

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

**Sledování exprese ABC transportérů na transkripční
úrovni**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Hradec Králové 2007

Milada Kalmanová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D. a PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování této diplomové práce.

V neposlední řadě také děkuji celé rodině a mému příteli za maximální podporu po celou dobu studií.

Obsah

OBSAH	3
SEZNAM ZKRATEK	4
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	6
2 TRANSPORT LÉČIV PŘES BIOLOGICKÉ BARIÉRY	8
2.1 PROSTÁ (PASIVNÍ) DIFÚZE.....	8
2.2 FILTRACE (VODNÍ DIFÚZE)	9
2.3 TRANSPORT POMOCÍ PROTEINŮ	10
2.3.1 Facilitovaná (usnadněná) difúze pomocí membránových kanálů	10
2.3.2 Aktivní transport.....	11
2.4 ENDOCYTÓZA	11
3 MEMBRÁNOVÉ TRANSPORTÉRY	13
3.1 SOLUTE CARRIER (SLC) TRANSPORTÉRY	13
3.2 ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTÉRY	14
4 ABC TRANSPORTÉRY	16
4.1 ABCA GENOVÁ PODRODINA.....	20
4.2 ABCB GENOVÁ PODRODINA	22
4.3 ABCC GENOVÁ PODRODINA	25
4.4 ABCD GENOVÁ PODRODINA.....	28
4.5 ABCE A ABCF GENOVÉ PODRODINY	29
4.6 ABCG GENOVÁ PODRODINA.....	30
5 MĚŘENÍ GENOVÉ EXPRESE	33
5.1 IZOLACE MRNA.....	34
5.2 METODY SLEDOVÁNÍ GENOVÉ EXPRESE NA ÚROVNI TRANSKRIPCE	34
5.2.1 Northern blotting	34
5.2.2 RNase protection assay	36
5.2.3 Real-time reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce.....	37
5.2.4 Další metody kvantifikace založené na PCR.....	46
5.2.5 Microarray – biočipy.....	47
6 SLEDOVÁNÍ EXPRESE ABC TRANSPORTÉRŮ NA TRANSKRIPČNÍ ÚROVNI – REŠERŠE PRACÍ	49
6.1 EXPRESSE ABCB TRANSPORTÉRŮ	49
6.1.1 Sledování exprese ABCB1	49
6.2 EXPRESSE ABCC TRANSPORTÉRŮ	50
6.2.1 Sledování exprese ABCC1	50
6.2.2 Sledování exprese ABCC2	50
6.2.3 Sledování exprese ABCC3	51
6.2.4 Sledování exprese ABCC4.....	52
6.2.5 Sledování exprese ABCC5	52
6.2.6 Sledování exprese ABCC6.....	53
6.2.7 Sledování exprese ABCC10	54
6.2.8 Sledování exprese ABCC11	54
6.2.9 Sledování exprese ABCC12	54
6.3 EXPRESSE ABCG TRANSPORTÉRŮ.....	54
6.3.1 Sledování exprese ABCG2.....	55
7 ZÁVĚR	56
ABSTRAKT	57
ABSTRACT	57
8 LITERATURA	58

Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette (ATP-vazebná kazeta)
ABCP	placentárně specifický ABC transportér
ALDP	adrenoleukodystrophy protein (protein adrenoleukodystrofie)
AMV	Avian Myeloblastosis Virus (virus ptačí myeloblastózy)
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	breast cancer resistance protein (prsňí nádorový rezistentní protein)
CCD	charge-coupled device (zařízení s vázanými náboji)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (transmembránový regulátor vodivosti cystické fibrózy)
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter (kanalikulární multispecifický transportér organických aniontů)
Ct	threshold cycle (prahová hladina)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
dsDNA	double-stranded DNA (dvouřetězcová DNA)
dT	deoxytymidin
eIF	eukaryotický iniciační faktor
FRET	fluorescence resonance energy transfer (přenos fluorescenční rezonanční energie)
HDL	high density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus způsobující ztrátu obranyschopnosti u člověka)
HLA	human leukocyte antigen (lidský leukocytární antigen)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GTP	guanosintrifosfát
LED	light-emitting diode (světelná dioda)
LDL	low density lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)
LTC ₄	leukotrien C ₄
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus (Moloneyho myšního leukemický virus)

MDR	multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence)
MRP	multidrug resistance related protein (protein mnohočetné lékové rezistence)
mRNA	mediátorová RNA
MXR	mitoxantrone-resistance protein (mitoxantron rezistentní protein)
NBD	nukleotide-binding domain (nukleotid-vazebná doména)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PFIC2	progresivní familiární intrahepatická cholestáza typu 2
PFIC3	progresivní familiární intrahepatická cholestáza typu 3
Pgp	P-glykoprotein
PMEA	9-(2-fosfonomethoxyethyl) adenin
RLI	RNase L inhibitor (RNáza L inhibitor)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
rRNA	ribozomální RNA
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SLC	solute carrier (přenašeč rozpuštěných látek)
ssDNA	single-stranded DNA (jednořetězcová DNA)
SUR	sulfonylureový receptor
TAP	transporter associated with antigen processing (transportér spojený s antigenním zpracováním)
T _m	melting temperature (teplota tání)
TMD	transmembránová doména
TNF α	tumor nekrotický faktor α
TTP	tymidintrifosfát
UTP	uraciltrifosfát
X-ALD	adrenoleukodystrofie vázaná na chromozom X
XLSA/A	sideroblastická anemie vázaná na X chromozom a ataxie

1 Úvod a cíle práce

Tato práce je zaměřená na shrnutí aktuálních informací o kvantifikaci ABC transportérů v lidských tkáních pomocí metod, které sledují expresi na transkripční úrovni. ABC transportéry mají důležité role v transportu léků a mají tedy vliv na jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku.

Léky mohou být transportovány v organismu několika mechanismy, které závisí na fyzikálně chemických vlastnostech buněčné membrány a samotného léčiva. Mezi nejdůležitější mechanismy transportu léků patří prostá difúze a transport pomocí přenašečů.

Membránové transportéry jsou rozděleny na SLC a ABC rodiny. Hrají významné role v absorpci, distribuci a eliminaci léků a jejich konjugátů. SLC transportéry mají molekulovou hmotnost 40-90 kDa, jako zdroj energie využívají elektrochemický gradient anorganických látek a jsou to jak influxní, tak efluxní pumpy. Naproti tomu ABC transportéry jsou efluxní pumpy, které mají molekulovou hmotnost 140-180 kDa a pro transport sloučenin využívají energii získanou z hydrolyzy ATP.

Rodina ABC transportérů obsahuje asi 50 členů, které jsou rozděleny do sedmi podrodin. V lidském organismu jsou exprimovány v různých tkáních a mají různorodé fyziologické funkce, např. transport lipidů, žlučových solí, aminokyselin, proteinů, léků a toxických sloučenin. Mutace ve 14 ABC genech způsobují 13 geneticky podmíněných nemocí. Bylo také zjištěno, že zvýšená exprese jistých ABC genů v nádorových buněčných liniích nebo v nádorech způsobuje mnohočetnou lékovou rezistenci a tím se snižuje účinnost chemoterapeutické léčby.

Sledovat expresi genů lze jak na transkripční, tak translační úrovni. Častokrát je výhodné použít pro sledování exprese metody na obou úrovních. Mezi transkripční metody patří Northern blotting, „RNase protection assay“, metody založené na PCR a microarray analýza. Těmito metodami lze detekovat množství exprimované mRNA daného genu.

Je velmi důležité kvantifikovat ABC transportéry v různých orgánech a tkáních lidského těla, protože ovlivňují absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci léků. V průběhu

let bylo provedeno mnoho studií, které se zabývaly přesnou tkáňovou expresí ABC genů. V této práci se pokusíme najít nejnovější práce, které sledovaly expresi ABC transportérů.

2 Transport léčiv přes biologické bariéry

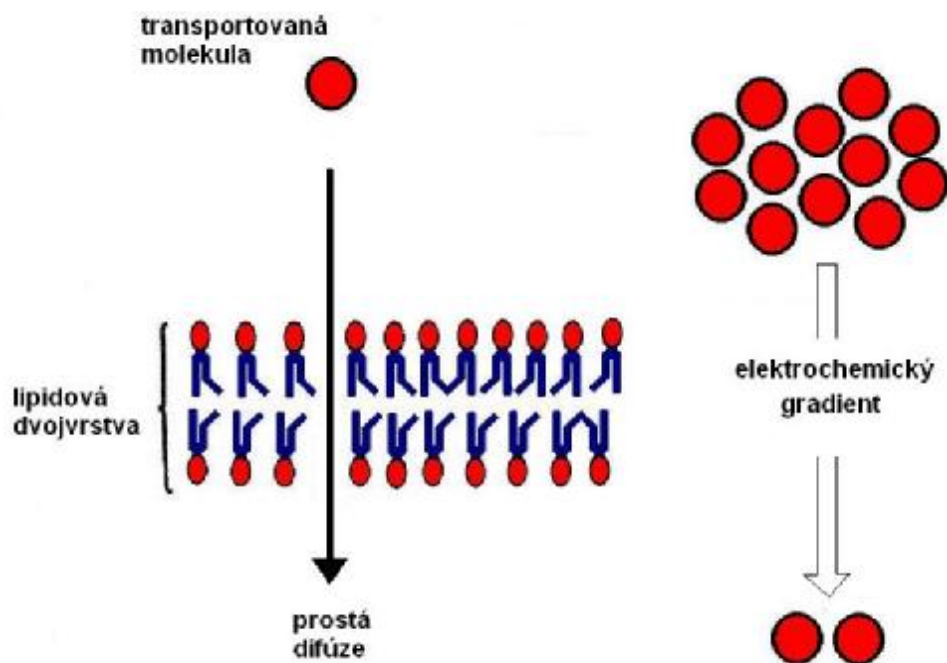
Organismus je tvořen sérií vzájemně dobře propojených kompartmentů ohraničených biologickými bariérami, díky nimž jsou tekutiny jednotlivých kompartmentů odděleny. Každá biologická bariéra se skládá z buněk, které jsou těsně spojeny k sobě (Lincová et al., 2007). Bariéry mezi vodními kompartmenty v těle tvoří fosfolipidové buněčné membrány, které na základě svých amfifilních vlastností vytvářejí dvojvrstvu, jež má hydrofilní povrch a hydrofóbní jádro (Campbell and Reece, 2006).

Biologické bariéry tedy hrají pro transport léčiv významnou roli. Na transport mají také vliv fyzikálně chemické vlastnosti léčiv (jejich lipofilita, hydrofilita a ionizovatelnost) a jejich molekulové hmotnosti, která se u většiny léčiv pohybuje v rozmezí 100-1000 (Katzung, 2006).

Existuje několik mechanismů, pomocí kterých léčiva biologické bariéry prostupují (Katzung, 2006).

2.1 Prostá (pasivní) difúze

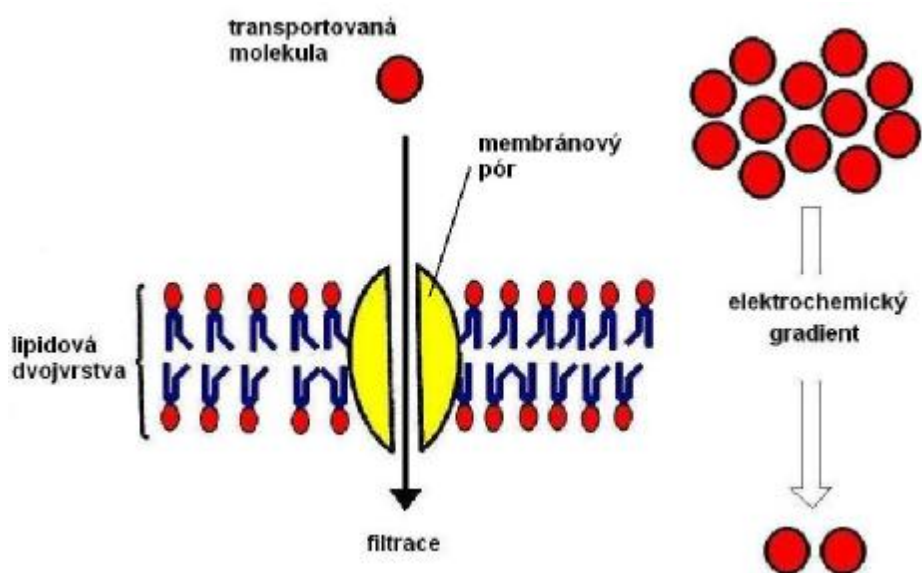
Difúzí procházejí přes buněčnou membránu pouze látky s malou molekulou, které jsou lipofilní. (Nečas et al., 2000). Prostup látek závisí na fyzikálně chemických vlastnostech membrán a procházejících molekul. Lipofilní látky jsou schopny přestupovat z jedné strany membrány na druhou. Směr a rychlost přestupu přitom závisí na poměrech koncentrací ve vodních prostředích na obou stranách buněčné membrány (viz Obr. 1.). Čím větší je koncentrační rozdíl (gradient), tím větší je množství difundovaného léčiva za jednotku času (Fickův zákon) (Campbell and Reece, 2006). Důležitým faktorem, který ovlivňuje prostou difúzi, je také rozdíl v elektrických gradientech na obou stranách membrány nazývaný membránový potenciál (Alberts et al., 2001). Prostá difúze je jedním z nejdůležitějších mechanismů transportu léčiv (Lüllmann et al., 1994).



Obr. 1. Prostá difúze (převzato z Nečas et al., 2000).

2.2 Filtrace (vodní difúze)

Molekuly léčiv jsou transportovány přes vodní póry nebo paracelulární kanály v plazmatické membráně (Obr. 2.). Procházet mohou dostatečně malé hydrofilní molekuly (molekulová hmotnost menší než 100), které nenesou náboj (Nečas et al., 2000). Děj je pasivní a probíhá podle koncentračního spádu (Alberts et al., 2001).



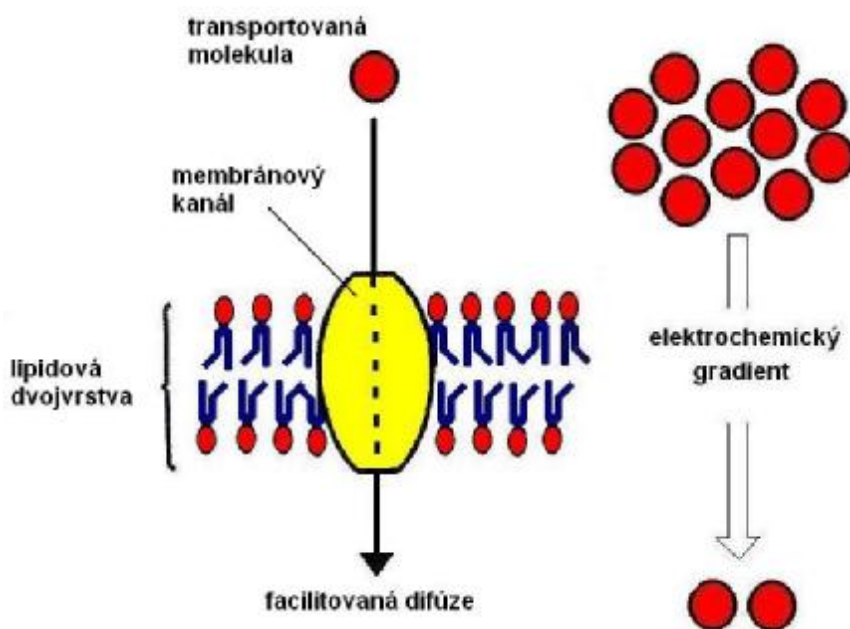
Obr. 2. Filtrace (převzato z Nečas et al., 2000).

2.3 Transport pomocí proteinů

Do této skupiny patří mechanismy, které potřebují membránové proteiny (Alberts et al., 2001). Některé proteiny vytvářejí napříč membránou póry nebo kanály, kterými mohou molekuly proudit podle koncentračního spádu. Nazývají se membránové kanály. Jiné proteiny mohou specificky vázat přenášené molekuly (ligandy) na jedné straně, pak konformačními změnami ligandu přenést na druhou stranu membrány a tam ji uvolnit. To jsou tzv. přenašečové (carrier) proteiny (Nečas et al., 2000). Typická je pro ně saturační kapacita a specifita, ze které plyne možnost kompetice mezi podobnými látkami. Tyto mechanismy realizují transport většiny „životně důležitých“ látek (Lüllmann et al., 1994).

2.3.1 Facilitovaná (usnadněná) difúze pomocí membránových kanálů

Membránové kanály jsou tvořeny oligomerními proteiny, které několikrát procházejí napříč membránou. Prostor mezi podjednotkami proteinových řetězců tvoří kanál (pór) (Alberts et al., 2001). Tok molekul je velmi rychlý a probíhá podle koncentračního spádu. Nevyužívá tedy energii. Jde vlastně o difúzi, která je usnadněná perforovaným pórem (viz Obr. 3.) (Campbell and Reece, 2006). Pro funkci membránových kanálů je velmi důležité, že tok částic může být regulován otvíráním nebo zavíráním kanálu. K tomu dochází díky změně konformace proteinů, které tvoří kanál (Nečas et al., 2000). Pomocí membránových kanálů mohou být transportována léčiva, která jsou hydrofilní a nabitá (Katzung, 2006).

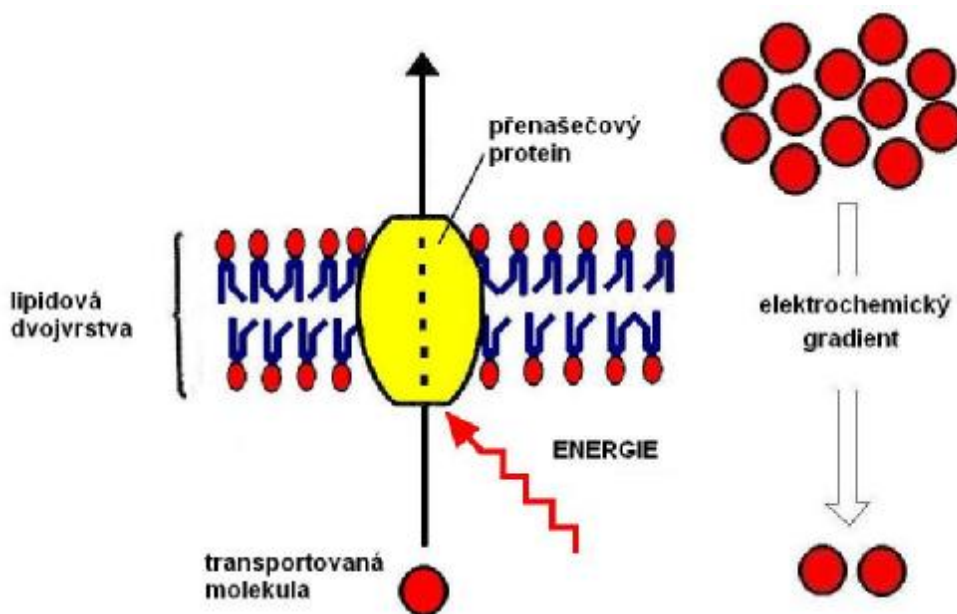


Obr. 3. Facilitovaná difúze (převzato z Nečas et al., 2000).

2.3.2 Aktivní transport

Základním principem aktivního transportu je rozpoznání ligandy přenašečem, který ji naváže na jedné straně plazmatické membrány, změní svoji konformaci a přeneseme molekulu na druhou stranu, kde molekulu uvolní a obnoví původní stav proteinu (Campbell and Reece, 2006). Od membránových kanálů se přenašečové proteiny liší tím, že transport probíhá proti koncentračnímu gradientu (Obr. 4). K tomu ale vyžadují energii, kterou nejčastěji získávají z hydrolyzy ATP (Nečas et al., 2000). Dalším možným zdrojem energie je elektrochemický gradient iontů na obou stranách membrány nebo energie uvolněná při redoxních pochodech (Alberts et al., 2001).

Proteiny, jejichž funkce je závislá na hydrolyze ATP, se nazývají membránové transporterní ATPázy. Přenášejí nejčastěji kationty, ale také anionty a jiné substráty. Přenašečů tohoto typu u nejrůznějších buněk nebo membránových kompartmentů je dnes známo podrobně mnoho. Jsou to podjednotkové bílkoviny, jejichž polypeptidové řetězce procházejí osmkrát až desetkrát plazmatickou membránou (Campbell and Reece, 2006).



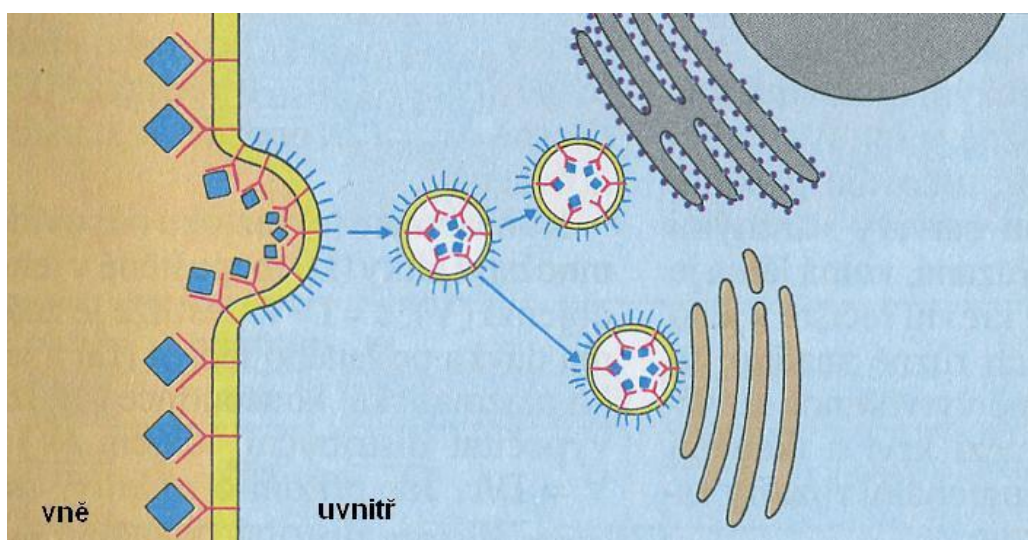
Obr. 4. Aktivní transport přes přenašečový protein (převzato z Nečas et al., 2000).

2.4 Endocytóza

Posledním mechanismem přenosu léčiv přes plazmatickou membránu je endocytóza. Svým mechanismem se liší od předchozích transportů, protože molekuly léčiv neprocházejí

přes plazmatickou membránu. Tento proces je umožněn fluiditou membrán a jejich splýváním (Nečas et al., 2000).

Dochází ke vchlípení (invaginaci) plazmatické membrány a léčiva s mimořádně velkou molekulovou hmotností (nad 1000) jsou ohraničena za tvorby membránových vezikul (Obr. 5.). Tento způsob transportu je významný především u polypeptidů (Katzung, 2006). Obsah vezikul může být v buňce uvolněn nebo mohou být vezikuly dále transportovány do jiných membránových systémů (Nečas et al., 2000). U endocytózy se předpokládá afinita látky k receptorům na povrchu membrány. Přenos se děje nezávisle na gradientu (Lüllmann et al., 1994).



Obr. 5. Endocytóza (převzato z Lüllmann et al., 1994).

3 Membránové transportéry

Pro transport léků přes biologické bariéry mají velký význam membránové transportéry. Jsou to integrální membránové proteiny, které mají obvykle 12 transmembránových domén (TMD), ačkoli existují i výjimky (např. jsou membránové transportéry, které obsahují 10, 11, 13 nebo 17 TMD) (Sai, 2005). Jsou přítomné v mnoha tkáních, jako jsou lymfocyty, střeva, játra, ledviny, varlata, placenta a centrální nervová soustava (Girardin et al., 2006).

Tyto transportéry fungují jako influxní pumpy, které přijímají živiny a různé látky do těla, nebo jako efluxní pumpy, které slouží jako bariéry proti toxickým sloučeninám (Sugiura et al., 2006). Transport léků je tedy výsledek současného působení efluxních a influxních pump, které jsou umístěny jak v bazolaterálních, tak v apikálních membránách epitelálních buněk (Girardin et al., 2006). Mezi sloučeniny přemísťované membránovými transportéry patří aminokyseliny, lipidy, anorganické ionty, peptidy, sacharidy, kovy, léky, toxická xenobiotika, chemické sloučeniny a proteiny (Nishimura and Naito, 2005).

Obecně membránové transportéry řídí cesty léků v těle, čímž ovlivňují jejich farmakologickou aktivitu a vedlejší účinky (Sugiura et al., 2006). Transportéry hrají zásadní role v absorpčních, distribučních a exkreačních procesech a mohou být klíčovými determinanty farmakokinetiky a farmakodynamiky léků (Nishimura and Naito, 2005).

Lékové membránové transportéry jsou obecně rozdělovány na SLC a ABC transportéry (Sugiura et al., 2006).

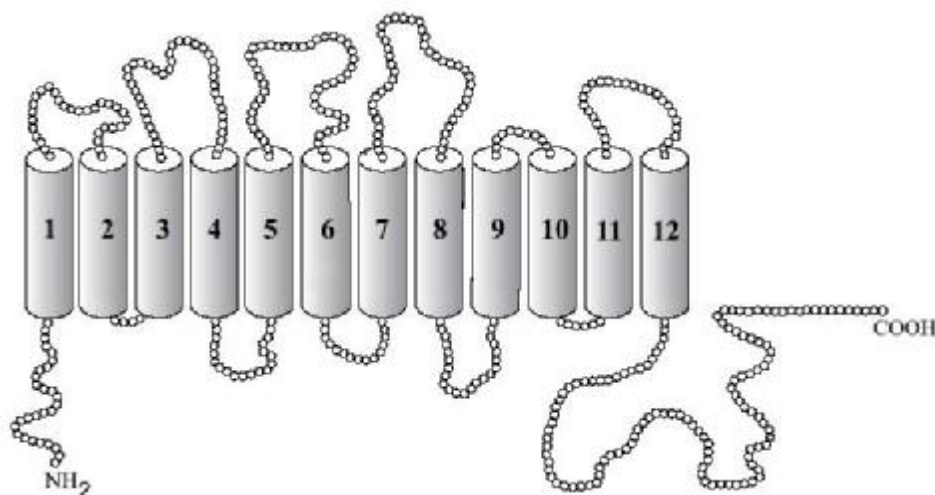
3.1 Solute carrier (SLC) transportéry

Více než 300 SLC genů bylo rozděleno do 43 rodin (Kusuhara and Sugiyama, 2005). Geny jsou exprimovány v plazmatických, mitochondriálních a vezikulárních membránách jako SLC transportéry, které se skládají ze 300-800 aminokyselin. Molekulová hmotnost je 40-90 kDa (Sai, 2005).

Protože jsou SLC aktivní transportéry, jako zdroj energie využívají elektrochemický gradient anorganických látek (Sugiura et al., 2006).

SLC transportéry hrají významné role v transportu živin, ale také léků. Během posledních let bylo zjištěno, že ohromné množství léků má stejné transportní cesty, jako mají živiny (Zhang et al., 2002). Je například známo, že SLC2A a SLC5A jsou transportéry pro sacharidy, SLC1A, SLC6A, SLC7A, SLC36A a SLC38A pro aminokyseliny, SLC15A

pro peptidy, SLC28A a SLC29A pro nukleotidy (Nishimura and Naito, 2005) a SLC22A a SLCO pro organické ionty (Kusuhara and Sugiyama, 2005). Je dokázáno, že SLC transportéry jsou jak efluxní, tak influxní pumpy (Sugiura et al., 2006).



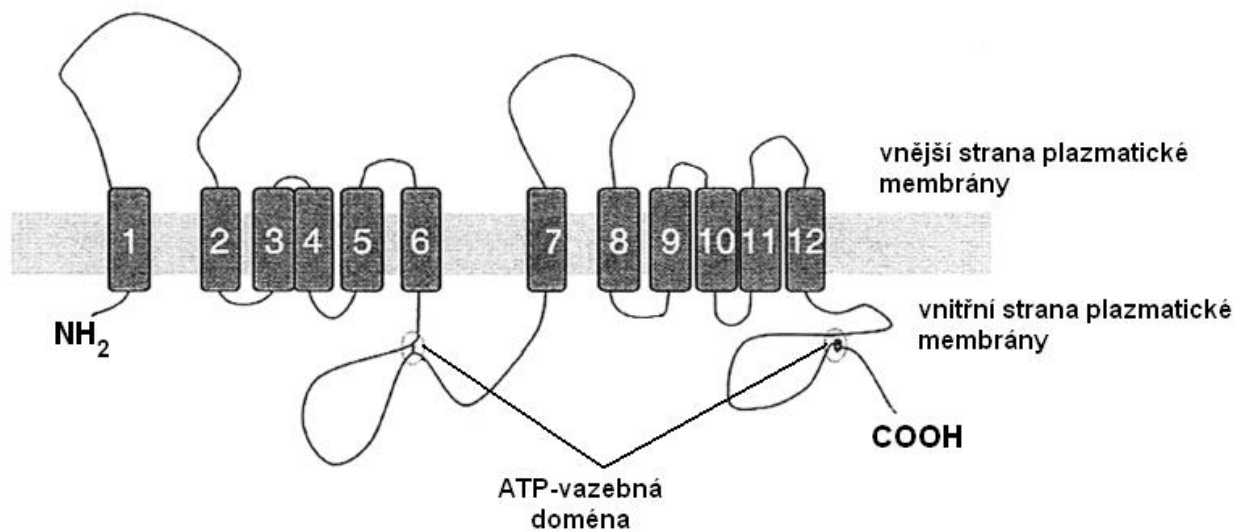
Obr. 6. Struktura SLC5A1 transportéru (převzato z Hediger, 1994).

3.2 ATP-binding cassette (ABC) transportéry

ABC geny patří do jedné rodiny, která obsahuje kolem 50 členů. Transportéry z ABC rodiny jsou složeny z 1200-1500 aminokyselin a molekulovou hmotnost mají 140-180 kDa (Sai, 2005). Nacházejí se v plazmatické membráně a exportují léky z intracelulárního do extracelulárního prostředí (Girardin et al., 2006).

Pro transport sloučenin využívají ABC transportéry energii, kterou získají z hydrolýzy ATP (Sugiura et al., 2006).

Mezi ABC transportéry patří např. P-glykoprotein neboli MDR1, multidrug resistance-associated proteiny MRP1 a MRP2 a breast cancer-resistance protein BCRP, které mají široké substrátové specifity (Girardin et al., 2006).



Obr. 7. Struktura ABCA1 transportéru (převzato z Dean et al., 2001).

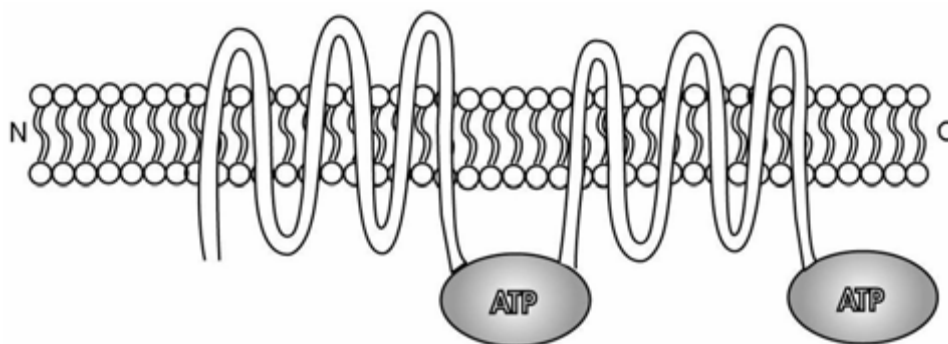
4 ABC transportéry

ABC transportéry jsou rodina velkých membránových proteinů, které jsou schopné transportovat různé druhy sloučenin přes membrány proti koncentračnímu spádu na úkor energie ATP (Borst and Elferink, 2002). Tato největší rodina transmembránových transportérů je složena asi z 50 funkčně odlišných prokaryotických a eukaryotických proteinů. Hlavní fyziologickou funkcí ABC transportérů je přesun široké palety substrátů přes extra- a intracelulární membrány (Štefková et al., 2004).

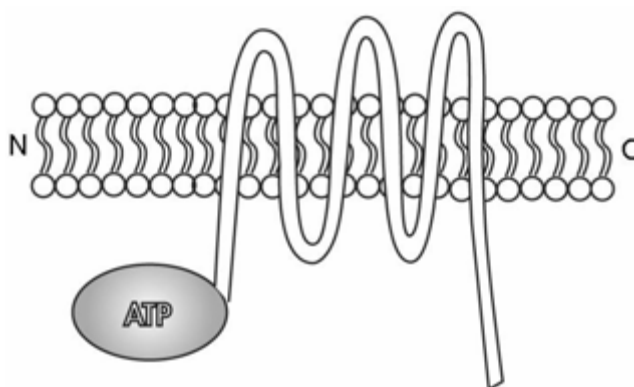
Chris Higgins v roce 1992 představil název ABC transportér, který je odvozen od konzervované sekvence ATP-vazebné kazety, což je nejcharakterističtější rys rodiny (Higgins, 1992). Pro tuto rodinu jsou užívána i jiná jména, např. dopravní ATPázy nebo P-glykoproteiny (Pgp) (Borst and Elferink, 2002).

Typický funkční ABC transportér se skládá ze dvou nukleotid-vazebných domén (NBD) a ze dvou transmembránových domén (TMD). NBD se také nazývají ATP-vazebné domény nebo ATPázové domény, protože váží a hydrolyzují ATP (Garmory and Titball, 2004). Jsou to hydrofilní jednoduché polypeptidy, které jsou složeny z 90–110 aminokyselin a jsou umístěny na cytoplazmatické straně membrány (Linton, 2007). Každá NBD obsahuje dva velmi zachovalé sekvenční motivy, Walker A a Walker B motiv, které jsou charakteristické pro všechny ABC transportéry (Holmes et al., 2006). Oba tyto motivy, které dohromady tvoří strukturu pro vazbu ATP, jsou od sebe odděleny přibližně 90–120 aminokyselinami (Linton, 2007). ABC transportéry také obsahují specifický motiv, konvenční sekvenci LeuSerGlyGlyGln. Tato sekvence se také nazývá spojovací peptid nebo C motiv a je umístěna na N-konci vzhledem k Walker B motivu (Garmory and Titball, 2004). TMD tvoří 6–11 hydrofóbních α -helixů, které přemostují membránu. Jejich aminokyselinové sekvence určují substrátovou specifitu každého transportéru. Proto je obvykle malá podobnost mezi TMD různých ABC transportérů (Teodori et al., 2006).

Eukaryotické ABC transportéry jsou tvořeny buď jako plné transportéry, které obsahují dvě TMD a dvě NBD (viz Obr. 8.), nebo jako poloviční transportéry (viz Obr. 9.). Ty musí později vytvořit buď homodimér (dvě stejné poloviny), nebo heterodimér (dvě nesteré poloviny), aby byl transportér plně funkční (Hyde et al., 1990).



Obr. 8. Plný ABC transportér se skládá ze dvou TMD a dvou NBD (převzato z Štefková et al., 2004).



Obr. 9. Poloviční ABC transportér se skládá z jedné TMD a jedné NBD (převzato z Štefková et al., 2004).

Jak již bylo zmíněno, ABC transportéry váží ATP, ze které hydrolyzou získávají energii. Tuto energii spotřebovávají k přemísťování různých molekul přes membrány proti koncentračnímu spádu. Zatím je ale nejasná stechiometrie vztahu mezi počtem ATP molekul hydrolyzovaných a počtem transportovaných molekul substrátu (Randak and Welsch, 2005). Jednou z teorií je, že hydrolyza dvou ATP molekul má za následek transport jedné molekuly substrátu (Ivetac et al., 2007).

ABC transportéry jsou umístěny v plazmatických membránách a v membránách organel různých organismů (Holmes et al., 2006). Mezi jejich hlavní funkce patří přemísťování sloučenin, jako jsou aminokyseliny, lipidy, lipopolysacharidy, anorganické ionty, sacharidy, kovy, žlučové soli a proteiny (Higgins, 1992). K transportu dochází uvnitř buněk při metabolických procesech, nebo mimo buňky při přemísťování substrátů do jiných orgánů. Další funkcí je sekrece sloučenin ven z těla organismů a ochrana životních orgánů těla, tj. mozku, cerebrospinální tekutiny, varlete nebo zárodku, před toxiny, které vstupují do těla a ohrožují ho. Hrají také důležitou roli v transportu léků a lékových konjugátů (Borst and Elferink, 2002).

Některé ABC transportéry nejsou přímo zapojeny do transportování substrátů, ale zdá se, že jsou částí iontových kanálů (transmembránový regulátor vodivosti CFTR nebo sulfonylureový regulátor). V těchto případech se zdá, že hydrolýza ATP je spojena s pohybem samotného proteinu (pro CFTR) (Tabcharani et al., 1991) nebo dalších proteinů (sulfonylureový regulátor), které regulují otevírání a zavírání iontových kanálů (Inagaki et al., 1995).

ABC geny jsou široce rozptýleny v eukaryotických genomech a jsou vysoce zachovány mezi druhy. Toto naznačuje, že většina těchto genů existovala od začátku eukaryotického vývoje (Dean et al., 2001).

Defekty v některých genech jsou spojeny s popsány lidskými onemocněními. Bylo zjištěno, že 14 defektů způsobuje 13 genetických nemocí. Nejběžnější jsou cystická fibróza, Stargardtova choroba, adrenoleukodystrofie a Tangierovo onemocnění (Štefková et al., 2004).

ABC geny jsou na základě podobnosti s genovou strukturou (poloviční *versus* plné transportéry), pořadí domén a na sekvenční homologii NBD a TMD rozděleny do podrodin. K tomuto rozdělování se používá fylogenetická analýza, která rozděluje savčí ABC geny do sedmi rozdílných podrodin, které jsou pojmenovány ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (viz Tab. 1.) (Borst and Elferink, 2002).

Tab. 1. Seznam lidských ABC transportérů, jejich lokalizace na chromozómu, hlavní umístění ve tkáni, jejich funkce a nemoc způsobená ABC geny.

Symbol genu	Další označení	Lokalizace na chromozómu	Hlavní umístění v organismu	Funkce	Nemoc
ABCA1	ABC1 TGD HDLDT1	9q31.1	Všudypřítomný	Cholesterolový a fosfolipidový transport	Tangierova choroba, familiární hypoapoproteinemie
ABCA2	ABC2	9q34.3	Mozek, ledviny, plíce, srdce	Léková rezistence	
ABCA3	ABC3 ABCC	16p13.3	Plíce a další tkáně	Surfaktantová sekrece?	
ABCA4	ABCR ABC10 STGD1 STGD	1p21.3	Sítnice, fotoreceptorové buňky	N-retinylidien-PE odtok	Stargardtova nemoc, retinitis pigmentosa, dystrofie žluté skvrny
ABCA5		17q24.3	Slinivka, srdce, svalovina, varle		
ABCA6		17q24.3	Játra		
ABCA7	ABCX	19p13.3	Slezina, brzlík, kostní dřeň		
ABCA8		17q24.3	Vaječník, varle, srdce, játra		

ABCA9		17q24.3	Srdce, mozek		
ABCA10		17q24.3	Kosterní svaly, srdce		
ABCA12		2q34	Žaludek		
ABCA13		7p12.3	Žaludek, varle, trachea, kostní dřeň		
ABCB1	PGY1 MDR1 Pgp GP170	7q21.12	Mnoho epitelů, hematoencefalická bariéra	Mnohočetná léková rezistence	
ABCB2	TAP1 PSF1 RING4	6p21.3	Všudypřítomný	Peptidový transport	Imunitní nedostatečnost
ABCB3	TAP2 PSF2 RING11	6p21.3	Všudypřítomný	Peptidový transport	Imunitní nedostatečnost
ABCB4	PGY3 MDR2(3) PFIC-3	7q21.12	Jaterní hepatocyty	Transport žlučových kyselin	Progresivní familiární intrahepatická cholestáza-3, cholestáza těhotenství
ABCB5		7p21.1	Všudypřítomný		
ABCB6	ABCB6 ABC14 UMAT MTABC3 EST45597	2q35	Všudypřítomný	Transport železa	
ABCB7	ABC7 Amt1P ASAT	Xq21-q22	Všudypřítomný	Fe/S klastrový transport	Sideroblastická anémie vázaná na chromozom X a ataxie
ABCB8	MABC1	7q36.1			
ABCB9		12q24.31	Srdce, mozek		
ABCB10	ABC10 EST20237	1q42.13			
ABCB11	BSEP SPGP PFIC-2 PGY4	2q24.3	Jaterní hepatocyty	Transport žlučových kyselin	Progresivní familiární intrahepatická cholestáza-2
ABCC1	MRP1 MRP	16p13.12	Všudypřítomný	Léková rezistence	
ABCC2	MRP2 cMOAT	10q24.2	Játra, tenké střevo, ledviny	Transport žlučových kyselin/eflux organických aniontů	Dubin-Johnsonův syndrom
ABCC3	MRP3	17q21.33	Játra, žlučovody, střevo, kůra nadledvinek	Léková rezistence	
ABCC4	MRP4	13q32.1	Mnoho tkání	Transport nukleosidových analogů	

ABCC5	MRP5 SMRP	3q27.1	Všudypřítomný	Transport nukleosidových analogů	
ABCC6	MRP6	16p13.12	Ledviny, játra		Pseudoxanthoma elasticum
CFTR	ABCC7	7q31.31	Plíce, střeva	Chloridový iontový kanál	Cystická fibróza
ABCC8	SUR SUR1	11p15.1	Slinivka	Sulfonylureový receptor	
ABCC9	SUR2	12p12.1	Srdce, kosterní svaly	K(ATP) kanálová regulace	
ABCC10	MRP7	6p21.1			
ABCC11	MRP8	16q12.1	Játra, prs		
ABCC12	MRP9	16q12.1	Všudypřítomný		
ABCD1	ALD ALDP	Xq28	Mnoho tkání	Transport velmi dlouhých řetěz-ců mastných kyselin	Adrenoleukodystrofie
ABCD2	ALDL1 ALDR	12q11	Mnoho tkání		
ABCD3	PMP70 PXMP1	1p22.1	Mnoho tkání		
ABCD4	PMP69 P70R PXMP1L	14q24.3	Mnoho tkání		
ABCE1	OABP RNS4I	4q31.31	Vaječník, varle, slezina	Oligoadenylát-vazebný protein	
ABCF1	ABC50	6p21.1	Všudypřítomný		
ABCF2		7q36.1	Všudypřítomný		
ABCF3		3q27.1	Všudypřítomný		
ABCG1	ABC8 White	21q22.3		Cholesterolový transport	
ABCG2	BCRP MXR ABCP	4q22	Placenta, prs, játra, střeva	Toxinové eflux, léková rezistence	
ABCG4	White2	11q23	Makrofágy, oko, mozek, slezina		
ABCG5	White3	2p21	Játra, tenké střevo	Sterolový transport	Sitosterolemie
ABCG8		2p21	Játra, tenké střevo	Sterolový transport	Sitosterolemie

4.1 ABCA genová podrodina

Podrodina lidských ABCA transportérů obsahuje 12 plných transportérů, které jsou dále rozděleny do dvou podskupin na základě fylogenetické analýzy a intronové struktury. První podskupina zahrnuje sedm genů rozptýlených na šesti různých chromozomech (ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCA12, ABCA13), zatímco druhá skupina obsahuje pět genů (ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 a ABCA10) uspořádaných v klastru na chromozómu 17q24. Tato podrodina obsahuje několik genů, které jsou jedny z největších

ABC genů a jsou dlouhé až 2100 aminokyselin (Broccardo et al., 1999).

Charakteristickým znakem této podrodiny je přítomnost úseku hydrofóbních aminokyselin, který je skrz přemostění membrány uvnitř regulační domény (Luciani et al., 1994).

ABCA1 gen kóduje integrální membránový protein, který je 2261 aminokyselin velký (Santamarina-Fojo et al., 2001). Bylo zjištěno, že ABCA1 přispívá k pohlcování apoptotických tělísek (Hamon et al., 2002). Také bylo dokázáno, že ABCA1 hraje základní roli v transportu celulárního cholesterolu a fosfolipidů (většinou fosfatidylcholinu) k apolipoproteinům (Santamarina-Fojo et al., 2001). ABCA1 vytlačuje membránové fosfolipidy a cholesterol směrem ke specifickým extracelulárním akceptorům, k apolipoproteinům chudým na lipidy A - I (apoA-I), ale přesná role proteinu v tomto procesu je zatím stále nejasná (Cavelier et al., 2006). Mutace v ABCA1 genu způsobuje Tangierovo onemocnění (Hoffman and Fredrickson, 1965), což je vzácná dědičná autozomálně recesivní porucha charakterizovaná těžkým nedostatkem nebo nepřítomností HDL v plazmě a akumulací cholesterolových esterů v makrofázích a dalších retikuloendoteliálních buňkách (Kolovou et al., 2006). Také byli popsáni pacienti s familiární hypoalfalipoproteinémií, což je autozomálně dominantní porucha charakterizovaná nízkými hladinami HDL u heterozygotů a není zde zřetelné ukládání cholesterolových esterů do buněk. Tito pacienti, stejně jako pacienti, kteří trpí Tangierovou nemocí, mají mutaci v genu ABCA1 (Alrasadi et al., 2006). Genetická analýza ale odhalila, že Tangierova nemoc je následkem mutací na obou alelách ABCA1, zatímco familiární hypoalfalipoproteinémie je kvůli mutaci na jedné alele (Singaraja et al., 2006).

ABCA4 (ABCR) protein je výhradně exprimován ve fotoreceptorech, přesněji v okrajích vnějších segmentových disků tyčinek v sítnici jako 210 kilodaltonů velký glykoprotein, nazývaný fosfolipidová „flippáza“ (Azarian et al., 1998). Předpokládá se, že ABCA4 transportuje N-retinylidenfosfatidylethanolamin (N-retinyliden-PE), což je derivát vitamínu A, z fotoreceptorových vnějších segmentových disků do cytoplazmy a představuje rozhodující krok ve vidění. Tyto sloučeniny jsou pravděpodobné substráty pro ABCA4 (Bok, 2005). Mutace v tomto genu jsou spojeny s mnohočetnými očními poruchami (Cremers et al., 2002). Naprostá ztráta ABCA4 funkce vede k retinitis pigmentosa (Michaelides et al., 2006), zatímco pacienti s alespoň jednou poškozenou alelou trpí Startgardtovým onemocněním, což je autozomálně recesivní onemocnění, které je charakterizováno v dětství nastupující makulární dystrofií a ztrátou centrálního vidění. Začíná prodlouženou adaptací na tmou a následuje akumulace lipofuscinu v retinálním epitelu (Allikmets et al., 1997).

ABCA2, ABCA3 a ABCA7 hrají roli ve fosfolipidovém metabolismu. Bylo zjištěno, že mRNA hladiny těchto genů byly zvýšeně exprimovány během cholesterolového influxu (Kaminski et al, 2001a, Ban et al., 2007, Linsel-Nitschke et al., 2005). ABCA3 může také hrát důležitou roli v tvorbě plicního surfaktantu, který je důležitý ke snížení povrchového napětí alveolární tekutiny (van der Deen et al., 2005). Hlavní složky plicního surfaktantu jsou fosfolipidy a specifické surfaktantové proteiny. ABCA3 je rovněž důležitý v homeostáze plic dospělých (Ban et al., 2007).

Během studia ABCA5 bylo zjištěno, že tento gen je vysoce exprimován v Leydigových buňkách, ale jeho funkce zatím není přesně známá (Petry et al., 2006).

Předpokládá se, že ABCA6, ABCA9 a ABCA10 jsou zapojeny do lipidové homeostázy makrofágů (Kaminski et al., 2001b, Piehler et al., 2002, Wenzel et al., 2003).

ABCA8 může hrát roli v metabolismu digoxinu v játrech, ale mechanismus je nejasný (Wakaumi et al., 2005).

Nedávno Akiyama a kol. dokázal, že ABCA12 je exprimován v lidských keratinocytech, které jsou upregulovány během keratinizace (Akiyama et al., 2005).

ABCA13 může sloužit jako regulační mechanismus v ledvinách, ale je třeba dalších studií (Barros et al., 2003).

4.2 ABCB genová podrodina

ABCB podrodina u savců je jedinečná tím, že obsahuje jak plné, tak poloviční transportéry. Mezi plné transportéry patří ABCB1, ABCB4, ABCB5 a ABCB11, mezi poloviční pak ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9 a ABCB10 (Štefková et al., 2004).

ABCB1 (MDR1) gen kóduje P-glykoprotein (Pgp), fosforylovaný glykoprotein s molekulovou hmotností 170 kDa (Bauer et al., 2005). Je exprimován jako apikální membránový protein (de Lannoy and Silverman, 1992). Hraje rozhodující roli v distribuci a akumulaci substrátů a léků v cílových tkáních a je to jeden z nejintenzivněji studovaných transportérů (Balimane et al., 2006). Ve střevní mukóze hraje MDR1 důležitou roli, protože zabraňuje vstupu toxinů do těla (Kivisto et al., 2004), v játrech, nadledvinkách, střevech a ledvinách pomáhá eliminovat toxiny z těla (Sun et al., 2006) a v hematoencefalické bariéře, placentárním trofoblastu, varlatelych a kostní dřeni poskytuje ochranu vitálním částem těla (Hennessy and Spiers, 2007). Bylo zjištěno, že MDR1 má velmi širokou substrátovou specifitu (Al-Shawi and Omote, 2005) a že transportuje velké množství různorodých

hydrofobních neutrálních nebo slabě zásaditých substrátů, jako jsou lipidy, steroidy, xenobiotika, peptidy (Garmorry and Titball, 2004), ale také léky (viz Tab. 2.). MDR1 je první lidský ABC transportér, který byl klonován a charakterizován kvůli jeho schopnosti udílet mnohačetnou lékovou rezistenci nádorovým buňkám k chemoterapeutickým lékům (Juliano and Ling, 1976). Transportéry jsou totiž schopné vytlačit protinádorové léky ven z buněk a snížit tak efektivní celulární akumulaci léků uvnitř buněk, což je hlavní důvod, který snižuje účinnost používaných chemoterapeutických režimů (Ambudkar et al., 2005). Mnohočetná léková rezistence v nádorových buňkách je často spojena se zvýšenou expresí ABC transportérů na povrchu buněk. ABCB1 je exprimován v různých hematopoetických nádorech a solidních tumorech (Kuwano et al., 2003).

Tab. 2. Léky transportované MDR1 transportérem.

Léková skupina	Název léčiva	Reference
Blokátory kalciových kanálů	verapamil	(Dadashzadeh et al., 2006)
Anthelmintika	ivermectin	(Lankas et al., 1997)
Kortikoidy	dexamethazon hydrokortison	(Mark and Waddell, 2006)
Opioidní analgetika	morfin	(Kharasch et al., 2003)
Antiepileptika	phenobarbital gabapentin fenytoin	(Sun et al., 2003)
Kardioglykosidy	digoxin	(Darbar and Roden, 2006)
Antibiotika	erytromycin tetracyklin doxycyklin	(Ebinger and Uhr, 2006)
Antiuratika	kolchicin	(Gottesman et al., 2002)
Protinádorová léčiva	etoposid doxorubicin paclitaxel methotrexat vinblastin	(Gottesman et al., 2002)

ABCB2 a ABCB3 (TAP – transporter associated with antigen processing) geny kódují poloviční transportéry, které tvoří heterodimery, jež slouží k transportu peptidů do endoplazmatického retikula, kde jsou prezentovány jako HLA antigeny třídy I (Leveson-

Gover et al., 2004). Byli popsáni pacienti jak s mutací ABCB2, tak s mutací ABCB3, které způsobují vrozenou HLA imunodeficienci třídy I (Gadola et al., 2000).

ABCB4 je exprimován hlavně ve žlučové kanalikulární membráně jater (Ruetz and Gros, 1994), ale byl také nalezen v srdci, svalech, nadledvinkách a v B-lymfocytech (Smit et al., 1995). Bylo zjištěno, že ABCB4 je exprimován v apikální membráně a transportuje fosfatidylcholin z vnitřní do vnější strany membrány (Ruetz and Gros, 1994). Mutace ABCB4 jsou základní příčinou progresivní familiární intrahepatické cholestázy typu 3 (PFIC3) a jsou také spojeny s intrahepatickou cholestázou v těhotenství. Pacienti s PFIC3 mají zvýšené cholestatické sérové markery a vysoké sérové hladiny γ -glutamyltranspeptidázy (Oude Elferink and Paulusma, 2007).

ABCB5 gen kóduje plnou transportérní molekulu. Její funkce je ale neznámá (Frank et al., 2003).

Poloviční transportéry ABCB6 a ABCB7 jsou lokalizovány v mitochondriích, kde jsou zapojeny do metabolismu železa a transportu Fe/S proteinových prekurzorů z mitochondrií do cytosolu (Krishnamurthy et al., 2006). Mutace v ABCB7 genu je spojena se sideroblastickou anemií vázanou na chromozom X a ataxií (XLSA/A). Je to recesivní porucha charakterizovaná v dětství nastupující neprogresivní mozečkovou ataxií a mírnou anemií s hypochromií a mikrocytosou (Bekri et al., 2000).

V mitochondriích ve varlatech je exprimován ABCB8 gen, ale jeho funkce zatím není známá (Melaine et al., 2006).

Nejbližším homologem TAP transportérů je ABCB9, který je umístěn v lysosomech. Jeho funkce není ale známá (Herget and Tampe, 2007).

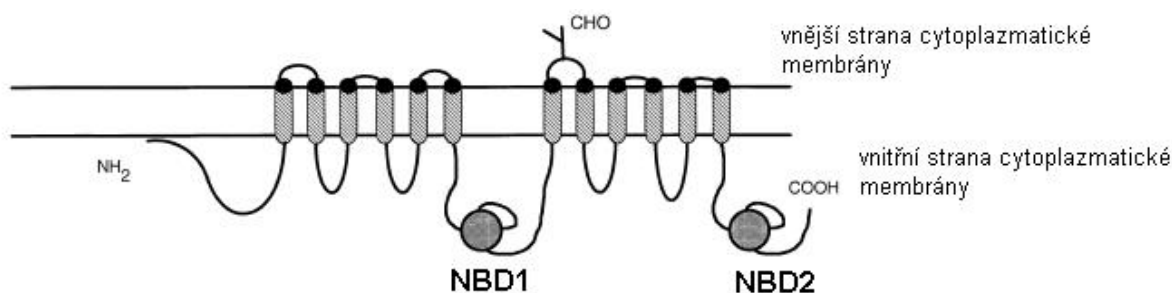
ABCB10 transportér je lokalizován ve vnitřní mitochondriální membráně a je zapojen do biosyntézy hemu (Graf et al., 2004).

V kanalikulární membráně jater je také umístěn ABCB11. Protein je exprimován ve vezikulách uvnitř jaterních buněk, které vyplňují žlučovod a je identifikován jako exportní pumpa žlučových solí, která se účastní sekrece žlučových solí do žluči, jako je taurocholát (Suchy and Ananthanarayanan, 2006). Mutace v ABCB11 způsobují progresivní familiární intrahepatickou cholestázu typu 2 (PFIC2). Je to onemocnění charakterizované nízkou koncentrací žlučových solí ve žluči, zvýšenými sérovými koncentracemi žlučových solí a normálními sérovými γ -glutamyltranspeptidázovými hladinami (van Mil et al., 2004).

ABCC2 (MRP2) gen je exprimován jako kanalikulární multispecifický transportér organických aniontů (cMOAT) v apikální straně kanalikulární membrány jater (Büchler et al., 1996), ale také v epitelu proximálních tubulů ledvin (Everst et al., 1998), epitelu střev (Gotoh et al., 2000) a syncytiotrofoblastu placenty (Gerk and Vore, 2002). Má velmi podobnou substrátovou specifitu jako MRP1, takže transportuje glutathionové a glukuronátové konjugáty (Keppler and König, 2000). Je také vysoce afinitní k LTC₄ (Leier et al., 1994) a glukuronosyl-bilirubinu (Kamisako et al., 1999). Bylo zjištěno, že zvýšená exprese ABCC2 může způsobit lékovou rezistenci nádorových buněk k vinkristinu, vinblastinu, camptothecinovým derivátům (Koike et al., 1997), doxorubicinu, epirubicinu, etoposidu, cisplatině (Cui et al., 1999), mitoxantronu, metothrexatu (Borst et al., 2000). Mutace ABCC2 genu způsobuje Dubin-Johnsonův syndrom, lidskou poruchu organického iontového transportu. Je to dědičná autozomálně recesivní porucha charakterizovaná abnormální akumulací bilirubinu v játrech (Wada et al., 1998).

ABCC3 (MRP3) gen je exprimován jako organický aniontový transportér a je lokalizován v játrech, pankreatu, střevech, ledvinách a žlučníku v bazolaterální membráně stejně jako MRP1 (Scheffer et al., 2002). Zdá se, že MRP3 není schopen transportovat glutathion a tím se odlišuje od MRP1 a 2 (Zelcer et al., 2001). Bylo ale zjištěno, že glukuronosyl-lékové konjugáty jsou dobré MRP3 substráty, proto tento transportér přispívá k odstraňování toxických a karcinogenních látek, které jsou detoxikovány glukuronidizací (Keppler, 2005). MRP3 hraje důležitou roli v enterohepatické recirkulaci žlučových kyselin a v odstraňování toxických organických aniontů z hepatocytů, zvláště když sekrece do žluči je zablokována (např. při cholestáze) (Belinsky et al., 2005). Exprese ABCC3 je také ve vysokých hladinách v kůře nadledvinek, kde přispívá k transportu endogenních steroidních konjugátů (Borst et al., 2006). Bylo zjištěno, že MRP3 udílí rezistenci k epipodophyllotoxinům etoposidu a teniposidu (Zelcer et al., 2001) a ve vyšších koncentracích také k methotrexatu (van der Deen et al., 2005).

Zajímavé je, že proteiny ABCC4, ABCC5, ABCC11 a ABCC12 genů jsou menší než ostatní geny této podrodiny. Postrádají totiž TMD₀ v N-konci, která ale není nutná pro transportní funkci (Obr. 11.). Někdy se nazývají jako tzv. „krátké MRP“ (Bakos et al., 1998).



Obr. 11. Schéma struktury proteinu MRP5 (převzato z Borst et al., 2000)

ABCC4 (MRP4) gen je nejvíce exprimován v ledvinách (Sekine et al., 2006) a prostatě (van der Deen et al., 2005), dále také v kostní dřeni, brzlíku, slezině a střevech (Belinsky et al., 2007). Jeho protein je organická aniontová pumpa, která má schopnost transportovat cyklické nukleotidy (cAMP, cGMP) a nukleotidové analogy. To má za následek rezistenci ke klinicky využívaným analogům bazí, nukleosidů a nukleotidů, jako je PMEa, 6-merkaptopurin, azidothymidinmonofosfát a další nukleosidové analogy (Sampath et al., 2002). MRP4 je také rezistentní k methotrexatu a topotekanu (Bronger et al., 2005). Rezistence k nukleosidovým a nukleotidovým analogům je důležitým faktorem v terapii nádorů, HIV1 infekcí a dalších onemocnění, protože tyto analogy jsou důležité antivirové a protinádorové léky (Wielinga et al., 2003). MRP4 také hraje roli v efluxu prostaglandinů E₁ a E₂ (Reid et al., 2003).

ABCC5 (MRP5) gen je exprimován ve všech tkáních, nejvíce však v kosterním svalstvu, mozku a také v plicích (Kool et al., 1997). Stejně jako MRP4 protein je MRP5 nukleotidový transportér a udílí rezistenci k nukleosidovým analogům (Wielinga et al., 2003). Je rezistentní k thioguaninu, 6-merkaptopurinu a PMEa, k protinádorovým lékům, jako jsou anthracykliny nebo methotrexat, rezistentní nejsou (Bronger et al., 2005).

Na chromozomu 16q12.1 v klastru se nacházejí ABCC11 (MRP8) a ABCC12 (MRP9) geny. Jsou exprimovány v ledvinách, plicích, játrech a některých tkáních plodu (Yabuuchi et al., 2001). MRP8 je lipofilní aniontová pumpa, která může transportovat cyklické nukleotidy, konjugované steroidy a žlučové kyseliny. Je také schopná udílet rezistenci k nukleosidovým analogům (PMEa a 5-fluorouracil). Funkce MRP9 je stále nejasná (Kruh et al., 2007).

ABCC6 (MRP6) gen je hlavně exprimován v laterálních membránách jater (Madon et al., 2000) a ledvin (Ringpfeil et al., 2000), nízké RNA hladiny byly rovněž detekovány ve slinivce, střevech, štítné žláze, mozku, plicích a potních žlázách. Substrátová specifita není doposud známa (Beck et al., 2005). Bylo zjištěno, že mutace v ABCC6 způsobuje pseudoxanthoma elasticum, vzácnou recesivní genetickou systémovou nemoc elastické

vazivové tkáni, která je charakterizovaná kalcifikací pojivových vláken kůže, očním krvácením a kardiovaskulárním onemocněním, jako je arteriální hypertenze nebo ateroskleróza (Le Saux et al., 2001).

Dalším genem této rodiny je ABCC7 (CFTR). Kóduje transportér, který je proteinkináza A-dependentní chloridový kanál složený z 1480 aminokyselin (Riordan et al., 1989). Je exprimován v apikální buněčné membráně exokrinních tkáních, jako jsou potní kanálky, slinivka (Park et al., 2002), střeva, játra, genitální trakt, nosní sliznice (Ratjen and Doring, 2003), plíce a ledviny (Silbernagl and Lang, 2001). Mezi ABC geny je neobvyklý, protože za první NBD má velkou, hydrofilní doménu, R-doménu, která je fosforylována cAMP dependentními proteinkinázami a slouží k regulaci aktivity kanálu (Riordan et al., 1989). Mutace v CFTR genu způsobuje autozomálně recesivní genetickou nemoc zvanou cystická fibróza neboli mukoviscidóza (Greger et al., 2001). U bělochů to je nejběžnější fatální dětské onemocnění a je charakterizováno defektní epiteliální sekrecí plic, slinivky, potních kanálků, jater, genitálního traktu, nosní sliznice, ledvin a střev (Silbernagl and Lang, 2001). Defektní funkce transportéru způsobuje viskózní sekrece v epiteliálních tkáních (van der Deen et al., 2005).

ABCC8 (SUR1) a ABCC9 (SUR2) geny jsou blízce příbuzné (Bryan et al., 2007). ABCC8 je exprimován jako vysoce afinitní receptor pro sulfonylureu v membránách B-buněk pankreatu a řídí draselné kanály zapojené do modulované inzulínové sekrece. Mutace v ABCC8 je spojena s familiární perzistentní hyperinsulinemickou hypoglykemií dětství (Thomas et al., 1995). Je to autozomálně recesivní porucha, při které dochází k neregulované inzulínové sekreci (Darendeliler et al., 2002). SUR2 má nízkou afinitu pro sulfonylureu, je primární regulátor ATP-dependentních kaliových kanálů v kosterních svalech a srdci a stejně jako ABCC8 ovlivňuje inzulínovou sekreci (Bryan et al., 2007).

ABCC10 (MRP7) gen je exprimován ve všech tkáních (van der Deen et al., 2005) jako lipofilní aniontová pumpa. Je schopný transportovat estradiol(2)17 β -glukuronid (Kruh et al., 2007) a také bylo zjištěno, že je rezistentní k docetaxelu (Hopper-Borge et al., 2004). ABCC10 může rovněž hrát roli v apoptóze (Takayanagi et al., 2004).

4.4 ABCD genová podrodina

ABCD podrodina obsahuje čtyři geny (ABCD1, ABCD2, ABCD3 a ABCD4) kódující poloviční transportéry, které jsou umístěny v peroxisomech. Zde fungují jako homo- a/nebo heterodimery (Shani and Valle, 1998).

ABCD1 (ALDP) gen byl prvním savčím polovičním transportérem, který byl objeven (Mosser et al., 1993). Je důležitý pro regulaci transportu mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci (Shani and Valle, 1996). Mutace v tomto genu způsobují adrenoleukodystrofii vázanou na chromozom X (X-ALD). Je to těžká recesivní neurodegenerativní porucha charakterizovaná hlavně insuficiencí nadledvinek a progresivní demyelinizací centrálního nervového systému (McGuinness et al., 2003). Charakteristickým biochemickým znakem je akumulace nerozvětvených nasycených mastných kyselin s délkou řetězce 24-30 uhlíků, která je následkem defektu v jejich β -oxidaci uzavřené v peroxisomech. Mastné kyseliny se ukládají ve formě cholesterolových esterů v mozku a v kůře nadledvinek (Hettema and Tabak, 2000).

V peroxisomech jsou exprimovány i další tři členy podrodiny, ABCD2, ABCD3 a ABCD4, a rovněž jsou zapojeny do regulace mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci (Wanders et al., 2007). ABCD2 kóduje protein o délce 741 aminokyselin, který je exprimován zejména v mozku a nadledvinkách. Bylo také zjištěno, že ABCD2 hraje roli v oxidativním stresu (Lu et al., 2007). Zvýšená exprese nebo indukce ABCD2 nebo ABCD3 genu ve fibroblastech X-ALD pacientů částečně obnovuje poškozenou peroxisomální β -oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci (Braiterman et al., 1998). Přesné funkce ABCD2, ABCD3 a ABCD4 nejsou ještě známy (Wanders et al., 2007).

4.5 ABCE a ABCF genové podrodiny

ABCE a ABCF podrodiny obsahují proteiny, které mají ATP-vazebné domény, které jsou zřetelně odvozeny od jiných ABC transportérů, ale nemají žádnou transmembránovou doménu. Také není známo, zda jsou zapojeny do nějakých membránových transportních funkcí (Allikmets et al., 1996).

ABCE1 gen kóduje protein se dvěma ATP-vazebnými doménami (NBD). Zajímavé na struktuře proteinu je, že N-konec obsahuje Fe-S vazebnou doménu, která váže Fe-S klastr (Yarunin et al., 2005). Je cytosolicky exprimován ve všech tkáních jako mRNA. ABCE1 inhibuje RNase L protein, ribonukleázu, která je aktivována interferony, a proto se také nazývá RNase L inhibitor (RLI1) (Bisbal et al., 1995). Bylo rovněž zjištěno, že ABCE1 je nezbytný pro kompletaci nezralých lidských imunodeficientních virových kapsid, což naznačuje, že gen je součástí vrozené imunity (Zimmerman et al., 2002). Je velmi pravděpodobné, že ABCE1 má základní roli v procesu translační iniciace a biosyntézy ribozomů. Interaguje totiž s translačními iniciačními faktory, eIF2, eIF3, eIF5, 40S

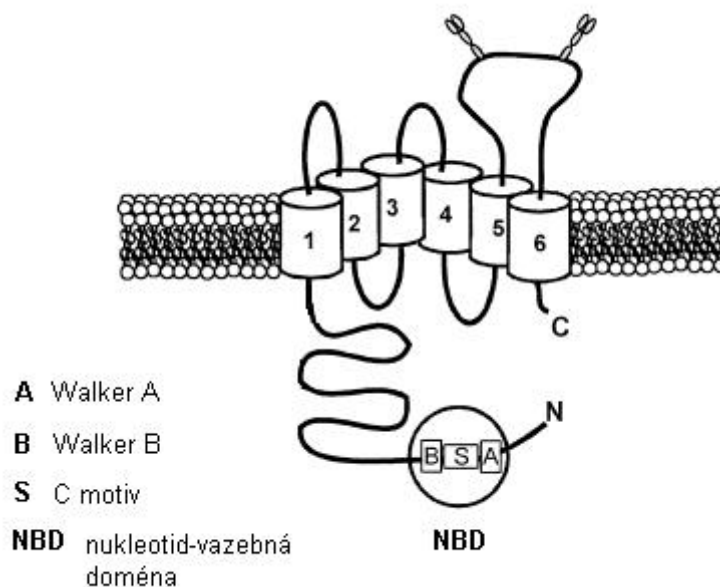
ribozomální podjednotkou a některými ribosomálními RNA (Chen et al., 2006).

Lidský genom obsahuje tři ABCF geny, které také cytosolicky exprimují proteiny s dvěma nukleotid-vazebnými doménami a žádnou TMD. ABCF1 protein může být regulován tumor nekrotickým faktorem α (TNF α) a hraje roli ve zvýšení proteinové syntézy a zánětlivém procesu (Richard et al., 1998). Dnes je také známo, že ABCF1 zprostředkovává aktivaci eIF-2a kinázy a tím hraje roli v translační iniciaci (Tyzack et al., 2000).

Funkce ABCF2 a ABCF3 jsou neznámé (Leprohon et al., 2006), ale předpokládá se, že ABCF2 protein je prognostický marker pro adenokarcinom vaječníku (Nishimura et al., 2007).

4.6 ABCG genová podrodina

Lidská ABCG podrodina se také nazývá „bílá“ podrodina podle ABCG1 genu, který je homolog *white* genu drozofily, jenž se spolu s dalšími geny účastní transportu prekurzorů očních pigmentů (tryptofan a guanin) v očních buňkách octomilky (Croop et al., 1997). Podrodina je složená ze šesti polovičních transportérů, které dimerizují za tvorby aktivních membránových transportérů. Na základě studií struktury proteinů bylo zjištěno, že mezi polovičními transportéry mají ABCG proteiny zvláštní doménovou organizaci, protože nukleotid-vazebná doména je na N-konci a je následovaná šesti transmembránovými doménami na C-konci (viz Obr. 12.) (Klein et al., 1999).



Obr. 12. Schéma struktury proteinu ABCG1 (převzato z Schmitz et al., 2001).

Savčí ABCG1 gen je nejintenzivněji studovaný člen této skupiny a je zapojen do transportu cholesterolu a fosfolipidů v makrofázích (Croop et al., 1997). Gen je indukován cholesterolem během cholesterolového influxu, který je zprostředkovaný acetylovaným LDL, v makrofázích odvozených od monocytů (Klucken et al., 2000).

Druhý dobře známý člen této podrodiny je ABCG2 gen. Je exprimován jako fosfoglykoprotein s molekulovou hmotností 95 kDa, který byl Doylem a kol. identifikován jako prsní nádorový rezistentní protein (BCRP) (Doyle et al., 1998), Allikmetsem a kol. jako placentární specifický ABC transportér (ABCP) (Allikmets et al., 1998) a Miyakem a kol. jako mitoxantron rezistentní protein (MXR) (Miyake et al., 1999). ABCG2 je přítomný v apikálních membránách mnoha tkání, nejvyšší hladiny jsou v placentárním syncytiotrofoblastu (Rocchi et al., 2000), dále v kanalikulární membráně hepatocytů, epiteliální výstelce tenkého střeva a tračníku, v mozku (Jonker et al., 2000), v srdečním svalu, endokrinních buňkách pankreatu (Doyle and Ross, 2003), v endoteliálních buňkách žil a kapilár a v kanálcích a lalůčcích prsní žlázy (Maliepaard et al., 2001). Hematopoetické kmenové buňky rovněž obsahují tento gen (Zhou et al., 2001). BCRP je přímá léková efluxní pumpa a má širokou substrátovou specifitu (anionické i kationické léky). Někdy se o něm mluví jako o xenobiotickém transportéru, který hraje velkou roli v ochraně lidských orgánů (Ross et al., 1999). Je také schopen transportovat steroidy (např. cholesterol, estradiol, progesteron, testosteron). Bylo zjištěno, že pro transport elektroneutrálních amfipatických léků nevyžaduje glutathion jako MRP1 (Mao and Unadkat, 2005). Fyziologická funkce není zatím přesně známá, ale je známo, že protein hraje důležitou roli v obraně plodu před toxickými látkami (Jonker et al., 2000), ve střevní absorpci a sekreci metabolitů a xenobiotik (Ebert et al. 2005), v sekreci sulfátových konjugátů do jater (Zamek-Gliszczyński et al., 2006) a v ochraně mozku před penetrací léků (Breedveld et al., 2005). Po mnoha studiích bylo zjištěno, že BCRP je zesílen a zvýšeně exprimován v lidských nádorových buňkách a že je schopný zprostředkovat lékovou rezistenci dokonce za absence klasických proteinů mnohočetné lékové rezistence MDR1 a MRP1 (Schmitz et al., 2001). ABCG2 udílí rezistenci k mitoxantronu, doxorubicinu, topotekanovým derivátům (Allen et al., 1999), bisantrenu, prazosinu (Litman et al., 2000), metothrexatu (Volk et al., 2002) a flavopiridolu (Robey et al., 2001).

ABCG3 transportér byl doposud nalezen pouze u hlodavců, kde je exprimován v hematopoetických buňkách (Mickley et al., 2001).

ABCG4 gen je exprimován hlavně v játrech a mozku, ale také v hematopoetických buňkách nebo v plicích (Yoshikawa et al., 2002). Přesná fyziologická funkce není přesně

známá, ale bylo zjištěno, že hraje roli v transportu cholesterolu z buněk k HDL (Vaughan and Oram, 2006).

ABCG5 a ABCG8 kódují sterolin-1 a sterolin-2. Oba geny jsou k sobě přilehlé v konfiguraci hlava k hlavě a jen 140 bází odděluje jejich dvě příslušná startovně transkripční místa (Lu et al., 2002). Vzhledem k tomu, že ABCG5 a ABCG8 jsou poloviční transportéry, tvoří dohromady funkční heterodimer (Remaley et al., 2002). Oba geny jsou exprimovány v apikálních membránách v játrech a tenkém střevě jako pumpy pro rostlinné steroly (Klett et al., 2004) a jsou indukovány cholesterolem (Berge et al., 2000). Mutace v těchto genech způsobují lidské onemocnění nazývané sitosterolemie (také známé jako fytosterolemie) (Lee et al., 2001), což je vzácná autozomálně recesivní dědičná metabolická porucha, která je charakterizovaná defektním transportem rostlinných a rybích sterolů a cholesterolu (Salen et al., 1997). Charakteristickým biochemickým rysem této nemoci jsou velmi vysoké hladiny rostlinných sterolů (sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol, avenosterol a jiné) a 5 α -nasyčený stanolů, zvláště sitostanolu, v plazmě. Cholesterolové hladiny v krvi mohou být normální nebo jen mírně zvýšené (Yu et al., 2002).

5 Měření genové exprese

V dnešní době je možné měřit expresi genů v jejich dvou hlavních fázích: v průběhu transkripce (tj. přepis DNA do RNA) a v průběhu translace (tj. tvorba proteinu nebo polypeptidu podle templátu mRNA) (Vondrejs, 2003).

Metody na úrovni transkripce sledují množství určitého transkriptu, který je přítomný ve studovaném vzorku v daném čase (Alberts et al., 2001). Je ale třeba brát na zřetel dvě omezení: za prvé množství určité molekuly mRNA v buňce je v daném okamžiku důsledek transkripční aktivity příslušného genu a také míra stability transkriptu, za druhé množství mRNA nemusí odpovídat množství jejího proteinového produktu, protože účinnost translace se může různě měnit (Šmarda et al., 2005).

V současné době používané metody pro sledování transkripce jsou Northern blotting, „RNase protection assay“, real-time RT-PCR (Dvořák et al., 2003) a metody založené na technologii DNA čipů („DNA microarrays“) (Chaudhuri, 2005).

Mnohé metody pro sledování translace a studium proteinů byly zavedeny dříve než metody pro sledování transkripce (Šmarda et al., 2005).

Pro detekci proteinů se obvykle využívají specifické protilátky (imunoglobuliny). Vznikají v tělech živočichů jako reakce na přítomnost antigenů (Šmarda et al., 2005). Pokud je injekčně vpraven antigen (protein) do těla laboratorního živočicha, dochází k tvorbě celé řady protilátek, které rozeznávají různé části tohoto antigenu. Ta oblast proteinu, která je rozeznávána protilátkou, se označuje jako epitop (Campbell and Reece, 2006).

Nejčastěji používanou metodou pro sledování genové exprese na úrovni translace je Western blotting (Zima, 2002). Proteiny jsou rozděleny polyakrylamidovou gelovou elektroforézou, přeneseny na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu pomocí elektrického pole a nakonec jsou sledované proteiny specificky zviditelněny protilátkami (Clark, 2005).

Dále můžeme pro sledování exprese genů na proteinové úrovni použít tzv. proteinové mikročipy („microarrays“). Na skleněné destičce jsou imobilizovány protilátky, které specificky zachycují cílový protein ze vzorku. Následně jsou zachycené proteiny detekovány laserem a kvantifikovány (Chaudhuri, 2005).

Vzhledem k tomu, že metody na úrovni transkripce i translace jsou různě citlivé a náročné, je třeba studovat expresi genů na obou úrovních. Tím docílíme vyšší přesnosti získaných výsledků (Šmarda et al., 2005).

5.1 Izolace mRNA

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě. Je to jeden ze stěžejních kroků, protože špatně provedená izolace značně sníží kvalitu sledované mRNA (Rosypal et al., 2002). Navíc molekuly mRNA jsou mnohem méně stabilní než molekuly DNA, takže izolace je značně náročnější a vyžaduje přísnější podmínky (Šmarda et al., 2005). Vzorek může být kontaminován např. různými proteiny, které by mohly ovlivnit výsledky následně prováděné kvantifikační metody (Rosypal et al., 2002).

Zpravidla se nejvíce používají dvě metody, od kterých jsou odvozeny další techniky. První metodou je izolace na kolonkách. Principem je vazba molekul mRNA na silikagelový sorbent v chromatografických kolonkách. Nukleové kyseliny izolované touto technikou mají vysoký stupeň čistoty (Šmarda et al., 2005). Druhou je fázově separační metoda, kterou v roce 1987 představili Chomczynski a Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Je založená na extrakci vzorku směsí fenol-chloroform v poměru 1:1, následném oddělení organické a vodné fáze a vysrážení nukleových kyselin ethanolem nebo isopropanolem (Rosypal et al., 2002).

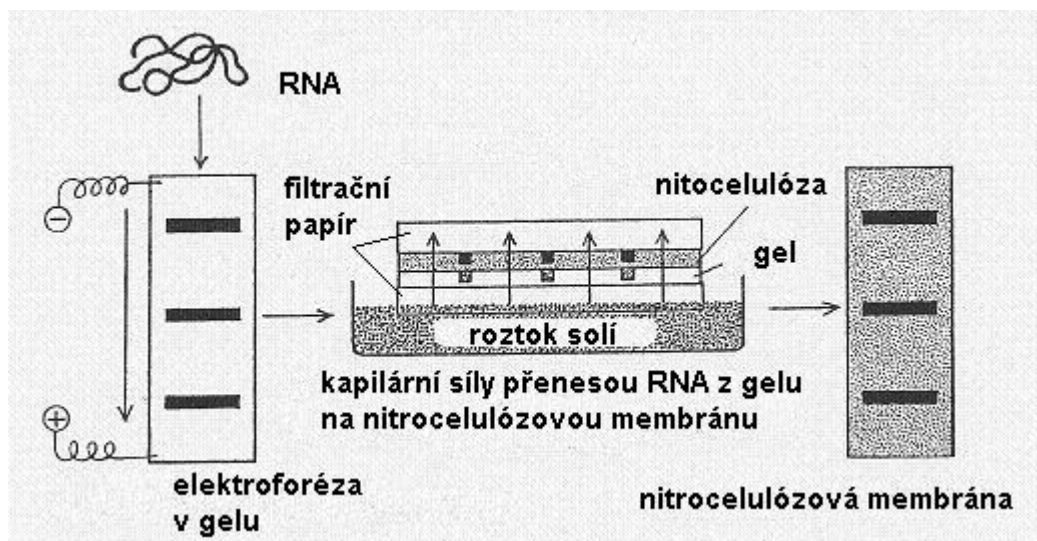
5.2 Metody sledování genové exprese na úrovni transkripce

5.2.1 Northern blotting

Klasická metoda používaná k detekci a kvantifikaci specifické mRNA je Northern blotting, který byl objeven Johnem Alwinem a Georgem Starkem jako obměna Southern blottingu (Alwine et al, 1979). Metoda je založená na elektroforetické separaci RNA, přenosu mRNA na pevný nosič a určení velikosti a kvantitativního zastoupení určité mRNA pomocí specifické hybridizační sondy (Raval, 1994).

V první řadě u Northern blottingu je třeba provést denaturaci RNA, které se dosáhne tím, že se RNA smíchá s formaldehydem nebo močovinou. Celá směs se pak zahřeje na teplotu 50–55°C a převede se na agarózový gel, na kterém jsou elektroforeticky separovány molekuly RNA (Vondrejs et al., 2003). Doba elektroforézy je od 1 až do 6 hodin v závislosti na velikosti gelu (Dvořák et al, 2003). Po této operaci následuje nejdůležitější část – přenos mRNA z gelu na nitrocelulósovou nebo nylonovou membránu pomocí kapilárních sil (Chomczynski, 1992). To provedeme tak, že do misky s roztokem solí o vysoké iontové síle vložíme podložku, na ni silnou vrstvu filtračního papíru, jehož konce jsou ponořeny

v roztoku. Na filtrační papír dáme gel, který překryjeme membránou. Na ni položíme několik vrstev navlhčeného filtračního papíru, destičku a asi 0,5-1,0 kg závaží. Přenos RNA na membránu trvá obvykle 2 hodiny (Vondrejs, 2003), ale neškodí, když se počká přes noc (Dvořák et al., 2003). Molekuly se na membráně zachytí buď pomocí adsorpce nebo pomocí nekovalentních vazeb (Obr. 13.). Aby se molekuly mRNA lépe přichytily k membráně, je mRNA fixována buď pomocí UV záření či je sušena ve vakuu (Vondrejs, 2003). Po této úpravě lze membránu přímo použít nebo je možné ji vložit do plastového obalu, ve kterém může být až několik měsíců skladována. V posledním kroku se dělá hybridizace mRNA pomocí specificky značených cDNA sond, které jsou komplementární k mRNA a tvoří dvouřetězcovou RNA-DNA strukturu. Sondy mohou být značeny pomocí radioaktivních izotopů ^{32}P nebo pomocí fluorescenčních barviv (Dvořák et al, 2003).



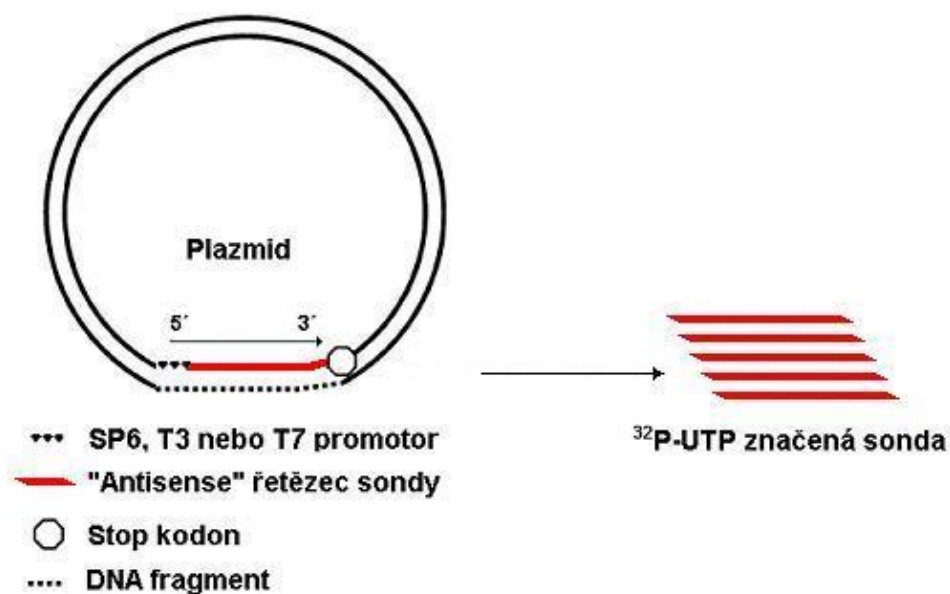
Obr. 13. Princip Northern blottingu s použitím nitrocelulózové membrány (převzato z Červinka, 1993).

Vědci si oblíbili tuto metodu pro svou jednoduchost, nízké finanční náklady a celkem vysokou specifitu (Dvořák et al, 2003). Má ale i své nevýhody, kterými jsou hlavně nižší citlivost oproti ostatním metodám, požadavek většího množství mRNA k provedení analýzy (Šmarda et al., 2005), práce s nebezpečnými látkami (formaldehyd) a s radioaktivními sondami (Dvořák et al, 2003). Také přesnost stanovení je snižována kvůli nedokonalému přenosu na membránu (Vondrejs, 2003).

5.2.2 RNase protection assay

Pro kvantifikaci můžeme také použít tzv. „RNase protection assay“ (RPA), někdy překládanou jako test ochrany před účinkem ribonukleázy (RNázy) (Šmarda et al., 2006). Na rozdíl od Northern blottingu se provádí hybridizace přímo v roztoku. Díky tomu identifikujeme určité molekuly RNA ze směsi různých molekul RNA izolovaných z daného biologického vzorku (Rottman, 2002).

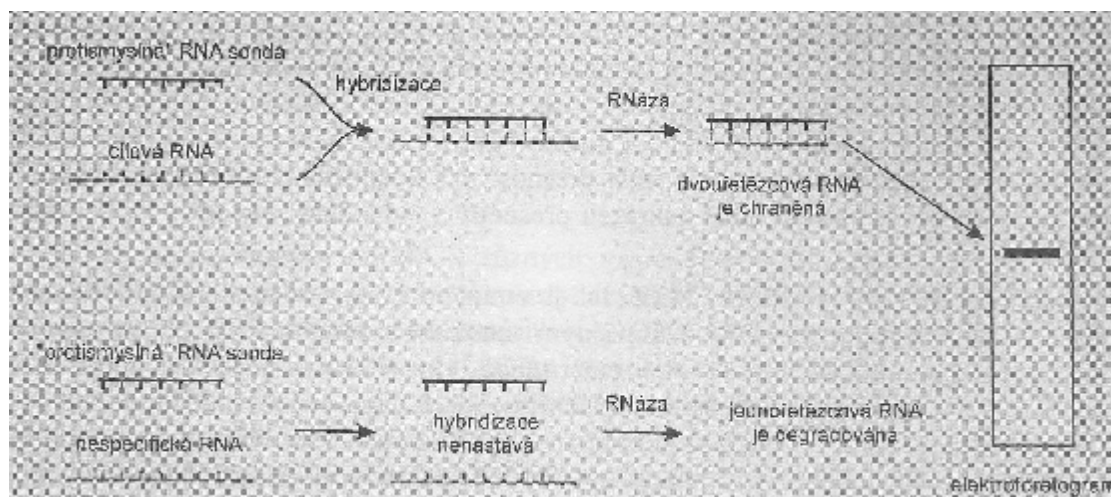
K hybridizaci se používají značené jednořetězcové RNA sondy, kterou jsou „antisense“ (opačně kódované) k cílové mRNA, která je detekována (Moore, 2006). Sondy se získávají tak, že se nejprve DNA fragment (obvykle 200-450 bází), který kóduje část cílové mRNA, vloží do plazmidu mezi SP6, T3 nebo T7 promotor a stop kodon. Potom přidáme DNA dependentní RNA polymerázu (SP6, T3 nebo T7), nukleotidy (ATP, GTP, TTP, UTP) a radioaktivně značený uracil (^{32}P -UTP). RNA polymeráza se naváže na SP6, T3 nebo T7 promotor a začíná přepis DNA fragmentu ve směru 5'→3' na „antisense“ jednořetězcovou RNA, přičemž je inkorporován ^{32}P -UTP (Obr. 14.) (Rottman, 2002). Po transkripci následuje čištění sondy – extrakce/precipitace, elektroforéza a extrakce z akrylamidového gelu a precipitace (Dvořák et al., 2003).



Obr. 14. Syntéza sondy pro RNase protection assay (převzato z Rottman, 2002).

K našemu vzorku mRNA molekul, které jsou izolované z buněk, přidáme sondy a necháme přes noc hybridizovat, až se vytvoří dvouřetězcové RNA pouze mezi sondou a komplementární hledanou sekvencí (Moore, 2006). Nespecifické molekuly mRNA zůstanou

v jednořetězcové podobě. Pak následuje inkubace s RNázami A a T1, které štěpí pouze jednořetězcové RNA, dvouřetězcové hybridní molekuly RNA jsou před účinkem RNáz chráněny (Obr. 15.) (Rottman, 2002).



Obr. 15. Průběh „RNase protection assay“ (převzato z Šmarda et al., 2005).

Po skončení štěpení RNázou se hybridizační směs nanese na polyakrylamidový gel, který se po elektroforéze vysuší a přiloží k citlivé vrstvě filmu, kde se zviditelní přítomnost značené sondy navázané na cílovou sekvenci. Nakonec se provede autoradiografická detekce (Dvořák et al., 2003).

Je to ekonomicky náročná metoda, vyžaduje zkušené pracovníky, příprava sond je pracná a pracuje se radioaktivními látkami, ale i přesto je vědci pro svou vysokou specifitu a citlivost hodně používaná (Rottman, 2002).

5.2.3 Real-time reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce

Další metoda, která slouží k detekci a kvantifikaci mRNA, je v dnešní době hojně používaná a rozšířená real-time reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Její princip spočívá v reverzní transkripci mRNA na cDNA, která je následně amplifikována v polymerázové řetězové reakci (PCR). V celém průběhu PCR je kontinuálně zaznamenáváno množství cílové sekvence (de Mello-Coelho and Hess, 2005).

PCR byla objevena v 80. letech 20. století Karlem B. Mullisem a jeho spolupracovníky v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii, tento objev znamenal v molekulární biologii skutečný převrat (Saiki et al., 1988, Shutzbank et al., 1993, White et al., 1992). Karl B. Mullis za tento objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Kubista

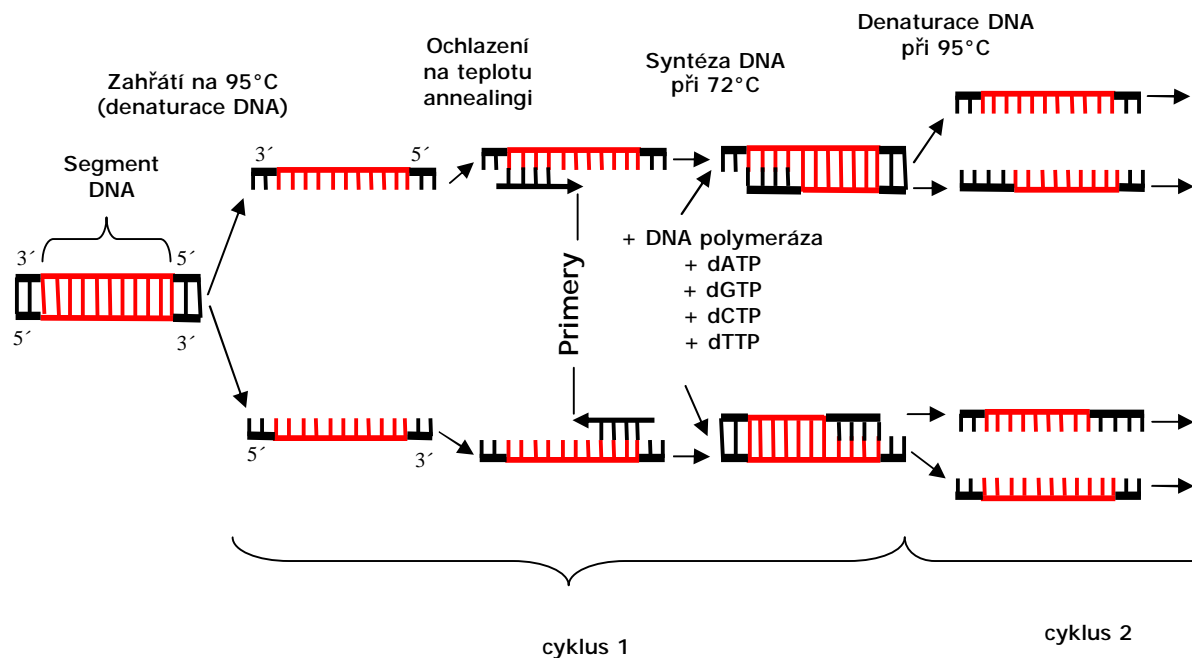
et al., 2006). PCR je opakující se enzymatická syntéza mnoha kopií nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA *in vitro* ve směru 5'→3' pomocí DNA polymerázy. Reakce má tři teplotní fáze (Saiki et al., 1988).

Pro PCR není třeba znát celou nukleotidovou sekvenci cílové DNA, ale musí být známy alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích amplifikované DNA. Na jejich základě se připraví symetrické primery, obvykle 20-30 nukleotidů dlouhé, které jsou komplementární k sekvencím na obou vláknech DNA. Primery nemohou být mezi sebou komplementární, zvláště v 3' konci, protože překrytím dvou nebo tří bazí může dojít ke vzniku dimeru primerů, nežádoucího produktu PCR (Bustin, 2002). Syntéza nových řetězců DNA je katalyzována enzymem DNA polymerázou. Vzhledem k tomu, že během reakce dochází k inkubacím při vysokých teplotách (90-95°C) a cykly se opakují, využívá se termostabilních DNA polymeráz (např. *Taq* z termostabilní bakterie *Thermus aquaticus* nebo *Tht* z *Thermus thermophilus*), což má velkou výhodu, protože není potřeba po každém cyklu přidávat čerstvý enzym (Steitz, 1999). Samozřejmě k syntéze jsou nezbytné všechny čtyři deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) jako stavební kameny DNA. Celá reakce musí běžet v optimálním prostředí, které zajišťuje speciální pufr (Vondrejs, 2001).

V prvním kroku je dvouřetězcová DNA (dsDNA) při teplotě 94 až 95°C denaturována, dochází tedy k disociaci fragmentů dsDNA na dvě templátové jednořetězcové molekuly DNA (ssDNA). Ve druhém kroku tzv. „annealingu“ se teplota sníží na 50 až 65°C, aby se mohl primer navázat na komplementární sekvenci templátové ssDNA. V posledním kroku se teplota opět zvýší na 70 až 80°C a nastává vlastní syntéza nových řetězců (tzv. amplikonů) katalyzovaná DNA polymerázou od 5'-konce, kde je navázán primer. Poté se reakční směs opět zahřeje na 90 až 95°C a celý cyklus se opakuje. Průběh reakce je znázorněn na Obr. 16. (Šmarda et al., 2005).

Po prvním cyklu jsou z molekuly DNA vytvořeny 2 nové amplikony, po druhém jsou už 4, po třetím 8 atd. Počet amplifikované DNA se tedy teoreticky zvětšuje geometrickou řadou – 2ⁿ kopií. Zpravidla k získání dostatečného množství amplifikované DNA stačí 20–40 cyklů, které vytvoří milion až bilion kopií vzorku (Šmarda et al., 2005). Délka cyklu závisí především na délce amplifikované sekvence. U real-time PCR jeden cyklus trvá 1–2 minuty a celá analýza s 50 cykly je hotová cca za 2 hodiny (Holasová et al., 2006).

Celá reakce probíhá v termocykléru, který automaticky mění a udržuje teplotu pomocí tzv. Peltierových článků nebo prouděním ohřátého vzduchu podle určitého časového rozvrhu (Valasek and Repa, 2005).



Obr. 16. Schéma polymerázové řetězové reakce (PCR) (převzato z Nečas et al., 2000).

Lze si všimnout, že pro PCR se užívá DNA. Aby mRNA mohla být kvantifikována pomocí PCR, je třeba ji na DNA převést. Bylo zjištěno, že retroviry běžně používají enzymy, tzv. reverzní transkriptázy, které jsou schopné z virové RNA vytvořit DNA. Této vlastnosti reverzních transkriptáz se využívá i v RT-PCR. Z mRNA se tak získá cDNA, která je pak pomocí PCR jednoduše amplifikována. Toho také využil Lyn M. Powell se svými kolegy a v roce 1987 představil kombinaci reverzní transkripce (RT) a PCR jako jedné techniky – RT-PCR (Powell et al, 1987).

Reverzní transkriptázou používanou při RT je např. AMV reverzní transkriptáza z viru ptačí myeloblastózy a M-MuLV reverzní transkriptáza (z Moloneyho myšního leukemického viru) produkovaná jako rekombinantní protein z *E. coli*. Tyto enzymy jsou funkční při teplotách kolem 40 až 50°C. Pro reverzní transkripci se také využívají termostabilní geneticky modifikované reverzní transkriptázy, které dobře snáší i teploty kolem 70 °C. Při těchto teplotách dochází k rušení sekundárních struktur RNA (vláseček). Tyto enzymy se ale pro běžné kvantifikační účely nepoužívají (Valasek and Repa, 2005).

Aby RT mohla proběhnout, musí se použít primer pro mRNA (Zhang and Byrne, 1999). Používají se buď specifické oligonukleotidy pro syntézu vybrané určité mRNA, nebo směs náhodných hexamerů, nebo primery oligo-dT (Ståhlberg et al., 2004).

Podle způsobu kombinace RT a PCR můžeme rozlišit tři typy uspořádání RT-PCR: (1) dvoustupňová RT-PCR ve dvou zkumavkách, kdy RT proběhne v jedné zkumavce a pak se

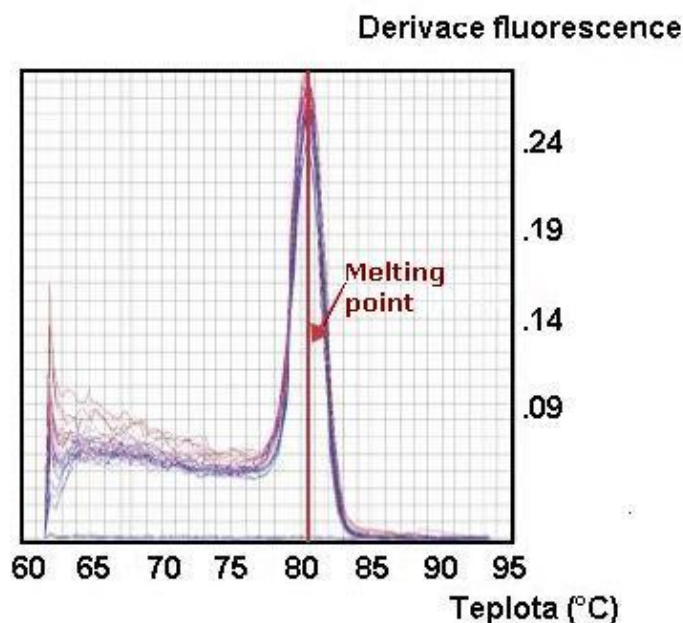
část směsi s cDNA přemístí do druhé zkumavky, kde proběhne PCR, (2) dvoustupňová v jedné zkumavce, kdy nejdříve proběhne RT a poté se přidá termostabilní polymeráza a specifické primery pro PCR, a (3) jednostupňová v jedné zkumavce, kdy se do jedné zkumavky dají všechny substráty (Bustin, 2002).

Už víme, jak funguje RT-PCR, teď je třeba ještě vysvětlit, jakým způsobem je možné kvantifikovat amplikony v reálném čase. Základním principem je použití fluorescenčních barviv, jejichž fluorescence je detekována pomocí speciálních zařízení. Metody detekce můžeme rozdělit na tzv. nespecifické a sekvenčně specifické (Vonderjans, 2001).

Nespecifické metody využívají interkalačních barviv, např. SYBR Green I nebo ethidium bromid (Deprez et al., 2002). V roztoku volné molekuly těchto barviv fluorescenci nevydávají nebo jen velmi nízkou. Za přítomnosti DNA dochází k vmezezení molekul barviva do DNA a k výraznému vzrůstu fluorescence. Princip metody je na Obr. 17. (Bustin and Nolan, 2004). Nevýhoda je, že touto metodou nelze rozlišit případnou přítomnost nespecifických produktů PCR a tzv. dimerů primerů. Proto se u této metody ještě zjišťuje teplota tání produktu (T_m). Pokud na grafu dostaneme jednu hodnotu zobrazenou jako úzký ostrý pík, je možné provést vlastní hodnocení pro kvantifikovanou mRNA (Obr. 18.). Jestliže dostaneme více T_m hodnot a píky jsou širší, pak jsou přítomny nespecifické produkty a hodnocení není možné, protože by bylo zatížené velkou chybou, nebo vůbec není proveditelné (Valasek and Repa, 2005).



Obr. 17. Fluorescenční barvivo, které se interkaluje do dvoušroubovice DNA (převzato z Šmarda et al., 2005).



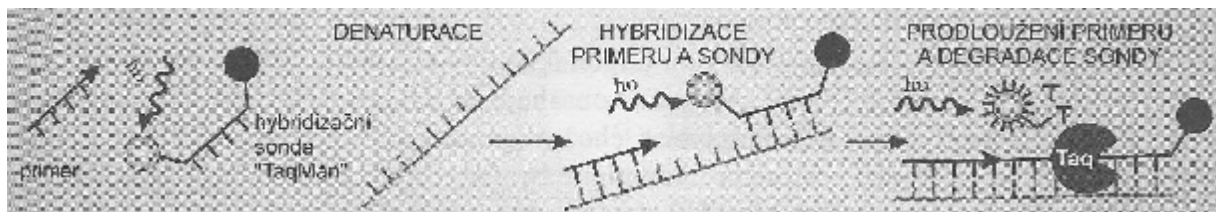
Obr. 18. Křivka teploty tání (převzato z Valasek and Repa, 2005).

Pro zvýšení specifity reakce a detekování pouze specifického signálu můžeme použít sekvenčně specifických sond. Existuje mnoho systémů, z nichž asi nejpoužívanější jsou ty, které jsou založeny na principu přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET) (Holasová et al, 2006). FRET je interakce mezi excitovanými stavy dvou molekul a je závislá na vzdálenosti, při které dojde k přenosu excitace z jedné molekuly (tzv. dárce, donoru) na druhou (tzv. příjemce, akceptor), přičemž nedojde k emisi fotonů (Valasek and Repa, 2005). Aby k FRET mohlo dojít, je potřebná těsná blízkost mezi molekulou dárce a příjemce a absorpční spektrum molekuly příjemce se musí překrývat s emisním spektrem molekuly dárce. Většinou jsou molekuly dárce i příjemce odlišné a FRET je detekován jako vznik fluorescence příjemce nebo zhášení fluorescence dárce. Jako příjemce můžeme také použít nefluorescenční molekuly, které se nazývají quencher (neboli zhášedce). Tímto lze odstranit problém fluorescence pozadí, která je emitována molekulou příjemce, aniž dojde k excitaci (Mackay and Landt, 2007).

Můžeme si vybrat z velkého množství metod, které jsou založeny na principu sekvenčně specifických sond. Nejpoužívanější metodou jsou tzv. hydrolyzační sondy, ale vědci se neustále zabývají rozvojem nových metod, které by zlepšily detekci (Holasová et al, 2006). Mezi takové metody patří např. molekuly Scorpions nebo univerzální primery Amplifluor (Šmarda et al., 2005).

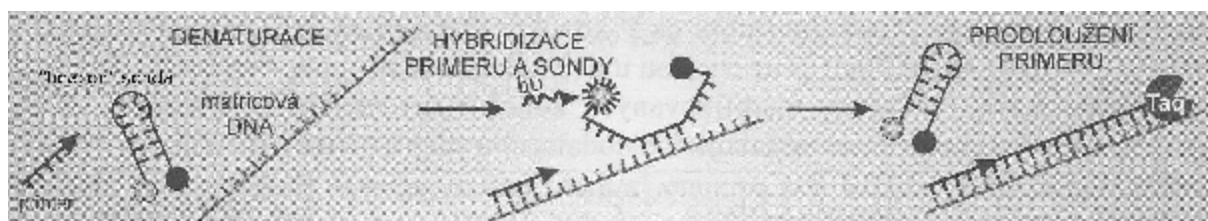
Většina termostabilních polymeráz používaných při PCR má 5'→3' exonukleázovou aktivitu, která umožňuje hydrolyzovat jakýkoli řetězec komplementární k templátovému

řetězci, když syntetizuje nový (dá se říct, že „odstraní vše, co jí stojí v cestě“). Tohoto principu se využívá u hydrolyzačních sond, známých také jako TaqMan (Yesilkaya et al., 2006). Sondu tvoří krátký oligonukleotid, který je komplementární k jednomu z řetězců templátu. Na 5' konci má fluorescenční barvivo (fluorofor) a na 3' konci je zhášec (quencher). V průběhu PCR tedy díky DNA polymeráze dojde k rozložení sondy, molekula fluoroforu a zhášeče se oddělí a dojde ke vzrůstu fluorescence (Obr. 19.) (Šmarda et al., 2005). Vzdálenost mezi molekulou fluoroforu a zhášeče je obvykle 20–35 nukleotidů. Kdyby byla sonda lineární, byla by to příliš velká vzdálenost, aby mohlo dojít k jevu FRET. K použití tohoto principu u hydrolyzačních sond se využívá skutečnosti, že většina sekvencí oligonukleotidů je v roztoku přítomna v konformaci tzv. náhodného klubka (random coil). V této konformaci jsou obě molekuly již v dostatečné vzdálenosti a FRET můžeme efektivně využít. I toto má ale jeden nedostatek. Konformace je totiž náhodná, závisí na sekvenci a to má za následek, že FRET není zcela efektivní a je vždy přítomna fluorescence pozadí, která je u různých sond velmi rozdílná (Mackay and Landt, 2007).



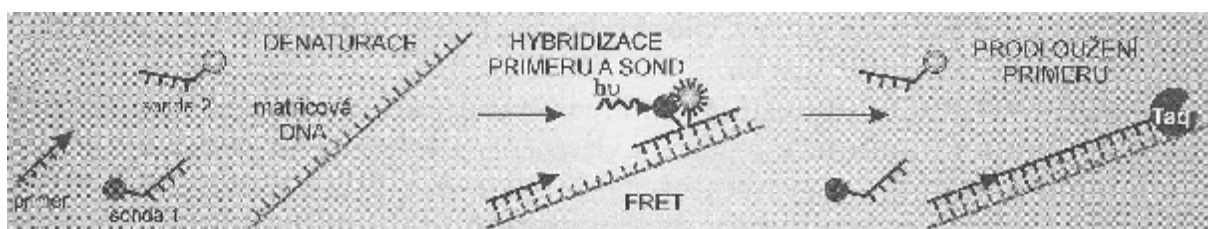
Obr. 19. Princip hydrolyzačních sond (TaqMan) (převzato z Šmarda et al., 2005).

Zajímavou metodou, která částečně odstraňuje problém fluorescence pozadí, jsou tzv. sondy „beacon“ (Molecular Beacons). Jsou to oligonukleotidy, které jako volné tvoří sekundární strukturu vlásenky, která se skládá ze dvou částí. Středová část je komplementární k části amplikonu a na obou koncích má vzájemně komplementární krátké sekvence, které nejsou homologické k cílové molekule. Tyto krátké sekvence mají na jednom konci připojený fluorofor, na druhém zhášec. Díky tomu opět dochází k FRET (Goel et al, 2005). Když je přítomen specifický amplikon, sonda v průběhu fáze „annealingu“ hybridizuje se svou komplementární sekvencí, dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče a sonda po excitaci vydává intenzivní fluorescenci (Obr. 20.) (Yesilkaya et al., 2006).



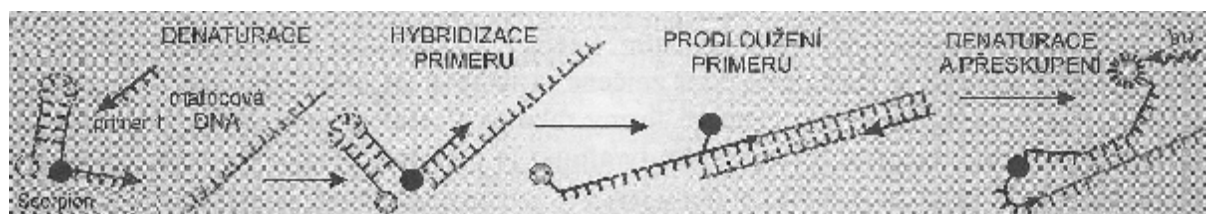
Obr. 20. Princip „beacon“ sond (převzato z Šmarda et al., 2005).

Můžeme rovněž použít dvojici jednoduše značených sond, které se označují také jako FRET sondy. Obě sondy jsou značeny rozdílnými fluorofory, jedna na 3' konci, druhá na 5' konci. Vzdálenost mezi oběma sondami je taková, aby umožňovala efektivní FRET (většinou 1-5 bází). Ve fázi „annealingu“ dojde k navázání obou sond do těsné blízkosti na templát a fluorofor druhé sondy je excitován zářením prvního fluoroforu. Při měření se detekuje nárůst fluorescence druhého fluoroforu (Obr. 21.) (Yesilkaya et al., 2006).



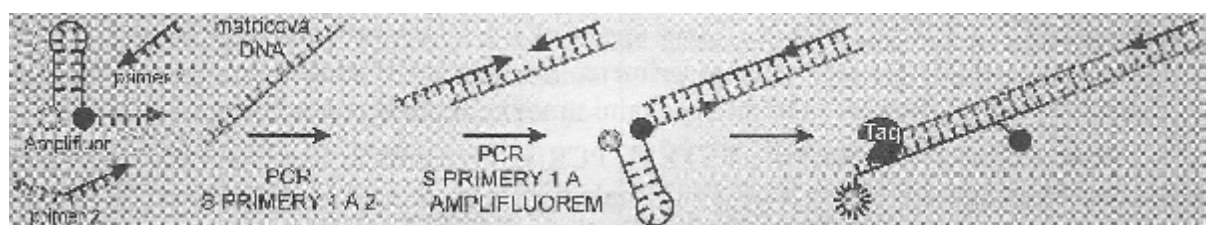
Obr. 21. Princip použití dvojice jednoduše značených sond (převzato z Šmarda et al., 2005).

Měli bychom se také zmínit o molekulách Scorpion. Jsou to oligonukleotidy, které obsahují PCR-primer navázaný k hybridizační sondě. Na 5'-konci obsahují flourofor, který interaguje se zhášecem vázaným na střední část stejného oligonukleotidu nebo na 3'-konec druhého komplementárního oligonukleotidu. Na základě vázání zhášече můžeme molekuly Scorpions rozdělit na monomolekulární a bimolekulární (Yesilkaya et al., 2006). Po dokončení cyklu PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení „škorpiónu“ kvůli tomu, že sonda hybridizuje s cílovou sekvencí. Díky tomu je fluorofor oddělen od zhášече a dojde ke zvýšení fluorescence. Při pohledu na Obr. 22. nám může být jasné, proč tyto sondy dostaly název Scorpions. Při intramolekulárním přeskupení svým tvarem připomínají škorpióna (Bustin, 2002).



Obr. 22. Princip molekul Scorpions (převzato z Šmarda et al., 2005).

Poslední metodu, kterou si zmíníme, jsou univerzální primery Amplifluor. Tato technologie je založená na inkorporaci fluorescenčně značeného primeru, který má vlásenkovou strukturu, do produktu PCR. Kromě univerzálního primeru potřebujeme ještě primer 1 (plně komplementární s krajem amplifikované sekvence) a primer 2 (obsahuje 3'koniec a tzv. nástavec Z, který je komplementární k prodlouženému ramenu vlásenky univerzálního primeru). Fluorescenční signál je tvořen pouze tehdy, je-li porušena sekundární struktura primeru, když je syntetizován druhý řetězec PCR produktu. Dojde totiž k oddělení fluoroforu na 5'konci primeru od zhášedce vázaného ve střední části sondy (Obr. 23.) (Bengra et al., 2002). Tyto sondy pracují s různými PCR primery, což má velkou výhodu, hlavně finanční, protože není třeba připravovat pro každou cílovou sekvenci novou sekvenci specifickou sondu (Šmarda et al., 2005).

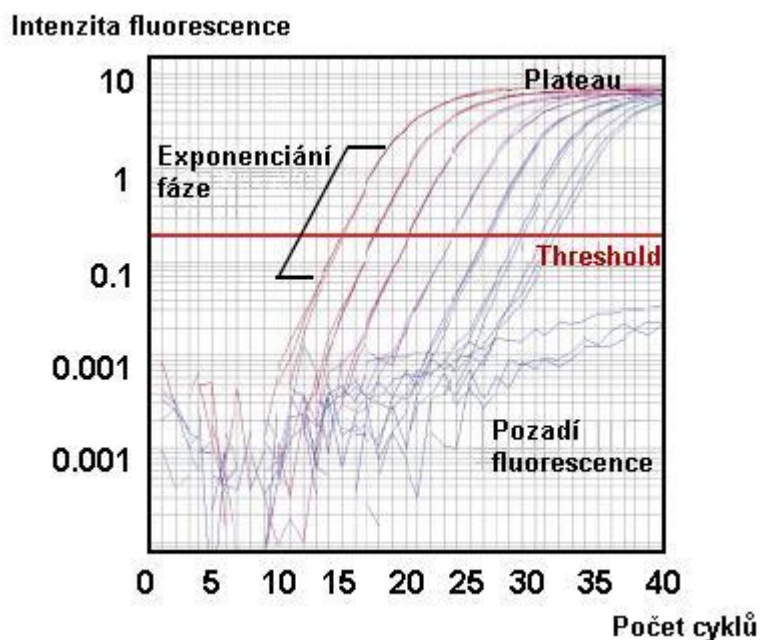


Obr. 23. Princip univerzálních primerů Amplifluor (převzato z Šmarda et al., 2005).

Ještě by bylo dobré říct pár slov, která fluorescenční barviva se používají pro detekci. Z fluoroforů to jsou nejčastěji fluorescein, hexachlorofluorescein, cyaninová barviva Cy3 a Cy5, rhodamin a další speciální barviva, jako je Oregon Green nebo LihtCycler Red (Bustin and Nolan, 2004). Jako zhášedce se používají např. dabcy, dabcy, „black hole quencher“ (BHQ) molekuly nebo barvivo TAMRA (Bustin, 2002). Podle použití různých fluorescenčních barviv, které se liší emisním spektrem, je možné provádět multiplexní reakce, což má tu výhodu, že v jedné zkumavce můžeme amplifikovat, detekovat a kvantifikovat několik různých sekvencí DNA najednou (Valasek and Repa, 2005).

K tomu, aby real-time RT-PCR vůbec proběhla, potřebujeme speciální přístroje, kterých je v dnešní době celá řada. Základní sestavení je pro všechny stejné: termocykler, přístroj dodávající energii pro fluorofory a detektor (Bustin, 2004). O termocykleru jsme se zmínili už výše, je však třeba si říct něco k dalším částem přístroje. Aby došlo k fluorescenci, musíme dodat fluoroforu excitační energii. K tomu můžeme použít tři typy přístrojů. Jsou to lampy (např. halogenová žárovka), světelné diody (LED) a lasery. Lamy mají široké spektrum záření, LED a lasery jsou naopak s úzkým spektrem. Detektory nám umožní sběr dat emisní energie, která je vyzařována fluoroforem a která musí mít určitou vlnovou délku. Nejběžněji používané jsou CCD kamery a fotonásobiče. Často je třeba použít ještě filtry nebo kanály, které nám zajistí, že do detektoru vstoupí pouze požadovaná vlnová délka nebo délky (Valasek and Repa, 2005).

Je samozřejmě nezbytné, aby byl přístroj pro real-time RT-PCR propojen s počítačem, který je díky speciálnímu programu schopen všechna získaná data vyhodnocovat. Na základě detekované fluorescence, která odráží kinetiku reakce, nám počítač poskytne grafický průběh PCR reakce, tzv. amplifikační křivku (Obr. 24.). Má klasický sigmoidální tvar a lze z ní jednoduše odvodit množství templátu na začátku reakce (Valasek and Repa, 2005). Křivka má čtyři charakteristické fáze: první fáze je skryta za pozadím fluorescence, druhá je exponenciální, třetí je lineární a čtvrtá je plateau, kdy dochází k útlumu rychlosti PCR (Bustin, 2004). Křivka nám umožní určit „čas cyklu“, ve kterém fluorescence dosáhne threshold (prahové) hladiny (threshold cycle - Ct). Tato Ct hodnota je nepřímo úměrná množství sekvence nukleové kyseliny ze vzorku a je využívána pro kvantifikaci, na základě které můžeme určit expresi genu. Je třeba se zmínit, že kvantifikace může být absolutní nebo relativní (Valasek and Repa, 2005). Absolutní kvantifikace měří aktuální počet kopií nukleové kyseliny v daném vzorku. Neznámý vzorek je srovnáván s kalibrační křivkou, která je sestavena na základě známých koncentrací DNA molekul standardu (např. rekombinantní plazmidová nebo genomická DNA). Naproti tomu relativní kvantifikace určuje změny v ustálené hladině sledovaného genu v porovnání s hladinou referenčního genu, který zde slouží jako vnitřní kontrola (Bustin, 2004). „Housekeepingové“ geny (např. GAPDH, albumin, β -aktin, 18S rRNA) jsou běžně používané jako referenční geny, protože jsou přítomny ve všech typech buněk a očekává se od nich, že při experimentech nebudou měnit své vlastnosti (Huggett et al., 2005).



Obr. 24. Grafický průběh PCR (převzato z Valášek and Repa, 2005).

V dnešní době je real-time RT-PCR díky jednoduchosti, vysoké citlivosti a výkonnosti jednou z nejpoužívanějších metod k detekci a kvantifikaci mRNA. Její hlavní nevýhodou je vysoká cena (Dvořák et al, 2003).

5.2.4 Další metody kvantifikace založené na PCR

Kromě real-time RT-PCR můžeme nukleové kyseliny také kvantifikovat pomocí kompetitivní a komparativní PCR. Jsou to tzv. end-point metody, u kterých provádíme měření až po skončení PCR. Denzitometricky se kvantifikují produkty specifické délky po rozdělení na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Dnes už patří kompetitivní a komparativní PCR mezi starší metody, které se méně užívají. Obě využívají standard o známé koncentraci (tj. sekvenci) (Holasová et al, 2006, Vondrejs, 2001). Kompetitivní PCR (neboli soutěživá) využívá vnitřního standardu, který se amplifikuje zároveň s cílovou sekvencí pomocí stejných primerů. Musí mít ale jinou délku nebo se lišit restričním místem oproti cílové sekvenci (Diviacco et al., 1992). U komparativní PCR (neboli srovnávací) se porovnávají koncentrace cílového amplikonu s kalibrační křivkou standardu, který ale nemá společné primery s cílovou sekvencí, a proto může být amplifikován společně nebo paralelně (Holasová et al, 2006).

5.2.5 Microarray – biočipy

Významným pomocníkem při kvantifikování genové exprese se stala cDNA microarray technologie. Také se užívá označení cDNA čipy nebo biočipy. cDNA čip je tvořen neznačenými specifickými fragmenty (sondami), které jsou kovalentně připevněny k pevnému nosiči a ty jsou pak hybridizovány se značenou cílovou molekulou jak testovaného, tak kontrolního vzorku (Schena et al., 1995). Jejich výhodou je, že můžeme analyzovat velký počet genů současně. Mají ale několik omezení. Jedním je, že nemohou kvantifikovat velké množství vzorků jako real-time RT-PCR (Bueno Filho et al., 2006). Další omezení je, že tato metoda má nižší přesnost kvantifikace, a proto je nutné si výsledky pomocí RT-PCR ověřit (de Mello-Coelho and Hess, 2005).

K přípravě cDNA čipů se používají cDNA sondy, které reprezentují část nebo celý genom daného organismu a jsou imobilizovány buď na skleněných destičkách, nebo nylonových membránách. Aby byly vazby sond k nosičům pevnější, je třeba, abychom nejdříve zvýšily jejich hydrofóbní náboje (White and Salamonsen, 2005).

Poté následuje nanášení sond ve formě teček (spotů). Proces nanášení je proto označován „spotting“. Existují tři základní techniky. První je syntéza přímo na místě a je to nejnáročnější technika (Chaudhuri, 2005). Druhou je tzv. nekontaktní technologie neboli ink-jet. Principem je, že se z roztoku dané sondy pomocí piezoelektrického krystalu vytvoří maličká kapka, která je bez dotyku přenesena na cDNA čip. Jsou tvořeny homogenní spoty, což je výhodou, ale proces je značně pomalý (Šášik et al., 2004). Poslední technologie je tzv. kontaktní. Používají se jehly, které jsou namáčeny do roztoku sondy a poté přenesou sondu na dané místo dotykem na nosič. Zde je výhodou rychlost a jednoduchost, ale není zajištěna taková homogenita jako u bezdotykových technologií (Chaudhuri, 2005). Spotting se provádí speciálními robotickými přístroji (Walsh and Henderson, 2004).

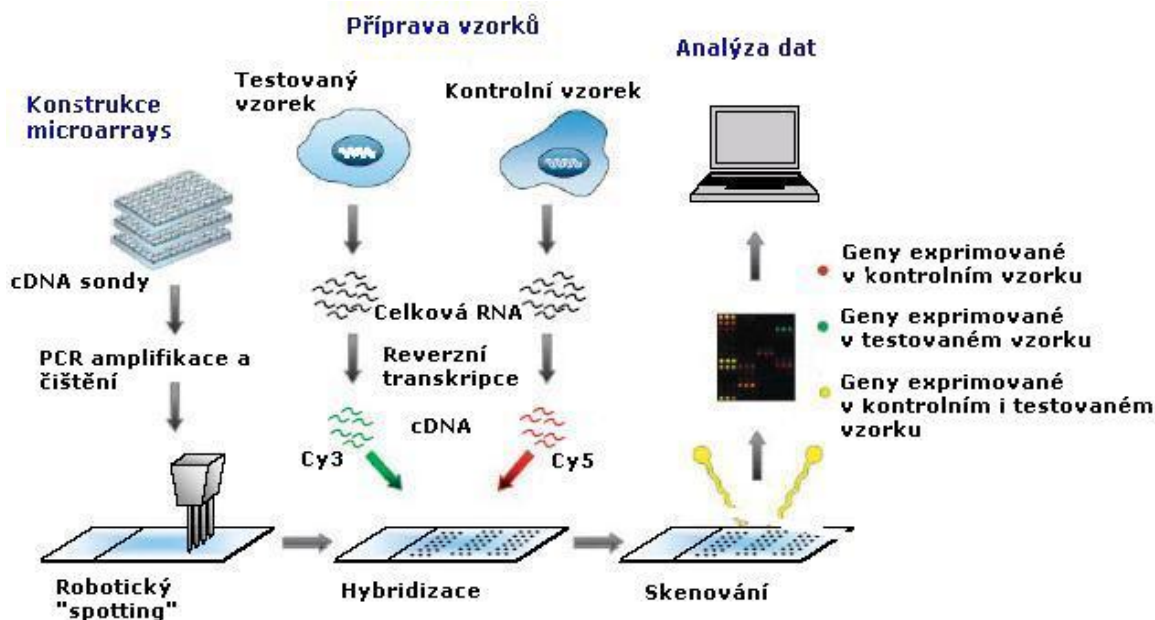
K tomu, abychom mohli kvantifikovat pomocí cDNA čipů, musíme nejdříve ze vzorku izolovat mRNA, kterou můžeme použít přímo ke kvantifikaci. Jelikož je však mRNA značně nestabilní, je lepší s ní provést reverzní transkripci a získanou cDNA následně použít ke zkoušce (Šášik et al., 2004).

Vlastní zkouška je postavená na tom, že porovnáváme expresi kontroly a expresi vzorku. Jako kontrolní vzorky používáme neovlivněné buňky nebo zdravou tkáň. Před vlastní hybridizací musíme cDNA vzorku a kontroly označit, abychom mohli výsledky hybridizace detekovat (Chaudhuri, 2005). K tomu používáme dva způsoby – použití radioaktivního ^{32}P či ^{33}P nebo fluorescenčních barviv Cy-3 a Cy-5. Značení provádíme při reverzní transkripci přímo nebo nepřímo. U přímého značení inkorporujeme do cDNA značené nukleotidy,

u nepřímého používáme nefluorescenčně značených nukleotidů (např. primární aminoskupiny), které v následující reakci označíme modifikovaným fluorescenčním barvivem. Toto značení je sice zdlouhavější, ale má tu výhodu, že značené nukleotidy jsou rovnoměrně rozmístěny v cDNA (Bueno Filho et al., 2006).

Po označení se cDNA vzorku a kontroly smíchají v poměru 1:1, směs se nanese na cDNA čip a ve speciálním zařízení, které zajistí optimální podmínky, dochází k hybridizaci a tvorbě DNA-DNA komplementárních komplexů (Obr. 25.) (Holasová et al., 2006).

Fluorescenci detekujeme pomocí laserového skeneru, který je spojený s počítačem a provádí analýzu dat. Zpravidla je kontrolní vzorek označen červenou a testovaný vzorek zelenou fluorescenční značkou (Šmarda et al., 2005). Sondy, které hybridizují s cDNA a fluoreskují červeně, představují geny, které se specificky exprimují v kontrolním vzorku, a sondy, které hybridizují s cDNA a fluoreskují zeleně, reprezentují geny, které jsou specificky exprimovány v testovaném vzorku. Pokud jsou geny exprimovány v kontrolním i testovaném vzorku, sondy fluoreskují žlutě (Walsh and Henderson, 2004).



Obr. 25. cDNA microarray analýza pomocí dvou fluorescenčních barviv (převzato z White and Salamonsen, 2005).

Radioaktivita je detekována pomocí speciálního skeneru nebo je fotografický papír vystaven radioaktivně značenému cDNA čipu (de Mello-Coelho and Hess, 2005).

Z intenzity fluorescence nebo radioaktivity pak pomocí počítače zjistíme, jak se sledované geny exprimují (Chaudhuri, 2005).

6 Sledování exprese ABC transportérů na transkripční úrovni – rešerše prací

Tato práce se zaměřuje na sledování ABC transportérů, které jsou exportními pumpami léků v lidském organismu. Patří sem transportéry z ABCB, ABCC a ABCG podrodin, jež jsou významné z farmakologického hlediska, protože mají významné role v absorpci, distribuci a exkreci léků a jsou schopné udělit mnohočetnou lékovou rezistenci nádorovým buňkám. Jde o rešerši prací, které byly publikovány v posledních letech. Exprese ostatních transportérů sledována není, protože z farmakologického hlediska nemají takový význam.

6.1 Exprese ABCB transportérů

V této podrodině je sledován jen ABCB1, který kóduje Pgp.

6.1.1 Sledování exprese ABCB1

Real-time RT-PCR metodou bylo zjištěno, že ABCB1 gen je exprimován ve všech lidských tkáních, nejvíce však v nadledvinkách (Langmann et al., 2003, Nishimura and Naito, 2005). Vysoké hladiny Pgp jsou rovněž v ledvinách, děloze (Langmann et al., 2003) a tenkém střevě (Nishimura and Naito, 2005).

V lidské placentě byla sledována exprese pomocí real-time RT-PCR a Western blottingu a bylo nalezeno, že ABCB1 je exprimován v nízkých hladinách (Serrano et al., 2007), které byly až 10x menší než hladiny BCRP (Čečková et al., 2006). V průběhu gestace, kdy dochází k diferenciaci trofoblastů v placentě, exprese ABCB1 značně klesá (Mathias et al., 2005, Evseenko et al., 2006, Sun et al., 2007). U krys RT-PCR metoda detekovala Pgp už v 11. a Western blotting ve 13. dni gestace v chorioalantoické placentě a exprese se zvyšovala během zrání placenty (Novotná et al., 2004).

Nejvyšší exprese ABCB1 v lidském tenkém a tlustém střevě byla zjištěna v terminálním ileu (Zimmermann et al., 2005). Vysoké hladiny jsou také v jejunu (Taipalensuu et al., 2001), duodenu a tračníku (Zimmermann et al., 2005). Berggren a kol. ukázal, že se od proximálních segmentů k distálním snižuje exprese ABCB1 (Berggren et al., 2006), ale hladiny Pgp v lidském ascendentním, transversálním, descendentním a esovitým tráčníku jsou již relativně konstantní (Zimmermann et al., 2005).

Microarrays analýza detekovala vysoké hladiny Pgp v lidských hepatocytech potvrzené Western blottingem a validované real-time RT-PCR (Moon et al., 2007).

6.2 Exprese ABCC transportérů

V ABCC podrodině je celá řada farmakologicky významných transportérů, u kterých byla sledována exprese.

6.2.1 Sledování exprese ABCC1

ABCC1 gen exprimuje MRP1 protein v mnoha lidských tkáních (Nishimura and Naito, 2005). Nejvyšší hladiny byly real-time RT-PCR metodou zjištěny v průdušnici, plicích, varlatech, slezině a děloze, vysoké hladiny byly také v nadledvinkách, prostatě a brzlíku člověka (Langmann et al., 2003).

Také v lidské placentě je exprimován ABCC1 ve vysokých hladinách (Serrano et al., 2007). Real-time RT-PCR metodou bylo zjištěno, že v placentě ve třetím trimestru ve srovnání s placentou v prvním trimestru jsou hladiny MRP1 až 4x vyšší (Pascolo et al., 2003).

V lidském duodenu byly zjištěny nízké hladiny MRP1 (Zimmermann et al., 2005), v jejunu byly naopak relativně vysoké (Taipalensuu et al., 2001). Vysoké mRNA a proteinové hladiny byly také v terminálním ileu, v tračníku ale klesaly od proximálních částí k distálním (Zimmermann et al., 2005). Berggren a kol. ale přišel RT-PCR a Western blottingem na to, že ABCC1 je exprimován v jejunu, ileu a tračníku relativně rovnoměrně (Berggren et al., 2006).

V temporální a frontoparietální oblasti lidského mozku byly detekovány vysoké hladiny MRP1 real-time RT-PCR (Nies et al., 2003). V hematoencefalické bariéře krys bylo zjištěno, že MRP1 se nejvíce vyskytuje v celé kůře mozkové, naproti tomu exprese v endoteliálních buňkách z izolovaných cév z mozku je slabá (Yousif et al., 2007).

6.2.2 Sledování exprese ABCC2

ABCC2 je nejvíce exprimován v játrech člověka (Langmann et al., 2003), vysoké hladiny jsou také v ledvinách a tenkém střevě (Nishimura and Naito, 2005).

Při sledování exprese real-time RT-PCR a Western blottingem v lidské placentě bylo zjištěno, že hladiny mRNA a proteinů jsou velmi nízké, (Serrano et al., 2007) Pascolo a kol. dokonce Western blottingem MRP2 nepotvrdil (Pascolo et al., 2003).

Hladiny MRP2 v lidském tenkém a tlustém střevě klesají od proximálních segmentů směrem k distálním (Berggren et al., 2006). To bylo sledováno také RT-PCR a Western blotting analýzami v krysích tkáňových vzorcích tenkého a tlustého střeva (Rost et al., 2002). Bylo změřeno, že v jejunu člověka jsou hladiny mRNA dokonce vyšší než hladiny Pgp, jak bylo dokázáno Northern blottingem (Hirohashi et al., 2000) i real-time RT-PCR (Taipalensuu et al., 2001). Zimmermann a kol. rovněž zjistil, že v duodenu má MRP2 vysoké hladiny, v terminálním ileu dosahují polovičních hodnot a v tračníku jsou velmi nízké. Přitom změřil, že v jednotlivých segmentech tračníku jsou hladiny MRP2 relativně konstantní (Zimmermann et al., 2005).

Expresi ABCC2 ve vzorcích lidských jater dospělého člověka a plodu sledoval Chen a kol. pomocí real-time RT-PCR a Western blottingu. Pozoroval, že hladiny mRNA i proteinů jsou v játrech plodu nižší než v dospělých játrech (Chen et al., 2005).

Při sledování exprese ABCC2 v lidské rohovce nebyly RT-PCR metodou změřeny mRNA hladiny (Becker et al., 2007). Naproti tomu v epitelálních korneálních buňkách králíka byly nalezeny vysoké mRNA a proteinové hladiny (Karla et al., 2007).

V temporální a frontoparietální oblasti lidského mozku byla RT-PCR změřena relativně vysoká exprese ABCC2 (Nies et al., 2004). Když byla provedena analýza různých částí mozku krysy, bylo zjištěno, že v celkovém homogenátu mozku nebyly detekovány ani mRNA, ani proteiny MRP2. V mozkových kapilárních endoteliálních buňkách byly naopak mRNA hladiny relativně vysoké, ale Western blotting detekoval proteinové hladiny MRP2 v mozkových kapilárách velmi slabě nebo vůbec (Yousif et al., 2007).

6.2.3 Sledování exprese ABCC3

Expresi ABCC3 genu měřená real-time RT-PCR je nejvyšší v nadledvinkách, vysoká je ale také v játrech, slinivce, žaludku (Nishimura and Naito, 2005), prostatě a tenkém a tlustém střevě člověka (Langmann et al., 2003).

V lidské placentě v prvním trimestru jsou detekovány vysoké hladiny mRNA MRP3 (Serrano et al., 2007), které jsou po celou dobu gestace relativně konstantní. Western blotting ale nenašel proteinové hladiny v placentě (Pascolo et al., 2003).

V duodenu a terminálním ileu člověka byla zjištěna RT-PCR metodou nízká exprese ABCC3. Velmi vysoká byla naopak v tračníku, kdy mírně klesala od proximálních částí k distálním (Zimmermann et al., 2005). Taipalensuu a kol. detekoval real-time RT-PCR metodou relativně vysoké hladiny MRP3 v jejunu (Taipalensuu et al., 2001), čímž potvrdil výsledky Hirohashiho a kol., který použil k měření Northern blotting (Hirohashi et al., 2000). Také u myši byly microarray analýzou zjištěny vysoké hladiny mRNA ABCC3 v tlustém střevě potvrzené na proteinové úrovni (Mutch et al., 2004).

Hladiny mRNA i proteinů MRP3 v játrech lidského plodu jsou ve srovnání s dospělými játry významně nižší, stejně jako u ABCC2 (Chen et al., 2005).

V různých částech lidského mozku byla detekována pouze slabá exprese ABCC3 (Nies et al., 2004). I u krys byla zaznamenána nízká exprese v celkovém homogenátu mozku a v mozkových kapilárních endoteliálních buňkách nebyla zjištěna vůbec (Yousif et al., 2007).

6.2.4 Sledování exprese ABCC4

ABCC4 je exprimován ve většině lidských tkání, ale nejvyšších hladin dosahuje v prostatě (Nishimura and Naito, 2005), dále pak v průdušnici, ledvinách, varlatech a děloze (Langmann et al., 2003).

Real-time RT-PCR a Western blotting analýzami byly v trofoblastových buňkách lidské placenty detekovány nízké hladiny mRNA a proteinů MRP4 (Serrano et al., 2007).

V lidském jejunu (Taipalensuu et al., 2001), duodenu i terminálním ileu real-time RT-PCR byly zjištěny nízké hladiny MRP4. Vysoké hladiny pak byly změřeny v tračníku, v jehož všech částech byly hladiny relativně konstantní (Zimmermann et al., 2005).

ABCC4 byl exprimován ve vysokých hladinách v temporální a frontoparietální oblasti lidského mozku. Proteinová analýza ale tyto výsledky nepotvrdila (Nies et al., 2004). V izolovaných cévách z hematoencefalické bariéry z mozku krys byla změřena relativně vysoká exprese ABCC4 real-time RT-PCT metodou (Yousif et al., 2007).

6.2.5 Sledování exprese ABCC5

ABCC5 gen je exprimován ve všech tkáních člověka. Nejvyšší hladiny má v kosterním svalstvu (Nishimura and Naito, 2005), v průdušnici, plicích, prostatě, varlatech, slezině a děloze (Langmann et al., 2003).

Při sledování exprese v lidské placentě byly naměřeny vyšší hladiny mRNA i proteinů MRP5 v placentě prvního trimestru, které během gestace klesají (Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005).

Expres ABCC5 v duodenu a terminálním ileu člověka je nízká (Zimmermann et al., 2005), ale v jejunu je relativně vysoká (Taipalensuu et al., 2001). Také v tračníku bylo zjištěno, že mRNA hladiny jsou vysoké a že klesají od jeho proximálních segmentů k distálním (Zimmermann et al., 2005).

Temporální a frontoparietální oblasti lidského mozku analyzované real-time RT-PCR metodou ukazovaly vysoké hladiny mRNA MRP5, stejně jako tomu bylo u ABCC4. Ale ani zde proteinová analýza tyto výsledky nepotvrdila (Nies et al., 2004). I v homogenátu celé kůry mozkové z krys byla Yousifem a kol. zjištěna relativně vysoká exprese ABCC5. Analyzoval také izolované cévy z hematoencefalické bariéry, kde naopak zjistil relativně nízkou expresi ABCC5 (Yousif et al., 2007).

6.2.6 Sledování exprese ABCC6

Expres ABCC6 genu byla sledována pomocí real-time RT-PCR. Díky tomu bylo zjištěno, že gen má nejvyšší hladiny mRNA v lidských játrech (Nishimura and Naito, 2005) a také v ledvinách (Langmann et al., 2003). I v různých tkáňových vzorcích myši byla „RNase protection assay“, real-time RT-PCR a Western blottingem zjištěna vysoká exprese ABCC6 v játrech. Nízká exprese byla v ledvinách, tenkém a tlustém střevě, velmi nízká v mozku a oku a extrémně nízká byla v žaludku, srdci, průdušnici, žlučníku, jazyku, varlatech a aortě (Beck et al., 2003). Tyto výsledky byly potvrzeny real-time RT-PCR analýzou různých myších tkání (Matsuzaki et al., 2005).

Nízké hladiny ABCC6 byly také zjištěny Matsuzakim a kol v lidských epidermálních keratinocytech a dermálních fibroblastech (Matsuzaki et al., 2005).

Relativně vysoká exprese byla detekována v lidském jejunu pomocí real-time RT-PCR metody (Taipalensuu et al., 2001).

Ve vzorcích z temporální, frontální, okcipitální a frontoparietální oblastí lidského mozku bylo nalezeno, že mRNA hladiny MRP6 jsou ve všech částech mozku pod detekovatelnou hranicí exprese (Nies et al., 2004)

6.2.7 Sledování exprese ABCC10

ABCC10 je exprimován ve většině lidských tkání (Nishimura and Naito, 2005), nejvyšší hladiny mRNA pomocí real-time RT-PCR byly zjištěny v pankreatu (Takayanagi et al., 2004), průdušnici, plicích a děloze (Langmann et al., 2003) a vysoké hladiny byly ještě v játrech (Takayanagi et al., 2004), prostatě, placentě, nadledvinkách, varlatech, slezině a brzlíku (Langmann et al., 2003).

6.2.8 Sledování exprese ABCC11

Vysoké hladiny exprese ABCC11 byly zjištěny v lidských plicích, játrech, ledvinách, relativně vysoká exprese byla také změřena real-time RT-PCR v prostatě a varlatech (Yabuuchi et al., 2001). Langmann a kol. a Nishimura a Naito přišli ale s tím, že ABCC11 je hlavně exprimován ve varlatech a že v ostatních tkáních člověka jsou mRNA hladiny velmi nízké (Langmann et al., 2003, Nishimura and Naito, 2005).

Analýzou lidských tkáňových vzorků z různých částí mozku bylo zjištěno, že ABCC11 se exprimuje v axonech neuronů a také v periferním nervovém systému (Bortfeld et al., 2006).

6.2.9 Sledování exprese ABCC12

Expres ABCC12 byla zkoumána v různých lidských tkáňových vzorcích pomocí real-time RT-PCR a byly nalezeny vysoké hladiny hlavně v plicích, játrech, ledvinách, dále v mozku, pankreatu, brzlíku, prostatě, varlatech, vaječnicích, tlustém střevu a leukocytech (Yabuuchi et al., 2001). Bylo ale zjištěno, že ABCC12 je exprimován hlavně ve varlatech člověka a v jiných tkáních jsou jeho hladiny jen nízké (Langmann et al., 2003, Nishimura and Naito, 2005).

6.3 Expres ABCG transportérů

Z genů ABCG podrodiny je z farmakologického hlediska nejdůležitější ABCG2 (BCRP).

6.3.1 Sledování exprese ABCG2

ABCG2 je exprimován ve všech tkáních lidského těla, nejvyšší hladiny se nacházejí v placentě, tenkém střevu (Nishimura and Naito, 2005), děloze a prostatě (Langmann et al., 2003).

Expres BCRP v placentě je až 10x vyšší než MDR1, který u ní je také významně exprimován (Čečková et al., 2006). V primárních trofoblastech lidské placenty byly detekovány real-time RT-PCR a Western blottingem vysoké hladiny BCRP, které s diferenciací trofoblastů rostly (Evseenko et al., 2006). V lidských placentách v různých fázích gestace (60-90 dnů, 90-120 dnů a placenta při porodu – plně donošená) bylo pozorováno, že se exprese ABCG2 v průběhu gestace významně nemění (Mathias et al., 2005). V placentách krys bylo ale pozorováno, že ve 20. gestačním dni jsou mRNA a proteinové hladiny mnohem nižší než ve 14. dni gestace (Yasuda et al., 2005).

V duodenu lidského tenkého střeva byly zjištěny velmi vysoké hladiny mRNA exprimovaného ABCG2 (Gutmann et al., 2005). V jejunu byla exprese ABCG2 také značně vysoká. Dokonce byla vyšší než exprese ABCB1 (Taipalensuu et al., 2001). V tračníku člověka bylo detekováno real-time RT-PCR metodou kontinuální klesání exprese dolů směrem k rektu (terminální ileum 93.7%, ascendentní tračník 75.8%, transversální tračník 66.6%, descendentní tračník 62.8% a esovitý tračník 50.1% exprese srovnávaná s duodenem) (Gutmann et al., 2005).

V izolovaných cévách hematoencefalické bariéry mozku krys byly zjištěny relativně vysoké mRNA a proteinové hladiny BCRP (Yousif et al., 2007)

ABCG2 je také vysoce exprimován v lidském žlučníku a významná exprese je rovněž v izolovaných epiteliálních buňkách žlučníku (Aust et al., 2004).

7 Závěr

Současný výzkum zjistil, že ABC transportéry jsou exprimovány v játrech, ledvinách, gastrointestinálním traktu, hematoencefalické bariéře, placentě a dalších tkáních. Transportéry jsou důležité v absorpci léků z gastrointestinálního traktu. V ledvinách a játrech hrají ABC transportéry významnou roli v exkreci toxinů, léků a jejich metabolitů ven z těla. V bariérách mezi tkání a krví životně důležitých orgánů, jako je hematoencefalická bariéra, bariéra mezi varletem a krví nebo placentární bariéra, jsou zapojeny do distribuce léků, kde mají také obrannou funkci před různými toxiny. ABC transportéry jsou významné determinanty rozdělování léků v lidském organismu.

Velmi důležité pro studium ABC transportérů a pro sledování jejich exprese v různých tkáních jsou moderní kvantifikační metody. V dnešní době je možné si vybrat z celé řady citlivých a spolehlivých metod, které nejsou náročné na provedení. Hojně používaná real-time RT-PCR a také microarray analýza značně pomohly rozšířit znalosti o expresi ABC transportérů v různých lidských tkáních. Tím se objasnil význam některých ABC transportérů ve farmakokinetice.

Bude-li přesně známa tkáňová lokalizace a míra exprese transportérů z ABC a jiných rodin, které jsou zapojeny do transportu léků v organismu, bude možné vyvíjet nové léčivé přípravky s cílenou distribucí v jednotlivých orgánech lidského těla.

Abstrakt

Lidská ABC (ATP-binding cassette) rodina aktivních transportů obsahuje asi 50 funkčně rozdílných transmembránových proteinů. Využívají energii z hydrolýzy ATP a transportují různé druhy endogenních a exogenních sloučenin přes membrány proti koncentračnímu spádu. ABC transportéry hrají důležité role v absorpci, distribuci a exkreci léků. Některé jsou také schopné udělit mnohočetnou lékovou rezistenci nádorovým buňkám. Sledovat expresi ABC transportérů na transkripční úrovni lze v dnešní době několika metodami. Patří mezi ně Northern blotting, „RNase protection assay“, real-time RT-PCR a microarray analýza. V této práci jsou shrnuty aktuální informace o kvantifikaci ABC transportérů, které transportují léky. Bylo zjištěno, že ABC transportéry jsou exprimovány v játrech, ledvinách, gastrointestinálním traktu, hematoencefalické bariéře, placentě a dalších tkáních.

Abstract

Human ABC (ATP-binding cassette) family of active transporters contains about 50 functionally diverse transmembrane proteins. They utilize energy from the hydrolysis of ATP and transport a variety of endogenous and exogenous compounds across the membranes against a concentration gradient. ABC transporters play important role in absorption, distribution and excretion of drugs. Some are able to confer multidrug resistance in cancer cells. Nowadays, to observe expression of ABC transporters on transcription level, it is possible to use several methods as Northern blotting, RNase protection assay, real-time RT-PCR and microarray analysis. This thesis summarizes up to date information about quantification of ABC drug transporters. It was found that ABC transporters are expressed in the liver, kidney, gastrointestinal tract, blood-brain barrier, placenta and other tissues.

8 Literatura

Akiyama M., Sugiyama-Nakagiri Y., Sakai K., McMillan J.R., Goto M., Arita K., Tsuji-Abe Y., Tabata N., Matsuoka K., Sasaki R., Sawamura D., Shimizu H., Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer, *J Clin Invest*, 2005, 115: 1777-1784

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, Ústí nad Labem, Espero Publishing, 2001, str. 313-315, 371-378, ISBN: 80-902906-0-4

Allen J.D., Brinkhuis R.F., Wijnholds J., Schinkel A.H., The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin, *Cancer Res*, 1999, 59: 4237-4241

Allikmets R., Gerrard B., Hutchinson A., Dean M., Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database, *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 1649-1655

Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano-Spica V., Dean M., A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance, *Cancer Res*, 1998, 58: 5337-5339

Allikmets R., Singh N., Sun H., Shroyer N.F., Hutchinson A., Chidambaram A., Gerrard B., Baird L., Stauffer D., Peiffer A., Rattner A., Smallwood P., Li Y., Anderson K.L., Lewis R.A., Nathans K., Leppert M., Dean M., Lupski J.R., A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy, *Nat Genet*, 1997, 15: 236-246

Alrasadi K., Ruel I.L., Marcil M., Genest J., Functional mutations of the ABCA1 gene in subjects of French-Canadian descent with HDL deficiency, *Atherosclerosis*, 2006, 186: 281-291

Al-Shawi, M.K., Omote, H., The remarkable transport mechanism of P-glycoprotein; a multidrug transporter, *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 37: 489-496

Alwine J.C., Kemp D.J., Parker B.A., Reiser J., Renart J., Stark G.R., Wahl G.M., Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper, *Methods Enzymol*, 1979, 68: 220-242

Ambudkar S.V., Sauna Z.E., Gottesman M.M., Szakacz G., A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1), *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26: 385-387

- Augustine L.M., Markelewicz R.J.Jr, Boekelheide K., Cherrington N.J., Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier, *Drug Metab Dospod*, 2005, 33: 182-189
- Aust S., Obrist P., Jaeger W., Klimpfinger M., Tucek G., Wrba F., Penner E., Thalhammer T., Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium, *Lab Invest*, 2004, 84: 1024-1036
- Azarian S.M., Megarity C.F., Weng J., Horvath D.H., Travis G.H., The human photoreceptor rim protein gene (ABCR): genomic structure and primer set information for mutation analysis, *Hum Genet*, 1998, 102: 699-705
- Bakos E., Evers R., Szakács G., Tusnády G.E., Wolker E., Szabó K., de Haas M., van Deemter L., Borst P., Váradi A., Sarkadi B., Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain, *J Biol Chem*, 1998, 273: 32167-32175
- Balimane P.V., Han Y.-H., Chong S., Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction, *AAPS J*, 2006, 8: E1-E13
- Ban N., Matsumura Y., Sakai H., Takanezawa Y., Sasaki M., Arai H., Inagaki N., ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis, *J Biol Chem*, 2007, 282: 9628-9634
- Barros S.A., Tennant R.W., Cannon R.E., Molecular structure and characterization of a novel murine transporter, Abca13, *Gene*, 2003, 307: 191-200
- Bauer B., Hartz A.M., Fricker G., Miller D.S., Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier, *Exp Biol Med*, 2005, 230: 118-127
- Beck K., Hayashi K., Dang K., Hayashi M., Boyd C.D., Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues, *Histochem Cell Biol*, 2005, 123: 517-528
- Beck K., Hayashi K., Nishiguchi B., Le Saux O., Hayashi M., Boyd C.D., The distribution of Abcc6 in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC transporter, *J Histochem Cytochem*, 2003, 51: 887-902
- Becker U., Ehrhardt C., Daum N., Baldes C., Schaefer U.F., Ruprecht K.W., Kim K.J., Lehr C.M., Expression of ABC-Transporters in human corneal tissue and the transformed cell line, HCE-T, *J Ocul Pharmacol Ther*, 2007, 23: 172-181
- Bekri S., Kispal G., Lange H., Fitzsimons E., Tolmie J., Lill R., Bishop D.F., Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation, *Blood*, 2000, 96: 3256-3264

- Belinsky M.G., Dawson P.A., Shchaveleva I., Bain L.J., Wang R., Ling V., Chen Z.-S., Grinberg A., Westphal H., Klein-Szento A., Lerro A., Kruh G.A., Analysis of the in vivo functions of Mrp3, *Mol Pharmacol*, 2005, 68: 160-168
- Belinsky M.G., Guo P., Lee K., Zhou F., Kotova E., Grinberg A., Westphal H., Shchaveleva I., Klein-Szento A., Gallo J.M., Kruh G.D., Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage, *Cancer Res*, 2007, 67: 262-268
- Bengra C., Mifflin T.E., Khripin Y., Manunta P., Williams S.M., Jose P.A., Felder R.A., Genotyping of essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogeneous PCR method with universal energy transfer primers, *Clin Chem*, 2002, 48: 2131-2140
- Berge K.E., Tian H., Graf G.A., Yu L., Grishin N.V., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R., Hobbs H.H., Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters, *Science*, 2000, 290: 1771-1775
- Berggren S., Gall C., Wollnitz N., Ekelund M., Karlbom U., Hoogstraate J., Schrenk D., Lennernäs H., Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine, *Mol Pharm*, 2007, 4: 252-257
- Bisbal C., Martinand C., Silhol M., Lebleu B., Salehzada T., Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway, *J Biol Chem*, 1995, 270: 13308-13317
- Bok D., Cellular mechanisms of retinal degenerations: RPE65, ABCA4, RDS, and bicarbonate transporter genes as examples, *Retina*, 2005, 25: S18-S20
- Borowski E., Bontemps-Gracz M.M., Piwkowska A., Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells, *Acta Biochim Pol*, 2005, 52: 609-627
- Borst P., Elferink R.O., Mammalian ABC transporters in health and disease, *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 537-592
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J., A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 1295-1302
- Borst P., Zelcer N., van de Wetering K., MRP2 and 3 in health and disease, *Cancer Lett*, 2006, 234: 51-61
- Bortfeld M., Rius M., König J., Herold-Mende C., Nies A.T., Keppler D., Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system, *Neuroscience*, 2006, 137: 1247-1257

- Braiterman L.T., Zheng S., Watkins P.A., Geraghty M.T., Johnson G., McGuinness M.C., Moser A.B., Smith K.D., Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins, *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 239-247
- Breedveld P., Pluim D., Cipriani G., Wielinga P., van Tellingen O., Schinkel A.H., Schellens J.H., The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients, *Cancer Res*, 2005, 65: 2577-2582
- Bryan J., Munoz A., Zhang X., Dufer M., Drews G., Krippeit-Drews P., Aquilar-Bryan L., ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K(+) channels, *Pflugers Arch*, 2007, 453: 703-718
- Broccardo C., Luciani M., Chimini G., The ABCA subclass of mammalian transporters, *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1461: 395-404
- Bronger H., König J., Kopplow K., Steiner H.-H., Ahmadi R., Herold-Mende C., Keppler D., Nies A.T., ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier, *Cancer Res*, 2005, 65: 11419-11428
- Bueno Filho J.S.S., Gilmour S.G., Rosa G.J.M., Design of microarray experiments for genetical genomics studies, *Genetics*, 2006, 174: 945-957
- Bustin S.A., A-Z of quantitative PCR, San Diego, CA: IUL Press, 2004
- Bustin S.A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems, *J Mol Endocrinol*, 2002, 29: 23-39
- Bustin S.A., Nolan T., Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, *J Biomol Tech*, 2004, 15: 155-166
- Büchler M., König J., Brom M., Kartenbeck J., Spring H., Horie T., Keppler D., cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats, *J Biol Chem*, 1996, 271: 15091-15098
- Campbell N.A., Reece J.B., Biologie, Brno, Computer Press, 2006, str. 144-153, 904 ISBN: 80-251-1178-4
- Clark D.P., Molecular biology, Amsterdam, Elsevier, 2005, str. 722-724, ISBN: 0-12-175551-7
- Cavelier C., Lorenzi I., Rohrer L., von Eckardstein A., Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1, *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761: 655-666

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

Cole S.P., Sparks K.E., Fraser K., Loe D.W., Grant C.E., Wilson G.M., Deeley R.G., Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells, *Cancer Res*, 1994, 54: 5902-5910

Cremers F.P., Maugeri A., Klevering B.J., Hoefsloop L.H., Hoyng C.B., From gene to disease: from the ABCA4 gene to Stargardt disease, cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa, *Ned Tijdschr Geneesk*, 2002, 146: 1581-1584

Croop J.M., Miller G.E., Fletcher J.A., Lux M.L., Raab E., Goldenson D., Son D., Arciniegas S., Wu R.L., Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene, *Gene*, 1997, 185: 77-85

Cui Y., König J., Buchholz J.K., Spring H., Leier I., Keppler D., Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells, *Mol Pharmacol*, 1999, 55: 929-937

Čečková M., Libra A., Pávek P., Nachtigal P., Brabec M., Fuchs R., Štaud F., Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33: 58-65

Červinka M., Úvod do genového inženýrství, Univerzita Karlova v Praze, 1993, str. 19

Dadashzadeh S., Javadian B., Sadeghian S., The effect of gender on the pharmacokinetics of verapamil and norverapamil in human, *Biopharm Drug Dispos*, 2006, 27: 329-334

Darbar D., Roden D.M., Pharmacogenetics of antiarrhythmic therapy, *Expert Opin Pharmacother*, 2006, 7: 1583-1590

De Lannoy I.A., Silverman M., The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin, *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 551-557

De Mello-Coelho V., Hess K.L., A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences, *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38: 1543-1552

Dean M., Hamom Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res*, 2001, 11: 1156-1166

- Dean M., Rzhetsky A., Allikments R., The human ATP-binding cassette (ATP) transporter superfamily, *Genome Res*, 2001, 11: 1156-66
- Deeley R.G., Cole S.P., Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1), *FEBS Lett*, 2006, 580: 1103-1111
- Deprez R.L.H, Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F.M., Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions, *Anal Biochem*, 2002, 307: 63-69
- Derandeliler F., Fournet J.C., Bas F., Junien C., Gross M.S., Bundak R., Saka N., Gunoz H., ABCC8 (SUR1) and KCNJ11 (KIR6.2) mutations in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and evaluation of different therapeutic measures, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15: 993-1000
- Diviacco S., Norio P., Zentilin L., Menzo S., Clementi M., Biamonti G., Riva S., Falaschi A., Giacca M., A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive template, *Gene*, 1992, 122: 313-320
- Doyle L.A., Ross D.D., Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2), *Oncogene*, 2003, 22: 7340-7358
- Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15665-15670
- Dvořák Z., Pascussi J.-M., Modrianský M., Approaches to messenger RNA detection – comparison of methods, *Biomed Papers*, 2003, 147: 131-135
- Ebert B., Seidel A., Lampen A., Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists, *Carcinogenesis*, 2005, 26: 1754-1763
- Ebinger M., Uhr M., ABC drug transporter at the blood-brain barrier: effects on drug metabolism and drug response, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2006, 256: 294-298
- Evers R., Kool M., van Deemter L., Janssen H., Calafat J., Oomen L.C., Paulusma C.C., Oude Elferink R.P., Baas F., Schinkel A.H., Borst P., Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA, *J Clin Invest*, 1998, 101: 1310-1319

- Evseenko D.A., Paxton J.W., Keelan J.A., ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290: R1357-R1365
- Fetsch P.A., Abati A., Litman T., Morisaki K., Honjo Y., Mittal K., Bates S.E., Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues, *Cancer Lett*, 2006, 235: 84-92
- Frank N.Y., Pendse S.S., Lapchak P.H., Margaryan A., Shlain D., Doeing C., Sayegh M.H., Frank M.H., Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter, *J Biol Chem*, 2003, 278: 47156-47165
- Gadola S.D., Moins-Teisserenc H.T., Trowsdale J., Gross W.L., Cerundolo V., TAP deficiency syndrome, *Clin Exp Immunol*, 2000, 121: 173-178
- Garmory H.S., Titball R.W., ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccine and therapies, *Infect Immun*, 2004, 72: 6757-6763
- Gerk P.M., Vore M., Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition, *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302: 407-415
- Girardin F., Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development, *Dialogues Clin Neurosci*, 2006, 8: 311-321
- Goel G., Kumar A., Puniya A.K., Chen W., Singh K., Molecular beacon: a multitask probe, *J Appl Microbiol*, 2005, 99: 435-442
- Gotoh Y., Suzuki H., Kinoshita S., Hirohashi T., Kato Y., Sugiyama Y., Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats, *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292: 433-439
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E., Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 48-58
- Graf S.A., Haigh S.E., Corson E.D., Shirihai O.S., Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me), *J Biol Chem*, 2004, 279: 42954-42963
- Greger R., Schreiber R., Mall W., Wissner A., Hopf A., Briel M., Bleich M., Warth R., Kunzleman K., Cystic fibrosis and CFTR, *Pflugers Arch*, 2001, 443: S3-S7

- Gutmann H., Hruz P., Zimmermann C., Beglinger C., Drewe J., Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract, *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 695-699
- Hamon Y., Chambenoit O., Chimini G., ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells, *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585: 64-71
- Hediger M.A., Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes, *J Exp Biol*, 1994, 196: 15-49
- Hennessy M., Spiers J.P., A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter, *Pharmacol Res*, 2007, 55: 1-15
- Hergert M., Tampe R., Intracellular peptide transporters in human - compartmentalization of the "peptidome", *Pflugers Arch*, 2007, 453: 591-600
- Hettema E.H., Tabak H.F., Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486: 18-27
- Higgins G.F., ABC transporters: from microorganisms to man, *Annu Rev Cell Biol*, 1992, 8: 67-113
- Hirohashi T., Suzuki H., Chu X.Y., Tamai I., Tsuji A., Sugiyama Y., Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2), *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292: 265-270
- Hoffman H.N., Fredrickson D.S., Tangier disease (familial high density lipoprotein deficiency). Clinical and genetic features in two adults, *Am J Med*, 1965, 39: 582-593
- Holasová Š., Radilová H., Bunčec M., Praktická cvičení z molekulární genetiky, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2006, str. 36-37, ISBN: 80-246-1072-8
- Holmes A.R., Tsao S., Lamping E., Niimi K., Monk B.C., Tanabe K., Niimi M., Cannon R.D., Amino acid residues affecting drug pump function in *Candida albicans*, *Jpn J Med Mycol*, 2006, 47: 275-281
- Hooijbegr J.H., Broxterman H.J., Kool M., Assaraf Y.G., Peters G.J., Noordhuis P., Scheper R.J., Borst P., Pinedo H.M., Jansen G., Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2, *Cancer Res*, 1999, 59: 2532-2535
- Hopper-Borge E., Chen Z.S., Shchaveleva I., Belinsky M.G., Kruh G.D., Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel, *Cancer Res*, 2004, 64: 4927-4930

- Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F., Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature*, 1990, 346: 362-365
- Chaudhuri J.D., Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays, *Med Sci Monit*, 2005, 11: RA52-62
- Chen H.L., Chen H.L., Liu Y.J., Feng C.H., Wu C.Y., Shyu M.K., Yuan R.H., Chang M.H., Developmental expression of canalicular transporter genes in human liver, *J Hepatol*, 2005, 43: 472-477
- Chen Z.Q., Dong J., Ishimura A., Daar I., Hinnebusch A.G., Dean M., The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors, *J Biol Chem*, 2006, 281: 7452-7457
- Chomczynski P., One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA, *Anal Biochem*, 1992, 201: 89-95
- Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 1987, 162: 156-159
- Inagaki N., Gonoi T., Clement J.P. 4th, Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aquilar-Bryan L., Seino S., Bryan J., Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor, *Science*, 270: 1166-1170
- Ishikawa T., The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem Sci*, 1992, 17: 463-468
- Ivetac A., Campbell J.D., Samson M.S., Dynamics and function in a bacterial ABC transporters : simulation studies of the BtuCDF system and its components, *Biochemistry*, 2007, 46: 2767-2778
- Jedlitschky G., Keppler D., Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates, *Vitam Horm*, 2002, 64: 153-184
- Jonker J.W., Smit J.W., Brinkhuis R.F., Maliepaard M., Beijnen J.H., Schellens J.H., Schinkel A.H., Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan, *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 1651-1656
- Juliano R.L., Ling V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455: 152-162
- Kaminski W.E., Piehler A., Püllmann K., Porsch-Özcürümez M., Duong C., Bared G.M., Büchler C., Schmitz G., Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001a, 281: 249-258

Kaminski W.E., Wenzel J.J., Piehler A., Langmann T., Schmitz G., ABCA6, a novel a subclass ABC transporter, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001b, 285: 1295-1301

Kamisako T., Leier I., Cui Y., König J., Buchholz U., Hummel-Eisenbeiss J., Keppler D., Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2, *Hepatology*, 1999, 30: 485-490

Karla P.K., Pal D., Mitra A.K., Molecular evidence and functional expression of multidrug resistance associated protein (MRP) in rabbit corneal epithelial cells, *Exp Eye Res*, 2007, 84: 53-60

Katzung B.G., Základní a klinická farmakologie, Jinočany H&H, 2006, 2.české vydání, str. 1-4, ISBN: 80-7319-056-7

Kharasch E.D., Hoffer C., Whittington D., Sheffels P., Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine, *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 74: 543-554

Keppler D., Uptake and efflux transporters for conjugates in human hepatocytes, *Methods Enzymol*, 2005, 400: 531-542

Keppler D., König J., Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substance, *Semin Liver Dis*, 2000, 20: 265-272

Kivisto K.T., Niemi M., Fromm M.F., Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein, *Fundam Clin Pharmacol*, 2004, 18: 621-626

Klein I., Sarkadi B., Varadi A., An inventory of the human ABC proteins, *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1461: 237-262

Klett E.L., Lee M.H., Adams D.B., Chavin K.D., Patel S.B., Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine, *BMC Gastroenterol*, 2004, 21, 4: 21

Klucken J., Büchler C., Orsó E., Kaminski W.E., Porsch-Özcürümez M., Liebisch G., Kapinsky M., Diederich W., Drobnik W., Dean M., Allikmets R., Schmitz G., ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 817-822

Koike K., Kawabe T., Tanaka T., Toh S., Uchiumi T., Wada M., Akiyama S., Ono M., Kuwano M., A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells, *Cancer Res*, 1997, 57: 5475-5479

Kolovou G.D., Mikhailidis D.P., Anagnostopoulou K.K., Daskalopoulou S.S., Cokkinos D.V., Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HLD, *Curr Med Chem*, 2006, 13: 771-782

Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P., Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines, *Cancer Res*, 1997, 57: 3537-3547

Krishnamurthy P.C., Du G., Fukuda Y., Sun D., Sampath J., Mercer K.E., Wang J., Sosa-Pineda B., Murti K.G., Schuetz J.D., Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter, *Nature*, 2006, 443: 586-589

Kruh G.D., Guo Y., Hopper-Borge E., Belinsky M.G., Chen Z.S., ABCC10, ABCC11, and ABCC12, *Pflugers Arch*, 2007, 453: 675-684

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan M., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N., The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med*, 2006, 27: 95-125

Kusuhara H., Sugiyama Y., Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family, *NeuroRx*, 2005, 2: 73-85

Kuwano M., Uchiumi T., Hayakawa H., Ono M., Wada M., Ozimi H., Kohno K., The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies, *Cancer Sci*, 2003, 94: 9-14

Langmann T., Mauerer R., Zahn A., Moehle C., Probst M., Stremmel W., Schmitz G., Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues, *Clinical Chemistry*, 2003, 49: 230-238

Lankas G.R., Cartwright M.E., Umbenhauer D., P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 143: 357-365

Le Saux O., Beck K., Sachsinger C., Silvestri C., Treiber C., Goring H.H., Johnson E.W., De Paepe A., Pope F.M., Pasquali-Ronchetti I., Bercovitch L., Marais A.S., Viljoen D.L., Terry S.F., Boyd C.D., A spectrum of *ABCC6* mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum, *Am J Hum Genet*, 2001, 69: 749-764

Lee M.H., Lu K., Patel S.B., Genetic basis of sitosterolemia, *Curr Opin Lipidol*, 2001, 12: 141-149

Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S., Deeley R.G., Keppler D., The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates, *J Biol Chem*, 1994, 269: 27807-27810

- Leprohon P., Legare D., Girard I., Papadopoulou B., Oullette M., Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites, *Eukaryot Cell*, 2006, 5: 1713-1725
- Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P., Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204: 216-237
- Leveson-Gower D.B., Michnick S.W., Ling V., Detection of TAP family dimerizations by an in vivo assay in mammalian cells, *Biochemistry*, 2004, 43: 14257-14264
- Lincová D., Farghali H. et al., Základní a aplikovaná farmakologie, Praha Galén, 2007, str. 33-36, ISBN: 978-7262-373-0
- Linsel-Nitschke P., Jehle A.W., Shan J., Cao G., Bacic D., Lan D., Wang N., Tall A.R., Potential role of ABCA7 in cellular lipid efflux to apoA-I, *J Lipid Res*, 2005, 46: 86-92
- Linton K.J., Structure and function of ABC transporters, *Physiology*, 2007, 22: 122-130
- Litman T., Brangi M., Hudson E., Fetsch P., Abati A., Ross D.D., Miyake K., Resau J.H., Bates S.E., The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2), *J Cell Sci*, 2000, 113: 2011-2021
- Löscher W., Potschka H., Blood-brain active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family, *NeuroRx*, 2005, 2: 86-98
- Lu J.F., Barron-Casella E., Deering R., Heinzer A.K., Moser A.B., deMesy Bentley K.L., Wand G.S., McGuinness M.C., Pei Z., Watkins P.A., Pujol A., Smith K.D., Powers J.M., The role of peroxisomal ABC transporters in the mouse adrenal gland: the loss of Abcd2 (ALDR), Not Abcd1 (ALD), causes oxidative damage, *Lab Invest*, 2007, 87: 261-272
- Lu K., Lee M.H., Yu H., Zhou Y., Sandell S.A., Salen G., Patel S.B., Molecular cloning, genomic organization, genetic variations, and characterization of murine sterolin genes Abcg5 and Abcg8, *J Lipid Res*, 2002, 43: 565-578
- Luciani M.F., Denizot F., Savary S., Mattei M.G., Chimini G., Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9, *Genomics*, 1994, 21: 150-159
- Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Atlas farmakologie, Praha Grada, 1994, 1. české vydání, str. 20, 21, 26, 27, ISBN: 80-7169-088-0

- Mackay J, Landt O., Real-time PCR fluorescent chemistries, *Methods Mol Biol*, 2007, 353: 237-62
- Madon J., Hagenbuch B., Landmann L., Meier P.J., Stieger B., Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver, *Mol Pharmacol*, 2000, 57: 634-641
- Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H., Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues, *Cancer Res*, 2001, 61: 3458-3464
- Mao Q., Unadkat J.D., Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport, *AAPS J*, 2005, 7: E118-E133
- Mark P.J., Waddell B.J., P-glycoprotein restricts access of cortisol and dexamethasone to the glucocorticoid receptor in placental BeWo cells, *Endocrinology*, 2006, 147: 5147-5152
- Mathias A.A., Hitti J., Unadkat J.D., P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289: R963-R969
- Matsuzaki Y., Nakano A., Jiang Q.J., Pulkkinen L., Uitto J., Tissue-specific expression of the ABCC6 gene, *J Invest Dermatol*, 2005, 125: 900-905
- McGuinness M.C., Lu J.-F., Zhang H.-P., Dong G.-X., Heinzer A.K., Watkins P.A., Powers J., Smith K.D., Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molec Cell Biol*, 2003, 23: 744-753
- Melaine N., Satie A.P., Lassurguare J., Desmont S., Jegou B., Samson M., Molecular cloning of several rat ABC transporters including a new ABC transporter, Abcb8, and their expression in rat testis, *Int J Nadrol*, 2006, 29: 392-399
- Meyer Zu Schwabedissen H.E., Grube M., Heydrich B., Linnemann K., Fusch C., Kroemer H.K., Jedlitschky G., Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation, *Am J Pathol*, 2005, 166: 39-48
- Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T., Bates S.E., Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes, *Cancer Res*, 1999, 59: 8-13
- Mickley L., Jain P., Miyake K., Schriml L.M., Rao K., Fojo T., Bates S., Dean M., An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain, *Mamm Genome*, 2001, 12: 86-88

- Moon Y.J., Zhang S., Brazeau D.A., Morris M.E., Effects of the flavonoid biochanin A on gene expression in primary human hepatocytes and human intestinal cells, *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51: 317-323
- Moore J.W., Quantification of RNA by ribonuclease protection assay, *Methods Mol Med*, 2006, 120: 347-362
- Mosser J., Douar A.-M., Sarde C.-O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A.-M., Mandel J.-L., Aubourg P., Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters, *Nature*, 1993, 361: 726-730
- Mutch D.W., Anderle P., Fiaux M., Mansourian R., Vidal K., Wahli W., Williamson G., Roberts M.-A., Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract, *Physiol Genomics*, 2004, 17: 11-20
- Müller M., Yong M., Peng X.H., Petre B., Arora S., Ambudkar S.V., Evidence for the role of glycosylation in accessibility of the extracellular domains of human MRP1 (ABCC1), *Biochemistry*, 2002, 41: 10123-10132
- Nagashige M., Ushihome F., Koyabu N., Hirata K., Kawabuchi M., Hirakawa T., Satoh S., Tsukimori K., Nakano H., Uchiumi T., Kuwano Ohtani H., Sawada Y., Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast, *Placenta*, 2003, 24: 951-958
- Nečas O. et al., *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, 2000, str. 138-139, 170-183, ISBN: 80-86022-46-3
- Nies A.T., Jedlitschky G., König J., Herold-Mende C., Steiner H.H., Schmitt H.P., Keppler D., Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain, *Neuroscience*, 2004, 129: 349-360
- Nishimura M., Naito S., Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies, *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20: 452-477
- Nishimura S., Tsuda H., Ito K., Jobo T., Yaegashi N., Inoue T., Sudo T., Berkowitz R.S., Mok S.C., Differential expression of ABCF2 protein among different histologic types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas of different organs, *Hum Pathol*, 2007, 38: 134-139
- Novotná M., Libra A., Kopecký M., Pávek P., Fendrich Z., Semecký V., Štaud F., P-glycoprotein expression and distribution in the rat placenta during pregnancy, *Reprod Toxicol*, 2004, 18: 785-792
- Nuggety J., Dheda K., Bustin S., Zumla A., Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Gen Immun*, 2005, 6: 279-284

- Oude Elferink R.P., Paulusma C.C., Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein), *Pflugers Arch*, 2007, 453: 601-610
- Park M., Ko S.B., Choi J.Y., Muallem G., Thomas P.J., Pushkin A., Lee M.S., Muallem S., Kurtz I., The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO₃⁻ salvage transporter human Na⁺-HCO₃⁻ cotransport isoform 3, *J Biol Chem*, 2002, 277: 50503-50509
- Pascolo L., Ferneti C., Pirulli D., Crovella S., Amoroso A., Tiribelli C., Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303: 259-265
- Petry F., Ritz V., Meineke C., Middel P., Kietzmann T., Schmitz-Salue C., Hirsch-Ernst K.I., Subcellular localization of rat Abca5, a rat ATP-binding-cassette transporter expressed in Leydig cells, and characterization of its splice variant apparently encoding a half-transporter, *Biochem J*, 2006, 393: 79-87
- Piebler A., Kaminski W.E., Wenzel J.J., Langmann T., Schmitz G., Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9, *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295: 408-416
- Powell L.M., Wallis S.C., Pease R.J., Edwards Y.H., Knott T.J., Scott J., A novel form of tissue-specific RNA processing productes apolipoprotein-B48 in intestine, *Cell*, 1987, 50: 831-340
- Randak C.O., Welsch M.J., Adenylate kinase activity in ABC transporters, *J Biol Chem*, 2005, 280: 34385-34388
- Ratjen F., Doring G., Cystic fibrosis, *Lancet*, 2003, 361: 681-689
- Raval P., Qualitative and quantitative determination of mRNA, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32: 125-127
- Reid G., Wielinga P., Zelcer N., van der Heijden I., Kuil A., de Haas M., Wijnholds J., Borst P., The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory druha, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9244-9249
- Remaley A.T., Bark S., Walts A.D., Freeman L., Shulenin S., Annilo T., Elgin E., Rhodes H.E., Joyce C., Dean M., Santamarina-Fojo S., Brewer H.B.Jr., Comparative genome analysis of potential regulatory elements in the ABCG5–ABCG8 gene cluster, *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295: 276-282
- Richard M., Drouin R., Beaulieu A.D., ABC50, a novel human ATP-binding cassette protein found in tumor necrosis factor-alpha-stimulated synoviocytes, *Genomics*, 1998, 53: 137-145

- Ringfeil F., Lebowitz M.G., Christiano A.M., Uitto J, Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the *MRP6* gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6001-6006
- Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L. et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science*, 1989, 245: 1066-1073
- Robey R.W., Medina-Perez W.Y., Nishiyama K., Lahusen T., Miyake K., Litman T., Senderowicz A.M., Ross D.D., Bates S.E., Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells, *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 145-152
- Rocchi E., Khodjakov A., Volk E.L., Yang C.H., Litman T., Bates S.E., Schneider E., The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane, *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271: 42-46
- Ross D.D., Yang W., Abruzzo L.V., Dalton W.S., Schneider E., Lage H., Dietel M., Greenberger L., Cole S.P., Doyle L.A., Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines, *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 429-433
- Rost D., Mahner S., Sugiyama Y., Stremmel W., Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282: G720-G726
- Rosypal S., Doškař J., Petřík K., Růžičková V., Úvod do molekulární biologie, Díl 4., Brno, 2002, str. 1085-1092, ISBN: 80-902562-4-4
- Rottman J.B., The ribonuclease protection assay: A powerful tool for the veterinary pathologist, *Vet Pathol*, 2002, 39: 2-9
- Saiki R.K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R. , Horn G.T., Mullis K.B, Erich H.A., Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science*, 1988, 239: 487-491
- Salen G., Shefer S., Nguyen L., Ness G.C., Tint G.S., Batta A.K, Sitosterolemia, *Subcell Biochem*, 1997, 28: 453-476
- Sampath J., Adachi M., Hatse S., Naesens L., Balzarini J., Flatley R.M., Matherly L.H., Schuetz J.D., Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy, *AAPS PharmSci*, 2002, 4: E14

- Santamarina-Fojo S., Remaley A.T., Neufeld E.B., Brewer H.B.Jr., Regulation and intracellular trafficking of ABCA1, *J Lipid Res*, 2001, 41: 1339-1345
- Sai Y., Biochemical and molecular pharmacological aspects of transporters as determinants of drug disposition, *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20: 91-99
- Sekine T., Miyazaki H., Endou H., Molecular physiology of renal organic anion transporters, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290: 251-261
- Serrano M.A., Macias R.I., Briz O., Monte M.J., Blazquez A.G., Williamson C., Kubitz R., Marin J.J., Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta, *Placenta*, 2007, 28: 107-117
- Shani N., Valle D., A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters, *Proc Nat Acad Sci*, 1996, 93: 11901-11906
- Scheffer G.L., Kool M., de Haas M., de Vree J.M., Pijnenborg A.C., Bosman D.K., Elferink R.P., van der Valk P., Borst P., Scheper R.J., Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3, *Lab Invest*, 2002, 82: 193-201
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 1995, 270: 467-70
- Schmitz G., Langmann T., Heimerl S., Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism, *J Lipid Res*, 2001, 42: 1513-1520
- Schutzbank T.E., Stern H.J., Principles and applications of the polymerase chain reaction, *J Int Fed Clin Chem*, 1993, 5: 96-104
- Silbernagl S., Lang F., Atlas patofyziologie člověka, Grada Publishing, 2001, 1. české vydání, str. 162-163, ISBN: 80-7169-963-3
- Singaraja R.R., Visscher H., James E.R., Chroni A., Coutinho J.M., Brunham L.R., Kang M.H., Zannis V.I., Chimini G., Hayden M.R., Specific mutations in ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro, *Circ Res*, 2006, 99: 389-397
- Smit J.J., Mol C.A., van Deemter L., Wagenaar E., Schinkel A.H., Borst P., Characterization of the promoter region of the human MDR3 P-glycoprotein gene, *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1261: 44-56
- Ståhlberg A., Håkansson J., Xian X., Semb H., Kubista M., Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification, *Clin Chem*, 2004, 50: 509-515

Steitz T.A., DNA Polymerases: Structural diversity and common mechanisms, *J Biol Chem*, 1999, 274: 17395-17398

Sugiura T., Kato Y., Tsuji A., Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition, *J Control Release*, 2006, 116: 238-246

Suchy F.J., Ananthanarayanan M., Bile salt excretory pump: biology and pathobiology, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006, 43: S10-S16

Sun H., Dai H., Shaik N., Elmquist W.F., Drug efflux transporters in the CNS, *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 83-105

Sun H., Frassetto L., Benet L.Z., Effects of renal failure on drug transport and metabolism, *Pharmacol Ther*, 2006, 109: 1-11

Sun M., Kingdom J., Byczyk D., Lye S.J., Matthews S.G., Gibb W., Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation, *Placenta*, 2006, 27: 602-609

Šášik R., Woelk C.H., Corbeil J., Microarray thuths and consequences, *J Mol Endocrinol*, 2004, 33: 1-9

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J., *Metody molekulární biologie*, Masarykova univerzita v Brně, 2005, str. 7-10, 73-82, 121-126, 131-132, 137-148, ISBN: 80-210-3841-1

Štefková J., Poledne R., Hubáček J.A., ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases, *Physiol Res*, 2004, 53: 235-243

Tabcharani J.A., Chang X.-B., Riordan J.R., Hanrahan J.W., Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene, *Nature*, 1991, 352: 628-631

Taipalensuu J., Törnblom H., Lindberg G., Einarsoon C., Sjöqvist F., Melhus H., Garberg P., Sjöström B., Lundgren B., Artusson P., Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299: 164-170

Takayanagi S., Kataoka T., Ohara O., Oishi M., Kuo M.T., Ishikawa T., Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation, *J Exp Ther Oncol*, 2004, 4: 239-246

- Teodori E., Dei S., Martelli C., Scapecchi S., Gualtieri F., The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR), *Curr Drug Targets*, 2006, 7: 893-909
- Thomas P.M., Cote G.J., Wohllk N., Haddad B., Mathew P.M., Rabl W., Aquilar-Bryan L., Gagel R.F., Bryan J., Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy, *Science*, 1995, 268: 426-429
- Tyzack J.K., Wang X., Belsham G.J., Proud C.G., ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner, *J Biol Chem*, 2000, 275: 34131-34129
- Valasek M.A., Repa J.J., The power of real-time PCR, *Adv Physiol Educ*, 2005, 29: 151-159
- Van der Deen M., de Vries E.G., Timens W., Scheper R.J., Timmer-Bosscha H., Postma D.S., ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung, *Respir Res*, 2005, 6: 59
- Van Mil S.W., van der Woerd W.L., van der Brugge G., Strum E., Jansen P.L., Bull L.N., van der Berg I.E., Berger R., Houwen R.H., Klomp L.W., Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11, *Gastroenterology*, 2004, 127: 379-384
- Vaughan A.M., Oram J.F., ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL, *J Lipid Res*, 2006, 47: 2433-2443
- Volk E.L., Farley K.M., Wu Y., Li F., Robey R.W., Schneider E., Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance, *Cancer Res*, 2002, 62: 5035-5040
- Vondrejs V., Genové inženýrství II., Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2001, str. 23-30, 36-37, ISBN: 80-246-0262-8
- Vondrejs V., Genové inženýrství III., Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2003, str. 68-69, ISBN: 80-246-0586-4
- Wada M., Toh S., Taniguchi K., Nakamura T., Uchiumi T., Kohno K., Yoshida I., Kimura A., Sakisaka S., Adachi Y., Kuwano M., Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome, *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 203-207
- Wakaumi M., Ishibashi K., Ando H., Kasanuki H., Tsuruoka S., Acute digoxin loading reduces ABCA8A mRNA expression in the mouse liver, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32: 1034-1041

- Walsh B., Henderson D., Microarrays and beyond: What potential do current and future genomics tools have for breeders?, *J Anim Sci*, 2004, 82: E292-E299
- Wanders R.J., Visser W.F., van Roermund C.W., Kemp S., Waterham H.R., The peroxisomal ABC transporter family, *Pflugers Arch*, 2007, 453: 719-734
- Wenzel J.J., Kaminski W.E., Piehler A., Heimerl S., Langmann T., Schmitz G., ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306: 1089-1098
- White C.A., Salamonsen L.A., A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology, *Reproduction*, 2005, 130: 1-13
- White T.J., Madej R., Persing D.H., The polymerase chain reaction: clinical application. *Adv Clin Chem*, 1992, 29: 161-196
- Wielinga P.R., van der Heijden I., Reid G., Beijnen J.H., Wijnholds J., Borst P., Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells, *J Biol Chem*, 2003, 278: 17664-17671
- Wijnholds J., Drug resistance caused by multidrug resistance-associated proteins, *Novartis Found Symp*, 2002, 243: 69-79
- Yabuuchi H., Shimizu H., Takayanagi S., Ishikawa T., Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288: 933-939
- Yarunin A., Panse V.G., Petfalski E., Dez C., Tollervey D., Hurt E.C., Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins, *EMBO J*, 2005, 24: 580-588
- Yasuda S., Itagaji S., Hirano T., Iseki K., Expression level of ABCG2 in the placenta decreases from the mid stage to the end of gestation, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69: 1871-1876
- Yesilkaya H., Meacci F., Niemann S., Hillemann D., Rüsç-Gerdes S., LONG DRUG Study Group, Barer M.R., Andrew P.W., Oggioni M.R., Evaluation of molecular-beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed *Mycobacterium tuberculosis* DNA extracts, *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 3826-3829
- Yoshikawa M., Yabuuchi H., Kuroiwa A., Kegami Y., Sai Y., Tamai I., Tsuji A., Matsuda Y., Yoshida H., Ishikawa T., Molecular and cytogenetic characterization of the mouse ATP-binding cassette transporter Abcg4, *Gene*, 2002, 293: 67-75

- Yousif S., Marie-Claire C., Roux F., Scherrmann J.M., Decleves X., Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy, *Brain Res*, 2007, 1134: 1-11
- Yu L., Hammer R.E., Li-Hawkins J., von Bergmann K., Lutjohann D., Cohen J.C., Hobbs H.H., Disruption of Abcg5/Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion, *Proc Nat Acad Sci*, 2002, 99: 16237-16242
- Zamek-Gliszczyński M.J., Nezasa K., Tian X., Kalvass J.C., Patel N.J., Raub T.J., Brouwer K.L., The important role of Bcrp (Abcg2) in the biliary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in mice, *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 2127-2133
- Zelcer N., Saeki T., Reid G., Beijnen J.H., Borst P., Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3), *J Biol Chem*, 2001, 276: 46400-46407
- Zhang E.Y., Knipp G.T., Ekins S., Swaan P.W., Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates, *Drug Metab Rev*, 2002, 34: 709-750
- Zhang J., Byrne C.D., Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative comparative reverse-transcriptase PCR, *Biochemicals J*, 1999, 337: 231-241
- Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., Sorrentino B.P., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype, *Nat Med*, 2001, 7: 1028-1034
- Zima T., Laboratorní diagnostika, Praha Galén, 2002, 555-557, str. 633, 635, ISBN:80-7262-201-3
- Zimmermann C., Gutmann H., Hruz P., Gutzwiller J.-P., Beglinger C., Drewe J., Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract, *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 219-224
- Zimmerman C., Klein K.C., Kiser P.K., Singh A.R., Firestein B.L., Riba S.C., Lingappa J.R., Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids, *Nature*, 2002, 415: 88-92