lze pak využít v léčbě nádorových onemocnění (Longley, Harkin, and Johnston 2003). Experimentálně bylo dokázáno, že 5-fluorouracil skutečně je substrátem ABCG2. Buňky v médiu s obsahem této látky přežívaly pouze pokud exprimovaly BCRP. Při jeho experimentálním knockoutu se buňky staly senzitivní k 5-fluorouracilu (Yuan et al. 2009).

Ze steroidních látek jsou transportovány převážně jejich sulfátované formy, jako estronsulfát (E1S; s $K_m=6,8 \mu\text{M}$) nebo 17- β -estradiol sulfát (E2S), ten je však transportován s nižší afinitou. Dále jsou transportovány dihydroepiandrosteron (DHEAS), 4-methylbelliferon sulfát (4-MUS) a 17- β -estradiol glukuronid (E2G). (Imai et al.

2003; Suzuki et al. 2003). Na bakteriích *Lactococcus lactis* bylo ukázáno, že ABCG2 může transportovat i estradiol. Ovšem, na rozdíl od předchozího experimentu nebyla provedena analýza radioaktivně značeného substrátu, který byl z buněk transportován ven. Je tedy pravděpodobné, že stejně jako výše, byl estradiol nejprve bakteriálními drahami konvertován na sulfátovanou formu a posléze přenesen transportérem ven z buňky. ATPázová aktivita transportéru byla v tomto experimentu přibližně čtyřikrát stimulována přítomností cholesterolu a estradiolu (Janvilisri et al. 2003). Buňky MCF-7 se sníženou expresí ABCG2 vykazují zvýšenou akumulaci radioaktivně značené kyseliny listové (folátu). Zároveň tytéž buňky jsou-li adaptované na přítomnost folátu v médiu, vykazují sníženou expresi ABCG2 (Ifergan et al. 2004). Kyselina močová (urát) je transportována v epitelu ledvin a enterocytech ve střevním epitelu rovněž prostřednictvím ABCG2 (Hosomi et al. 2012). Rovněž myší varianta ABCG2 transportuje kyselinu močovou (Ichida et al. 2012). Ukázalo se rovněž, že ABCG2 je jeden z transportérů schopný přenášet glutathion (GSH), což je molekula (tripeptid) zajišťující redukční prostředí uvnitř buněk. Autoři použili 2,5-dihydroxychalkon což je látka, která indukuje eflux glutathionu, glutathiondisulfidu a jejich konjugátů a zjišťovali, který z 84 předem vytipovaných proteinů by se mohl účastnit právě transportu GSH. Jako jediný přenašeč se ukázal ABCG2, což bylo ověřeno jeho expresí v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Přenos GSH prostřednictvím ABCG2 bylo možné kompetitivně inhibovat metotrexátem o koncentraci 10 μ M, což ukazuje, že afinita GSH k ABCG2 je nižší (Brechbuhl et al. 2010).

Z vitamínů je substrátem riboflavin (vitamin B2) a je přenášen jak myším, tak i lidským homologem ABCG2. Ve stejné studii bylo také zjištěno, že u myší knockoutovaných pro tento transportér je snížená hladina vitamínu H v mléku. Je tedy možné, že i vitamín H je substrátem ABCG2 (van Herwaarden et al. 2007). Také vitamín K3 (menadion; a jeho strukturní analog plumbagin) je transportován tímto proteinem, jak bylo zjištěno v buněčné kultuře buněk HEK 293 (Shukla et al. 2007).

Pro experimentální využití má význam přenos fluorescenčních barviv, která mohou sloužit jako marker funkčnosti transportéru, čehož je také v mnoha studiích využito. Jedním z těchto barviv je Rhodamin 123. Toto barvivo je přenášeno prostřednictvím ABCG2, jak bylo ukázáno na buňkách MCF a S1 exprimujících tento transportér (Litman et al. 2000) V další studii bylo upřesněno, že probíhá transport Rhodaminu 123, ale pouze jeho mutantní formou s jednobodovou záměnou v argininu 482 (R482G či R482T). Hoechst 33342 je transportován jak wild type variantou BCRP, tak i častými mutantními variantami R482G a R482T. Hoechst 33342 inhibuje ve vysoké koncentraci ATPázovou aktivitu proteinu (Özvegy et al. 2002). Dalším fluorescenčním barvivem, jež je substrátem ABCG2 je BODIPY – Prazosin (fluorescenční derivát Prazosinu), který je přenášen jak wild type variantou, tak i variantami s jednobodovými záměnami argininu 482 za threonin či glycin. Naopak barvivo LysoTracker green je transportováno pouze těmito mutantními variantami (Robey et al. 2003). Méně používaným fluorescenčním barvivem je Pheophorbide A, který je transportován jak wild type variantou, tak i variantami C592A, C608A (tedy variantami, kdy je narušena disulfidická vazba ve třetí extracelulární smyčce) (Hegedu et al. 2008)

Mezi ostatními transportovanými látkami můžeme nalézt Prazosin (antagonista α 1-receptorů) (Litman et al., 2000) antibiotikum Erythromycin (Hendrik 2005), inhibitor H2 receptoru pro histamín Cimetidin (Pavek et al. 2005). Také je přenášeno krevní barvivo hem, což má zřejmě za následek udržování jeho homeostázy v buňkách a při nabohacení transportéru zřejmě i vyšší odolnost buněk proti hypoxii. Hem je zřejmě předáván v extracelulárním prostoru na serumalbumin. (Desuzinges-mandon et al. 2010) Výčet substrátů samozřejmě není úplný, protože by zdaleka přesahoval rozsah této práce.

- Inhibitory ABCG2:

Nejvyužívanější inhibitor ABCG2, mykotoxin fumitremogin C, byl coby inhibitor identifikován na buněčné linii odvozené z karcinomu tlustého střeva, rezistentních k mitoxantronu, topotecanu a doxorubicinu. Tuto látku lze izolovat z plísně *Aspergillus fumigatus* metanolem a následnou krystalizací (Rabindran et al. 1998). Jeho inhibiční funkce byla ověřena i na buňkách MCF-7 (Rabindran et al. 2000). Fumitremogin C je neurotoxin, což jeho aplikaci omezuje na použití *in vitro*. Inhibitor Ko143 nebyl shledán toxickým *in vitro* ani *in vivo* pro myši model, přičemž inhibuje jak lidskou, tak i myši variantu ABCG2 (Allen et al. 2002). Podle novějších experimentů se ale ukazuje, že Ko143 v koncentraci větší než 1,0 μ M ztrácí svoji specifitu a ovlivňuje i jiné transportéry, například ABCC1 či ABCB1 (Weidner et al. 2015). Substance GF120918 (známá jako Elecridar) blokuje činnost jak ABCG2, tak i ABCB1 (Bruin et al. 1999). Také látky ovlivňující primárně jiné proteiny současně inhibují činnost ABCG2. Například tyrozin kinázový inhibitor Imatinib Mesylát inhibuje transportní funkci BCRP, přičemž ale není tímto transportérem přenášen (Houghton et al. 2004).

- Protilátky proti ABCG2.

V současné době existují tři různé monoklonální protilátky proti transportéru. Protilátka BXP-34 byla připravena imunizací myši sonikovanými buňkami MCF-7/MR a následným vytvořením hybridomů. (Lines et al. 2000) Protilátka BXP-21 byla získána imunizací myši částí proteinu ABCG2 dlouhou 126 aminokyselin (konkrétně 271 – 396) a následným vytvořením hybridomů s myšimi myelomovými buňkami Sp2/0 (Maliepaard et al. 2001). Další protilátkou získanou imunizací myši je monoklonální protilátka 5D3 (Zhou et al. 2001). Paraformaldehydová fixáž přitom zvyšuje afinitu této protilátky k transportéru (nejvyšší afinity je dosaženo při 0,5-1% koncentraci paraformaldehydu) (Hegedu et al. 2008).

6. Význam transportéru v jednotlivých buněčných typech

6.1. Tkáň varlat

Přítomnost transportéru ABCG2 byla pozorována na buňkách hemato-testikulární bariéry (Fetsch et al. 2006). Tuto bariéru tvoří tři typy buněk (endoteliální, myoidní a Sertolliho buňky) tvořící tři vrstvy. Buňky jsou vzájemně spojeny těsnými spoji. Účelem této bariéry je nepochybně ochránit germinální buňky před

případnými negativním vlivem toxických látek přenášených krví. Endoteliální buňky jsou bez fenestrace a tvoří povrch arteriol, Sertolliho buňky tvoří podpůrné buňky vyživující germinální buňky a myoidní buňky vytváří obal okolo semenotvorného kanálku ve formě membrány Tunica propria. Na vlastním transportu molekul přes bariéru se podílí řada transportních proteinů MRP1, MRP2, PGP1 a v neposlední řadě také ABCG2. Ten je exprimován na luminální straně endotelu a na apikální straně myoidních buněk. ABCG2 naopak není exprimován v Leydigových ani Sertolliho buňkách. Podobná situace je i v případě tkáně myších varlat (Dankers et al. 2012). V seminomech (nádorech vzniklých z mužských pohlavních buněk) a lymfomech je ABCG2 plně exprimován jak na samotných nádorových buňkách, tak i na endotelu cév, které je zásobují. Menší míra exprese je zřetelná v případě non-seminomu, tj. nádoru pocházejícího z nediferencovaných buněk. Celkově situace budí dojem, že škodlivé substráty jsou transportovány ze semenotvorného kanálku. Případné nabožení transportéru při vzniku nádoru svojí funkcí ztěžuje léčbu cytostatiky a jinými chemoterapeutiky, jež jsou tímto proteinem transportovány (cisplatin, doxorubicin a další) (Bart et al. 2004). Bylo ukázáno, že například antiretrovirotikum raltegravir je akumulováno v Sertolliho buňkách při inhibici ABCG2 inhibitorem Ko143 (Hoque et al. 2015). Stejně tak cytostatikum regorafenib blokuje tyrozín – kinázové receptory nádorových buněk se u ABCG2 knockout myši hromadí ve tkáni varlat (Kort et al. 2015). ABCG2 je naopak nekompetitivně inhibován testosteronem, progesteronem a androstenedionem (při pokusu byl substrátem estrogen – 1 –sulfát) (Dankers et al. 2012). Je tedy možné, že eflux substrátů je regulován také přítomností těchto hormonů. ABCG2 je také exprimován na spermatidách, zejména v pozdním stádiu jejich vývoje. Na jejich apikální straně je exprimován nejvíce ve stádiu VII vývoje spermatidy. ABCG2 je zde asociován s aktinovými vlákny a také s proteiny Arp3 a Eps8. Při experimentálním knockoutu ABCG2 u myši se ve stádiu VII vývoje spermatidy vytrácí její bazolaterálně apikální polarita a také ztrácí svojí adhezní schopnost, což se projevuje ve snížené schopnosti putovat epitelem (Qian et al. 2013).

6.2. Jaterní tkáň

Jak u člověka, tak i u myši je ABCG2 exprimován v játrech, konkrétně na membránách buněk epitelu žlučových kanálků (Fetsch et al. 2006). Télsisz a spolupracovníci zjistili, že žlučové kyseliny a látky z nich odvozené potlačují bazální ATPázovou aktivitu přirozeně se vyskytující varianty transportéru. V případě ABCG2 je bazální aktivita aktivitou, kterou lze zablokovat vanadátovými ionty. Kyselina cholová například bazální ATPázovou aktivitu silně snižuje (v pokusu na membránových váčcích) až na úroveň pozadí, ale v přítomnosti přenášeného substrátu (např. quercetinu) je tato aktivita nezměněna. Bazální aktivita je definována jako hydrolytická aktivita ATPázy bez přítomnosti přenášených substrátů. Stejně jako kyselina cholová se chovají například glykocholát, taurocholát nebo kyselina ursodeoxycholát. V přítomnosti substrátu pak naopak ATPázová aktivita stoupá i v přítomnosti žlučových kyselin oproti stavu bez substrátu (to je bazální aktivita). Pro interakci žlučových kyselin s transportérem se zdají být zásadní aminokyselinové pozice R482 a L555-558. Nicméně autoři se domnívají, že transportér ABCG2 nemá v játrech člověka velký význam, protože i jeho schopnost přenášet žlučové kyseliny je relativně malá – kyselinu cholovou a glykocholát transportuje zhruba 20x

pomaleji, estradiolglukuronid zhruba 5x pomaleji než metotrexát. Lze se domnívat, že v hepatocytech tedy slouží tento protein spíše pro transport xenobiotik do žluče, přičemž tento transport může být pozitivně modulován zvýšenou přítomností cholesterolu (Telbisz et al. 2014). Tomu by mohlo nasvědčovat i to, že při experimentálně navozené cholestáze (retenci žluči v játrech), dochází u myši po třech dnech ke snížení exprese BCRP v játrech (a také v ledvinách), naproti tomu jeho exprese stoupá v enterocytech. Tento jev však nebyl prokázán u člověka. Navíc mezi hladinou mRNA ostatních jaterních transportérů v játrech myši přirozené a knockoutované pro ABCG2 nebyl signifikantní rozdíl, což rovněž podporuje závěr, že ABCG2 není pro transport žlučových kyselin zásadní.

6.2.1. Substráty a xenobiotika přenášená ABCG2 v jaterních buňkách

Suzuki a jeho spolupracovníci prokázali, že ABCG2 transportuje sulfátované konjugáty steroidů a také některá další xenobiotika. Autoři provedli experiment na proteinu exprimovaném v membránových váčcích připravených z buněk P388 (buňky z myšního lymfomu) a rovněž i v buněčné kultuře těchto buněk exprimujících transportér. V takto připraveném experimentu se ukázalo, že estrogen-1-sulfát a dehydroepiandrosteron jsou substráty přenášené transportérem ABCG2. Dále byly testovány jako substráty 4-methylumbelliferyl sulfát (4-MUS/MUG), S-(2,4-dinitrofenyl)glutathion (DNP-SG), 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl)benzothiazole (E3040; také i jeho sulfátovaná forma), kyselina taurocholová (TLC; i její sulfátovaná forma), estradiol-17-D-glukuronid (E₂17G), přičemž se ukázalo, že jsou signifikantně významně více přenášeny právě sulfátované formy těchto substrátů. Transport jako taurocholátu, tak taurocholát-sulfátu nebyl signifikantně prokázán. Naopak autoři experimentálně ukázali, že transport estrogen-1sulfátu je nejspíše silně inhibován 4-ethylumbelliferyl sulfátem a cytostatikem SN-38 (7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin) a dále také dehydroepiandrosteronem, estradiol sulfátem, taurocholát sulfátem, para-nitrophenyl sulfátem (PNPS), a E3040S (Suzuki et al. 2003). Obdobně v další studii byla potvrzena inhibice činnosti transportéru ABCG2 přenášejícího mitoxantron zprostředkovaná 17-β-estradiolem, estronem, ale ne však již progesteronem. I v této práci došli autoři k závěru, že ABCG2 přenáší sulfátované substráty (zde například estron-sulfát s $K_m=6,8 (+1,4) \mu\text{M}$). Jako další inhibiční molekuly našli tauroolithocholát, tauroolithocholát-sulfát, estron, estron sulfát, dehydroepiandrosteron sulfát (ne však jeho nesulfátovanou formu), 17-β-estradiol i 17-β-estradiol sulfát, přičemž všechny inhibovali přenos estronsulfátu (Imai et al. 2003). Zajímavým substrátem pro ABCG2 je bezesporu benzo(a)pyren. Tato látka patří do skupiny polyaromatických uhlovodíků a je obsažena jak v polutantech v ovzduší, tak i například v potravinách, kde vzniká při jejich tepelné úpravě (smažení, grilování nebo uzení). Při požití je poté metabolizován na genotoxický anti-BP-7,8-diol-9,10-epoxid (Buening et al. 1978). U myši s knockoutovaným ABCG2 hladina benzo(a)pyrenu vzrůstá oproti wild type myši nejen v séru, ale také v mozku, srdci a plicích. U wild type myši byl pozorován eflux tritíem značeného benzo(a)pyrenu do žluči s maximem ve 35. minutě od intravenózní aplikace, u knockout myši je maximální množství vyloučené do žluči zhruba 2x menší s maximem ve 20. minutě (Kranz et al. 2014). Dalším toxickým substrátem je 2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazol(4,5-b)pyridin (PhiP), který je rovněž potravním karcinogenem. Je přenášen

bazolaterálně – apikálním směrem. Jeho přenos je inhibován například beclomethasonem, 6 α -methylprednisolonem, dexamethasonem, triamcinolonem (Pavek et al. 2005). V pivu, vínu, sušeném ovoci, obilninách a dalších zemědělských produktech se mohou vyskytovat metabolické produkty plísní rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, mezi nimi molekula ochratoxin A. Schrick a kolektiv nepřímo ukázali, že na transport ochratoxinu má vliv rovněž ABCG2. Autoři jeho transport testovali na polarizovaných buňkách Caco-2, u nichž došlo po podání specifického inhibitoru Ko143 k utlumení bazolaterálně apikálního transportu a naopak k nárůstu transportu opačným směrem (Schrickx et al. 2006). Dalšími významnými substráty přenášenými ABCG transportérem je 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin (IQ), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-1) a samozřejmě i širší veřejnosti známý aflatoxin B1. Všechny tři látky jsou možnými kontaminanty potravin či vedlejšími produkty jejich metabolické úpravy. Dalším karcinogenem je di(2-ethylhexyl) fthalát (DEHP), který může být obsažen v některých výrobcích z měkčeného PVC jako přísada při jeho zpracování. V *in – vitro* experimentu se ukázalo, že IQ, Trp-P-1 a aflatoxin B1 jsou skutečně přenášeny bazolaterálně apikálním směrem buňkami MDCK-II transfekovanými jak lidským ABCG2, tak i jeho myším homologem BCRP1. Zajímavé je, že Trp-P-1 je přenášen pouze myší variantou BCRP1. Transport DEHP tímto transportérem nebyl potvrzen. Akumulace těchto substrátů u knockout myši v játrech, ledvinách a střevním obsahu naznačuje, že jsou tyto vylučovány prostřednictvím ABCG2 právě do žluči, moči a feces (van Herwaarden et al. 2006). Také riboflavin (vitamín B1) je exportován prostřednictvím ABCG2 do hepatobiliárního prostoru (van Herwaarden et al. 2007). Přítomnost transportéru zdá se nemá vliv na koncentraci některých cytostatik, například regorafenibu (Kort et al. 2015). Exprese ABCG2 je rozdílná mezi pohlavími, a to jak u člověka, tak i u myši a její varianty transportéru BCRP1. Koncentrace některých xenobiotik (např.: topotecanu, furantoinu nebo PhiP) v plazmě myších samic byla v experimentu signifikantně vyšší, než u samců. Tyto látky byly vylučovány hepatobiliárně a v menší míře také epitelem tenkého střeva, a to signifikantně více u samic než u samců. Rovněž na vzorcích lidských jater byl zastoupen transportér ABCG2 více u mužů než u žen (Merino et al. 2005).

6.3. Epiteliální ledvinné buňky

Přítomnost transportéru v lidských ledvinách, konkrétně v proximálním tubulu na buňkách kartáčového lemu, byla popsána Hulsem. Autoři použili jak RT-PCR tak i imunohistochemické barvení pomocí protilátky BXP-9 (Huls et al. 2008). O dva roky dříve byl prokázán transportér ABCG2 v ledvinách myši, konkrétně na apikální straně buněk epitelu proximálního tubulu. Autoři zjistili, že při experimentálně vyvolané ischemii a následné regeneraci se zvyšuje množství ABCG2 proteinu na membráně, ale množství jeho mRNA v buňkách se snižuje. Autoři se domnívají, že jde o kompenzační mechanismus, který má odstranit z buněk toxické látky vzniklé během ischemie tkáně (Huls et al. 2006). Významnou molekulou transportovanou v nefronech ledvin je bezesporu urát, tedy aniont kyseliny močové. Dehghan a spolupracovníci v rozsáhlé studii na 11 847 (ve dvou různých kohortách; Rotterdamské a Framinghtonské) sledovaných subjektech zjistili, že významnou roli ve vzniku hyperurikémie, tedy stavu kdy stoupá retence a tedy i obsah urátu v séru, může hrát právě defekt

transportéru ABCG2. Ve své studii také identifikovali jednobodovou záměnu (SNP) v aminokyselinové sekvenci, a to sice glutaminu za lysin na pozici 141 (Q141K)(Dehghan et al. 2008) Tento závěr je také podpořen studií na kohortě 28 141 participantů, kdy bylo identifikováno celkem 954 jednobodových záměn v celkem devíti různých lokusech, přičemž jejich přítomnost byla v lokusu genu ABCG2 jako druhá nejčastější, přičemž zvýšení hladiny urátu bylo významnější u mužů než u žen zahrnutých do studie (Kolz et al. 2009). V jiné studii, založené na 644 mužských pacientech s diagnostikovanou hyperurikémií, bylo zjištěno, že při dysfunkci transportéru ABCG2 vzrůstá clearance urátu do moči. To by mohlo paradoxně naznačovat, že existuje i významný systém vylučování této látky založený právě na ABCG2 i mimo vlastní tkáň ledvin, konkrétně prostřednictvím epitelu tenkého střeva, při jehož výpadku je větší množství kyseliny močové sekretováno právě do ledvin. V rámci stejné studie byl testován transport urátu přenašečem ABCG2 (v tomto případě jeho myším homologem BCRP1), a to sice na membránových váčcích. Z experimentu vyplynulo, že ABCG2 transportuje urát s vysokou transportní kapacitou. Autoři se domnívají, na základě experimentu na myších, že dysfunkce transportéru ABCG2 způsobuje hyperurikémii právě proto, že klesá exkrece urátu ve střevě zprostředkovaná tímto transportérem, následkem čehož se jako kompenzační mechanismus rozvíjí exkrece urátu v ledvinách pomocí jiných transportérů (GLUT9, URAT1) (Ichida et al. 2012). Již dříve bylo ukázáno, že jednobodová záměna glutaminu 141 za lysin (Q141K) způsobuje takovou dysfunkci transportéru, která je příčinou dny. Tento fakt byl prokázán studií na 14783 dobrovolnících podrobených genotypování. Rovněž byly provedeny funkční studie na oocytech a polarizovaných LLC-PK1 buňkách. Studie prokázala, že ABCG2 exprimovaný na proximálním tubulu ledvin zajišťuje sekreci do lumen, nikoliv reabsorpci. Eflux byl potvrzen i na oocytech inkubovaných v radioaktivně značeném urátu a injikovaných mRNA pro ABCG2 (Woodward et al. 2009). Toto zjištění je podpořeno i faktem, že u pacientů, kteří jsou v konečném stádiu selhání ledvin (pacienti na hemodialýze) a trpících akutní gastroenteritidou, byly nalezeny jednobodové záměny v transportéru ABCG2. A to sice výše zmíněná Q141K a (minoritně zastoupená) Q126X (kde X je libovolná aminokyselina). U takto postižených pacientů dochází k signifikantnímu zvýšení hladiny urátu v séru, což potvrzuje důležitost exkrece této látky prostřednictvím střevního epitelu(Matsuo et al. 2016). Rovněž zajímavých výsledků bylo dosaženo ve výzkumu významu toxických látek, které se vyskytují v lidském séru a jejich případného potenciálu inhibovat transportér BCRP. U pacientů s chronickým selháním ledvin, popřípadě v konečném stadiu roste hladina kyseliny hippurové, indol-3-octové, indoxylsulfátu, kyseliny kynurenonové a fenylacetátu v krevním séru. Bylo zjištěno, že kyselina hippurová, indoxylsulfát (0,1 – 4 mM) a kyselina kynurenonová (0,05-3 mM) blokují transportér přenášející estrogen – 1 sulfát. Na rozdíl od těchto látek, oxalát, p-kresol, p-toluenesulfonová kyselina, putrescein a kyselina chinolinová nemají v zásadě vliv na činnost transportéru. Kyselina hippurová a indoxylsulfát inhibují transport estrogen-1-sulfátu nekompetitivně BCRP s $K_i=4$ mM, respektive $K_i=0,5$ mM (Mutsaers et al. 2011). Za použití potkana coby modelového organismu bylo ukázáno, že exprese ABCG2 na apikální membráně epitelálních buněk proximálního tubulu je řízena prostřednictvím receptoru V1a, což je receptor pro vazopresin. Za použití jeho syntetického agonisty (např. terlipressinu) lze vyvolat jeho stimulaci, což vede k expresi ABCG2 na apikální straně tubulárního epitelu a následně k poklesu sérové hladiny kyseliny močové a

naopak ke vzestupu její hladiny v moči. Současně stimulací tohoto receptoru dochází k poklesu exprese transportéru GLUT9, který urát naopak reabsorbuje (Taniguchi et al. 2016). Ke zvýšené expresi ABCG2 může vést také snížená degradace faktoru HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor). Tento faktor je při normálním okysličení tkání degradován prostřednictvím ubiquitin dependentní proteolýzy, naopak při vzniku hypoxie je jeho degradace zastavena a HIF-1 (po dimerizaci s další podjednotkou) pak slouží jako transkripční faktor spouštějící transkripci genu. Experimentálně lze faktor HIF-1 aktivovat prostřednictvím chloridu kobaltnatého, přičemž dojde ke zvýšení jak množství mRNA pro ABCG2, tak i samotného transportéru na membráně a tedy i ke zvýšení transportu jím přenášených substrátů. Experiment byl proveden na buňkách HK-2, jejichž linie pochází z buněk epitelu proximálního tubulu lidských ledvin (Nishihashi et al. 2017). Transportér je patologicky nabohacen také u rakovinných buněk karcinomu ledvin, čehož by mohlo být využito jak v diagnostice, tak i při případném odhadu prognózy pacienta. Ukázalo se totiž, že množství a vůbec přítomnost ABCG2 na membránách těchto buněk koreluje s dobou dožití pacientů s tímto onkologickým onemocněním a také pozitivně se vznikem metastáz (Haofei Wang et al. 2017).

6.4. Mozek a hematoencefalická bariéra

Transportér ABCG2 je exprimován a je detekovatelný na cévách v mozku (Maliepaard et al. 2001; Fetsch et al. 2006). U endotelu mozkových kapilár prasete byl již v roce 2002 objeven transportér s vysokou mírou homologie v aminokyselinové sekvenci k lidskému ABCG2 (Eisenblätter and Galla 2002). Proti této prasečí variantě, nazvané BDCP, lze rovněž použít monoklonální protilátku BXP-21 (Eisenblätter et al. 2003). Exprese BCRP není pozorovatelná v buňkách glie a neuronech, naopak je zachytitelná v endotelu mozkových cév. V případě mozkových tumorů je ABCG2 v cévách, které tumor zasobují, nabohacen. Detekce proteinu proběhla za pomoci protilátky BXP-21 (Aronica et al. 2005). Tato skutečnost je v souladu s funkcí hematoencefalické bariéry, která má bránit vstupu škodlivých látek k vlastním neuronům, čemuž napomáhá i eflux škodlivých látek již buňkami endotelu mozkových kapilár. Přítomnost ABCG2 v endoteliálních buňkách byla také dokázána při izolaci mozkových kapilár potkana (Yousif et al. 2007). Význam ABCG2 v endoteliálních buňkách tvořících hematoencefalickou bariéru se pokusili objasnit autoři experimentu na potkanech knockoutovaných pro transportér p-glykoprotein (P-gp) a wild type potkanech exprimujících tento transportér. Oběma skupinám potkanů byly podávány substráty přenášené transportérem ABCG2, a to sice mitoxantron a prazosin a rovněž také vinblastin, který naopak substrátem není. Rovněž byly oběma skupinám potkanů podávány inhibitory obou transportérů (GF120918) či jenom transportéru P-gp (PSC833). Ukázalo se, že endotel kapilár v mozku obsahuje (cca 700x) víc ABCG2 než vlastní tkáň mozku. U potkanů s knockoutem P-gp bylo na endotelu exprimováno cca třikrát víc ABCG2 než u wild type potkanů. Ve výsledku byl při inhibici ABCG2 inhibitorem GF120918 více ovlivněn transport mitoxantronu (0,67-krát) a prazosinu (0,71-krát) u myši bez transportéru P-gp než u wild type myši. Toto pozorování dokresluje skutečnost, že ABCG2 transportér převzal funkci v odstraňování toxických substrátů po nepřítomném P-gp (Cisternino et al. 2004). Rovněž byl potvrzen eflux kinázového inhibitoru Afanitib, který je užíván při léčbě mozkových metastáz pocházejících z velkobuněčného

karcinomu plic. Na úrovni buněčné kultury byl potvrzen transport apikálním směrem jak lidskou, tak i myší variantou ABCG2. Zde bylo ovšem v experimentu na myších ukázáno, že na jeho exfluxu se kromě ABCG2 podílí i jiný transportér, a to sice ABCC1 (Durmus et al. 2015). K obdobnému výsledku dospěli výzkumníci i při testování jiného inhibitoru tyrosin kináz, sorafenibu, který je u myší knockoutovaných pro ABCG2 akumulován v mozku 4,3-krát více než u wild type myší (Lagas et al. 2010). Rovněž další tyrosin kinázový inhibitor regorafenib se u ABCG2 knockout myší hromadí v mozku a to v průměru 4,4-krát více než u wild type kontroly (Kort et al. 2015). Směr transportu byl také testován na in vitro kompozitním modelu složeném z hovězích mozkových kapilár a astrocytů potkanů, přičemž substrát, triciem značený estron-3-sulfát byl přenášen směrem z mozkové tkáně do lumen kapilár (Helms et al. 2014). Klinicky jistě významnou regulací proteinu ABCG2 na hematoencefalické bariéře je jeho downregulace prostřednictvím nekonjugovaného bilirubinu, jehož koncentrace v séru je zvýšena při jaterních onemocněních. U potkanů bylo experimentálně zabráněno odtoku žluči, což vedlo k navýšení žlučových solí a jejich konjugátů v séru, přičemž na endotelu mozkových kapilár byl zjištěn úbytek exprimovaného BCRP. Sérum těchto jedinců inhibovalo transport a snižovalo expresi transportéru v *in vitro* kultivovaných lidských mozkových endoteliálních buňkách. Dalším výzkumem bylo zjištěno, že za tento efekt je zodpovědný právě nekonjugovaný bilirubin a ne jiné, konjugované, formy jako chenodeoxycholová kyselina, ursodeoxycholová kyselina či deoxycholová kyselina (Xu et al. 2016). Zajímavým zjištěním je možnost blokovat funkci transportéru na hematoencefalické bariéře pomocí nízké koncentrace (10 nM) 17- β -estradiolu (E2). Po jeho aplikaci na explantované mozkové kapiláry potkana a myši byl v řádu minut snížen transport fluorescenčního substrátu prazosinu, aniž by byla snížena transkripce či translace proteinu. Vzhledem k nízké koncentraci byla vyloučena kompetitivní inhibice transportéru. Autoři dále uvádějí (za použití agonistů a antagonistů receptorů E2), že právě stimulace tohoto receptoru může omezit transportní funkci ABCG2 (Hartz et al. 2010). Dalším, neméně zajímavým zjištěním, je bezpochyby regulace exprese pomocí receptoru (PPAR α), což je receptor fungující jako senzor pro udržení lipidové homeostázy (Muerhoffet al. 1992). K testování transportní funkce proteinu v endotelu mozkových kapilár byl opět využit fluorescenčně značený prazosin. Kapiláry byly izolovány a kultivovány *in vitro*. Receptor Ppara byl stimulován syntetickým agonistou clofibrátem. Po této stimulaci byl zjištěn nárůst činnosti transportéru. Při 4 hodinové expozici 50 μ M clofibrátu byl nárůst exprese ABCG2 (stanoveno imunofluorescencí) téměř o 50% vyšší. U myší s knockoutem genu pro Ppara nebyl pozorován žádný vliv clofibrátu. Rovněž byl testován vliv kukuřičného oleje, který obsahuje mastné kyseliny, jež jsou přirozenými ligandy tohoto receptoru. Při srovnání s kontrolní skupinou nebyl zjištěn žádný signifikantní vliv látek obsažených v oleji na expresi ABCG2 (Calcagno et al. 2016).

6.5. Epiteliální buňky střeva

Transportér ABCG2 je také hojně zastoupen ve střevní tkáni, respektive na buňkách jeho epitelu (Maliepaard et al. 2001; Fetsch et al. 2006). U zdravých jedinců byla přítomnost mRNA pro transportér zaznamenána v celé délce střevního traktu, a to v segmentech střeva odebraných pomocí biopsie z dvanácterníku, terminálního ilea, vzestupné, příčné, sestupné části tračnicku a sigmoidea. Zastoupení ABCG2 v epiteliálních buňkách klesá

směrem od duodena, kde je maximální (100%) až k sigmoideu (50,1%), přičemž nebyl nalezen významný rozdíl mezi pohlavími. V buňkách Caco-2 (imortalizovaná linie odvozená z lidského epiteliálního adenokarcinomu) je exprese transportéru srovnatelná. (Gutmann et al. 2005) Toto zjištění vyvolává dojem, že výskyt ABCG2 koreluje se zastoupením toxinů v potravě. Z fyziologického hlediska je zajímavý fakt, že enterocyty, prostřednictvím ABCG2 odstraňují sulfátované a glukuronidované konjugáty nejrůznějších látek, které jsou epitelem absorbovány. Při experimentální perfuzi in vivo střeva myši 4-methylumbelliferonem (4MU) a E3040 (6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methyl-amino-4-(3-pyridilmethyl)-benzothiazolem) byla sekrece vnitrobuněčně upravených metabolitů obou látek přibližně šestkrát nižší u myši bez exprimovaného transportéru (Adachi et al. 2005). Stejně tak i rostlinný flavonoid quercetin je transportován směrem do lumen střeva tímto proteinem. Tato látka je vyloučena opět ve formě glukuronidu. (Sesink et al. 2006) Ve střevním epitelu je transportérem aktivně transportován inhibitor topoizomeráz topotecan. U knockoutovaných myši roste jeho absorpce ve střevě téměř šestkrát, respektive je omezen jeho zpětný eflux do střeva (Jonker et al. 2002). Protizánětlivý prostředek sulfasalazin, používaný také v léčbě některých autoimunitních onemocnění, je prostřednictvím ABCG2 transportován v enterocytech bazolaterálně apikálním směrem. Na dobrovolnících bylo zjištěno, že jedinci s jednonukleotidovou záměnou Q141K, popřípadě se záměnou Q141K i V12M vykazují nižší clearance sulfasalazinu, než nositelé wild type varianty. Autoři předpokládají využití sulfasalazinu jako experimentálního in vivo substrátu pro transportér BCRP (Urquhart et al. 2008). Již výše zmíněný tyrozinkinázový inhibitor Afanitib je rovněž transportován prostřednictvím ABCG2. U myši s knockoutem pro gen ABCG2 vzrůstá jeho koncentrace v séru za 24 hodin 4,2-krát. To naznačuje, že v rámci střevního epitelu je tato substance aktivně vylučována tímto transportním proteinem směrem do lumen střeva (Durmus et al. 2015). Feoforbid A je rozpadovým produktem chlorofylu, vznikající například působením enzymu chlorofylázy. U myši s knockoutem pro BCRP dochází k nárůstu koncentrace této látky v séru 17-krát oproti wild type kontrole (Johan W Jonker et al. 2002). Další významnou látkou sekretovanou do lumen střeva je vitamín B2. U myši bez tohoto transportéru dochází k poklesu obsahu riboflavinu ve stolici 6,2-krát (van Herwaarden et al. 2007). Všechny tyto příklady názorně ilustrují funkci transportéru ve střevní tkáni, což je zpětná exkrece toxických metabolitů zpět do lumen střeva. Důležitým substrátem, vylučovaným transportérem ABCG2 do lumen střeva je bezesporu kyselina močová, která je zhruba ze dvou třetin vylučovaná v epitelu ledvin (viz výše). V pokusu na potkanech bylo ukázáno, že po intravenózním podání radioaktivně značeného urátu (u potkanů, kterým byl podáván oxonát, což je inhibitor enzymu urikázy, který metabolizuje urát na allantoin), se vylučuje tato kyselina močová přibližně z 9% střevním epitelem (přičemž ale zhruba 50% zůstává nevyloučeno v těle). U myši knockoutovaných pro BCRP bylo vylučování urátu do střeva signifikantně sníženo na úkor zvýšení jeho hladiny v séru. Rovněž byl potvrzen export kyseliny močové bazolaterálně apikálním směrem, to je do lumen střeva. Clearance urátu u potkanů činí pro střevo 0,15 mL/min, pro ledviny 0.50 mL/min a pro žlučové cesty 0.02 mL/min, což ukazuje význam střeva pro extrarenální vylučování urátu (Hosomi et al. 2012). Hypotéza, že by přítomnost funkčního proteinu ABCG2 na epitelu střeva mohla snižovat hustotu bakteriálních biofilmů na jeho povrchu, se nepotvrdila (na rozdíl od vlivu transportéru P-gp) (Crowe 2011).

6.6. Žláznatá tkáň

Transportér ABCG2 je exprimován v tkáni s funkcí žláz s vnitřní i vnější sekrecí, jako jsou buňky pankreatu, nadledvin, mléčné žlázy či hypofýzy (Maliepaard et al. 2001; Fetsch et al. 2006). Ve tkáni hypofýzy a pankreatu je transportér majoritně lokalizován ve stěně endotelu cév, které tyto tkáně vaskularizují. U myši je transportér lokalizován také v kapilárách kůry nadledvin, a intracelulárně v buňkách zona glomerulosa a reticularis, ne však ve dřeni nadledvin. Ve vlásečnicích zásobujících pankreas je relativně slabě detekovatelný BCRP, ale ne už ve vlastní tkáni slinivky, ani v exokrinní, ani endokrinní části (Dankers et al. 2012). Naopak na povrchu rakovinných buněk pankreatu je naopak ABCG2 exprimován výrazněji (Guo et al. 2009). Tímto faktem lze také vysvětlit, proč se téměř žádná publikovaná práce nevěnuje fyziologické funkci transportéru v tkáni pankreatu. Polyfenol resveratrol, rostlinný flavonoid (obsažený například v hroznech či citrusech) snižuje expresi ABCG2 v rakovinných kmenových buňkách původem z pankreatické tkáně (Shankar et al. 2011). Zajímavou lokalizací transportéru je epitel mléčné žlázy. ABCG2 byl detekován na alveolárním epitelu, ale ne na epitelu hlavního mlékovodu. Expresie proteinu je detekovatelná pouze u jedinců s probíhající laktací a to jak u myši, skotu, tak i u člověka. Naopak protein nelze detekovat u adultních jedinců před počátkem laktace či u rodivších samic, u nichž právě neprobíhá laktace (Jonker et al. 2005) Při experimentu s triciem značeným riboflavinem (vitamín B2) se ukázalo, že u myši s knockoutem pro BCRP je v jejich mléku obsaženo téměř 13-krát méně tohoto vitamínu než u divoké kontroly. Tento vitamín je transportován jak myši tak i lidskou variantou ABCG2 a to sice ve směru bazolaterálně apikálním (testováno na buňkách MDCK-II). U myši rovněž byla prokázána závislost koncentrace riboflavínu v plazmě na pohlaví ve prospěch samic. Tento rozdíl nebyl zaznamenán u knockout myši. Lze předpokládat, že u myších samců je větší zastoupení BCRP v orgánech schopných exkrece. U myši defektních pro tento transportér je rovněž snížena hladina biotinu (vitamínu H) v mléce (van Herwaarden et al. 2007). U myši byl také prokázán podíl na transportu 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolinu (IQ), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indolu (Trp-P-1) do mléka, a to sice experimentem *in-vivo* (van Herwaarden et al. 2006). Podobně u skotu tento transportér přenáší do mléka různé substráty, z nichž hospodářsky významná jsou antibiotika, například danofloxacin (Real et al. 2011). Bylo také zjištěno, že jednobodová záměna v tyrozinu 521 za serin (Y521S), způsobuje zvýšení hladiny enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu v mléku holštýských krav (Otero et al. 2016). ABCG2 je také exprimován v buňkách slzné žlázy (Tiwari et al. 2012)

6.7. Placenta a syncytiotrofoblast

Transportér ABCG2 je u člověka hojně exprimován na membránách buněk syncytiotrofoblastu placenty (Fetsch et al. 2006; Maliepaard et al. 2001). Na experimentu u myši a jejího homologa BCRP1 bylo po podání inhibitoru GF120918 pozorováno zvýšení cytostatika topotecanu v tkáních myšího plodu a to 3,2-krát. V buňkách buněčné linie LLC-PK a MDCK1 byl prokázán transport bazolaterálně apikálním směrem. (Jonker 2000) U potkana byl BCRP nalezen v syncytiotrofoblastu a to sice v zóně zvané labyrint, kde je přítomna pouze fetální

krev. Naopak nebyl detekován ve fetálních kapilárách. Pokusem na in-vivo perfundované placentě byl zjištěn transport cimetidinu. Tento transport probíhal směrem od fetálního krevního oběhu k matčině krevnímu oběhu zhruba 25-krát víc než směrem opačným. Transportér také transportoval cimetidin proti jeho koncentračnímu gradientu. ABCG2 tak zřejmě chrání plod před vstupem toxických látek z maternálního oběhu a také pomáhá odstraňovat toxické látky přímo z fetálního oběhu a tedy i ze samotných tkání plodu (Staud et al. 2006). Rovněž u myši knockoutované pro myší homologický transportér BCRP1 došlo k nárůstu koncentrace substrátu nitrofurantoinu ve tkáních plodu, což podtrhuje detoxifikační význam tohoto transportéru (Zhang et al. 2007). Syncytiotrofoblast exportuje estron a 17- β - estradiol směrem do těla matky. Imai a kolektiv zkoumali možnost, že se na transportu těchto látek podílí i ABCG2. V experimentu se ukázalo, že jak estron, tak 17- β -estradiol je transportován v bazolaterálně – apikálním směru, zatímco reabsorpce (tedy transport apikálně – bazolaterálním směrem) je výrazně redukován. Naopak transport kortizolu a estron-sulfátu, ať už jakýmkoliv směrem, je minimální a srovnatelný jak ve wild type buňkách LLC, tak i v buňkách s exprimovaným ABCG2. Kortizon ani estron sulfát zřejmě tedy nejsou substráty tohoto transportního proteinu (Imai et al. 2003). Při experimentálně vyvolané cholestáze u myši byl pozorován nárůst přítomnosti žlučových kyselin v plodu a to u myši kockoutovaných pro ABCG2 (Blazquez et al. 2012). U buněk získaných z lidského chorionkarcinomu (buňky BeWo) byla rovněž prokázána přítomnost ABCG2 a rovněž bylo zjištěno, že transport mitoxantronu jakožto známého ABCG2 substrátu, probíhá bazolaterálně – apikálním směrem. Stejným směrem probíhá i exkrece toxických látek in vivo z tkání plodu do maternálního oběhu (Staud et al. 2006). V tkáňové kultuře buněk BeWo byla zkoumána možnost regulace exprese prostřednictvím progesteronu a 17 β -estrogenu. Progesteron významně zvyšuje expresi (a současně i syntézu mRNA) transportéru, kdežto 17 β -estrogen jeho expresi snižuje. Pokud působí oba steroidy současně, exprese proteinu je spíše zvýšena. Regulace probíhá přes receptor progesteronu a estrogen (Wang et al. 2006). Indukce exprese je řízena pouze podtypem B receptoru progesteronu (PRB), varianta A receptoru má na regulaci exprese pouze malý vliv (Wang et al. 2008). U BeWo buněk s umlčenou expresí ABCG2 došlo k nárůstu externalizace membránového fosfatidyl serinu a akumulace ceramidu. Dále také snížením exprese ABCG2 dochází ke snížení exprese β HCG a rovněž proteinu HERV-W, který se účastní tvorby syncytií v zárodečném vývoji (Evseenko et al. 2007). Rozborem placent japonských žen byly identifikovány dvě relativně časté varianty jednobodových záměn, a to sice V12M (G34A) – 18% a Q141K – 36% (C421A). Například inhalace cigaretového kouření během těhotenství neměla vliv na množství exprimovaného ABCG2 na placentálních buňkách. Dá se tedy předpokládat, že toxiny inhalované při kouření jsou méně účinně odstraňovány z tkáně plodu. (Kobayashi et al. 2005) Zajímavou výzkumnou metodou, která jistě najde využití (nejen ve výzkumu funkce transportéru v placentě) je myš exprimující luciferázu, která je schopna přeměnit substrát luciferin na oxo-luciferin za vzniku světelného záření. Autoři prokázali, že D-luciferin je současně substrátem ABCG2 (ale ne již transportéru P-gp). Křížením transgenního samce s wild type samicí a po podání D-luciferázy došlo ke vzniku bioluminiscence plodů, která významně vzrostla po podání inhibitorů ABCG2 (Kumar et al. 2016). Zdá se, že přítomnost a tedy i funkce transportéru na membránách buněk placenty, je negativně regulována přítomností Cd²⁺ iontů. Tato down-

regulace by mohla způsobovat toxicitu kadmia pro plod během těhotenství. Je ovšem nutné dodat, že autoři ve své studii nedovedli dosud plně prokázat, jestli není prostřednictvím Cd^{2+} down regulován i transportér ABCB4 či oba transportéry současně (Liu et al. 2016).

6.8. Kmenové buňky

U kmenových hematopoetických buněk z kostní dřeně myši bylo zjištěno, že aktivně odstraňují ze své cytoplasmy barvivo Hoechst 33342. Takovéto buňky, tvořící subpopulaci, byly nazvány kmenovými buňkami postranní populace (side population – SP buňky), protože si ve tkáni zachovávají i dále charakteristiky kmenových buněk, to je především multipotenci (Goodell et al. 1996). U myši bylo zjištěno, že buňky vykazující fenotyp postranní populace se nalézají v tkáních jako je kosterní svalstvo, mozek, slezina, srdce, játra, plíce a tenké střevo (Asakura and Rudnicki 2002). Zhou a kolektiv dokázali u myši s experimentálním knockoutem ABCG2, že u ní dojde k redukci buněk s fenotypem postranní populace v kostní dřeni a kosterní svalovině. Ukázalo se, že exprese BCRP je nezbytná pro udržení fenotypu postranní populace kmenových buněk, ale i při jeho experimentálním vyřazení dále v kostní dřeni existuje populace hematopoetických kmenových buněk, tedy těch, které nevykazují fenotyp postranní populace. Proto také u knockout myši probíhala normální hematopoéza (Zhou et al. 2002). Další práce potvrdila, že za fenotyp postranní populace v buňkách kostní dřeně myši je zodpovědný právě BCRP. Naopak se ale ukázalo, že v epiteliálních buňkách myši mléčné žlázy je za tento fenotyp zodpovědný jak ABCG2, tak i přenašeče Mdr1a a Mdr1b. (Jonker et al. 2005) U člověka rovněž hematopoetické kmenové buňky mají fenotyp postranní populace a jsou tedy vybaveny transportérem ABCG2 (Scharenberg et al. 2017). U myši existuje tato postranní populace rovněž v srdci (Martin et al. 2004). Také v buňkách tvořících plicní tkáň byl zaznamenán tento fenotyp. Buňky postranní populace tvoří u myši přibližně 0,03 – 0,07% všech plicních buněk. V distálních částech alveolů a hladké svalovině plic je sice exprimován ABCG2, ale pouze intracelulárně a buňky tak netvoří onu postranní populaci. Kde v plicní tkáni myši jsou tedy tyto kmenové buňky lokalizovány, autoři nevyřešili (Summer et al. 2003). V lidských plicích byly SP buňky nalezeny v tracheobronchiálním epitelu a v buněčné kultuře je bylo možné diferenciovat na buňky epitelu. Zajímavé je, že u plic astmatiků je větší výskyt těchto buněk (Hackett et al. 2008). Také v buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu byla zaznamenána populace postranních kmenových buněk (Lechner et al. 2002). Dále byly tyto buňky nalezeny v zubní dřeni člověka (Honda et al. 2007) a také v okolí germinativní zóny čočky oka myši (Oka et al. 2010).

7. Závěr

Protein ABCG2 (BCRP, MXR) je buněčný transmembránový protein, který je exprimován v celé řadě živočišných tkání. Z molekulárně biologického hlediska jde o protein, homodimer o celkové molekulové hmotnosti 140 kDa spojený disulfidickými můstky. Protein má celkem šest transmembránových smyček a Walkerův motiv A a B umožňující vazbu a hydrolýzu ATP za účelem transportu substrátu. Umožňuje především odstraňovat toxické látky z intracelulárního prostředí do extracelulárního. Z nejvýznamnějších tkání jsme uvedli hemato-testikulární

bariéru, hemato-encefalickou bariéru, epitel proximálního tubulu ledvin, epitel tenkého střeva a zažívacího traktu, bariéru endotel-syncytiotrofoblast placenty a některé žláznaté tkáně. ABCG2 hraje významnou roli v efluxu protinádorových léčiv u buněk tvořících tumory a také řada běžně používaných cytostatik je substrátem tohoto proteinu. V neposlední řadě je exprese ABCG2 markerem pro rozpoznání postranní populace kmenových buněk. Ze stručného výčtu těchto vlastností je zřejmá důležitost ABCG2 ve fyziologii organismu, jeho role však v některých tkáních zatím zůstává neobjasněna. Stejně tak není ještě zcela objasněna struktura a detailní princip funkce transportéru na molekulárně biologické úrovni.

8. Literatura

- Adachi, Yasuhisa, Hiroshi Suzuki, Alfred H Schinkel, and Yuichi Sugiyama. 2005. "Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) in the Extrusion of Glucuronide and Sulfate Conjugates from Enterocytes to Intestinal Lumen." *Molecular Pharmacology* 67 (3): 923–28.
- Allen, John D, Remco F Brinkhuis, Jan Wijnholds, and Alfred H Schinkel. 1999. "The Mouse Bcrp1 / Mxr / Abcp Gene : Amplification and Overexpression in Cell Lines Selected for Resistance to Topotecan , Mitoxantrone , or Doxorubicin." *CANCER RESEARCH*, 4237–41.
- Allen, John D, Arnold Van Loevezijn, Jeany M Lakhai, Martin Van Der Valk, Olaf Van Tellingen, Glen Reid, Jan H M Schellens, Gerrit-jan Koomen, and Alfred H Schinkel. 2002. "Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C." *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (April): 417–25.
- Allikmets, Rando, Lynn M. Schriml, Amy Hutchinson, Vincenzo Romano-Spica, and Michael Dean. 1998. "A Human Placenta-Specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance." *Cancer Research* 58 (23): 5337–39.
- Aronica, Eleonora, Jan A. Gorter, Sandra Redeker, Erwin A. Van Vliet, Marja Ramkema, George L. Scheffer, Rik J. Scheper, et al. 2005. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain." *Epilepsia* 46 (6): 849–57.
- Asakura, Atsushi, and Michael A Rudnicki. 2002. "Side Population Cells from Diverse Adult Tissues Are Capable of in Vitro Hematopoietic Differentiation." *Experimental Hematology* 30: 1339–45.
- Bailey-Dell, K J, B Hassel, L a Doyle, and D D Ross. 2001. "Promoter Characterization and Genomic Organization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (ATP-Binding Cassette Transporter G2) Gene." *Biochim Biophys Acta* 1520 (3): 234–41.
- Bart, J., H. Hollema, H. J M Groen, E. G E De Vries, N. H. Hendrikse, D. T. Sleijfer, T. D. Wegman, W. Vaalburg, and W. T A Van Der Graaf. 2004. "The Distribution of Drug-Efflux Pumps, P-Gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the Normal Blood-Testis Barrier and in Primary Testicular Tumours." *European Journal of Cancer* 40 (14): 2064–70.
- Blazquez, Alba G, Oscar Briz, Marta R Romero, Ruben Rosales, Maria J Monte, Javier Vaquero, Rocio I R Macias, Doris Cassio, and Jose J G Marin. 2012. "Characterization of the Role of ABCG2 as a Bile Acid Transporter in Liver and Placenta." *Molecular Pharmacology* 81 (2): 273–83.
- Brechbuhl, Heather M., Neal Gould, Remy Kachadourian, Wayne R. Riekhof, Dennis R. Voelkerand, and Brian J. Day. 2010. "Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-Binding Cassette Protein ABCG2." *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 16582–87.
- Bruin, Michiel De, Keisuke Miyake, Thomas Litman, Robert Robey, and Susan E Bates. 1999. "Reversal of Resistance by GF120918 in Cell Lines Expressing the ABC Half-Transporter, MXR." *Cancer Research* 146: 117–26.
- Buening, M K, P G Wislocki, W Levin, H Yagi, D R Thakker, H Akagi, M Koreeda, D M Jerina, and a H Conney. 1978. "Tumorigenicity of the Optical Enantiomers of the Diastereomeric Benzo[a]pyrene 7,8-Diol-9,10-Epoxides in Newborn Mice: Exceptional Activity of (+)-7beta,8alpha-Dihydroxy-9alpha,10alpha-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]Pyrene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (0027–8424): 5358–61.

- Calcagno, Claudia, Mark E Lobatto, Philip M Robson, and Antoine Millon. 2016. "In Vivo and Ex Vivo Regulation of Breast Cancer Resistant Protein (Bcrp) by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (Ppara) at the Blood-Brain Barrier." *Journal of Neurochemistry* 28 (10): 1304–14.
- Candeil, Laurent, Isabelle Gourdiere, Delphine Peyron, Nadia Vezzio, Virginie Copois, Frederic Bibeau, Beatrice Orsetti, et al. 2004. "ABCG2 Overexpression in Colon Cancer Cells Resistant to SN38 and in Irinotecan-Treated Metastases." *International Journal of Cancer* 109 (6): 848–54.
- Cisternino, Salvatore, Claire Mercier, Fanchon Bourasset, Françoise Roux, and Jean Michel Scherrmann. 2004. "Expression, Up-Regulation, and Transport Activity of the Multidrug-Resistance Protein Abcg2 at the Mouse Blood-Brain Barrier." *Cancer Research* 64 (9): 3296–3301.
- Crowe, Andrew. 2011. "The Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Bacterial Attachment to Human Gastrointestinal Cells." *Journal of Crohn's & Colitis* 5 (6). Elsevier B.V.: 531–42.
- Dankers, Anita C A, Fred C G J Sweep, Jeanne C L M Pertijs, Vivienne Verweij, Jeroen J M W Van Den Heuvel, Jan B. Koenderink, Frans G M Russel, and Rosalinde Masereeuw. 2012. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp) in Endocrine Organs and Inhibition of Its Transport Activity by Steroid Hormones." *Cell and Tissue Research* 349 (2): 551–63.
- Dehghan, Abbas, Anna Köttgen, Qiong Yang, W H Linda Kao, Fernando Rivadeneira, Daniel Levy, Albert Hofman, et al. 2008. "Association of Three Genetic Loci with Uric Acid Concentration and Risk of Gout: A Genome-Wide Association Study." *Lancet* 372 (9654): 1953–61.
- Desuzinges-mandon, Elodie, Lorena Martinez, Attilio Di Pietro, and Pierre Falson. 2010. "ABCG2 Transports and Transfers Heme to Albumin through Its Large Extracellular Loop." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 285 (43): 33123–33.
- Dezi, Manuela, Pierre Frédéric Fribourg, Aurelie Di Cicco, Ophelie Arnaud, Sergio Marco, Pierre Falson, Attilio Di Pietro, and Daniel Lévy. 2010. "The Multidrug Resistance Half-Transporter ABCG2 Is Purified as a Tetramer upon Selective Extraction from Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798 (11). Elsevier B.V.: 2094–2101.
- Ding, Rui, Jia Shi, Kirk Pabon, and Kathleen W Scotto. 2012. "Xanthines Down-Regulate the Drug Transporter ABCG2 and Reverse Multidrug Resistance." *Molecular Pharmacology* 81 (3): 328–37.
- Doyle, L Austin, Weidong Yang, Lynne V Abruzzo, Tammy Krogmann, Yongming Gao, Arun K Rishi, and Douglas D Ross. 1998. "A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15665–70.
- Durmus, Selvi, Rolf W. Sparidans, Anita Van Esch, Els Wagenaar, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2015. "Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and P-Glycoprotein (P-GP/ABCB1) Restrict Oral Availability and Brain Accumulation of the PARP Inhibitor Rucaparib (AG-014699)." *Pharmaceutical Research* 32 (1). Elsevier Ltd: 37–46.
- Ebert, Bettina, Albrecht Seidel, and Alfonso Lampen. 2005. "Identification of BCRP as Transporter of Benzo[a]pyrene Conjugates Metabolically Formed in Caco-2 Cells and Its Induction by Ah-Receptor Agonists." *Carcinogenesis* 26 (10): 1754–63.
- Eisenblätter, Tanja, and Hans-Joachim Galla. 2002. "A New Multidrug Resistance Protein at the Blood-Brain Barrier." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (4): 1273–78.
- Eisenblätter, Tanja, Sabine Hüwel, and Hans Joachim Galla. 2003. "Characterisation of the Brain Multidrug Resistance Protein (BMDP/ABCG2/BCRP) Expressed at the Blood-Brain Barrier." *Brain Research* 971 (2): 221–31.
- Evseenko, D. A., J. W. Paxton, and J. A. Keelan. 2007. "The Xenobiotic Transporter ABCG2 Plays a Novel Role in Differentiation of Trophoblast-like BeWo Cells." *Placenta* 28 (SUPPL.). IFPA and Elsevier Ltd: S116–20.
- Fetsch, Patricia A., Andrea Abati, Thomas Litman, Kuniaki Morisaki, Yasumasa Honjo, Khush Mittal, and Susan E. Bates. 2006. "Localization of the ABCG2 Mitoxantrone Resistance-Associated Protein in Normal Tissues." *Cancer Letters* 235 (1): 84–92.
- Fornari, F A, J K Randolph, J C Yalowich, M K Ritke, and D A Gewirtz. 1994. "Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells." *JOUR. Molecular Pharmacology* 45 (4): 649 LP-656.
- Gál, Zita, Csilla Hegedüs, Gergely Szakács, András Váradi, Balázs Sarkadi, and Csilla Özvegy-Laczka. 2015. "Mutations of the Central Tyrosines of Putative Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus (CRAC) Sequences Modify Folding, Activity, and Sterol-Sensing of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848 (2). Elsevier B.V.: 477–87.

- Goodell, M A, K Brose, G Paradis, A S Conner, and R C Mulligan. 1996. "Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo ." *JOUR . J. Exp. Med.* .
- Guo, J, M G Anderson, P Tapang, J P Palma, L E Rodriguez, A Niquette, J Li, et al. 2009. "Identification of Genes That Confer Tumor Cell Resistance to the Aurora B Kinase Inhibitor, AZD1152." *The Pharmacogenomics Journal* 9 (2): 90–102.
- Gutmann, Heike, Petr Hruz, Christian Zimmermann, Christoph Beglinger, and Juergen Drewe. 2005. "Distribution of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) mRNA Expression along the Human GI Tract." *Biochemical Pharmacology* 70 (5): 695–99.
- Hackett, Tillie-Louise, Furquan Shaheen, Andrew Johnson, Samuel Wadsworth, Dmitri V Pechkovsky, David B Jacoby, Anthony Kicic, Stephen M Stick, and Darryl A Knight. 2008. "Characterization of Side Population Cells from Human Airway Epithelium." *JOUR. STEM CELLS* 26 (10). John Wiley & Sons, Ltd.: 2576–85.
- Hamada, Shin, Kennichi Satoh, Morihisa Hirota, Atsushi Kanno, Jun Umino, Hiromichi Ito, Atsushi Masamune, Kazuhiro Kikuta, Kiyoshi Kume, and Tooru Shimosegawa. 2012. "The Homeobox Gene MSX2 Determines Chemosensitivity of Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of Transporter Gene ABCG2." *Journal of Cellular Physiology* 227 (2): 729–38.
- Hartz, Anika MS, Anne Mahringer, David S Miller, and Björn Bauer. 2010. "17- β -Estradiol: A Powerful Modulator of Blood–Brain Barrier BCRP Activity." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30 (10): 1742–55.
- Hazai, Eszter, and Zsolt Bikádi. 2008. "Homology Modeling of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)." *Journal of Structural Biology* 162 (1): 63–74.
- Hegedu, Csilla, Nikolay V Dokholyan, and Brian P Sorrentino. 2008. "Interaction with the 5D3 Monoclonal Antibody Is Regulated by Intramolecular Rearrangements but Not by Covalent Dimer Formation of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (38): 26059–70.
- Helms, Hans Christian, Maria Hersom, Louise Borella Kuhlmann, Lasina Badolo, Carsten Uhd Nielsen, and Birger Brodin. 2014. "An Electrically Tight In Vitro Blood–Brain Barrier Model Displays Net Brain-to-Blood Efflux of Substrates for the ABC Transporters, P-Gp, Bcrp and Mrp-1." *The AAPS Journal* 16 (5): 1046–55.
- Hendrik, W. 2005. "Arginine-482 Is Not Essential for Transport of Antibiotics , Primary Bile Acids and Unconjugated Sterols by the Human Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)." *Biochemical Journal* 426: 419–26.
- Henriksen, Ulla, Jacob U Fog, Thomas Litman, Ulrik Gether, *, *, *, and *. 2005. "Identification of Intra- and Intermolecular Disulfide Bridges in the Multidrug Resistance Transporter ABCG2." *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 36926–34.
- Henriksen, Ulla, Ulrik Gether, and Thomas Litman. 2005. "Effect of Walker A Mutation (K86M) on Oligomerization and Surface Targeting of the Multidrug Resistance Transporter ABCG2." *Journal of Cell Science* 118: 1417–26.
- Honda, M J, F Nakashima, K Satomura, Y Shinohara, S Tsuchiya, and N Watanabe. 2007. "Side Population Cells Expressing ABCG2 in Human Adult Dental Pulp Tissue." *International Endodontic Journal* 40: 949–58.
- Honjo, Yasumasa, Christine A Hrycyna, Qing-wu Yan, Wilma Y Medina-pe, Robert W Robey, Anne Van De Laar, Thomas Litman, Michael Dean, and Susan E Bates. 2001. "Acquired Mutations in the MXR / BCRP / ABCP Gene Alter Substrate Specificity in," no. 301: 6635–39.
- **Hopfner, Karl-peter. 2016. "Invited Review Architectures and Mechanisms of ATP Binding Cassette Proteins." *Biopolymers* 105 (8): 492–504.
- Hoque, M. Tozammel, Olena Kis, María F. De Rosa, and Reina Bendayan. 2015. "Raltegravir Permeability across Blood-Tissue Barriers and the Potential Role of Drug Efflux Transporters." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (5): 2572–82.
- Hosomi, Atsushi, Takeo Nakanishi, Takuya Fujita, and Ikumi Tamai. 2012. "Extra-Renal Elimination of Uric Acid via Intestinal Efflux Transporter BCRP/ABCG2." *PLoS ONE* 7 (2): 2–9..
- Houghton, Peter J, Glen S Germain, Franklin C Harwood, John D Schuetz, Clinton F Stewart, Elisabeth Buchdunger, and Peter Traxler. 2004. "Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro." *Cancer Research* 2 (901): 2333–37.
- Huls, M., C.D.A. Brown, A.S. Windass, R. Sayer, J.J.M.W. van den Heuvel, S. Heemskerk, F.G.M. Russel, and R. Masereeuw. 2008. "The Breast Cancer Resistance Protein Transporter ABCG2 Is Expressed in the Human

- Kidney Proximal Tubule Apical Membrane." *Kidney International* 73 (2). Elsevier Masson SAS: 220–25.
- Huls, M, J J M W van den Heuvel, H B P M Dijkman, F G M Russel, and R Masereeuw. 2006. "ABC Transporter Expression Profiling after Ischemic Reperfusion Injury in Mouse Kidney." *Kidney International* 69 (12). Elsevier Masson SAS: 2186–93.
- Chen, Zhe Sheng, Robert W. Robey, Martin G. Belinsky, Irina Shchavezleva, Xiao Qin Ren, Yoshikazu Sugimoto, Douglas D. Ross, Susan E. Bates, and Gary D. Kruh. 2003. "Transport of Methotrexate, Methotrexate Polyglutamates, and 17 β -Estradiol 17-(B-D-Glucuronide) by ABCG2: Effects of Acquired Mutations at R482 on Methotrexate Transport." *Cancer Research* 63 (14): 4048–54.
- Ifergan, Ilan, Assaf Shafran, Gerrit Jansen, Jan Hendrik Hooijberg, George L. Scheffer, and Yehuda G. Assaraf. 2004. "Folate Deprivation Results in the Loss of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Expression: A Role for BCRP in Cellular Folate Homeostasis." *Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25527–34.
- Ichida, Kimiyoshi, Hirotsuka Matsuo, Tappei Takada, Akiyoshi Nakayama, Keizo Murakami, Toru Shimizu, Yoshihide Yamanashi, et al. 2012. "Decreased Extra-Renal Urate Excretion Is a Common Cause of Hyperuricemia." *Nature Communications* 3. Nature Publishing Group: 764.
- Imai, Yasuo, Sakiyo Asada, Satomi Tsukahara, Etsuko Ishikawa, Takashi Tsuruo, Molecular Biotherapy, and Experimental Chemotherapy T T. 2003. "Breast Cancer Resistance Protein Exports Sulfated Estrogens but Not Free Estrogens" 64 (3): 610–18.
- Imai, Yasuo, Etsuko Ishikawa, Sakiyo Asada, and Yoshikazu Sugimoto. 2005. "Estrogen-Mediated Post Transcriptional Down-Regulation of Breast Cancer Resistance Protein / ABCG2," no. 2: 1–5.
- Izuarai, Shinji M, Naohiko A Ozasa, and Hidehito K Otani. 2004. "Single Nucleotide Polymorphisms Result in Impaired Membrane Localization and Reduced Atpase Activity in Multidrug Transporter ABCG2." *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 246 (April 2003): 238–46.
- Janvilisri, Tavan, Henrietta Venter, Sanjay Shahi, Galya Reuter, Lekshmy Balakrishnan, and Hendrik W. van Veen. 2003. "Sterol Transport by the Human Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Expressed in *Lactococcus Lactis*." *Journal of Biological Chemistry* 278 (23): 20645–51.
- Jonker, J. W. 2000. "Role of Breast Cancer Resistance Protein in the Bioavailability and Fetal Penetration of Topotecan." *Journal of the National Cancer Institute* 92 (20): 1651–56.
- Jonker, Johan W, Marije Buitelaar, Els Wagenaar, Martin a Van Der Valk, George L Scheffer, Rik J Scheper, Torsten Plosch, et al. 2002. "The Breast Cancer Resistance Protein Protects against a Major Chlorophyll-Derived Dietary Phototoxin and Protoporphyrin." *PNAS* 99 (24): 15649–54.
- Jonker, Johan W, Jamie Freeman, Ellen Bolscher, Sandra Musters, Azra J Alvi, Ian Titley, Alfred H Schinkel, and C Dale. 2005. "Contribution of the ABC Transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the Side Population Phenotype in Mammary Gland and Bone Marrow of Mice." *Stem Cells*. 23: 1059–65.
- Jonker, Johan W, Gracia Merino, Sandra Musters, Antonius E van Herwaarden, Ellen Bolscher, Els Wagenaar, Elly Mesman, Trevor C Dale, and Alfred H Schinkel. 2005. "The Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2) Concentrates Drugs and Carcinogenic Xenotoxins into Milk." *Nature Medicine* 11 (2): 127–29.
- Kage, Kumie, Toshiro Fujita, and Yoshikazu Sugimoto. 2005. "Role of Cys-603 in Dimer / Oligomer Formation of the Breast Cancer Resistance Protein BCRP / ABCG2." *Cancer Sci* 96: 866–72.
- Kage, Kumie K, Satomi T Sukahara, Tomomi S Ugiyama, Sakiyo A Sada, Etsuko I Shikawa, and Takashi T Suruo. 2002. "Dominant-Negative Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein as Drug Efflux Pump through the Inhibition of S-S Dependent Homodimerization." *International Journal of Cancer* 630: 626–30.
- **Kang, Ping, Mingxiang Liao, Michael R Wester, J Steven Leeder, and Robin E Pearce. 2010. "Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein." *Curr Drug Metab* 36 (3): 490–99.
- Kawabata, Shigeru, Mikio Oka, Ken Shiozawa, Kazuhiro Tsukamoto, Katsumi Nakatomi, Hiroshi Soda, Minoru Fukuda, et al. 2001. "Breast Cancer Resistance Protein Directly Confers SN-38 Resistance of Lung Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1223: 1216–23.
- Knutsen, Turid, V. Koneti Rao, Thomas Ried, Lyn Mickley, Erasmus Schneider, Keisuke Miyake, B. Michael Ghadimi, et al. 2000. "Amplification of 4q21-q22 and the MXR Gene in Independently Derived Mitoxantrone-Resistant Cell Lines." *Genes Chromosomes and Cancer* 27 (1): 110–16.
- Kobayashi, Daisuke, Ichiro Ieiri, Takeshi Hirota, Hiroshi Takane, Shinji Maegawa, Junzo Kigawa, Hiroshi Suzuki, et al. 2005. "FUNCTIONAL ASSESSMENT OF ABCG2 (BCRP) GENE POLYMORPHISMS TO PROTEIN EXPRESSION IN HUMAN PLACENTA." *Drug Metabolism and Disposition* 33 (1).

- Kolz, Melanie, Toby Johnson, Serena Sanna, Alexander Teumer, Veronique Vitart, Markus Perola, Massimo Mangino, et al. 2009. "Meta-Analysis of 28,141 Individuals Identifies Common Variants within Five New Loci That Influence Uric Acid Concentrations." *PLoS Genetics* 5 (6). doi:10.1371/journal.pgen.1000504.
- Kort, Anita, Rolf W. Sparidans, Els Wagenaar, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2015. "Brain Accumulation of the EML4-ALK Inhibitor Ceritinib Is Restricted by P-Glycoprotein (P-GP/ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)." *Pharmacological Research* 102: 200–207.
- Kranz, Jasmin, Stefanie Hessel, Julia Aretz, Albrecht Seidel, Ernst Petzinger, Joachim Geyer, and Alfonso Lampen. 2014. "The Role of the Efflux Carriers Abcg2 and Abcc2 for the Hepatobiliary Elimination of Benzo[a]pyrene and Its Metabolites in Mice." *Chemico-Biological Interactions* 224. Elsevier Ireland Ltd: 36–41.
- Krishnamurthy, Partha, Douglas D. Ross, Takeo Nakanishi, Kim Bailey-Dell, Sheng Zhou, Kelly E. Mercer, Balazs Sarkadi, Brian P. Sorrentino, and John D. Schuetz. 2004. "The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme." *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24218–25.
- Kumar, Jeyan S, Bih-Rong Wei, James P Madigan, R Mark Simpson, Matthew D Hall, and Michael M Gottesman. 2016. "Bioluminescent Imaging of ABCG2 Efflux Activity at the Blood-Placenta Barrier." *Scientific Reports* 6 (August 2015): 20418.
- **Kusuhara, Hiroyuki, and Yuichi Sugiyama. 2007. "ATP-Binding Cassette, Subfamily G (ABCG Family)." *European Journal of Physiology* 453: 735–44.
- Lagas, Jurjen S, Robert a B van Waterschoot, Rolf W Sparidans, Els Wagenaar, Jos H Beijnen, and Alfred H Schinkel. 2010. "Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Limit Sorafenib Brain Accumulation." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (2): 319–26.
- Lai, Pui, Rachel Ee, Sitharthan Kamalakaran, Debra Tonetti, Xiaolong He, Douglas D Ross, and William T Beck. 2004. "Identification of a Novel Estrogen Response Element in the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Gene," no. 20: 1247–51.
- László, Laura, Balázs Sarkadi, and Tamás Hegedűs. 2016. "Jump into a New Fold—A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter." Article. *PLOS ONE* 11 (10). Public Library of Science: 1–22.
- Lechner, Andreas, Colin A. Leech, Elizabeth J. Abraham, Anna L. Nolan, and Joel F. Habener. 2002. "Nestin-Positive Progenitor Cells Derived from Adult Human Pancreatic Islets of Langerhans Contain Side Population (SP) Cells Defined by Expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-Binding Cassette Transporter." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (2): 670–74.
- Line, Tumor Cell, Marc Maliepaard, A Van Gastelen, Laurina A De Jong, Dick Pluim, Robert C A M Van Waardenburg, Marjan C Ruevekamp-helmers, Ben G J Floot, and Jan H M Schellens. 1999. "Overexpression of the BCRP / MXR / ABCP Gene in a Topotecan-Selected Ovarian." *Cancer Research* 59: 4559–63.
- Lines, Topotecan-resistant Cell, George L Scheffer, Marc Maliepaard, Adriana C L M Pijnenborg, A Van Gastelen, Mariska C De Jong, Anouk B Schroeijers, et al. 2000. "Breast Cancer Resistance Protein Is Localized at the Plasma Membrane in Mitoxantrone- and Topotecan-Resistant Cell Lines." *Cancer Research* 60: 2589–93.
- Liu, Lili, Liang Zhou, Shuiwang Hu, Shanyu Zhou, Yingyu Deng, Ming Dong, Jianxun Huang, et al. 2016. "Down-Regulation of ABCG2 and ABCB4 Transporters in the Placenta of Rats Exposed to Cadmium." *Oncotarget* 7 (25): 38154–63.
- Longley, Daniel B, D Paul Harkin, and Patrick G Johnston. 2003. "5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies." *JOUR. Nat Rev Cancer* 3 (5): 330–38.
- Lu, Wenyi, Mingfeng Zhao, Sajin Rajbhandary, Fang Xie, Xiao Chai, Juan Mu, Juanxia Meng, et al. 2013. "Free Iron Catalyzes Oxidative Damage to Hematopoietic Cells / Mesenchymal Stem Cells in Vitro and Suppresses Hematopoiesis in Iron Overload Patients." *European Journal of Haematology* 91 (24): 249–61.
- Macalou, S., R. W. Robey, G. Jabor Gozzi, S. Shukla, I. Grosjean, T. Hegedus, S. V. Ambudkar, S. E. Bates, and A. Di Pietro. 2016. "The Linker Region of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 Is Critical for Coupling of ATP-Dependent Drug Transport." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (9). Springer International Publishing: 1927–37.
- Maliepaard, Marc, George L. Scheffer, Ian F. Faneyte, Margot A. van Gastelen, Adriana C. L. M. Pijnenborg, Alfred H. Schinkel, Marc J. van de Vijver, Rik J. Scheper, and Jan H. M. Schellens. 2001. "Subcellular

- Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues." *Cancer Research* 61 (8): 3458–64.
- Martin, Cindy M., Annette P. Meeson, Scott M. Robertson, Thomas J. Hawke, James A. Richardson, Susan Bates, Sean C. Goetsch, Teresa D. Gallardo, and Daniel J. Garry. 2004. "Persistent Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter, *Abcg2*, Identifies Cardiac SP Cells in the Developing and Adult Heart." *Developmental Biology* 265 (1): 262–75.
- Matsuo, Hiroataka, Tomoyuki Tsunoda, Keiko Ooyama, Masayuki Sakiyama, Tsuyoshi Sogo, Tappei Takada, Akio Nakashima, et al. 2016. "Hyperuricemia in Acute Gastroenteritis Is Caused by Decreased Urate Excretion via ABCG2." *Scientific Reports*.
- Mazerski J, Martelli S, Borowski E. 1998. "The Geometry of Intercalation Complex of Antitumor Mitoxantrone and Ametantrone with DNA: Molecular Dynamics Simulations." *Acta Biochimica Polonica* 45. *Acta Biochim Pol*: 1–11.
- Mcdevitt, Christopher A, Richard F Collins, Michael Conway, Szabolcs Modok, Janet Storm, Ian D Kerr, Robert C Ford, and Richard Callaghan. 2006. "Purification and 3D Structural Analysis of Oligomeric Human Multidrug Transporter ABCG2." *Structure* 1: 1623–32.
- Merino, Gracia, Ae Van Herwaarden, and Els Wagenaar. 2005. "Sex-Dependent Expression and Activity of the ATP-Binding Cassette Transporter Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Liver." *Molecular Pharmacology* 67 (5): 1765–71.
- Miwa, Miyu M, Satomi T Sukahara, Etsuko I Shikawa, Sakiyo A Sada, Yasuo I Mai, and Yoshikazu S Ugimoto. 2003. "Single Amino Acid Substitutions in the Transmembrane Domains of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Alter Cross Resistance Patterns in Transfectants." *International Journal of Cancer* 763:
- Miyake, Keisuke, Lyn Mickley, Thomas Litman, Zhiron Zhan, Robert Robey, Barbara Cristensen, Mariafiorella Brangi, et al. 1999. "Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-Resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes." *Cancer Research* 59 (1): 8–13.
- Mohrmann, Karin, Maria A J Van Eijndhoven, Alfred H. Schinkel, and Jan H M Schellens. 2005. "Absence of N-Linked Glycosylation Does Not Affect Plasma Membrane Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (4): 344–50.
- Muerhoff, A S, K J Griffin, and E F Johnson. 1992. "The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Mediates the Induction of CYP4A6, a Cytochrome P450 Fatty Acid Omega-Hydroxylase, by Clofibrilic Acid." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (27): 19051–53.
- Mutsaers, Henricus A M, Lambertus P. van den Heuvel, Lauke H J Ringens, Anita C A Dankers, Frans G M Russel, Jack F M Wetzels, Joost G. Hoenderop, and Rosalinde Masereeuw. 2011. "Uremic Toxins Inhibit Transport by Breast Cancer Resistance Protein and Multidrug Resistance Protein 4 at Clinically Relevant Concentrations." *PLoS ONE* 6 (4).
- Nakagawa, Hiroshi, Ai Tamura, Kanako Wakabayashi, Kazuyuki Hoshijima, Masayuki Komada, Takashi Yoshida, Satoshi Kometani, Takayoshi Matsubara, Kenta Mikuriya, and Toshihisa Ishikawa. 2008. "Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation of Non-Synonymous SNP Variants of Human ABC Transporter ABCG2." *The Biochemical Journal* 411 (3): 623–31.
- Nakagawa, Hiroshi, Kanako Wakabayashi-Nakao, Ai Tamura, Yu Toyoda, Shoko Koshiba, and Toshihisa Ishikawa. 2009. "Disruption of N-Linked Glycosylation Enhances Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation of the Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2." *FEBS Journal* 276 (24): 7237–52.
- Nakamichi, Naoto, Eiichi Morii, Jun-ichiro Ikeda, Ying Qiu, Suhana Mamato, Tian Tian, Shirou Fukuhara, and Katsuyuki Aozasa. 2009. "Synergistic Effect of Interleukin-6 and Endoplasmic Reticulum Stress Inducers on the High Level of ABCG2 Expression in Plasma Cells." *Laboratory Investigation* 89 (3): 327–36.
- Nakanishi, Takeo, L Austin Doyle, Bret Hassel, Yuetong Wei, Kenneth S Bauer, Suhlan Wu, David W Pumplin, Hong-Bin Fang, and Douglas D Ross. 2003. "Functional Characterization of Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2) Expressed in the Oocytes of *Xenopus Laevis*." *Molecular Pharmacology* 64 (6): 1452–62.
- Nakano, Hirofumi, Yoichi Nakamura, Hiroshi Soda, Megumi Kamikatahira, Kanako Uchida, Mineyo Takasu, Takeshi Kitazaki, et al. 2008. "Methylation Status of Breast Cancer Resistance Protein Detected by Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Analysis Is Correlated Inversely with Its Expression in Drug-Resistant Lung Cancer Cells." *Cancer* 112 (5): 1122–30.
- Nakatomi, K, M Yoshikawa, M Oka, Y Ikegami, S Hayasaka, K Sano, K Shiozawa, et al. 2001. "Transport of 7-

- Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN-38) by Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 in Human Lung Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (4): 827–32.
- Nishihashi, Katsuki, Kei Kawashima, Takami Nomura, Yumiko Urakami-Takebayashi, Makoto Miyazaki, Mikihisa Takano, and Junya Nagai. 2017. "Cobalt Chloride Induces Expression and Function of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Line HK-2." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40 (1): 82–87.
- Oka, Mikako, Chizuko Toyoda, Yuka Kaneko, Yosuke Nakazawa, Eriko Aizu-yokota, and Makoto Takehana. 2010. "Characterization and Localization of Side Population Cells in the Lens." *Molecular Vision* 2010, no. May: 945–53.
- Otero, J.A., D. García-Mateos, A. de la Fuente, J.G. Prieto, A.I. Álvarez, and G. Merino. 2016. "Effect of Bovine ABCG2 Y581S Polymorphism on Concentrations in Milk of Enrofloxacin and Its Active Metabolite Ciprofloxacin." *Journal of Dairy Science* 99 (7): 5731–38.
- Özvegy, Csilla, András Varadi, and Balázs Sarkadi. 2002. "Characterization of Drug Transport, ATP Hydrolysis, and Nucleotide Trapping by the Human ABCG2 Multidrug Transporter. Modulation of Substrate Specificity by a Point Mutation." *Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 47980–90.
- Pavek, Petr, Gracia Merino, Els Wagenaar, Ellen Bolscher, Martina Novotna, Johan W Jonker, and Alfred H Schinkel. 2005. "Human Breast Cancer Resistance Protein: Interactions with Steroid Drugs, Hormones, the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-phenylimidazo(4,5-B)pyridine, and Transport of Cimetidine." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (1): 144–52.
- Peng, Hui, Zizheng Dong, Jing Qi, Youyun Yang, Yang Liu, Zhaomin Li, Junkang Xu, and Jian Ting Zhang. 2009. "A Novel Two Mode-Acting Inhibitor of ABCG2-Mediated Multidrug Transport and Resistance in Cancer Chemotherapy." *PLoS ONE* 4 (5).
- Peng, Hui, Jing Qi, Zizheng Dong, and Jian Ting Zhang. 2010. "Dynamic vs Static ABCG2 Inhibitors to Sensitize Drug Resistant Cancer Cells." *PLoS ONE* 5 (12): 1–10.
- Polgar, Orsolya, Lilangi S Ediriwickrema, Robert W Robey, Ajay Sharma, Ramanujan S Hegde, Yongfu Li, Di Xia, et al. 2009. "Arginine 383 Is a Crucial Residue in ABCG2 Biogenesis." *BBA - Biomembranes* 1788 (7). Elsevier B.V.: 1434–43.
- Polgar, Orsolya, Csilla Ozvegy-laczka, Robert W Robey, Kuniaki Morisaki, Masaki Okada, Akina Tamaki, Gabriella Koblos, et al. 2006. "Mutational Studies of G553 in TM5 of ABCG2 : A Residue Potentially Involved in Dimerization." *Biochemistry* 45: 5251–60.
- Pozza, A, J M Perez-victoria, A Sardo, A Ahmed-belkacem, A Di Pietro, *, *, and *. 2006. "Purification of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 and Role of Arginine-482." *Cell and Tissue Research* 63: 1912–22.
- Qian, Xiaojing, Dolores D Mruk, Elissa W P Wong, and C Yan Cheng. 2013. "Breast Cancer Resistance Protein Regulates Apical Ectoplasmic Specialization Dynamics Stage Specifically in the Rat Testis." *American Journal of Physiology* 304 (7): E757-69.
- Rabindran, Sridhar K, Haiyin He, Maya Singh, Eileen Brown, Karen I Collins, I Annable, and Lee M Greenberger. 1998. "Reversal of a Novel Multidrug Resistance Mechanism in Human Colon Carcinoma Cells by Fumitremorgin C." *Cancer Research* 58: 5850–59.
- Rabindran, Sridhar K, Douglas D Ross, L Austin Doyle, Weidong Yang, and Lee M Greenberger. 2000. "Fumitremorgin C Reverses Multidrug Resistance in Cells Transfected with the Breast Cancer Resistance Protein 1." *Cancer Research*, 47–50.
- Rajagopalan, P T Ravi, Zhiquan Zhang, Lynn Mccourt, Mary Dwyer, Stephen J Benkovic, Gordon G Hammes, J Gttctgc-, and J Acctgcc-. 2002. "Interaction of Dihydrofolate Reductase with Methotrexate : Ensemble and Single-Molecule Kinetics." *PNAS* 99 (21): 1–6.
- Rao, V. Koneti, Darawalee Wangsa, Robert W. Robey, Lyn Huff, Yasumasa Honjo, Jeffrey Hung, Turid Knutsen, Thomas Ried, and Susan E. Bates. 2005. "Characterization of ABCG2 Gene Amplification Manifesting as Extrachromosomal DNA in Mitoxantrone-Selected SF295 Human Glioblastoma Cells." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 160 (2): 126–33.
- Real, R., E. Egido, M. Pérez, L. González-Lobato, B. Barrera, J. G. Prieto, A. I. Álvarez, and G. Merino. 2011. "Involvement of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in the Secretion of Danofloxacin into Milk: Interaction with Ivermectin." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 34 (4): 313–21.
- Robey, R W, Y Honjo, K Morisaki, T A Nadjem, S Runge, M Risbood, M S Poruchynsky, and S E Bates. 2003. "Mutations at Amino-Acid 482 in the ABCG 2 Gene Affect Substrate and Antagonist Specificity." *British*

Journal of Cancer 89: 1971–78.

- Rosenberg, Mark F, Zsolt Bikadi, Eszter Hazai, Tobias Starborg, Lawrence Kelley, Naomi E Chayen, Robert C Ford, and Qingcheng Mao. 2015. "Three-Dimensional Structure of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in an Inward-Facing Conformation." *Acta Cryst* 71: 1725–35.
- Sesink, Aloys L A, Ilja C W Arts, Vincent C J De Boer, Pauline Breedveld, Jan H M Schellens, Peter C H Hollman, and Frans G M Russel. 2006. "Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1 / Abcg2) Limits Net Intestinal Uptake of Quercetin in Rats by Facilitating Apical Efflux of Glucuronides." *Molecular Pharmacology* 67 (6): 1999–2006.
- Shafraan, Assaf, Ilan Ifergan, Eran Bram, Gerrit Jansen, Ietje Kathmann, Godefridus J Peters, Robert W Robey, Susan E Bates, and Yehuda G Assaraf. 2005. "ABCG2 Harboring the Gly482 Mutation Confers High-Level Resistance to Various Hydrophilic Antifolates." *Cancer Research* 65 (18): 8414–23.
- Shankar, Sharmila, Dara Nall, Su Ni Tang, Daniel Meeker, Jenna Passarini, Jay Sharma, and Rakesh K. Srivastava. 2011. "Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and KrasG12D Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition." *PLoS ONE* 6 (1).
- Shigeta, Junichi, Kazuhiro Katayama, Junko Mitsuhashi, Kohji Noguchi, and Yoshikazu Sugimoto. 2010. "BCRP/ABCG2 Confers Anticancer Drug Resistance without Covalent Dimerization." *Cancer Sci* 101 (8): 1813–21.
- Shukla, Suneet, Chung-pu Wu, Krishnamachary Nandigama, and Suresh V Ambudkar. 2007. "The Naphthoquinones , Vitamin K3 and Its Structural Analogue Plumbagin , Are Substrates of the Multidrug Resistance – Linked ATP Binding Cassette Drug Transporter ABCG2." *Molecular Cancer Ther* 6 (December): 3279–87.
- Scharenberg, Christian W, Michael A Harkey, and Beverly Torok-storb. 2017. "The ABCG2 Transporter Is an Efficient Hoechst 33342 Efflux Pump and Is Preferentially Expressed by Immature Human Hematopoietic Progenitors." *Blood* 99 (2): 507–13.
- Schrickx, Jan, Yuri Lektarau, and J. Fink-Gremmels. 2006. "Ochratoxin A Secretion by ATP-Dependent Membrane Transporters in Caco-2 Cells." *Archives of Toxicology* 80 (5): 243–49.
- Staud, Frantisek, Zuzana Vackova, Katerina Pospechova, Petr Pavek, Martina Ceckova, Antonin Libra, Lenka Cygalova, Petr Nachtigal, and Zdenek Fendrich. 2006. "Expression and Transport Activity of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp / Abcg2) in Dually Perfused Rat Placenta and." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (1): 53–62.
- Sugiyama, Takashi, Tsuyoshi Shuto, Shingo Suzuki, Takashi Sato, Tomoaki Koga, Mary Ann Suico, Hiroyuki Kusuvara, Yuichi Sugiyama, Douglas M. Cyr, and Hirofumi Kai. 2011. "Posttranslational Negative Regulation of Glycosylated and Non-Glycosylated BCRP Expression by Derlin-1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 (3). Elsevier Inc.: 853–58.
- Summer, Ross, Darrell N Kotton, Xi Sun, Bei Ma, Kathleen Fitzsimmons, Alan Fine, Darrell N Kotton, et al. 2003. "Side Population Cells and Bcrp1 Expression in Lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2118: 97–104.
- Suzuki, Michiko, Hiroshi Suzuki, Yoshikazu Sugimoto, and Yuichi Sugiyama. 2003. "ABCG2 Transports Sulfated Conjugates of Steroids and Xenobiotics." *Journal of Biological Chemistry*.
- Szatmari, Istvan, György Vámosi, Peter Brazda, Balint L. Balint, Szilvia Benko, Lajos Széles, Viktoria Jeney, et al. 2006. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Regulated ABCG2 Expression Confers Cytoprotection to Human Dendritic Cells." *Journal of Biological Chemistry* 281 (33): 23812–23.
- Takada, Tappei, Hiroshi Suzuki, and Yuichi Sugiyama. 2005. "Characterization of Polarized Expression of Point- or Deletion-Mutated Human BCRP/ABCG2 in LLC-PK1 Cells." *Pharmaceutical Research* 22 (3): 458–64.
- Tamura, Ai, Masato Watanabe, Hikaru Saito, Hiroshi Nakagawa, Toshiaki Kamachi, Ichiro Okura, and Toshihisa Ishikawa. 2006. "Functional Validation of the Genetic Polymorphisms of Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 : Identification of Alleles That Are Defective in Porphyrin Transport." *Molecular Pharmacology* 70 (1): 287–96.
- Tan, Kah Poh, Bernice Wang, Mingdong Yang, Paul C Boutros, Jane Macaulay, Haibo Xu, Andrew I Chuang, et al. 2010. "Aryl Hydrocarbon Receptor Is a Transcriptional Activator of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2) □." *Molecular Pharmacology* 78 (2): 175–85.
- Taniguchi, K., Y. Tamura, T. Kumagai, S. Shibata, and S. Uchida. 2016. "Stimulation of V1a Receptor Increases Renal Uric Acid Clearance via Urate Transporters: Insight into Pathogenesis of Hypouricemia in SIADH."

- Clinical and Experimental Nephrology* 20 (6). Springer Japan: 845–52.
- Telbisz, Ágnes, Csilla Hegedűs, András Váradi, Balázs Sarkadi, and Csilla Özvegy-Laczka. 2014. "Special Section on Transporters in Toxicity and Disease Regulation of the Function of the Human ABCG2 Multidrug Transporter by Cholesterol and Bile Acids : Effects of Mutations in Potential Substrate and Steroid Binding Sites S." *Drug Metabolism and Disposition*, no. April: 575–85.
- Telbisz, Ágnes, Marianna Müller, Csilla Özvegy-Laczka, László Homolya, Lajos Szenté, András Váradi, and Balázs Sarkadi. 2007. "Membrane Cholesterol Selectively Modulates the Activity of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768 (11): 2698–2713.
- Telbisz, Ágnes, Csilla Özvegy-Laczka, Tamás Hegedűs, András Váradi, and Balázs Sarkadi. 2013. "Effects of the Lipid Environment, Cholesterol and Bile Acids on the Function of the Purified and Reconstituted Human ABCG2 Protein." *The Biochemical Journal* 450: 387–95.
- Thomas Litman, Mariafiorella Brangi, Eric Hudson, Patricia Fetsch, Andrea Abati, Douglas D. Ross, Keisuke Miyake. 2000. "The Multidrug-Resistant Phenotype Associated with Overexpression of the New ABC Half-Transporter, MXR (ABCG2)." *Journal of Cell Science* 113,.
- Tiwari, Shubha, Mohammad Javed Ali, Murali M S Balla, Milind N. Naik, Santosh G. Honavar, Vijay Anand P Reddy, and Geeta K. Vemuganti. 2012. "Establishing Human Lacrimal Gland Cultures with Secretory Function." *PLoS ONE* 7 (1): 1–12.
- To, K. K. W., Z. Zhan, and S. E. Bates. 2006. "Aberrant Promoter Methylation of the ABCG2 Gene in Renal Carcinoma." *Molecular and Cellular Biology* 26 (22): 8572–85.
- To, K. K.W., O. Polgar, L. M. Huff, K. Morisaki, and S. E. Bates. 2008. "Histone Modifications at the ABCG2 Promoter Following Treatment with Histone Deacetylase Inhibitor Mirror Those in Multidrug-Resistant Cells." *Molecular Cancer Research* 6 (1): 151–64.
- Turner, Joel G, Jana L Gump, Chunchun Zhang, James M Cook, Douglas Marchion, Lori Hazlehurst, Pamela Munster, Michael J Schell, William S Dalton, and Daniel M Sullivan. 2006. "ABCG2 Expression , Function , and Promoter Methylation in Human Multiple Myeloma." *Hematology* 108 (12): 3881–89.
- Urquhart, Bradley L, Joseph A Ware, Rommel G Tirona, Richard H Ho, Brenda F Leake, Ute I Schwarz, Hani Zaher, et al. 2008. "Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and Drug Disposition: Intestinal Expression, Polymorphisms and Sulfasalazine as an in Vivo Probe." *JOUR. Pharmacogenetics and Genomics* 18 (5): 439–48.
- van Herwaarden, Antonius E., Els Wagenaar, Barbara Karnekamp, Gracia Merino, Johan W. Jonker, and Alfred H. Schinkel. 2006. "Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Reduces Systemic Exposure of the Dietary Carcinogens Aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but Also Mediates Their Secretion into Breast Milk." *Carcinogenesis* 27 (1): 123–30.
- van Herwaarden, Antonius E, Els Wagenaar, Gracia Merino, Johan W Jonker, Hilde Rosing, Jos H Beijnen, and Alfred H Schinkel. 2007. "Multidrug Transporter ABCG2/breast Cancer Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B2) into Milk." *Molecular and Cellular Biology* 27 (4): 1247–53.
- Volk, Erin L, and Erasmus Schneider. 2003. "Wild-Type Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2) Is a Methotrexate Polyglutamate Transporter 1." *Cancer Research* 63: 5538–43.
- Wakabayashi, Kanako, Hiroshi Nakagawa, Ai Tamura, Shoko Koshiba, Kazuyuki Hoshijima, Masayuki Komada, and Toshihisa Ishikawa. 2007. "Intramolecular Disulfide Bond Is a Critical Check Point Determining Degradative Fates of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 Protein." *Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 27841–46.
- Wang, Haofei, Fangxiu Luo, Zhe Zhu, Zhaoping Xu, Xin Huang, Renyi Ma, Hongchao He, Yu Zhu, Kun Shao, and Juping Zhao. 2017. "ABCG2 Is a Potential Prognostic Marker of Overall Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *BMC Cancer* 17 (1). BMC Cancer: 222.
- Wang, Honggang, Eun-woo Lee, Xiaokun Cai, Zhanglin Ni, Lin Zhou, and Qingcheng Mao. 2008. "Membrane Topology of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP /ABCG2) Determined by Epitope Insertion and Immunofluorescenc." *Biochemistry* 47: 13778–87.
- Wang, Honggang, Eun-woo Lee, Lin Zhou, Peter C K Leung, Douglas D Ross, Jashvant D Unadkat, and Qingcheng Mao. 2008. "Progesterone Receptor (PR) Isoforms PRA and PRB Differentially Regulate Expression of the Breast Cancer Resistance Protein in Human Placental Choriocarcinoma BeWo Cells." *Molecular Pharmacology* 73 (3): 845–54.
- Wang, Honggang, Lin Zhou, Anshul Gupta, R Robert Vethanayagam, Yi Zhang, Jashvant D Unadkat, and

- Qingcheng Mao. 2006. "Regulation of BCRP/ABCG2 Expression by Progesterone and 17beta-Estradiol in Human Placental BeWo Cells." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 290: E798–807.
- Wang, Xueqian, Brian T Hawkins, and David S Miller Aryl. 2010. "Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated up-Regulation of ATP-Driven Xenobiotic Efflux Transporters at the Blood-Brain Barrier." *The FASEB Journal*, 2010.
- Weidner, L. D., S. S. Zoghbi, S. Lu, S. Shukla, S. V. Ambudkar, V. W. Pike, J. Mulder, M. M. Gottesman, R. B. Innis, and M. D. Hall. 2015. "The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 354 (3): 384–93.
- Wilhelm, Scott M, Lila Adnane, Philippa Newell, Augusto Villanueva, Josep M Llovet, and Mark Lynch. 2008. "Preclinical Overview of Sorafenib , a Multikinase Inhibitor That Targets Both Raf and VEGF and PDGF Receptor Tyrosine Kinase Signaling." *Mol Cancer Ther* 7: 3129–41.
- Woodward, Owen M, Anna Köttgen, Josef Coresh, Eric Boerwinkle, William B Guggino, and Michael Köttgen. 2009. "Identification of a Urate Transporter, ABCG2, with a Common Functional Polymorphism Causing Gout." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10338–42.
- Xu, P, Z L Ling, J Zhang, Y Li, N Shu, Z Y Zhong, Y Chen, et al. 2016. "Unconjugated Bilirubin Elevation Impairs the Function and Expression of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) at the Blood-Brain Barrier in Bile Duct-Ligated Rats." *Acta Pharmacol Sin* 37 (8). Nature Publishing Group: 1–12.
- Yousif, Salah, Cynthia Marie-Claire, Françoise Roux, Jean Michel Scherrmann, and Xavier Declèves. 2007. "Expression of Drug Transporters at the Blood-Brain Barrier Using an Optimized Isolated Rat Brain Microvessel Strategy." *Brain Research* 1134 (1). Elsevier B.V.: 1–11.
- Yuan, Jianhui, Hui Lv, Bo Peng, Chengkun Wang, Yanhui Yu, and Zhimin He. 2009. "Role of BCRP as a Biomarker for Predicting Resistance to 5- Fluorouracil in Breast Cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 1103–10.
- Zhang, Yi, Honggang Wang, Jashvant D Unadkat, and Qingcheng Mao. 2007. "Breast Cancer Resistance Protein 1 Limits Fetal Distribution of Nitrofurantoin in the Pregnant Mouse." *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* 35 (12): 2154–58.
- Zhou, Sheng, John J Morris, Yuxiao Barnes, Lubin Lan, John D Schuetz, and Brian P Sorrentino. 2002. "Bcrp1 Gene Expression Is Required for Normal Numbers of Side Population Stem Cells in Mice , and Confers Relative Protection to Mitoxantrone in Hematopoietic Cells in Vivo." *PNAS* 99 (19): 12339–44.
- Zhou, Sheng, John D Schuetz, Kevin D Bunting, Anne-Marie Colapietro, Janardhan Sampath, John J Morris, Irina Lagutina, et al. 2001. "The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype." *JOUR. Nat Med* 7 (9): 1028–34.

**sekundární zdroj.