



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

# Maciej Studzian

## **Specyficzność substratowa, aktywność i lokalizacja subkomórkowa ludzkiego białka oporności wielolekowej ABCG2**

Substrate specificity, activity and subcellular  
localization of human multidrug resistance protein  
ABCG2

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biologii  
Nowotworów i Epigenetyki

pod kierunkiem  
dr. hab. Łukasza Pułaskiego, prof. UŁ

Składam najserdeczniejsze podziękowania Promotorowi  
Dr hab. Łukaszowi Pułaskiemu, prof. UŁ, za jego bezcenną pomoc.  
Na każdym etapie pracy służył mi radą i był niezłomnym towarzyszem w dyskusjach.  
Dziękuję mu również za naukę strzelania do rzutków.

Chciałbym również podziękować wszystkim  
Pracownikom Katedry Biologii Nowotworów i Epigenetyki,  
dzięki którym praca przebiegała w rodzinnej atmosferze.

Dziękuję także wszystkim pozostałym  
Pracownikom Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ,  
którzy motywowali mnie i wspierali na każdym kroku.

Pragnę również złożyć najcieplejsze podziękowania mojej ukochanej Rodzinie,  
a także najcudowniejszym Przyjaciołom,  
bo bez ich troski, wsparcia i nieustannej motywacji  
ta praca nie miałaby szans powstać.

*“Shooting skeet eight hours a month was excellent training for them.  
It trained them to shoot skeet.”*

– Joseph Heller, “Catch-22”

Lista skrótów:

ABC – kasetka wiążąca ATP (ang. ATP-binding cassette)

AP – fotowycielenie akceptora (ang. acceptor photobleaching)

BiFc – dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (ang. bimolecular fluorescence complementation)

BSA – albumina surowicy bydźcej (ang. bovine serum albumin)

CAS – Służba Abstraktów Chemicznych (ang. Chemical Abstracts Service)

CRAC – sekwencja konsensusu rozpoznawania cholesterolu (ang. cholesterol recognition amino acid consensus)

cryo-EM – kriomikroskopia elektronowej (ang. cryogenic electron microscopy)

CtxB – podjednostka B toksyny cholery (ang. cholera toxin subunit B)

DPBA – ester 2-aminoetylowy kwasu difenylborinowego (ang. diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester)

ECL – pętla zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular loop)

FBS – płodowa surowica bydźca (ang. fetal bovine serum)

FLIM – obrazowanie czasu życia fluorescencji (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy)

FRET – Försterowski rezonansowy transfer energii (ang. Förster resonance energy transfer)

FTC – fumitremorgina C

HCS – testy przesiewowe o wysokiej zawartości danych (ang. high-content screening)

ICL – pętla wewnątrzkomórkowa (ang. intracellular loop)

LacCer C5 – laktozyloceramid C5

m $\beta$ CD – metylo- $\beta$ -cyklodekstryna

NBD – domena wiążąca nukleotyd (ang. nucleotide binding domain)

Tf – transferyna

TfR – receptor transferyny

TMD – domena transbłonowa (ang. transmembrane domain)

TMR – tetrametylorodamina

PMT – tuba fotopowielacza (ang. photomultiplier tube)

PBST – sól fizjologiczna buforowana fosforanem + Tween 20 (ang. phosphate-buffered saline + Tween 20)

PI3K – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase)

ROI – region zainteresowania (ROI, ang. region of interest)

SAR – związek struktura-aktywność (ang. structure–activity relationship)

SE – uwrażliwiona emisja (SE, ang. sensitized emission)

SP – populacja boczna (ang. side population)

TGN – sieć trans-Golgi (ang. trans-Golgi network)

TM – transmembrane helix

UTR – sekwencja niepodlegająca translacji

## Streszczenie

Ludzkie białko oporności wielolekowej ABCG2 należy do nadrodziny białek ABC, będącej jedną z najliczniejszych grup białek błonowych, występującą u wszystkich organizmów żywych. U człowieka białko ABCG2 funkcjonuje jako transporter wielu substancji o znaczeniu fizjologicznym – metabolitów, składników pożywienia, leków. Jego aktywność ma znaczenie w farmakokinetyce leków i innych ksenobiotyków, w farmakologicznych oddziaływaniach lek-lek, pożywienie-lek i pożywienie-pożywienie, a szczególnie w funkcji tkanek barierowych (nie pozwalających toksynom dostawać się do szczególnie wrażliwych miejsc organizmu). Dodatkowo białko ABCG2 jest jednym z trzech transporterów z nadrodziny ABC, dla których postuluje się udział w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów. Podczas gdy dla prawidłowego funkcjonowania zdrowych tkanek barierowych jego ekspresja jest nieodzowna, jego patologiczna nadekspresja w komórkach zmienionych nowotworowo może być odpowiedzialna za zniesienie ich wrażliwości na chemioterapeutyki, a w konsekwencji za niepowodzenie leczenia.

Choć literatura przedmiotu bogata jest w informacje dotyczące specyficzności substratowej i mechanizmu aktywności białka ABCG2, nadal wiele ważnych naturalnych substratów pozostaje niezidentyfikowanych, nie potrafimy również formułować ogólnych reguł predykcji oddziaływań ABCG2 ze związkami drobnocząsteczkowymi. Stosunkowo mało wiadomo również o jego biogenezie, losach wewnątrzkomórkowych i mechanizmach regulacji lokalizacji w obrębie komórki. Identyfikacja tych luk w wiedzy, a także w niezbędnym do jej poszerzenia repertuarze metod badawczych, była impulsem do podjęcia badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Wysiłek badawczy skupił się na stworzeniu innowacyjnych narzędzi, niezbędnych do badania aktywności białka ABCG2; na opracowaniu i walidacji metod wykorzystujących te narzędzia i nowoczesne techniki pomiarowe (głównie mikroskopowe); oraz na weryfikacji szczegółowych hipotez dotyczących oddziaływania konkretnych substratów i inhibitorów z ABCG2. W toku prowadzonych prac udało się znacząco poszerzyć paletę dostępnych metod badania biologii białka ABCG2, znacząco zwiększyć liczbę znanych substratów i inhibitorów tego białka, a także poczynić interesujące obserwacje naukowe zwiększające zasób wiedzy o ABCG2 i ogólnie o transporterach błonowych.

Wśród najważniejszych przedmiotów zainteresowania znalazły się: określenie specyficzności substratowej białka w stosunku do znanych oraz nowych związków polifenolowych o potencjalnej aktywności farmakologicznej; zbadanie mechanizmu i kinetyki oddziaływania ABCG2 z wybranymi substratami i inhibitorami; oraz zbadanie subkomórkowej redystrybucji białka ABCG2 w odpowiedzi na zmiany konformacyjne oraz stymulacje farmakologiczne. W pracy zaawansowano szereg technik spektroskopowych i obrazowania biologicznego, opartych w dużej mierze o mikroskopię konfokalną, a także samodzielnie przygotowanych

materiałów modelowych (plazmidów ekspresyjnych, linii komórkowych). Użyto ich do opracowania nowych, oryginalnych metod badawczych, bez których eksperymentalne przetestowanie założonych hipotez w odniesieniu do trzech obszarów zainteresowania, dotyczących specyficzności substratowej, aktywności i lokalizacji subkomórkowej ABCG2, nie byłoby możliwe.

W wyniku przeprowadzonych prac udało się przystosować metodę derywatywacji fluorescencyjnej flawonoidów za pomocą estru 2-aminoetylowego kwasu difenyloborinowego (DPBA) do badania aktywności transportowej białka ABCG2 w komórkach ssaczy. Umożliwiło to identyfikację kilkudziesięciu flawonoidów, związków naturalnych pochodzenia roślinnego obecnych w żywności, jako nieznanych uprzednio substratów białka ABCG2, z istotnymi implikacjami dla ich farmakokinetyki w organizmie ludzkim. Flawonoid luteolinę udało się zidentyfikować i opisać jako dobry nowo zidentyfikowany substrat modelowy do badania aktywności i inhibicji transportera ABCG2. Zastosowano obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM) do czasowo-rozdzielczej dekonwolucji obrazu, co wykorzystano przy pomiarach aktywności białka ABCG2. Wdrożono również metodę bazującą na pomiarach Försterowskiego rezonansowego transferu energii (FRET) w celu określania powinowactwa substratu do białka transportowego w żywej komórce. Stosując pomiary FRET-FLIM udało się również udowodnić eksperymentalnie oddziaływanie białko-białko między cząsteczkami ABCG2.

Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik obrazowania, opartych o mikroskopię konfokalną, udało się odkryć i dokładnie scharakteryzować nowe interesujące zjawisko: stymulowaną wiązaniem przeciwciała endocytozę ludzkiego białka oporności wielolekowej ABCG2. W wyniku przeprowadzonych badań udało się wyjaśnić, że stabilizacji jednej z możliwych konformacji białka przez przeciwciało następuje szybka internalizacja kompleksu białko-przeciwciało, zachodząca na drodze endocytozy o mechanizmie mieszanym, częściowo zależnym od klatryny, częściowo od cholesterolu. Udało się również wyjaśnić, że internalizowany kompleks trafia do systemu endosomalnego, gdzie ulega częściowo kierowaniu do lizosomów i trawieniu, a częściowo zatrzymaniu w kompartmentach endosomalnym i recyclingowi z powrotem do błony plazmatycznej.

## Summary

The human multidrug resistance protein ABCG2 belongs to the ABC protein superfamily, which is one of the largest groups of membrane proteins found in all living organisms. In humans the ABCG2 protein functions as a transporter for many substances of physiological importance - metabolites, dietary compounds, drugs. Its activity is important for the pharmacokinetics of drugs and other xenobiotics, in pharmacological drug-drug, food-drug and food-food interactions, and especially in the function of barrier tissues (which prevent toxins from reaching particularly sensitive areas of the body). In addition, the ABCG2 protein is one of three transporters from the ABC superfamily, involvement of which is postulated in the phenomenon of multidrug resistance of cancer. While its expression is essential for the proper functioning of healthy barrier tissues, its pathological overexpression in neoplastic cells may be responsible for making them less sensitive to chemotherapeutic agents and consequently for treatment failure.

Although the literature on the subject is rich in data on substrate specificity and mechanism of ABCG2 protein activity, many important natural substrates still remain unidentified, and we are unable to formulate general rules for predicting the interactions of ABCG2 with small molecule compounds. Relatively little is also known about its biogenesis, intracellular fate and mechanisms of regulation of localization within the cell. Identification of these gaps in knowledge, as well as in the repertoire of research methods necessary to expand it, was the impulse for undertaking research described in this doctoral dissertation. The research effort focused on creating innovative tools necessary to study the activity of the ABCG2 protein; on the development and validation of methods using these tools and modern measurement techniques (mainly microscopic ones); and on the verification of detailed hypotheses regarding the interaction of specific substrates and inhibitors with ABCG2. In the course of this work, it was possible to significantly expand the range of available methods for studying the biology of the ABCG2 protein, to considerably increase the number of known substrates and inhibitors of this protein, and to make interesting scientific observations that increased the knowledge base on ABCG2 and membrane transporters in general.

Among the most important foci of interest were: determination of protein substrate specificity in relation to known and new polyphenolic compounds with potential pharmacological activity; researching the mechanism and kinetics of ABCG2 interaction with selected substrates and inhibitors; and investigation of subcellular redistribution of the ABCG2 protein in response to conformational changes and pharmacological stimuli.

The described work led to development a number of spectroscopic and biological imaging techniques, largely based on confocal microscopy, as well as self-prepared model materials (expression plasmids, cell lines). They were used to develop new, original research methods,

without which it would not be possible to experimentally test the assumed hypotheses in relation to the three areas of interest: substrate specificity, activity and subcellular localization of ABCG2.

As a result of conducted work, it was possible to adapt the method of fluorescent derivatization of flavonoids using diphenylboronic acid 2-aminoethyl ester (DPBA) to study the transport activity of the ABCG2 protein in mammalian cells. This made possible the identification of several dozen flavonoids, natural compounds of plant origin present in food, as previously unknown substrates of the ABCG2 protein, with significant implications for their pharmacokinetics in the human body. The flavonoid luteolin has been identified and described as a good newly identified model substrate for studying the activity and inhibition of the ABCG2 transporter. Fluorescence lifetime imaging (FLIM) was used for time-resolved deconvolution of the image, which was used to measure the activity of the ABCG2 protein. A method based on Förster resonance energy transfer (FRET) measurements was also implemented to determine the affinity of the substrate for the transport protein in a living cell. Using FRET-FLIM measurements, it was also possible to experimentally prove the protein-protein interaction between ABCG2 molecules.

Thanks to the use of advanced imaging techniques based on confocal microscopy, it was possible to discover and characterize a new interesting phenomenon: antibody binding-stimulated endocytosis of the human multidrug resistance protein ABCG2. As a result of conducted research, it was possible to explain that the stabilization of one of possible conformations of the protein by the antibody is followed by rapid internalization of the protein-antibody complex, which occurs by endocytosis with a mixed mechanism, partly dependent on clathrin, partly on cholesterol. It was also possible to explain that the internalized complex goes to the endosomal system, where it is partly directed to lysosomes and digested, and partly retained in the endosomal compartment and recycled back to the plasma membrane.



# Spis treści:

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>4</b>
1.1. Białko ABCG2 jako transporter z nadrodziny ABC .....	4
1.1.1. Ogólna charakterystyka nadrodziny ABC .....	4
1.1.2. Struktura i funkcja domeny wiążącej ATP w białkach z nadrodziny ABC .....	7
1.1.3. Historia odkrycia ludzkiego białka ABCG2 .....	9
1.2. Gen białka ABCG2 .....	9
1.2.1. Ogólna charakterystyka ludzkiego genu <i>ABCG2</i> .....	9
1.2.2. Promotor genu <i>ABCG2</i> .....	10
1.2.3. Polimorfizmy genu <i>ABCG2</i> oraz ich wpływ na aktywność transportera .....	13
1.2.3.1. Polimorfizmy w regionach kodujących .....	13
1.2.3.2. Polimorfizmy w regionach niekodujących .....	16
1.3. Struktura białka ABCG2 .....	17
1.3.1. Ogólna charakterystyka drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury białka ABCG2 .....	17
1.3.2. Prawdopodobne miejsca oddziaływania z substratami i inhibitorami .....	21
1.3.3. Prawdopodobny przebieg cyklu katalitycznego białka ABCG2 .....	24
1.3.4. Cholesterol jako regulator struktury i aktywności białka ABCG2 .....	27
1.4. Ekspresja białka ABCG2 .....	28
1.4.1. Lokalizacja subkomórkowa białka ABCG2 .....	28
1.4.2. Ekspresja białka ABCG2 w tkankach człowieka .....	31
1.5. Specyficzność substratowa białka ABCG2 .....	33
1.5.1. Metody pomiaru aktywności transportowej białka ABCG2 .....	33
1.5.2. Substraty białka ABCG2 .....	37
1.5.2.1. Leki przeciwnowotworowe jako substraty białka ABCG2 .....	37
1.5.2.2. Inne leki jako substraty białka ABCG2 .....	40
1.5.2.3. Pozostałe substraty białka ABCG2 .....	41
1.5.3. Inhibitory białka ABCG2 .....	44
<b>2. CELE PRACY .....</b>	<b>48</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>49</b>
3.1. Materiały .....	49
3.1.1. Odczynniki .....	49
3.1.1.1. Inhibitory .....	49
3.1.1.2. Flawonoidy .....	49
3.1.1.3. Przeciwciała .....	50
3.1.1.4. Odczynniki stosowane do barwienia komórek .....	51
3.1.2. Płytki wielodołkowe do obrazowania .....	51
3.1.3. Plazmidy .....	52
3.1.4. Linie komórkowe .....	53

3.2.	Metody.....	54
3.2.1.	Zasada derywatywacji flawonoidów za pomocą DPBA .....	54
3.2.2.	Wybór flawonoidów do derywatywacji .....	55
3.2.3.	Pomiar stężenia białka .....	59
3.2.4.	Izolacja plazmidów .....	59
3.2.5.	Konstruowanie plazmidów.....	59
3.2.5.1.	Konstruowanie plazmidów pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 i pcDNA6.2- TagGFP2-ABCC2 .....	59
3.2.5.2.	Konstruowanie plazmidu pcDNA6.2-ABCC2-TagGFP2.....	61
3.2.5.3.	Konstruowanie plazmidów pTagRFP-TagGFP2 oraz pmKate2-TagGFP2 .....	62
3.2.5.4.	Mutageneza ukierunkowana plazmidu pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 .....	62
3.2.6.	Hodowla komórkowa .....	62
3.2.7.	Transfekcja chemiczna komórek.....	63
3.2.8.	Transdukcja komórek preparatami bakulowirusów .....	63
3.2.9.	Wyprowadzenie linii HEK-TagGFP2-ABCG2.....	63
3.2.10.	Derywatywacja flawonoidów za pomocą DPBA.....	64
3.2.10.1.	Derywatywacja flawonoidów <i>in vitro</i> .....	64
3.2.10.2.	Derywatywacja flawonoidów w komórkach traktowanych w zawiesinie .....	64
3.2.10.3.	Derywatywacja flawonoidów w komórkach traktowanych flawonoidami w w monowarstwie.....	64
3.2.11.	Pomiar fluorescencji pochodnych flawonoid+DPBA .....	66
3.2.11.1.	Pomiar widm absorpcji oraz widm emisji fluorescencji .....	66
3.2.11.2.	Pomiar intensywności fluorescencji w cieczy .....	66
3.2.11.3.	Pomiar intensywności fluorescencji w monowarstwie komórek.....	66
3.2.11.4.	Pomiar stężenia flawonoidów na podstawie krzywych standardowych .....	66
3.2.12.	Badanie kinetyki inhibicji transportu luteoliny.....	67
3.2.12.1.	Metody eksperymentalne .....	67
3.2.12.2.	Metody obliczeniowe .....	67
3.2.13.	Immunodetekcja białek.....	68
3.2.13.1.	Przygotowanie próbek do techniki Western Blot .....	68
3.2.13.2.	Półilościowe oznaczanie białek techniką Western Blot .....	69
3.2.13.3.	Immunofluorescencyjne barwienie komórek.....	69
3.2.14.	Techniki obrazowania.....	70
3.2.14.1.	Mikroskopia fluorescencyjna – technika testów przesiewowych o wysokiej zawartości danych.....	70
3.2.14.2.	Obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego .....	72
3.2.14.3.	Ilościowa analiza endocytozy za pomocą obserwacji mikroskopowych .....	74
3.2.14.4.	Obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM) .....	75
3.2.14.5.	Czasowo-rozdzielcza dekonwolucja obrazu FLIM.....	76
3.2.14.6.	Oznaczanie intensywności Försterowskiego rezonansowego transferu energii przy użyciu FLIM (FRET-FLIM) .....	76
3.2.15.	Statystyczna analiza danych .....	79

<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>80</b>
4.1. Badanie specyficzności substratowej ABCG2 .....	80
4.1.1. Fluorescencyjna derywatywacja flawonoidów za pomocą DPBA .....	80
4.1.1.1. Badanie zjawiska fluorescencyjnej derywatywacji flawonoidów za pomocą DPBA .....	80
4.1.1.2. Wybór flawonoidów ulegających derywatywacji fluorescencyjnej za pomocą DPBA.....	85
4.1.2. Badanie aktywności transportowej ludzkiego białka ABCG2 z wykorzystaniem flawonoidów jako substratów .....	87
4.1.2.1. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez oznaczanie stężenia flawonoidu w lizatach komórkowych otrzymywanych z zawiesiny komórek .....	87
4.1.2.2. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez oznaczanie stężenia flawonoidu w lizatach komórkowych przygotowywanych z monowarstwy .....	92
4.1.2.3. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez bezpośrednie oznaczanie substratu wewnątrz komórek w monowarstwie .....	100
4.1.2.4. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez bezpośredni pomiar stężenia flawonoidu wewnątrz pojedynczych komórek.....	103
4.1.3. Poszukiwanie nowych substratów do transportu .....	106
4.1.4. Testy przesiewowe inhibitorów.....	113
4.1.5. Badanie wpływu mutacji punktowych białka ABCG2 na jego aktywność .....	115
4.1.6. Badanie kinetyki inhibicji transportu luteoliny przez Ko143 .....	118
4.1.7. Poszukiwanie substratów ABCG2 metodą wysokoprzepustową .....	121
4.2. Badanie oddziaływań białko-białko oraz białko-substrat.....	132
4.2.1. Badanie oddziaływań białko-białko .....	132
4.2.1.1. Wybór pary białek fluoryzujących do badania oddziaływań .....	132
4.2.1.2. Badanie oddziaływań ABCG2-ABCG2 .....	134
4.2.2. Badanie oddziaływań białko-substrat.....	138
4.2.2.1. Badanie oddziaływań ABCG2-mitoksantron i ABCC2-mitoksantron.....	138
4.2.2.2. Badanie oddziaływań ABCG2-flawonoid .....	144
4.3. Badanie zmian w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołanych inhibitorami.....	150
4.3.1. Zmiany w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołane drobnocząsteczkowymi inhibitorami białka ABCG2.....	150
4.3.2. Zmiany w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołane interakcją z przeciwciałem 5D3 .....	155
4.3.2.1. Internalizacja białka ABCG2 stymulowana opsonizacją przez przeciwciało .....	155
4.3.2.2. Farmakologiczna inhibicja endocytozy białka ABCG2 .....	163
4.3.2.3. Kolokalizacja z markerami lokalizacji subkomórkowej .....	172
4.3.2.4. Losy białka ABCG2 po internalizacji .....	177
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>183</b>
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>208</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>209</b>

## ANEKS

# 1. Wstęp

## 1.1. Białko ABCG2 jako transporter z nadrodziny ABC

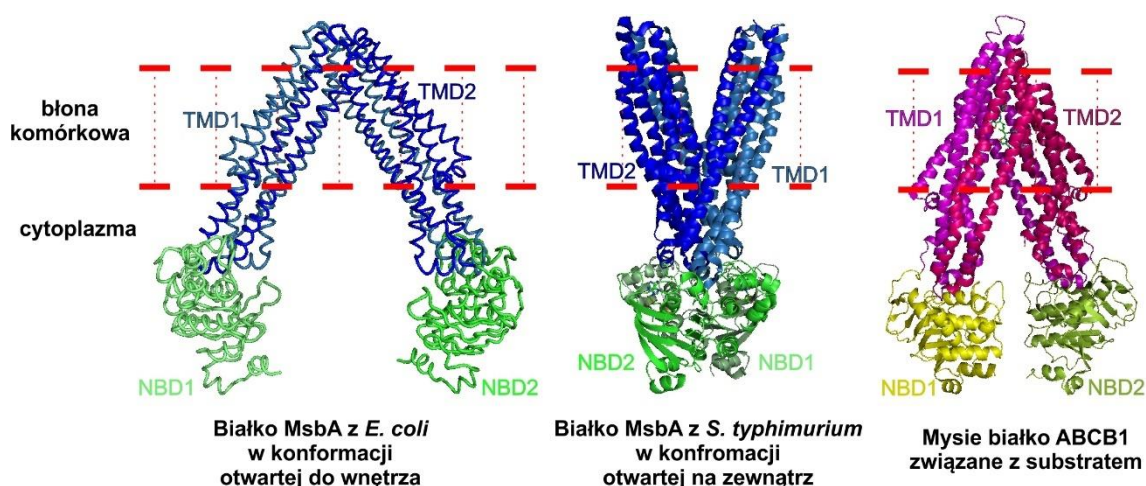
### 1.1.1. Ogólna charakterystyka nadrodziny ABC

Białka z nadrodziny ABC stanowią jedną z największych i najstarszych ewolucyjnie grup białek. Większość z nich pełni funkcję transporterów błonowych. Występują w błonach komórkowych i wewnątrzkomórkowych u wszystkich istot żywych, od najprostszych organizmów jednokomórkowych do złożonych organizmów tkankowych, i umożliwiają wybiórczy transport substancji chemicznych przez te błony (Juan-Carlos i in., 2021). U bakterii i archeonów od 1% do 4,9% liczby genów w genomie stanowią geny białek należących do tej grupy (Huang i Ecker, 2023).

Transportery ABC mogą pełnić zarówno funkcje importerów (umożliwiających aktywny transport wybranych substancji chemicznych do wnętrza komórki lub wnętrza organelli), jak i eksporterów (transportujących w przeciwnym kierunku). W komórkach prokariotycznych transportery ABC, składające się najczęściej z kilku podjednostek, zwiększają (importery) lub zmniejszają (eksportery) stężenie wewnątrzkomórkowe transportowanej substancji. U eukariontów białka te zwykle pełnią funkcję eksporterów, jeśli znajdują się w błonach plazmatycznych (z nielicznymi wyjątkami), natomiast jeśli znajdują się w błonach organelli wewnątrzkomórkowych (np. peroksysom), importują substraty do ich wnętrza (Beis, 2015). Białka ABC transportują przez błony bardzo różnorodne substancje chemiczne, wykorzystując zmiany konformacyjne w swojej strukturze następujące w wyniku związania cząsteczki ATP. Ich substratami są między innymi: jony metali, aminokwasy i peptydy, cukry, tłuszcze, sterydy oraz inne różnorodne pod względem budowy chemicznej metabolity komórkowe, jak również ksenobiotyki (w tym leki) (Lefèvre i Boutry, 2018). Mimo że białka te transportują różne substraty, pełnią wiele funkcji i mają różne lokalizacje komórkowe, cechą wspólną, która je wyróżnia, jest obecność jednorodnej strukturalnie i funkcjonalnie domeny odpowiedzialnej za wiązanie i hydrolizę ATP. Domena ta nazywana jest domeną ABC (ABC, ang. ATP-binding cassette) lub domeną wiążącą nukleotyd (NBD, ang. nucleotide binding domain) - od niej wywodzi się nazwa całej nadrodziny ABC. Drugą domeną, która występuje u większości białek z tej rodziny, jest domena transbłonowa (TMD, ang. transmembrane domain), na którą u transporterów ABC składa się sześć helis o hydrofobowej powierzchni. Umożliwiają one lokalizację białka w błonach biologicznych i są odpowiedzialne za wiązanie oraz translokację substratów. Białka, w których znajduje się tylko jedna domena NBD i jedna domena TMD, są określane mianem półtransporterów, ponieważ do swojej aktywności transportowej białka ABC wymagają obecności dwóch domen każdego rodzaju. Na rycinie 1 pokazano przykładowe modele przestrzenne dwóch pełnych transporterów ABC (zawierających po dwie domeny

każdego z rodzajów w jednym łańcuchu polipeptydowym): prokariotycznego (bakteryjne białko MsbA, flipaza odpowiedzialna za transport lipidu A) oraz eukariotycznego (mysie białko ABCB1, glikoproteina P transportująca ksenobiotyki).

Eukariotyczne białka z nadrodziny ABC zaklasyfikowano do dziewięciu rodzin na podstawie ich wielkości, a także kolejności ułożenia domen (Verrier i in., 2008). Rodziny te nazwano kolejnymi literami od A do I (rycina 2). U człowieka zidentyfikowano 48 genów białek ABC i przypisano je do siedmiu rodzin (od ABCA do ABCG; (Vasiliou i in., 2009)). Podczas gdy u prokariotów białka zawierające wyłącznie NBD (pozbawione TMD) mogą brać udział w transporcie przez błony jako podjednostki większych kompleksów, u eukariotów transportery ABC należą wyłącznie do rodzin zawierających TMD w swojej strukturze, czyli ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCG i ABCH.



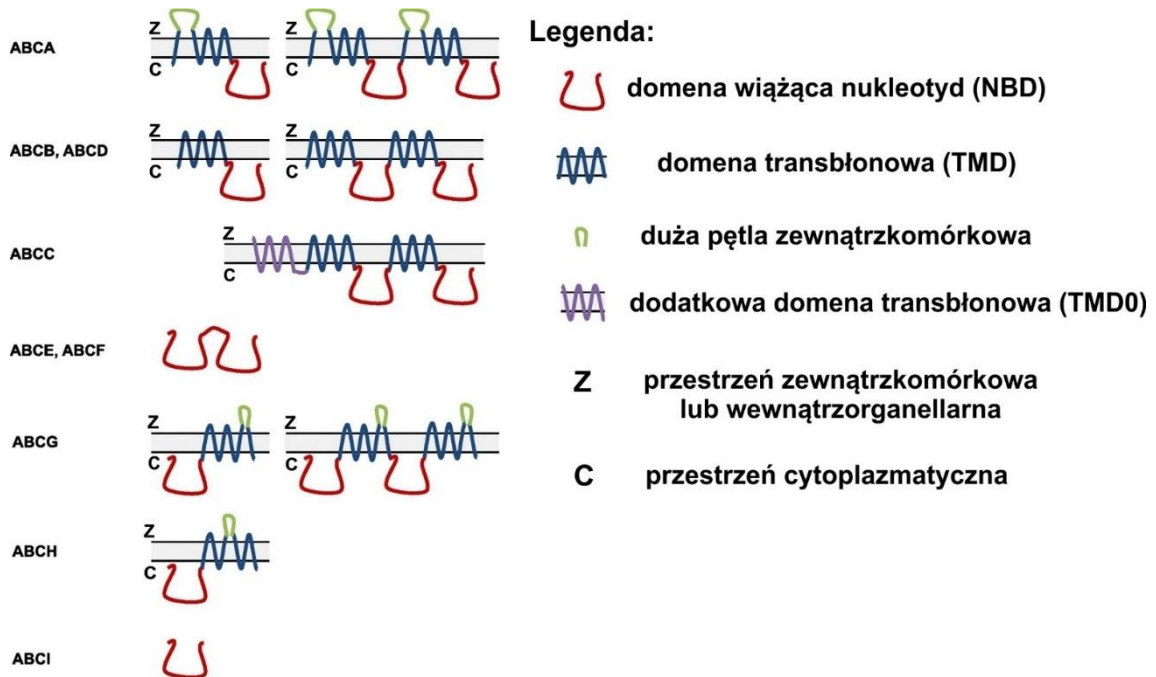
**Rycina 1.** Modele przestrzenne przykładowych białek z nadrodziny ABC. Domeny transbłonowe (TMD) oraz domeny wiążące nukleotyd (NBD) zaznaczono różnymi kolorami oraz ponumerowano. Przygotowano w programie PyMOL na podstawie struktur zdeponowanych w bazie PDB o symbolach identyfikacyjnych kolejno: 3B5W (MsbA, *Escherichia coli*), 3B60 (MsbA, *Salmonella typhimurium*) oraz 4M2T (ABCB1, *Mus musculus*).

Do rodziny ABCA u człowieka należy 12 białek, z których większość jest zaangażowana w transport lipidów. Ich cechą charakterystyczną jest obecność dużej pierwszej pętli zewnątrzkomórkowej w domenie TMD. Do tej rodziny należy największe ludzkie białko ABC, ABCA13. Jego sekwencja zawiera ponad pięć tysięcy aminokwasów.

Rodzina ludzkich transporterów ABCB zawiera 11 białek, z czego 8 jest półtransporterami, a 3 pełnymi transporterami. Należy do niej białko ABCB1 (glikoproteina P) będące najwcześniej zidentyfikowanym transporterem z grupy białek powiązanych ze zjawiskiem oporności wielolekowej komórek nowotworowych (Juliano i Ling, 1976).

Do rodziny ABCC u człowieka należy 12 genów białek ABC. Niektóre z nich charakteryzują się obecnością dodatkowej domeny transbłonowej (TMD0), która znajduje się na N-końcu białka (rycina 2). Wśród tej grupy białek należy wspomnieć o transporterze ABCC1, który

również powiązany jest ze zjawiskiem oporności wielolekowej. Ważnym członkiem tej rodziny transporterów jest także białko CFTR (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) tworzące kanał chlorkowy w błonie komórkowej, którego dysfunkcja powoduje chorobę mukowiscydozę.



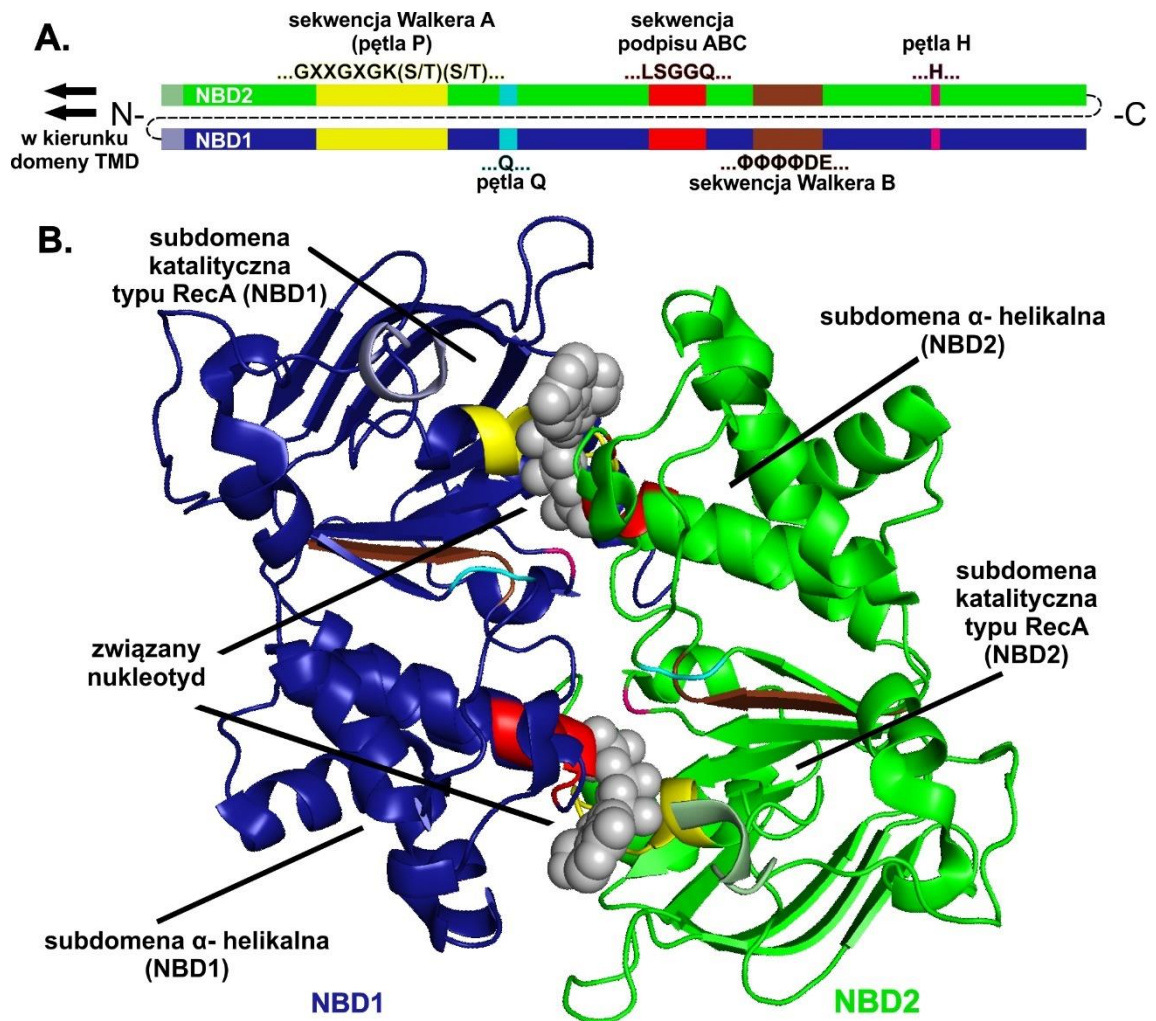
**Rycina 2.** Podział eukariotycznych białek ABC na rodziny w zależności od wielkości, liczby domen oraz ich wzajemnej orientacji. Ułożenie domen w białku jest przedstawione w kolejności od N-końca (lewa strona schematu) do C-końca (prawa strona schematu). Błone komórkową zaznaczono jako szary obszar między dwoma równoległymi odcinkami. Zmodyfikowane na podstawie (Lefèvre i Boutry, 2018).

Rodzina ABCD u człowieka składa się z 4 bardzo podobnych strukturalnie białek będących półtransporterami. Są one zlokalizowane w błonach peroksysomów i zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą prowadzić do chorób metabolicznych (np. zespół Zellwegera). Jedynym przedstawicielem rodziny ABCE u człowieka jest białko ABCE1, które posiada tylko domeny wiążące nukleotyd, stąd nie pełni ono ról transportowych. Podobnie jak białko ABCE1, trzy ludzkie białka z rodziny ABCF nie posiadają domen transbłonowych.

Białka z rodziny ABCG określane są jako transportery o odwrotnej konfiguracji, ponieważ inaczej niż w białkach poprzednich rodzin sekwencja NBD znajduje się przed sekwencją TMD, przy N-końcu polipeptydu. U człowieka opisano 5 genów białek należących do tej rodziny. Do tej rodziny transporterów należy białko ABCG2, ważny transporter zaangażowany m.in. w zjawisko oporności wielolekowej nowotworów. Stanowi ono główny obiekt zainteresowania niniejszej rozprawy doktorskiej.

### 1.1.2. Struktura i funkcja domeny wiążącej ATP w białkach z nadrodziny ABC

Pojedyncza domena wiążąca nukleotydy w białkach ABC ma długość około 250 aminokwasów. Podobieństwo sekwencyjne w obrębie tej domeny dla różnych białek ABC sięga 30-50%, nawet jeśli porównuje się białka prokariotyczne i eukariotyczne (Moore i in., 2023). Tak znaczne podobieństwo sugeruje, że domeny wiążące nukleotydy różnych białek ABC mają bardzo zbliżoną strukturę trzeciorzędową. Takie założenie potwierdzają struktury przestrzenne wszystkich przeanalizowanych do tej pory domen NBD białek ABC.

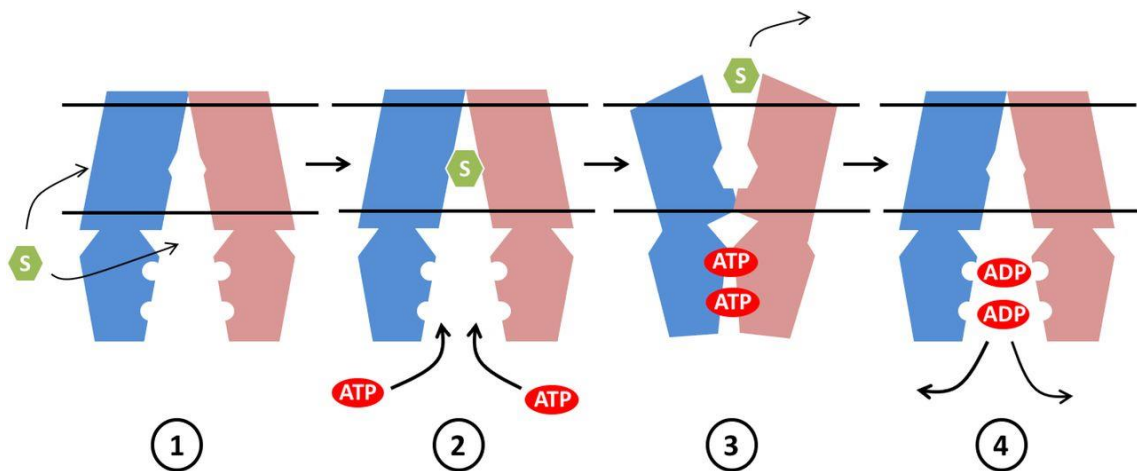


**Rycina 3. A.** Schemat ułożenia motywów sekwencyjnych w strukturze domeny wiążącej nukleotydy (NBD) białek ABC. **B.** Wzajemne ułożenie subdomen oraz motywów w funkcjonalnym kompleksie dwóch domen NBD (oznaczone tymi samymi kolorami jak w panelu A) i dwóch cząsteczek ATP (pokazane na szaro) – na przykładzie struktury przestrzennej kompleksu białka Sav1866 ze *Staphylococcus aureus* z analogiem ATP (AMP-PNP). Źródło: baza PDB numer identyfikacyjny 2ONJ. Opracowano w programie PyMOL.

W obrębie pojedynczej domeny NBD można rozróżnić dwie subdomeny. Większą z nich stanowi subdomena katalityczna, przypominająca strukturą domenę wiążącą nukleotydy bakteryjnego białka RecA, stąd subdomena ta jest określana jako katalityczna typu RecA. W obrębie tej subdomeny zlokalizowany jest charakterystyczny dla niej motyw Walkera A

(nazywany również pętlą P) o sekwencji konsensusowej GXXXXGK-[TS] (X oznacza dowolny aminokwas) oraz motyw Walkera B o sekwencji konsensusowej  $\Phi\Phi\Phi\Phi$ DE ( $\Phi$  oznacza dowolny aminokwas hydrofobowy), który zawiera katalityczną resztę kwasu glutaminowego biorącą udział w reakcji hydrolizy ATP. Strukturę drugorzędową drugiej, mniejszej subdomeny stanowią głównie trzy  $\alpha$ -helisy. W obrębie tej struktury znajduje się sekwencja LSGGQ, będąca znakiem rozpoznawczym białek ABC. Przez to motyw ten jest nazywany w literaturze podpisem ABC (ang. ABC signature) lub inaczej motywem C (rycina 3A). Każda z cząsteczek nukleotydu tworzy po związaniu z domenami NBD strukturę „kanapki”, w której ATP uwięzione jest między dwoma przeciwległymi motywami Walkera A i dwoma sekwencjami podpisu ABC z dwóch różnych domen (rycina 3B).

Domena NBD zawiera również ważną resztę glutaminy znajdującą się w obrębie pętli określanej z tego powodu jako pętla Q. Zwykle jest ona ułożona blisko grup funkcyjnych aminokwasów domeny transbłonowej i przypisuje się jej kluczowe znaczenie w przekazywaniu sygnału o zmianach konformacyjnych między domeną NBD i TMD. Inną ważną częścią strukturalną domeny NBD jest pętla H, która zawiera konserwatywną resztę histydyny oddziałującą z cząsteczką nukleotydu i stabilizującą jego wiązanie (rycina 3A).



**Rycina 4.** Ogólny schemat cyklu katalitycznego białek ABC. Substrat oznaczono symbolem S. Etapy cyklu oznaczono kolejnymi numerami: 1 – wiązanie substratu od strony cytoplazmy lub bezpośrednio z dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, 2 – wiązanie ATP do domen NBD, 3 – zmiana konformacji domeny transbłonowej białka spowodowana związaniem nukleotydu umożliwiającą przeniesienie substratu na drugą stronę błony, 4 – hydroliza ATP i odłączenie ADP umożliwiającą odtworzenie pierwszej konformacji białka. Grafika zmodyfikowana na podstawie (Lefèvre i Boutry, 2018).

Dla zrozumienia funkcjonowania transporterów ABC istotnymi były doświadczenia, w których udowodniono, że motorem aktywności transportowej nie jest proces hydrolizy cząsteczki ATP, lecz samo jej wiązanie do domen NBD (Higgins i Linton, 2004; Jones i George, 2023). Schematyczny przebieg cyklu katalitycznego transportera ABC przedstawiono na rycinie 4. Zgodnie z tym mechanizmem transportu wiązanie substratu od strony cytoplazmy lub od strony dwuwarstwy lipidowej (etap 1) umożliwia zbliżenie się odpowiednich fragmentów domen



NBD i wiązanie ATP (etap 2). Zmiany konformacyjne spowodowane wiązaniem nukleotydu w domenach NBD wymuszają zmiany konformacyjne w domenie transbłonowej, do której wiązany jest substrat. Powoduje to, że substrat ulega translokacji na drugą stronę błony komórkowej (etap 3). W ostatnim etapie cyklu (etap 4) reakcja hydrolizy cząsteczki ATP umożliwia rozłączenie się domen NBD transportera i ponowne przyjęcie początkowej konformacji białka (określanej jako otwarta do wewnątrz), w której może się związać kolejna cząsteczka substratu.

### **1.1.3. Historia odkrycia ludzkiego białka ABCG2**

Sekwencja kodująca ludzkie białko ABCG2 została po raz pierwszy sklonowana w 1998 roku niemal równocześnie przez trzy grupy badawcze. Badacze z Uniwersytetu Maryland z grupy profesora D. Rossa pierwsi opisali sekwencję kodującą tego białka. Badali komórki nowotworu piersi linii MCF-7/AdVP3000, które wykazywały oporność wielolekową, lecz nie posiadały ekspresji innych znanych wówczas transporterów odpowiedzialnych za to zjawisko (tj. białek ABCB1 i ABCC1). Nowo opisane białko, nadające komórkom oporność na szereg leków stosowanych w chemioterapii nowotworu piersi, zostało przez nich nazwane białkiem BCRP, to jest białkiem oporności nowotworu piersi (ang. breast cancer resistance protein) (Doyle i in., 1998). Niedługo później, w grupie profesor S. Bates, cDNA dla białka ABCG2 uzyskano również z odpornej na mitoksantron linii nowotworu jelita grubego S1-M1-80, stąd białku nadano wtedy nazwę MXR (ang. mitoxantrone resistance) (Miyake i in., 1999). Równolegle naukowcy z Narodowego Instytutu Raka z grupy profesora M. Deana opisali identyczne białko transportowe, któremu ze względu na wysoki poziom ekspresji w łożysku nadali nazwę ABCP (ang. ATP-binding cassette placenta) (Allikmets i in., 1998). Od tego czasu aktywność białka ABCG2 wiązano z szeregiem istotnych procesów fizjologicznych, przez co nadawano mu jeszcze między innymi takie nazwy jak: BMRP (białko oporności wielolekowej mózgu; ang. brain multidrug resistance protein), ABC15 (15 opisany ludzki transporter z rodziny ABC), CD338 (338 antygen różnicowania komórkowego), GOUT1 (jako czynnik odpowiedzialny za niektóre formy dny moczanowej) (Arnaud, 2012; Eisenblätter i in., 2003; Woodward i in., 2009). W literaturze najczęściej używane są dwie nazwy tego białka: systematyczna ABCG2, która odpowiada nazwie genu, oraz zwyczajowa BCRP, ponieważ taką nazwę nadali białku odkrywcy, którzy jako pierwsi opisali jego sekwencję.

## **1.2. Gen białka ABCG2**

### **1.2.1. Ogólna charakterystyka ludzkiego genu ABCG2**

Ludzkie białko ABCG2 jest kodowane przez gen *ABCG2* o wielkości ponad 141 tysięcy par zasad. Gen *ABCG2* jest ułożony w orientacji antysensowej na chromosomie czwartym

w drugim prążku drugiego regionu długiego ramienia tego chromosomu na pierwszym podprążku (pozycja 4q22.1) (Huang i Ecker, 2023). Gen *ABCG2* składa się z 16 egzonów oraz 15 intronów. Egzony mają długość od 60 do 532 par zasad. Sekwencje intronów mają długość od 587 do ponad 18000 par zasad. Wszystkie introny posiadają klasyczne sekwencje miejsca donorowego (GT na końcu 5') i miejsca akceptorowego (AG na końcu 3') składania genu. Miejsce inicjacji translacji znajduje się w egzonie drugim genu *ABCG2*, a znaczna większość sekwencji 5' niepodlegającej translacji (5'-UTR, ang. 5'-untranslated region) znajduje się w pierwszym egzonie i posiada szereg sekwencji regulatorowych (Nakanishi i in., 2006). Sekwencja stop znajduje się w egzonie 16 genu. Sekwencja 3' niepodlegająca translacji (3'-UTR, ang. 3'-untranslated region) genu zawiera miejsca wiązania dla mikroRNA (To i in., 2011).

W genomie człowieka zidentyfikowano trzy fragmenty DNA stanowiące pseudogeny genu *ABCG2*. Pierwszy z pseudogenów o długości 2220 par zasad jest zlokalizowany na chromosomie drugim (pozycja 2q36.3). Drugi pseudogen ma 583 par zasad i znajduje się na chromosomie czternastym (pozycja 14q34.3). Trzeci fragment DNA stanowiący pseudogen dla *ABCG2* ma długość 1470 par zasad i znajduje się na chromosomie 15 (pozycja 15q23). Wiadomo, że podlega on transkrypcji (Piehler i in., 2008). Dotychczas nie ustalono, czy powyższe pseudogeny mają jakiegokolwiek znaczenie regulatorowe, czy też stanowią jedynie ewolucyjny ślad powielenia fragmentów funkcjonalnego genu *ABCG2*.

### **1.2.2. Promotor genu *ABCG2***

Sekwencja bazalnego promotora genu *ABCG2* ma długość 312 par zasad licząc od miejsca inicjacji transkrypcji (pozycja +1 genu) i nie posiada kasety TATA (Kukal i in., 2021). W sekwencji tej znajduje się kasetta CCAAT (miejsce wiązania czynników C/EBP) oraz po kilka miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych SP1, AP1 i AP2. Znajduje się tu także miejsce wiązania dla receptora węglowodorów aromatycznych (Tan i in., 2010; To i in., 2011) oraz wspólny region wiązania się receptorów progesteronu (Wang i in., 2008) oraz estrogenów (Ee i in., 2004). Na przestrzeni około 430 par zasad powyżej miejsca inicjacji transkrypcji znajdują się również sekwencje wiązania czynników HIF-1 (Krishnamurthy i in., 2004), czynników odpowiedzi antyoksydacyjnej (sekwencja ARE, ang. antioxidant response element, wiążąca czynnik Nrf2) (Singh i in., 2010), jak również kompleksu NF-κB. Dodatkowe elementy regulatorowe promotora rozmieszczone są na długości nawet ponad 100 tysięcy par zasad w regionie powyżej sekwencji genu (Poonkuzhali i in., 2008). W sekwencji promotora genu *ABCG2* opisano dużo polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, jednakże do tej pory znanych jest jedynie kilka rzadko występujących mutacji mających wpływ na poziom ekspresji transportera (Eclov i in., 2018).

Dzięki obecności w promotorze genu *ABCG2* sekwencji wiązania receptora AhR ekspresja transportera jest indukowana przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. benzopireny) oraz polifenole pochodzenia roślinnego (np. flawonoidy takie jak kwercetyna czy chryzyna), związki, które są transportowane przez białko ABCG2 (Ebert i in., 2005, 2007). Inną grupę fizjologicznych substratów tego białka stanowią porfiryny. Zwiększenie ekspresji transportera w warunkach hipoksji jest ważnym elementem homeostazy komórki i ma na celu ochronę przed nagromadzeniem się toksycznych ilości tych kofaktorów w warunkach niedoboru tlenu (Krishnamurthy i in., 2004). Taki mechanizm wzrostu poziomu ekspresji białka ABCG2 funkcjonuje również w komórkach nowotworowych (He i in., 2016).

Zwiększenie poziomu ekspresji białka ABCG2 w komórkach poddanych działaniu ksenobiotyków tłumaczy się między innymi odpowiedzią na stres oksydacyjny, którego źródłem są te związki. Udowodniono, że czynnik transkrypcyjny Nrf2, wiążący się do sekwencji ARE promotora, stanowi efektor takiej odpowiedzi na ksenobiotyki w komórkach wątroby oraz w komórkach nowotworu płuca (Adachi i in., 2007; Singh i in., 2010).

Obecność w sekwencji promotora genu *ABCG2* wspólnego miejsca wiązania dla receptorów progesteronu oraz estrogenu prowadzi do złożonej hormonalnej regulacji ekspresji tego białka, stanowiącego główny transporter bariery krew-łożysko (Imai i in., 2005; Wang i in., 2008). Po związaniu receptora estrogenów na promotorze *ABCG2* ujawnia się miejsce wiązania dla białek z rodziny NF- $\kappa$ B, co prowadzi do synergii obu czynników i znacznego zwiększenia ekspresji białka ABCG2 w odpowiedzi na działanie estrogenów oraz związków prozapalnych (Pradhan i in., 2010).

Wykazano, że ekspresja genu *ABCG2* wzrasta również pod wpływem receptorów z rodziny PPAR (ang. peroxisome proliferator-activated receptor). Jak ustaliła grupa węgierskich badaczy, jest za to odpowiedzialna charakterystyczna sekwencja wzmacniająca o długości 150 par zasad obecna powyżej sekwencji inicjacji transkrypcji, posiadająca fragmenty odpowiedzialne za wiązanie kompleksu receptora PPAR- $\gamma$  i receptora RXR (ang. retinoid X receptor) (Szatmari i in., 2006). Inna grupa badaczy wykazała, że u myszy ekspresja genu *ABCG2* ulega zwiększeniu w jelitach i wątrobie na drodze regulacji transkrypcyjnej przez receptor PPAR- $\alpha$  (Hirai i in., 2007).

Inną grupą czynników odpowiedzialnych za wzrost ekspresji *ABCG2* są hormony należące do rodziny czynników wzrostu. Wzrost ilości mRNA dla *ABCG2* zaobserwowano między innymi w komórkach nowotworów piersi, jajnika oraz komórek raka kolczystokomórkowego głowy i szyi w wyniku stymulacji receptorów nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR i HER2) (Chen i in., 2006; Nakanishi i in., 2010). Czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za aktywację ekspresji genu *ABCG2* (wraz z miejscami ich wiązania) na tej drodze nie zostały do tej pory

jednoznacznie zidentyfikowane. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów jest aktywacja czynnika HIF-1 $\alpha$  za pośrednictwem białka mTOR aktywowanego w szlaku PTEN/PI3K/Akt. Regulację ekspresji białka ABCG2 na tej drodze udowodniono dla szeregu linii komórek nowotworowych, w tym dla populacji nowotworowych komórek macierzystych (Bleau i in., 2009; Hu i in., 2016; Huang i in., 2014).

Większość sekwencji promotora proksymalnego ABCG2 jest bogata w wyspy CpG, których demetylacja koreluje z wysoką ekspresją transportera (Turner i in., 2006). Analiza wzorców modyfikacji histonu H3 między innymi w białaczkach (Robey i in., 2006; Turner i in., 2006), w komórkach raka nerki (To i in., 2006) oraz w komórkach nowotworu jelita grubego i raka piersi (Calcagno i in., 2008) wykazała, że za zwiększenie poziomu ekspresji białka ABCG2 mogą być również odpowiedzialne zmiany stanów metylacji i acetylacji histonu H3 związanego z regionem promotorowym genu ABCG2, wywołane bezpośrednio zastosowaniem leków z grupy inhibitorów deacetylaz histonów (HDACi, ang. histone deacetylase inhibitors) (Hauswald i in., 2009) lub pośrednio w odpowiedzi na zastosowanie innych chemioterapeutyków (np. doksorubicyna) (Calcagno i in., 2008). Według jednej z hipotez, opisujących mechanizm odpowiedzialny za ten efekt, w komórkach o niskiej ekspresji genu ABCG2 histon H3 związany z jego promotorem posiada potrójnie metylowaną resztę lizyny 9. W tym stanie H3 silnie wiąże się z promotorem genu białka ABCG2 i uniemożliwia jego transkrypcję. Inkubacja z chemioterapeutykami w komórkach wrażliwych na ten efekt prowadzi do acetylacji histonu H3 w pozycji lizyny 9 i lizyny 14, potrójnej metylacji lizyny 4 oraz fosforylacji seryny 10. Te modyfikacje prowadzą w konsekwencji do zmian w strukturze chromatyny, przez co umożliwiają efektywne wiązanie się polimerazy RNA do promotora genu ABCG2 i wzrost ekspresji tego transportera (To i in., 2006).

Wiadomo, że za zróżnicowany w zależności od rodzaju komórek lub tkanki poziom ekspresji białka ABCG2 odpowiada również zmienna długość regionu 5'-UTR zlokalizowanego w pierwszym egzonie genu ABCG2. Powstawanie transkryptów posiadających zróżnicowaną długość tego fragmentu spowodowane jest zarówno wykorzystaniem alternatywnych sekwencji promotorowych, jak i różnych miejsc donorowych składania genu w obrębie pierwszego egzonu. Wykorzystanie alternatywnych promotorów genu ABCG2 udowodniono na przykładzie szeregu komórek prawidłowych oraz nowotworowych, ale konkretne czynniki regulujące powstawanie danej izoforny transkryptu nie zostały do tej pory wyjaśnione (Campbell i in., 2011; Nakanishi i in., 2006; Poonkuzhali i in., 2008).

Ważny element regulatorowy stabilności mRNA białka ABCG2 stanowią mikroRNA. Miejsca wiązania dla kilku takich cząsteczek są zlokalizowane w części 3'-UTR genu (Pavlíková i in., 2022). W wielu komórkach nowotworowych wykazujących oporność wielolekową, za którą

odpowiedzialna jest wysoka ekspresja białka ABCG2 (m.in.: MCF-7/FLV1000, SF295/MX2000, H460/MX20, A549/Beca250), skrócenie 3'UTR w mRNA usuwa miejsca wiązania dla miR-519c, co stabilizuje transkrypt i umożliwia bardziej efektywną syntezę tego białka (To i in., 2009). Inne znane cząsteczki mikroRNA regulujące ekspresję ABCG2 to miR-328 oraz miR-520h. Ten ostatni czynnik bierze udział w regulacji ekspresji białka ABCG2 w komórkach macierzystych hematopoezy (Liao i in., 2008). Wykazano również, że jest on odpowiedzialny za zmniejszenie ilości białka ABCG2, a przez to zdolności do migracji i inwazyjności komórek nowotworu trzustki (Wang i in., 2010).

### **1.2.3. Polimorfizmy genu ABCG2 oraz ich wpływ na aktywność transportera**

#### **1.2.3.1. Polimorfizmy w regionach kodujących**

Wkrótce po odkryciu genu ABCG2 w jego sekwencji zidentyfikowano wiele polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism) (Iida i in., 2002). W sekwencji kodującej genu opisano do tej pory setki różnych polimorfizmów, z których większość zmienia sekwencję aminokwasową białka (Móznier i in., 2019; Toyoda i in., 2019). Co ciekawe, już pierwsze sekwencje cDNA genu sklonowanego z dwóch lekoopornych linii komórkowych posiadały punktowe mutacje skutkujące obecnością treoniny lub glicyny w pozycji 482 białka, podczas gdy w referencyjnej sekwencji aminokwasowej transportera, którą ustalono później, znajduje się arginina (mutacja R482G/T) (Doyle i in., 1998; Miyake i in., 1999). Obecność tych mutacji spowodowała zmianę specyficzności substratowej białka ABCG2, co było konsekwencją presji selekcyjnej leków przeciwnowotworowych. Substratami wariantów R482G oraz R482T są na przykład niektóre antracykliny oraz barwnik fluorescencyjny rodamina 123, związki nietransportowane lub bardzo słabo transportowane przez białko ABCG2 o sekwencji referencyjnej (Clark i in., 2006; Honjo i in., 2001).

Analiza sekwencji ABCG2 przeprowadzona na 90 próbkach DNA genomowego pochodzących od pacjentów zróżnicowanych etnicznie wykazała obecność siedmiu polimorfizmów w sekwencjach intronów, trzech polimorfizmów w rejonach UTR, dwóch polimorfizmów nie powodujących zmian w sekwencji aminokwasowej oraz trzech polimorfizmów zmieniających sekwencję aminokwasową białka (Honjo i in., 2002). Mutacje zmieniające sekwencję białka były zlokalizowane odpowiednio w drugim (c.34G>A, V12M, rs2231137), piątym (c.421C>A, Q141K, rs2231142) oraz szesnastym (c.1858G>A, D620N, rs34783571) egzonie genu. Wśród tych trzech polimorfizmów najdokładniej opisano do tej pory warianty białka posiadające mutacje V12M oraz Q141K, ponieważ ich obecność znacząco obniża poziom ekspresji transportera w przejściowo transfekowanych liniach komórkowych (Imai i in., 2002; Mizuarai i in., 2004; Zamber i in., 2003).

Mutacja V12M jest spowodowana jednym z najczęściej występujących polimorfizmów genu białka ABCG2 (średnia częstość allelu to ok. 16%). Polimorfizm ten jest reprezentowany w bardzo zróżnicowany sposób w zależności od przynależności etnicznej. Z największą częstością allel ten występuje wśród rdzennej populacji Meksyku (90%), a także u ludzi pochodzących z wysp Pacyfiku (64%) oraz regionu Azji Południowo-Wschodniej (45%) (Heyes i in., 2018). Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* przez jedną z grup badawczych wykazały, że mutacja V12M powoduje znacząco niższą ekspresję białka ABCG2 w błonach apikalnych komórek spolaryzowanych (Mizuarai i in., 2004). Inne badania wykazały z kolei, że wpływ tej mutacji na aktywność białka był zróżnicowany w zależności od zastosowanego modelu ekspresji (Morisaki i in., 2005). Badania na modelu komórek HEK 293 stabilnie ekspresyjujących ten wariant białka wykazały, że ma ono mniejszą aktywność, ponieważ zawierające je komórki wykazują większą wrażliwość na lek cytostatyczny SN-38 (będący substratem białka ABCG2) niż komórki posiadające dziki wariant białka ABCG2 (Tamura i in., 2007). Do tej pory znaczenie kliniczne tego polimorfizmu jest jednak kwestią sporną (Higashino i in., 2017; Hu i in., 2007).

Mutacja Q141K należy do najlepiej zbadanych naturalnie występujących modyfikacji sekwencji białka ABCG2. Ma ona również wysoką średnią częstość występowania, choć u różnych grup etnicznych kształtuje się ona różnie. Najczęściej polimorfizm ten występuje u Japończyków (średnia częstość allelu to ok. 46 %) i Chińczyków (ok. 34%). U ludzi pochodzenia europejskiego częstość występowania tego polimorfizmu waha się w granicach 9-14%, a u Afroamerykanów oraz ludzi pochodzących z Afryki Subsaharyjskiej wynosi ona mniej niż 5% (de Jong i in., 2004; Imai i in., 2002). Wyniki wielu niezależnie przeprowadzonych badań wykorzystujących różne modele ekspresji wykazują jednoznacznie, że mutacja Q141K powoduje obniżenie ilości produkowanego białka ABCG2 (Furukawa i in., 2009; Imai i in., 2002; Kobayashi i in., 2005; Sarankó i in., 2013). Zamiana obojętnej elektrostatycznie reszty glutaminy na dodatnio naładowaną resztę lizyny w pozycji 141 białka wykazuje podwójnie negatywny efekt na aktywność transportera. Po pierwsze, taka zamiana aminokwasów zlokalizowanych w domenie wiążącej nukleotyd (między sekwencjami Walkera A oraz podpisu ABC) powoduje zmniejszenie aktywności ATPazowej białka ABCG2 (Mizuarai i in., 2004; Morisaki i in., 2005). Po drugie, oddziaływania elektrostatyczne dodatnio naładowanej reszty lizyny w mutancie Q141K z dodatnio naładowanymi resztami bliskich przestrzennie aminokwasów helisy 1a domeny transbłonowej (arginina 383 lub lizyna 382) (László i in., 2016; Polgar i in., 2008; Taylor i in., 2017) prowadzą do zaburzeń w fałdowaniu tego mutantu białka ABCG2, co skutkuje jego degradacją (Furukawa i in., 2009). Obniżona aktywność transportowa mutantu Q141K powoduje, że odpowiadający mu polimorfizm ma duże znaczenie kliniczne. Dobrze udokumentowana jest korelacja jego występowania ze

zwiększonym poziomem kwasu moczowego we krwi i rozwojem dny moczanowej (Cleophas i in., 2017; Higashino i in., 2017; Woodward i in., 2013). U pacjentów posiadających polimorfizm Q141K białka ABCG2 obserwuje się również wyższą aktywność leków przeciwnowotworowych z grupy pochodnych kamptotecyny (Morisaki i in., 2005; Sparreboom i in., 2004), z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych (Fukudo i in., 2013; Li i in., 2007) i innych chemioterapeutyków będących substratami dla ABCG2 (Gervasini i in., 2017; Sobek i in., 2017). Zmieniona jest u nich również farmakokinetyka innych ważnych leków transportowanych przez ABCG2: statyn (Ieiri i in., 2007; Keskitalo i in., 2009; Oh i in., 2013), leków przeciw HIV (Tsuchiya i in., 2016, 2017), doustnych leków przeciwzakrzepowych (Ueshima i in., 2017) oraz leków modyfikujących przebieg chorób o podłożu reumatoidalnym (Kim i in., 2011; Yamasaki i in., 2008).

Wśród innych, słabiej scharakteryzowanych polimorfizmów zlokalizowanych w domenie wiążącej nukleotyd białka ABCG2 znajdują się także inne mutacje zmieniające sekwencję białka: M71V (c.211A>G; rs148475733), R147W (c.439C>T, rs372192400), T153M (c.458C>T; rs753759474), I206L (c.616A>C, rs12721643), F208S (c.623T>C, rs1061018) oraz S248P (c.742T>C, rs3116448). Mutacja M71V występująca w populacji europeoidalnej z umiarkowaną częstotliwością (szacunkowo ok. 1% populacji stanowią heterozygoty) powoduje, że białko ulega znacznie słabszej ekspresji w błonach plazmatycznych, ale zachowuje ono w nich zdolność do transportu substratów (Zámbó i in., 2018). Polimorfizmy odpowiedzialne za mutacje R147W oraz T153W znajdują się niedaleko regionu dobrze scharakteryzowanej mutacji Q141K i prowadzą również do istotnego zmniejszenia poziomu ekspresji białka ABCG2, a także do upośledzenia jego funkcji (Stiburkova i in., 2017). Mutacje I206L oraz F208S znajdują się bardzo blisko katalitycznej reszty kwasu glutaminowego w motywie Walker B (pozycja E211), w związku z tym nie dziwi, że zaburzają one strukturę domeny wiążącej nukleotyd i prowadzą do zwiększonej degradacji białka i utraty funkcji (Skoglund i in., 2014). Co ciekawe, mimo że mutacja I206L powoduje zmniejszenie ekspresji białka ABCG2 w błonach komórkowych, transporter posiadający tę modyfikację wykazuje wyższą aktywność transportową niż dziki wariant białka (Vethanayagam i in., 2005). Komórki, w których ekspresji ulega białko ABCG2 z mutacją S248P, charakteryzuje upośledzona zdolność do transportu porfiryń (Tamura i in., 2006). Mimo iż wykazują one taki sam poziom ekspresji transportera jak komórki, w których białko ma sekwencję referencyjną, są one również znacznie mniej odporne na cytotoksyczny efekt leków takich jak mitoksantron czy SN-38 (Tamura i in., 2007). Do grupy polimorfizmów zlokalizowanych w regionie domeny wiążącej nukleotyd należy również rzadki polimorfizm występujący u pacjentów pochodzenia koreańskiego. Odpowiadająca mu mutacja wprowadza kodon stop w miejscu asparaginy 126 (Q126Stop, c.376C>T, rs72552713), co prowadzi do braku ekspresji funkcjonalnego

transportera (Gotanda i in., 2015; Matsuo i in., 2009). Innym rzadkim polimorfizmem występującym u tej grupy etnicznej pacjentów jest polimorfizm P269S (c.805C>T, rs34678167). Wiadomo, że białko ABCG2 niosące tą mutację ma mniejszą aktywność transportową (Lee i in., 2007).

Inne naturalnie występujące polimorfizmy białka ABCG2 powodują zmiany w sekwencji aminokwasowej domeny transbłonowej oraz pętli zewnątrzkomórkowej: F431L (c.1291T>C, rs750568956), S441N (c.1322G>A, rs758900849), F489L (c.1465T>C, rs192169063), N590Y (c.1768 A>T, rs34264773) oraz D620N (c.1858 G>A, rs34783571). Dwie pierwsze mutacje (F431L i S441N) znajdują się w obrębie drugiej helisy transbłonowej białka, ale w różny sposób wpływają na poziom ekspresji transportera i jego aktywność. Badania *in vitro* wykazały, że mutant F431L, mimo iż wykazuje normalny poziom ekspresji białka, ma upośledzone funkcje transportowe wobec szeregu substratów, między innymi miktoksantronu, SN-38 oraz związków z grupy porfiryn (Tamura i in., 2007). Mutacja S441N jest z kolei odpowiedzialna za znaczną niestabilność struktury domeny transbłonowej, co prowadzi do degradacji proteasomalnej białka i utraty funkcji (Nakagawa i in., 2008; Sjöstedt i in., 2017). Białko posiadające mutację F489L ma zbliżony poziom ekspresji w błonach plazmatycznych do białka o sekwencji referencyjnej, lecz jego aktywność transportowa jest znacząco niższa (Sjöstedt i in., 2017; Tamura i in., 2006). Wyniki pierwszych doświadczeń *in vitro* wykonanych dla białka ABCG2 posiadającego mutację N590Y lub D620N wykazały, że transporter o takich modyfikacjach sekwencji ma wyższy poziom ekspresji, ale niższą aktywność transportową w porównaniu do wariantu dzikiego (Vethanayagam i in., 2005). Obserwacje odnośnie stymulacji ekspresji nie zostały jednak potwierdzone w pracach innych badaczy (Morisaki i in., 2005; Yoshioka i in., 2007).

### **1.2.3.2. Polimorfizmy w regionach niekodujących**

Mutacje w regionach niekodujących również mogą skutkować zmianami w poziomie ekspresji białka, na przykład wpływając na ilość powstającego transkryptu lub modyfikując wydajność procesu wycinania intronów. Do grupy polimorfizmów, które powodują zwiększenie poziomu ekspresji transportera, należą mutacje nc.12283T>C oraz nc.16702C>T. Ten ostatni polimorfizm powoduje powstawanie sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny GATA4 (Rudin i in., 2008). Analiza niekodujących sekwencji genu *ABCG2* przeprowadzona na materiale klinicznym wykazała obecność 49 polimorfizmów zlokalizowanych w intronach (Poonkuzhali i in., 2008). Niektóre z nich wpływają na ekspresję białka ABCG2. Na przykład polimorfizm nc.1143C>T powoduje obniżenie ilości aktywnego transportera oraz wiążące się z tym konsekwencje kliniczne dotyczące odpowiedzi na leczenie erlotynibem lub sorafenibem (Rudin i in., 2008; Tandia i in., 2017). Inne polimorfizmy zlokalizowane w intronach genu



ABCG2, których obecność powodowała lepszą odpowiedź pacjentów na chemioterapię metotreksatem, to nc.5566 C>T oraz nc.3531G>C (Bruhn i Cascorbi, 2014). Mutacja nc.18271G>A miała wpływ na farmakokinetykę flawopirydolu (zwiększenie skuteczności terapii), ale efektu takiego nie zaobserwowano dla innych polimorfizmów w regionach niekodujących: nc.152G>A, nc.10130A>G, nc.14952G>T oraz nc.18271G>A (Ni i in., 2010).

### **1.3. Struktura białka ABCG2**

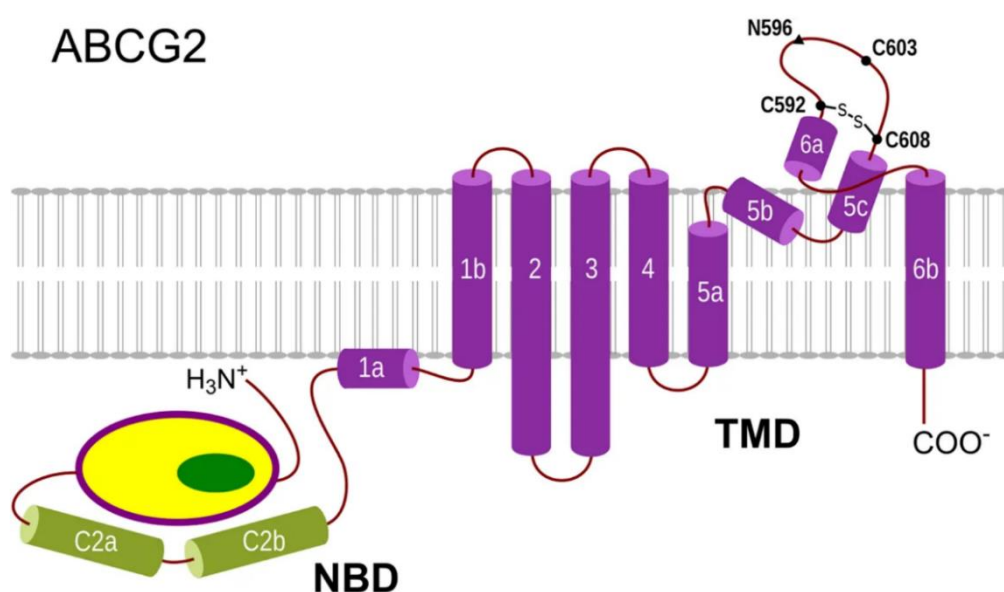
Sekwencja ludzkiego białka ABCG2 składa się z 655 aminokwasów, a teoretyczna masa cząsteczkowa białka wyliczona dla polipeptydu bez modyfikacji potranslacyjnych wynosi około 72 kDa. W sekwencji białka ABCG2 można wyróżnić dwie główne domeny odpowiedzialne za dwie podstawowe aktywności: zdolność do wiązania i hydrolizy cząsteczki ATP (aktywność ATPazowa) oraz zdolność wiązania i transportu przez błony plazmatyczne dużej grupy drobnocząsteczkowych substratów o zróżnicowanej budowie chemicznej. Za aktywność ATPazową odpowiada domena NBD zlokalizowana blisko N-końca białka (aminokwasy 37 – 286). Pojedyncza domena transbłonowa TMD, w której znajduje się miejsce wiązania substratów, umieszczona jest w C-końcowej części białka (aminokwasy 389 – 651).

Pierwszy, mało dokładny model struktury przestrzennej białka ABCG2 skonstruowano w oparciu o zdjęcia z mikroskopu elektronowego (McDevitt i in., 2006). Niska rozdzielczość obrazów uzyskanych wtedy nie umożliwiła opisanie większości struktury drugorzędowej białka. Następne publikacje, w których podjęto próbę modelowania budowy tego transportera, ukazały się dopiero w oparciu o strukturę krystalograficzną otrzymaną dla heterodimerycznej pary ludzkich białek ABCG5/ABCG8 (Lee i in., 2016). Postulując znaczną homologię struktury tych białek do struktury homodimeru białka ABCG2, podejmowano kolejne próby modelowania jego struktury (Ferreira i in., 2017; Khunweeraphong i in., 2017; László i in., 2016). Dokładna struktura przestrzenna dla większości fragmentów białka (niektóre fragmenty polipeptydu pozostają nieustrukturyzowane) w kilku różnych konformacjach ze związanymi i nie związanymi substratami lub inhibitorami została dopiero niedawno scharakteryzowana na podstawie obserwacji prowadzonych za pomocą kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM, ang. cryogenic electron microscopy (Jackson i in., 2018; Manolaridis i in., 2018; Rasouli i in., 2023; Taylor i in., 2017; Yu i in., 2021)).

#### **1.3.1. Ogólna charakterystyka drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury białka ABCG2**

Podobnie jak w innych półtransporterach z rodziny ABCG, domena NBD jest w ABCG2 zlokalizowana w N-końcowej części białka, a następująca po niej domena transbłonowa zawiera sześć helis ułożonych w błonie komórkowej (rycina 5). W białku ABCG2 helisy 1, 5

oraz 6 mają nieciągłą strukturę (posiadają krótkie fragmenty łącznikowe nie mające struktury helisy), co sprawia, że domena TMD zajmuje w dwuwarstwie lipidowej błon znacznie mniejszą objętość i jest dużo ściślej powiązana z domeną NBD niż odpowiadająca jej struktura występująca w innych transporterach, np. w białku ABCB1 (Kapoor i in., 2018; Khunweeraphong i in., 2017). Tym, co wyróżnia białko ABCG2 od innych przebadanych transporterów z rodziny ABC, jest również obecność w domenie TMD bardzo krótkich wewnątrzkomórkowych oraz zewnątrzkomórkowych pętli łączących helisy transbłonowe. Wyjątek stanowi trzecia pętla zewnątrzkomórkowa (ECL3, ang. extracellular loop 3) łącząca trzeci fragment helisy piątej (TM5c, ang. transmembrane helix 5c) z pierwszym fragmentem helisy szóstej (TM6a, ang. transmembrane helix 6a).



**Rycina 5.** Schemat struktury drugorzędowej białka ABCG2. Na schemacie zaznaczono reszty cysteiny biorące udział w tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych oraz międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych (czarne koło) oraz resztę asparaginy ulegającą N-glikozylacji (czarny trójkąt). Rycinę przygotowano na podstawie (Ferreira i in., 2017).

Ponieważ pojedynczy polipeptyd białka ABCG2 zawiera tylko jedną domenę TMD i NBD, funkcjonalny transporter ABCG2, podobnie jak inne półtransportery, musi tworzyć kompleks złożony z przynajmniej dwóch cząsteczek. Już pierwsze badania biochemiczne wykazały, że transporter ten najprawdopodobniej ulega homodimeryzacji, a nie tworzy kompleks z innym ludzkim półtransporterem (jak ma to miejsce np. w przypadku pary białek ABCG5 i ABCG8). Wykazano, że koekspresja aktywnego i nieaktywnego ATPazowo ABCG2 prowadzi do obniżenia aktywności transportowej białka (Kage i in., 2002), a ekspresja heterologiczna ludzkiego ABCG2 w komórkach owadzych umożliwia otrzymanie w pełni funkcjonalnego białka (Ozvegy i in., 2001). Wyniki badań prowadzonych w kolejnych latach udowodniły, że białko ABCG2 może tworzyć w błonach plazmatycznych komórek kompleksy wyższego rzędu,

tn. tworzy funkcjonalne struktury złożone z czterech, ośmiu, a nawet dwunastu pojedynczych polipeptydów (Bhatia i in., 2005; McDevitt i in., 2006; Xu i in., 2004). Równolegle wyniki innych eksperymentów wykazały, że struktura złożona z dwóch podjednostek białka jest już w pełni funkcjonalna (Kage i in., 2002; Litman i in., 2002). Wyniki ostatnio prowadzonych badań, w których wykorzystano techniki pomiarowe wykorzystujące obserwacje pojedynczych cząsteczek transportera znakowanych fluorescencyjnie, dowodzą, że w warunkach fizjologicznych w błonach plazmatycznych komórek dominuje forma złożona z czterech podjednostek białka ABCG2, a dimer jest obecny jedynie w niewielkiej ilości (Wong i in., 2016). Badania biochemiczne wykazały, że za oligomeryzację białka odpowiadają helisa TM5, pętla ECL3 oraz helisa TM6 (Mo i in., 2012; Xu i in., 2007). Prace te udowodniły, że każdy z tych elementów struktury jest wystarczający do wytworzenia międzycząsteczkowych oddziaływań między dwoma polipeptydami białka ABCG2. Wykazano również, że helisa TM5 jest nieodzowna dla aktywności transportera, a helisę TM6 oraz pętlę ECL3 można usunąć nie tracąc aktywności transportowej białka.

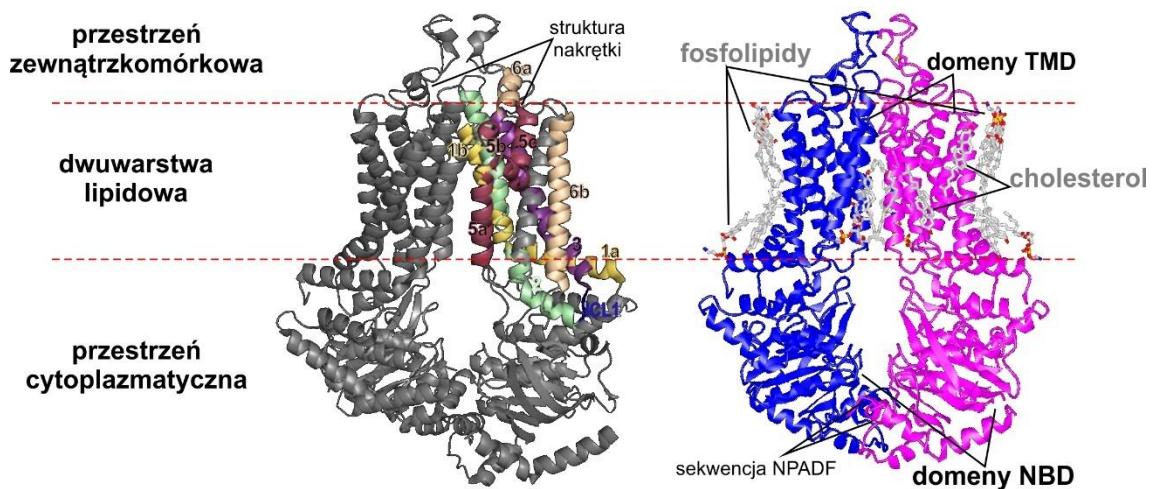
W sekwencji aminokwasowej pętli ECL3 znajduje się reszta asparaginy 596 (N596), będąca miejscem glikozylacji, oraz trzy reszty cysteiny, które są w stanie tworzyć mostki disiarczkowe w dojrzałym białku. Chociaż w komórkach ludzkich białko ABCG2 ulega w trakcie dojrzewania specyficznej N-glikozylacji, modyfikacja ta nie wpływa znacząco na poziom ekspresji białka, na jego lokalizację w błonach plazmatycznych ani na aktywność (Diop i Hrycyna, 2005; Haider i in., 2015).

Wykazano, że między cysteinami 603 dwóch cząsteczek białka ABCG2 (rycina 5) może wytworzyć się mostek disiarczkowy, ale nie ma on znaczenia dla oligomeryzacji białka, ani nie wpływa na jego aktywność transportową (Henriksen i in., 2005; Xu i in., 2007). Co więcej, mutacje punktowe cysteiny 603 udowodniły, że nie jest ona niezbędna dla właściwej ekspresji białka, dla jego prawidłowej lokalizacji wewnątrzkomórkowej oraz zdolności do hydrolizy ATP (Bhatia i in., 2005; Liu i in., 2008). Według niektórych badaczy mostek disiarczkowy tworzący się między tymi cysteinami może być wręcz artefaktem powstającym w trakcie izolacji próbek białka (Xu i in., 2004).

Między resztami cystein 592 i 608 białka ABCG2 tworzy się mostek disiarczkowy (rycina 5). Jego znaczenie dla funkcji białka jest kwestią sporną. Według jednej z początkowych publikacji dotyczących tego tematu wiązanie między tymi resztami cysteiny stanowi kluczowy element strukturalny warunkujący aktywność transportową białka i jego specyficzność substratową (Henriksen i in., 2005). Wyniki innych doświadczeń, w których wspomniane cysteiny w białku zamieniono na alaniny, dowodzą z kolei, że takie warianty białka mają porównywalny poziom ekspresji, lokalizację w błonach plazmatycznych oraz aktywność transportową i ATPazową

stymulowaną obecnością substratów jak białko ABCG2 o sekwencji referencyjnej (Bhatia i in., 2005). Rozbieżności w wynikach uzyskanych przez te dwie grupy badawcze może tłumaczyć inna praca, w której potwierdzono, że wiązanie disiarczkowe tworzące się między cysteiną 592 i cysteiną 608 powoduje stabilizację konformacji syntetyzowanego białka, a w przypadku niektórych modeli ekspresji brak tego wiązania może prowadzić do niewłaściwego fałdowania białka i jego degradacji proteasomalnej (Wakabayashi i in., 2007).

Przestrzeń kluczową dla wiązania i translokacji substratów stanowią oddziałujące ze sobą symetrycznie druga i piąta helisy transbłonowe (TM2 oraz TM5) w dwóch cząsteczkach białka ABCG2 tworzącego dimer (rycina 6). Niezwykle istotne strukturalnie są również helisa trzecia (TM3) oraz fragment helisy 6 zlokalizowany w błonie plazmatycznej (TM6b). Tworzą one powierzchnię oddziaływania między lipidami błony komórkowej a miejscem wiązania substratu, utworzonym przez helisy TM2 i TM5. Pierwsza pętla wewnątrzkomórkowa (ICL1, ang. intracellular loop) domeny transbłonowej, łącząca helisę TM2 i TM3, znajduje się blisko jednej z helis domeny wiążącej nukleotyd, co ma kluczowe znaczenie dla przenoszenia się zmian konformacyjnych z części białka hydrolizującej ATP (domena NBD) na część, w której transportowany jest substrat (domena TMD). W obrębie helisy będącej w bliskim kontakcie z pętlą ICL1 znajduje się reszta glutaminy 141, której naturalnie występująca w populacji mutacja na resztę lizyny (polimorfizm Q141K) skutkuje nieprawidłowym fałdowaniem białka i jego degradacją.



**Rycina 6.** Model przestrzenny struktury ludzkiego białka ABCG2. Helisy domeny transbłonowej (TMD) opisano zgodnie ze schematem pokazany na rycinie 5. Oznaczono lokalizację pierwszej pętli wewnątrzkomórkowej (ICL1) domeny transbłonowej, helisy 5b, 5c i 6a tworzące strukturę nakrętki, sekwencję NPADF, a także umiejscowienie cząsteczek fosfolipidów i cholesterolu. Zmodyfikowano na podstawie (Kapoor i in., 2018) oraz struktury zdeponowanej w bazie PDB o symbolu identyfikacyjnym 6HIJ.

Struktura przestrzenna domeny wiążącej nukleotydy (NBD) białka ABCG2 ma budowę bardzo zbliżoną do analogicznej domeny obecnej w innych białkach z rodziny ABC. Charakterystyczną cechą jest to, że dwie domeny NBD cząsteczek białka ABCG2 tworzących ze sobą dimer pozostają w ścisłym kontakcie nawet w konformacji niezwiązanej z nukleotydem (ATP lub ADP). Za to oddziaływanie odpowiedzialny jest konserwowany wśród białek ABCG2 motyw NPXDF (sekwencja NPADF w białku ABCG2), zlokalizowany w C-końcowej części domeny NBD, która jest również najdalej wysuniętą w kierunku cytoplazmy częścią białka (rycina 6, (Lee i in., 2016; Taylor i in., 2017)). Między sekwencją NPADF a pierwszą częścią pierwszej helisy transbłonowej białka (helisa 1a) znajduje się mało ustrukturyzowany region łącznikowy o długości około 70 aminokwasów, łączący ze sobą domeny NBD i TMD. W obrębie jego sekwencji znajduje się druga sekwencja podobna do sekwencji podpisu ABC (LSGGE, aminokwasy 352–356), niezbędna dla prawidłowego wiązania i hydrolizy ATP, lecz nie wpływająca na specyficzność substratową białka (Macalou i in., 2016). Niewielka helisa 1a następująca w sekwencji białka po tym regionie łącznikowym jest ułożona równolegle do powierzchni błony komórkowej na granicy dwuwarstwy lipidowej oraz przestrzeni cytoplazmatycznej. Na granicy błony komórkowej oraz przestrzeni zewnątrzkomórkowej znajdują się trzy charakterystyczne dla ABCG2 krótkie helisy (5b, 5c, oraz 6a), które łączą ułożone wewnątrz błony helisy 5a oraz 6b tworząc w górnej części dimeru białka strukturę nakrętki (rycina 6).

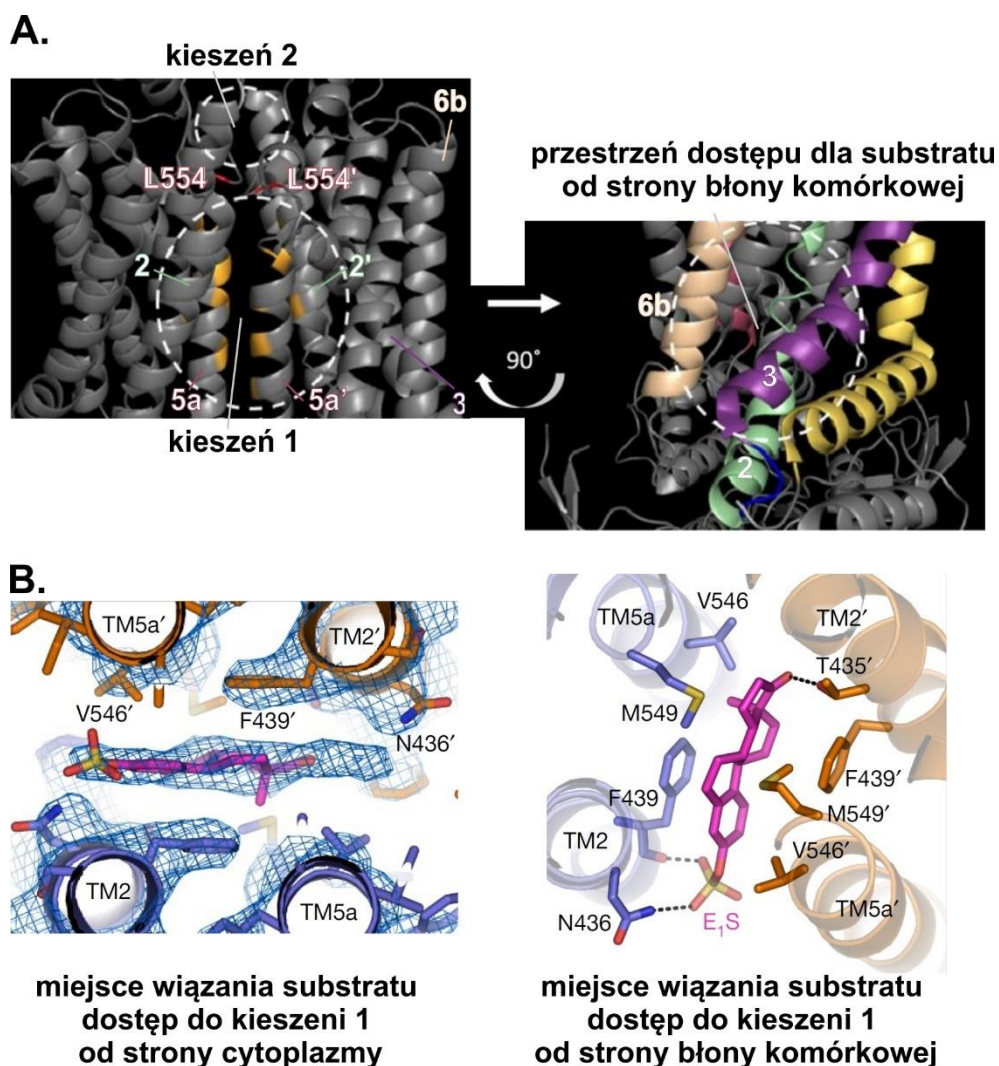
### **1.3.2. Prawdopodobne miejsca oddziaływania z substratami i inhibitorami**

Jak pokazano na rycinie 7A, analiza struktury trzeciorzędowej białka ABCG2, uzyskanej za pomocą cryo-EM, ujawniła w przestrzeniach na granicy dwóch cząsteczek transportera tworzących dimer dwie wyraźne kieszenie (Taylor i in., 2017). Obie kieszenie znajdują się w przestrzeni ograniczonej czterema helisami: TM2 i TM5a z pierwszego polipeptydu ABCG2 oraz TM2' i TM5a' z drugiego polipeptydu ABCG2.

W konformacji białka otwartej do wnętrza (w nieobecności związanego ATP) pierwsza kieszeń jest dostępna od strony cytoplazmy. Zaraz za nią zlokalizowane są dwie reszty leucyny (L554 i L555), które oddzielają kieszeń pierwszą od kieszeni drugiej (dostępnej od strony przestrzeni zewnątrzkomórkowej), tworząc strukturę określaną jako korek leucynowy. Kieszeń druga jest ograniczona od strony przestrzeni zewnątrzkomórkowej za pomocą nakrętki (helisy 5b, 5c i 6a obu polipeptydów dimeru). Ukierunkowana mutageneza każdej z leucyn tworzących korek daje różne rezultaty. Reszta leucyny 555 jest istotna dla strukturalnej integralności białka, ponieważ nie posiadające jej białko nie jest produkowane. Zamiana leucyny 554 na alaninę powoduje z kolei, że powstające białko wykazuje znacznie zwiększoną podstawową aktywność ATPazową oraz mniejszy wzrost tej aktywności po stymulacji substratem

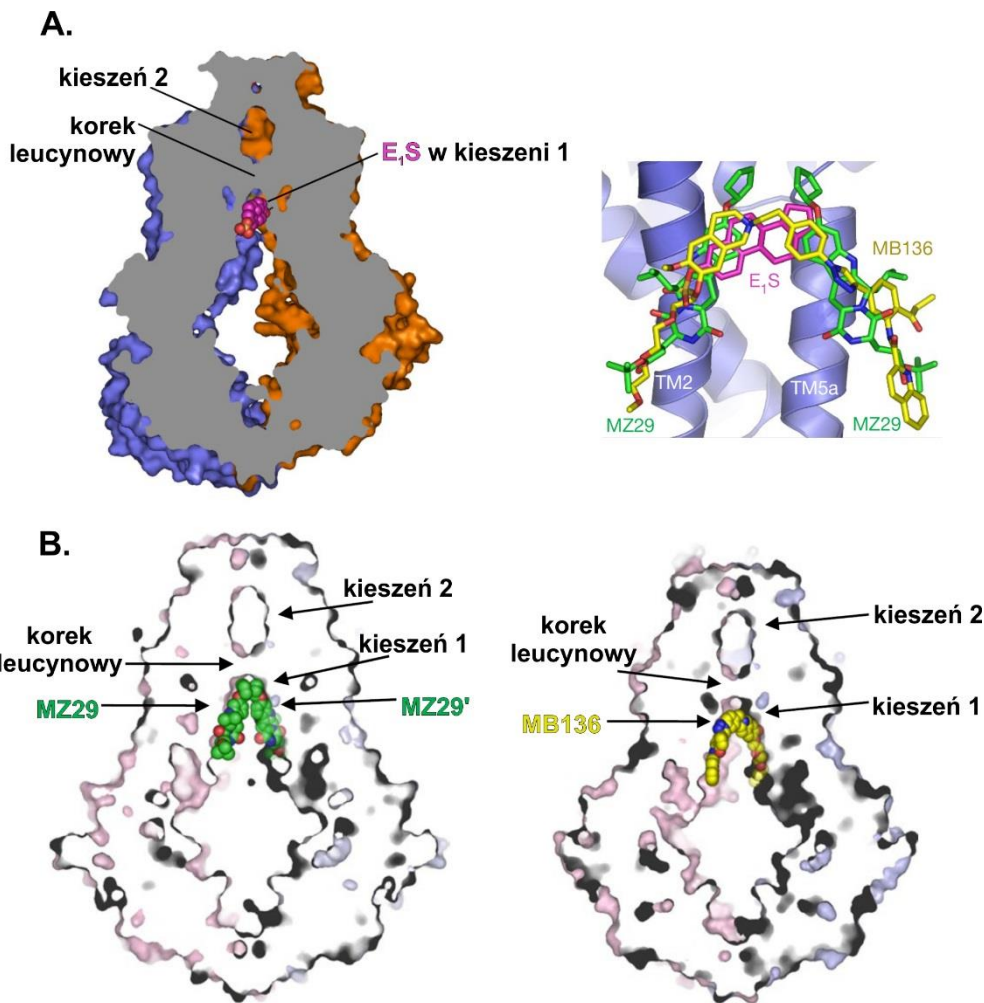
w porównaniu do białka o sekwencji referencyjnej. Klasyczny substrat białka ABCG2, siarczan estronu ( $E_1S$ ), ma mniejsze powinowactwo do białka zawierającego mutację L554A, ale jego transport jest dwukrotnie szybszy (Manolaridis i in., 2018). Wyniki te potwierdzają, że korek leucynowy, którego ważnym elementem jest leucyna 554, stanowi fizyczną barierę rozdzielającą kieszeń pierwszą i drugą, a jego modyfikacje zaburzają funkcjonowanie procesu translokacji substratu między nimi. W konformacji otwartej do wnętrza od strony dwuwarstwy lipidowej otaczającej dimer białka ABCG2 formuje się również przestrzeń dostępu, przez którą hydrofobowe substraty mogą przedostawać się i wiązać do miejsca w kieszeni pierwszej. Przestrzeń ta jest tworzona przez reszty aminokwasów zlokalizowane w helisach TM3 i TM6 (rycina 7A). Mutageneza wybranych, kluczowych aminokwasów znajdujących się w tych helisach powoduje zmianę specyficzności substratowej białka ABCG2 oraz wpływa na jego aktywność transportową w sposób niezależny od aktywności ATPazowej. Mutacje obecnej w helisie TM3 argininy 482 skutkują (w zależności od aminokwasu, na który jest ona zamieniona) zwiększeniem aktywności transportera i poszerzeniem specyficzności substratowej (np. zamiana na glicynę lub treoninę umożliwia transport daunorubicyny) lub też zmniejszeniem aktywności transportowej białka (np. zamiana na lizynę) (Ejendal i in., 2006). Podobnie zamiana na alaninę fenyloalaniny 640 w strukturze helisy TM6 lub metioniny 496 w strukturze helisy TM3 skutkuje poszerzeniem przestrzeni dostępu dla substratu od strony błony plazmatycznej, zmianą specyficzności substratowej (mutant F640A transportuje również daunorubicynę) oraz znacznym zwiększeniem aktywności transportera (np. efektywniejszy transport mitoksantronu) (Cox i in., 2018).

Dzięki analizie gęstości elektronowych kompleksu białka ABCG2 z jego substratem  $E_1S$  zidentyfikowano miejsca wiązania tego substratu do kieszeni pierwszej transportera. Odpowiedzialne są za to zarówno oddziaływania z resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi w kieszeni pierwszej (N546, F439, N436), jak i z resztami aminokwasowymi tworzącymi przestrzeń dostępu od strony błony komórkowej (M549, T435; rycina 7B (Manolaridis i in., 2018; Yu i in., 2021)).



**Rycina 7.** Elementy struktury białka ABCG2 biorące udział w wiązaniu substratu. **(A)** Fragment modelu przestrzennego białka ABCG2 z zaznaczonymi przestrzeniami kieszeni pierwszej i drugiej, resztami leucyn tworzącymi strukturę korka leucynowego oraz przestrzenią dostępu dla substratów dostępną od strony błony komórkowej. **(B)** Oddziaływania grup funkcyjnych reszt aminokwasów biorących udział w wiązaniu substratu E<sub>1</sub>S do białka ABCG2 pokazane od strony cytoplazmy oraz od strony błony komórkowej. Zmodyfikowano na podstawie (Kapoor i in., 2018) i (Manolaridis i in., 2018).

Na podstawie obserwacji prowadzonych za pomocą cryo-EM stwierdzono, że miejsca wiązania dwóch różnych inhibitorów kompetycyjnych białka ABCG2 (MZ29 - pochodnej inhibitora Ko143 oraz M136 - pochodnej tarikwidaru) znajdują się podobnie jak w przypadku E<sub>1</sub>S w przestrzeni kieszeni pierwszej (Jackson i in., 2018). Oddziaływania te różnią się jednak stechiometrią oraz geometrią wiązania cząsteczek. W kieszeni pierwszej utworzonej przez dwie cząsteczki białka ABCG2 mieści się tylko jedna cząsteczka substratu E<sub>1</sub>S i zajmuje ona niewielką część tej kieszeni (rycina 8A). W przypadku inhibitorów w kieszeni pierwszej mieszczą się dwie cząsteczki związku MZ29 lub jedna cząsteczka większego przestrzennie związku MB136 (rycina 8B). Inhibitory zajmują praktycznie całą przestrzeń kieszeni, gdzie wytwarzają silne oddziaływania ze znajdującymi się tam grupami funkcyjnymi reszt aminokwasowych (Jackson i in., 2018; Manolaridis i in., 2018; Yu i in., 2021).

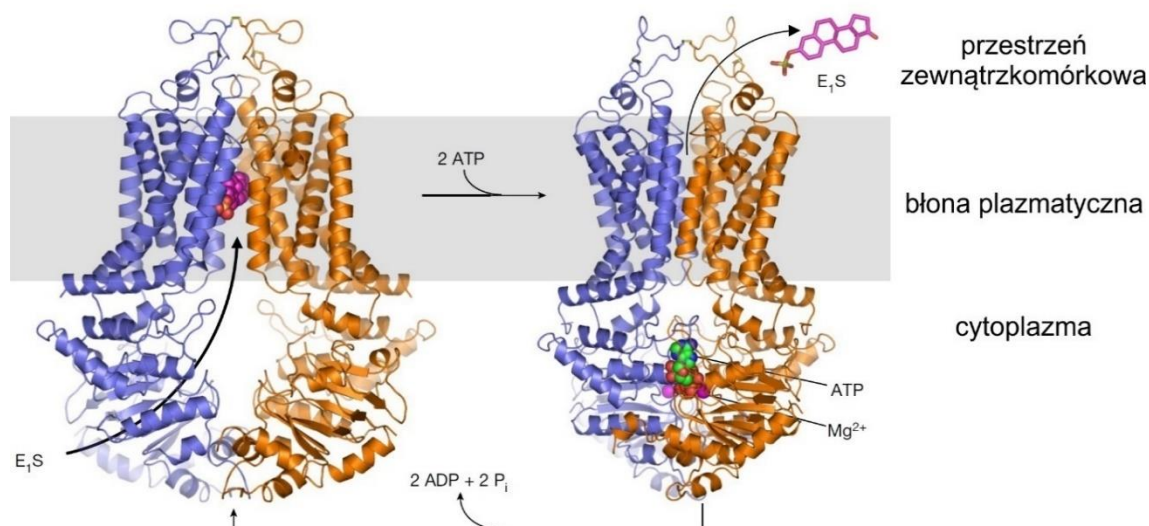


**Rycina 8.** Porównanie miejsc wiązania substratu ( $E_1S$ ) oraz inhibitorów (MZ29 i MB136) do białka ABCG2. (A) Ułożenie cząsteczki  $E_1S$  wewnątrz kieszeni pierwszej transportera; nałożenie miejsc wiązania  $E_1S$  i inhibitorów MZ29 oraz MB136. (B) Ułożenie w modelu struktury przestrzennej białka ABCG2 cząsteczek inhibitora MZ29 (dwie cząsteczki inhibitora związane w kieszeni pierwszej) oraz cząsteczki inhibitora MB136. Zmodyfikowano na podstawie (Jackson i in., 2018) i (Manolaridis i in., 2018).

### 1.3.3. Prawdopodobny przebieg cyklu katalicznego białka ABCG2

W swoim cyklu katalicznym białko ABCG2 zmienia strukturę przestrzenną przechodząc między konformacją otwartą do wnętrza, w której związaniu ulega substrat, a konformacją otwartą na zewnątrz, która wytwarza się pod wpływem związania ATP i jonów magnezu (rycina 9, (Manolaridis i in., 2018; Yu i in., 2021)). Po związaniu ATP zmiany konformacyjne w obrębie domeny NBD białka powodują szereg zmian w konformacji domeny TMD, co skutkuje zamknięciem dostępu do kieszeni pierwszej i translokacją związanego tam uprzednio substratu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.



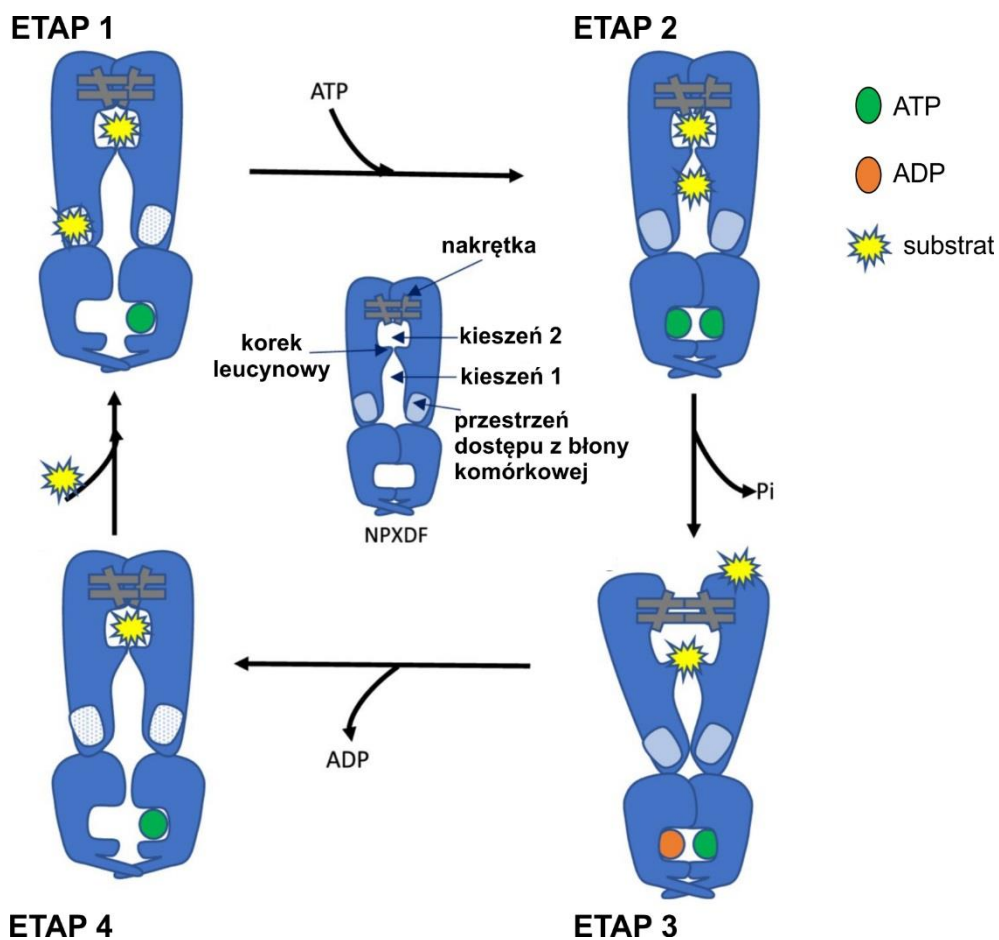


**Rycina 9.** Modele przestrzenne białka ABCG2 w dwóch konformacjach: konformacji otwartej do wnętrza (po lewej) oraz konformacji otwartej na zewnątrz (po prawej) wraz ze schematycznym opisem reakcji transportu substratu (E<sub>1</sub>S). Zmodyfikowano na podstawie (Manolaridis i in., 2018).

Analizując modele przestrzenne białka w dwóch opisanych powyżej konformacjach, a także opierając się na wynikach szeregu doświadczeń biochemicznych badających zmiany aktywności transportowej białka ABCG2 wywołanych odpowiednimi mutacjami punktowymi, grupa badaczy z Uniwersytetu Nottingham zaproponowała prawdopodobny przebieg cyklu aktywności katalitycznej tego białka (rycina 10, (Kapoor i in., 2018)).

W pierwszym etapie cyklu substrat oddziałuje z miejscem wiązania dostępnym od strony błony komórkowej (przestrzeń dostępu z błony). To miejsce oddziaływania wyznaczają grupy funkcyjne reszt aminokwasów wchodzących w skład drugiej, trzeciej oraz szóstej helisy transbłonowej (TM2/3/6, rycina 7A). Takie oddziaływanie substratu z białkiem (może się ono odbywać symetrycznie po obu stronach dimeru) wywołuje zmiany konformacyjne w domenach NBD, co umożliwia związanie ATP. Przyłączenie cząsteczki ATP wymusza zmiany konformacyjne w domenach NDB i TMD, w wyniku czego substrat przesuwany jest do kieszeni pierwszej, a zablokowaniu ulega miejsce wiązania dostępne od strony błony komórkowej (etap 2). Mimo, że nie są znane struktury pośrednich konformacji białka uczestniczących w tym procesie, badania biochemiczne wykazały, że za przekazywanie impulsu allosterycznego z domeny NBD do domeny TMD odpowiedzialne są naładowane grupy funkcyjne reszt aminokwasów pętli ICL1, która pełni rolę molekularnej sprężyny spinającej obie domeny (Khunweeraphong i in., 2017). Podobnie jak w przypadku innych transporterów ABC, związanie cząsteczki ATP do białka stanowi główną siłę napędową dla zmian konformacyjnych, dzięki którym następuje translokacja substratu (Kim i Chen, 2018; McDevitt i in., 2008).

W kolejnym etapie cyklu wraz z hydrolizą cząsteczki ATP wymuszone zostają skoordynowane zmiany konformacyjne w obrębie kieszeni pierwszej i drugiej oraz korka leucynowego, w wyniku czego cząsteczka substratu na zasadzie ruchu perystaltycznego jest przesuwana z kieszeni pierwszej do kieszeni drugiej, a ruch w przeciwnym kierunku jest uniemożliwiony dzięki obecności blokujących reszt leucynowych korka (działających na zasadzie podobnej do zastawki). Równoległe zmiany konformacyjne zachodzące w strukturze nakrętki złożonej z helis 5b, 5c i 6a umożliwiają wydostanie się substratu z kieszeni drugiej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (etap 3). W ostatnim etapie cyklu oddysocjowanie cząsteczki ADP od domeny NBD powoduje zresetowanie układu i przyjęcie ponownie konformacji otwartej do wewnątrz (etap 4).



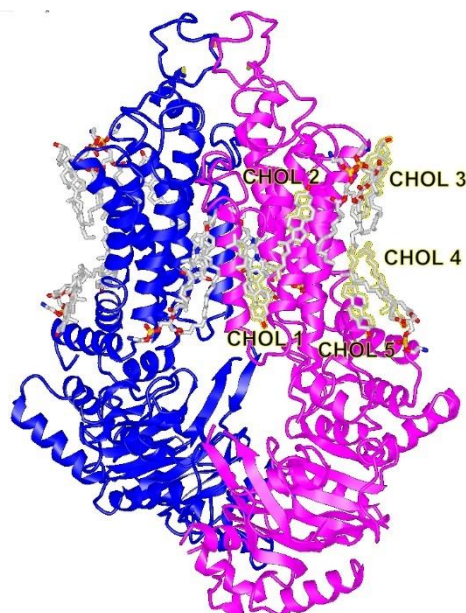
**Rycina 10.** Schemat przebiegu cyklu aktywności katalitycznej białka ABCG2. Zmodyfikowano na podstawie (Kapoor i in., 2018).

Powyższy opis cyklu aktywności katalitycznej białka ABCG2 wyjaśnia zapewne, jak związki będące inhibitorami kompetycyjnymi mogą same nie stanowić substratów do transportu. Według proponowanego modelu substraty wiążą się z białkiem od strony przestrzeni dostępu z błony komórkowej, wytwarzając początkowo niezbyt silne oddziaływania. Inhibitory, które od razu wytwarzają silnie oddziaływania z miejscami wiązania wewnątrz kieszeni pierwszej,

z jednej strony stanowią zawadę przestrzenną uniemożliwiając translokację substratu, a z drugiej strony stabilizują konformację białka otwartą do wnętrza powstrzymując zajście zmian konformacyjnych w obrębie domeny NBD, które pozwalałyby na przyłączenie cząsteczki ATP i zamknięcie substratu w przestrzeni kieszeni pierwszej.

#### 1.3.4. Cholesterol jako regulator struktury i aktywności białka ABCG2

Fracjonowanie błon komórek ekspresujących białko ABCG2 pozwoliło na stwierdzenie, że białko to znajduje się w błonach plazmatycznych w mikrodomenach nierozpuszczalnych przez niektóre detergenty, bogatych między innymi w cholesterol, określanych mianem tratw lipidowych (ang. lipid rafts). Potwierdzają to również wyniki barwień immunocytochemicznych, w których sygnał pochodzący od białka ABCG2 kolokalizuje z sygnałem pochodzącym od znanego markera tych domen – białka kaweoliny-1 (Storch i in., 2007). Co więcej, odpowiednio wysokie stężenie cholesterolu w błonach komórkowych jest niezbędne dla aktywności transportowej i ATPazowej tego transportera. Suplementowanie cholesterolu błon plazmatycznych komórek owadnich produkujących ludzkie białko ABCG2 jest kluczowe dla uzyskania jego maksymalnej aktywności (Pál i in., 2007). W komórkach ssaczych obniżenie ilości cholesterolu w błonach komórkowych znacząco zmniejsza aktywność transportera. Efekt ten ustępuje po przywróceniu wysokiego stężenia cholesterolu w błonach (Storch i in., 2007; Telbisz i in., 2007). Doświadczenia wykonane na ABCG2 rekonstruowanym w liposomach wykazały, że dla uzyskania maksymalnej aktywności ATPazowej frakcja lipidowa powinna posiadać aż 30% (mol/mol) zawartości cholesterolu (Telbisz i in., 2013).



**Rycina 11.** Umieszczenie pięciu cząsteczek cholesterolu związanych z pojedynczym polipeptydem ABCG2 pokazane na modelu przestrzennym homodimeru białka ABCG2 w konformacji otwartej do wnętrza. Przygotowano w programie PyMol na podstawie struktury z bazy PDB o numerze identyfikacyjnym 6HIJ.

W sekwencji białka ABCG2 zidentyfikowano *in silico* pięć sekwencji konsensusu rozpoznawania cholesterolu (CRAC, ang. cholesterol recognition amino acid consensus) i przeprowadzono ukierunkowaną mutagenezę reszt tyrozyny występujących w tych sekwencjach (Gál i in., 2015). Co ciekawe, tylko w przypadku jednej mutacji (tyrozyna 413) zaobserwowano zmiany w aktywności ATPazowej transportera, które korelowały ze zmianami stężenia cholesterolu w błonach plazmatycznych.

Analiza gęstości elektronowych uzyskanych w pomiarach cryo-EM białka ABCG2 rekonstruowanego w nanodyskach lipidowych w obecności cholesterolu ujawniła istnienie szeregu ustrukturyzowanych miejsc wiązania tego związku (Jackson i in., 2018). Na każdy z monomerycznych polipeptydów transportera przypada 5 cząsteczek cholesterolu, ale nie są one wiązane w miejscach odpowiadających sekwencjom CRAC (rycina 11). Nie odpowiadają one również miejscom wiązania cholesterolu obserwowanym w strukturze krystalograficznej kompleksu białek ABCG5 i ABCG8 (Lee i in., 2016).

Wszystkie powyższe wyniki jednoznacznie wskazują, że cholesterol jest kluczowym aktywatorem funkcji białka ABCG2. Dodatkowo, zgodnie z tym, co wykazały wyniki obserwacji mikroskopowych, cząsteczka cholesterolu może z niewielkim powinowactwem ulegać wiązaniu do kieszeni pierwszej białka (patrz rycina 7A) (Taylor i in., 2017). Jak do tej pory nie ma jednak bezpośrednich dowodów na to, że cholesterol jest również transportowany przez białko ABCG2. Skonstruowano hipotezę, że wraz ze wzrostem ilości cholesterolu białko ABCG2 z większym prawdopodobieństwem przyjmuje konformację otwartą do wnętrza, w której transporter jest gotowy do przyłączenia substratu oraz wiązania i hydrolizy ATP (etap 1 cyklu). Hipoteza ta stara się również w ten sposób tłumaczyć wzrost bazalnej aktywności ATPazowej obserwowany wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu w błonach (Telbisz i in., 2014). Przeprowadzone niedawno symulacje dynamiki molekularnej oddziaływania ABCG2 z cholesterolem wskazują, że cholesterol może dodatkowo przejściowo blokować oddziaływania lipidów błony plazmatycznej z miejscem wiązania od strony błony komórkowej. W konsekwencji umożliwia to wydajniejsze przechodzenie transportera między kolejnymi konformacjami cyklu aktywności katalitycznej (Rasouli i in., 2023).

#### **1.4. Ekspresja białka ABCG2**

##### **1.4.1. Lokalizacja subkomórkowa białka ABCG2**

Podobnie jak przypadku innych białek posiadających domeny transbłonowe, biosynteza, fałdowanie oraz pierwsze modyfikacje potranslacyjne białka ABCG2 odbywają się w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej. Już w trakcie biosyntezy powstający na rybosomie polipeptyd jest umieszczany w błonie komórkowej dzięki udziałowi kompleksu białkowego Sec61, a także

kompleksu białkowego związanego z ER (EMC, ang. ER membrane protein complex), który bierze udział we właściwym umieszczeniu w błonie pierwszej domeny transbłonowej, co jest kluczowe dla całego procesu fałdowania białek transbłonowych (Chitwood i in., 2018). Jak opisano w podrozdziale 1.3.1., wiadomo, że białko ABCG2 ulega złożonemu procesowi glikozylacji na asparaginie 596. Proces ten rozpoczyna się w ER i jest kontynuowany w aparacie Golgiego. Wewnątrz kanalików ER białko ABCG2 nabywa również wewnętrzny mostek disiarczkowy między cysteinami 592 i 608. Te dwie modyfikacje potranslacyjne są opisywane jako dwa ważne punkty kontrolne właściwej struktury trzeciorzędowej ABCG2 (Wakabayashi i in., 2007). Niewłaściwa glikozylacja nie jest czynnikiem, który uniemożliwia funkcjonowanie białka, ale wykazano, że białko nie posiadające tej modyfikacji jest częściej ubikwitynowane i kierowane do degradacji w proteasomie (Nakagawa i in., 2009; Sugiyama i in., 2011).

Po etapie biosyntezy, fałdowania i modyfikacji potranslacyjnych białka ABC są transportowane do błon plazmatycznych komórki za pomocą odpowiednio opłaszczonych pęcherzyków endocytarnych zarówno bezpośrednio, jak i poprzez sieć trans-Golgi, poprzez pęcherzyki endosomów recyklujących oraz endosomów wczesnych (Farinha i Canato, 2017). Mechanizm transportu między aparatem Golgiego a błonami plazmatycznymi jest różny dla różnych białek ABC, a często to samo białko może być transportowane w różny sposób. Na przykład białko ABCC2 trafia do błon plazmatycznych bezpośrednio (Zeigerer i in., 2012), podczas gdy białko ABCB11 jest magazynowane w endosomach recyklujących i dopiero stamtąd, w razie potrzeby, jest mobilizowane do błon plazmatycznych (Homolya i in., 2014; Kipp i in., 2001). Wiadomo, że białko ABCB1 może trafiać do błon plazmatycznych bezpośrednio (Kipp i Arias, 2000) lub również pośrednio przez szereg pęcherzyków endocytarnych posiadających różne białka markerowe (Rab11a, Rab6, Rab5, EE1) (De Rosa i in., 2004; Fu i in., 2007; Wakabayashi i in., 2005). Zmiana lokalizacji subkomórkowej dla wielu z białek ABC jest ważnym sposobem regulacji ich aktywności. Na przykład białko ABCA1 jest stale transportowane między błonami plazmatycznymi a pęcherzykami endoplazmatycznymi, w których częściowo ulega degradacji, a częściowo jest transportowane z powrotem na powierzchnię komórki. Proces ten jest regulowany przez oddziaływanie z ligandem zewnątrzkomórkowym tego białka, ApoA-I (Azuma i in., 2009). W przypadku białka ABCG2, mechanizmy regulujące lokalizację subkomórkową nie są jak do tej pory dobrze zbadane. W transport między błonami komórkowymi zaangażowane są najprawdopodobniej pęcherzyki endocytarne zawierające białka Rab5a i Rab21 (Yousaf i Ali, 2020). Wariant białka o sekwencji referencyjnej lokalizuje się głównie w błonach plazmatycznych komórki, choć znane są warianty białka, które w większości pozostają zmagazynowane wewnątrz komórki. Jednym z takich wariantów jest białko zawierające mutację M71V. Podobnie jak białko o mutacji Q141K,

białko ABCG2(M71V) jest w pełni funkcjonalne, ale najpewniej nie jest właściwie fałdowane i akumuluje się w błonach wewnątrzkomórkowych (Zámbó i in., 2018).

Stres oksydacyjny jest opisywany jako jeden z czynników, który może wpływać na lokalizację subkomórkową białka ABCG2. Na przykład poziom ABCG2 w zarodkowych komórkach macierzystych spada znacząco po 6h traktowania subletalną dawką wody utlenionej, ale komórki odzyskują początkowy poziom ekspresji transportera po 24h (Erdei i in., 2013). Na innym modelu komórkowym wykazano również, że wysokie stężenie kwasu moczowego, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, powoduje obniżenie poziomu białka ABCG2 w błonach plazmatycznych, przy zachowaniu stałego poziomu ekspresji transportera w całej komórce (Komori i in., 2018). Autorzy wykazali, że obniżeniu ulega również wtedy poziom fosforylacji białka Akt, które jest uważane za jeden z czynników odpowiedzialnych za utrzymywanie białka ABCG2 w błonach plazmatycznych, a jego inhibicja najpewniej powoduje zwiększoną endocytozę białka (Bleau i in., 2009). Innym białkiem, które może mieć znaczenie w regulowaniu lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2, jest kinaza Pim-1. Wariant tego białka o dłuższej sekwencji został opisano jako czynnik powodujący fosforylację treoniny 362 w białku ABCG2 (Natarajan i in., 2013; Xie i in., 2008). Według autorów powyższych prac fosforylacja w tym miejscu jest niezbędna do utrzymywania białka w błonach plazmatycznych. Wariant białka posiadający mutację T362A znajdował się głównie w błonach wewnątrzkomórkowych, a użycie inhibitora Pim-1 powodowało obniżenie ilości białka ABCG2 w błonach plazmatycznych i zwiększoną cytotoksyczność chemioterapeutyków transportowanych przez ABCG2, ale tylko w komórkach wykazujących ekspresję tej kinazy.

Niektóre ksantyny również obniżają ekspresję białka ABCG2 w błonach plazmatycznych. Kofeina oraz kilka innych związków należących do tej klasy stymulują internalizację i degradację lizosomalną transportera, uczulając tym samym komórki na chemioterapeutyki transportowane przez ABCG2 (Ding i in., 2012). Ponieważ nie ma dowodów na to, że ksantyny wiążą się do białka ABCG2 bezpośrednio, autorzy sugerują, że związki te wpływają na mechanizmy regulujące wewnątrzkomórkową lokalizację transportera i stymulują naturalne procesy, w wyniku których białko ulega endocytozie i degradacji w lizosomach. We wszystkich powyższych doświadczeniach nie jest jasne, jaki jest mechanizm, na drodze którego białko ABCG2 jest transportowane z błon plazmatycznych do kompartmentów wewnątrzkomórkowych. Co więcej w przypadku wielu z czynników, które zwiększają wewnątrzkomórkową lokalizację białka ABCG2, ciężko jest rozróżnić, czy powodują one internalizację cząsteczek już obecnych w błonie, czy też blokują na którymś z etapów transport białka do błon plazmatycznych.

#### 1.4.2. Ekspresja białka ABCG2 w tkankach człowieka

Niedługo po opisanu genu dla ludzkiego białka ABCG2 kilka grup badawczych niezależnie podjęło próbę zbadania lokalizacji oraz poziomu ekspresji tego transportera w tkankach prawidłowych (Doyle i in., 1998; Fetsch i in., 2006; Maliepaard i in., 2001). Stosując techniki hybrydyzacyjne oraz barwienia immunohistochemiczne, wysoki poziom ekspresji ABCG2 stwierdzono między innymi w: komórkach nabłonkowych dwunastnicy, jelita cienkiego i grubego, komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych mózgu, komórkach nadnerczy, hepatocytach, komórkach gruczołu mlekowego, komórkach śródmiąższowych jądra, syncytiotrofoblastach łożyska, komórkach nabłonka płaskiego macicy, komórkach kanalików proksymalnych nerki, a także w komórkach wydzielniczych trzustki. Taka lokalizacja białka ABCG2 wskazuje na dwie funkcje fizjologiczne, które ono pełni: funkcję ochrony ważnych narządów przed ksenobiotykami oraz szkodliwymi metabolitami, a także funkcję wydzielniczą wobec substancji pochodzenia endogennego.

Aktywność transportowa białka ABCG2 ogranicza lub uniemożliwia przedostawanie się jego substratów z krwiobiegu do tkanek. Ma ono kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu czterech barier: bariery jelitowej, krew-łożysko, krew-jądro oraz krew-mózg. W komórkach łożyska ABCG2 chroni rozwijający się płód przed działaniem toksyn, a także bierze udział w detoksyfikacji substancji szkodliwych. Doświadczenia na myszach wykazały, że po doustnym podaniu mieszaniny topotekanu oraz GF120918 (hamującego zarówno białko ABCG2, jak i ABCB1) stężenie topotekanu w surowicy płodów u myszy bez ekspresji ABCB1 było dwa razy wyższe niż w nieobecności GF120918 (Jonker i in., 2000). Tymczasem w surowicy płodu u myszy pozbawionych ABCG2 stężenie podanej dożylnie nitrofurantoiny, będącej substratem dla ABCG2, było pięciokrotnie wyższe niż u osobników o dzikim fenotypie (Zhang i in., 2007). Szereg prac opisuje podobny efekt obserwowany dla leku przeciwcukrzycowego, glibenklamidu, który również jest substratem ABCG2 (Gedeon i in., 2008; Pollex i in., 2008). Doświadczenia, w których wykonywano perfuzję łożyska szczura cymetydyną, wykazały, że białko to ogranicza transport leku z krwiobiegu matki do krwiobiegu płodu (Staud i in., 2006). Podobne doświadczenia wykonane na ludzkim łożysku udowodniły, że białko ABCG2 obniża po stronie płodu stężenie PhIP (Myllynen i in., 2008). Białko ABCG2 jest również odpowiedzialne za ochronę powstających plemników przed potencjalnie szkodliwym wpływem ksenobiotyków. Wykazano, że u samców myszy pozbawionych białka ABCG2 szereg substancji szkodliwych będących substratami tego transportera (PhIP, prazosyna) akumulował się w jądrach w znacząco wyższym stężeniu niż u osobników kontrolnych (Enokizono i in., 2008).

Wiadomo również, że białko ABCG2 (obok białka ABCB1) jest ważnym transporterem umożliwiającym funkcjonowanie bariery krew-mózg. W komórkach śródbłonka naczyń

włosowatych mózgu ABCG2 jest ekspresjonowane w błonach komórkowych po stronie światła naczyń krwionośnych i jest odpowiedzialne za transport substratów w kierunku krwioobiegu (Cooray i in., 2002). Wykazano, że u myszy pozbawionych ABCB1 ekspresja ABCG2 w naczyniach włosowatych mózgu jest trzykrotnie wyższa niż u osobników kontrolnych, co sugeruje, że zwiększona ilość ABCG2 częściowo kompensuje nieobecność białka ABCB1 w barierze krew-mózg (Cisternino i in., 2004). Wyniki wielu doświadczeń wykazują, że aktywność ABCG2 jest ważnym czynnikiem ograniczającym przenikanie ksenobiotyków do mózgu. Zastosowanie inhibitorów oraz doświadczenia na myszach bez ekspresji ABCG2 i ABCB1 dowodzą, że ekspresja obu transporterów jest odpowiedzialna za ograniczanie przenikania do mózgu między innymi takich substancji jak imatynib (Bihorel i in., 2007; Breedveld i in., 2005) czy topotekan (de Vries i in., 2007). W mózgu myszy pozbawionych ABCG2 zaobserwowano również ponad dziewięciokrotnie wyższą akumulację genisteiny niż u osobników o fenotypie dzikim (Enokizono i in., 2007).

Białko ABCG2 znajduje się również w znacznej ilości w komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego, gdzie zlokalizowane jest w błonach komórkowych po stronie światła przewodu. Największą ekspresję transportera zaobserwowano w dwunastnicy, ale jest ono również obecne w niewielkich ilościach w dalszych odcinkach jelita cienkiego i grubego (Gutmann i in., 2005). W komórkach przewodu pokarmowego ABCG2 ogranicza absorpcję do krwioobiegu substancji będących substratami dla transportera. Wyniki doświadczeń na gryzoniach pozbawionych homologu ludzkiego ABCG2 udowodniły, że białko to ma kluczowe znaczenie przy ograniczeniu wchłaniania z przewodu pokarmowego między innymi takich substancji jak kwercetyna (Sesink i in., 2005), erlotynib (Marchetti i in., 2008), sulfasalazyna (Zaher i in., 2006), antybiotyki fluorochinolonowe (Merino i in., 2006) oraz kancerogeny PhIP i aflatoksyna B1 (van Herwaarden i in., 2003, 2006).

Białko ABCG2 jest również obecne w dużej ilości w innych organach odpowiedzialnych za detoksyfikację. Zlokalizowane jest w błonach apikalnych hepatocytów oraz nabłonka kanalików żółciowych, a także w błonach apikalnych komórek nabłonka kanalików proksymalnych nerki (Huls i in., 2008; Maliepaard i in., 2001; Vander Borghet i in., 2006). Doświadczenia wykonane na myszach pozbawionych tego transportera wykazały, że ABCG2 odpowiada za wydalanie do żółci wielu leków i ich metabolitów. Do substancji usuwanych w ten sposób należą między innymi: nitrofurantoina (Merino i in., 2005a), antybiotyki fluorochinolonowe (Ando i in., 2007), pitawastatyna (Hirano i in., 2005), a także siarczan hymekromonu (Zamek-Gliszczyński i in., 2006), siarczan troglitazonu (Enokizono i in., 2007), siarczan acetaminofenu i siarczan harmolu (Zamek-Gliszczyński i in., 2006). Analogicznie udowodniono, że ABCG2 bierze udział w wydalaniu do moczu metabolitów takich leków jak E3040 (Mizuno i in., 2004) oraz edarawon (Mizuno i in., 2007).



Oprócz funkcji detoksyfikacyjnych i barierowych białko ABCG2 pełni również funkcje wydzielnicze. Wiadomo, że białko ABCG2 obecne w komórkach gruczołu mlekowego jest odpowiedzialne za transport ryboflawiny (van Herwaarden i in., 2007). Udowodniono także, że zwiększona ekspresja tego transportera w okresie laktacji w komórkach gruczołu mlekowego u myszy, krów i ludzi powoduje, że substancje toksyczne (np. PhIP) oraz ksenobiotyki (topotekan, cymetydyna) również są wydzielane do mleka w większej ilości (Jonker i in., 2005). Wiadomo również, że białko ABCG2 u człowieka jest ekspresjonowane w błonach plazmatycznych erytrocytów. Zewnątrzkomórkowy fragment tego białka jest jednym z antygenów powierzchniowych czerwonych krwinek, a ludzie pozbawieni jego ekspresji posiadają grupę krwi Junior (a-) (JR(a)-; (Arnaud, 2012)).

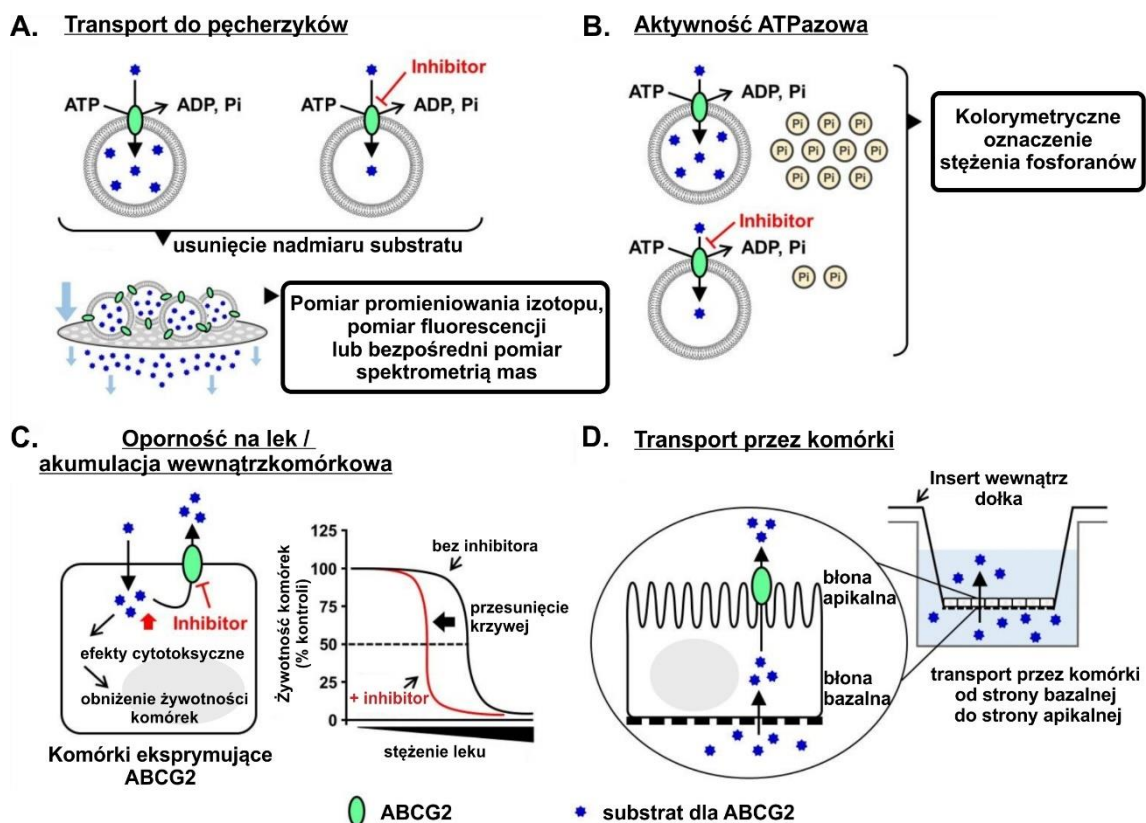
## **1.5. Specyficzność substratowa białka ABCG2**

### **1.5.1. Metody pomiaru aktywności transportowej białka ABCG2**

Do poszukiwania nowych substratów oraz modulatorów aktywności białka ABCG2 stosowanych jest kilka różnych metod *in vitro* oraz *in vivo* mających na celu ilościowe badanie aktywności tego transportera. Wśród metod *in vitro* można wyróżnić dwa typy technik: pomiary aktywności oparte o wykorzystanie błon lipidowych zawierających białko ABCG2 oraz pomiary aktywności prowadzone z wykorzystaniem całych komórek (Toyoda i in., 2019). Aktywność transportowa białka jest w tych technikach mierzona w sposób bezpośredni (gromadzenie substratu wewnątrz pęcherzyków lub komórek; różnica stężeń między kompartamentami w przypadku transportu przez komórki) lub pośrednio poprzez ocenę stymulacji aktywności ATPazowej (oznaczanie stężenia fosforanu nieorganicznego będącego produktem reakcji hydrolizy ATP) bądź pomiar żywotności komórek poddanych działaniu substancji cytotoksycznej transportowanej przez ABCG2 (rycina 12).

W technikach, w których stosuje się pęcherzyki z błon lipidowych (rycina 12, panele A i B), białko ABCG2 może być izolowane z fragmentami błon plazmatycznych komórek (Jani i in., 2009) lub umieszczane w proteoliposomach (Jackson i in., 2018). Jako źródło błon plazmatycznych zawierających ABCG2 najczęściej stosowane są komórki ssacze (Miyata i in., 2016) lub komórki owadzie, zwykle komórki Sf9 (Saito i in., 2006), choć te ostatnie do pełnej funkcjonalności wymagają suplementacji cholesterolem (Poirier i in., 2014). Bezpośredni pomiar aktywności transportowej białka ABCG2 w pęcherzykach zakłada akumulowanie się w nich substratów. Proces ten jest zależny od obecności ATP (kontrolę negatywną stanowią niehydrolizowalne analogi ATP lub AMP) i powinien być hamowany przez inhibitory ABCG2. Ilość zakumulowanego substratu jest mierzona na podstawie pomiarów za pomocą spektrometrii mas, pomiarów intensywności promieniowania (dla substratów znakowanych radionuklidem) lub fluorescencji (dla substratów fluorescencyjnych). Ta technika pomiaru

aktywności transportowej ABCG2 jest często stosowana w celu określenia podstawowych parametrów kinetycznych enzymu i porównania ich np. dla różnych wariantów transportera posiadających mutacje punktowe (Manolaridis i in., 2018). Wśród substratów znakowanych radionuklidem najczęściej stosowane są zawierający tryt siarczan estronu ( $[^3\text{H}]\text{-E}_1\text{S}$ , (Manolaridis i in., 2018; Suzuki i in., 2003)) oraz zawierający węgla  $^{14}\text{C}$  kwas moczowy (Higashino i in., 2017; Stiburkova i in., 2017). Stosunek sygnału do tła dla tych modelowych związków jest wysoki, ponieważ są one na tyle hydrofilowe, że nie są w stanie biernie dyfundować przez błony pęcherzyków. Metoda badania transportu do pęcherzyków nie nadaje się jednak do identyfikacji substratów, które same wydajnie dyfundują przez błony plazmatyczne.



**Rycina 12.** Techniki *in vitro* wykorzystywane w pomiarach aktywności białka ABCG2 podzielone na techniki oparte o zastosowanie pęcherzyków z błon lipidowych (błony plazmatyczne lub proteoliposomy - **A** i **B**) oraz techniki wykorzystujące całe komórki (**C** i **D**). Wykorzystanie pęcherzyków lipidowych zawierających białko ABCG2 umożliwia pomiar transportu substratu do wnętrza pęcherzyka (zależnego od ATP dostępnego z zewnątrz pęcherzyków) (**A**) lub pomiar aktywności ATPazowej transportera (**B**). Metody wykorzystujące całe komórki ekspresyjujące białko ABCG2 pozwalają na pośredni (np. wzrost oporności komórek na cytotoksyczny substrat) lub bezpośredni pomiar aktywności transportera (oznaczanie wewnątrzkomórkowego stężenia substratu) (**C**), a także dla komórek spolaryzowanych tworzących połączenia ścisłe pozwalają mierzyć transport przez warstwy komórek (**D**). Zmodyfikowano na podstawie (Toyoda i in., 2019).

Druga z metod badania aktywności transportowej białka ABCG2 z wykorzystaniem pęcherzyków błonowych opiera się na pomiarze aktywności ATPazowej transportera (rycina 12B). Pomiar polega na oznaczaniu stężenia fosforanów, które są produktem reakcji hydrolizy ATP. Zwykle zwiększenie aktywności ATPazowej pośrednio wskazuje na zwiększenie aktywności transportowej białka. W przeciwieństwie do metody, w której analizowana jest ilość substratu zgromadzonego w pęcherzyku, pomiar aktywności ATPazowej pozwala na pośrednie oszacowanie aktywności transportowej dla substratów lipofilowych, które są w stanie dyfundować przez błony komórkowe (Guo i in., 2018). Należy mieć jednak świadomość, że zwiększenie aktywności ATPazowej białka nie zawsze musi wskazywać na zwiększenie aktywności transportowej (Manolaridis i in., 2018).

W pozostałych metodach pomiaru aktywności transportowej białka ABCG2 *in vitro* stosuje się całe komórki modelowych linii komórkowych (rycina 12, panele C i D). Aktywność białka ABCG2 może być mierzona pośrednio przez zmianę oporności komórek na cytotoksyczny substrat (Nakamura i in., 2005) lub bezpośrednio przez pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia substratu (Rozanski i in., 2019). W obu przypadkach można porównać dwie linie tego samego typu komórek, które różnią się jedynie ekspresją białka ABCG2, lub określić, w jaki sposób na linię komórkową o wysokiej ekspresji transportera wpływa obecność inhibitora ABCG2. W pomiarach pośrednich komórki, które posiadają ABCG2, charakteryzują się zwiększoną opornością na daną substancję (rycina 12C). Ta metoda funkcjonalnej oceny aktywności białka ABCG2 znajduje zastosowanie przy identyfikacji nowych substratów jedynie jeśli wykazują one właściwości cytotoksyczne (Bates i in., 2004; Nakagawa i in., 2002; Yuan i in., 2009). Jest ona jednak bardzo często wykorzystywana do poszukiwania nowych inhibitorów tego transportera przy zastosowaniu modelowych, cytotoksycznych substratów ABCG2 (Allcock i in., 2017; Zhang i in., 2004).

Bezpośrednie pomiary wewnątrzkomórkowego stężenia substancji potencjalnie transportowanych przez ABCG2 nie ograniczają zakresu stosowalności tej metody jedynie do związków cytotoksycznych. Jeśli ilość związku akumulowanego w komórkach posiadających aktywny ABCG2 jest niższa niż w komórkach kontrolnych (bez transportera) oraz rośnie po inkubacji z inhibitorem, implikuje to, że związek ten jest substratem (An i in., 2011). Czynnikiem ograniczającym stosowanie tej metody jest jednak trudność w pomiarze wewnątrzkomórkowej ilości danego związku. Konieczne jest użycie drogich oraz czasochłonnych technik chromatograficznych, albo stosowanie substratów fluorescencyjnych lub znakowanych radionuklidami. Ta metoda nie nadaje się więc do wysokoprzepustowego poszukiwania nowych substratów. Jest jednak często stosowana przy poszukiwaniu nowych inhibitorów białka ABCG2. Modelowe substraty fluoryzujące stanowią wtedy zwykle: Hoechst 33342 (Tang

i in., 2020), feoforbid A (Kokubo i in., 2021), BODIPY FL-prazosyna (Horsey i in., 2020) lub mitoksantron (Yang i in., 2020).

Ponieważ w komórkach spolaryzowanych białko ABCG2 jest ekspresjonowane w błonach plazmatycznych po apikalnej stronie komórki, transport substratów przez monowarstwę takich komórek odbywa się szybciej w jednym kierunku. W komórkach pozbawionych tego transportera szybkość dyfuzji przez komórki powinna być jednakowa w obu kierunkach (rycina 12D). Dwie linie komórkowe najczęściej stosowane w tego typu eksperymentach to linia psich komórek nabłonkowych nerki MDCK-II oraz linia świńskich komórek nabłonkowych kanalików nerki LLC-PK1. Dla obu linii wyprowadzono linie komórkowe stabilnie transfekowane sekwencją kodującą ludzkiego białka ABCG2 (Imai i in., 2003; Weiss i in., 2007). Alternatywnie w tego typu pomiarach wykorzystywana jest linia ludzkich komórek raka jelita grubego Caco-2, w której naturalnie ekspresjonowane jest wiele transporterów, w tym białko ABCG2 (Kawahara i in., 2020). Specyficzność transportu danej substancji przez białko ABCG2 można wtedy potwierdzić stosując inhibitory (Beéry i in., 2012) lub zmodyfikowaną genetycznie pochodną linię komórkową pozbawioną ekspresji ABCG2 (Sampson i in., 2015). W przypadku metod badania aktywności transportowej białka ABCG2 wykorzystujących całe komórki trzeba zawsze brać pod uwagę ewentualną obecność w danej linii komórkowej innych endogennych transporterów oraz to, że potencjalny substrat do transportu może być w komórkach metabolizowany.

Inną metodą *in vitro*, która ma na celu weryfikację oddziaływania potencjalnych substratów lub inhibitorów z białkiem ABCG2, jest test oparty na oddziaływaniu tego transportera z przeciwciałem monoklonalnym 5D3 (Telbisz i in., 2012). Konformacyjny epitop dla tego przeciwciała znajduje się w obrębie trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej białka ABCG2 (Taylor i in., 2017). Wykazano, że wiązanie przeciwciała 5D3 do białka ABCG2 jest stymulowane związaniem substratu lub inhibitora (co indukuje konformację otwartą do wnętrza), a blokowane związaniem niehydrolizowalnego analogu ATP (co stabilizuje białko w innej konformacji), ponieważ epitop ten występuje w białku jedynie w konformacji otwartej do wnętrza (Özvegy-Laczka i in., 2005).

Badania aktywności transportowej białka ABCG2 *in vivo* przeprowadza się albo korzystając z modeli zwierzęcych (np. myszy nokautowe (Jonker i in., 2002) lub przeszczepy komórek ludzkich do myszy (Tiwari i in., 2013; Zhang i in., 2018)), albo badając farmakokinetykę związków chemicznych u ludzi (Robey i in., 2018), na przykład porównując pacjentów posiadających wariant białka ABCG2 o upośledzonej funkcji (takich jak mutant Q141K) z pacjentami kontrolnymi. Nowych, istotnych klinicznie inhibitorów dla ABCG2 można poszukiwać analizując losy leków transportowanych przez to białko w ustroju człowieka po

jednoczesnym podaniu związku o potencjalnej aktywności inhibitorowej. W tego typu badaniach dominują dwa modelowe leki: sulfosalazyna oraz rosuwastatyna (Lee i in., 2015; Momper i in., 2016).

## **1.5.2. Substraty białka ABCG2**

### **1.5.2.1. Leki przeciwnowotworowe jako substraty białka ABCG2**

Leki przeciwnowotworowe stanowią dużą oraz bardzo zróżnicowaną pod względem struktury chemicznej grupę znanych substratów białka ABCG2. Transportowane są między innymi: antraceny, antracykliny, pochodne kamptotecyny, alkaloidy, indolokarbazole oraz analogi nukleozydów. Transportowane są również inhibitory kinaz tyrozynowych, a także antymetabolity kwasu foliowego.

Mitoksantron jest jednym z pierwszych zidentyfikowanych chemioterapeutyków, na który oporność nadaje białko ABCG2 (Doyle i in., 1998; Miyake i in., 1999). Badania *in vitro* jednoznacznie wykazały, że jest on transportowany przez to białko (Nakanishi i in., 2003; Ozvegy i in., 2001). Presja selekcyjna mitoksantronem może powodować znaczne zwiększenie poziomu ekspresji białka ABCG2 w komórkach wielu linii nowotworowych, między innymi w komórkach raka jelita grubego (S1M180, HT29NOV, KM12/MX), komórkach raka piersi (MCF-7/MX8, MCF-7/Mitox, MDA-MB-231RNOV), komórkach raka żołądka (EPG85-257RNOV), komórkach włóknakiomęsaka (EPF86-079RNOV), komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (H460/MX), komórkach glejaka (SF295/MX) i komórkach szpiczaka (8226/MR20) (Hazlehurst i in., 1999; Ross i in., 1999; Stein i in., 2002; Volk i in., 2002). Badania prowadzone na tej ostatniej linii komórkowej wykazały, że substratem ABCG2 jest też inny lek o strukturze chemicznej zbliżonej do mitoksantronu, BBR3390, pochodna aza-antrapirazolu (Hazlehurst i in., 1999).

Inny lek antracyklinowy, doksorubicyna, jest czynnikiem odpowiedzialnym za zwiększoną ekspresję białka ABCG2 w lekoopornej linii komórek raka piersi - MCF-7/AdrVp. Linia ta, w przeciwieństwie do równoległe wyprowadzonej linii komórek MCF-7/MX8 wyselekcjonowanych w obecności mitoksantronu, jest w stanie transportować barwnik fluorescencyjny rodaminę 123 (Doyle i in., 1998). Późniejsze badania wykazały, że w przypadku obu linii komórkowych czynnikiem nadającym oporność na chemioterapeutyki jest białko ABCG2, lecz w komórkach, które były w stanie transportować również rodaminę 123, białko posiada mutację argininy w pozycji 482 (Honjo i in., 2001). Kolejne eksperymenty dowiodły, że białko ABCG2 posiadające mutację R482T lub R482G w przeciwieństwie do białka o sekwencji referencyjnej jest w stanie transportować znacznie więcej antracyklin, między innymi daunorubicynę, doksorubicynę, epirubicynę i bizantren (Litman i in., 2000; Robey i in., 2003), a także barwniki fluorescencyjne: LysoTracker Green DMD-26 oraz

tetrametylorozaminę (Robey i in., 2001; Shafran i in., 2005). Powyższe mutacje mają również wpływ na specyficzność substratową w stosunku do hydrofilowych antymetabolitów kwasu foliowego. Wykazano, że metotreksat, podobnie jak kwas foliowy oraz ich pochodne poliglutaminianowe, są wydajnie transportowane przez białko o sekwencji referencyjnej, lecz nie przez mutanty R482G lub R482T (Chen i in., 2003; Mitomo i in., 2003; Volk i in., 2002). Późniejsze doświadczenia wykazały jednak, że zarówno białko o sekwencji referencyjnej, jak i transporter posiadający mutację R482G nadają komórkom oporność na metotreksat i inne hydrofilowe metabolity kwasu foliowego, takie jak GW1843 i raltitrexed (Shafran i in., 2005). Białko posiadające mutację R482G lub R482T nadawało komórkom istotną oporność na leki z grupy lipofilowych antymetabolitów kwasu foliowego takie jak trimetreksat, piritreksim, metoprin i pirymetamina (z grupy inhibitorów reduktazy dihydrofolianowej), a także AG337 (nolatreksed), AG377 oraz AG331 (z grupy inhibitorów syntazy tymidylanowej) (Bram i in., 2006). Pomimo tego, że mutacja argininy w pozycji 482 białka tak istotnie modyfikuje specyficzność substratową transportera, mutacje w tym miejscu sekwencji stwierdzono do tej pory jedynie w hodowlach komórkowych linii nowotworowych. Sekwencjonowanie materiału genetycznego komórek białaczkowych pochodzenia klinicznego nie ujawniło obecności tej mutacji białka ABCG2 wśród pacjentów poddanych chemioterapii (Nakanishi i in., 2003; Plasschaert i in., 2003; Suvannasankha i in., 2004).

Pochodne kamptotecyny stanowią inną ważną grupę leków przeciwnowotworowych transportowanych przez białko ABCG2. Transporter ten nadaje oporność na tę grupę związków komórkom linii nowotworowych raka jajnika (IGROV1/T8, (Maliepaard i in., 1999)) oraz raka piersi (MCF-7/TPT3000, (Yang i in., 2000)) wyselekcjonowanym w obecności topotekanu. Większa niż w wyjściowych liniach ekspresja transportera ABCG2 jest odpowiedzialna za zwiększoną oporność na 10-hydroksy-7-etylokamptotecynę (SN-38, aktywny metabolit irinotekanu), na 9-aminokamptotecynę oraz w mniejszym stopniu na irinotekan i kamptotecynę (Maliepaard i in., 1999; Schellens i in., 2000; Yang i in., 2000). Badania przeprowadzone na stabilnych transfektantach wykazały, że zarówno komórki produkujące dziki wariant ABCG2, jak i białko posiadające mutację R482T są w stanie transportować 9-aminokamptotecynę, ale nie 9-nitrokamptotecynę (Rajendra i in., 2003). Biorąc pod uwagę, że ABCG2 jest również w stanie bardzo wydajnie transportować topotekan oraz SN-38, autorzy sugerują że obecność polarnej grupy funkcyjnej w pozycji 9 lub 10 kamptotecyny jest kluczowa dla funkcji transportowej białka względem substratów z tej grupy związków. Podobnie jak w przypadku topotekanu, wysoką ekspresję białka ABCG2 wyindukowano za pomocą SN-38 w komórkach linii nowotworowych raka jelita grubego (Candeil i in., 2004) i raka płuc (Kawabata i in., 2001). Wiadomo, że ABCG2 może transportować zarówno niemodyfikowany SN-38, jak i jego glukuronidową pochodną

(Nakatomi i in., 2001), a w próbkach klinicznych nowotworów od pacjentów leczonych irinotekaniem zaobserwowano wyższy poziom mRNA dla ABCG2 niż w analogicznych próbkach od pacjentów, którym nie podawano tego leku (Candeil i in., 2004). Jako bardzo dobre, dobre lub słabe substraty ABCG2 zidentyfikowano również wiele innych pochodnych kamptotecyny: belotekan (Li i in., 2008), gimatekan (Marchetti i in., 2007), ST1976, ST1968 (De Cesare i in., 2007), diflomotekan, homokamptotecynę (Bates i in., 2004), NX211 (Maliapaard i in., 2001), DX-8951f (Ishii i in., 2000) oraz BNP-1350 (Van Hattum i in., 2002).

Inną grupę leków przeciwnowotworowych, z których wiele jest substratami ABCG2, stanowią pochodne staurosporyny (Nakagawa i in., 2002). Transportowane są między innymi inhibitory topoizomerazy I, takie jak J-107088 i NB-506 (Komatani i in., 2001), ale również związki o innej aktywności, np. inhibitor kinaz zależnych od cyklin UCN-01 (Robey i in., 2004).

Dużą grupą substratów białka ABCG2 są leki przeciwnowotworowe będące inhibitorami kinaz tyrozynowych. Według najwcześniejszych danych dotyczących transportu tej grupy związków przez ABCG2 trzy związki: imatynib, gefitynib oraz EKI-785 z dużym powinowactwem wiążą się do transportera i stymulują jego aktywność ATPazową (Ozvegy-Laczka i in., 2004). Niedługo później badania prowadzone na imatynibie dowodziły z jednej strony że jest on substratem dla ABCG2 (Burger i in., 2004), a z drugiej, że stanowi jedynie inhibitor aktywności transportowej tego białka w stosunku do innych substratów (Houghton i in., 2004; Jordanides i in., 2006). W doświadczeniach *in vivo* udowodniono że imatynib jest substratem dla homologu białka ABCG2 u myszy (Breedveld i in., 2005). Eksperyment na komórkach linii Caco2 wykazał, że długotrwała ekspozycja komórek na ten lek powoduje znaczący wzrost ekspresji białka ABCG2 oraz spadek wewnątrzkomórkowego stężenia imatynibu o 50% (Burger i in., 2005). W komórkach linii K562, których wzrost jest zależny od kinazy BCR-Abl, zwiększenie ekspresji ABCG2 powoduje, że komórki stają się kilkukrotnie bardziej odporne na imatynib (Dohse i in., 2010; Nakanishi i in., 2006). Podobne wyniki zaobserwowano inhibitorów kinaz tyrozynowych drugiej generacji, na przykład nilotynibu. Ten związek jest zarówno silnym inhibitorem białka ABCG2 (Brendel i in., 2007; Tiwari i in., 2009), jak i substratem o wysokim powinowactwie dla ABCG2 i ABCB1 (Hegedus i in., 2009). Badania *in vitro* (Hiwase i in., 2008) oraz *in vivo* (Chen i in., 2009) jednoznacznie wykazują, że substratem dla ABCG2 jest też desatynib.

Spośród inhibitorów EGFR pierwszym związkiem, który zidentyfikowano jako substrat dla ABCG2, jest CI1033 (inaczej kanertynib) (Erlichman i in., 2001; Xiao i in., 2006). Innym związkiem należącym do tej grupy leków jest gefitynib. Początkowo wykazano, że moduluje on aktywność ATPazową białka ABCG2 (Ozvegy-Laczka i in., 2004) oraz znosi zależną od ABCG2 oporność na SN-38 oraz topotekan (Nakamura i in., 2005; Stewart i in., 2004; Yanase

i in., 2004). W szeregu innych doświadczeń udowodniono, że gefitynib jest bezpośrednio transportowany przez ABCG2 (Elkind i in., 2005; Li i in., 2007) oraz że indukuje ekspresję tego transportera w komórkach jelita grubego (Azzariti i in., 2006). Strukturalnie podobny do gefitynibu związek erlotynib jest bardzo silnym kompetycyjnym inhibitorem białka ABCG2 (Noguchi i in., 2009) i jest również transportowany (Li i in., 2007). W doświadczeniach *in vivo* stanowi substrat ABCG2 i ABCB1 (Marchetti i in., 2008), podobnie jak lapatynib, który jest znacznie lepszym substratem (Polli i in., 2009) oraz inhibitorem ABCG2 niż ABCB1 (Dai i in., 2008).

Wiele innych inhibitorów kinaz tyrozynowych stanowi również substraty białka ABCG2, co zademonstrowano zarówno w doświadczeniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Można tu wymienić między innymi: sunitynib (Poller i in., 2011; Tang i in., 2012), sorafenib (Asakawa i in., 2011; Lagas i in., 2010), tandutynib (Yang i in., 2010) oraz aksytynib (Canu i in., 2011; Poller i in., 2011).

Inne leki o działaniu przeciwnowotworowym, które są substratami białka ABCG2, to między innymi: etopozyd (Yuan i in., 2009), flawopirydol (Nakanishi i in., 2003, 2003), oksaliplatyna (Ceckova i in., 2008) i bikalutamid (Colabufo i in., 2008). Substratami ABCG2 jest także wiele analogów nukleozydów, między innymi 5-fluorouracyl (Yuan i in., 2009), kladrybina, klofarabina, fludarabina, gemcytabina oraz 6-merkaptopuryna (de Wolf i in., 2008).

#### **1.5.2.2. Inne leki jako substraty białka ABCG2**

Lista ksenobiotyków, które stanowią znane substraty dla białka ABCG2, stale rośnie. Zidentyfikowano już przeszło 200 różnych transportowanych leków (Horsey i in., 2016). Oprócz leków przeciwnowotworowych transportowane są również niektóre: leki przeciwwirusowe, antybiotyki, leki przeciwpasożytnicze, statyny, blokery kanałów jonowych, niesteroidowe leki przeciwzapalne oraz leki przeciwzakrzepowe.

Wśród leków przeciwwirusowych, które są substratami dla ABCG2, można wymienić azydotymidynę, abakawir i lamiwudynę, inhibitory odwrotnej transkryptazy stosowane w leczeniu HIV i HBV (Pan i in., 2007; Wang i in., 2003, 2004), dolutegrawir i raltegrawir, inhibitory integrazy również wykorzystywane w terapii zakażeń HIV (Tsuchiya i in., 2016, 2017), a także gancyklowir, lek wiostatyczny zaburzający replikację DNA wirusów (Hu i Liu, 2010). Białko ABCG2 transportuje również wiele ważnych antybiotyków. Substratami są między innymi związki fluorochinolinowe, takie jak cyprofloksacyna, ofloksacyna, czy norfloksacyna (Ando i in., 2007); antybiotyk makrolidowy erytromycyna (Janvilisri i in., 2005), a także nitrofurantoina - antybiotyk nitrofuranowy stosowany w leczeniu zakażeń dróg moczowych (Merino i in., 2005a). Substratami dla ABCG2 są również takie leki przeciwpasożytnicze jak iwermektyna (Jani i in., 2011), moksidektyna (Perez i in., 2009),



a także przeciw pasożytnicze leki benzimidazolowe: oksfendazol oraz sulfotlenek albendazolu (Merino i in., 2005b).

Białko ABCG2 pełni kluczową rolę w farmakokinetyce wielu statyn, inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA). U osób posiadających mutację Q141K w sekwencji tego białka, powodującą upośledzenie jego aktywności, zaobserwowano wyższe niż u pacjentów kontrolnych (bez tej mutacji) stężenie leku we krwi po podaniu fluwastatyny oraz simwastatyny, ale nie prawastatyny (Ho i in., 2007; Keskitalo i in., 2009). Innymi substratami białka ABCG2 z tej grupy są również związki takie jak pitawastatyna (Hirano i in., 2005), ceriwastatyna (Matsushima i in., 2005), rosuwastatyna (Huang i in., 2006) oraz atorwastatyna (Birmingham i in., 2015).

Substratami białka ABCG2 jest również wiele leków obniżających ciśnienie. Do tej grupy należą tak różnorodne strukturalnie związki, jak: pochodne dihydropirydyny (blokery kanałów wapniowych), np. azydopina, nikardypina i nifedypina (Shukla i in., 2006); prazosyna, związek będący antagonistą receptora  $\alpha$ 1-adrenergicznego (Litman i in., 2000); czy olmesartan, antagonistą receptora angiotensyny II (Yamada i in., 2007).

Spośród niesteroidowych leków przeciwzapalnych substratami dla ABCG2 są diklofenak (Lagas i in., 2009) oraz sulfasalazyna, stosowana między innymi w pierwszym stadium leczenia reumatycznego zapaleniu stawów (Urquhart i in., 2008).

Doustne leki przeciwzakrzepowe to kolejna grupa związków będących substratami białka ABCG2. Transporter ten ma kluczowe znaczenie dla farmakokinetyki takich leków z tej rodziny, jak apiksaban (Ueshima i in., 2017), czy dabigatran (Hodin i in., 2018). Do grupy związków o podobnym działaniu należą również dwa inne znane substraty ABCG2: dipirydamol oraz ME3277 (Zhang i in., 2005).

Białko ABCG2 odgrywa kluczową rolę w farmakokinetyce także innych leków. Można tu wymienić na przykład: glibenklamid – lek przeciwcukrzycowy (Gedeon i in., 2008; Pollex i in., 2010), klozapinę – lek przeciwpsychotyczny (Akamine i in., 2017), befloksaton - inhibitor monoaminoooksydazy (Tournier i in., 2011), cymetydynę – lek hamujący wydzielanie kwasu solnego w żołądku (Pavek i in., 2005) oraz riluzol – środek stosowany w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego (Milane i in., 2009).

### **1.5.2.3. Pozostałe substraty białka ABCG2**

Białko ABCG2 zostało początkowo zidentyfikowane jako czynnik odpowiedzialny za oporność wielolekową komórek nowotworowych, ale późniejsze badania wykazały, że jest ono również ekspresjonowane na wysokim poziomie w wielu komórkach prawidłowych zlokalizowanych w tkankach barierowych (Robey i in., 2009). Okazało się, że ABCG2 chroni tkanki znajdujące

się za tymi barierami przed negatywnym efektem substancji znajdujących się w pożywieniu. Eksperymenty wykonane na myszach, które nie posiadają białka ABCG2, wykazały, że gryzonie te gromadzą w tkankach feoforbid A, fototoksyczny metabolit chlorofilu przyjmowanego z pożywieniem, będący jednym z naturalnych substratów ABCG2 (Jonker i in., 2002). Oprócz tego w erytrocytach myszy pozbawionych homologu ludzkiego ABCG2 akumuluje się protoporfiryna IX oraz inne prekursory hemu (Krishnamurthy i in., 2004). Ludzkie białko ABCG2 także transportuje między innymi takie porfiryny jak: chloryna e6, werteporfina, filoerytryna czy hematoporfiryna (Liu i in., 2007; Robey i in., 2004, 2005, 2006; Tamura i in., 2006).

Osobną grupę substratów białka ABCG2 stanowią barwniki fluorescencyjne. Substancje te są stosowane jako modelowe substraty tego transportera w metodach badania jego aktywności. Jednym z takich barwników jest Hoechst 33342. Inkubacja komórek z tym barwnikiem i analiza barwienia za pomocą cytometrii przepływowej umożliwia wyodrębnienie z komórek szpiku kostnego populacji określanej jako populacja boczna (SP, ang. side population). Populacja ta zawiera komórki macierzyste hematopoezy (Goodell i in., 1996), utrzymujące bardzo niskie wewnątrzkomórkowe stężenie tego barwnika dzięki wysokiej ekspresji i aktywności transportowej białka ABCG2 (Islam i in., 2020). W szpiku kostnym myszy nokautowych pozbawionych białka ABCG2 nie można wyróżnić komórek SP (Zhou i in., 2001). Wykazano, że białko ABCG2 jest także markerem komórek SP wśród komórek prawidłowych wątroby (Nakauchi, 2004), płuc (Summer i in., 2003), serca (Martin i in., 2004), gruczołów mlekowych (Alvi i in., 2003), mięśni szkieletowych (Meeson i in., 2004), neuronów (Mouthon i in., 2006), zrębu rogówki (Du i in., 2005), a także wśród różnorodnych komórek nowotworowych (Islam i in., 2020; Mallini i in., 2023; Shen i in., 2022). Wśród fluorescencyjnych substratów, które są transportowane przez ABCG2, należy wymienić również koniugaty barwnika BODIPY FL z prazosyną (Henrich i in., 2009) oraz nilotynibem (Shukla i in., 2011).

Inną grupę substancji transportowanych przez ABCG2 stanowią aminy heterocykliczne będące mutagenami i kancerogenami tworzącymi się w mięsie poddanym obróbce termicznej. Takie substancje z tej grupy jak PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-b]pirydyna), IQ (2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolina) i Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-b]indol) były obecne w znacznie wyższym stężeniu w surowicy myszy pozbawionych ABCG2 niż w surowicy myszy o fenotypie dzikim (van Herwaarden i in., 2003, 2006). Efekt ten obserwowano zarówno u zwierząt, które związki te przyjmowały z pokarmem, jak i u osobników, którym aminy heterocykliczne podawano dożylnie. Doświadczenia na myszach pozbawionych ABCG2 wykazały również, że transporter ten jest odpowiedzialny za eksport ryboflawiny (witaminy B2) do mleka matki. Ryboflawina była także słabiej wchłaniana z przewodu pokarmowego dorosłych osobników o dzikim fenotypie (van Herwaarden i in.,

2007). Obserwacje te zostały potwierdzone również w przypadku homologu białka ABCG2 u krów, dla którego mutacja Y581S powodująca wzrost aktywności transportowej ABCG2 jest odpowiedzialna za zwiększony eksport ryboflawiny do mleka w porównaniu do dzikiego wariantu białka (Otero i in., 2016). Innym ważnym naturalnym substratem ludzkiego ABCG2 jest kwas moczowy. Białko ABCG2 zlokalizowane w komórkach kanalików proksymalnych nefronów odpowiada za wydalanie tego metabolitu. Polimorfizmy upośledzające funkcję ABCG2 (np. naturalnie występujący wariant białka z mutacją Q141K) prowadzą do zwiększonego ryzyka rozwoju dny moczanowej (Dehghan i in., 2008; Woodward i in., 2009). Udowodniono również, że białko ABCG2 jest transporterem biorącym udział w wydalaniu indykanu (siarczanu 3-indoksyłu), naturalnego metabolitu związków indolowych, którego nagromadzenie obserwuje się u pacjentów z zespołem przewlekłej choroby nerek (Takada i in., 2018).

Substratami białka ABCG2 są również związki z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Wiadomo, że transportowane są rakotwórcze substancje należące do tej grupy, takie jak siarczan oraz glukuronian benzo[a]pirenu, metabolity komórkowe benzo[a]pirenu obecnego w dużych ilościach w dymie papierosowym (Ebert i in., 2005), a także aflatoksyna B1, mykotoksyna obecna w pożywieniu (van Herwaarden i in., 2006). Wiadomo również, że ABCG2 jest w stanie transportować kwas foliowy (Chen i in., 2003).

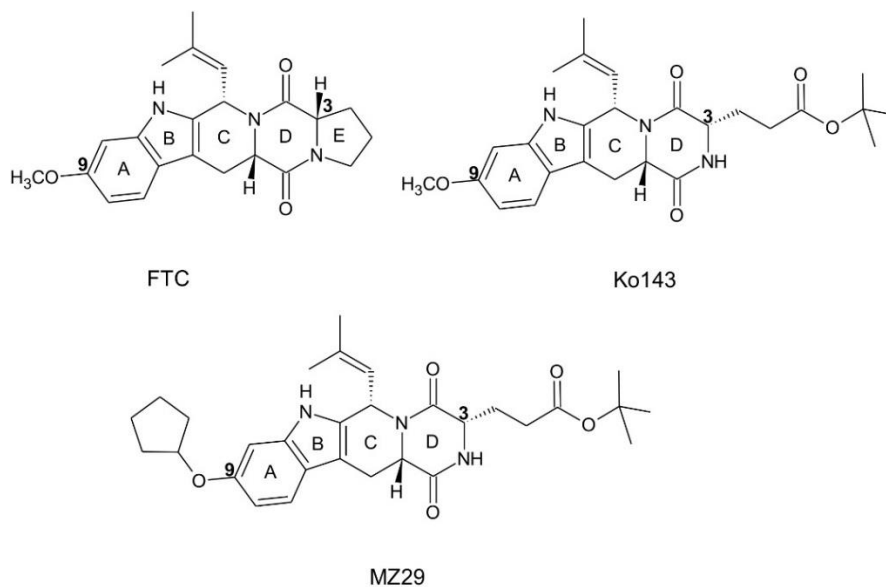
Białko ABCG2 jest również odpowiedzialne za transport pochodnych hormonów sterydowych. Siarczan estronu, siarczan dihydroepiandrosteronu i 17 $\beta$ -D-glukuronid estradiolu stanowią substraty tego białka (Imai i in., 2003; Suzuki i in., 2003). Wyniki doświadczeń wykazują również, że może ono wiązać i transportować nieskoniugowane cząsteczki steroli takie jak 17 $\beta$ -estradiol oraz dihydrotestosteron (Huss i in., 2005; Imai i in., 2002; Janvilisri i in., 2003).

Osobną grupą związków naturalnych, wśród których zidentyfikowano substraty białka ABCG2, są flawonoidy. Wykazano, że transportowane przez ABCG2 są takie flawonoidy właściwe jak kwercetyna (Sesink i in., 2005) i jej metylowe pochodne (Gallus i in., 2014), hesperetyna i jej metabolity (Brand i in., 2008) oraz kempferol (An i in., 2011). Dane eksperymentalne wskazują również, że substratami są takie związki spośród izoflawonoidów, jak genisteina (Enokizono i in., 2007; Imai i in., 2004) i daidzeina (Cooray i in., 2004; Enokizono i in., 2007), a także ich metabolity komórkowe siarczan lub glukuronid (Álvarez i in., 2011; Yang i in., 2012; Zhu i in., 2010). Substratami ABCG2 są także metabolity innego izoflawonoidu, biochaniny A (An i Morris, 2011; Wang i in., 2008), oraz resweratrolu, polifenolowego związku naturalnego pochodzenia (Alfaras i in., 2010). Do polifenolowych substratów białka ABCG2 należy również witamina K3 (menadion) oraz podobna strukturalnie plumbagina (Shukla i in., 2007).

### 1.5.3. Inhibitory białka ABCG2

Ponieważ białko ABCG2 jest jednym z czynników odpowiedzialnych za zjawisko lekooporności nowotworów, duże nadzieje wiąże się z zahamowaniem jego aktywności w komórkach nowotworowych poddawanych chemioterapii. Zidentyfikowano wiele związków będących inhibitorami ABCG2. Część z tych związków jest poddawana testom klinicznym, aby zweryfikować potencjalne korzyści z ich stosowania (Ricci i in., 2015).

Fumitremorgina C (FTC) jest pierwszym odkrytym inhibitorem białka ABCG2. Ta mykotoksyna została wyizolowana z *Aspergillus fumigatus* i wykazano, że jest w stanie niwelować oporność na mitoksantron w komórkach raka jelita grubego S1-M1-3.2 wyselekcjonowanych za pomocą tego leku (Rabindran i in., 1998, 2000). FTC efektywnie hamuje aktywność transportową i ATPazową białka (Chen i in., 2003; Noguchi i in., 2009). Związek ten wykazuje jednak dużą neurotoksyczność *in vivo*. Jego półsyntetycznym analogiem jest Ko143. Inhibitor ten nie tylko hamuje aktywność transportera około 10 razy mocniej niż FTC (podobny efekt osiągany jest przy niższych stężeniach inhibitora), ale jest również nietoksyczny w stosowanym zakresie stężeń (Allen i in., 2002; Weiss i in., 2007). Ko143 jest najbardziej specyficznym ze znanych drobnocząsteczkowych inhibitorów ABCG2. Hamuje on aktywność transportera w stężeniach ok. dwustukrotnie niższych niż te, które są wymagane do zahamowania aktywności innych transporterów ABC o zbliżonej specyficzności substratowej, w szczególności ABCB1 i ABCC1 (Allen i in., 2002). Niestety, w doświadczeniach *in vivo* wykazano, że Ko143 w surowicy szczura jest metabolizowany do mało aktywnej pochodnej już w ciągu kilku minut od podania (Weidner i in., 2015). Oprócz Ko143 zsyntetyzowano wiele innych inhibitorów białka ABCG2 posiadających strukturę zbliżoną do FTC, na przykład inne diketopiperazyny (van Loevezijn i in., 2001) oraz tryprostatynę A (Woehlecke i in., 2003). Inhibitory te wykazywały jednak mniejszą aktywność niż Ko143. Niedawno zsyntetyzowano również szereg analogów Ko143, w których skupiono się na modyfikacji grup funkcyjnych w pozycji C-3 (w pierścieniu D) oraz C-9 (w pierścieniu A), ponieważ miejsca te są kluczowe dla aktywności pochodnych FTC (Jackson i in., 2018). Pięć spośród siedemnastu przygotowanych pochodnych wykazuje aktywność porównywalną lub niewiele wyższą niż Ko143. Najbardziej aktywnym związkiem jest MZ29. Podobnie jak Ko143 całkowicie blokuje on transport siarczanu estronu do pęcherzyków błonowych oraz w największym stopniu hamuje aktywność ATPazową ABCG2. Wzory strukturalne FTC, Ko143 i MZ29 pokazano na rycinie 13. Badania z wykorzystaniem cryo-EM udowodniły, że dwie cząsteczki MZ29 stabilnie wiążą się do kieszeni pierwszej transportera (utworzonej z dwóch monomerów ABCG2) i uniemożliwiają zajście cyklu katalicznego (patrz rycina 8; (Jackson i in., 2018)).

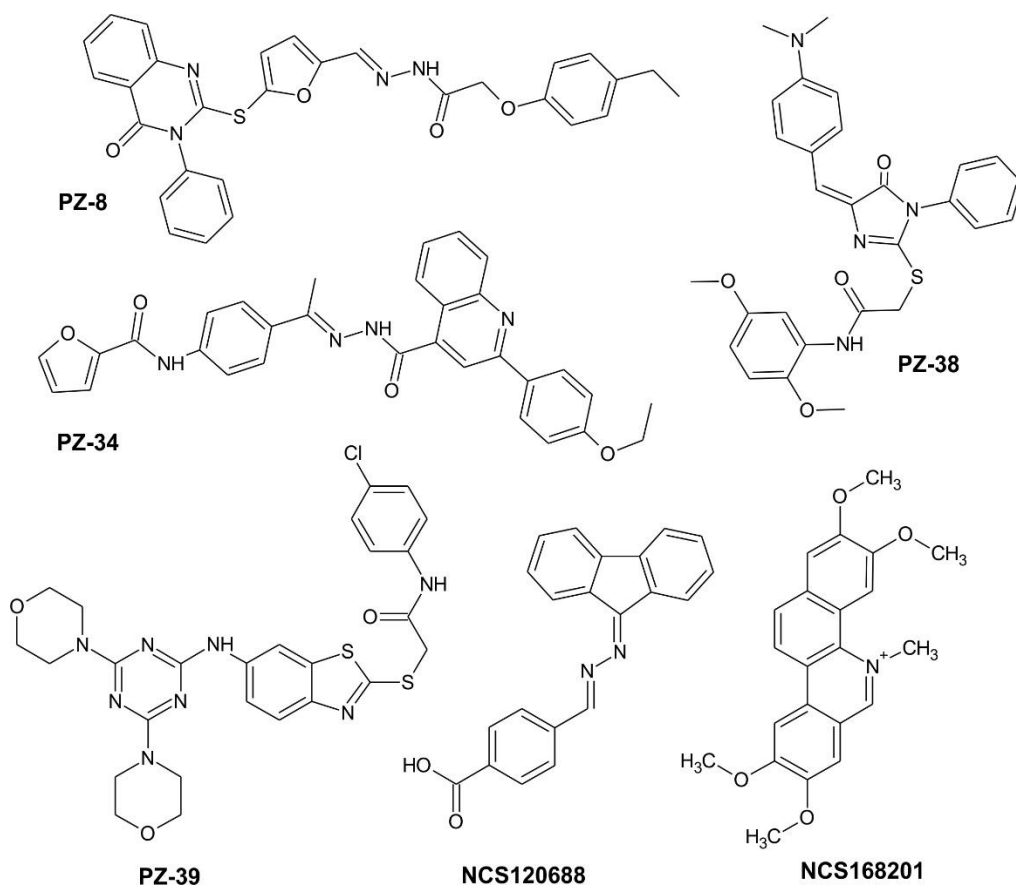


**Rycina 13.** Struktura chemiczna fumitremorginy C oraz jej dwóch półsyntetycznych pochodnych.

Ze względu na duże podobieństwo w specyficzności substratowej między białkami ABCB1 i ABCG2 nie dziwi fakt, że wiele spośród znanych syntetycznych lub naturalnych inhibitorów białka ABCB1 jest również dobrymi inhibitorami ABCG2. Do grupy tej należą między innymi GF120918 (inaczej elakridar, (de Bruin i in., 1999; Maliepaard i in., 2001)), cyklosporyna A (Ozvegy i in., 2001; Qadir i in., 2005) i jej pochodna PSC-833 (inaczej walspodar, (García-Escarp i in., 2004)), rezerpina (Wierdl i in., 2003; Zhou i in., 2001), tarikwidar (Robey i in., 2004), syntetyczne pochodne taksanów ortataksel i tRA96023 (Minderman i in., 2004), pochodne dihydropirydiny niguldypina, nikardypina i nitrendypina (Zhang i in., 2005), a także wiele piperazynobenzopiranonów i fenyloaminobenzopiranonów (Boumendjel i in., 2005).

Oddzielną pod względem budowy chemicznej grupę inhibitorów białka ABCG2 stanowią flawonoidy (Ye i in., 2019). Wiele spośród tych polifenolowych związków pochodzenia naturalnego wykazuje silne działanie modulujące aktywność tego transportera. Związki takie jak kwercetyna, silibinina, daidzeina, chryzyna, tektochryzyna, 6-prenylochryzyna, biochanina A oraz resweratrol specyficznie zwiększają akumulację mitoksantronu oraz BODIPY-prazosyny w komórkach eksprymujących ABCG2 (Ahmed-Belkacem i in., 2005; Cooray i in., 2004; Zhang i in., 2004). W innym zestawie doświadczeń wykazano, że genisteina, akacetyna, kempferol, naryngenina oraz jej 7-O-glikozyd (prunina) uczulają na SN-38 oraz mitoksantron komórki linii K562 posiadające nadekspresję ABCG2, ale nie komórki linii wyjściowej (Imai i in., 2004). Podobne działanie wykazują również leki o budowie zbliżonej do flawonoidów: flawopirydol, półsyntetyczny alkaloid stosowany w chemioterapii ostrej białaczki szpikowej (Nakanishi i in., 2003) oraz nowobiocyna, antybiotyk aminokumarynowy (Shiozawa i in., 2004). Co ciekawe, zastosowanie mieszaniny kilku flawonoidów będących inhibitorami ABCG2 pozwoliło na wykazanie synergii w ich działaniu (Zhang i in., 2004). Do związków pochodzenia

naturalnego stanowiących inhibitory ABCG2 należą również kurkuminy. Związki te nie są transportowane, ale wykazano, że wiążą się do miejsca aktywnego enzymu wypierając z niego jodoaryloazydoprazosynę. W komórkach zawierających transporter ABCG2 zwiększają akumulację mitoksantronu lub feoforbidu A, nie wpływając przy tym na poziom ekspresji białka ani na jego aktywność ATPazową (Chearwae i in., 2006).



**Rycina 14.** Struktura chemiczna wybranych inhibitorów dynamicznych białka ABCG2.

Oprócz inhibitorów drobnocząsteczkowych znanym akompetycyjnym inhibitorem białka ABCG2 jest przeciwciało monoklonalne 5D3. Jego epitop znajduje się na zewnątrzkomórkowej części transportera w konformacji otwartej do wnętrza. Związanie przeciwciała blokuje cykl transportowy białka ABCG2 stabilizując je w tej konformacji, co uniemożliwia jego aktywność (Őzvegy-Laczka i in., 2005).

Poszukiwania nowych drobnocząsteczkowych inhibitorów białka ABCG2, wykorzystujące techniki wysokoprzepustowe, doprowadziły również do odkrycia związków określanych mianem inhibitorów dynamicznych (Peng i in., 2010). Związki należące do tej grupy podobnie jak inhibitory statyczne (na przykład FTC czy Ko143) bezpośrednio hamują aktywność transportową białka ABCG2, ale dodatkowo przyspieszają jego degradację zmniejszając ilość transportera obecną w błonach komórkowych. Pierwszym inhibitorem, dla którego grupa

profesora Jian-Ting Zhang'a zaobserwowała taki podwójny efekt obniżania aktywności białka ABCG2, jest związek PZ-39 (Peng i in., 2009). Wykazano, że PZ-39 stymuluje degradację ABCG2 przyspieszając endocytozę białka i kierując je do lizosomów. W komórkach HEK 293, na których prowadzono te badania, inkubacja z PZ-39 obniża okres półtrwania białka z około 54 godzin do jedynie około 5 godzin. Inne związki z serii PZ: PZ-8, PZ-34 oraz PZ-38 również funkcjonują jako inhibitory dynamiczne, ale związek PZ-16 posiada według autorów jedynie cechy inhibitora statycznego. Udowodniono, że dwa inne inhibitory (NSC120688 i NSC168201) scharakteryzowane niezależnie przez inną grupę badaczy (Henrich i in., 2007) też wykazują właściwości inhibitorów dynamicznych (Peng i in., 2010). Dokładny mechanizm działania tego typu inhibitorów nie jest jednoznacznie wyjaśniony i może być niejednorodny. Właściwości inhibitorów dynamicznych wykazują związki o różnej strukturze chemicznej. Wzory strukturalne opisywanych powyżej związków będących inhibitorami dynamicznymi ABCG2 zestawiono na rycinie 14.

## 2. Cele pracy

1. Opracowanie metody badania **specyficzności substratowej** ABCG2 wobec szerokiej grupy związków naturalnych, która umożliwiałaby identyfikację substratów lub inhibitorów oraz ilościowy opis kinetyki ich oddziaływania z transporterem.
2. Ilościowe określenie zróżnicowania oddziaływań z ABCG2 w grupie flawonoidów jako potencjalnych substratów tego transportera.
3. Zastosowanie techniki FLIM do badania **aktywności transportowej** ABCG2 oraz oddziaływań białko-białko i białko-substrat z jego udziałem.
4. Opracowanie opartej o mikroskopię konfokalną metodyki badania przebiegu i mechanizmów internalizacji białek błonowych.
5. Określenie związku między przekształceniami strukturalnymi białka ABCG2 a jego **lokalizacją subkomórkową**.



## **3. Materiały i metody**

### **3.1. Materiały**

#### **3.1.1. Odczynniki**

Wszystkie niespecjalistyczne odczynniki używane w niniejszej pracy zostały zakupione w Merck KGaA (Darmstadt, Germany) lub Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). W dalszej części podane są źródła odczynników specjalistycznych.

##### **3.1.1.1. Inhibitory**

Inhibitory białka ABCG2 stosowane w niniejszej pracy: FTC, Ko143, GF120918, PSC833 i nilotinib zakupiono w Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Inhibitory PZ-16, PZ-34, PZ-38 oraz PZ-39 zakupiono w Specs (Zoetermeer, Holandia). Szczegółowe informacje o właściwościach tych inhibitorów znajdują się w podrozdziale 1.5.3.

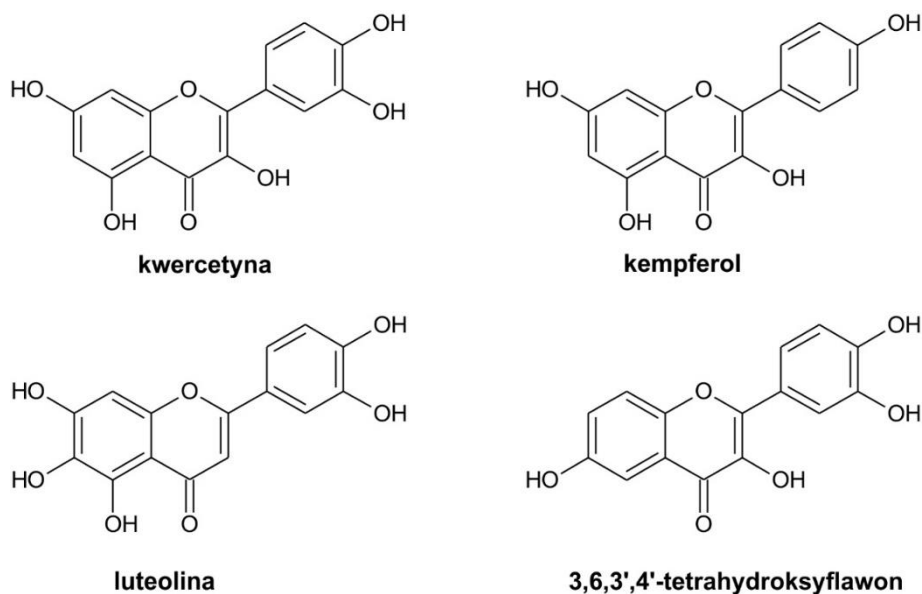
Zastosowano również inhibitory innych ludzkich białek ABC (zakupione w Merck): werapamil – inhibitor białka ABCB1, MK571 – inhibitor białek z rodziny ABCC, probenecid – inhibitor białka ABCC1.

W doświadczeniach dotyczących endocytozy stosowano następujące odczynniki: bafilomycyna A1, cytochalazyna D, paklitaksel, winkrystyna, nokodazol, chlorpromazyna, triflupromazyna, dansylokadaweryna, dynasore, filipina, metylo- $\beta$ -cyklodekstryna (m $\beta$ CD), nystatyna, genisteina, PP2 i wortmanina zakupione w Merck. Odczynniki Pitstop 2 oraz Pitstop 2 – NC zakupiono w Abcam (Cambridge, Wielka Brytania).

##### **3.1.1.2. Flawonoidy**

Bibliotekę związków o nazwie FL-500 Flavonoid Derivatives zakupiono w TimTec (Newark, USA). Zakupiono również flawonoidy naturalnego pochodzenia pochodzące ze zbioru oferowanego przez firmę Chemfaces (Wuhan, Chiny). Opis flawonoidów zakupionych w formie tych dwóch bibliotek i stosowanych w niniejszej pracy znajduje się w aneksie w tabelach 1 i 2.

Kwercetynę i trzy flawonoidy właściwe podobne do niej (kempferol, luteolina i 3,6,3',4'-tetrahydroksyflawon) zakupiono w Merck. Wzory strukturalne tych związków przedstawiono na rycinie 15.



**Rycina 15.** Wzory strukturalne kwercetyny oraz trzech innych flawonoidów właściwych o zbliżonej strukturze, ale różnej konfiguracji grup hydroksylowych.

### 3.1.1.3. Przeciwciała

Nieznakowane mysie przeciwciało monoklonalne 5D3 o izotypie IgG<sub>2b</sub> skierowane przeciwko zewnątrzkomórkowemu epitopowi białka ABCG2 zakupiono w Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Przeciwciało 5D3 wyznakowane bezpośrednio za pomocą barwnika Pacific Blue (5D3-PacBlue) zakupiono w BioLegend (San Diego, USA). Przeciwciało 5D3 wyznakowane bezpośrednio za pomocą barwnika Alexa Fluor 488 (5D3-AF488) zakupiono w RiD Systems (Minneapolis, MN, USA). Pierwszorzędowe mysie przeciwciało monoklonalne BXP-34 o izotypie IgG<sub>1</sub> skierowane przeciwko wewnątrzkomórkowemu epitopowi białka ABCG2 zakupiono w Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA). Pierwszorzędowe mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ATPazie Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (klon 464.6) zakupiono w Abcam. W doświadczeniach typu Western Blot stosowano królicze poliklonalne przeciwciało (numer katalogowy AV43649) skierowane przeciwko ABCG2 oraz monoklonalne mysie przeciwciało skierowane przeciwko β-aktynie (klon AC-74), które zakupiono w firmie Merck. Wyznakowane bezpośrednio za pomocą fluoresceiny przeciwciało pierwszorzędowe skierowane przeciwko receptorowi transferyny (anty-TfR-FITC, BD Pharmingen FITC Mouse Anti-Human CD71) stymulujące klatrynozależną endocytozę tego receptora zakupiono w BD Biosciences (San Jose, USA).

W firmie Thermo Fisher Scientific zakupiono wszystkie kozie przeciwciała drugorzędowe skierowane przeciwko konkretnym izotypom mysiego IgG lub przeciwko króliczemu IgG, skoniugowane z różnymi wariantami barwnika Alexa Fluor. W Thermo Fisher Scientific zakupiono również fragmenty Zenon skierowane przeciwko mysiemu IgG1, wyznakowane za pomocą Alexa Fluor 488 lub za pomocą Alexa Fluor 568. Drugorzędowe przeciwciało królicze

skierowane przeciwko mysiemu IgG i skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. horseradish peroxidase), a także drugorzędowe przeciwciało kozie skierowane przeciwko króliczemu IgG i skoniugowane z HRP, zakupiono w Merck.

#### **3.1.1.4. Odczynniki stosowane do barwienia komórek**

Preparat transferyny wyznakowany Alexa Fluor 488 (Tf-AF488), wyznakowaną Alexa Fluor 488 podjednostkę B toksyny cholery (CtxB-AF488), wyznakowany BODIPY FL preparat laktozyloceramidu C5 (LacCer C5-BODIPY FL), wyznakowany tetrametylorodaminą preparat dextranu o średniej wielkości 70 kDa (dextran-TMR) oraz wyznakowany Alexa Fluor 647 preparat albuminy surowicy bydłowej (BSA-AF647) zakupiono w Thermo Fisher Scientific.

Ester 2-aminoetylowy kwasu difenyloborinowego (DPBA, ang. diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester; numer CAS 208-366-5) stosowany do fluorescencyjnej derywatywacji flawonoidów oraz chlorowoderek bisbenzimidu H 33342 (Hoechst 33342) używany do barwienia jąder komórkowych zakupiono w Merck. Barwnik mCLING-ATTO647 stosowany do barwienia błon plazmatycznych komórek zakupiono w Synaptic Systems (Coventry, Wielka Brytania).

Preparaty bakulowirusów CellLight Plasma Membrane-RFP oraz CellLight Early Endosomes-RFP zakupiono w Thermo Fisher Scientific. W komórkach zainfekowanych preparatem CellLight Plasma Membrane-RFP jest ekspresjonowane białko PM-TagRFP. PM-TagRFP zawiera na N-końcu 10-aminokwasową sekwencję (pochodzącą z kinazy Lck10) rozpoznawaną przez enzymy dołączające do białka reszty nasyconych kwasów tłuszczowych: mirystynowego i palmitynowego. W konsekwencji białko PM-TagRFP kotwiczy się w wewnętrznej (po stronie cytoplazmy) warstwie dwuwarstwy lipidowej błon plazmatycznych w regionach tratw lipidowych (regionów bogatych w cholesterol oraz fosfolipidy o nasyconych resztach kwasów tłuszczowych). W komórkach zainfekowanych preparatem CellLight Early Endosomes-RFP jest ekspresjonowane białko fuzyjne Rab5a-TagRFP. Tak wyznakowane białko Rab5a ulega ekspresji w błonach wczesnych endosomów.

#### **3.1.2. Płytki wielodołkowe do obrazowania**

W przypadku pomiarów fluorescencji cieczy stosowano czarne, płaskodenne, 96-dołkowe płytki polistyrenowe (Thermo Fisher Scientific). W przypadku pomiarów dotyczących monowarstwy komórek stosowano płytki 96-dołkowe o czarnych ściankach posiadające przezroczyste polistyrenowe dno (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). W przypadku pomiarów mikroskopowych prowadzonych za pomocą mikroskopu konfokalnego stosowano płytki 96-dołkowe o czarnych ściankach posiadające szklane dno o grubości odpowiadającej grubości szkła nakrywkowego #1.5 (0,175 mm) (Greiner Bio-One).

### 3.1.3. Plazmidy

Z repozytorium Addgene (Watertown, USA) otrzymano następujące plazmidy niosące geny ludzkich małych GTPaz:

- Arf6(T27N)-CFP; umożliwia ekspresję białka Arf6(T27N) (mutacja negatywna dominująca (Beemiller i in., 2006)) jako białka fuzyjnego z niebieskim białkiem fluoryzującym ECFP,
- Arf6(Q67L)-CFP; umożliwia ekspresję białka Arf6(Q67L) (białko konstytutywnie aktywne (Beemiller i in., 2006)) jako białka fuzyjnego z niebieskim białkiem fluoryzującym ECFP,
- EGFP-RhoA(T19N); umożliwia ekspresję białka RhoA (T19N) (mutacja negatywna dominująca (Subauste i in., 2000)) jako białka fuzyjnego z zielonym białkiem fluoryzującym EGFP,
- EGFP-RhoA(Q63L); umożliwia ekspresję białka RhoA (Q63L) (białko konstytutywnie aktywne (Subauste i in., 2000)) jako białka fuzyjnego z zielonym białkiem fluoryzującym EGFPu,
- EGFP-Cdc42(T17N); umożliwia ekspresję białka Cdc42(T17N) (mutacja negatywna dominująca (Subauste i in., 2000)) jako białka fuzyjnego z zielonym białkiem fluoryzującym EGFP,
- EGFP-Cdc42(Q61L); umożliwia ekspresję białka Cdc42 (Q61L) (białko konstytutywnie aktywne (Subauste i in., 2000)) jako białka fuzyjnego z zielonym białkiem fluoryzującym EGFP,
- Rab5(Q79L)-GFP; umożliwia ekspresję białka Rab5(Q79L) (białko konstytutywnie aktywne (Dinneen i Ceresa, 2004)) jako białka fuzyjnego z zielonym białkiem fluoryzującym EGFP.

Mutacja negatywna dominująca sprawia, że w komórkach, w których to нефункциональное białko ulega ekspresji, zahamowana jest również aktywność endogennego białka, ponieważ wariant zawierający mutację, obecny w komórkach w znacznie większej ilości, konkuruje o miejsca wiązania na aktywatorach (białkach wymieniających nukleotydy guanylowe).

Białko konstytutywnie aktywne zawiera mutację, która uniemożliwia spontaniczną lub stymulowaną przez związanie białek regulatorowych hydrolizę GTP związanego do danej GTPazy. Sprawia to, że białko permanentnie znajduje się w konformacji aktywnej.

W firmie Evrogen (Moskwa, Rosja) zakupiono następujące plazmidy:

pTagGFP2-N; wektor ekspresyjny zawierający gen zielonego białka fluoryzującego TagGFP2,  
pTagRFP-N; wektor ekspresyjny zawierający gen czerwonego białka fluoryzującego TagRFP,  
pmKate2-N; wektor ekspresyjny zawierający gen czerwonego białka fluoryzującego mKate2,

pmKate2-lyso; wektor ekspresyjny zawierający gen szczurzego białka LAMP-1 w fuzji z czerwonym białkiem fluoryzującym mKate2 dołączonym na C-końcu. Białko LAMP-1 jest markerem lizosomów.

W firmie Thermo Fisher Scientific zakupiono następujące plazmidy:

pENTR/D-TOPO – wektor do klonowania z wykorzystaniem techniki Gateway.

pcDNA™6.2/V5-DEST – wektor do ekspresji genów w komórkach ssaczych; ekspresja kontrolowana promotorem CMV. Plazmid umożliwia rekombinację z wykorzystaniem techniki Gateway.

#### **3.1.4. Linie komórkowe**

W poniższej pracy korzystano z trzech linii komórkowych o niewykrywalnej za pomocą immunofluorescencji ekspresji ludzkiego białka ABCG2:

- HEK 293 – ludzkie nieśmiertelne adenowirusem embrionalne komórki nerki. Poziom ekspresji ABCG2 w tych komórkach jest niewykrywalny techniką Western Blot (Zámbó i in., 2020);
- HeLa – ludzkie komórki raka szyjki macicy. Poziom ekspresji ABCG2 w tych komórkach jest niewykrywalny techniką Western Blot (Zámbó i in., 2020);
- MDCK-II – spontanicznie immortalizowane komórki psiej linii komórek nabłonkowych nerki. Komórki te nie zawierają homologu ludzkiego białka ABCG2, który byłby wykrywalny techniką Western Blot (Storch i in., 2007).

Dodatkowo korzystano z trzech linii komórkowych o wysokiej ekspresji białka ABCG2:

- A549 – ludzkie komórki niedrobnokomórkowego raka płuca. Linia ta wykazuje naturalnie wysoką ekspresję białka ABCG2 (Kovacsics i in., 2020);
- MCF7 – ludzkie komórki raka piersi. Linia ta wykazuje naturalnie wysoką ekspresję białka ABCG2 (Mastrangelopoulou i in., 2022).;
- HT29 – ludzkie komórki raka jelita grubego. Linia ta wykazuje naturalnie wysoką ekspresję białka ABCG2 (Kim i in., 2015).

Korzystano również z dwóch linii stabilnie transfekowanych genem ludzkiego białka ABCG2:

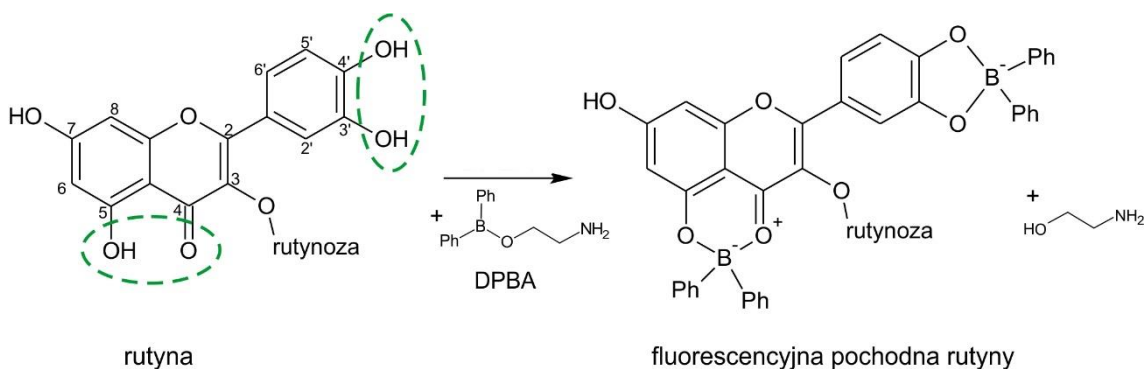
- MDCK-II/BCRP – komórki MDCK-II z heterologiczną nadekspresją ludzkiego ABCG2 (Pavek i in., 2005);
- G401-ABCG2 – ludzkie komórki rabdoidalnego guza złośliwego nerki linii G401 z homologiczną nadekspresją ludzkiego ABCG2.

Komórki MDCK-II i MDCK-II/BCRP zakupiono w Solvo Biotechnology (Budapeszt, Węgry); komórki G401-ABCG2 pozyskano z kolekcji Katedry Biologii Nowotworów i Epigenetyki UŁ. Wszystkie pozostałe linie komórkowe otrzymano ze zbiorów ATCC (Manassas, USA).

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Zasada derywatywacji flawonoidów za pomocą DPBA

DPBA to związek chemiczny, który stosowany jest czasem w biologii jako inhibitor wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych (Wei i in., 2020). W histochemii roślin jest on również czasem wykorzystywany jako odczynnik derywatyżujący do wykrywania polifenoli (zwłaszcza flawonoidów), tworząc z nimi w nieenzymatycznej reakcji barwny i fluoryzujący produkt. Dzięki temu znajduje on zastosowanie do wykrywania flawonoidów w tkankach roślinnych pod mikroskopem fluorescencyjnym (Chapman i Muday, 2021). Pomimo tego, że zjawisko derywatywacji flawonoidów z DPBA znane jest od wielu dziesięcioleci, dopiero w 2011 roku opublikowano pracę, w której opisana jest struktura chemiczna powstającego produktu oraz warunki, jakie musi spełniać flawonoid, aby ulegać reakcji derywatywacji (Matteini i in., 2011). Na przykładzie rutyny wykazano, że DPBA będący kwasem Lewisa przeprowadza atak elektrofilowy na atomy tlenu w sąsiednich grupach hydroksylowych przy pierścieniu fenylowym lub na grupy hydroksylową i karbonylową znajdujące się w układzie chromen-4-onu. Schemat reakcji, w której dwie cząsteczki DPBA reagują z jedną cząsteczką rutyny, pokazano na rycinie 16. Powstająca pochodna difenyloborinianowa wykazuje fluorescencję i tworzy się z udziałem grup hydroksylowych przy węglach 3' i 4', jak również grupy karbonylowej i hydroksylowej przy węglach 4 i 5. Z cząsteczki DPBA w efekcie opisywanej reakcji uwalnia się również etanoloamina.



**Rycina 16.** Przebieg reakcji rutyny z DPBA z wytworzeniem fluorescencyjnej pochodnej difenyloborinianowej. Grupy funkcyjne z atomami tlenu ulegającymi atakowi elektrofilowemu za pomocą DPBA, zaznaczono zieloną przerywaną linią. Na podstawie (Matteini i in., 2011).

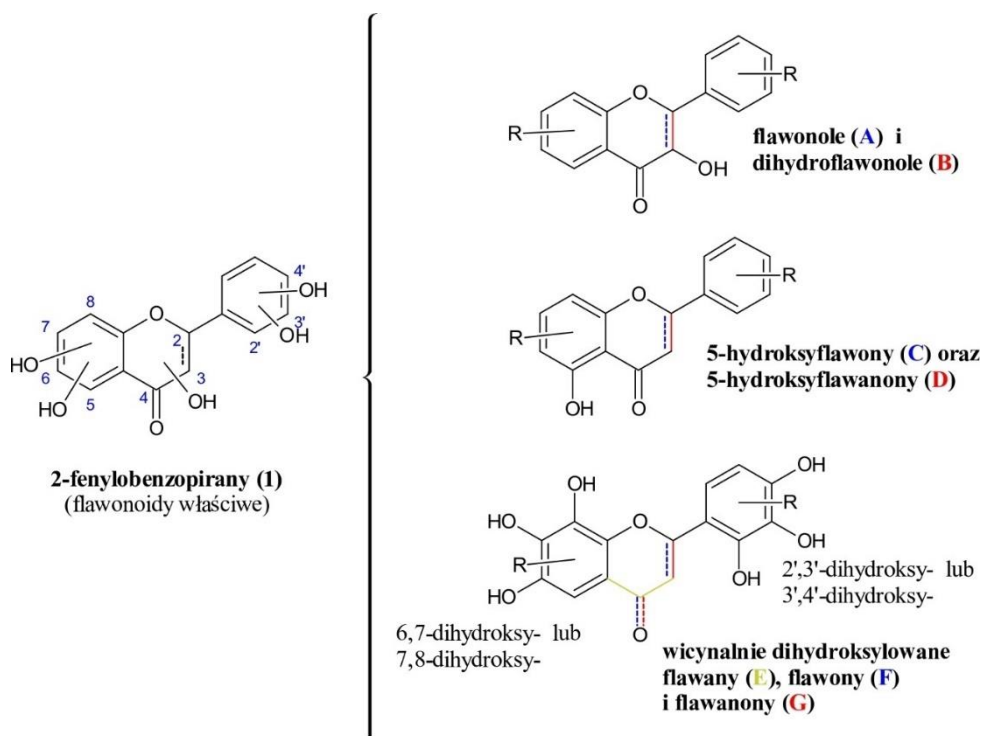
Ponieważ stosowanie nazwy „pochodna difenyloborinianowa flawonoidu” nie jest praktyczne, w dalszej części niniejszej pracy fluorescencyjny produkt reakcji flawonoidu z DPBA jest opisywany w skrócie jako „flawonoid+DPBA”. Na przykład fluorescencyjny produkt reakcji DPBA z kwercetyną, czyli pochodna difenyloborinianowa kwercetyny, określane jest jako „kwercetyna+DPBA”.

### 3.2.2. Wybór flawonoidów do derywatywacji

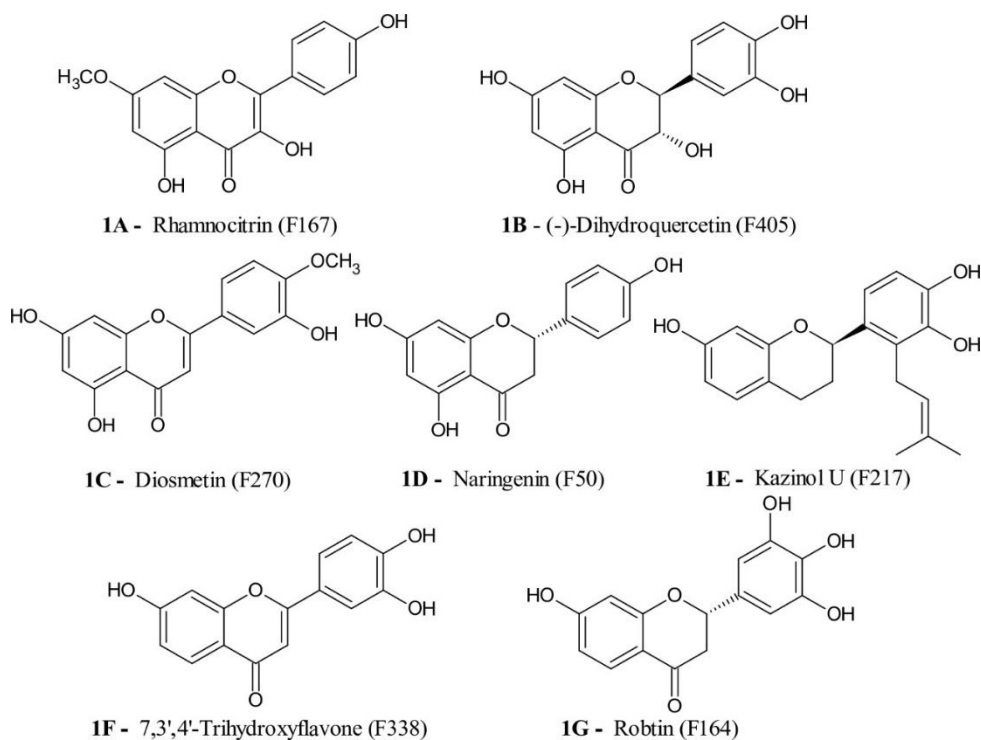
Przeprowadzono analizę *in silico* dwóch bibliotek związków polifenolowych oferowanych przez firmy TimTec oraz Chemfaces. Stosując kryterium podziału flawonoidów pod kątem struktury układu polifenolowego związki przyporządkowano do trzech głównych grup: 2-fenylobenzopiranołów, czyli flawonoidów właściwych (1 grupa główna), 3-fenylobenzopiranołów, czyli izoflawonoidów (2 grupa główna), oraz pozostałych związków, takich jak kromony czy aurole (3 grupa główna). Ponieważ każda z grup głównych zawiera nadal bardzo różnorodnie strukturalnie związki, w obrębie każdej z grup głównych wydzielono odrębne grupy podrzędne (A, B, C, D, itd.) spełniające podstawowe kryterium wymagane do derywatywacji za pomocą DPBA, czyli obecność sąsiednich grup hydroksylowych lub grupy hydroksylowej i karbonylowej (patrz rycina 16). Na rycinach 17, 19 i 21 przedstawiono schematyczne wzory strukturalne związków należących do odpowiednio: 1, 2 i 3 grupy głównej. Na rycinach 18, 20 i 22 przedstawiono przykładowe związki reprezentujące różne grupy podrzędne w obrębie różnych grup głównych. Nazwy związków przedstawiono na rycinach w języku angielskim dla spójności z tabelami 1 i 2 znajdującymi się w aneksie, w których nazwy zakupionych odczynników podano w języku angielskim zgodnie z opisem uzyskanym od producentów.

W aneksie w tabeli 1 zestawiono podstawowe informacje dotyczące 444 związków reprezentujących bibliotekę firmy TimTec: numer katalogowy, masę molową oraz nazwę systematyczną. Flawonoidy, które zostały wybrane do dalszej analizy (123 z tej biblioteki), zaznaczono w tabeli na kolor zielony. Przyporządkowano je do odpowiednich grup zgodnie z kryteriami przedstawionymi na rycinach 17, 19 i 21. Opisano je również nazwami zwyczajowymi i nadano im kolejne numery identyfikacyjne od F1 do F123. W aneksie w tabeli 2 zestawiono podstawowe informacje dotyczące 461 związków reprezentujących flawonoidy pochodzenia naturalnego zebrane w zbiorze oferowanym przez firmę Chemfaces: numer katalogowy, masę molową, numer CAS oraz nazwę zwyczajową. Flawonoidy potencjalnie ulegające reakcji z DPBA (283 z biblioteki Chemfaces) zostały zaklasyfikowane do danej grupy (zgodnie z rycinami 17, 19 i 21), zaznaczono je w tabeli na zielono i nadano im dalsze numery identyfikacyjne od F124 do F406.

13 flawonoidów wybranych do derywatywacji znajduje się w obu przeanalizowanych bibliotekach. Flawonoidy które opisano i którym nadano numer identyfikacyjny w bibliotece TimTec, nie były już opisywane w bibliotece Chemfaces.

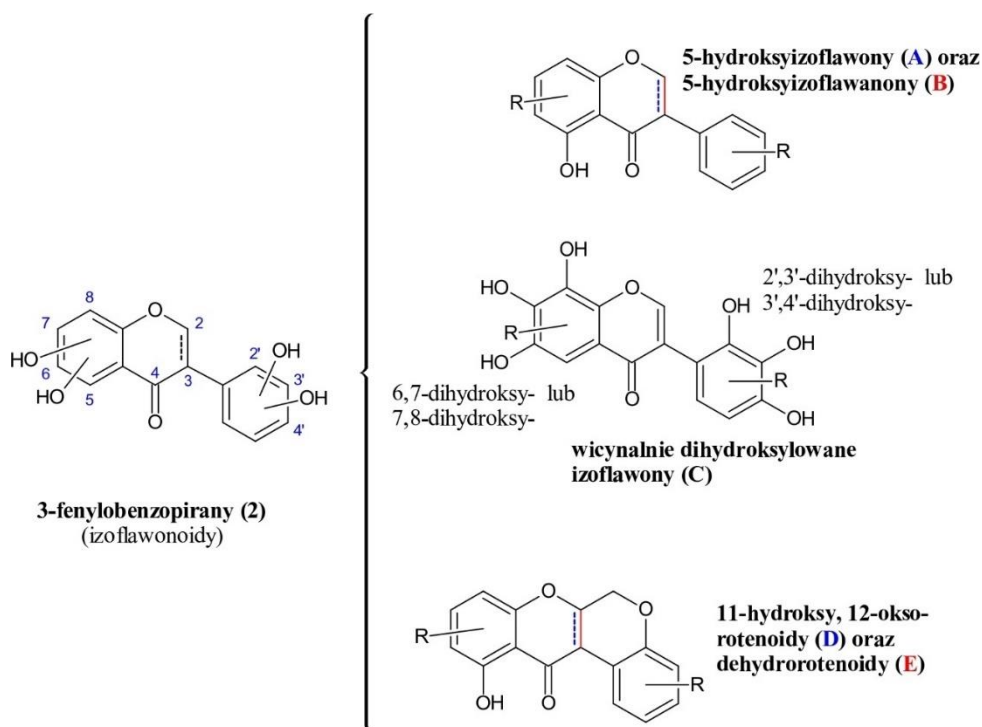


**Rycina 17.** Schematyczne wzory strukturalne związków należących do pierwszej grupy głównej 2-fenylobenzopirany (flawonoidy właściwe) i potencjalnie ulegających reakcji z DPBA z wytworzeniem pochodnej difenyloborinianowej. Flawonoidy tej grupy głównej zaklasyfikowano do siedmiu grup podrzędnych (oznaczone od A do G). Kolorami zaznaczono różnice we wzorach strukturalnych umożliwiające przypisanie związku do danej podgrupy.

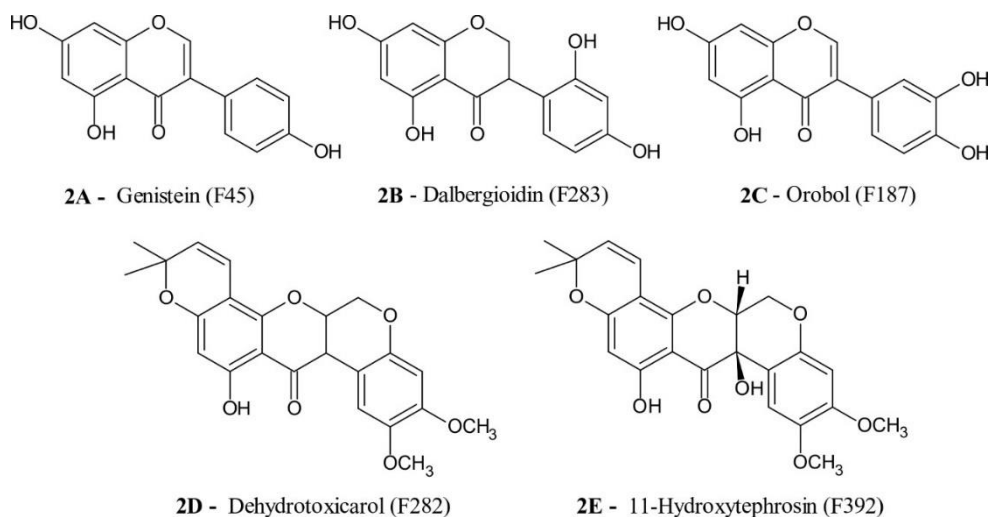


**Rycina 18.** Przykładowe flawonoidy wybrane do dalszej analizy i należące do pierwszej grupy głównej 2-fenylobenzopirany (flawonoidy właściwe). Nazwy zwyczajowe, pochodzące z danych udostępnionych przez producenta, przedstawiono w języku angielskim. W nawiasie podano numer identyfikacyjny nadany na potrzeby niniejszej rozprawy (patrz aneks tabela 1 i 2).



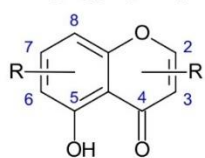


**Rycina 19.** Schematyczne wzory strukturalne związków należących do drugiej grupy głównej 3-fenylbenzopirany (izoflawonoidy) i potencjalnie ulegających reakcji z DPBA z wytworzeniem pochodnej difenylborinianowej. Flawonoidy tej grupy głównej zaklasyfikowano do pięciu grup podrzędnych (oznaczone od A do E). Kolorami zaznaczono różnice we wzorach strukturalnych umożliwiające przypisanie związku do danej podgrupy.

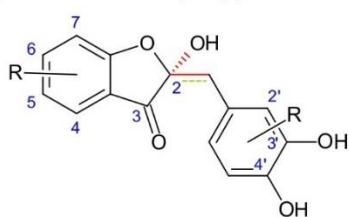


**Rycina 20.** Przykładowe flawonoidy wybrane do dalszej analizy i należące do drugiej grupy głównej 3-fenylbenzopirany (izoflawonoidy). Nazwy zwyczajowe, pochodzące z danych udostępnionych przez producenta, przedstawiono w języku angielskim. W nawiasie podano numer identyfikacyjny nadany na potrzeby niniejszej rozprawy (patrz aneks tabela 1 i 2).

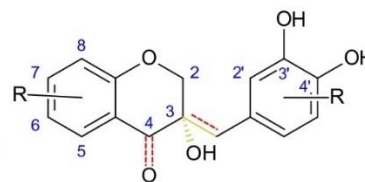
Inne grupy wybranych związków flawonoidowych (3):



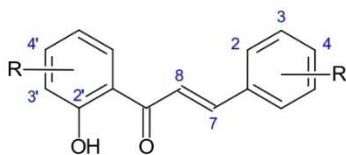
5-hydroksykromony (3A)



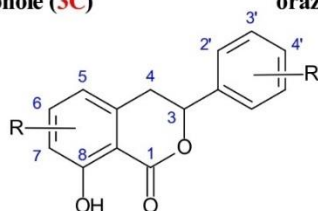
3',4'-dihydroksy-aurony (3B) oraz auronole (3C)



3',4'-dihydroksy-homoizoflawnony (3D) oraz homoizoflawnony (3E)

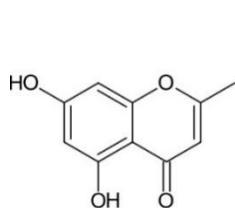


2'-hydroksychalkony (3F)

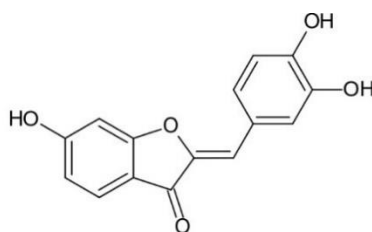


8-hydroksydihydrokumaryny (3G)

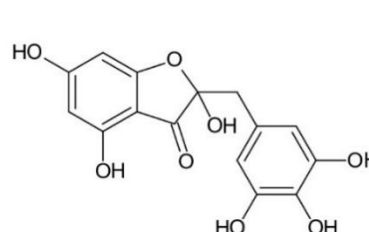
**Rycina 21.** Schematyczne wzory strukturalne związków należących do trzeciej grupy głównej (inne flawonoidy) i potencjalnie ulegających reakcji z DPBA z wytworzeniem pochodnej difenylborinianowej. Flawonoidy tej grupy głównej zaklasyfikowano do pięciu grup podrzędnych (oznaczone od A do E). Kolorami zaznaczono różnice we wzorach strukturalnych umożliwiające przypisanie związku do danej podgrupy.



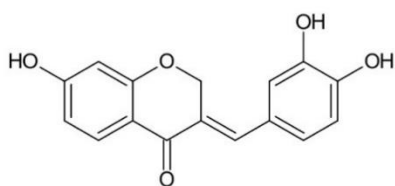
3A - Noreugenin (F193)



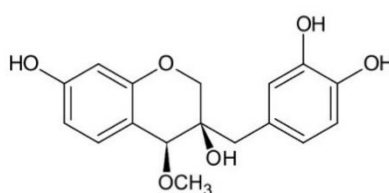
3B - Sulfuretin (F146)



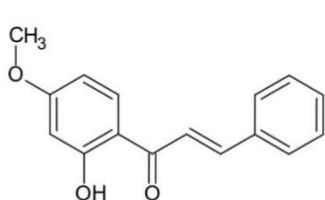
3C - Amaronol A (F322)



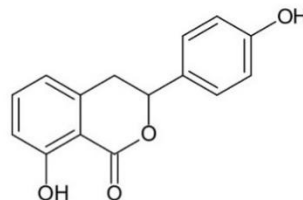
3D - Sappanone A (F156)



3E - 4-O-Methylsappanol (F362)



3F - 4'-methoxy-2'-hydroxychalcone (F123)



3G - Hydrangenol (F235)

**Rycina 22.** Przykładowe flawonoidy wybrane do dalszej analizy i należące do trzeciej grupy głównej (inne flawonoidy). Nazwy zwyczajowe, pochodzące z danych udostępnionych przez producenta, przedstawiono w języku angielskim. W nawiasie podano numer identyfikacyjny nadany na potrzeby niniejszej rozprawy (patrz aneks tabela 1 i 2).

Z biblioteki firmy TimTec wybrano 105 związków z pierwszej grupy głównej (1A – 57; 1B – 1; 1C – 28; 1D – 5; 1F – 13; 1G – 1), 6 związków z drugiej grupy głównej (2A – 5; 2C – 1) oraz 12 związków z trzeciej grupy głównej (3F – 12). Z biblioteki firmy Chemfaces wybrano 219 związków z pierwszej grupy głównej (1A – 26; 1B – 23; 1C – 99; 1D – 46; 1E – 23; 1F – 1; 1G – 1), 42 związki z drugiej grupy głównej (2A – 30; 2B – 7; 2C – 3; 2D – 1; 2E – 1) oraz 22 z trzeciej grupy głównej (3A – 8; 3B – 1; 3C – 2; 3D – 3; 3E – 5; 3G – 3). Łącznie z obu bibliotek wybrano 406 związków: 324 flawonoidy właściwe (grupa 1), 48 izoflawonoidów (grupa 2) oraz 34 inne flawonoidy (grupa 3).

### **3.2.3. Pomiar stężenia białka**

Stężenie białka mierzono przy użyciu odczynnika Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. Do przygotowania krzywej wzorcowej używano roztworów albuminy surowicy bydlęcej (BSA, ang. bovine serum albumin) o stężeniach w zakresie 0-1500 µg/ml przygotowanych w buforze lizującym z wyjściowego roztworu o stężeniu 2 mg/ml dostarczonego przez producenta.

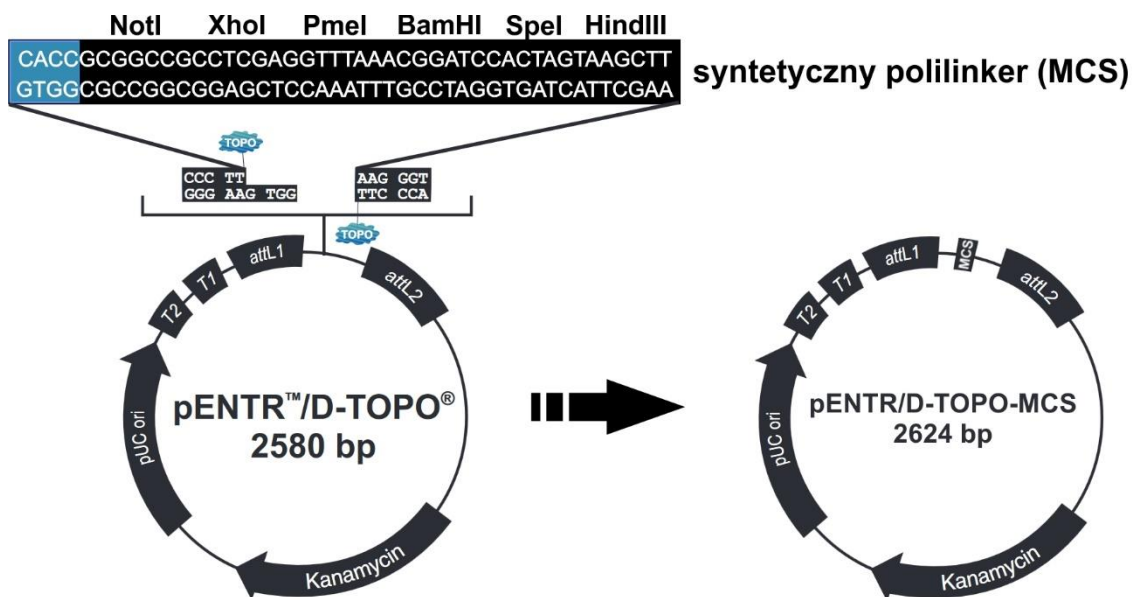
### **3.2.4. Izolacja plazmidów**

DNA plazmidowe wysokiej czystości wykorzystywane do transfekcji komórek otrzymano przez izolację z płynnej hodowli bakterii *E.coli* szczepu TOP10 (Thermo Fisher Scientific) za pomocą zestawu GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Merck). Stężenie preparatu DNA określano spektrofotometrycznie przez pomiar w kropli cieczy za pomocą spektrofotometru NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific).

### **3.2.5. Konstruowanie plazmidów**

#### **3.2.5.1. Konstruowanie plazmidów pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 i pcDNA6.2TagRFP-ABCG2**

Wykorzystując technologię zorientowanej ligacji wstawki do wektora linearyzowanego topoizomerazą I z wirusa *Vaccinia* do wektora pENTR/D-TOPO wklonowano syntetyczny polilinker (zakupiony w firmie Genomed) zawierający kilka miejsc rozpoznawanych przez różne enzymy restrykcyjne (dwa enzymy rozpoznające sekwencję ośmiu par zasad: NotI, PmeI oraz cztery enzymy rozpoznające sekwencję sześciu par zasad: XhoI, BamHI, SpeI, HindIII). Otrzymany w ten sposób plazmid nazwano pENTR/D-TOPO-MCS. Schemat integracji oraz sekwencję zintegrowanego polilinkera przedstawiono na rycinie 23.



**Rycina 23.** Schemat integracji sekwencji syntetycznego polilinkera do wektora pENTR/D-TOPO w celu stworzenia wektora pENTR/D-TOPO-MCS.

Plazmid pENTR/D-TOPO-MCS posłużył jako wektor do wklonowania namnożonej w reakcji PCR sekwencji kodującej białko ABCG2. Amplifikację pełnej sekwencji kodującej wraz z kodonem STOP wykonano na matrycy komercyjnego plazmidu zawierającego cDNA *ABCG2* (numer katalogowy SC320948, Origene, Rockville, USA) za pomocą polimerazy o wysokiej wierności PhusionHS-II (Thermo Fisher Scientific), dołączając na primerach sekwencje rozpoznawane przez enzymy XhoI oraz HindIII. Klonowanie przeprowadzono za pomocą klasycznych technik restrykcji i ligacji. Następnie do tak otrzymanego konstrukt pENTR/D-TOPO-MCS-ABCG2 wklonowano namnożoną w reakcji PCR na matrycy wektora pTagGFP2-N wstawkę kodującą białko TagGFP2 lub namnożoną na matrycy wektora pTagRFP-N wstawkę kodującą białko TagRFP. Primery do amplifikacji zawierały miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne NotI oraz XhoI. Aby umożliwić fuzję ABCG2 i odpowiedniego białka fluoryzującego, z sekwencji białka fluoryzującego podczas amplifikacji usunięto kodon STOP. W sekwencji genu białka fuzyjnego sekwencja kodująca ABCG2 znajdowała się na końcu 3' sekwencji kodującej gen białka fluoryzującego. Taka lokalizacja znacznika zapewnia, że powstające białko fuzyjne wykazuje pełną aktywność ATPazową i niezaburzoną aktywność transportową, ponieważ domeny odpowiedzialne za dimeryzację i formowanie kieszeni wiążącej substrat znajdują się po C-końcowej stronie ABCG2 (Orbán i in., 2008). Ostatecznie wykorzystując technologię Gateway (polegającą na rekombinacji między ściśle określonymi sekwencjami *attB* i *attP* – przeprowadzanej przez rekombinazę typu BP lub *attL* i *attR* – przeprowadzanej przez rekombinazę typu LR, pochodzącymi z bakteriofaga  $\lambda$ ) wykonano ukierunkowaną rekombinację kasety ekspresyjnej

z nieekspresyjnego wektora pENTR/D-TOPO-TagGFP2-ABCG2 lub pENTR/D-TOPO-TagGFP2-ABCG2 do wektora docelowego pcDNA6.2/V5-DEST stosując rekombinazę typu LR. Uzyskano w ten sposób plazmidy pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 i pcDNA6.2-TagRFP-ABCG2, umożliwiające nadekspresję białka fuzyjnego TagGFP2-ABCG2 lub białka fuzyjnego TagRFP-ABCG2 w komórkach ssaczych wraz z możliwością selekcji stabilnych transfektantów za pomocą blastycydyny S. Sekwencja kodująca ostatecznego plazmidu, jak również sekwencje wszystkich konstruktów pośrednich, została pozytywnie zweryfikowana za pomocą reakcji sekwencjonowania metodą Sangera (usługa naukowa w firmie Genomed). Sekwencja genu ABCG2 była zgodna z sekwencją referencyjną GenBank numer NM\_004827.

### **3.2.5.2. Konstruowanie plazmidu pcDNA6.2-ABCC2-TagGFP2**

W przeciwieństwie do białka ABCG2, do którego TagGFP2 dołączono na N-końcu, do białka ABCC2 znacznik fluorescencyjny dołączono na jego C-końcu. Różna lokalizacja znacznika jest związana z różnicami we wzajemnym ułożeniu domen między rodziną ABCG i ABCC (patrz rycina 2). Taka lokalizacja sprawia również, że w przypadku obu białek dołączone białko fluoryzujące znajduje się w podobnej odległości od miejsca wiązania substratu. Plazmid pENTR/D-TOPO-MCS posłużył jako wektor do wklonowania namnożonej w reakcji PCR sekwencji kodującej białko ABCC2. Amplifikację pełnej sekwencji kodującej wraz z kodonem STOP wykonano na matrycy komercyjnego plazmidu zawierającego cDNA ABCC2 (numer katalogowy SC119897, Origene) za pomocą polimerazy o wysokiej wierności PhusionHS-II, dołączając na primerach sekwencje rozpoznawane przez enzymy NotI oraz HindIII. Klonowanie przeprowadzono za pomocą klasycznych technik restrykcji i ligacji. Następnie na tak otrzymanym plazmidzie pENTR/D-TOPO-MCS-ABCG2 wykonano mutagenezę ukierunkowaną za pomocą zestawu do mutagenazy QuickChange Lightning (Agilent, Santa Clara, USA), usuwając z sekwencji kodującej ABCC2 kodon STOP oraz wprowadzając miejsca rozpoznawania dla enzymów BglII i NdeI. Następnie do tak przygotowanego wektora wklonowano namnożoną w reakcji PCR na matrycy wektora pTagGFP2-N wstawkę kodującą zielone białko fluoryzujące TagGFP2 wraz z kodonem STOP. Primery do amplifikacji zawierały miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne BglII i NdeI. Ostatecznie wykorzystując technologię Gateway wykonano ukierunkowaną rekombinację kasety ekspresyjnej z nieekspresyjnego wektora pENTR/D-TOPO-ABCC2-TagGFP2 do wektora docelowego pcDNA6.2/V5-DEST. Uzyskano w ten sposób plazmid pcDNA6.2-ABCC2-TagGFP2, umożliwiający nadekspresję białka fuzyjnego ABCC2-TagGFP2 w komórkach ssaczych wraz z możliwością selekcji stabilnych transfektantów za pomocą blastycydyny S. Sekwencja kodująca ostatecznego plazmidu, jak również sekwencje

wszystkich konstruktów pośrednich, zostały pozytywnie zweryfikowane za pomocą reakcji sekwencjonowania metodą Sangera (usługa naukowa w firmie Genomed). Sekwencja genu ABCG2 była zgodna z sekwencją referencyjną GenBank numer NM\_000392.

### **3.2.5.3. Konstruowanie plazmidów pTagRFP-TagGFP2 oraz pmKate2-TagGFP2**

Plazmid pTagGFP2-N posłużył jako wektor do wklonowania namnożonej w reakcji PCR sekwencji kodującej białko TagRFP lub białko mKate2. Amplifikację sekwencji kodującej bez kodonu STOP (aby umożliwić powstanie białka fuzyjnego) wykonano na matrycy plazmidu pTagRFP-N lub pmKate2-N za pomocą polimerazy o wysokiej wierności PhusionHS-II, dołączając na primerach sekwencje rozpoznawane przez enzymy KpnI oraz Agel. Klonowanie przeprowadzono za pomocą klasycznych technik restrykcji i ligacji. Otrzymano odpowiednio plazmidy pTagRFP-TagGFP2 oraz pmKate2-TagGFP2 umożliwiające ekspresję białek fuzyjnych, w których sekwencje białek fluoryzujących były połączone krótkim łącznikiem o sekwencji aminokwasowej LPVAT.

### **3.2.5.4. Mutageneza ukierunkowana plazmidu pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2**

Na matrycy wektora pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 przeprowadzono mutagenezę ukierunkowaną sekwencji kodującej białka ABCG2 za pomocą zestawu do mutagenezy QuickChange Lightning (Agilent). Otrzymano poniższe plazmidy umożliwiające ekspresję zmutowanego białka ABCG2 w fuzji z zielonym białkiem fluoryzującym:

- pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2(R482G);
- pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2(R482K);
- pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2(R482Y);
- pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2(K86M).

### **3.2.6. Hodowla komórkowa**

Do hodowli wszystkich linii komórkowych za wyjątkiem HT29 stosowano medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 4,5g/l glukoza, 25mM HEPES, 4 mM GlutaMax, bez pirogronianu) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum). Do hodowli linii HT29 stosowano medium McCoy's 5a z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Hodowle komórkowe prowadzono w inkubatorze do hodowli komórkowej o temperaturze 37°C, wilgotności 95% i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Komórki pasażowano co 2-3 dni rozcieńczając hodowle 6-krotnie. Do odklejania komórek od butelek hodowlanych stosowano 0,25% roztwór trypsyny z dodatkiem 1 mM EDTA (Merck). Po całkowitym odklejeniu się komórek od butelki hodowlanej do mieszaniny dodawano pełne medium hodowlane. Liczbę komórek w zawieszynie oceniano za pomocą zautomatyzowanego licznika Countess (Thermo Fisher Scientific).

### **3.2.7. Transfekcja chemiczna komórek**

Transfekcję przejściową komórek w małej skali wykonywano w płytkach 96-dołkowych SensoPlate, transfekcję komórek w dużej skali (do wyprowadzenia linii stabilnie transfekowanej oraz do przygotowania dużej ilości przejściowo transfekowanych komórek HeLa zawierających fluorescencyjnie wyznakowane białko ABCG2) wykonywano w płytkach 6-dołkowych. Ok. 24 h przed transfekcją komórki wysiewano w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na dołek w objętości 100  $\mu$ l (mała skala) lub w gęstości  $6 \times 10^5$  komórek na dołek w objętości 3 ml (duża skala) pełnego medium hodowlanego. W dniu transfekcji w probówkach typu Eppendorf przygotowywano mieszaninę transfekcyjną. W 55  $\mu$ l (mała skala) lub 150  $\mu$ l (duża skala) medium hodowlanego MEM bez dodatków rozcieńczano 550 ng (mała skala) lub 1,5  $\mu$ g (duża skala) DNA plazmidowego. Następnie do tego roztworu dodawano 3,3  $\mu$ l (mała skala) lub 9  $\mu$ l (duża skala) odczynnika Fugene HD (Promega) intensywnie mieszając probówkę. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do jednego dołka płytki dodawano 5  $\mu$ l (mała skala) lub 150  $\mu$ l (duża skala) przygotowanej mieszaniny transfekcyjnej. Komórki hodowano następnie w normalnych warunkach hodowli do czasu wykonywania pomiarów.

### **3.2.8. Transdukcja komórek preparatami bakulowirusów**

Transdukcję komórek wykonywano w płytkach 96-dołkowych SensoPlate. Ok. 24 h przed dodaniem odczynnika komórki wysiewano w gęstości  $20 \times 10^4$  komórek na dołek w objętości 100  $\mu$ l pełnego medium hodowlanego. Infekcję komórek wykonywano dodając 6  $\mu$ l odczynnika, czyli stosując 30 cząsteczek wirusa na komórkę. Preparaty hodowano następnie w normalnych warunkach hodowli przez 48 h do czasu wykonywania pomiarów mikroskopowych.

### **3.2.9. Wyprowadzenie linii HEK-TagGFP2-ABCG2**

Komórki linii HEK 293 zostały wybrane jako model do stabilnej nadekspresji białka ABCG2 w fuzji z białkiem TagGFP2 ze względu na niski wyjściowy poziom ekspresji transportera, jak również ze względu na łatwość uzyskiwania dla tej linii stabilnych sublinii zawierających zintegrowaną kasetę ekspresyjną. Po ok. 20 h od transfekcji przejściowej plazmidem pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 (z użyciem Fugene HD, jak opisano w podrozdziale 3.2.7.; wydajność transfekcji ~70%), komórki poddano stałej presji selekcyjnej za pomocą blastycydyny S w stężeniu 10  $\mu$ g/ml. Po 16 dniach selekcji antybiotykowej uzyskano poliklonalną hodowlę linii HEK-poly-TagGFP2-ABCG2 oporną na blastycydynę S. W celu uzyskania monoklonalnych, jednorodnych genetycznie sublinii HEK-TagGFP2-ABCG2 komórki wysiano na cztery płytki 96-dołkowe w rozcieńczeniu granicznym 0,5 komórki na jeden dołek. Po kilkutygodniowej hodowli z utrzymaniem stałej presji antybiotykowej (blastycydyna S w stężeniu 10  $\mu$ g/ml) otrzymano 9 stabilnych klonów, które dalej analizowano pod kątem

ekspresji TagGFP2-ABCG2 na poziomie mRNA i białka. Do dalszych eksperymentów wybrano klon z najwyższą ekspresją i najbardziej zbliżoną do opisywanej w literaturze lokalizacją wewnątrzkomórkową białka ABCG2 (dominująca lokalizacja w błonach plazmatycznych).

### **3.2.10. Derywatywacja flawonoidów za pomocą DPBA**

#### **3.2.10.1. Derywatywacja flawonoidów *in vitro***

W dołku płytki wielodołkowej (200  $\mu$ l) lub w probówce typu Eppendorf przygotowywano roztwory flawonoidów o określonym stężeniu w PBS. Aby przeprowadzić flawonoidy w ich fluorescencyjne pochodne, do przygotowanych roztworów dodawano stężony roztwór DPBA (do końcowego stężenia 1,11 mM) i przed pomiarem roztwory inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej.

#### **3.2.10.2. Derywatywacja flawonoidów w komórkach traktowanych w zawieszynie**

Dla każdego typu komórek w jednym punkcie pomiarowym przygotowywano zawiesinę  $6 \times 10^5$  komórek w objętości 1 ml stosując metodę opisaną w podrozdziale 3.2.6. W przypadku, kiedy aktywność białka ABCG2 hamowano za pomocą inhibitorów, na 15 minut przed dodaniem flawonoidu do zawiesiny komórek dodawano dany inhibitor z roztworu wyjściowego w DMSO o stężeniu 10 mM. Zawiesinę komórek inkubowano w pełnym medium hodowlanym przez godzinę w inkubatorze do hodowli komórkowych (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) bez dodatku lub z dodatkiem flawonoidu dodanego do końcowego stężenia 20  $\mu$ M ze stężonego roztworu wyjściowego w DMSO o stężeniu 100 mM. Po tym czasie komórki wirowano (200g, 5 min), usuwano medium wraz z nadmiarem flawonoidu, a komórki płukano jednokrotnie za pomocą lodowatego PBS, aby usunąć pozakomórkowe pozostałości flawonoidu. Następnie osad komórek lizowano za pomocą 500  $\mu$ l buforu lizującego (PBS z dodatkiem 0,5% Tritonu X-100) z dodatkiem lub bez dodatku DPBA (dodanego do końcowego stężenia 1,11 mM). Równolegle w przygotowanych lizatach komórkowych oznaczano stężenie białka i zmierzone wartości fluorescencji przedstawiano w przeliczeniu na 1 mg białka w lizacie. Pomiar fluorescencji wykonywano na czytniku płytek jak opisano w podrozdziale 3.2.11.2.

#### **3.2.10.3. Derywatywacja flawonoidów w komórkach traktowanych flawonoidami w monowarstwie**

##### **3.2.10.3.1. Derywatywacja flawonoidów w komórkach traktowanych flawonoidami w monowarstwie (komórki lizowane)**

Ok. 24 h przed podaniem flawonoidu komórki linii MDCK-II oraz MDCK-II/BCRP wysiewano na czarną płytkę 96-dołkową w określonej gęstości (od  $1 \times 10^3$  do  $5 \times 10^3$  komórek na dołek). W dniu eksperymentu komórki inkubowano z roztworem flawonoidu przez określony czas



w pełnym medium hodowlanym w normalnych warunkach hodowli. Aktywność białka ABCG2 w części dołków hamowano za pomocą Ko143 (końcowe stężenie 10  $\mu\text{M}$ ). Po zakończonej inkubacji usuwano medium hodowlane zawierające flawonoid, a następnie pozakomórkowe pozostałości flawonoidu usuwano poprzez dwukrotne przemycie komórek za pomocą lodowatego PBS. Następnie komórki lizowano buforem lizującym z DPBA (PBS pH = 7,4; 0,5% Triton X-100; 1,11 mM DPBA), uwalniając flawonoid znajdujący się w komórkach do lizatu oraz równocześnie przeprowadzając derywatyzację. Pomiar fluorescencji wykonywano na czytniku płytek jak opisano w podrozdziale 3.2.11.2.

Za miarę aktywności transportowej białka ABCG2 uznawano różnicę między średnimi wartościami fluorescencji lizatów otrzymanych z komórek pozbawionych aktywności ABCG2 (komórki MDCK-II lub komórki MDCK-II/BCRP traktowane 10  $\mu\text{M}$  Ko143) i lizatów z komórek zawierających aktywne białko ABCG2 (MDCK-II/BCRP).

### **3.2.10.3.2. Derywatyzacja flawonoidów w komórkach traktowanych flawonoidami w monowarstwie (komórki nielizowane)**

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $4 \times 10^4$  komórek na dołek (w objętości 100  $\mu\text{l}$ ) lub na płytki 384 dołkowe w gęstości  $15 \times 10^4$  komórek na dołek (w objętości 40  $\mu\text{l}$ ) na ok. 24 h przed doświadczeniem. W dniu eksperymentu do komórek dodawano roztwór flawonoidów w pełnym medium hodowlanym (przez rozcieńczenie roztworów 2x stężonych przygotowanych z wyjściowych roztworów flawonoidów w DMSO) i inkubowano komórki przez godzinę w normalnych warunkach hodowli. Następnie do komórek dodawano stężony roztwór DPBA w PBS (do końcowego stężenia DPBA 1,11 mM) i inkubowano komórki przez 20 minut w temperaturze pokojowej. W niektórych doświadczeniach znad komórek usuwano najpierw medium z flawonoidem, komórki przepłukiwano za pomocą lodowatego PBS, a następnie dodawano do nich roztwór DPBA w PBS (o stężeniu 1,11 mM) na 20 minut. W celu przygotowania lizatów komórkowych zamiast DPBA z PBS do komórek dodawano bufor lizujący z DPBA (PBS pH = 7,4; 0,5% Triton X-100; 1,11 mM DPBA). W przypadku doświadczenia wysokoprzepustowego (w płytkach 384 dołkowych) komórki dodatkowo utrwalano przez 15 minut w temperaturze pokojowej za pomocą 2% formaldehydu zbuforowanego w PBS (pH = 7,4), a następnie barwiono ich jądra komórkowe przez 5 min za pomocą 5  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 w PBS. W przypadku obserwacji mikroskopii konfokalnej jądra komórkowe wybarwiano jak opisano powyżej, a dodatkowo błony plazmatyczne wybarwiano przez 2 min inkubacji z 0,5  $\mu\text{M}$  odczynnikami mCLING-ATTO647 przygotowanym w PBS. Ostatecznie znad komórek usuwano nadmiar odczynników barwiących i komórki obrazowano w buforze PBS.

### **3.2.11. Pomiar fluorescencji pochodnych flawonoid+DPBA**

#### **3.2.11.1. Pomiar widm absorpcji oraz widm emisji fluorescencji**

Widma wykonywano w płytkach 96-dołkowych za pomocą czytnika płytek EnVision® firmy PerkinElmer. Stosując monochromatory, wartości absorbancji rejestrowano w określonym zakresie długości fali co 5 nm, a wartości intensywności emisji fluorescencji przy wybranej długości fali wzbudzenia rejestrowano w określonym zakresie długości fali co 3 nm.

Na podstawie widm określano, przy jakiej długości fali znajduje się maksimum emisji fluorescencji oraz jaka jest wartość intensywności emisji w tym punkcie. Dodatkowo na podstawie zarejestrowanych widm emisji fluorescencji wybranych roztworów flawonoid+DPBA obliczano wartość odpowiadającą intensywności emisji przy wzbudzeniu długością fali 485 nm w zakresie długości fali 500-545 nm. Wartość intensywności emisji obliczano przez zsumowanie wszystkich wartości intensywności emisji zmierzonych w podanym zakresie.

#### **3.2.11.2. Pomiar intensywności fluorescencji w cieczy**

Pomiar intensywności fluorescencji roztworów flawonoid+DPBA lub lizatów komórkowych wykonywano w czarnych płytkach 96-dołkowych za pomocą czytnika płytek EnVision stosując odpowiednie zestawy filtrów ekscytacyjnych i emisyjnych opisane w treści pracy. Fluorescencję mierzono na wysokości 6,5 mm powyżej dna dołka w roztworach o objętości 100 µl.

#### **3.2.11.3. Pomiar intensywności fluorescencji w monowarstwie komórek**

Pomiar intensywności fluorescencji monowarstwy komórek, w których znajdowała się fluorescencyjna pochodna luteolina+DPBA, wykonywano w płaskodennych płytkach 96-dołkowych o czarnych ściankach i przezroczystym dnie (µClear® firmy Greiner Bio-One) za pomocą czytnika płytek EnVision, stosując filtr wzbudzenia  $Ex = 485 \pm 14$  nm i emisji  $Em = 555 \pm 38$  nm. Fluorescencję mierzono na wysokości dna dołka płytki. W czasie pomiaru komórki znajdowały się w PBS o objętości 50 µl.

#### **3.2.11.4. Pomiar stężenia flawonoidów na podstawie krzywych standardowych**

W celu sporządzenia krzywych standardowych w probówkach typu Eppendorf przygotowywano seryjne rozcieńczenia flawonoidów (z roztworów wyjściowych o stężeniu 100 mM w DMSO) w buforze lizującym (PBS + 0,5% Triton X-100), stosując dwukrotne rozcieńczenia od stężenia 3,2 µM do stężenia 100 nM. Wszystkie rozcieńczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Jako ślepą próbę stosowano bufor lizujący. Następnie do wszystkich roztworów dodawano 1000x stężony roztwór DPBA w DMSO do końcowego stężenia 1,11 mM. Po 5 min inkubacji w temperaturze pokojowej wykonywano pomiar intensywności

fluorescencji jak opisano w podrozdziale 3.2.11.2. Na podstawie średnich wartości intensywności fluorescencji wykreślano krzywe standardowe, dla których za pomocą regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów otrzymywano równanie funkcji liniowej oraz współczynnik determinacji  $R^2$ .

Stężenie danego flawonoidu w badanej próbce lizatu komórkowego obliczano, korzystając z równania funkcji liniowej dla krzywej standardowej odpowiadającego mu produktu flawonoid+DPBA.

### **3.2.12. Badanie kinetyki inhibicji transportu luteoliny**

#### **3.2.12.1. Metody eksperymentalne**

Ok. 24 h przed doświadczeniem w przypadku obserwacji mikroskopowych na 96-dołkową płytkę SensoPlate komórki MDCKII/BCRP wysiewano w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na dołek w 100  $\mu$ l pełnego medium hodowlanego, a w przypadku doświadczenia na lizatach komórkowych komórki wysiewano w gęstości  $4 \times 10^4$  komórek na dołek.

W dniu eksperymentu komórki inkubowano najpierw przez 30 min z różnymi stężeniami inhibitora, a następnie komórki inkubowano z luteoliną w różnych stężeniach w nieobecności lub w obecności takich samych stężeń inhibitora przez 1 h. Wszystkie inkubacje prowadzono w 37°C w inkubatorze do hodowli komórkowych. Komórki przepłukiwano dwukrotnie lodowatym PBS. W przypadku pomiarów mikroskopowych do komórek dodawano następnie po 100  $\mu$ l roztworu PBS (RT) z dodatkiem 1,11mM DPBA. Fluorescencję komórek mierzono za pomocą zautomatyzowanego mikroskopu fluorescencyjnego (patrz podrozdział 3.2.14.1.). W przypadku pomiarów lizatów komórkowych do komórek dodawano 100  $\mu$ l buforu lizującego z DPBA (PBS pH = 7,4; 0,5% Triton X-100; 1,1 mM DPBA). Fluorescencję lizatów komórkowych mierzono na czytniku płytek jak opisano w podrozdziale 3.2.11.2.

#### **3.2.12.2. Metody obliczeniowe**

Ponieważ w obecności 10  $\mu$ M Ko143 aktywność białka ABCG2 względem luteoliny jest prawie w 100% zahamowana, szybkość transportu przy danym stężeniu inhibitora można określić za pomocą zależności:

$$V_c = I_{max} - I_c ,$$

Gdzie  $V_c$  to szybkość transportu przy stężeniu Ko143 równym  $c$ ,  $I_{max}$  to średnia intensywność fluorescencji komórek lub lizatów komórkowych inkubowanych z 10  $\mu$ M Ko143, a  $I_c$  to średnia intensywność fluorescencji komórek lub lizatów komórkowych z komórek inkubowanych ze stężeniem inhibitora równym  $c$ . Wykreślano wykres Dixona, czyli liniową zależność  $1/V_c$  od  $c$  i za pomocą regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów określano równanie prostej

dla każdego ze stężeń substratu. Na podstawie uzyskanych równań prostych obliczano, odciętą punktu przecięcia prostych. Eksperymentalna stała inhibicji ( $K_i$ ) odpowiada modułowi wartości odciętej obliczonej w ten sposób. Niepewność obliczonej wartości  $K_i$  wyznaczano jako średni błąd średniej punktów przecięcia prostych znajdujących się na granicach przedziału ufności ( $p = 0,05$ ).

### **3.2.13. Immunodetekcja białek**

#### **3.2.13.1. Przygotowanie próbek do techniki Western Blot**

Przygotowując próbki do oznaczania ekspresji ABCG2 techniką Western Blot,  $2 \times 10^6$  komórek A549 wysiewano na małe butelki do hodowli (o powierzchni  $25 \text{ cm}^2$ ) ok. 24 h przed eksperymentem. Następnie komórki hodowano w normalnych warunkach hodowli z dodatkiem określonych substancji. Po wskazanym czasie komórki odklejano od butelek hodowlanych za pomocą roztworu trypsyny z EDTA (0,25% + 1mM). Komórki liczone za pomocą zautomatyzowanego licznika Countess, zawiesiny  $2 \times 10^6$  komórek wirowano (200xg, 5 min) i osady komórkowe lizowano za pomocą 100  $\mu\text{l}$  1x stężonego redukującego buforu obciążającego do elektroforezy białek (Pierce Lane Marker, Thermo Fisher Scientific), do którego dodawano uprzednio 5 mM EDTA oraz rozcieńczony 100x koktajl inhibitorów proteaz (Merck). Stężenie białka oznaczano w lizatach po uprzednim rozcieńczeniu 10x w wodzie niewielkiej próbki każdego lizatu. Na pojedynczą ścieżkę żelu poliakrylamidowego nakładano preparaty lizatów, w których znajdowało się 10  $\mu\text{g}$  białka.

Przygotowując próbki do oznaczania ilości przeciwciała 5D3 techniką Western Blot, ok. 24 h przed eksperymentem na dwie płytki 6 dołkowe wysiewano komórki w gęstości  $1 \times 10^6$  komórek na dołek. W dniu eksperymentu do medium komórek wysianych na jednej z płytek dodawano bafilomycynę A1 (wyjściowy roztwór 10  $\mu\text{M}$  w DMSO) do końcowego stężenia 10 nM. Następnie do komórek dodawano normalne mysie IgG<sub>2b</sub> (kontrola negatywna) lub przeciwciała 5D3 w końcowym stężeniu 5  $\mu\text{g/ml}$ . Po określonym czasie medium znad komórek usuwano, komórki płukano jednokrotnie roztworem lodowatego PBS i lizowano bezpośrednio na płycie 6 dołkowej za pomocą 1 ml buforu lizującego (1% Triton X-100, PBS pH = 7,4, 5 mM EDTA, 1  $\times$  koktajl inhibitorów proteaz). Obecne w lizatach przeciwciała zagęszczano za pomocą kulek paramagnetycznych opłaszczonych białkiem A oraz białkiem G (Pierce Protein A/G Magnetic Beads, Thermo Fisher Scientific). Preparaty przeciwciał eluowano z kulek za pomocą 20  $\mu\text{l}$  1x stężonego nieredukującego buforu obciążającego do elektroforezy białek (Pierce Lane Marker, Thermo Fisher Scientific). Jako wzorca użyto 400 pg przeciwciała 5D3 zagęszczonego w analogiczny sposób z 1ml buforu lizującego. Na pojedynczą ścieżkę żelu poliakrylamidowego nakładano cały otrzymany eluat.

### **3.2.13.2. Półilościowe oznaczanie białek techniką Western Blot**

Rozdział elektroforetyczny próbek prowadzono w standardowych warunkach w gotowych gradientowych żelach poliakrylamidowych z SDS (Mini-PROTEAN TGX 4%-20%, BioRad, Hercules, USA). W przypadku analizy ilości białka ABCG2 jako wzorzec mas na jedną ścieżkę żelu nakładano 5 µl Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad). Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym próbki białka transferowano z żelu na membrany PVDF za pomocą systemu Trans-Blot Turbo Mini (BioRad). Membrany blokowano przez godzinę w 3% roztworze BSA w PBST (PBS pH = 7,4; 0,05 % Tween 20). W przypadku analizy ilości ABCG2 membrany inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym w rozcieńczeniu 1:1000 w 1% roztworze BSA w PBST. Membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi w rozcieńczeniu 1:50000 w 1% roztworze BSA w PBST. Związaną peroksydazę chrzanową wykrywano chemiluminescencyjnie stosując odczynnik Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientific), a obrazy rejestrowano za pomocą czytnika Multispectral FX Pro In-Vivo Imager (Carestream; Rochester, USA). Pomiarzy densytometryczne wykonywano w programie GelQuant.NET (biochemlabsolutions.com).

### **3.2.13.3. Immunofluorescencyjne barwienie komórek**

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na dołek na ok. 24 h przed doświadczeniem. We wszystkich doświadczeniach przeciwciało 5D3 stosowano w końcowym stężeniu równym 5 µg/ml. Przed utwaleniem preparatów, we wszystkich doświadczeniach w których komórki traktowano przyżyciowo za pomocą przeciwciała 5D3 lub odpowiednio wybarwionego przeciwciała drugorzędowego inkubacje prowadzono w pełnym medium hodowlanym, za wyjątkiem doświadczeń w których stosowano związki Pitstop2, Pitstop2 - NC lub związki oddziałujące z cholesterolem (filipina, nystatyna, mβCD). W tych doświadczeniach komórki inkubowano z przeciwciałami w medium pozbawionym surowicy (DMEM z dodatkiem 0,2% BSA).

W doświadczeniach, w których wykrywano epitopy obecne w komórkach, komórki utrwalano za pomocą 2% formaldehydu przygotowywanego na świeżo z paraformaldehydu i zbuforowanego w PBS do pH = 7,4. Przed dodaniem formaldehydu hodowle komórkowe płukano jednokrotnie za pomocą PBS. Komórki utrwalano przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu formaldehydu komórki permeabilizowano i blokowano niespecyficzne epitopy, inkubując komórki przez godzinę w buforze do immunofluorescencji (PBS pH = 7,4; 1% BSA; 3% normalna surowica kozia; 0,2% Triton X-100). Następnie komórki inkubowano przez godzinę z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym przygotowanym w buforze do immunofluorescencji C. Po trzykrotnym przepłukaniu komórek za pomocą PBST komórki inkubowano przez godzinę z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym

przygotowanym w buforze do immunofluorescencji (rozcieńczenie 1:1000). Komórki płukano następnie trzykrotnie za pomocą PBST. W przypadku, kiedy w komórkach barwiono jądra komórkowe, komórki inkubowano dodatkowo 5 minut z 5  $\mu$ M roztworem Hoechst33342 w PBS. Ostatecznie komórki umieszczano w PBS i analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej.

W doświadczeniach, w których wykrywano przeciwciało 5D3, którym uprzednio traktowano komórki przyżyciowo, komórki utrwalano jak opisano powyżej. Komórki po utrwaleniu traktowano przez 10 minut 0,2 M roztworem glicyny w PBS o pH = 7,4. Dla wykrycia przeciwciał dostępnych na powierzchni komórek prowadzono inkubację z przeciwciałem drugorzędowym (skierowane przeciwko mysiemu IgG<sub>2b</sub>) wyznakowanym za pomocą Alexa Fluor 555 przez godzinę w buforze pozbawionym detergentu (bufor do immunofluorescencji bez detergentu: PBS pH = 7,4; 1% BSA; 3% normalna surowica kozia). Dla wykrycia również przeciwciał zlokalizowanych wewnątrz komórek komórki permeabilizowano i blokowano niespecyficzne epitopy inkubując komórki przez godzinę w buforze do immunofluorescencji. Komórki inkubowano następnie z przeciwciałem drugorzędowym (skierowanym przeciwko mysiemu IgG<sub>2b</sub>) wyznakowanym za pomocą Alexa Fluor 488. Po trzykrotnym płukaniu komórek za pomocą PBST jądra komórkowe barwiono przez 5 min stosując 5  $\mu$ M roztwór Hoechst 33342 w PBS, a następnie komórki umieszczano w PBS i analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej.

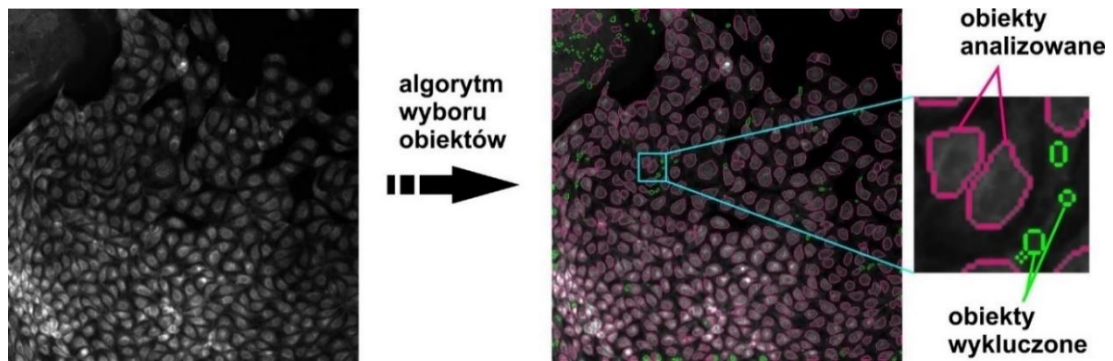
### **3.2.14. Techniki obrazowania**

#### **3.2.14.1. Mikroskopia fluorescencyjna – technika testów przesiewowych o wysokiej zawartości danych (HCS, ang. high-content screening)**

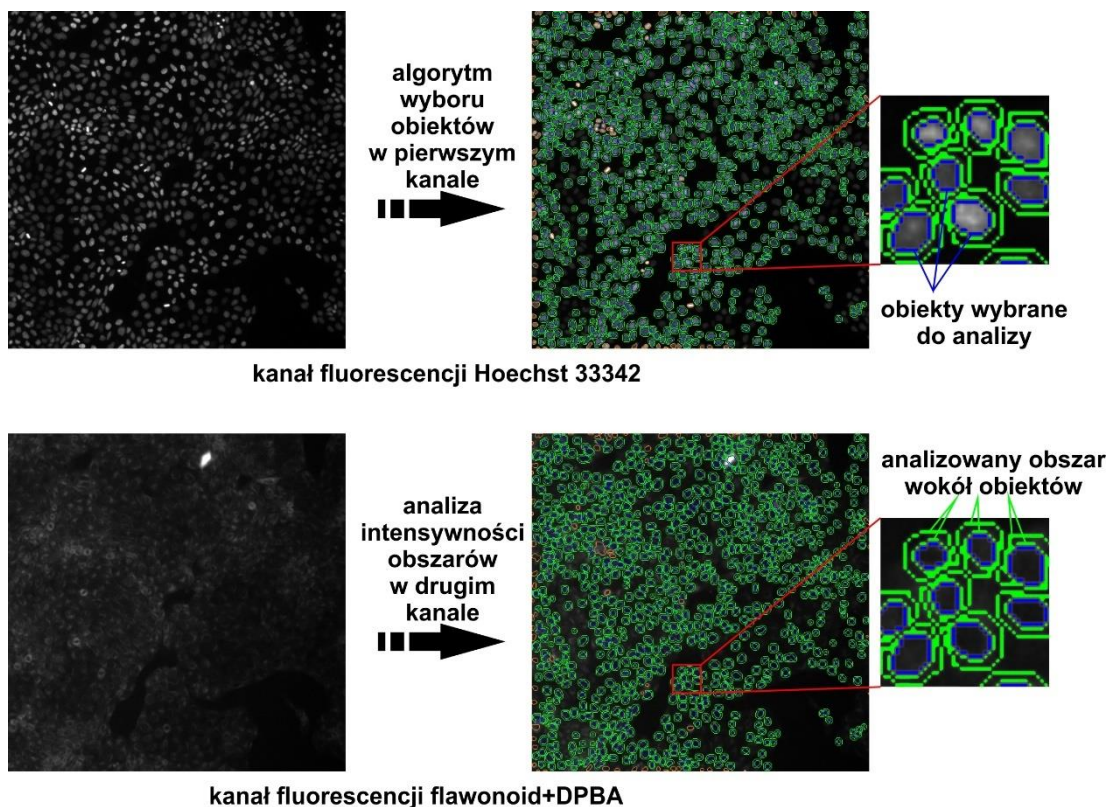
Obrazowanie techniką HCS wykonywano za pomocą zautomatyzowanego mikroskopu Cellomics ArrayScan VTI. Urządzenie wykonuje seryjne obrazowanie komórek w obrębie każdego wybranego dołka płytki w wybranych kanałach fluorescencji. Co kilka obrazów płaszczyzna ostrości jest automatycznie dostosowywana przez procedurę autoostrzenia obrazu.

Obrazowanie wykonywano w dwóch kanałach fluorescencyjnych, odpowiadających następującym fluoroforom: flawonoid+DPBA (Ex = 485  $\pm$  15 nm; Em = 525  $\pm$  20 nm) oraz Hoechst 33342 (Ex = 400  $\pm$  15 nm; Em = 460  $\pm$  40 nm). W przypadku pomiarów parametrów kinetycznych transportu luteoliny zastosowano jednokanałowy algorytm wyboru obiektów. Na rycinie 24 pokazano przykładowy obraz wykonany w kanale odpowiadającym pochodnej luteolina+DPBA wraz z zaznaczeniem obiektów wybranych do analizy oraz wykluczonych z analizy. Ponieważ intensywność fluorescencji luteolina+DPBA w komórkach była wysoka i równomiernie rozmieszczona w obrębie cytoplazmy komórek, identyfikacji pojedynczych obiektów (w tym wypadku całych komórek) dokonano w tym właśnie kanale. Następnie

dokonano automatycznej selekcji obiektów, eliminując z analizy obiekty zbyt duże (na przykład grupy komórek połączone w jeden rozpoznany obiekt), zbyt małe (przypadkowe artefakty obrazowania lub resztki komórek) i zbyt jasne (autofluoryzujące zanieczyszczenia i artefakty obrazowania). Intensywność fluorescencji mierzono następnie w tym samym kanale w całej powierzchni wyselekcjonowanych obiektów.



**Rycina 24.** Jednokanałowy algorytm identyfikacji obiektów do analizy (pojedyncze komórki) i selekcji dla eliminacji obiektów wykluczonych (artefakty obrazowania) przeprowadzony na obrazach fluorescencyjnych komórek MDCK-II/BCRP zawierających pochodną luteolina+DPBA.



**Rycina 25.** Dwukanałowy algorytm identyfikacji i wyboru obiektów do analizy. Obiekty identyfikowano i selekcjonowano do analizy obiekty na podstawie fluorescencji w kanale Hoechst 33342 (pojedyncze jądra komórkowe). Intensywność fluorescencji analizowano w kanale flawonoid+DPBA w regionie otaczającym obiekty zidentyfikowane w pierwszym kanale. Pokazano przykładowe zdjęcie komórek MDCK-II zawierających flawonoid+DPBA.

W przypadku pomiarów aktywności transportowej białka ABCG2 względem dużej grupy flawonoidów zastosowano dwukanałowy algorytm identyfikacji i selekcji obiektów. Na rycinie 25 pokazano przykładowe obrazy i wybór obiektów do analizy. Obiekty do analizy identyfikowano na podstawie sygnału fluorescencyjnego wybarwionych jąder komórkowych w kanale Hoechst 33342. Podobnie jak w przypadku algorytmu jednokanałowego obiekty następnie selekcjonowano, odrzucając obiekty zbyt duże, zbyt małe lub zbyt jasne. Następnie dokonywano identyfikacji pikseli zlokalizowanych w odległości 3 pikseli i mniej od granicy obiektów (pierścień cytoplazmy wokół jądra komórkowego). Intensywność fluorescencji mierzono następnie w drugim kanale, odpowiadającym fluorescencji flawonoid+DPBA, w zidentyfikowanym pierścieniu pikseli. Dzięki zastosowaniu takiej metody możliwe było określenie średniej fluorescencji cytoplazmy komórek nawet w przypadku, kiedy jej intensywność była bardzo niska.

#### **3.2.14.2. Obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego**

W skaningowej mikroskopii konfokalnej dzięki zastosowaniu koherentnego (laserowego) źródła światła oświetlany jest pojedynczy punkt preparatu, a dodatkowo dzięki systemowi specjalnych przesłon z otworem (ang. pinhole) umieszczonych we wspólnej płaszczyźnie ostrości na drodze optycznej do preparatu i do detektora, eliminowany jest sygnał pochodzący z punktów leżących poza tą płaszczyzną ostrości. Sprawia to, że rejestrowany sygnał fluorescencyjny pochodzi tylko z określonej objętości konfokalnej preparatu. Przeskanowanie wielu takich objętości konfokalnych umożliwia zarejestrowanie obrazów cienkich warstw preparatu, nazywanych przekrojami optycznymi. Grubość przekroju optycznego jest determinowana parametrami obiektywu oraz wielkością otworu przesłon, którą można regulować.

Do obrazowania fluorescencji w komórkach stosowano skanujący mikroskop konfokalny LSM 780 produkcji firmy Zeiss (Oberkochen, Niemcy). Jako źródło światła stosowano laser diodowy o długości fali emisji 405 nm, laser argonowy lub laser InTune o strojonej emisji w zakresie 490-645 nm. Obrazowanie prowadzono stosując odwróconą optykę mikroskopową. Obrazowanie prowadzono używając olejowego obiektywu immersyjnego Zeiss Plan-Apochromat 63x o aperturze numerycznej 1,4. W przypadku obrazowania przyżyciowego w temperaturze 37°C używano olejowy obiektyw immersyjny Zeiss Plan-Neofluar 40x o aperturze numerycznej 1,3. Do obrazowania w temperaturze pokojowej używano olejku immersyjnego Immersol 518F (Zeiss), do obrazowania w temperaturze 37°C używano olejku immersyjnego Immersol 518F / 37°C (Zeiss). Obrazy rejestrowano za pomocą oprogramowania ZEN2012 (Zeiss). W przypadku kiedy obrazowano fluorescencję kilku



różnych fluoroforów naraz, skanowano preparat sekwencyjnie, stosując za każdym razem optymalną długość fali wzbudzenia oraz zakres długości fal emisji odpowiadający temu fluoroforowi (kanał fluorescencji danego fluorofora). Gdy emisję rejestrowano przy długościach fali w zakresie 450-600 nm stosowano detektor spektralny typu GaAsP, w przeciwnym razie korzystano z dwóch dostępnych detektorów typu rura fotopowielacza (PMT, ang. photomultiplier tube). Dane dotyczące parametrów wzbudzenia i emisji fluorescencji wykorzystywane przy obrazowaniu fluoroforów opisanych w niniejszej pracy zestawiono w tabeli 1. Dla każdego z preparatów obrazowanie wykonywano z zastosowaniem dwukrotnego uśrednienia, stosując najwyższą rozdzielczość ograniczoną limitem Abbego i stosując niską szybkość skanowania (czas integracji sygnału z piksela równy ok. 4  $\mu$ s). W przypadku obrazowania z użyciem obiektywu 63x wielkość użytych przesłon (ok. 90  $\mu$ m) zapewniała obrazowanie przekrojów optycznych o grubości 1,3  $\mu$ m.

Średnią intensywność fluorescencji w pikselach w całym obrazie lub w zadanym regionie obrazu w danym kanale fluorescencji określano za pomocą oprogramowania ZEN2012.

Obserwacje przyżyciowe prowadzono w komorze mikroskopowej utrzymując temperaturę 37°C oraz atmosferę 5% CO<sub>2</sub>. W przypadku obrazowania przyżyciowego przed i po dodawaniu odczynników do tej samej próbki, obraz rejestrowano z tej samej płaszczyzny ostrości dzięki zastosowaniu zautomatyzowanego systemu odnajdowania dna preparatu dzięki analizie intensywności sygnału odbitego światła lasera. W tym przypadku obrazowanie wykonywano z użyciem obiektywu 40x, a wielkość użytych przesłon (ok. 90  $\mu$ m) zapewniała obrazowanie przekrojów optycznych o grubości 2,2  $\mu$ m. Płaszczyzna obrazowania znajdowała się w odległości 3  $\mu$ m od płaszczyzny maksymalnego odbicia (dna dołka).

Stopień kolokalizacji sygnału fluorescencyjnego w różnych kanałach wyznaczono, określając najpierw regiony zainteresowania (ROI, ang. region of interest). Następnie w wybranych ROI określano liczbę pikseli o sygnale w jednym z kanałów przekraczającym średnią fluorescencję tła ( $N_1$ ), a także liczbę pikseli o sygnale przekraczającym średnią fluorescencję tła w obu kanałach ( $N_{1+2}$ ). Procent kolokalizacji określano dla każdego regionu na podstawie wzoru:  $\%kolokalizacji = N_{1+2} / N_1 \times 100\%$ .

**Tabela 1.** Parametry wzbudzenia i emisji w kanałach fluorescencji stosowanych przy obrazowaniu wskazanych fluoroforów.

<b>Fluorofor</b>	<b>długość fali wzbudzenia [nm]</b>	<b>zakres długości fali emisji [nm]</b>
TagGFP2	490	500-560
TagRFP	550	560-640
mKate2	592	600-700
ikarytyna+DPBA	490	500-560
izotymonina+DPBA	490	500-560
kempferol+DPBA	490	500-560
kwercetyna+DPBA	553	500-600
luteolina+DPBA	553	500-600
ATTO647	645	650-755
Hoechst 33342	405	415-500
Pacific Blue	405	425-505
Alexa Fluor 488	490	500-560
Alexa Fluor 555	555	560-630
Alexa Fluor 568	570	580-700
Alexa Fluor 594	590	600-700
Alexa Fluor 647	645	650-755
błękit trypanu	570	580-700
fluoresceina	490	500-550
tetrametylorodamina	550	560-630
EGFP	490	500-550
ECFP	458	465-530

### **3.2.14.3. Ilościowa analiza endocytozy za pomocą obserwacji mikroskopowych**

Ok. 24 h przed eksperymentem komórki A549 wysiewano na 96-dołkowe płytki SensoPlate w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na dołek. W dniu eksperymentu na godzinę przed dodaniem fluorescencyjnie wyznakowanego białka medium komórek zmieniano na 100  $\mu$ l medium z dodatkami odpowiednich inhibitorów endocytozy. W przypadku wybranych inhibitorów (Pitstop2, Pitstop2 - NC, nystatyna, filipina oraz m $\beta$ CD) stosowano medium hodowlane pozbawione surowicy (DMEM z dodatkiem 0,2% BSA), w pozostałych przypadkach stosowano pełne medium hodowlane (DMEM z dodatkiem 10% FBS). Następnie do komórek dodawano odpowiednio wyznakowany preparat białka. Po wskazanym czasie medium zmieniano na 100  $\mu$ l HBSS z 1% BSA i odpowiednim inhibitorem endocytozy i natychmiast wykonywano przyżyciowe pomiary intensywności fluorescencji w odpowiednim kanale (patrz tabela 1) na tych samych czterech sąsiadujących polach widzenia przed i po dodaniu 50  $\mu$ l 0,4 % wodnego roztworu błękitu trypanu. Komórki po dodaniu błękitu trypanu obrazowano również w kanale odpowiadającym czerwonej fluorescencji błękitu trypanu związanego z białkami komórek

(Avelar-Freitas i in., 2014). Regiony zawierające komórki o zaburzonej integralności błony plazmatycznej, które wykazywały wewnątrzkomórkową fluorescencję w kanale błękitu trypanu, wykluczano z analizy intensywności fluorescencji w kanale odpowiadającym wyznakowanemu preparatowi białka. Analizę średniej intensywności fluorescencji w regionach wykonywano w programie ZEN2012 (Zeiss).

Na podstawie uzyskanych danych obliczano frakcję wewnątrzkomórkową fluorescencyjnie wyznakowanego białka zgodnie ze wzorem:

$$\text{frakcja wewnątrzkomórkowa (FW)} = \frac{\text{średnia intensywność sygnału po dodaniu błękitu trypanu}}{\text{średnia intensywność sygnału przed dodaniem błękitu trypanu}}$$

Względny procent internalizacji sygnału przedstawiony na rycinach obliczano na podstawie wzoru:

$$\text{względny procent internalizacji sygnału} = \frac{\text{FW w obecności inhibitora} \times 100\%}{\text{FW w nieobecności inhibitora}}$$

#### **3.2.14.4. Obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM, ang. fluorescence lifetime imaging microscopy)**

Próbki obrazowano za pomocą skaningowego mikroskopu konfokalnego LSM 780 w sposób opisany w podrozdziale 3.2.14.2. Fluorescencję próbki wzbudzano laserem pulsacyjnym InTune o częstotliwości pulsów 20 MHz. Fotony emitowane przez próbkę rejestrowano za pomocą dwóch dedykowanych detektorów (PMT) po przejściu przez moduł optyczny lustra dichroicznego i filtrów emisyjnych. Rejestrowane kanały odpowiadały długości fali emisji 502-537 nm i >560 nm. Obrazowanie czasu życia fluorescencji wykonywano stosując metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. time-correlated single photon counting). Do pomiarów używano modułu PicoHarp 300 produkcji firmy PicoQuant (Berlin, Niemcy). Dla każdego pola widzenia dane zbierano w rozdzielczości 512 x 512 pikseli, każdorazowo skanując obszar trzykrotnie i łącząc dane zarejestrowane w każdym z pikseli. W oparciu o dane uzyskane dla całego obrazu lub wybranego regionu obrazu sporządzano krzywą zaniku fluorescencji (histogram liczby fotonów rejestrowanych w funkcji czasu), do której za pomocą oprogramowania SymPhoTime 64 produkcji firmy PicoQuant dopasowywano wieloskładnikową funkcję wykładniczą o równaniu:

$$I(t) = \sum_i A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1)$$

gdzie  $I(t)$  to ilość fotonów zarejestrowanych po czasie  $t$  od wzbudzenia;  $A_i$  to cząstkowa amplituda dla składowej  $i$ ;  $\tau_i$  to czas życia fluorescencji dla składowej  $i$ . Aproksymację punktową wykonywano za pomocą metody oszacowywania największego

prawdopodobieństwa (ang. maximum likelihood estimation) minimalizując zredukowany parametr  $\chi^2$  (Patting, 2008). Kiedy analizowano próbki pojedynczych fluoroforów, zakładano obecność jednej składowej w równaniu (1). Dopasowanie wykonywano uwzględniając funkcję odpowiedzi instrumentu (ang. instrument response function) zmierzoną osobno dla użytego lasera pulsacyjnego (wykonując pomiar czasu życia fluorescencji nasyconego wodnego roztworu erytrozyny B w nasyconym roztworze jodku potasu (Szabelski i in., 2009)).

W celu graficznej reprezentacji czasów życia fluorescencji, w każdym pikselu obrazu szacowano średnią wartość czasu życia fluorescencji zakładając jedną składową równania (1) (określając punkt ciężkości krzywej zaniku fluorescencji dla tych danych, jak opisano w (Patting, 2008)). Tak oszacowany czas życia fluorescencji kodowano w każdym pikselu obrazu za pomocą ustalonego pseudokoloru. Intensywność sygnału odpowiadała liczbie zarejestrowanych fotonów.

#### **3.2.14.5. Czasowo-rozdzielcza dekonwolucja obrazu FLIM**

Krzywe zaniku fluorescencji uzyskiwane na podstawie FLIM poddawano analizie składowych funkcji wykładniczej opisanej równaniem (1). Wykonywano dopasowanie danych eksperymentalnych do równania, w którym założono dwie składowe o ustalonych czasach życia fluorescencji. Czasy życia pojedynczych składowych uzyskiwano na podstawie pomiarów FLIM komórek zawierających pojedyncze fluorofory. Następnie używając wartości amplitud i czasów życia fluorescencji wyznaczonych na podstawie dopasowania wykonanego dla fotonów zarejestrowanych z całego pola widzenia, fotony w każdym pikselu obrazu przyporządkowywano do danej składowej krzywej zaniku fluorescencji. W ten sposób w każdym pikselu obrazu uzyskiwano liczby fotonów wyemitowanych przez każdy z dwóch współwystępujących w preparacie fluoroforów.

#### **3.2.14.6. Oznaczanie intensywności Försterowskiego rezonansowego transferu energii (FRET, ang. Förster resonance energy transfer) przy użyciu FLIM (FRET-FLIM)**

Zjawisko FRET polega na bezpromienistym przekazywaniu części energii wzbudzenia między dwoma fluoroforami. Fluorofor, który będąc w stanie wzbudzonym traci część swojej energii wzbudzenia, nazywany jest donorem. Fluorofor, który zyskuje energię od donora, nazywany jest akceptorem. Wydajność zjawiska FRET ( $E$ ) silnie zależy od odległości ( $r$ ) między cząsteczkami (centrami fluoroforowymi) donora i akceptora:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2)$$

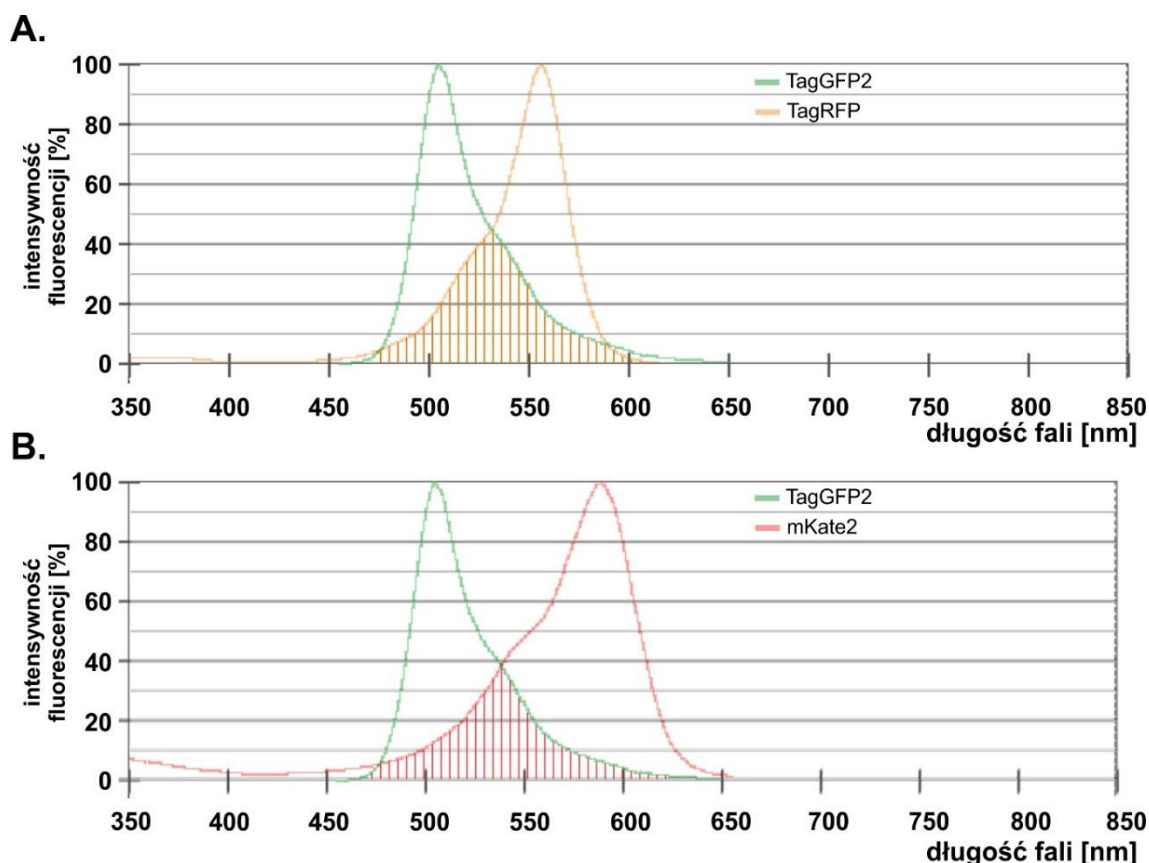
Ważnym parametrem, który opisuje FRET między danymi rodzajami fluoroforów, jest promień Förstera ( $R_0$ ). Jest to odległość między fluoroforami, dla której szybkość transferu energii i szybkość emisji fluorescencji donora są sobie równe. W praktyce zgodnie z równaniem (2) odpowiada to odległości, dla której FRET między donorem i akceptorem ma wydajność 0,5. Parametr ten można wyliczyć z równania:

$$(R_0)^6 = 8,785 \times 10^5 \frac{\kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J}{n^4} , \quad (3)$$

znając wydajność kwantową donora ( $\Phi_D$ ), współczynnik załamania światła w ośrodku, w którym zachodzi oddziaływanie ( $n$ ), współczynnik określający orientację przestrzenną donora względem akceptora ( $\kappa^2$ ), a także parametr  $J$ , zależny od wielkości części wspólnej widma emisji donora i widma wzbudzenia akceptora.

Jako donor w parze FRET wybrano zielone białko fluoryzujące TagGFP2. TagGFP2 jest nietoksycznym białkiem monomerycznym którego sekwencję kodującą uzyskano za pomocą mutagenyzy sekwencji kodującej białka podobnego do GFP wyizolowanej z *Aequorea macrodactyla*. Białko TagGFP2 charakteryzuje wysoka wydajności kwantowa (równa 0,6) i jasność fluorescencji, porównywalna z EGFP. Jego fluorofor dojrzewa szybko (w ciągu godziny od syntezy białka) w komórkach hodowanych w 37°C. Białko to charakteryzuje stabilność strukturalna w szerokim zakresie pH oraz wysoka fotostabilność. Ponieważ nie ma ono skłonności do agregacji, stanowi dobry znacznik fluorescencyjny dla innych białek, umożliwiając długoterminowe obserwacje zmian w ich poziomie ekspresji i lokalizacji. Ze względu na wymienione powyżej właściwości białko TagGFP2 jest również uważane za dobry donor w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych z wykorzystaniem FRET. W celu wybrania najlepszego białkowego akceptora FRET w parze z TagGFP2 przeanalizowano właściwości spektralne dwóch czerwonych białek fluoryzujących znajdujących się w ofercie handlowej firmy Evrogen (która sprzedaje również plazmidy niosące sekwencję kodującą białka TagGFP2): TagRFP oraz mKate2. Te dwa białka wybrano do analizy, ponieważ podobnie jak TagGFP2 są monomeryczne, nietoksyczne, ich fluorofory szybko dojrzewają, nie mają skłonności do agregacji i charakteryzują się wysoką jasnością oraz fotostabilnością.

Na rycinie 26 pokazano widma emisji fluorescencji TagGFP2 oraz odpowiednio widmo wzbudzenia TagRFP (rycina 26A) oraz mKate2 (rycina 26B). Wspólna część widm jest większa dla pary TagGFP2/TagRFP niż dla pary TagGFP2/mKate2. Ilościowo jest to opisywane przez parametr  $J$ . Korzystając z informacji zgromadzonych w bazie danych FPbase (Lambert, 2019) odczytano, że dla pary TagGFP2/TagRFP parametr  $J$  wynosi  $2,84 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ , a dla pary TagGFP2/mKate2 wynosi  $1,37 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ .



**Rycina 26.** Widmo emisji fluorescencji donora oraz widmo wzbudzenia akceptora dla dwóch par FRET: **A.** TagGFP2 (donor) i TagRFP (akceptor); **B.** TagGFP2 (donor) i mKate2 (akceptor). Widma fluorescencji wykreślono na podstawie danych udostępnionych przez producenta (<https://evrogen.com/spectra-viewer/viewer.shtml>).

Zakładając, że zjawisko FRET przebiega w roztworze wodnym (współczynnik załamania światła  $n = 1,33$ ), a współczynnik orientacji  $\kappa^2 = 0,6667$  (jest to przybliżenie nie odpowiadające rzeczywistej wartości dla białka fuzyjnego o ograniczonej liczbie stopni swobody, ale pozwalające na porównanie dwóch par donora/akceptora), na podstawie równania (3) można wyliczyć  $R_0$  dla obu par białek. Dla TagGFP2/TagRFP tak wyliczone  $R_0$  wynosi 5,633 nm. Dla pary TagGFP2/mKate2  $R_0$  wynosi 4,987 nm. Wyliczone wartości wskazują, że przy tej samej odległości między donorem i akceptorem zjawisko FRET jest bardziej wydajne dla pary TagGFP2/TagRFP niż dla pary TagGFP2/mKate2.

Zjawisko rezonansowego transferu energii można eksperymentalnie zaobserwować stosując kilka różnych technik obrazowania fluorescencyjnego. Metoda umożliwiająca uzyskanie najdokładniejszych wyników, zastosowana tutaj, polega na pomiarach czasu życia fluorescencji donora (wykorzystując FLIM). W przypadku, kiedy akceptor znajduje się wystarczająco blisko donora, aby możliwy był wydajny FRET, obserwowany czas życia fluorescencji donora się zmniejsza. Dzieje się tak, ponieważ prawdopodobieństwo transferu energii na drodze FRET jest tym większe, im dłużej donor znajduje się w stanie wzbudzonym. Przekazywana jest energia donora, która w przeciwnym wypadku byłaby wypromieniowywana

po dłuższym czasie od wzbudzenia. Wiedząc, jak zmienia się czas życia fluorescencji donora, można wyliczyć wydajność FRET:

$$E = 1 - \frac{\tau_{FRET}}{\tau_D} \quad (4)$$

$\tau_{FRET}$  to średni czas życia fluorescencji donora w obecności akceptora, a  $\tau_D$  to średni czas życia fluorescencji donora w nieobecności akceptora.

Czas życia fluorescencji donora w obecności akceptora wyliczano zgodnie z równaniem:

$$\tau_{FRET} = \frac{A_1\tau_1 + A_2\tau_2}{A_1 + A_2} \quad (5)$$

na podstawie parametrów wyznaczonych z pomiarów FLIM przez dopasowanie danych eksperymentalnych do krzywej o równaniu (1), w którym założono dwie składowe.

### 3.2.15. Statystyczna analiza danych

Regresję liniową wykonywano metodą najmniejszych kwadratów za pomocą arkusza kalkulacyjnego Excel 365. Nieliniowe aproksymacje punktowe wykonywano metodą najmniejszych kwadratów rozpoczynając od arbitralnie założonych, bliskich oczekiwanym początkowych wartości poszukiwanych argumentów funkcji. Aproksymacje nieliniowe przeprowadzano przy pomocy nakładki Solver w arkuszu kalkulacyjnym Excel 365.

Do porównań istotności statystycznej różnic między średnimi wartościami dla dwóch zmiennych niezależnych stosowano dwustronny test t-Studenta (z istotnością  $p < 0,05$ ). W przypadku porównań wielokrotnych stosowano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test *post hoc* Tukeya ( $p < 0,001$ ).

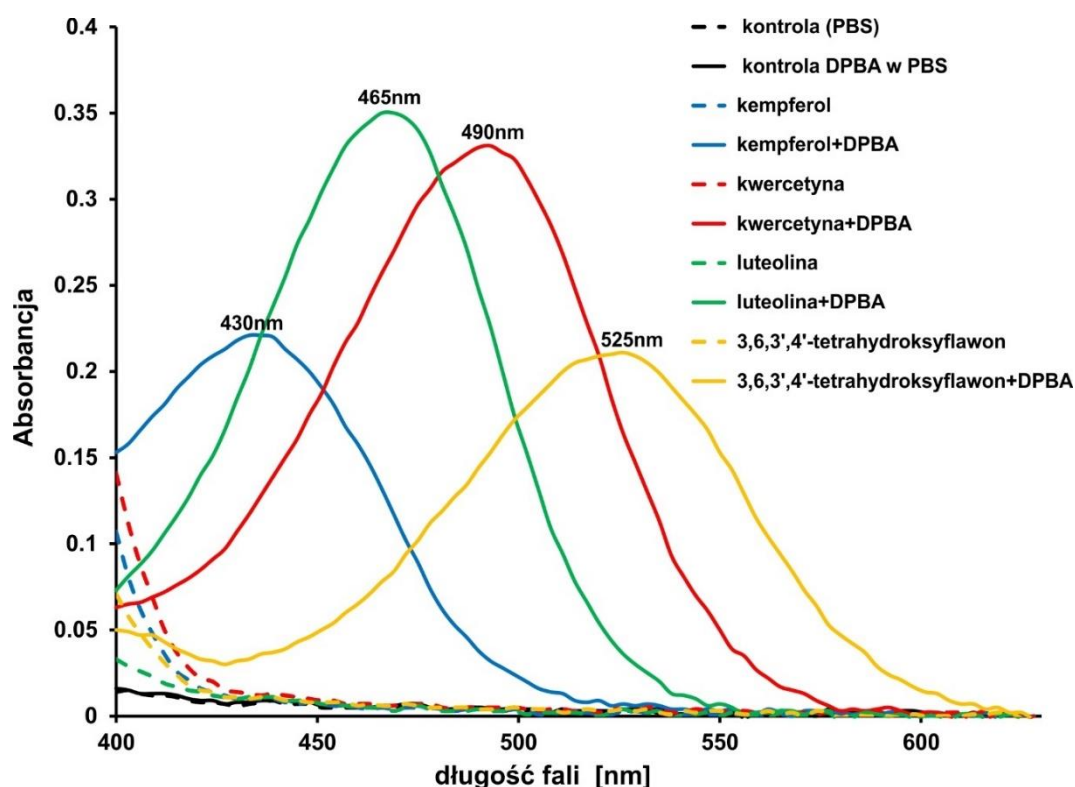
## 4. Wyniki

### 4.1. Badanie specyficzności substratowej ABCG2

#### 4.1.1. Fluorescencyjna derywatyżacja flawonoidów za pomocą DPBA

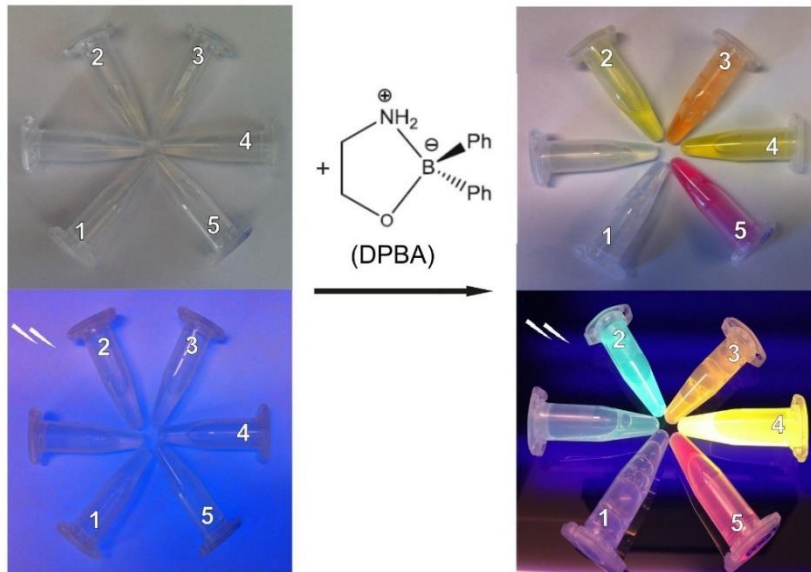
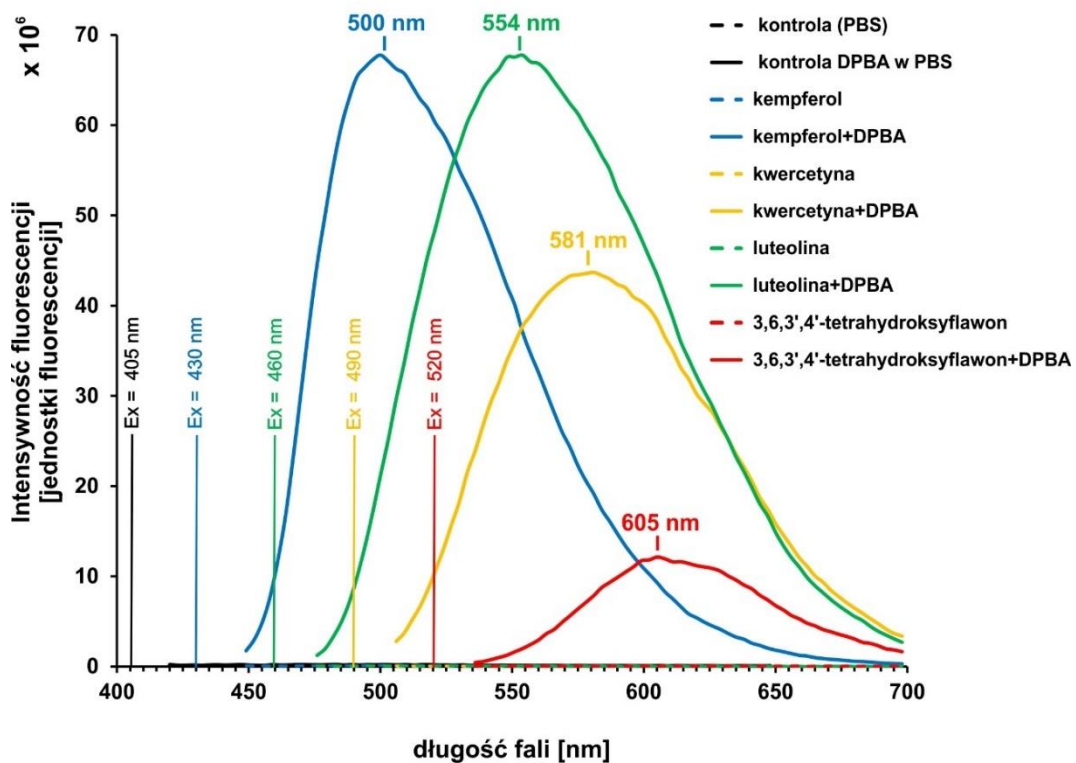
##### 4.1.1.1. Badanie zjawiska fluorescencyjnej derywatyżacji flawonoidów za pomocą DPBA

Wykonano serię doświadczeń kontrolnych, w których zbadano właściwości fluorescencyjne pochodnych flawonoid+DPBA. Wybrano w tym celu kwercetynę, jeden z najpowszechniej występujących flawonoidów właściwych spełniający kryteria reakcji z DPBA, a także trzy inne flawonoidy właściwe o bardzo zbliżonej strukturze chemicznej, różniące się wyłącznie konfiguracją grup hydroksylowych: kempferol, luteolina i 3,6,3',4'-tetrahydroksyflawon (patrz rycina 15). Przygotowano roztwory flawonoidów w PBS, a następnie dodano do nich nadmiar DPBA. Kontrolą negatywną był roztwór PBS. Wykonano pomiar widm absorpcyjnych roztworów przed i po dodaniu DPBA. Wyniki zestawiono na rycinie 27.



**Rycina 27.** Widma absorpcyjne 20 µM roztworów wybranych flawonoidów w PBS przed i po dodaniu DPBA (do końcowego stężenia 2 mM). Nad wykresami podano wartości długości fali maksimum absorbancji dla każdego z fluorescencyjnych produktów.



**A.****B.**

**Rycina 27. A.** Zdjęcie probówek zawierających 20  $\mu\text{M}$  roztwory flawonoidów w PBS przed i po reakcji z DPBA obserwowanych w świetle białym (górne zdjęcia) oraz po wzbudzeniu transiluminatorem (dolne zdjęcia): 1. PBS, 2. kempferol, 3. kwercetyna, 4. luteolina, 5. 3,6,3',4'-tetrahydroksyflawon. **B.** Widma emisji fluorescencji dla 20  $\mu\text{M}$  roztworów wybranych flawonoidów w PBS przed i po dodaniu DPBA (do końcowego stężenia 2 mM). Na wykresie odpowiednimi kolorami przedstawiono długości fali wzbudzenia oraz maksimum emisji fluorescencji pochodnych flawonoid+DPBA.

Żaden z badanych flawonoidów nie absorbuje istotnie światła w zakresie widzialnym 420-650 nm przed dodaniem DPBA. Niewielką absorpcję światła przez próbki zawierające flawonoidy można zaobserwować w nieobecności DPBA jedynie przy najkrótszych

stosowanych długościach fali (400-420 nm). Po dodaniu odczynnika derywatyzującego zaobserwowano natychmiastową zmianę barwy roztworów (rycina 27A). Zaskakująco, pomimo dużego podobieństwa strukturalnego wszystkich czterech wybranych do reakcji flawonoidów (patrz rycina 15) produkty flawonoid+DPBA charakteryzują się widmami absorpcyjnymi o różnym przebiegu. Cztery pochodne flawonoid+DPBA mają różne wartości współczynnika absorpcji, a maksimum absorpcji dla każdej z nich znajduje się przy innej długości fali.

Następnie wykonano widma emisji fluorescencji opisanych powyżej roztworów flawonoidów. Dla każdego ze związków zastosowano inną długość fali wzbudzenia, odpowiadającą długości fali maksimum absorpcji. Dodatkowo zmierzono fluorescencję roztworów flawonoidów przed dodaniem DPBA i fluorescencję roztworów kontrolnych. W przypadku tych roztworów zastosowano wzbudzenie długością fali 400 nm, ponieważ przy tej długości fali zaobserwowano najwyższe wartości absorpcji w badanym zakresie światła widzialnego. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie 27B.

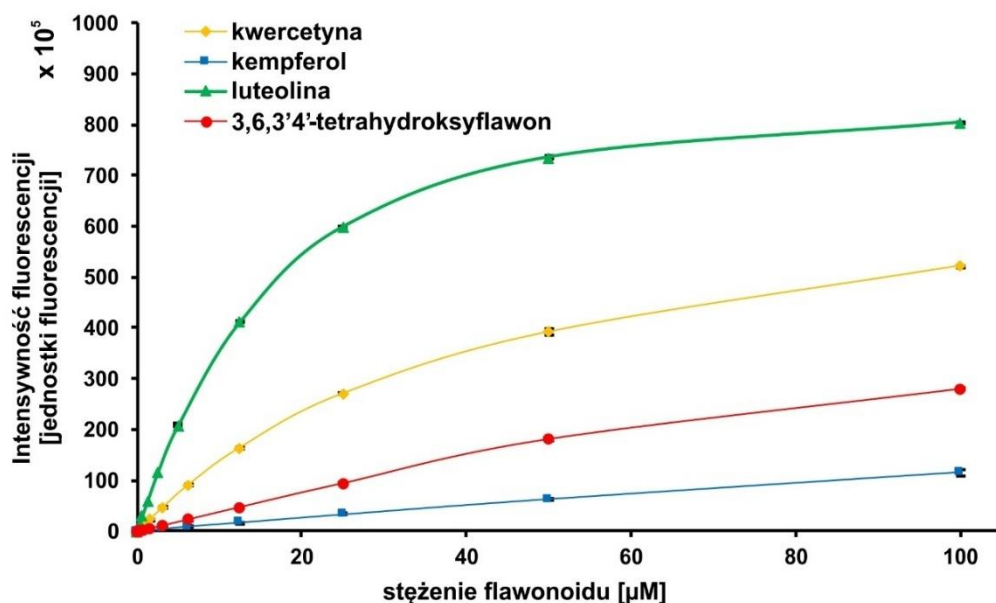
Nie zaobserwowano fluorescencji wyjściowych roztworów flawonoidów, pomimo pochłaniania przez nie światła w zakresie 400-430 nm. Po dodaniu DPBA roztwory badanych związków wykazują silną fluorescencję, każdy o różnej charakterystycznej barwie (odpowiednio: niebiesko-zieloną, żółtą, pomarańczową i czerwoną; rycina 27A) i maksimum emisji od ok. 500 nm aż do ok. 610 nm. Przesunięcia Stokesa otrzymanych fluorescencyjnych pochodnych flawonoidów wynoszą między 70 nm a 90 nm. Każdy z produktów ma inne maksimum wzbudzenia, ale ze względu na swoje szerokie pasma absorpcyjne oraz emisyjne wykazują one wydajną fluorescencję w zakresie 500-560 nm przy wzbudzeniu światłem niebieskozielonym o długości fali 485 nm (wartości odpowiadające intensywności fluorescencji przy wzbudzeniu tym zakresem długości fali przedstawiono w tabeli 6 w podrozdziale 4.1.7.), co jest niezwykle istotne dla praktycznego wykorzystania tej metody derywatacji w wysokoprzepustowych technikach biologicznych.

W kolejnym doświadczeniu dla czterech wybranych flawonoidów zbadano, czy fluorescencyjny produkt wytworzony w reakcji z DPBA umożliwia ilościowy pomiar stężenia tych flawonoidów w testach *in vitro*. W tym celu zbadano liniowość zależności intensywności fluorescencji wybranych flawonoidów po reakcji z DPBA od wyjściowego stężenia flawonoidu w próbce. Wykonano serię rozcieńczeń związków w PBS w zakresie między 100  $\mu$ M a 100 nM. Do tak przygotowanych próbek dodano nadmiar DPBA. Aby zapewnić wysoką czułość pomiaru, intensywność fluorescencji każdego produktu flawonoid+DPBA zmierzono z zastosowaniem innego zestawu filtrów emisyjnych (wybranych na podstawie widm pokazanych na rycinie 27B): kempferol  $E_m = 535 \pm 25$  nm; kwercetyna i luteolina  $E_m = 555 \pm 38$  nm; 3,6,3'4'-tetrahydroksyflawon  $E_m = 610 \pm 20$  nm, przy zachowaniu stałego filtra wzbudzenia:  $E_x = 485 \pm 14$  nm.

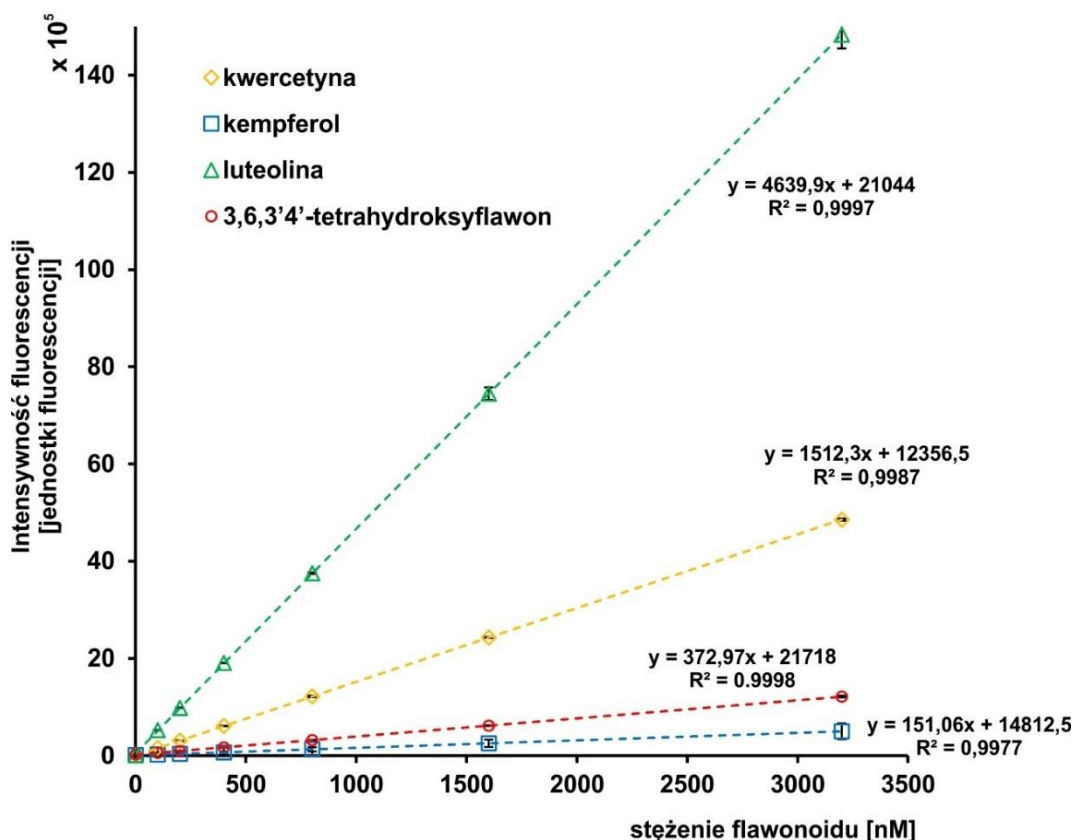
Na rycinie 28 przedstawiono krzywe zależności intensywności fluorescencji utworzonych produktów flawonoid+DPBA od stężenia flawonoidów w próbce. Dla wszystkich czterech badanych związków fluorescencja powstałego produktu w stężeniach nie przekraczających 10  $\mu\text{M}$  (dla kempferolu nawet do stężenia 100  $\mu\text{M}$ ) jest liniowo zależna od stężenia flawonoidu w próbce (współczynnik determinacji  $R^2 > 0,99$ ). Przy najwyższych użytych stężeniach flawonoidów (za wyjątkiem kempferolu) intensywność fluorescencji produktu jest niższa niż wynikałoby to z zależności liniowej, co należy tłumaczyć nasilającym się efektem filtra wewnętrznego.

Następnie dla czterech wybranych flawonoidów sporządzono krzywe standardowe umożliwiające przeliczenie intensywności fluorescencji zmierzonej próbki na stężenie badanego związku w próbce (rycina 29). Dla każdego produktu flawonoid+DPBA na wykresie podano równanie zależności liniowej oraz współczynnik determinacji  $R^2$ . Współczynnik ten dla wyznaczonych krzywych standardowych jest w każdym przypadku wyższy niż kryterium akceptacji stosowane dla metody analitycznej ( $R^2 > 0.995$ ).

Na podstawie krzywych standardowych oraz odchyłeń standardowych zmierzonych wartości fluorescencji koniugatów oszacowano granicę wykrywalności każdego z badanych flawonoidów w PBS. Jest ona równa stężeniu flawonoidu wyliczonemu z krzywej standardowej, jakie musiałoby znajdować się w próbce, aby uzyskać wartości fluorescencji odpowiadające trzykrotności odchylenia standardowego wartości fluorescencji zmierzonych dla ślepej próby (roztwór PBS z DPBA, nie zawierający flawonoidu). Dla kolejnych flawonoidów tak oszacowana granica wykrywalności wynosi odpowiednio: ok. 100 nM dla kempferolu, ok. 10 nM dla kwercetyny, ok. 6 nM dla luteoliny oraz ok. 60 nM dla 3,6,3',4'-tetrahydroksyflawonu. Luteolina tworzy w reakcji z DPBA produkt, który ma największą jasność. Dzięki temu spośród czterech badanych związków właśnie luteolina może być wykrywana w najmniejszych ilościach z zastosowaniem pomiarów fluorymetrycznych po derywatywacji za pomocą DPBA.



**Rycina 28.** Zależność średniej intensywności fluorescencji produktów flawonoid+DPBA od stężenia flawonoidu w szerokim zakresie stężeń. Punkty na wykresie reprezentują wartość średnią, słupki błędów przedstawiają średni błąd średniej, n = 3.



**Rycina 29.** Krzywe standardowe fluorescencji flawonoid+DPBA. Liniją przerywaną narysowano krzywe regresji liniowej wyznaczone na podstawie danych eksperymentalnych. Obok każdej krzywej podano równanie oraz współczynnik determinacji R<sup>2</sup>. Punkty na wykresie reprezentują wartość średnią, słupki błędów przedstawiają średni błąd średniej, n = 3.

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane dla kwercetyny i podobnych do niej flawonoidów postawiono hipotezę, że zjawisko tworzenia się fluorescencyjnych soli z DPBA jest dla flawonoidów powszechne. Kolejnym etapem tej części pracy była weryfikacja takiej hipotezy na dużej grupie flawonoidów oraz wybór związków, których obecność i stężenie można śledzić fluorymetrycznie po derywatacji za pomocą DPBA.

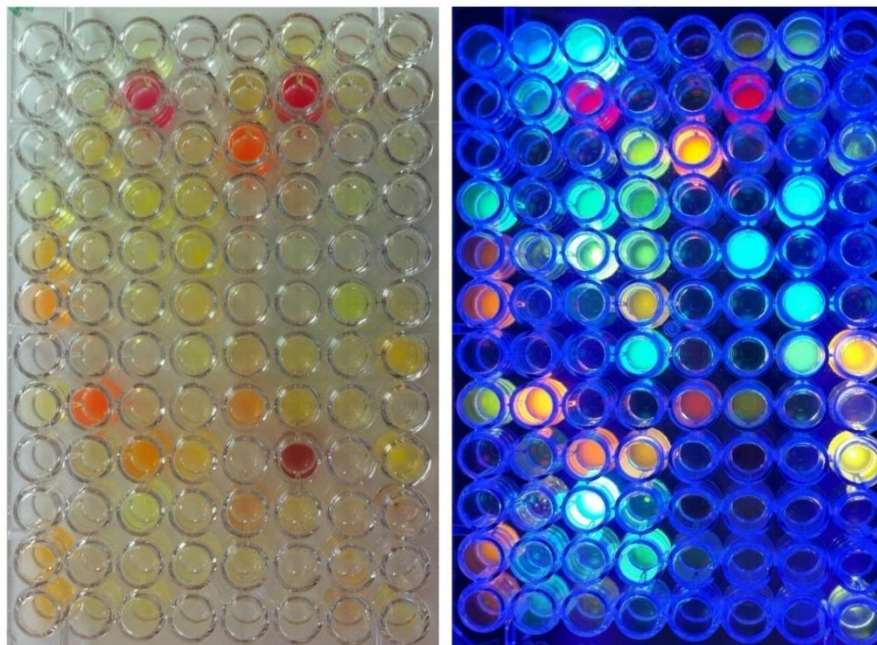
#### **4.1.1.2. Wybór flawonoidów ulegających derywatacji fluorescencyjnej za pomocą DPBA**

Ze względu na znaczny potencjał aplikacyjny flawonoidów w farmakologii i medycynie, komercyjnie dostępnych jest kilka bibliotek tych związków. Spośród nich wybrano dwie: bibliotekę składającą się z naturalnych oraz półsyntetycznych pochodnych flawonoidowych firmy TimTec i bibliotekę flawonoidów naturalnych firmy Chemfaces. Obie biblioteki zostały najpierw przeanalizowane *in silico* w celu wyselekcjonowania wszystkich związków potencjalnie ulegających derywatacji za pomocą DPBA (podrozdział 3.2.2.). Wybrane flawonoidy zakupiono, a następnie poddano reakcji z DPBA. Dla wszystkich związków sporządzono w płytkach 96-dołkowych 100  $\mu$ M roztwory w PBS, do których dodano nadmiar DPBA (rycina 30A). Tak powstałe mieszaniny analizowano badając ich widma emisji fluorescencji przy wzbudzeniu dwiema długościami fali: 405 nm oraz 485 nm. Te długości fali wzbudzenia wybrano biorąc pod uwagę widma absorpcyjne produktów flawonoid+DPBA uzyskane dla czterech flawonoidów (rycina 27B). Dodatkowo wartości te wybrano z myślą o testach wysokoprzepustowych (czytnik mikropłytek, zautomatyzowany mikroskop fluorescencyjny), gdzie zastosowanie filtrów emisyjnych umożliwiających wzbudzenie światłem o długościach fali 405 nm i 485 nm jest powszechne. Z widm emisji fluorescencji związków flawonoid+DPBA odczytano wartości maksymalne intensywności fluorescencji. Dla każdego produktu flawonoid+DPBA (opisanych kolejnymi numerami identyfikacyjnymi zestawionymi w aneksie w tabelach 1 i 2) wyższą z tych dwóch wartości maksymalnej intensywności fluorescencji (dla wzbudzenia 405 nm lub 485 nm) przedstawiono na rycinie 30B. Znaczna część testowanych flawonoidów ulega reakcji derywatacji za pomocą DPBA z wytworzeniem barwnego oraz fluorescencyjnego produktu (rycina 30A).

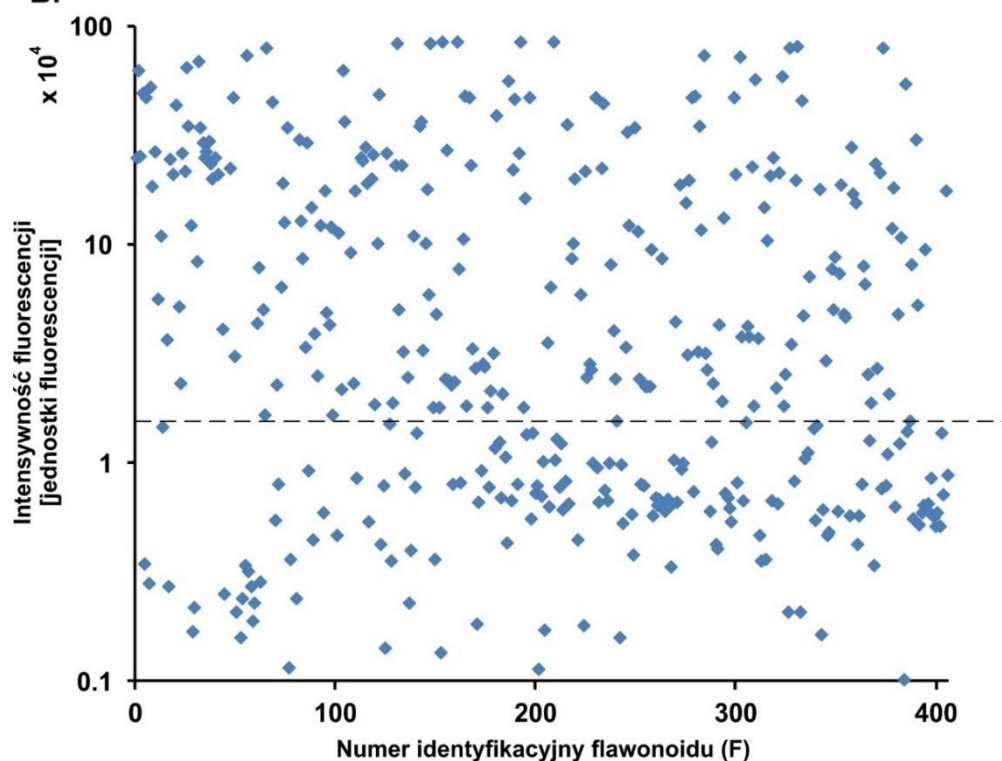
Średnia wartość intensywności fluorescencji produktów wynosi  $1,2 \times 10^5$  jednostek fluorescencji, przy maksymalnej zmierzonej wartości równej ok.  $8,5 \times 10^5$  jednostek fluorescencji. 116 spośród 406 wybranych flawonoidów wykazuje wyższą niż średnia intensywność fluorescencji powstałego produktu reakcji z DPBA. Mediana wartości przedstawionych na rycinie 30B wartości fluorescencji wynosi ok.  $2,3 \times 10^4$  jednostek, co stanowi więcej niż 2% maksymalnej zmierzonej wartości (będącej blisko maksymalnego limitu detekcji czytnika –  $9,0 \times 10^5$ ). 86 flawonoidów reagujących z DPBA z wytworzeniem produktu

o wysokiej intensywności fluorescencji (więcej niż  $2 \times 10^5$  jednostek) wybrano do dalszych badań z użyciem technik fluorymetrycznych (patrz tabela 4 w podrozdziale 4.1.3).

**A.**



**B.**



**Rycina 30. A.** Zdjęcie przykładowych 96 roztworów flawonoidów po dodaniu DPBA wykonane w świetle białym (z lewej strony) oraz po wzbudzeniu światłem w zakresie 400-500 nm (z prawej strony). **B.** Intensywność fluorescencji w maksimum widma emisji fluorescencji dla 100  $\mu\text{M}$  roztworów flawonoidów po reakcji z DPBA. Widma emisji flawonoid+DPBA wykonano przy wzbudzeniu 405 nm oraz 485 nm. Na wykresie przedstawiono wyższą z wartości maksymalnej intensywności fluorescencji. Linia przerywaną zaznaczono medianę wartości.

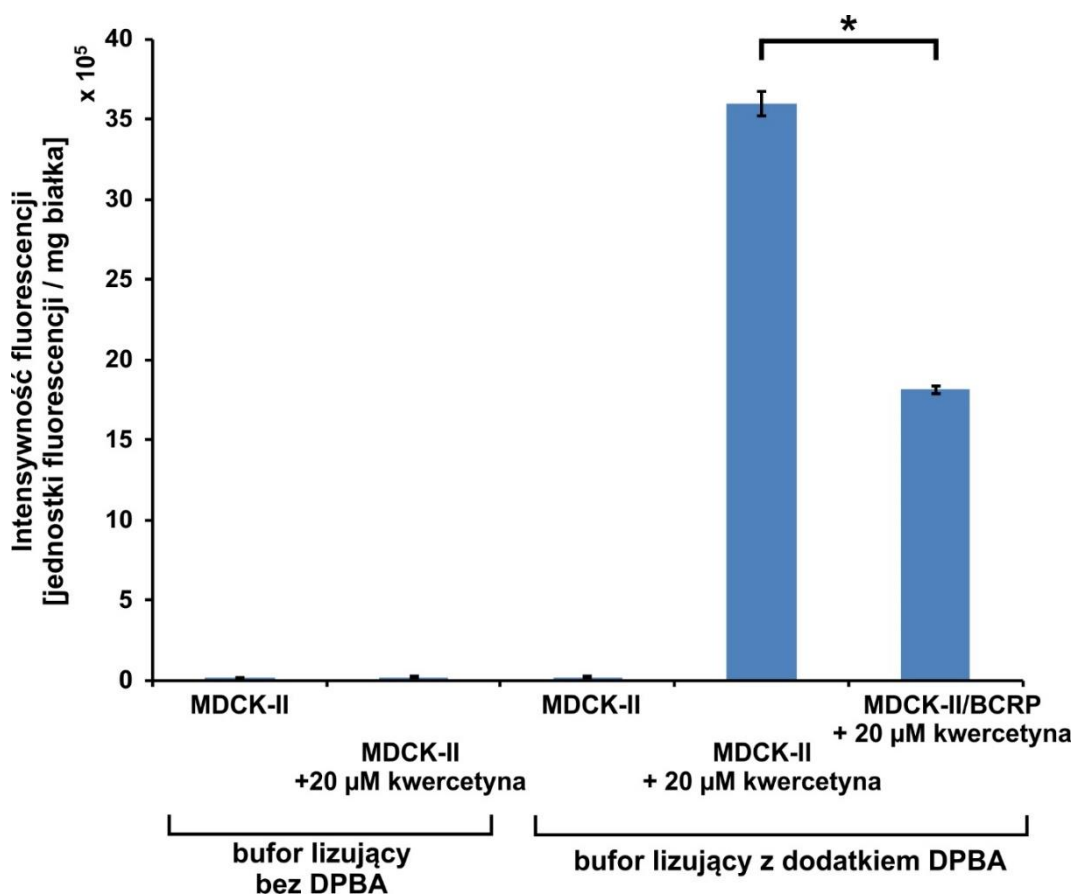
#### **4.1.2. Badanie aktywności transportowej ludzkiego białka ABCG2 z wykorzystaniem flawonoidów jako substratów**

##### **4.1.2.1. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez oznaczanie stężenia flawonoidu w lizatach komórkowych otrzymywanych z zawiesiny komórek**

Jak wykazano powyżej, wiele flawonoidów w reakcji z DPBA tworzy fluorescencyjny produkt, który może być specyficznie, ilościowo i z dużą dokładnością oznaczony w prostych roztworach wodnych (buforowany roztwór soli fizjologicznej). W związku z tym zbadano, czy flawonoidy znajdujące się wewnątrz komórki mogą być również oznaczone fluorymetrycznie w złożonej mieszaninie, jaką jest lizat komórkowy, zawierający wiele substancji potencjalnie zaburzających pomiar. Do zbadania tego zagadnienia wybrano dwie modelowe linie komórkowe powszechnie stosowane w badaniach dotyczących aktywności ludzkiego białka ABCG2: linię MDCK-II (kontrola) oraz linię MDCK-II/BCRP, w której ekspresji ulega ludzkie białko ABCG2. Jako znany modelowy substrat białka ABCG2 wybrano kwercetynę, która po reakcji z DPBA tworzy jasny fluorescencyjny produkt.

Doświadczenia prowadzono zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.10.2. Zawiesinę komórek linii MDCK-II i MDCK-II/BCRP inkubowano przez godzinę w obecności lub nieobecności kwercetyny (w stężeniu 20  $\mu\text{M}$ ). Fluorescencję otrzymanych lizatów zmierzono stosując zestaw filtrów wzbudzenia i emisji zoptymalizowany uprzednio dla produktu kwercetyna+DPBA (rycina 27B,  $\text{Ex} = 485 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\text{Em} = 565 \pm 30 \text{ nm}$ ). Otrzymane wyniki zestawiono na rycinie 31.

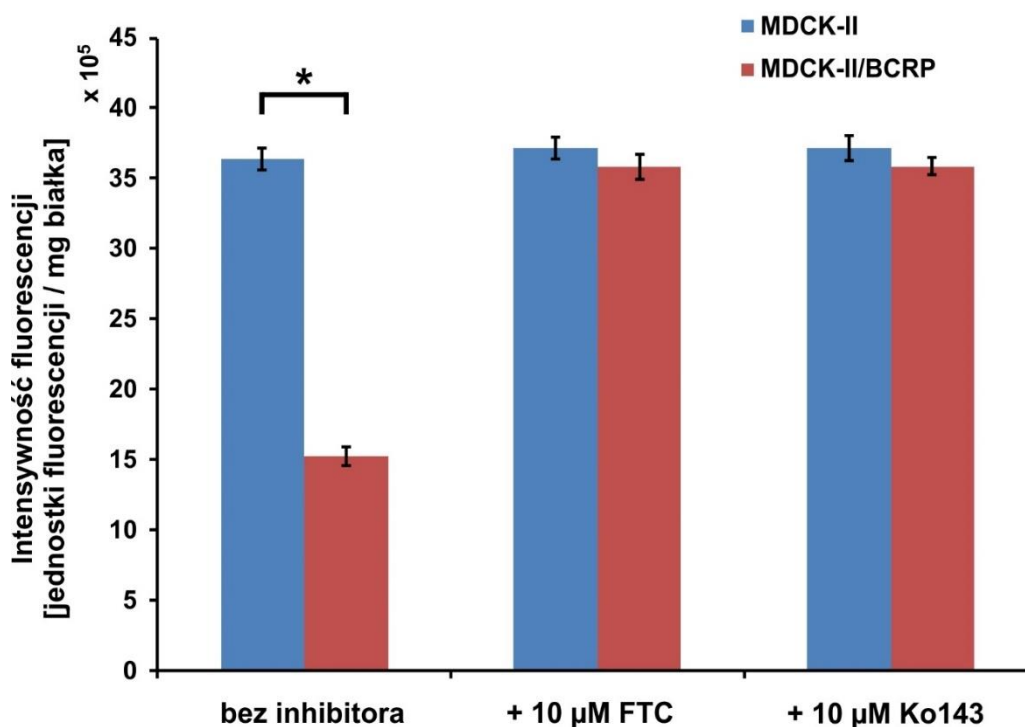
Lizaty komórkowe, do których nie dodano DPBA, wykazują fluorescencję na poziomie ślepej próby (bufor lizujący), nawet jeśli były inkubowane z kwercetyną. Podobnie lizat z komórek, które nie były inkubowane z flawonoidem, nie wykazuje fluorescencji w badanym zakresie nawet w obecności DPBA. Lizaty z komórek, które inkubowano z kwercetyną, wykazują silną fluorescencję po dodaniu DPBA, co potwierdza, że ten flawonoid również w lizatach komórkowych ulega wydajnej i specyficznej reakcji z wytworzeniem fluorescencyjnego produktu. Lizaty z komórek linii MDCK-II/BCRP mają o około 50% mniejszą intensywność fluorescencji niż lizaty z komórek MDCK-II. Wynik ten wskazuje, że białko ABCG2 obecne w linii MDCK-II/BCRP transportuje kwercetynę, obniżając wewnątrzkomórkowe stężenie flawonoidu w komórkach tej linii.



**Rycina 31.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych z komórek MDCK-II i MDCK-II/BCRP. Komórki inkubowano przez 1 h z dodatkiem lub bez dodatku 20  $\mu$ M kwercetyny. Następnie komórki przygotowano lizaty komórkowe z dodatkiem lub bez dodatku DPBA. Intensywności fluorescencji znormalizowano w przeliczeniu na 1 mg białka w otrzymanych lizatach. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ .

Aby sprawdzić, czy różnice w ilości flawonoidu zakumulowanego w komórkach tych dwóch linii wynikają jedynie z obecności aktywnego białka ABCG2, w kolejnym doświadczeniu zastosowano dwa inhibitory tego transportera: inhibitor naturalnego pochodzenia, fumitremorginę C (FTC), a także jego półsyntetyczną pochodną o zmniejszonej cytotoksyczności, Ko143. Podobnie jak w poprzednim eksperymencie zawiesinę komórek danego typu inkubowano przez godzinę z kwercetyną. Do części probówek zawierających zawiesinę komórek na ok. 15 min przed dodaniem flawonoidu dodano inhibitor (10  $\mu$ M FTC lub 10  $\mu$ M Ko143). Zmierzono intensywności fluorescencji lizatów komórkowych i znormalizowano je względem stężenia białka (rycina 32). Ponieważ zmierzone wartości fluorescencji znajdują się w liniowym zakresie krzywej standardowej dla pochodnej kwercetyna+DPBA (rycina 29), przeliczono je na stężenie kwercetyny. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 2.





**Rycina 32.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych z komórek MDCK-II i MDCK-II/BCRP. Komórki hodowano przez 1 h z dodatkiem 20 μM kwercetyny w obecności lub nieobecności inhibitorów ABCG2. Intensywności fluorescencji znormalizowano w przeliczeniu na 1 mg białka w otrzymanych lizatach. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędu to średni błąd średniej, n = 4, \* p < 0,05.

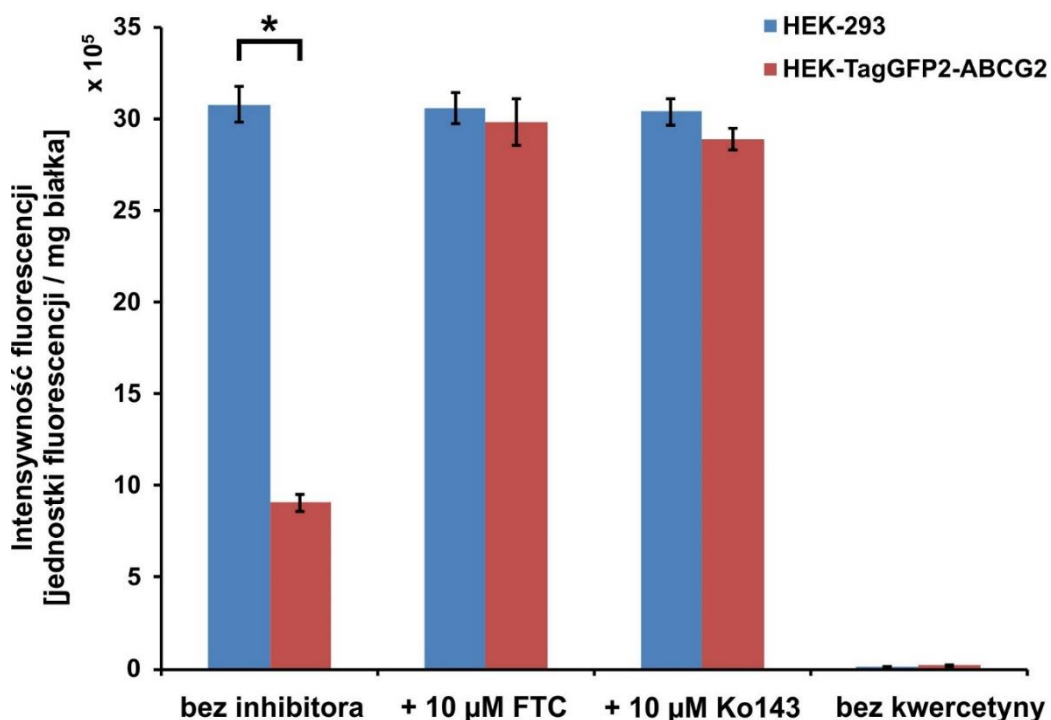
**Tabela 2.** Ilość kwercetyny zakumulowana w komórkach danej linii, znormalizowana względem ilości białka. Intensywność fluorescencji produktu kwercetyna+DPBA przeliczono na stężenie kwercetyny w próbce stosując krzywą standardową przedstawioną na rycinie 29. Wartości przedstawiają średnią ± średni błąd średniej, n = 4, \* p < 0,05.

Znormalizowana ilość kwercetyny w lizatach [μmol/μg białka]			
Linia komórkowa:	bez inhibitora	+ 10 μM FTC	+ 10 μM Ko143
MDCK-II	<b>2,399 ± 0,043</b>	<b>2,464 ± 0,043</b>	<b>2,449 ± 0,051</b>
MDCK-II/BCRP	<b>1,004 ± 0,034 *</b>	<b>2,363 ± 0,051</b>	<b>2,364 ± 0,034</b>

Ilość kwercetyny zakumulowanej w komórkach MDCK-II/BCRP wykazujących ekspresję ludzkiego białka ABCG2, jest o 58% mniejsza niż w komórkach linii MDCK-II. Po zahamowaniu aktywności ABCG2 za pomocą specyficznych inhibitorów kwercetyna jest akumulowana w komórkach MDCK-II/BCRP w takiej samej ilości jak w komórkach MDCK-II. Nie ma istotnych różnic w wewnątrzkomórkowej ilości kwercetyny zakumulowanej w komórkach MDCK-II po traktowaniu inhibitorami. Wynik ten dowodzi, że jedynym powodem, dla którego kwercetyna akumuluje się w komórkach MDCK-II/BCRP w mniejszej ilości, jest obecność aktywnego białka ABCG2.

Podobny eksperyment wykonano na dwóch innych liniach komórkowych różniących się ekspresją ABCG2: HEK 293 i HEK-TagGFP2-ABCG2. Zawieszoną komórek inkubowano przez godzinę w obecności kwercetyny. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu do części probówek z komórkami dodano odpowiedniego inhibitora. Po usunięciu medium z nadmiarem flawonoidu komórki lizowano buforem lizującym zawierającym DPBA. Ponieważ komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 zawierają zielone białko fluoryzujące emitujące fluorescencję w zakresie długości fali mierzonych dla związku kwercetyna+DPBA, przygotowano również lizaty z komórek inkubowanych w nieobecności kwercetyny. Doświadczenie wykonano w pięciu powtórzeniach, a otrzymane wyniki znormalizowano względem ilości białka i zestawiono na rycinie 33 oraz w tabeli 3.

Podobnie jak w przypadku komórek MDCK-II ilość kwercetyny zakumulowana w komórkach linii HEK-TagGFP2-ABCG2 jest znacznie mniejsza niż ilość zakumulowana w kontroli (komórki HEK-293). W komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2 znajdowało się mniej niż 30% ilości, która znajdowała się w komórkach nie zawierających tego transportera. Komórki inkubowane w obecności inhibitorów zakumulowały jednakową ilość kwercetyny, co dowodzi, że to obecność aktywnego białka ABCG2 jest przyczyną tej różnicy. W lizatach wykonanych z komórek nietraktowanych kwercetyną fluorescencja nie była różna od fluorescencji tła (bufor lizujący z DPBA) nawet w przypadku komórek HEK-TagGFP2-ABCG2. Wskazuje to, że fluorescencja pochodząca od białka TagGFP2-ABCG2 jest zaniedbywalna w lizacie komórkowym i nie zaburza fluorescencyjnego pomiaru ilości kwercetyny znajdującej się w tych komórkach.



**Rycina 33.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych z komórek HEK 293 i HEK-TagGFP2-ABCG2. Komórki inkubowano przez 1 h z dodatkiem 20 μM kwercetyny w obecności lub nieobecności inhibitorów ABCG2. Intensywności fluorescencji znormalizowano w przeliczeniu na 1 mg białka w otrzymanych lizatach. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 5, \* p < 0,05.

**Tabela 3.** Ilość kwercetyny zakumulowana w komórkach danej linii, znormalizowana względem ilości białka. Intensywność fluorescencji produktu kwercetyna+DPBA przeliczono na stężenie kwercetyny w próbce stosując krzywą standardową przedstawioną na rycinie 29. Wartości przedstawiają średnią ± średni błąd średniej, n = 5, \* p < 0,05.

Znormalizowana ilość kwercetyny w lizatach [μmol/μg białka]			
Linia komórkowa:	bez inhibitora	+ 10 μM FTC	+ 10 μM Ko143
HEK 293	<b>2,028 ± 0,057</b>	<b>2,012 ± 0,038</b>	<b>2,001 ± 0,048</b>
HEK-TagGFP2-ABCG2	<b>0,591 ± 0,022 *</b>	<b>1,965 ± 0,030</b>	<b>1.902 ± 0,074</b>

#### **4.1.2.2. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez oznaczanie stężenia flawonoidu w lizatach komórkowych przygotowywanych z monowarstwy**

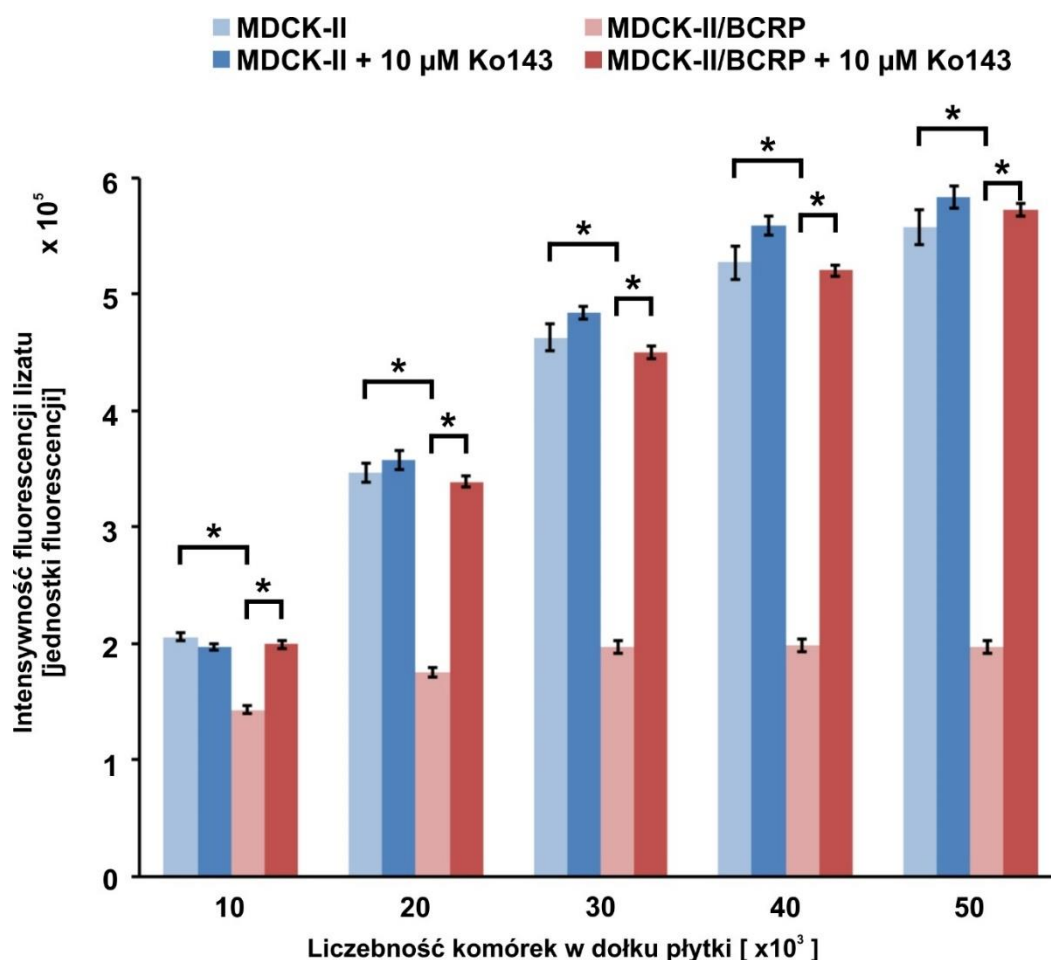
Powyższe doświadczenia wykazały, że aktywność białka ABCG2 można mierzyć fluorymetrycznie z wykorzystaniem kwercetyny jako substratu ilościowo przeprowadzanego we fluorescencyjną pochodną. Dla uproszczenia procedur eksperymentalnych oraz w celu zwiększenia przepustowości metody wykonano serię doświadczeń weryfikujących możliwość pomiaru aktywności białka w komórkach hodowanych i traktowanych flawonoidem bezpośrednio na płytce 96-dołkowej.

W pierwszym doświadczeniu zbadano, czy ilość kwercetyny znajdującej się w mniejszej liczbie komórek znajdującej się w dołku płytki jest wystarczająca, aby można było fluorymetrycznie oznaczać jej stężenie po derywatywacji za pomocą DPBA. W tym celu zbadano, w jaki sposób intensywność fluorescencji przygotowanych lizatów komórkowych zależy od liczebności komórek danego typu (MDCK-II lub MDCK-II/BCRP) inkubowanych z kwercetyną w dołku płytki 96-dołkowej w obecności lub nieobecności Ko143 oraz w jaki sposób różna liczebność komórek wpływa na pomiar aktywności transportowej białka ABCG2. Otrzymane wyniki zebrano na rycinie 34.

Dla wszystkich testowanych liczebności komórek intensywność fluorescencji koniugatu kwercetyna-DPBA w lizatach jest znacznie wyższa niż fluorescencja tła (lizat z komórek MDCK-II nie traktowanych flawonoidem), która wynosi ok.  $0,16 \times 10^5$  jednostek fluorescencji. Średnia intensywność fluorescencji produktu kwercetyna+DPBA oznaczanego w lizatach rośnie liniowo wraz ze wzrostem liczby komórek w punkcie pomiarowym. Dowodzi to, że w jednej komórce znajduje się średnio taka sama ilość flawonoidu niezależnie od gęstości hodowli. Podobnie jak w przypadku lizatów przygotowywanych z dużej liczby komórek inkubowanych z kwercetyną w zawieszynie, w lizatach przygotowywanych na płytkach 96-dołkowych średnie wartości intensywności fluorescencji lizatów z komórek MDCK-II są wyższe niż te dla komórek MDCK-II/BCRP, niezależnie od liczebności komórek w dołku. Po zahamowaniu aktywności ABCG2 w komórkach MDCK-II/BCRP za pomocą Ko143, kwercetyna akumuluje się w nich w takiej samej ilości jak w komórkach MDCK-II. Nie ma również statystycznie istotnych różnic w wewnątrzkomórkowej ilości kwercetyny, która znajduje się w komórkach MDCK-II po traktowaniu flawonoidem w obecności i nieobecności inhibitora.

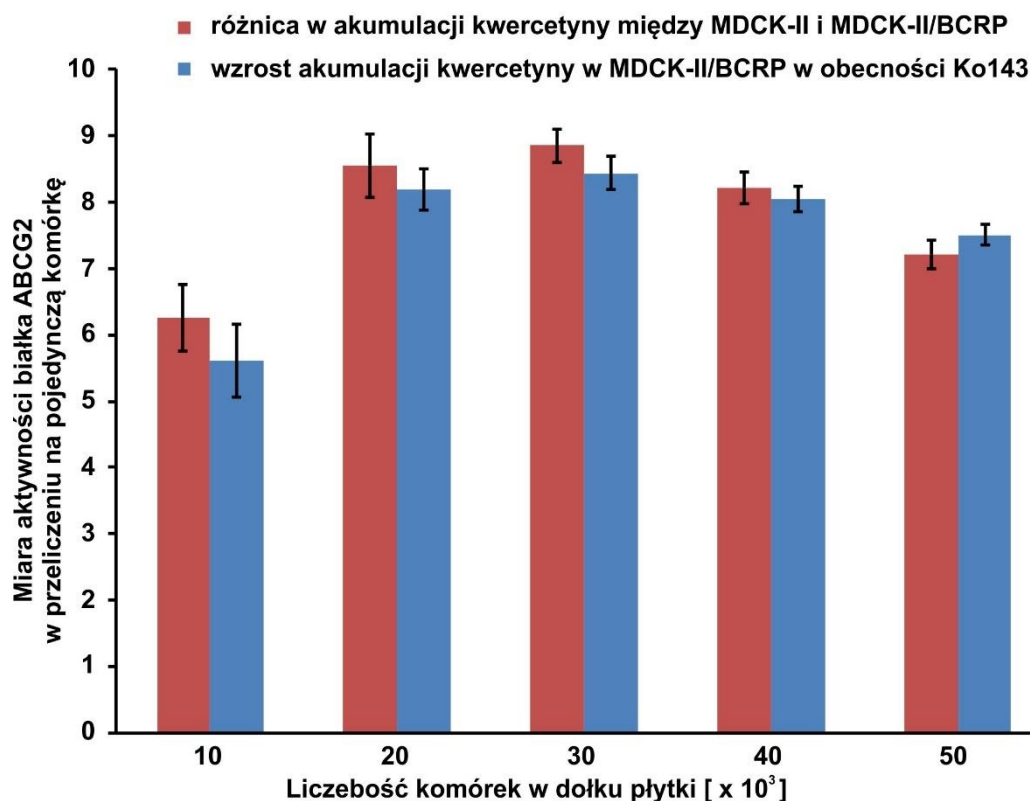
Za miarę aktywności białka ABCG2 można uznać różnicę między wartościami intensywności fluorescencji lizatów (co odpowiada różnicy w ilościach flawonoidu zakumulowanego w komórkach) przygotowanych z komórek bez aktywnego białka ABCG2 (tu: linia MDCK-II lub linia MDCK-II/BCRP z aktywnością transportera zablokowaną inhibitorem Ko143) i z komórek

w których białko ABCG2 wykazuje pełną aktywność (tu: linia MDCK-II/BCRP nie traktowana inhibitorem). Na podstawie wyników przedstawionych na rycinie 34 wyliczono w ten sposób miarę aktywności białka ABCG2 względem kwercetyny i otrzymane wartości przedstawiono dla różnej liczebności komórek, podając je w przeliczeniu na pojedynczą komórkę. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 35.



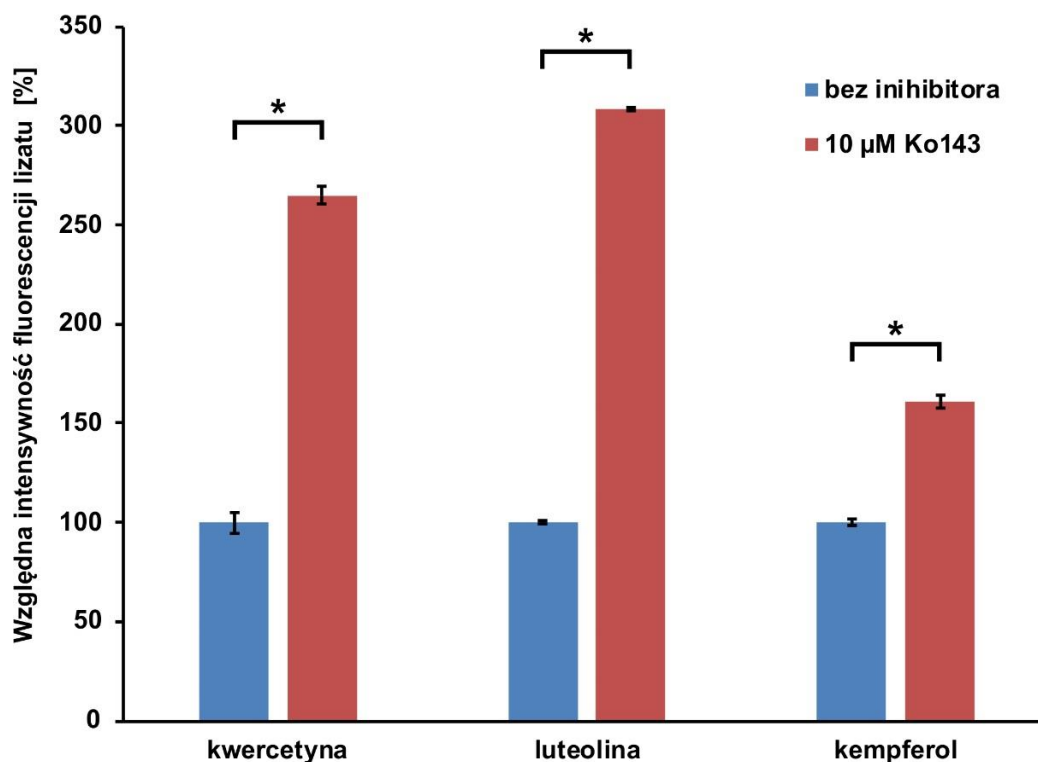
**Rycina 34.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych w płytce 96-dołkowej. Komórki danej linii inkubowano przez 1 h z dodatkiem 20  $\mu\text{M}$  kwercetyny w obecności lub nieobecności Ko143. Następnie przygotowano lizaty komórkowe derywatyzowane DPBA i zmierzono ich fluorescencję. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 9$ , \*  $p < 0,05$ .

Mierzona aktywność białka ABCG2 w przeliczeniu na pojedynczą komórkę była jednakowa niezależnie od gęstości komórek w dołku płytki. W dalszych doświadczeniach stosowano gęstość  $40 \times 10^3$  komórek na dołek płytki 96-dołkowej, ponieważ przy tej gęstości białko ABCG2 osiąga optymalną aktywność w przeliczeniu na pojedynczą komórkę, a bezwzględne wartości różnic intensywności fluorescencji są największe.



**Rycina 35.** Aktywność białka ABCG2 zmierzona w lizatach komórkowych przygotowanych w płytce 96-dołkowej dla różnej liczebności komórek i przedstawiona w przeliczeniu na pojedynczą komórkę. Przedstawiono różnicę wartości średnich między intensywnościami fluorescencji przedstawionymi na rycinie 34. Słupki błędów to średni błąd średniej dla różnic, n = 9, \* p < 0,05.

Korzystając z opisanej powyżej metody badania aktywności białka ABCG2 zbadano, czy luteolina i kempferol, dwa inne flawonoidy ulegające wydajnej derywatywacji fluorescencyjnej za pomocą DPBA, są również substratami dla tego białka. Komórki linii MDCK-II/BCRP inkubowano przez godzinę z kwercetyną, luteoliną lub kempferolem w nieobecności lub obecności Ko143. Po usunięciu nadmiaru flawonoidów przygotowano lizaty komórkowe bezpośrednio w dołkach płytki 96-dołkowej, równocześnie przeprowadzając derywatyzację flawonoidów za pomocą DPBA. Intensywność fluorescencji lizatów zmierzono stosując filtr wzbudzenia  $Ex = 485 \pm 14$  nm oraz różne filtry emisyjne: kempferol  $Em = 535 \pm 25$  nm; kwercetyna i luteolina  $Em = 555 \pm 38$  nm. Aby móc porównać różnice obserwowane dla różnych flawonoidów, intensywności fluorescencji lizatów przedstawiono w procentach jako wartości względne w odniesieniu do wartości uzyskanych dla kontroli z niezahamowaną aktywnością ABCG2. Tak przygotowane wyniki zestawiono na rycinie 36.

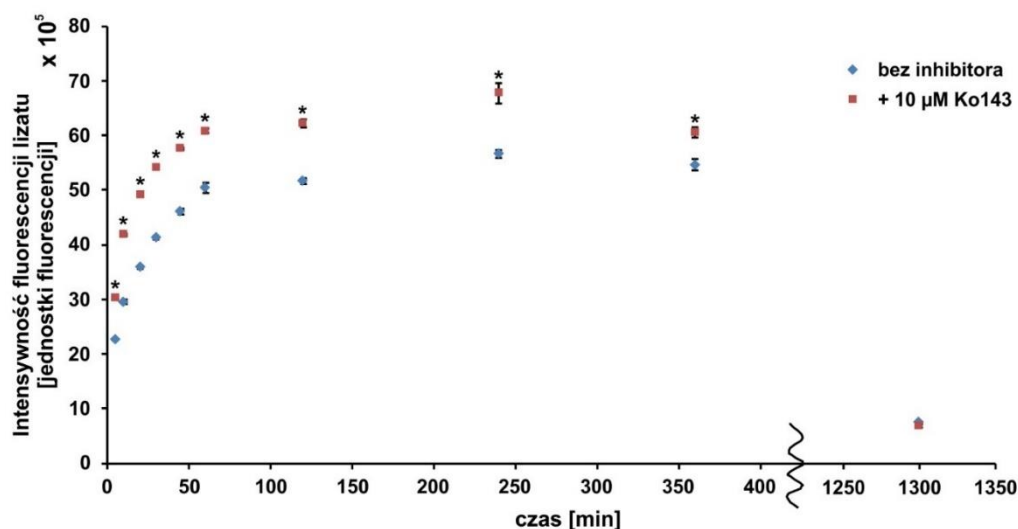


**Rycina 36.** Względna intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych w płytce 96-dołkowej z hodowli komórek MDCK-II/BCRP. Komórki inkubowano przez 1 h w obecności 10 μM flawonoidów w obecności lub nieobecności Ko143. Następnie przygotowano lizaty komórkowe derywatywizowane DPBA i zmierzono ich fluorescencję. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 5, \* p < 0,05.

Dla każdego z zastosowanych flawonoidów fluorescencja w lizacie otrzymanym z komórek z zahamowaną aktywnością białka ABCG2 jest znacznie wyższa niż w lizacie otrzymanym z komórek, których nie traktowano inhibitorem. Oznacza to, że wszystkie trzy związki są substratami białka ABCG2. Przy jednakowym zewnątrzkomórkowym stężeniu flawonoidów (10 μM) największe względne różnice w ilości zakumulowanego związku zaobserwowano dla luteoliny, a najmniejsze dla kempferolu. Koniugat luteoliny z DPBA wykazuje również bardzo intensywną fluorescencję (rycina 29), przez co flawonoid ten stanowi bardzo dobry, nowy substrat modelowy do badania aktywności białka ABCG2.

Zarówno luteolina, jak i inne flawonoidy mogą po dłuższych czasach inkubacji z komórkami wykazywać niepożądane efekty biologiczne, zaburzając homeostazę i w konsekwencji zakłócając pomiar aktywności transportera. Aby ograniczyć te efekty do minimum, oznaczanie aktywności transportowej białka ABCG2 oparte na pomiarze ilości flawonoidu zgromadzonego wewnątrzkomórkowo, po ustaleniu się równowagi między procesami dyfuzji i procesem transportu zależnym od ABCG2, należy wykonywać po możliwie najkrótszym czasie od podania flawonoidu. Stosując luteolinę jako nowy substrat białka ABCG2 zbadano kinetykę

ustalania się równowagi między procesami dyfuzji i transportu zależnego od tego białka. W tym celu komórki MDCK-II/BCRP hodowane na płytce 96-dołkowej inkubowano z luteoliną w obecności lub nieobecności Ko143 przez określony czas, maksymalnie 24 h. Po danym czasie z komórek przygotowano lizaty, przeprowadzając równocześnie derywatyzację luteoliny za pomocą DPBA, a następnie zmierzono intensywność fluorescencji otrzymanych lizatów. Wartości przedstawiono na rycinie 37. Ponieważ zmierzone wartości intensywności fluorescencji produktu luteolina+DPBA znajdują się w liniowym zakresie krzywej standardowej (rycina 29), odpowiadają ilości luteoliny zakumulowanej w komórkach po określonym czasie.

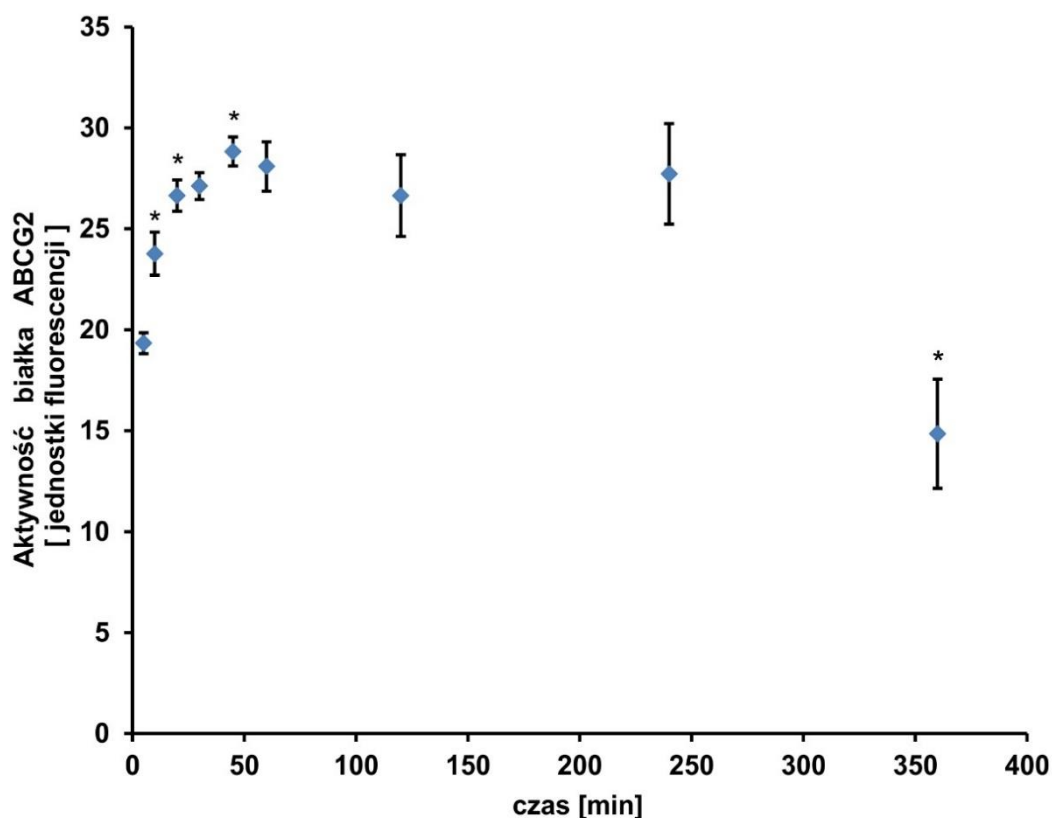


**Rycina 37.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych w płytce 96-dołkowej z komórek MDCK-II/BCRP inkubowanych z 60  $\mu$ M luteoliną przez różny okres czasu w obecności lub nieobecności Ko143. Z komórek po określonym czasie inkubacji przygotowano lizaty komórkowe derywatyzowane DPBA i zmierzono ich fluorescencję. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędu to średni błąd średniej,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$ .

Luteolina jest akumulowana w komórkach zawierających aktywne białko ABCG2 w mniejszej ilości niż w komórkach traktowanych Ko143. Ilość flawonoidu w komórkach rośnie przez pierwsze 60 minut od momentu rozpoczęcia inkubacji z luteoliną, po czym ustala się stan równowagi. Następnie, po 6 h inkubacji, można zaobserwować spadek intensywności fluorescencji oraz zmniejszenie się różnic w ilości akumulowanego flawonoidu między komórkami inkubowanymi w obecności i nieobecności Ko143. Po 24 h różnice w intensywnościach fluorescencji lizatów zanikają, a intensywności mierzonej fluorescencji lizatów są niskie. Spadek fluorescencji w obu przypadkach wiąże się najprawdopodobniej ze znacznym efektem cytotoksycznym, jaki wywiera na komórki długotrwała inkubacja z luteoliną. Ponieważ wewnątrzkomórkowa ilość flawonoidu dostępnego do transportu przez białko ABCG2 rośnie w trakcie początkowego okresu inkubacji, aktywność transportera przy stałym



zewnątrzkomórkowym stężeniu flawonoidu również rośnie w tym czasie. Na rycinie 38 przedstawiono, w jaki sposób zmienia się aktywność białka ABCG2 w przeliczeniu na pojedynczą komórkę.

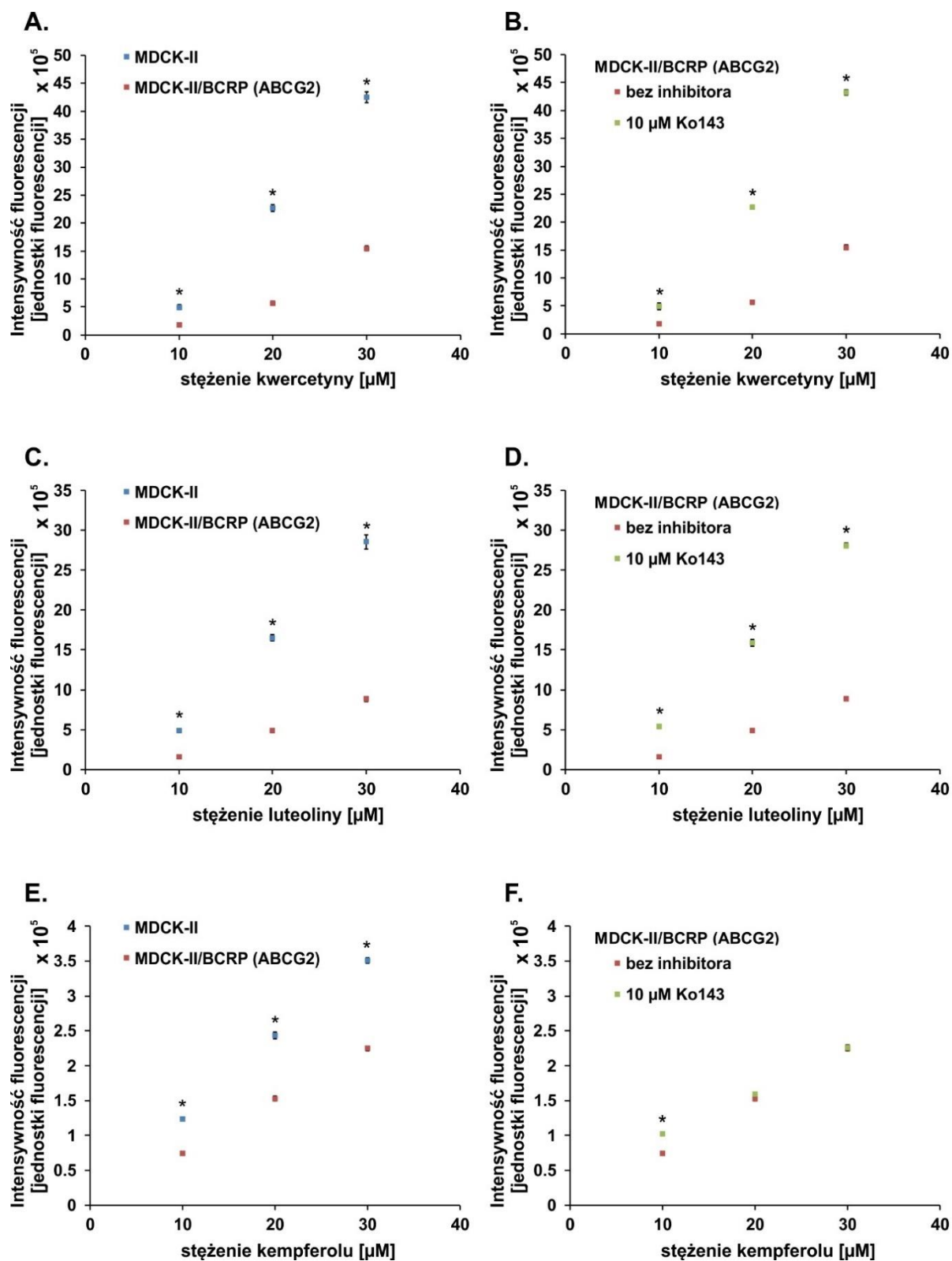


**Rycina 38.** Aktywność białka ABCG2, z luteoliną jako substratem, mierzona w lizatach komórkowych przygotowanych w płytce 96-dołkowej po różnym czasie od dodania flawonoidu. Na wykresie przedstawiono różnicę wartości średnich między intensywnościami fluorescencji przedstawionymi na rycinie 37 w przeliczeniu na pojedynczą komórkę. Słupki błędów to średni błąd średniej dla różnic,  $n = 5$ . Porównywano istotność różnic między dwoma następującymi po sobie punktami pomiarowymi, \*  $p < 0,05$ .

Różnice w ilości akumulowanego flawonoidu, będące miarą aktywności białka ABCG2, ustalają się po 60 minutach od podania luteoliny (transporter osiąga wtedy maksymalną szybkość transportu). W tym czasie osiągnąony jest stan równowagi między procesami dyfuzji i transportu, a ilość flawonoidu znajdującego się wewnątrz komórek utrzymuje się na stałym poziomie przez kilka następujących godzin. Biorąc pod uwagę powyższy wynik, w kolejnych doświadczeniach stosowano godzinny okres preinkubacji z flawonoidami.

Następnie wykonano serię doświadczeń z różnymi stężeniami trzech flawonoidów (kwercetyna, luteolina oraz kempferol) w dwóch układach eksperymentalnych: porównując ilość flawonoidu zakumulowanego w komórkach MDCK-II/BCRP i MDCK-II lub porównując ilości zakumulowane w komórkach MDCK-II/BCRP w nieobecności i obecności 10  $\mu$ M Ko143. Wyniki uzyskano stosując stężenia 10, 20 oraz 30  $\mu$ M danego flawonoidu w medium i zestawiono na rycinie 39.

W przypadku kwercetyny i luteoliny różnica ilości flawonoidu zakumulowanego w komórkach bez aktywnego białka ABCG2 (komórki MDCK-II lub komórki MDCK-II/BCRP z dodanym Ko143) i w komórkach z aktywnym ABCG2 (MDCK-II/BCRP bez inhibitora) rośnie zależnie od podanego stężenia flawonoidu. Ta różnica jest miarą szybkości reakcji enzymatycznej transportu. W zastosowanym zakresie stężeń w przypadku kwercetyny i luteoliny obserwowana szybkość transportu rośnie znacznie przy kolejnych stężeniach, co oznacza że aktywność białka ABCG2 względem tych substratów jest jeszcze daleka od aktywności maksymalnej (rycina 39A-D). Porównując aktywność ABCG2 względem wszystkich trzech substratów można zauważyć, że przyrosty różnic obserwowanych dla kempferolu są niewielkie (rycina 39E). Można z tego wywnioskować, że transporter osiąga w tym zakresie stężeń kempferolu szybkość bliską granicznej, co wskazuje na to, że powinowactwo kempferolu do białka ABCG2 jest wyższe niż powinowactwo kwercetyny czy luteoliny (połowa szybkości granicznej osiągnięta jest przy niższym stężeniu substratu –  $K_m$  jest niższe). Dodatkowo widać, że przy wyższych stężeniach kempferolu (20  $\mu$ M i 30  $\mu$ M) nie ma różnic między lizatami z komórek MDCK-II/BCRP traktowanymi i nietraktowanymi Ko143 (rycina 39F). Powinowactwo kempferolu do ABCG2 jest na tyle wysokie, że Ko143, będący inhibitorem kompetycyjnym, nie jest w stanie przy tych stężeniach flawonoidu wydajnie konkurować o miejsce wiązania na enzymie. Kempferol jest więc substratem białka ABCG2 o wysokim powinowactwie, ale niskiej szybkości maksymalnej transportu. Kwercetyna i luteolina mają niższe powinowactwo do transportera, ale są transportowane wydajniej.



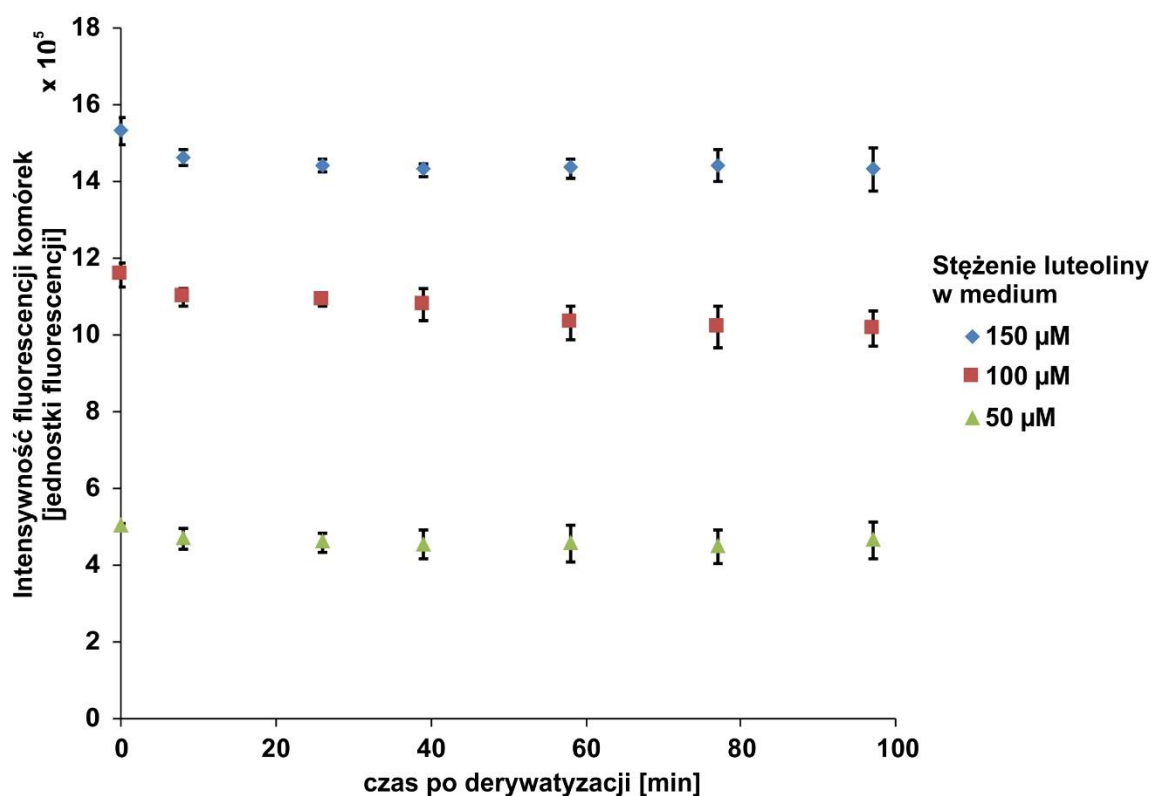
**Rycina 39.** Intensywność fluorescencji lizatów komórkowych przygotowanych w płytce 96-dółkowej. Komórki danej linii inkubowano przez 1 h z dodatkiem wskazanego stężenia kwercetyny (A. i B.), luteoliny (C. i D.) lub kempferolu (E. i F.) w obecności lub nieobecności Ko143. Przedstawiono fluorescencję lizatów otrzymanych z komórek MDCK-II i MDCK-II/BCRP nie traktowanych inhibitorem (A., C. i E.) oraz fluorescencję lizatów otrzymanych z komórek MDCK-II/BCRP traktowanych i nie traktowanych inhibitorem (B., D. i F.). Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd standardowy, n = 3, \* p < 0,05.

#### **4.1.2.3. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez bezpośrednie oznaczenie substratu wewnątrz komórek w monowarstwie**

Zastosowanie derywatywacji fluorescencyjnej polifenoli w lizatach komórkowych z niewielkiej ilości komórek hodowanych na płycie 96-dołkowej umożliwia szybki i dokładny pomiar ich stężenia. Biorąc pod uwagę, że DPBA łatwo i szybko przechodzi przez błony komórkowe, w tym ssacze, o czym świadczy jego stosowanie jako inhibitora wewnątrzkomórkowych kanałów jonowych, w kolejnych doświadczeniach zweryfikowano, czy fluorescencję produktu flawonoid+DPBA można również wiarygodnie mierzyć bezpośrednio w układzie heterogennym, jakim jest monowarstwa komórek.

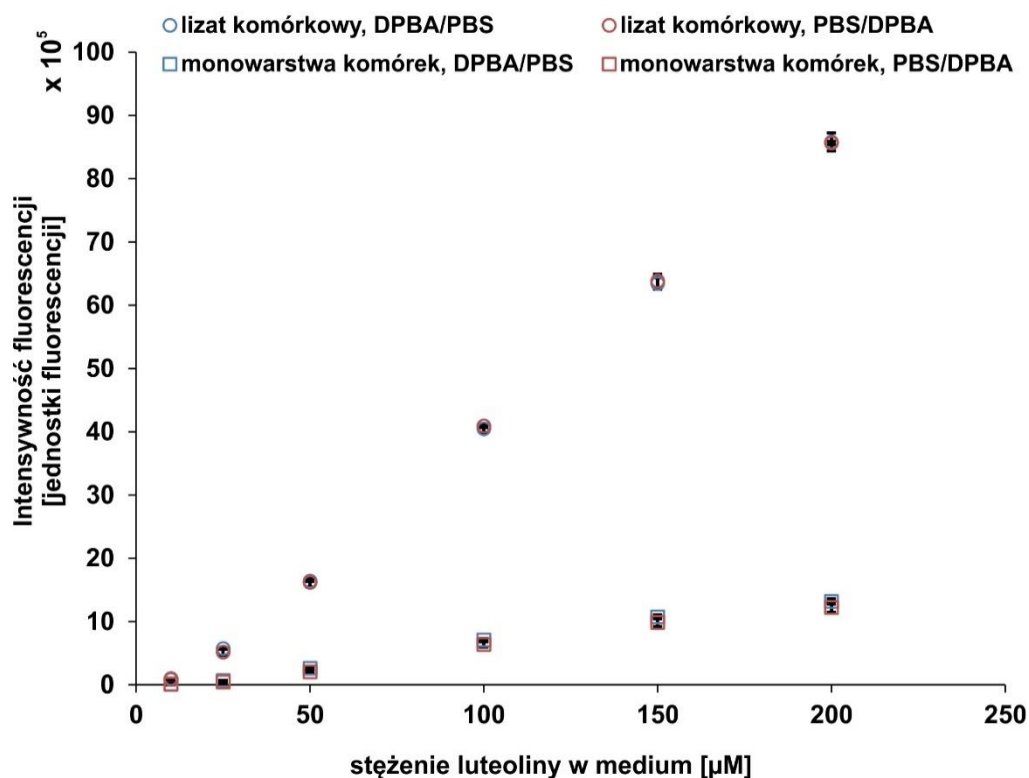
Stosując luteolinę, w pierwszym doświadczeniu badano, jak zmienia się fluorescencja komórek MDCK-II traktowanych najpierw flawonoidem, a następnie inkubowanych przyżyciowo w obecności DPBA. Komórki inkubowano z różnymi stężeniami flawonoidu przez godzinę w normalnych warunkach hodowli. Następnie bez usuwania nadmiaru flawonoidu do komórek dodano DPBA i komórki inkubowano dalej przyżyciowo przez 20 minut. Następnie z nad komórek usunięto medium i po jednokrotnej wymianie medium hodowlanego komórki inkubowano dalej w normalnych warunkach hodowli, wykonując po określonym czasie pomiar fluorescencji monowarstwy komórek (wymieniając przed pomiarem medium hodowlane na PBS). Otrzymane wyniki zebrano na rycinie 40.

Luteolina znajdująca się w komórkach ulega przekształceniu we fluorescencyjną pochodną, którą można mierzyć również w monowarstwie komórek za pomocą czytnika płytek. Intensywność fluorescencji komórek po akumulacji luteoliny i jej derywatywacji za pomocą DPBA, zmierzona przyżyciowo, dobrze koreluje z jej stężeniem podanym zewnątrzkomórkowo ( $R^2 > 0.99$ ). Co więcej, komórki zachowują początkową intensywność fluorescencji przez ponad 90 minut inkubacji po usunięciu flawonoidu oraz DPBA. Dowodzi to, że obdarzona ładunkiem fluorescencyjną pochodną flawonoid+DPBA, w przeciwieństwie do wyjściowego flawonoidu, nie przenika przez błonę plazmatyczną w żywych komórkach linii MDCK-II/BCRP. Pochodna ta nie jest usuwana do medium ani za pomocą dyfuzji, ani dzięki aktywnym transporterom, w tym w szczególności za pomocą białka ABCG2, które jest w tych komórkach obecne w dużej ilości. Dodatkowo niemal dwugodzinna stabilność mierzonych wartości fluorescencji związku flawonoid+DPBA w żywych komórkach oznacza, że w pochodna fluorescencyjna flawonoidu nie jest metabolizowana w sposób, który obniżałby wartości fluorescencji.



**Rycina 40.** Zależność intensywności fluorescencji monowarstwy komórek zawierających produkt luteolina+DPBA od czasu. Komórki MDCK-II inkubowano z różnymi stężeniami luteoliny przez godzinę, a następnie do komórek dodano DPBA (do stężenia 1,11 mM) i po 20 minutach inkubacji komórki przepłukano świeżym medium hodowlanym (bez flawonoidu i DPBA) i komórki od tego czasu (czas po derywatywacji) hodowano przez kolejne 100 minut w normalnych warunkach hodowli w określonych punktach czasowych wykonując pomiar fluorescencji monowarstwy. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 10$ .

W kolejnym doświadczeniu na komórkach lizowanych i nie lizowanych porównywano liniowość zależności mierzonej intensywności pochodnej flawonoid+DPBA od stężenia flawonoidu, z którym inkubowano komórki w monowarstwie. Dodatkowo sprawdzono, jak szybka jest reakcja derywatywacji flawonoidu w żywych komórkach. Komórki MDCK-II wysiane na płytkę 96-dołkową w jednakowej gęstości ( $4 \times 10^4$  komórek na dołek) inkubowano przez godzinę w normalnych warunkach hodowli z luteoliną w stężeniu między  $0 \mu\text{M}$  a  $200 \mu\text{M}$ . Następnie do niektórych dołków dodawano DPBA na 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym te komórki przemywano za pomocą PBS i wykonywano pomiar ich fluorescencji bezpośrednio (punkty pomiarowe: monowarstwa, DPBA/PBS) lub po przygotowaniu lizatów komórkowych (punkty pomiarowe: lizat komórkowy, DPBA/PBS). Równolegle w innych dołkach bezpośrednio po inkubacji z luteoliną komórki przemywano za pomocą PBS, a dopiero potem poddawano działaniu DPBA w PBS przez 20 minut (punkty pomiarowe: monowarstwa, PBS/DPBA) lub przygotowywano z nich lizaty derywatyzowane DPBA (punkty pomiarowe: lizat komórkowy, PBS/DPBA). Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 41.

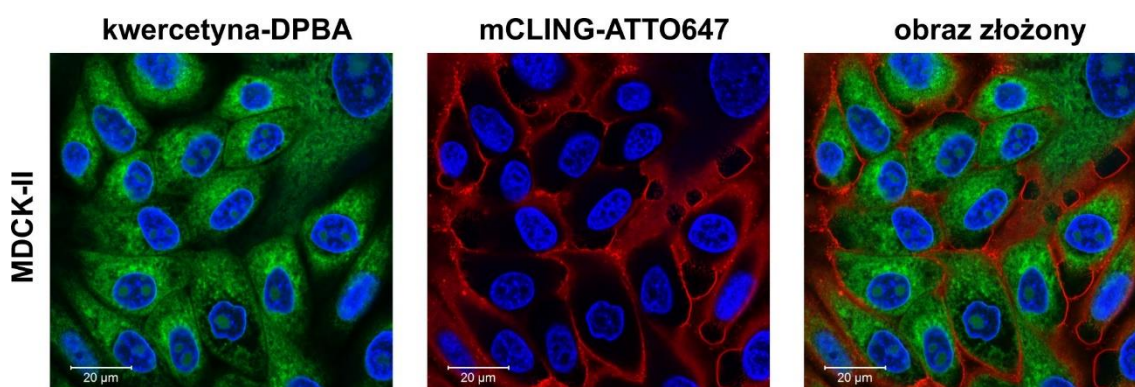


**Rycina 41.** Zależność intensywności fluorescencji monowarstwy komórek lub lizatu komórkowego zawierających produkt luteolina+DPBA od stężenia podanej luteoliny. Komórki MDCK-II inkubowano z różnymi stężeniami luteoliny przez godzinę, a następnie komórki przepłukano PBS i na 20 minut dodano roztwór DPBA (o stężeniu 1,11 mM) w PBS (punkty pomiarowe PBS/DPBA) lub najpierw do komórek na 20 minut dodano DPBA (do stężenia 1,11 mM), a następnie komórki dwukrotnie przepłukano PBS (punkty pomiarowe DPBA/PBS). Fluorescencję produktu luteolina+DPBA mierzono na czytniku płytek bezpośrednio w monowarstwie komórek (punkty pomiarowe monowarstwa komórek) albo po przygotowaniu lizatów komórkowych (punkty pomiarowe lizat komórkowy). Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 10$ .

Zarówno wartości intensywności fluorescencji produktu luteolina+DPBA mierzone w lizatach komórkowych, jak i wartości mierzone bezpośrednio w monowarstwie komórek korelują bardzo dobrze z zewnątrzkomórkowym stężeniem flawonoidu ( $R^2 > 0.99$ ). W obu przypadkach fluorescencja komórek inkubowanych z najniższym stężeniem flawonoidu (10 µM) jest wyższa niż fluorescencja tła (komórki nietraktowane luteoliną), co dowodzi, że obie techniki pomiaru równie dobrze nadają się do pomiaru wewnątrzkomórkowego stężenia flawonoidu. Co więcej, fluorescencja produktu luteolina+DPBA jest jednakowa niezależnie od tego, czy komórki są traktowane odczynnikami derywatyżującym bezpośrednio po inkubacji z flawonoidem, czy też dopiero po usunięciu nadmiaru medium z luteoliną. Dowodzi to, że derywatywizacja zachodzi niemal natychmiastowo i ilościowo. Cały zakumulowany w komórkach flawonoid jest przekształcany we fluorescencyjną pochodną, która ze względu na odmienną strukturę chemiczną nie jest w stanie wypływać z żywych komórek.

#### 4.1.2.4. Badanie aktywności białka ABCG2 poprzez bezpośredni pomiar stężenia flawonoidu wewnątrz pojedynczych komórek

Jak wykazano powyżej, przeprowadzenie flawonoidu zakumulowanego w komórce w jego fluorescencyjną pochodną za pomocą nieenzymatycznej i niemal natychmiastowej reakcji z DPBA powoduje jej zatrzymanie wewnątrz żywych komórek również po usunięciu zewnątrzkomórkowego źródła flawonoidu. Sugeruje to, że związek polifenolowy o dobrej rozpuszczalności w błonach komórkowych jest przeprowadzany we fluorescencyjną pochodną, która nie ma możliwości dyfuzji przez lipidowe błony komórkowe. Aby to dokładniej zbadać, komórki MDCK-II inkubowano z 20  $\mu$ M kwercetyną przez godzinę, po czym poddano je reakcji derywatacji za pomocą DPBA w PBS. Dodatkowo wybarwiono ich jądra komórkowe za pomocą Hoechst 33342 oraz błony plazmatyczne za pomocą lipofilowego barwnika mCLING-ATTO 647. Oba barwniki dobrano tak, aby zakresy emisji ich fluorescencji (odpowiednio poniżej 500 nm oraz powyżej 650 nm) znajdowały się poza zakresem emisji produktu kwercetyna+DPBA. Tak przygotowane preparaty obrazowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe obrazy przedstawiono na rycinie 42.



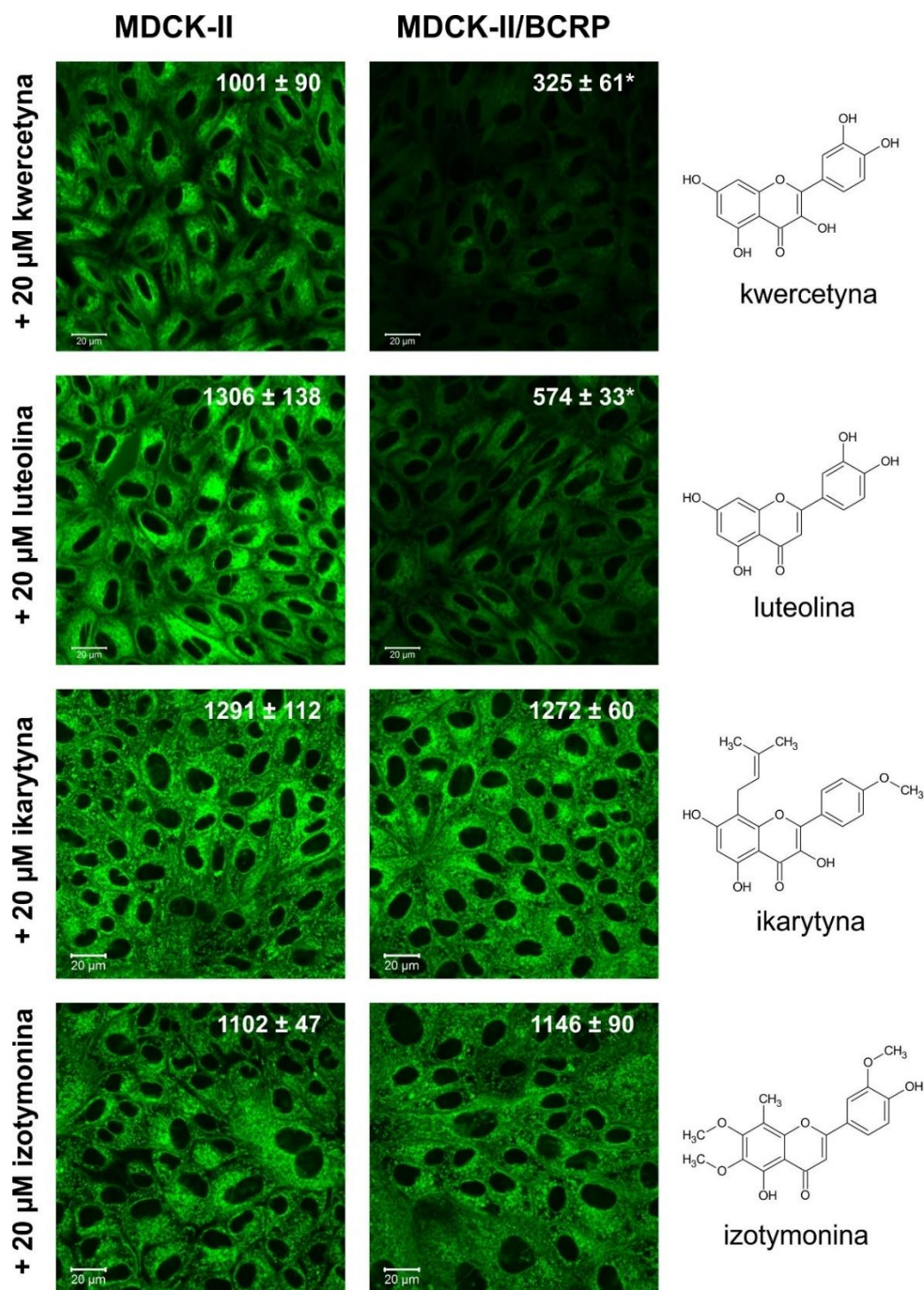
**Rycina 42.** Przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek MDCK-II zawierających produkt fluorescencyjny kwercetyna+DPBA (zielony sygnał). Błony plazmatyczne wybarwiono za pomocą mCLING-ATTO 647 (czerwony sygnał). Jądra komórkowe wybarwiono za pomocą Hoechst 33342 (niebieski sygnał).

Pochodna kwercetyna+DPBA jest dość jednorodnie rozmieszczona w cytozolu komórek. Sygnał fluorescencyjny pochodnej kwercetyny zupełnie nie kolokalizuje z sygnałem barwnika mCLING-ATTO 647 (co widać na obrazie złożonym, na którym brak pikseli o kolorze złożonym z zielonego i czerwonego), który barwi błony plazmatyczne komórek. Dowodzi to, że uwięzienie fluorescencyjnej pochodnej flawonoidu wewnątrz komórek jest związane z utratą możliwości wiązania się z błoną komórkową i przechodzenia przez nią.

W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, czy mikroskopowe pomiary sygnału fluorescencyjnego produktów flawonoid+DPBA umożliwiają również ilościową ocenę aktywności białka ABCG2. Do doświadczenia wybrano cztery flawonoidy, które tworzą z DPBA produkt o bardzo wysokiej intensywności fluorescencji. Zgodnie z wynikami uzyskanymi na podstawie pomiarów lizatów komórkowych (podrozdział 4.1.3.; tabela 5) dwa z wybranych związków są substratami ABCG2 (F4 - kwercetyna i F8 - luteolina), a dwa nie są transportowane przez ABCG2 (F233 - ikarytyna i F225 - izotymonina). Komórki MDCK-II lub MDCK-II/BCRP inkubowano z wybranymi związkami przez godzinę, a następnie flawonoidy poddano reakcji z DPBA. Po usunięciu nadmiaru odczynników, dla każdego z układów eksperymentalnych wykonano serię konfokalnych obrazów mikroskopowych, określając średnią wartość intensywności fluorescencji w kanale flawonoid+DPBA. Reprezentatywne obrazy wraz ze średnimi wartościami fluorescencji zmierzonymi dla każdego z układów przedstawiono na rycinie 43.

W przypadku kwercetyny i luteoliny średnia intensywność fluorescencji w komórkach linii MDCK-II/BCRP jest znacznie niższa niż w komórkach MDCK-II. Takiej różnicy nie ma w przypadku ikarytyny i izotymoniny, co potwierdza uprzednio uzyskane wyniki, że te dwa związki nie są substratami białka ABCG2. Powyższe doświadczenie potwierdza również, że ilościowy pomiar stężenia flawonoidów wewnątrz pojedynczych komórek jest możliwy po derywatywacji za pomocą DPBA.





**Rycina 43.** Przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek MDCK-II i komórek MDCK-II/BCRP zawierających produkty fluorescencyjne flawonoid+DPBA (zielony sygnał). Komórki inkubowano przez godzinę w obecności wskazanego stężenia flawonoidu, a następnie traktowano za pomocą DPBA w PBS i analizowano od razu. Wartości podane na obrazach reprezentują średnią  $\pm$  średni błąd średniej intensywności fluorescencji sygnału w danym kanale, n = 4, \* p < 0,05.

#### 4.1.3. Poszukiwanie nowych substratów do transportu

Wykorzystując zoptymalizowaną powyżej metodę pomiaru aktywności transportowej białka ABCG2, przeprowadzono poszukiwanie nowych flawonoidowych substratów tego transportera. W pierwszym eksperymencie analizie poddano 86 flawonoidów spośród 406 zakupionych związków. Były to flawonoidy które charakteryzowały się wysoką intensywnością fluorescencji produktu flawonoid+DPBA. Doświadczenie przeprowadzono na komórkach MDCK-II/BCRP hodowanych w płytках 96-dołkowych. W niektórych dołkach płytki aktywność transportera w komórkach hamowano za pomocą 10  $\mu\text{M}$  Ko143. Komórki inkubowano z 20  $\mu\text{M}$  roztworami różnych flawonoidów przez godzinę w normalnych warunkach hodowli. Po tym czasie przygotowywano lizaty komórkowe, derywatyzując równocześnie flawonoidy za pomocą DPBA. Fluorescencję lizatów mierzono na czytniku mikropłytek wykorzystując jeden z pięciu zestawów filtrów wzbudzenia i emisji, zoptymalizowany dla każdego ze związków w oparciu o wcześniej uzyskane wyniki (rycina 30B). W tabeli 4 zestawiono otrzymane wartości intensywności fluorescencji lizatów oraz wartości różnic między intensywnościami fluorescencji zmierzonymi dla lizatów z komórek inkubowanych z Ko143 lub nie. Wartość tej różnicy jest miarą aktywności transportowej białka ABCG2 dla danego związku. W tabeli podano również wartość intensywności fluorescencji w maksimum widma emisji przy optymalnym wzbudzeniu (405 nm lub 485 nm) zmierzoną uprzednio dla 100  $\mu\text{M}$  roztworów flawonoid+DPBA w PBS (wyniki zaprezentowane graficznie na rycinie 30B), pozwalające ocenić względną jasność danej fluorescencyjnej pochodnej w lizatach.

Na podstawie uzyskanych wyników analizowane związki zaklasyfikowano do kilku grup, oznaczonych w tabeli 4 za pomocą różnych kolorów. Pierwszym kryterium podziału była zdolność flawonoidów do akumulowania się w komórkach. Wszystkie badane tutaj flawonoidy ulegają wydajnej derywatyzacji fluorescencyjnej za pomocą DPBA, stąd związki, dla których intensywność fluorescencji lizatu nie była istotnie różna od fluorescencji tła (wartości zaznaczone w tabeli na pomarańczowo), to flawonoidy, które nie są w stanie pasywnie dyfundować przez błony komórkowe linii MDCK-II/BCRP. Co ciekawe, w tej grupie znajduje się na przykład rutyna (glikozyd kwercetyny), która bez dołączonej reszty cukrowej jest w stanie akumulować się w komórkach. W tej grupie znajdują się również dwie proste pochodne flawonoidów, które dobrze dyfundują przez błony plazmatyczne, czyli diocyanonaringeniny (pochodna naringeniny) oraz eter 5-metylowy kempferolu (pochodna kempferolu). Związki te tworzą jasne fluorescencyjne pochodne w reakcji z DPBA, ale nie wykryto ich obecności w lizatach komórkowych, co dowodzi, że nawet tak niewielkie zmiany w ich strukturze powodują, że nie są w stanie wydajnie dyfundować przez błony plazmatyczne komórek MDCK-II.

Flawonoidy, które akumulują się w komórkach, oznaczono w tabeli kolorem niebieskim. Dla tej grupy zastosowano drugie kryterium podziału określając, czy związek jest transportowany przez białko ABCG2. Flawonoidy, które gromadzą się w komórkach w większej ilości po zastosowaniu inhibitora, są substratami białka ABCG2. Wartości różnic uzyskanych dla tych związków zaznaczono w tabeli na kolor zielony. Wartości różnic dla pozostałych flawonoidów, czyli takich, dla których nie wykazano różnic oraz takich, które po zastosowaniu inhibitora ABCG2 akumulowały się w komórkach w mniejszej ilości, oznaczono w tabeli na żółto.

Spośród 86 testowanych flawonoidów 73 związki są w stanie wnikać do komórek MDCK-II/BCRP. Spośród tych flawonoidów 32 (ok. 44% z flawonoidów znajdujących się w komórkach) stanowią substraty białka ABCG2, z którymi inhibitor kompetycyjny Ko143 jest w stanie wydajnie konkurować. Należą do tej grupy związki, które nie wiążą się do ABCG2 z dużym powinowactwem. Do tej grupy należą takie nieznanne wcześniej substraty białka ABCG2 jak: fisetyna, orobol, robinetyna, a także genkwanina i hydroksygenkwanina.

Eksperyment polegający na pomiarze aktywności białka ABCG2 w komórkach linii MDCK-II/BCRP inkubowanych z Ko143 jest bardzo wygodny technicznie (jednorodny model komórkowy) i umożliwia wysoką przepustowość pomiarów, ale dla substratów o bardzo wysokim powinowactwie podawanych w odpowiednio wysokim stężeniu (jak wykazano wcześniej dla kempferolu) może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych i niezaklasyfikowania ich jako substratów białka ABCG2.

**Tabela 4.** Analiza akumulacji 86 wybranych flawonoidów przez komórki linii MDCK-II/BCRP w zależności od zahamowania aktywności białka ABCG2. Część komórek inkubowano z 10  $\mu$ M Ko143 przez 30 minut, a następnie wszystkie komórki inkubowano przez godzinę z 20  $\mu$ M roztworem flawonoidów w normalnych warunkach hodowli w obecności lub nieobecności inhibitora. W tabeli podano wartości intensywności fluorescencji lizatów zmierzonych za pomocą jednego z pięciu zestawów filtrów wzbudzenia i emisji. Numer zestawu filtrów zastosowany dla danego flawonoidu podano w indeksie górnym po nazwie związku: 1) Ex = 405  $\pm$  8 nm, Em = 510  $\pm$  10 nm; 2) Ex = 405  $\pm$  8 nm, Em = 535  $\pm$  38 nm; 3) Ex = 485  $\pm$  14 nm, Em = 535  $\pm$  38 nm; 4) Ex = 485  $\pm$  14 nm, Em = 555  $\pm$  38 nm; 5) Ex = 485  $\pm$  14 nm, Em = 579  $\pm$  25 nm. Flawonoidy zaklasyfikowano do różnych grup oznaczonych w tabeli kolorami. Związki które były akumulowane w komórkach z zahamowaną aktywnością ABCG2 zaznaczono na kolor niebieski. Flawonoidy które nie były akumulowane w komórkach, czyli takie dla których wartości fluorescencji lizatu nie były istotnie różne od wartości tła, zaznaczono na kolor pomarańczowy. Grupę związków akumulowanych przez komórki podzielono dodatkowo na dwie grupy. Związki będące substratami białka ABCG2, dla których fluorescencja lizatów z komórek traktowanych Ko143 była wyższa od fluorescencji lizatów wykonanych z komórek nie traktowanych inhibitorem, oznaczono na kolor zielony. Flawonoidy, dla których nie zaobserwowano istotnych różnic między intensywnościami fluorescencji lizatów lub dla których intensywność fluorescencji lizatu z komórek traktowanych inhibitorem ABCG2 była niższa, zaznaczono na żółto. W tabeli podano również zmierzone wcześniej dla 100  $\mu$ M roztworów flawonoid+DPBA wartości intensywności fluorescencji w maksimum widma emisji przy optymalnym wzbudzeniu (405 nm lub 485 nm). Wartości te pozwalają ocenić względną jasność danej fluorescencyjnej pochodnej w lizatach. Wartości intensywności fluorescencji przedstawiono jako średnia  $\pm$  średni błąd średniej, n = 6, p < 0.05.

Numer flawonoidu	Nazwa związku	Intensywność fluorescencji lizatu z komórek MDCK-II/BCRP nie traktowanych Ko143 [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]	Intensywność fluorescencji lizatu z komórek MDCK-II/BCRP traktowanych Ko143 [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]	Różnica w intensywności fluorescencji lizatu zależna od Ko143 [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]	Maksimum intensywności fluorescencji [jednostki fluorescencji x10 <sup>5</sup> ]
F234	Hydroxygenkwanin <sup>3)</sup>	778,4 $\pm$ 1,6	1045,3 $\pm$ 11,7	266,0 $\pm$ 11,8	73,3
F4	Quercetin <sup>5)</sup>	99,9 $\pm$ 0,3	296,6 $\pm$ 2,6	196,8 $\pm$ 2,6	49,1
F48	Fisetin <sup>5)</sup>	142,0 $\pm$ 4,2	266,7 $\pm$ 10,0	124,7 $\pm$ 10,9	73,6
F187	Orobol <sup>3)</sup>	269,3 $\pm$ 2,2	384,8 $\pm$ 7,8	115,5 $\pm$ 8,1	93,4
F165	Robinetin <sup>3)</sup>	445,0 $\pm$ 13,2	497,3 $\pm$ 10,3	52,3 $\pm$ 16,7	88,6
F36	6,3',4'-Trimethoxyflavonol <sup>3)</sup>	131,1 $\pm$ 2,0	178,9 $\pm$ 1,9	47,8 $\pm$ 2,7	34,1
F246	Genkwanin <sup>1)</sup>	58,3 $\pm$ 4,3	95,2 $\pm$ 13,7	36,9 $\pm$ 14,4	59,4
F49	Myricetin <sup>3)</sup>	47,7 $\pm$ 1,3	83,6 $\pm$ 3,4	35,9 $\pm$ 3,7	81,9
F26	5-Deoxykaempferol <sup>2)</sup>	132,0 $\pm$ 0,9	160,6 $\pm$ 1,3	28,6 $\pm$ 1,6	9,9
F167	Rhamnocitrin <sup>3)</sup>	173,8 $\pm$ 3,0	183,9 $\pm$ 2,1	10,2 $\pm$ 3,6	93,0
F31	3',4'-Dihydroxyflavonol <sup>2)</sup>	215,2 $\pm$ 1,5	225,1 $\pm$ 2,2	9,8 $\pm$ 2,7	8,3
F24	3',4'-Dimethoxyflavonol <sup>3)</sup>	168,4 $\pm$ 1,9	177,8 $\pm$ 2,7	9,3 $\pm$ 3,3	10,9
F119	3'4'-Diethoxyflavonol <sup>3)</sup>	591,3 $\pm$ 2,6	599,0 $\pm$ 2,6	7,8 $\pm$ 3,7	25,6
F143	Tamarixetin <sup>3)</sup>	8,8 $\pm$ 0,6	15,7 $\pm$ 1,8	6,9 $\pm$ 1,9	67,6
F154	Scillascillin <sup>2)</sup>	29,1 $\pm$ 0,6	35,8 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 1,3	151,8
F69	3,7,3'-Trihydroxyflavone <sup>3)</sup>	102,9 $\pm$ 2,9	109,6 $\pm$ 3,2	6,7 $\pm$ 4,3	73,5
F40	6,4'-Dimethoxyflavonol <sup>3)</sup>	23,8 $\pm$ 0,6	30,2 $\pm$ 1,5	6,4 $\pm$ 1,6	24,8
F142	Taxifolin <sup>3)</sup>	4,3 $\pm$ 0,2	9,7 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,7	67,0

F216	Kumatakenin <sup>3)</sup>	13,6 ± 0,3	18,6 ± 2,7	5,0 ± 2,7	63,1
F147	Steppogenin <sup>3)</sup>	2,4 ± 0,1	7,2 ± 1,4	4,9 ± 1,5	6,8
F145	Syzalterin <sup>3)</sup>	2,7 ± 0,2	7,2 ± 1,6	4,4 ± 1,6	11,7
F164	Robtin <sup>3)</sup>	3,7 ± 0,9	8,1 ± 2,4	4,4 ± 2,6	11,1
F27	6,4'-Dihydroxyflavonol <sup>3)</sup>	53,3 ± 0,5	57,2 ± 0,6	3,9 ± 0,8	34,6
F181	Pedalitin <sup>3)</sup>	8,8 ± 0,4	12,0 ± 1,4	3,2 ± 1,5	72,1
F38	4'-methoxy-6-methylflavonol <sup>3)</sup>	24,2 ± 0,5	26,7 ± 0,2	2,5 ± 0,5	23,2
F22	3',4'-Dihydroxy-7,8-benzoflavone <sup>2)</sup>	36,2 ± 0,2	38,5 ± 0,7	2,2 ± 0,7	5,1
F275	Dihydromorin <sup>3)</sup>	0,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	30,3
F34	2',4'-Dimethoxyflavonol <sup>3)</sup>	17,8 ± 0,2	19,8 ± 0,3	2,0 ± 0,3	29,2
F1	Isorhamnetin <sup>5)</sup>	2,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	1,9 ± 0,2	47,4
F33	6,2',4'-Trimethoxyflavonol <sup>3)</sup>	34,0 ± 0,3	35,8 ± 0,4	1,7 ± 0,5	34,1
F300	Capillarisin <sup>3)</sup>	1,4 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,6 ± 0,2	39,5
F25	3'-Methoxyflavonol <sup>2)</sup>	4,6 ± 0,1	5,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	21,5
F8	Kaempferol <sup>3)</sup>	126,5 ± 0,3	129,6 ± 0,1	3,1 ± 3,3	51,0
F39	3',4'-Dimethoxy-6-methylflavonol <sup>3)</sup>	324,7 ± 2,3	327,5 ± 3,1	2,7 ± 3,8	20,0
F10	Silibinin A <sup>2)</sup>	5,9 ± 0,2	7,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	51,8
F220	Jaceosidin <sup>3)</sup>	11,6 ± 0,3	12,7 ± 1,6	1,0 ± 1,6	36,9
F223	Isowighteone <sup>3)</sup>	64,5 ± 2,0	65,5 ± 0,6	1,1 ± 2,1	2,9
F19	6-Methylflavonol <sup>2)</sup>	8,1 ± 0,2	8,9 ± 0,4	0,8 ± 0,4	20,8
F133	Tricin <sup>3)</sup>	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,3	0,1 ± 0,3	42,8
F168	Quercetin 3,4'-dimethyl ether <sup>3)</sup>	8,9 ± 0,4	9,0 ± 0,7	0,1 ± 0,8	42,5
F219	Kaempferol 3,4,7-triacetate <sup>3)</sup>	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,2	18,2
F130	Viscidulin II <sup>3)</sup>	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	0,0 ± 0,3	42,5
F86	4'-Ethoxy-7-methylflavonol <sup>3)</sup>	5,3 ± 0,1	5,2 ± 0,4	-0,1 ± 0,5	29,1
F104	3',4'-Dimethoxy-7-hydroxyflavonol <sup>3)</sup>	137,7 ± 0,7	137,5 ± 0,9	-0,1 ± 1,2	62,0
F1	Isorhamnetin <sup>3)</sup>	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	-0,2 ± 0,2	24,9
F258	Eucalyptin <sup>3)</sup>	11,4 ± 0,2	11,2 ± 0,3	-0,2 ± 0,4	8,5
F278	Derrone <sup>1)</sup>	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1	-0,2 ± 0,3	37,6
F126	Wighteone <sup>2)</sup>	6,4 ± 0,3	5,9 ± 0,1	-0,5 ± 0,3	47,2
F230	Isoderrone <sup>1)</sup>	3,8 ± 0,3	3,2 ± 0,1	-0,6 ± 0,3	38,6
F110	5-Hydroxyflavonol <sup>3)</sup>	142,1 ± 1,5	141,5 ± 1,1	-0,6 ± 1,9	17,7
F189	Ombuin <sup>3)</sup>	11,2 ± 0,5	10,5 ± 0,1	-0,7 ± 0,5	41,2
F299	Carpachromene <sup>1)</sup>	4,9 ± 0,2	4,0 ± 0,3	-0,8 ± 0,3	39,3
F277	Desmethoxycentaureidin <sup>3)</sup>	12,8 ± 0,6	11,9 ± 0,5	-1,0 ± 0,8	36,3
F193	Noreugenin <sup>2)</sup>	8,7 ± 0,6	7,5 ± 0,6	-1,1 ± 0,8	168,5
F284	Cyclomorusin <sup>3)</sup>	12,3 ± 1,0	11,0 ± 0,7	-1,3 ± 1,3	61,5
F209	Kuwanon E <sup>2)</sup>	32,4 ± 2,3	31,0 ± 0,9	-1,4 ± 2,5	169,2
F148	Sophoraflavanone G <sup>2)</sup>	11,8 ± 1,0	9,9 ± 1,0	-1,9 ± 1,4	166,2
F114	4'-Hydroxyflavonol <sup>3)</sup>	101,7 ± 0,7	99,7 ± 1,6	-2,0 ± 1,7	24,0

F28	5,3',4'-Trihydroxyflavone <sup>5)</sup>	194,6 ± 1,2	192,6 ± 1,5	-2,0 ± 1,9	12,1
F156	Sappanone A <sup>2)</sup>	44,8 ± 3,2	41,8 ± 5,8	-3,0 ± 6,6	49,3
F160	Sanggenol A <sup>2)</sup>	24,9 ± 1,9	20,3 ± 3,3	-4,5 ± 3,8	3,4
F233	Icaritin <sup>3)</sup>	241,9 ± 2,5	236,9 ± 2,9	-4,9 ± 3,9	44,1
F131	Viscidulin I <sup>3)</sup>	82,5 ± 3,6	76,8 ± 1,4	-5,8 ± 3,9	90,6
F146	Sulfuretin <sup>2)</sup>	16,1 ± 4,4	8,4 ± 0,7	-7,8 ± 4,5	34,4
F197	Moslosooflavone <sup>3)</sup>	179,5 ± 3,6	171,5 ± 1,0	-8,0 ± 3,7	93,2
F294	Centaureidin <sup>1)</sup>	65,1 ± 5,0	56,7 ± 5,5	-8,5 ± 7,5	26,4
F113	Kaempferide <sup>3)</sup>	272,3 ± 5,9	262,2 ± 7,1	-10,1 ± 9,3	72,9
F282	Dehydrotoxicarol <sup>1)</sup>	180,8 ± 3,6	170,4 ± 3,8	-10,4 ± 5,3	65,6
F250	Galangin <sup>3)</sup>	236,7 ± 4,7	226,1 ± 1,2	-10,6 ± 4,8	66,2
F302	Brousoflavonol F <sup>1)</sup>	43,7 ± 2,3	32,1 ± 2,7	-11,6 ± 3,6	130,9
F190	Norwogonin <sup>3)</sup>	174,3 ± 1,9	160,8 ± 3,4	-13,5 ± 3,9	86,8
F225	Isothymonin <sup>3)</sup>	254,6 ± 5,4	237,8 ± 6,7	-16,8 ± 8,6	43,4
F192	Noricaritin <sup>3)</sup>	513,7 ± 6,2	479,4 ± 4,3	-34,3 ± 7,5	52,4
F82	4'-Methoxy-7-methylflavonol <sup>3)</sup>	1,2 ± 0,9	1,1 ± 1,0	-0,1 ± 1,3	30,1
F9	7,3',4',5'-Tetrahydroxyflavone <sup>5)</sup>	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	18,5
F3	Cynaroside <sup>5)</sup>	0,6 ± 0,8	1,4 ± 1,1	0,8 ± 1,4	3,1
F308	beta-Rhamnocitrin <sup>4)</sup>	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,2	20,9
F5	Glabranin <sup>4)</sup>	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,3	19,1
F255	Eupatorin <sup>1)</sup>	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	-0,3 ± 0,3	15,7
F257	Eupatilin <sup>4)</sup>	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	0,2 ± 0,3	20,3
F247	Gancaonin M <sup>1)</sup>	1,8 ± 0,6	1,1 ± 0,3	-0,7 ± 0,7	17,6
F155	Sciadopitysin <sup>1)</sup>	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,4	-0,8 ± 0,4	13,9
F218	Kaempferol 5-methyl ether <sup>3)</sup>	2,8 ± 1,1	1,5 ± 0,5	-1,3 ± 1,2	13,2
F195	Naringenin-4',7-diacetate <sup>3)</sup>	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,9	0,5 ± 0,9	32,7
F6	Rutin <sup>5)</sup>	1,8 ± 0,8	1,2 ± 0,8	-0,6 ± 1,1	18,0
F139	Tetrahydroamentoflavone <sup>2)</sup>	1,1 ± 0,2	1,3 ± 1,0	0,2 ± 1,0	21,9

W drugiej serii doświadczeń wykonanej na mniejszej próbie związków (60 flawonoidów pochodzących jedynie z biblioteki Chemfaces, w przeciwieństwie do 86 flawonoidów wybranych z obu bibliotek, użytych w pierwszym eksperymencie) zastosowano dwie linie komórkowe: MDCK-II i MDCK-II/BCRP. Mniejsza pula flawonoidów która została przetestowana w drugim doświadczeniu pochodziła jedynie z biblioteki Chemfaces, ponieważ w tej kolekcji dostępna była większa ilość każdego z badanych związków. Podobnie jak w pierwszym doświadczeniu komórki traktowano 20  $\mu$ M roztworami flawonoidów przez godzinę w normalnych warunkach hodowli. Następnie przygotowano lizaty komórkowe derywując jednocześnie flawonoidy za pomocą DPBA. Podobnie jak w pierwszym doświadczeniu, fluorescencję lizatów zmierzono na czytniku mikropłytek wykorzystując jeden z pięciu zestawów filtrów wzbudzenia i emisji. Otrzymane dane zestawiono w tabeli 5.

**Tabela 5.** Analiza akumulacji 60 wybranych flawonoidów w komórkach MDCK-II lub MDCK-II/BCRP. W tabeli zestawiono wartości intensywności fluorescencji lizatów (derywatyzowanych DPBA) otrzymanych z komórek odpowiednich linii po godzinnej inkubacji z flawonoidami. W tabeli podano wartości intensywności fluorescencji lizatów zmierzonych za pomocą jednego z pięciu zestawów filtrów wzbudzenia i emisji. Numer zestawu filtrów zastosowany dla danego flawonoidu podano w indeksie górnym po nazwie związku: 1) Ex = 405 ± 8 nm, Em = 510 ± 10 nm; 2) Ex = 405 ± 8 nm, Em = 535 ± 38 nm; 3) Ex = 485 ± 14 nm, Em = 535 ± 38 nm; 4) Ex = 485 ± 14 nm, Em = 555 ± 38 nm; 5) Ex = 485 ± 14 nm, Em = 579 ± 25 nm. Flawonoidy zaklasyfikowano do różnych grup oznaczonych w tabeli kolorami. Związki które były akumulowane w komórkach MDCK-II zaznaczono na kolor niebieski. Flawonoidy które nie akumulowały się w komórkach zaznaczono na kolor pomarańczowy. Grupę związków akumulowanych przez komórki podzielono dodatkowo na dwie grupy. Związki będące substratami białka ABCG2 oznaczono na kolor zielony. Flawonoidy, dla których nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami zaznaczono na żółto. Wartości intensywności fluorescencji przedstawiono jako średnia ± średni błąd średniej, n = 6, p < 0.05.

Numer flawonoidu	Nazwa związku	Intensywność fluorescencji lizatu z komórek MDCK-II [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]	Intensywność fluorescencji lizatu z komórek MDCK-II/BCRP [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]	Różnica w intensywności fluorescencji lizatu związana z obecnością białka ABCG2 [jednostki fluorescencji x10 <sup>4</sup> ]
F234	Hydroxygenkwanin <sup>3)</sup>	1321.7 ± 19.7	778.6 ± 2.5	543.1 ± 19.9
F48	Fisetin <sup>5)</sup>	587.9 ± 9.8	266.0 ± 14.4	321.9 ± 17.5
F165	Robinetin <sup>3)</sup>	761.1 ± 16.7	445.8 ± 16.7	315.3 ± 23.6
F187	Orobol <sup>3)</sup>	502.3 ± 4.2	269.7 ± 4.5	232.6 ± 6.1
F113	Kaempferide <sup>3)</sup>	382.1 ± 2.5	277.3 ± 3.6	104.8 ± 4.4
F192	Noricaritin <sup>3)</sup>	616.6 ± 3.6	512.9 ± 12.4	103.7 ± 12.9
F250	Galangin <sup>3)</sup>	327.8 ± 2.1	236.4 ± 6.9	91.4 ± 7.2
F190	Norwogonin <sup>3)</sup>	249.1 ± 1.3	171.0 ± 3.0	78.0 ± 3.3
F167	Rhamnocitrin <sup>3)</sup>	249.9 ± 1.1	173.6 ± 0.4	76.3 ± 1.2
F197	Moslosooflavone <sup>3)</sup>	250.0 ± 2.3	175.8 ± 5.9	74.2 ± 6.3
F49	Myricetin <sup>3)</sup>	108.7 ± 4.6	45.5 ± 1.8	63.2 ± 4.9
F282	Dehydrotoxicarol <sup>1)</sup>	227.0 ± 6.3	180.0 ± 10.7	47.0 ± 12.5
F69	Kaempferol <sup>3)</sup>	172.4 ± 3.6	126.8 ± 4.6	45.7 ± 5.9
F246	Genkwanin <sup>1)</sup>	101.4 ± 5.5	57.9 ± 6.0	43.5 ± 8.1
F131	Viscidulin I <sup>3)</sup>	113.9 ± 6.6	82.1 ± 5.5	31.8 ± 8.6
F154	Scillascillin <sup>2)</sup>	50.8 ± 0.5	29.6 ± 1.4	21.3 ± 1.5
F223	Isowighteone <sup>3)</sup>	80.9 ± 1.6	62.9 ± 3.3	18.1 ± 3.7
F142	Taxifolin <sup>3)</sup>	15.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	11.1 ± 0.2
F181	Pedalitin <sup>3)</sup>	19.0 ± 0.2	8.5 ± 0.3	10.5 ± 0.4
F143	Tamarixetin <sup>3)</sup>	19.1 ± 0.3	8.7 ± 0.2	10.4 ± 0.3
F284	Cyclomorusin <sup>3)</sup>	22.3 ± 2.6	12.4 ± 2.0	9.9 ± 3.1
F193	Noreugenin <sup>2)</sup>	14.8 ± 1.1	8.0 ± 0.5	6.8 ± 1.2
F147	Steppogenin <sup>3)</sup>	7.8 ± 0.1	2.1 ± 0.2	5.7 ± 0.2
F300	Capillarisin <sup>3)</sup>	7.1 ± 0.4	1.7 ± 0.4	5.4 ± 0.6
F216	Kumatakenin <sup>3)</sup>	19.0 ± 0.2	13.6 ± 0.6	5.4 ± 0.6
F277	Desmethoxycentaureidin <sup>3)</sup>	18.2 ± 0.4	13.0 ± 1.3	5.3 ± 1.3
F145	Syzalterin <sup>3)</sup>	7.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	5.2 ± 0.2
F168	Quercetin 3,4'-dimethyl ether <sup>3)</sup>	13.5 ± 0.2	8.4 ± 0.1	5.1 ± 0.2

F189	Ombuin <sup>3)</sup>	15.8 ± 0.3	10.8 ± 0.4	5.0 ± 0.6
F275	Dihydromorin <sup>3)</sup>	6.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	4.9 ± 0.2
F1	Isorhamnetin <sup>5)</sup>	6.2 ± 0.3	1.7 ± 0.1	4.5 ± 0.3
F10	Silibinin A <sup>2)</sup>	10.2 ± 0.1	6.0 ± 0.2	4.2 ± 0.3
F220	Jaceosidin <sup>3)</sup>	15.8 ± 0.2	11.9 ± 0.6	3.9 ± 0.6
F130	Viscidulin II <sup>3)</sup>	10.5 ± 0.2	7.1 ± 0.2	3.4 ± 0.3
F258	Eucalyptin <sup>3)</sup>	14.9 ± 0.1	12.0 ± 0.4	2.8 ± 0.4
F126	Wighteone <sup>2)</sup>	10.0 ± 0.3	7.2 ± 0.5	2.8 ± 0.6
F133	Tricin <sup>3)</sup>	5.9 ± 0.3	3.8 ± 0.1	2.1 ± 0.3
F299	Carpachromene <sup>1)</sup>	6.2 ± 0.5	4.6 ± 0.1	1.6 ± 0.5
F230	Isoderrone <sup>1)</sup>	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
F225	Isothymonin <sup>3)</sup>	271.4 ± 10.7	254.3 ± 1.4	17.1 ± 10.8
F302	Brousoflavonol F <sup>1)</sup>	56.8 ± 7.6	43.4 ± 4.7	13.4 ± 9.0
F156	Sappanone A <sup>2)</sup>	57.6 ± 4.9	46.2 ± 6.6	11.4 ± 8.2
F209	Kuwanon E <sup>2)</sup>	40.7 ± 2.9	29.7 ± 3.3	11.0 ± 4.4
F148	Sophoraflavanone G <sup>2)</sup>	17.8 ± 2.6	11.2 ± 1.6	6.6 ± 3.0
F233	Icaritin <sup>3)</sup>	246.1 ± 1.7	241.1 ± 4.0	5.0 ± 4.3
F160	Sanggenol A <sup>2)</sup>	29.0 ± 1.5	24.1 ± 1.1	5.0 ± 1.8
F164	Robtin <sup>3)</sup>	8.2 ± 0.1	4.3 ± 7.7	3.9 ± 7.7
F294	Centaureidin <sup>1)</sup>	67.4 ± 2.0	65.0 ± 0.4	2.4 ± 2.0
F278	Derrone <sup>1)</sup>	3.7 ± 0.1	3.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3
F219	Kaempferol 3,4,7-triacetate <sup>3)</sup>	0.8 ± 0.3	3.4 ± 2.2	-2.6 ± 2.3
F146	Sulfuretin <sup>2)</sup>	14.9 ± 3.2	23.9 ± 7.7	-9.0 ± 8.4
F257	Eupatilin <sup>4)</sup>	1.6 ± 1.2	0.3 ± 0.4	1.3 ± 1.3
F255	Eupatorin <sup>1)</sup>	1.4 ± 1.0	0.5 ± 0.2	0.9 ± 1.0
F247	Gancaonin M <sup>1)</sup>	1.2 ± 1.1	0.6 ± 0.4	0.6 ± 1.2
F195	Naringenin-4',7-diacetate <sup>3)</sup>	0.9 ± 0.8	0.0 ± 0.3	0.9 ± 0.8
F139	Tetrahydroamentoflavone <sup>2)</sup>	0.8 ± 0.5	-0.3 ± 0.3	1.1 ± 0.6
F155	Sciadopitysin <sup>1)</sup>	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.4
F308	beta-Rhamnocitrin <sup>4)</sup>	0.5 ± 0.3	-0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.3
F218	Kaempferol 5-methyl ether <sup>3)</sup>	0.4 ± 0.3	2.4 ± 2.0	-2.0 ± 2.0
F5	Glabranin <sup>4)</sup>	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.6	-0.1 ± 0.6

Podobnie jak w pierwszym eksperymencie flawonoidy zaklasyfikowano do kilku grup. Związki, które nie są akumulowane w komórkach zaznaczono w tabeli na kolor pomarańczowy. Pozostałe związki, czyli te które są w stanie przenikać do komórek MDCK-II, przyporządkowano do dwóch grup: związków będących substratami białka ABCG2 (oznaczone w tabeli na zielono) oraz związków, które nie gromadzą się w komórkach MDCK-II w istotnie większej ilości, niż w komórkach MDCK-II/BCRP (oznaczone w tabeli na żółto).

Wśród 60 flawonoidów testowanych w tym doświadczeniu 51 przenikało przez błony komórkowe i akumulowało się w komórkach. Pozostałe 9 flawonoidów znajduje się również wśród 13 związków zaklasyfikowanych do analogicznej grupy w pierwszym doświadczeniu (z użyciem Ko143), wskazując na spójność wyników uzyskiwanych tą metodą w dwóch niezależnych seriach doświadczeń. Spośród 51 flawonoidów, które wnikały do komórek

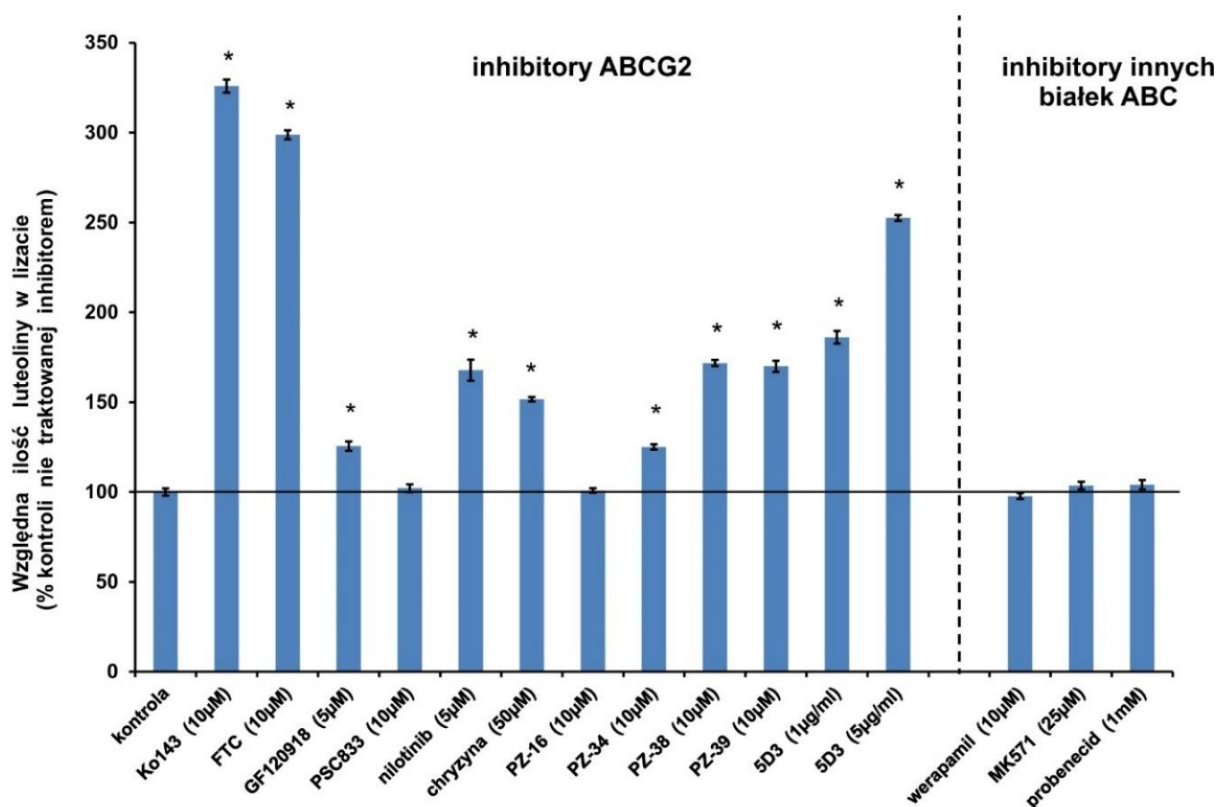


w drugim doświadczeniu, 39 można uważać za substraty białka ABCG2. Gromadzą się one w komórkach bez ekspresji transportera (MDCK-II) w większej ilości, niż w komórkach zawierających ludzkie ABCG2 (MDCK-II/BCRP). Tylko 12 związków z 60 przetestowanych w ten sposób nie było substratami ABCG2.

Pomimo tego, że w pierwszym doświadczeniu wykorzystano 86 związków, a w drugim 60, wyniki obu doświadczeń można ze sobą porównać, ponieważ mniejsza pula związków wykorzystana w drugim doświadczeniu została wybrana losowo z większej puli zastosowanej w pierwszym doświadczeniu (na wybór nie miały wpływu wyniki pierwszego doświadczenia oraz właściwości fizykochemiczne związków). Porównując oba doświadczenia można zauważyć, że procent związków zaklasyfikowanych jako substraty ABCG2 wśród wszystkich związków wnikających do komórek (ok. 48% w pierwszym doświadczeniu i ok. 76% w drugim doświadczeniu) jest wyższy w przypadku doświadczenia, w którym aktywność białka ABCG2 nie uzależniano od skuteczności inhibicji za pomocą Ko143. Potwierdza to przypuszczenie, że niektóre flawonoidy są substratami transportera o na tyle wysokim powinowactwie, że zahamowanie aktywności białka ABCG2 za pomocą inhibitora jest dla nich w warunkach eksperymentu nieskuteczne. Do tej grupy (żółte w tabeli 4, ale zielone w tabeli 5) można zaliczyć aż 22 związki, między innymi takie jak silibinin A, kempferol, noreugenin, eukaliptyna czy eter 3,4'-dimetylowy kwercetyny. Są to związki, które prawdopodobnie mogą wydajnie konkurować o miejsce wiązania z innymi substratami ABCG2, będąc w takich reakcjach transportu silnymi inhibitorami kompetycyjnymi.

#### **4.1.4. Testy przesiewowe inhibitorów**

Stosując luteolinę jako nowy dobry substrat modelowy białka ABCG2 o umiarkowanym powinowactwie, ale wysokiej szybkości transportu, zmierzono, jaki wpływ na aktywność tego białka mają różne inhibitory specyficzne względem ABCG2 oraz innych białek z rodziny ABC. Zastosowano zoptymalizowaną technikę pomiarów fluorescencyjnych w lizatach przygotowanych w płytce 96-dołkowej. Komórki linii MDCK-II/BCRP poddano działaniu określonego stężenia danego inhibitora na 30 minut przed godziną inkubacją z 20  $\mu$ M luteoliną w normalnych warunkach hodowli. Następnie ilość zgromadzonej luteoliny oznaczano fluorescencyjnie w lizatach komórkowych po derywatywacji za pomocą DPBA. Porównywano ilość luteoliny, która akumuluje się w komórkach w obecności inhibitora, z kontrolą nietraktowaną inhibitorem. Dane przedstawiono w procentach i zestawiono na rycinie 44.



**Rycina 44.** Porównanie aktywności transportowej białka ABCG2 względem luteoliny w obecności wybranych inhibitorów białka ABCG2 oraz trzech inhibitorów innych ludzkich transporterów z rodziny ABC. Komórki MDCK-II/BCRP traktowano danym inhibitorem przez 30 min, a następnie inkubowano w obecności inhibitora z 20 µM luteoliną przez godzinę. Z komórek przygotowano lizaty komórkowe derywatywizowane DPBA i zmierzono ich fluorescencję. Intensywność fluorescencji przedstawiono w procentach względem intensywności fluorescencji lizatów z komórek nie traktowanych inhibitorem (kontrola). Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 6, \* p < 0,05.

Wśród badanych inhibitorów najwyższą aktywność wykazują dwa najczęściej stosowane drobnocząsteczkowe inhibitory białka ABCG2: FTC oraz Ko143. Bardzo silną inhibicję uzyskano również po zastosowaniu przeciwciała monoklonalnego 5D3. Przeciwciało 5D3 wiąże się do epitopu na ABCG2 znajdującego się po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej komórki, blokując jednocześnie transporter w konformacji otwartej do wnętrza. Uniemożliwia to przejście białka w kolejne konformacje, co jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania transportera. Jak można zauważyć, przy wyższym stężeniu podanego przeciwciała (5 µg/ml) efekt inhibitorowy jest wyższy, co wskazuje na jedynie częściowe związanie się przeciwciała do transportera przy niższym stężeniu (1 µg/ml) w ciągu 30 min preinkubacji. Spośród innych związków dobrymi inhibitorami są:

- GF120918, inhibitor z którym wiązano duże nadzieje terapeutyczne przy przełamywaniu oporności wielolekowej nowotworów, ponieważ hamuje aktywność transportową zarówno białka ABCG2, jak i białka ABCB1,
- nilotinib, lek z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych stosowany m.in. w terapii przewlekłej białaczki szpikowej,

- chryzyna, inny flawonoidowy substrat o wysokim powinowactwie do ABCG2 (jak wykazano w doświadczeniu wysokoprzepustowym w niniejszej pracy, patrz podrozdział 4.1.7.), który stanowi względem luteoliny inhibitor kompetycyjny.

Porównano również aktywność inhibitorową czterech związków z serii PZ. Związki PZ-38 i PZ-39 to substancje określane jako inhibitory dynamiczne białka ABCG2. Wykazują one w stosunku do tego transportera dwojaki efekt modulatorowy: przy krótkotrwałej ekspozycji bezpośrednio hamują aktywność białka (potwierdzone tutaj przy akumulacji luteoliny), a przy dłuższej ekspozycji przyspieszają degradację tego transportera. W przypadku luteoliny jako substratu, przy krótkiej ekspozycji zastosowanej tutaj, inny związek z tej grupy, PZ-34, jest słabym inhibitorem, a PZ-16 (opisywany jako inhibitor statyczny) w tych warunkach zupełnie nie hamuje aktywności transportera. Aktywności transportowej białka ABCG2 względem luteoliny nie obniża również PSC833, związek który jest inhibitorem białka ABCG2 jak i białka ABCB1.

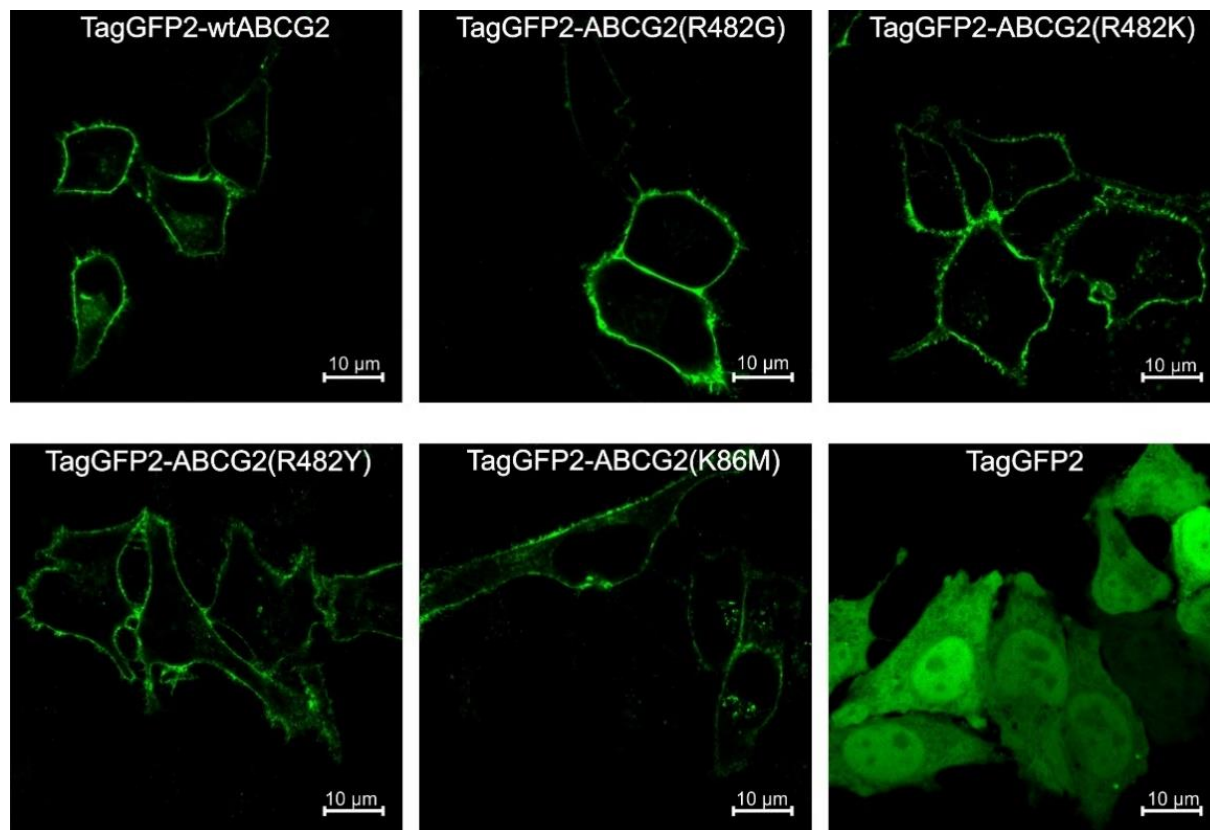
Aby sprawdzić, czy zastosowany test aktywności transportowej jest specyficzny w stosunku do białka ABCG2, przetestowano również trzy powszechnie stosowane inhibitory innych ludzkich transporterów ABC ważnych w zjawisku oporności wielolekowej. Zarówno werapamil, który hamuje aktywność białka ABCB1, jak i MK571 oraz probenecid, będące inhibitorami transporterów z podrodziny ABCC, nie powodują istotnego zwiększenia ilości luteoliny akumulowanej w komórkach MDCK-II/BCRP.

#### **4.1.5. Badanie wpływu mutacji punktowych białka ABCG2 na jego aktywność**

Ponownie stosując luteolinę jako substrat zbadano aktywność transportową białka ABCG2 niosącego znane z literatury mutacje punktowe. Jako model komórkowy zastosowano w tym wypadku linię HeLa, ponieważ komórki te ulegają bardzo wydajnej przejściowej transfekcji chemicznej zastosowanej w tym doświadczeniu. Wykonując mutagenezę ukierunkowaną plazmidu pcDNA6.2-TagGFP2-ABCG2 przygotowano cztery plazmidy pochodne niosące warianty sekwencji białka ABCG2 wyznakowanego fluorescencyjnie za pomocą TagGFP2. Wprowadzono trzy różne mutacje punktowe argininy w pozycji 482 białka (R482G, R482K, R482Y) lub mutację lizyny w pozycji 86 (K86M), znajdującej się w motywie Walkera A i kluczowej dla wiązania i hydrolizy ATP.

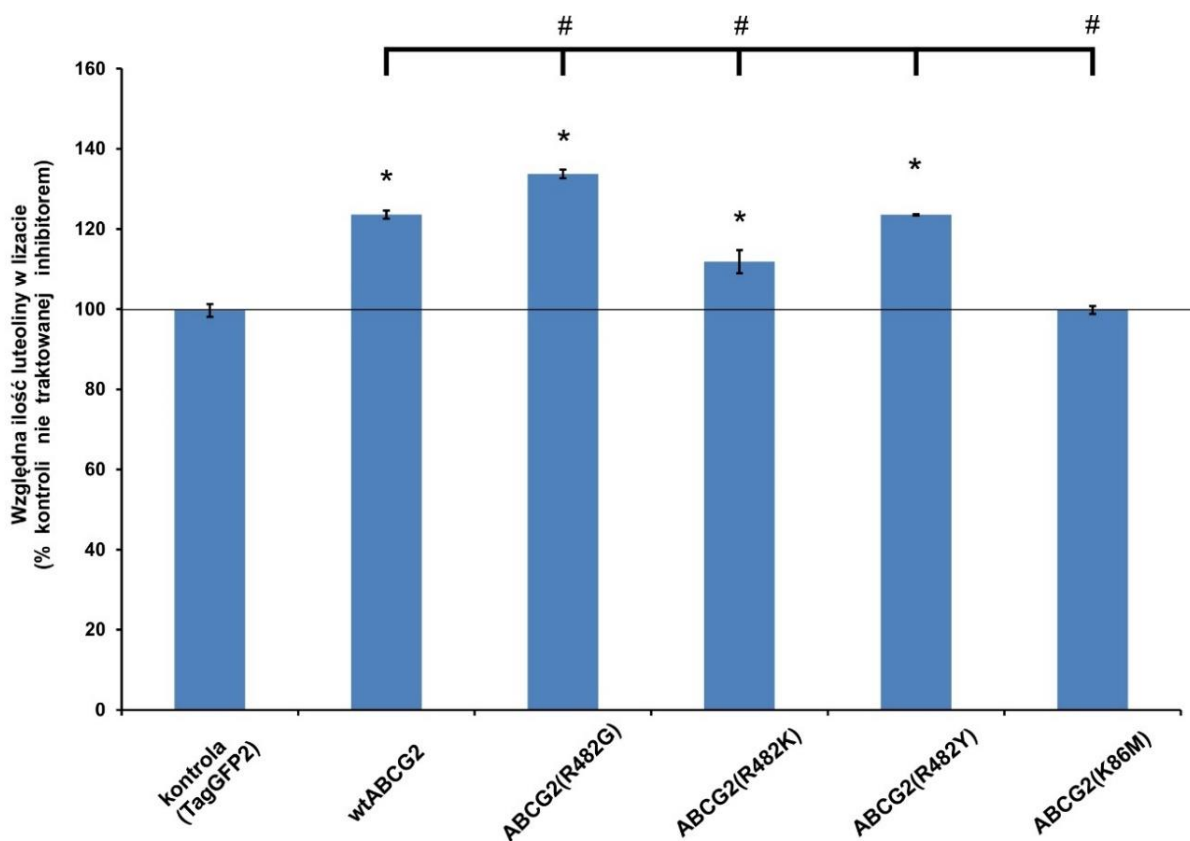
Komórki HeLa stransfekowano chemicznie za pomocą wszystkich przygotowanych plazmidów niosących gen białka ABCG2 (w tym gen białka o sekwencji referencyjnej wtABCG2). Jako kontrolę zastosowano komórki transfekowane za pomocą plazmidu pTagGFP2-N kodującego samo zielone białko fluoryzujące. Wydajność wszystkich transfekcji (oceniana po 24 h na podstawie obserwacji mikroskopowych) była podobna i wynosiła ok. 70%. Na rycinie 45

przedstawiono przykładowe obrazy stransfekowanych komórek. W przypadku wszystkich wariantów białka fuzyjnego TagGFP2-ABCG2 można zaobserwować porównywalny poziom ekspresji transportera, jak również jego prawidłową lokalizację (głównie w błonach plazmatycznych).



**Rycina 45.** Reprezentatywne obrazy mikroskopii konfokalnej komórek HeLa przejściowo transfekowanych wariantami białka ABCG2 w fuzji z białkiem zielonej fluorescencji TagGFP2 oraz komórek kontrolnych w których ekspresji ulega samo białko TagGFP2.

Transfekowane komórki wysiano na płytkę 96-dołkową i w niektórych dołkach aktywność transportera hamowano za pomocą 10  $\mu$ M Ko143. Następnie wszystkie komórki traktowano przez godzinę za pomocą 10  $\mu$ M luteoliny w obecności lub nieobecności inhibitora. Po tym czasie z komórek przygotowano lizaty, przeprowadzając równocześnie flawonoid w jego fluorescencyjną pochodną za pomocą DPBA. Porównano ilość luteoliny, która akumuluje się w komórkach w obecności inhibitora, z komórkami nietraktowanymi inhibitorem. Dane przedstawiono w procentach i zestawiono na rycinie 46.



**Rycina 46.** Porównanie aktywności transportowej różnych mutantów punktowych białka. Komórki HeLa o przejściowej ekspresji wskazanego wariantu białka ABCG2 w fuzji z białkiem TagGFP2 traktowano za pomocą 10  $\mu$ M luteoliny przez godzinę w obecności i nieobecności 10  $\mu$ M Ko143. Z komórek przygotowano lizaty komórkowe derywatyzowane DPBA i zmierzono ich fluorescencję. Intensywność fluorescencji przedstawiono w procentach względem intensywności fluorescencji lizatów z komórek nie traktowanych inhibitorem. Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki HeLa o przejściowej ekspresji białka TagGFP2. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 5$ . Istotność różnic w porównaniu do kontroli negatywnej oznaczono \* ( $p < 0,05$ ), istotność różnic w porównaniu z białkiem o sekwencji referencyjnej wtABCG2 oznaczono # ( $p < 0,05$ ).

Komórki HeLa transfekowane przejściowo za pomocą plazmidu niosącego gen zielonego białka fluoryzującego TagGFP2, stanowiące kontrolę negatywną doświadczenia, nie wykazywały zależnych od obecności inhibitora białka ABCG2 różnic w ilości zakumulowanego flawonoidu. Potwierdza to, że w komórkach HeLa użytych do eksperymentu nie ulega ekspresji znacząca ilość białka ABCG2. Analogicznie komórki, w których znajdowało się białko ABCG2 zawierające mutację uniemożliwiającą aktywność (K86M), akumulowały luteolinę w takiej samej ilości w nieobecności i obecności Ko143. Pozostałe warianty białka wykazywały zróżnicowaną aktywność. Komórki zawierające białko wtABCG2 (arginina w pozycji 482) akumulowały o około 25% więcej flawonoidu po traktowaniu inhibitorem. Porównywalną aktywność wykazywał mutant tyrozynowy (R482Y). Białko o mutacji R482G, charakteryzujące się zwiększoną podstawową oraz stymulowaną substratami aktywnością ATPazową oraz będące lepszym transporterem dla niektórych substratów, wykazywało większą aktywność niż białko wtABCG2 również dla luteoliny. Mutant ABCG2(R482Y) zawierający w miejscu argininy

w pozycji 482 inny zasadowy aminokwas, lizynę, wykazywał znacząco mniejszą aktywność w stosunku do luteoliny. Powyższe wyniki dowodzą, że również w przypadku flawonoidów (tu na przykładzie transportu luteoliny) arginina 482, obecna w trzeciej helisie transbłonowej białka ABCG2, pełni kluczową rolę w specyficzności substratowej.

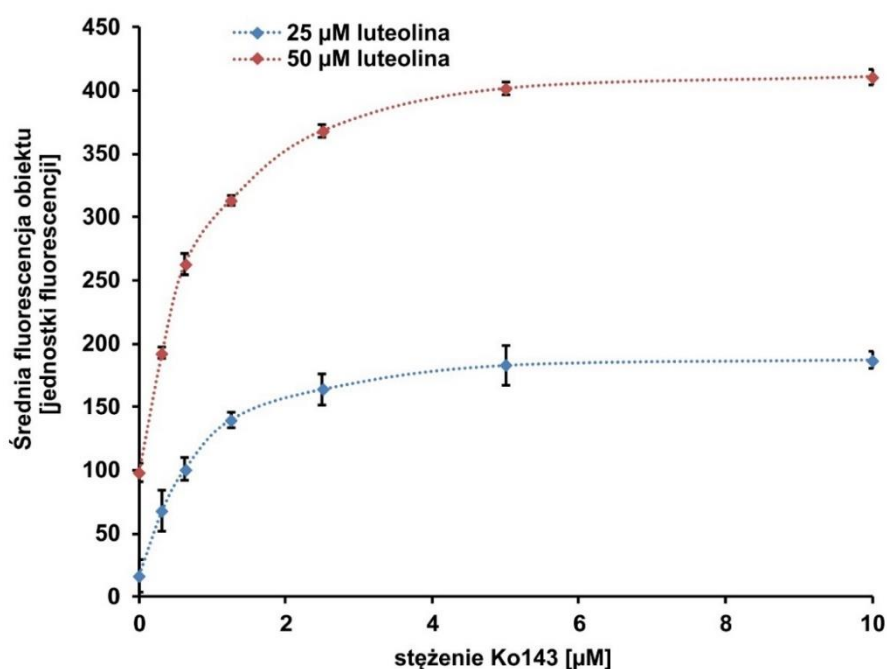
#### **4.1.6. Badanie kinetyki inhibicji transportu luteoliny przez Ko143**

Aby sprawdzić, czy pomiary stężenia na poziomie pojedynczych komórek umożliwiają wyciągnięcie wniosków dotyczących parametrów kinetycznych białka ABCG2, przeprowadzono badanie kinetyki inhibicji transportu luteoliny przez Ko143 za pomocą pomiarów mikroskopowych, a otrzymane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi na podstawie analizy przeprowadzonej na lizatach komórkowych.

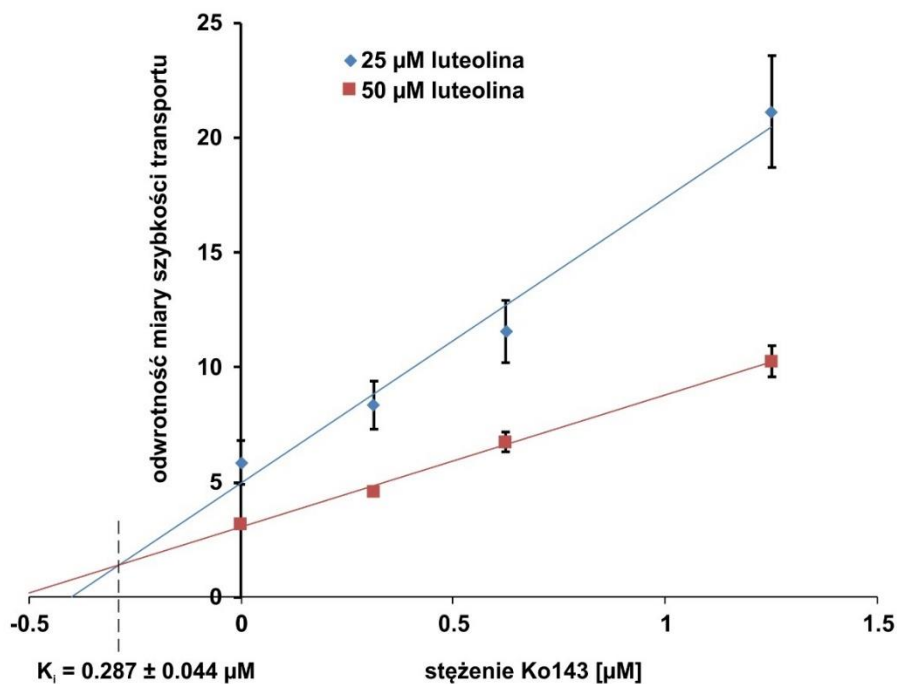
Do wysokoprzepustowego pomiaru fluorescencji związku luteolina+DPBA wewnątrz pojedynczych komórek wykorzystano zautomatyzowany mikroskop fluorescencyjny wyposażony w oprogramowanie umożliwiające przeanalizowanie serii zdjęć komórek hodowanych na płytce wielodołkowej i pomiar średniej fluorescencji wybranych obiektów (patrz podrozdział 3.2.14.1.). Na płytce 96-dołkowej przeprowadzono doświadczenie, w którym komórki MDCK-II/BCRP inkubowano przez 30 min z różnymi stężeniami Ko143, a następnie komórki inkubowano przez godzinę w obecności lub nieobecności inhibitora z 25  $\mu\text{M}$  lub 50  $\mu\text{M}$  luteoliną. Po ustaleniu się stanu równowagi flawonoid poddano reakcji derywatyzacji za pomocą DPBA. Ze względu na bardzo wysoką jasność fluorescencji produktu luteolina+DPBA oraz na jego równomierne rozmieszczenie w komórkach, mikroskopowe zdjęcia komórek umożliwiły jednoczesne: ustawienie płaszczyzny ostrości, identyfikację obiektów (zaznaczenie pojedynczych komórek) oraz analizę ilościową (średniej intensywności fluorescencji obiektów) przy zastosowaniu tylko jednego kanału fluorescencji (pojedynczego zestawu filtrów wzbudzenia i emisji).

Na rycinie 47 przedstawiono wykresy zależności średniej intensywności fluorescencji w obiektach (komórkach) od zastosowanego stężenia inhibitora dla komórek traktowanych różnymi stężeniami luteoliny. Przy obu stężeniach substratu zaobserwowano kinetykę saturacyjną, zgodną z kinetyką oddziaływania enzym-substrat i enzym-inhibitor. Przy najwyższych stężeniach Ko143 dla obu stężeń flawonoidu osiągnęte jest maksimum inhibicji. Ponieważ z uprzednich doświadczeń wiadomo, że powinowactwo Ko143 do białka ABCG2 jest znacznie wyższe niż powinowactwo luteoliny, można założyć, że przy najwyższym zastosowanym stężeniu inhibitora (10  $\mu\text{M}$ ) aktywność transportera względem luteoliny jest nieomal całkowicie zablokowana, a szybkość transportu jest wtedy bliska zeru. Zgodnie z tym założeniem przy danym stężeniu substratu różnice między średnimi wartościami fluorescencji w komórkach zmierzonymi w obecności różnych stężeń inhibitora a wartością fluorescencji

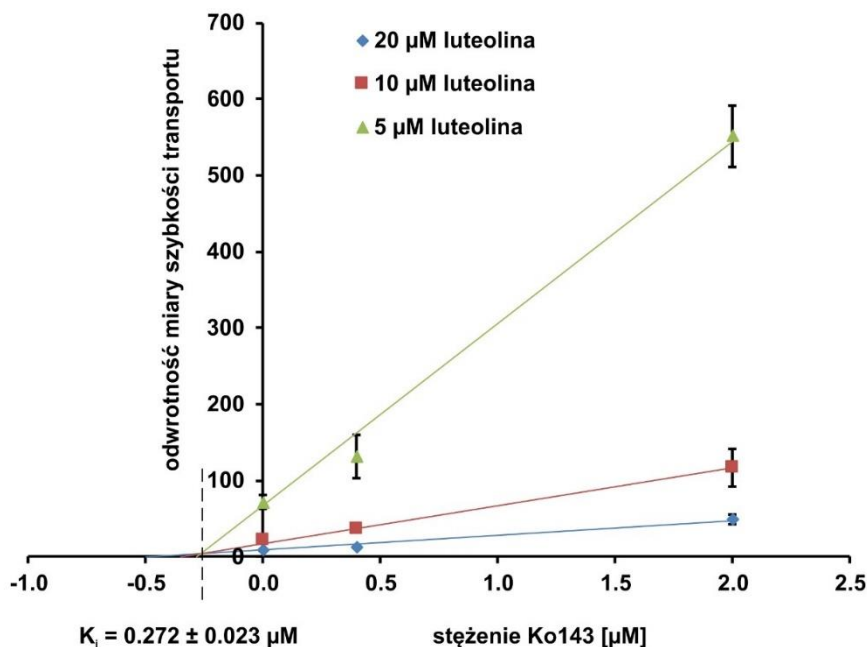
zmierzoną przy maksymalnym stężeniu Ko143 można uznać za miarę szybkości transportu luteoliny przy danym stężeniu inhibitora. Dysponując uzyskanymi w ten sposób wartościami, reprezentującymi szybkość transportu w zależności od stężenia inhibitora (Ko143) przy dwóch różnych stężeniach substratu, sporządzono wykres Dixona (rycina 48). Proste przecinają się powyżej osi odciętych, co jest zgodne z zależnością oczekiwaną dla inhibitora kompetycyjnego, jakim jest Ko143. Z analizy matematycznej równania wiążącego szybkość reakcji enzymatycznej ze stężeniem substratu oraz stężeniem inhibitora wynika, że moduł wartości odciętej punktu przecięcia prostych uzyskanych dla różnych stężeń substratu jest równy eksperymentalnej stałej inhibicji ( $K_i$ ).  $K_i$  wyznaczona w ten sposób dla Ko143 wynosi  $287 \pm 44$  nM. Aby sprawdzić, jaką wartość eksperymentalnej stałej inhibicji można wyznaczyć stosując inną metodę pomiaru, przeprowadzono analogiczne doświadczenie dla trzech różnych stężeń luteoliny (5, 10 i 20  $\mu\text{M}$ ) i podobnego zakresu stężeń inhibitora, stosując metodę pomiaru średniej wewnątrzkomórkowej ilości luteoliny w lizatach komórkowych przygotowywanych *in situ*. Wykres Dixona wraz z krzywymi regresji liniowej otrzymany na podstawie tego doświadczenia przedstawiono na rycinie 49.



**Rycina 47.** Wykres zależności intensywności sygnału fluorescencyjnego produktu luteolina+DPBA w komórkach pojedynczych komórkach MDCK-II/BCRP w obecności różnego stężenia Ko143. Komórki inkubowano z podanym stężeniem inhibitora przez 30 min, a następnie również w obecności tego samego stężenia Ko143 komórki inkubowano z luteoliną o stężeniu 25  $\mu\text{M}$  lub 50  $\mu\text{M}$ . Po godzinie inkubacji z flawonoidem sygnał fluorescencyjny wywoływano za pomocą DPBA w PBS i średnią intensywność fluorescencji komórek mierzono na pomocą zautomatyzowanego mikroskopu fluorescencyjnego. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 4$ .



**Rycina 48.** Wykres Dixona sporządzony dla wartości uzyskanych na podstawie pomiarów mikroskopowych przedstawionych na rycinie 47. Za wartość miary szybkości transportu przy określonym stężeniu Ko143 uznawano różnicę między średnią wartością intensywności komórek traktowanych 10 µM Ko143 i traktowanych określonym stężeniem inhibitora. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 4.



**Rycina 49.** Wykres Dixona sporządzony dla wartości uzyskanych na podstawie pomiarów fluorescencji lizatów komórkowych z komórek MDCK-II/BCRP traktowanych wskazanym stężeniem luteoliny w obecności różnych stężeń Ko143. Za wartość miary szybkości transportu przy określonym stężeniu Ko143 uznawano różnicę między średnią wartością intensywności lizatów z komórek traktowanych 10 µM Ko143 i z komórek traktowanych określonym stężeniem inhibitora. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 6.



Podobnie jak w przypadku pomiaru mikroskopowego proste przecinają się powyżej osi odciętych. Wyliczona wartość eksperymentalnej stałej inhibicji ( $K_i$ ) dla Ko143 wynosi w tym przypadku  $271 \pm 23$  nM. Wartość ta nie różni się od tej otrzymanej w poprzednim doświadczeniu. Zbieżność obu wyników uzyskanych w niezależnych doświadczeniach wykonanych za pomocą dwóch różnych technik pomiaru (pomiar w układzie heterogennym i homogennym) wskazuje na to, że obie metody równie dobrze pozwalają na badanie kinetyki transportu białka ABCG2 z zastosowaniem flawonoidów jako substratów.

#### **4.1.7. Poszukiwanie substratów ABCG2 metodą wysokoprzepustową**

Zaletą metody pomiaru fluorescencji na poziomie pojedynczej komórki jest to, że umożliwia ona na wygenerowanie bardzo dużej ilości danych z pojedynczego doświadczenia przeprowadzonego na niewielkiej liczbie komórek. Wykorzystując tą zaletę przeprowadzono eksperyment, w którym porównywano ilości flawonoidów akumulowanych w komórkach MDCK-II/BCRP i MDCK-II. W tym eksperymencie zbadano wszystkie 300 flawonoidów pochodzenia naturalnego, uzyskanych z biblioteki firmy Chemfaces. Komórki inkubowano na płytkach 384-dołkowych przez godzinę w obecności czterech różnych stężeń flawonoidów (10, 20, 50 i 100  $\mu$ M). Po tym czasie komórki traktowano DPBA w PBS, a następnie utrwalano za pomocą formaldehydu. Utrwalenie komórek było w tym wypadku konieczne, aby umożliwić długotrwały proces obrazowania za pomocą zautomatyzowanego mikroskopu fluorescencyjnego dla tak wielu punktów pomiarowych. Komórkom wybarwiono dodatkowo jądra komórkowe (za pomocą Hoechst 33342), co umożliwiło identyfikację obiektów nawet w przypadku niskiej intensywności fluorescencji produktu flawonoid+DPBA. Na podstawie fluorescencji jąder komórkowych identyfikowano pojedyncze obiekty, a następnie w kanale fluorescencji flawonoid+DPBA (filtr ekscytacyjny  $485 \pm 15$  nm oraz filtr emisyjny  $525 \pm 20$  nm) określano intensywność fluorescencji w niewielkim obszarze otaczającym obiekty (fluorescencja w cytozolu komórek). Dla każdego stężenia substratu określano średnią intensywność fluorescencji w kanale flawonoid+DPBA w przypadku komórek MDCK-II i w przypadku komórek MDCK-II/BCRP. Różnicę między tymi wartościami traktowano jako miarę aktywności białka ABCG2 i otrzymane w ten sposób wyniki zestawiono w tabeli 6. W tabeli podano również wartości jasności emisji fluorescencji produktów flawonoid+DPBA w mierzonym zakresie wyznaczone na podstawie krzywych emisji fluorescencji (jak opisano w podrozdziale 3.2.11.1.).

Na zielono w tabeli 6 zaznaczono związki, które uznano za dobre substraty ABCG2. Biorąc pod uwagę wartości błędu pomiaru aktywności białka ABCG2 powyższą metodą uznano, że substratem dla ABCG2 jest związek, który przynajmniej przy niektórych stężeniach wykazuje miarę aktywności białka ABCG2 wyższą niż 10. Spośród 300 związków przeanalizowanych

w ten sposób 105 (35%) spełniało powyższe kryterium. Bardziej dokładna analiza i porównanie aktywności w zależności od stężenia związku wskazuje, że w obrębie substratów białka ABCG2 można wydzielić kilka różnych klas. Jedną grupę stanowią związki, które tworzą z DPBA jasne fluorescencyjne pochodne i dla których aktywność ABCG2 rośnie wyraźnie wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia. Do tej grupy należą między innymi takie związki jak kwercetyna, fisetyna, moryna, eriodiktiol, kempferol, galangina, fustyna, dihydrorobinetyna, dalbergioidyna i apigenina. Ciekawą podgrupą tych związków są flawonoidy, które tworzą z DPBA pochodne o bardzo wysokiej intensywności fluorescencji, a na dodatek akumulują się w komórkach na tyle wydajnie, że przy wyższych stężeniach średnia intensywność komórek MDCK-II i MDCK-II/BCRP nie różni się (co przekłada się na pozornie niską miarę aktywności białka ABCG2), ponieważ osiągnięty został limit liniowości sygnału kamery i średnia intensywność pikseli cytoplazmy tych komórek nie odpowiada już wewnątrzkomórkowym stężeniom flawonoidów. W tej specyficznej grupie bardzo dobrych substratów ABCG2 znajdują się na przykład luteolina, orobol, steppogenina, hydroksygenkwanina i 8-demetylosideroksylina. Co ciekawe, wymieniona w tej grupie hydroksygenkwanina jest prostą metoksylową pochodną luteoliny (w pozycji 7). Jej pochodna flawonoid+DPBA ma porównywalną z luteoliną intensywność fluorescencji, a ze wszystkich przetestowanych flawonoidów białko ABCG2 wykazuje względem niej najwyższą aktywność już przy 20  $\mu\text{M}$  stężeniu flawonoidu (przy wyższych stężeniach pozorna mierzona aktywność była niższa ze względu na opisany powyżej problem z limitem liniowości sygnału kamery). Jest ona zatem jeszcze lepszym modelowym substratem białka ABCG2 niż luteolina. Należy jednak pamiętać, że ze względu na bardzo zróżnicowaną intensywność fluorescencji produktów flawonoid+DPBA, przedstawionych w tabeli 6 wartości miary aktywności białka ABCG2 nie można porównywać bezpośrednio w przypadku, kiedy produkty znacząco się różnią spektralnie. Widoczna jest na przykład grupa bardzo dobrych substratów ABCG2, którym przypisano relatywnie niewielkie miary aktywności ABCG2, ale biorąc pod uwagę niską intensywność fluorescencji ich produktu flawonoid+DPBA można uznać, że i tak są transportowane bardzo wydajnie. Do tej grupy związków należą na przykład akacetyna, izosakuranetyna, hydrangenol, dihydroobowatyna, cykloheterofilina i artoheterofilina B. Pomimo tego, że pochodne flawonoid+DPBA tych związków wykazują relatywnie niską fluorescencję, zastosowanie wysokoprzepustowego pomiaru z obiektywną oceną fluorescencji na poziomie pojedynczych komórek umożliwia nadal wiarygodne zaklasyfikowanie ich jako dobrych substratów ABCG2.

Osobną grupę substratów stanowią związki, dla których pomimo znacznej intensywności fluorescencji pochodnej flawonoid+DPBA nie obserwuje się dużego wzrostu aktywności w zależności od ich stężenia. Są to najpewniej związki, względem których ABCG2 charakteryzuje niska wartość szybkości granicznej transportu. Mają one bardzo wysokie

powinowactwo do transportera, ale są transportowane względnie wolno, przez co mogą stanowić dobre inhibitory kompetycyjne przy transporcie innych substratów ABCG2. Do tej grupy związków należą na przykład kempferol, taksifolina, robinetyna, norwogonina, genkwanina, chryzyna i bilobetyna. Można zwrócić szczególną uwagę na dwa wymienione w tej grupie związki: kempferol oraz genkwaninę. Związki te różnią się jedną grupą hydroksylową w pozycji 3' pierścienia fenylowego (patrz rycina 16) od substratów, względem których ABCG2 wykazuje znacznie wyższą aktywność. W obu przypadkach flawonoid, który posiada dwie grupy hydroksylowe w pozycji 3' i 4' (czyli kwercetyna i hydroksygenkwanina) jest bardzo dobrym substratem transportowym dla ABCG2, a jego pochodna nie posiadająca grupy hydroksylowej w pozycji 3' (czyli odpowiednio kempferol i genkwanina) charakteryzuje się bardzo wysokim powinowactwem do ABCG2, ale nie jest transportowana wydajnie. Ciekawe wnioski dotyczące relacji struktura-aktywność można też wyciągnąć, porównując kempferol z jego inną bliską pochodną, kempferydem. Ta pochodna kempferolu posiadająca grupę metoksyłową w pozycji 4' jest transportowana znacznie lepiej niż sam kempferol. Oba związki tworzą podobnie jasny produkt flawonoid+DPBA i mają podobnie wysokie powinowactwo do białka ABCG2, ponieważ, jak wykazały doświadczenia przeprowadzone na lizatach (patrz tabela 4 i tabela 5), oba związki bardzo dobrze konkurują o miejsce wiązania z Ko143, czyli mają powinowactwo do enzymu porównywalne do tego inhibitora. Dowodzi to, że modyfikacja grupy hydroksylowej w pozycji 4' ma kluczowe znaczenie przy oddziaływaniu powyższych związków z kieszenią pierwszą transportera. Ponieważ kempferol, który posiada w tym miejscu niezmodyfikowaną grupę hydroksylową, jest transportowany bardzo powoli, można domniemać, że tworzy z aminokwasami białka ABCG2 w kieszeni pierwszej silne wiązanie wodorowe, które spowalnia przechodzenie transportera do kolejnych etapów cyklu transportu. Kempferyd, który posiada w miejscu 4' grupę metoksyłową, nie jest w stanie wytwarzać tego wiązania wodorowego, przez co jest transportowany znacznie bardziej wydajnie (wiąże się z porównywalnym powinowactwem, ale enzym ma względem niego dość wysoką szybkość graniczną).

Zidentyfikowano również wiele innych związków będących umiarkowanie dobrymi substratami ABCG2. Do tej grupy należą na przykład izoramnetyna, myricetyna, ramnocytryna i diosmetyna. Dodatkowo z pewnością niektóre z przetestowanych flawonoidów mogą być również transportowane przez białko ABCG2, ale ze względu na niską intensywność fluorescencji ich pochodnej flawonoid+DPBA nie można tego wykazać za pomocą tej techniki. Należy też zwrócić uwagę na to, że opisywana technika opiera się na pomiarach wysokoprzepustowych i charakteryzuje się znaczną niepewnością pomiaru typową dla takich technik. Pomimo ograniczeń, ta metoda poszukiwania umożliwiła szybkie zidentyfikowanie wielu nowych substratów białka ABCG2.

**Tabela 6.** Wyniki testu wysokoprzepustowego z wykorzystaniem zautomatyzowanego mikroskopu fluorescencyjnego dla 300 wybranych flawonoidów. Flawonoidy opisano kolejnymi numerami identyfikacyjnymi F oraz nazwami zwyczajowymi podanymi przez producenta. W tabeli podano miarę aktywności białka ABCG2 będącą różnicą między wartościami fluorescencji produktu flawonoid+DPBA w komórkach MDCK-II i w komórkach MDCK-II/BCRP. Na zielono zaznaczono substraty ABCG2. Podano wartość średnią  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 4$ . Dodatkowo w tabeli przedstawiono wartość oszacowanej intensywności fluorescencji wyliczoną na podstawie krzywych emisji fluorescencji jak opisano w podrozdziale 3.2.11.1.

F	Nazwa zwyczajowa	Miara aktywności białka ABCG2				Intensywność fluorescencji ( $\times 10^4$ )
		stężenie flawonoidu w medium				
		10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	
F1	Isorhamnetin	3 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1	18 $\pm$ 3	575
F2	Luteolin	372 $\pm$ 58	185 $\pm$ 28	-2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	1012
F4	Quercetin	47 $\pm$ 31	82 $\pm$ 17	182 $\pm$ 32	254 $\pm$ 51	951
F5	Glabranin	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	6 $\pm$ 4	46
F8	Kaempferol	17 $\pm$ 1	25 $\pm$ 6	27 $\pm$ 5	32 $\pm$ 9	993
F10	Silymarin	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 2	408
F45	Genistein	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 3	15
F46	Baicalein	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	-2 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	1
F47	Catechin	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3
F48	Fisetin	44 $\pm$ 9	825 $\pm$ 31	979 $\pm$ 91	1571 $\pm$ 157	1001
F49	Myricetin	10 $\pm$ 1	29 $\pm$ 3	43 $\pm$ 1	52 $\pm$ 1	843
F50	Naringenin	-1 $\pm$ 1	8 $\pm$ 4	2 $\pm$ 2	-11 $\pm$ 4	49
F66	Morin	15 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1	29 $\pm$ 7	84 $\pm$ 15	1008
F72	Acacetin	18 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3	47 $\pm$ 4	28
F94	Eriodictyol	11 $\pm$ 3	659 $\pm$ 48	840 $\pm$ 82	845 $\pm$ 118	190
F113	Kaempferide	96 $\pm$ 10	221 $\pm$ 12	298 $\pm$ 31	588 $\pm$ 42	912
F124	Yukovanol	0 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	2
F125	Wogonin	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 1	1
F126	Wighteone	-1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	133
F127	Warangalone	-1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	9
F128	Vitexicarpin	-2 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 1	7
F129	Viscidulin III	0 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 1	47
F130	Viscidulin II	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	440
F131	Viscidulin I	1 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	11 $\pm$ 8	18 $\pm$ 3	1268
F132	Velutin	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	9
F133	Tricin	-2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	450
F134	Thunberginol C	-2 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 4	0 $\pm$ 4	7 $\pm$ 4	31
F135	Theaflavin-3-gallate	-2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	23
F136	Theaflavin-3'-gallate	2 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	26
F137	Theaflavin 3,3'-di-O-gallate	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 1	4
F138	Theaflavin	0 $\pm$ 1	3 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	10

F139	Tetrahydroamentoflavone	0 ± 1	1 ± 2	-2 ± 1	2 ± 3	144
F140	Tectorigenin	-5 ± 2	-2 ± 1	-1 ± 1	-3 ± 1	2
F141	Tectochrysin	0 ± 1	-2 ± 1	-3 ± 1	2 ± 1	4
F142	Taxifolin	1 ± 1	30 ± 7	30 ± 6	25 ± 9	784
F143	Tamarixetin	-5 ± 4	6 ± 1	2 ± 1	0 ± 1	974
F144	Taiwanhomoflavone B	-1 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	12
F145	Syzalterin	-2 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	-1 ± 1	211
F146	Sulfuretin	-2 ± 1	1 ± 1	4 ± 1	6 ± 2	373
F147	Steppogenin	35 ± 10	65 ± 31	-8 ± 7	-1 ± 4	630
F148	Sophoraflavanone G	-2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	3 ± 5	1236
F149	Sophoraflavanone C	-2 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	3
F150	Skullcapflavone II	-2 ± 1	-2 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	7
F151	Skullcapflavone I	0 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	18
F152	Sideroxylin	-1 ± 1	-2 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	2
F153	Scutellarein	2 ± 2	-1 ± 1	-4 ± 2	4 ± 3	2
F154	Scillasillin	-1 ± 1	9 ± 2	15 ± 8	36 ± 19	319
F155	Sciadopitysin	-3 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	32
F156	Sappanone A	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	412
F157	Sanggenone D	0 ± 1	5 ± 1	0 ± 5	10 ± 1	22
F158	Sanggenone C	0 ± 1	5 ± 1	2 ± 7	11 ± 2	21
F159	Sanggenon N	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	2
F160	Sanggenol L	-2 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	4
F161	Sanggenol A	0 ± 1	1 ± 2	-1 ± 1	-2 ± 1	1301
F162	Salvigenin	1 ± 1	-1 ± 1	-2 ± 1	0 ± 1	20
F163	Sakuranetin	-1 ± 1	-1 ± 1	-5 ± 3	-2 ± 1	11
F164	Robtin	11 ± 1	24 ± 10	75 ± 12	133 ± 39	102
F165	Robinetin	10 ± 5	103 ± 18	104 ± 1	108 ± 7	967
F166	Rivularin	-1 ± 1	0 ± 1	1 ± 2	14 ± 10	46
F167	Rhamnocitrin	3 ± 1	21 ± 4	42 ± 6	62 ± 13	1302
F168	Quercetin 3,4'-dimethyl ether	0 ± 1	4 ± 2	2 ± 1	4 ± 2	438
F169	Putraflavone	-1 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	6 ± 1	13
F170	Prunetin	0 ± 1	3 ± 2	3 ± 1	-2 ± 3	3
F171	Prudomestin	1 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	1
F172	Procyanidin B2	0 ± 1	0 ± 1	-1 ± 1	1 ± 1	2
F173	Procyanidin B1	0 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	2
F174	Proanthocyanidins	1 ± 1	-2 ± 1	-2 ± 1	-5 ± 3	65
F175	Podocarpusflavone A	1 ± 1	1 ± 5	9 ± 1	11 ± 3	9
F176	Pinostrobin	-2 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	17 ± 11	3
F177	Pinocembrin acetate	-1 ± 1	-1 ± 1	-3 ± 3	2 ± 3	3
F178	Pinocembrin	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	3 ± 1	3
F179	Pinobanksin	0 ± 1	5 ± 2	2 ± 1	26 ± 7	42
F180	Penduletin	-2 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	29
F181	Pedalitin	-1 ± 1	5 ± 1	-2 ± 1	-1 ± 1	1034
F182	Pectolarigenin	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	10

F183	Padmatin	-2 ± 1	-1 ± 1	-2 ± 1	0 ± 1	2
F184	Pachypodol	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	-4 ± 3	52
F185	Osajin	-2 ± 1	-2 ± 1	-3 ± 1	1 ± 1	6
F186	Oroxilin A	0 ± 1	-7 ± 3	-22 ± 12	-37 ± 16	4
F187	Orobol	197 ± 24	134 ± 13	-12 ± 14	-2 ± 6	1256
F188	Onysilin	0 ± 1	2 ± 1	48 ± 17	85 ± 13	20
F189	Ombuin	3 ± 3	3 ± 1	1 ± 1	5 ± 1	418
F190	Norwogonin	10 ± 1	20 ± 3	26 ± 8	35 ± 10	1229
F191	Norkhellol	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	3 ± 1	2
F192	Noricaritin	6 ± 1	14 ± 2	26 ± 4	44 ± 6	651
F193	Noreugenin	-1 ± 1	3 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	2
F194	Noranhydroicaritin	1 ± 1	4 ± 5	2 ± 1	-11 ± 3	14
F195	Naringenin-4',7-diacetate	-2 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	404
F196	Mulberrin	-1 ± 1	2 ± 2	-2 ± 1	-7 ± 7	35
F197	Moslosooflavone	0 ± 1	13 ± 5	17 ± 11	31 ± 10	1302
F198	Morusinol	-1 ± 1	1 ± 1	3 ± 2	-2 ± 1	3
F199	Morusin	-1 ± 1	2 ± 2	0 ± 2	-2 ± 6	30
F200	Methylpogonin B	-1 ± 1	0 ± 1	1 ± 2	0 ± 2	2
F201	Methylpogonin A	-1 ± 1	-2 ± 1	-2 ± 1	1 ± 1	2
F202	Lysionotin	-2 ± 1	0 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	1
F203	Luteone	-3 ± 4	0 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	2
F204	Lupalbigenin	-2 ± 1	1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	5
F205	Limocitrin	-2 ± 1	-2 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	1
F206	Licoflavone C	-3 ± 1	23 ± 6	29 ± 14	50 ± 9	22
F207	Leachianone G	-1 ± 1	-1 ± 1	0 ± 2	-1 ± 1	8
F208	Leachianone A	-2 ± 1	0 ± 1	-2 ± 1	0 ± 1	4
F209	Kuwanon E	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 1	-4 ± 4	1306
F210	Kuwanol C	-1 ± 1	-2 ± 1	-2 ± 1	2 ± 1	2
F211	Kushenol X	-2 ± 1	0 ± 1	0 ± 2	2 ± 4	3
F212	Kushenol W	-2 ± 1	0 ± 1	-1 ± 1	-1 ± 1	2
F213	Kushenol E	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 2	8
F214	Kushenol C	-2 ± 1	0 ± 1	-1 ± 1	-6 ± 7	2
F215	Kushenol A	-3 ± 1	0 ± 1	-4 ± 1	-3 ± 2	2
F216	Kumatakenin	1 ± 2	2 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	917
F217	Kazinol U	-1 ± 1	2 ± 2	1 ± 2	3 ± 3	2
F218	Kaempferol 5-methyl ether	3 ± 1	5 ± 7	4 ± 1	4 ± 6	153
F219	Kaempferol 3,4,7-triacetate	2 ± 1	6 ± 4	-1 ± 2	2 ± 1	212
F220	Jaceosidin	4 ± 2	6 ± 2	6 ± 7	10 ± 1	451
F221	Jaceidin	3 ± 3	0 ± 6	5 ± 1	2 ± 1	3
F222	Izalpinine	1 ± 1	3 ± 1	-14 ± 11	1 ± 1	0
F223	Isowighteone	12 ± 2	97 ± 9	144 ± 12	194 ± 22	76
F224	Isothymusin	2 ± 1	7 ± 14	0 ± 1	6 ± 1	1

F225	Isothymonin	1 ± 2	3 ± 2	3 ± 5	3 ± 5	527
F226	Isosakuranetin	3 ± 1	14 ± 4	28 ± 1	34 ± 9	9
F227	Isolicoflavonol	5 ± 3	21 ± 5	29 ± 7	33 ± 2	42
F228	Isoginkgetin	9 ± 1	22 ± 6	24 ± 4	28 ± 7	17
F229	Isoerysenegalensein E	1 ± 1	5 ± 1	2 ± 1	5 ± 3	18
F230	Isoderrone	1 ± 1	-1 ± 1	-3 ± 3	-3 ± 2	2
F231	Isochandalone	3 ± 1	2 ± 6	8 ± 5	-2 ± 3	7
F232	Isoapetalic acid	5 ± 1	5 ± 2	3 ± 1	7 ± 3	5
F233	Icaritin	1 ± 2	2 ± 6	4 ± 4	3 ± 5	539
F234	Hydroxygenkwanin	774 ± 34	1422 ± 153	749 ± 102	453 ± 73	952
F235	Hydrangenol	5 ± 1	9 ± 6	10 ± 1	22 ± 9	3
F236	Honyucitrin	3 ± 1	5 ± 7	1 ± 1	2 ± 1	3
F237	Homoferreirin	5 ± 1	4 ± 4	2 ± 1	2 ± 1	2
F238	Hispidulin	3 ± 1	8 ± 2	10 ± 7	16 ± 3	123
F239	Hinokiflavone	18 ± 4	55 ± 2	63 ± 6	88 ± 11	33
F240	Heveaflavone	5 ± 1	7 ± 6	8 ± 2	8 ± 1	31
F241	Hesperetin	7 ± 2	17 ± 2	19 ± 4	31 ± 5	14
F242	Herbacetin	5 ± 1	7 ± 1	4 ± 1	4 ± 2	2
F243	Glyasperin A	6 ± 1	20 ± 1	20 ± 4	31 ± 7	15
F244	Glepidotin B	7 ± 1	6 ± 5	0 ± 3	5 ± 1	2
F245	Ginkgetin	15 ± 3	18 ± 6	19 ± 9	23 ± 5	13
F246	Genkwanin	15 ± 1	18 ± 3	18 ± 1	17 ± 3	241
F247	Gancaonin M	5 ± 2	5 ± 1	1 ± 1	0 ± 3	3
F248	Gallocatechin	2 ± 1	5 ± 3	3 ± 1	3 ± 1	2
F249	Galangin 3-methyl ether	2 ± 1	7 ± 3	3 ± 4	1 ± 3	4
F250	Galangin	154 ± 8	293 ± 13	444 ± 47	679 ± 67	815
F251	Fustin	30 ± 6	372 ± 15	485 ± 45	852 ± 125	200
F252	Furowanin A	0 ± 1	2 ± 1	7 ± 1	7 ± 3	11
F253	Ficusin A	4 ± 1	5 ± 1	7 ± 3	9 ± 8	6
F254	Farrerol	4 ± 1	6 ± 7	3 ± 2	5 ± 1	5
F255	Eupatorin	3 ± 1	5 ± 2	7 ± 1	0 ± 5	48
F256	Eupatoletin	-1 ± 3	7 ± 1	8 ± 2	12 ± 7	48
F257	Eupatilin	5 ± 1	8 ± 1	4 ± 3	4 ± 1	48
F258	Eucalyptin	13 ± 3	13 ± 7	29 ± 1	35 ± 3	157
F259	Erythrinin C	1 ± 1	5 ± 2	6 ± 1	9 ± 1	6
F260	Erysubin B	6 ± 1	6 ± 1	10 ± 8	4 ± 1	6
F261	Erysubin A	2 ± 1	6 ± 1	3 ± 3	3 ± 3	6
F262	Erysenegalensein E	7 ± 5	5 ± 3	1 ± 1	5 ± 1	3
F263	Ermanin	3 ± 1	23 ± 8	31 ± 6	34 ± 13	56
F264	Eriosematin A	8 ± 1	6 ± 80	4 ± 1	5 ± 1	4
F265	Epicatechin	6 ± 2	15 ± 4	35 ± 11	51 ± 2	6
F266	Dodoviscin J	6 ± 1	6 ± 1	9 ± 1	9 ± 3	3
F267	Dodoviscin I	3 ± 1	2 ± 3	5 ± 1	11 ± 3	2
F268	Dodoviscin H	7 ± 1	7 ± 1	16 ± 9	22 ± 16	4

F269	Dodoviscin A	2 ± 2	7 ± 1	-1 ± 3	0 ± 3	15
F270	Diosmetin	10 ± 3	16 ± 4	19 ± 8	24 ± 13	37
F271	Dihydrotamarixetin	3 ± 1	4 ± 4	4 ± 1	5 ± 1	6
F272	Dihydrorobinetin	5 ± 1	80 ± 10	97 ± 13	222 ± 28	452
F273	Dihydrooroxilin A	2 ± 1	8 ± 7	3 ± 1	5 ± 2	17
F274	Dihydroobovatin	5 ± 2	6 ± 3	13 ± 1	22 ± 3	18
F275	Dihydromorin	2 ± 2	12 ± 5	40 ± 13	73 ± 21	372
F276	Dihydroalpinumisoflavone	6 ± 1	67 ± 8	107 ± 5	139 ± 8	34
F277	Desmethoxycentaureidin	5 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	11 ± 1	441
F278	Derrone	4 ± 1	6 ± 2	7 ± 3	2 ± 2	2
F279	Derrisoflavone B	5 ± 2	9 ± 1	1 ± 3	4 ± 1	6
F280	Demethoxycapillarisin	47 ± 8	171 ± 14	174 ± 34	335 ± 38	990
F281	Delphinidin chloride	6 ± 2	6 ± 2	14 ± 2	17 ± 1	74
F282	Dehydrotoxicarol	28 ± 6	79 ± 6	114 ± 3	254 ± 106	43
F283	Dalbergoidin	8 ± 1	604 ± 49	689 ± 72	1040 ± 119	205
F284	Cyclomorusin	9 ± 3	47 ± 6	115 ± 10	133 ± 10	765
F285	Cycloheterophyllin	158 ± 16	401 ± 37	495 ± 25	736 ± 92	2
F286	Cyanidin Chloride	4 ± 1	8 ± 4	2 ± 1	4 ± 2	62
F287	Cudraflavanone B	6 ± 3	5 ± 1	6 ± 3	4 ± 1	3
F288	Cirsimaritin	3 ± 1	8 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	8
F289	Cirsilineol	5 ± 2	7 ± 3	1 ± 1	2 ± 1	50
F290	Chryso splenol D	4 ± 1	5 ± 8	1 ± 1	9 ± 4	3
F291	Chryso splenetin	2 ± 1	6 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	5
F292	Chrysoeriol	12 ± 3	17 ± 5	17 ± 5	22 ± 1	44
F293	Chrysin	6 ± 1	7 ± 5	10 ± 1	13 ± 2	20
F294	Centaureidin	-2 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	-1 ± 3	7
F295	Cedrin	4 ± 1	1 ± 3	3 ± 1	5 ± 2	2
F296	Cedeodarin	3 ± 1	0 ± 1	3 ± 1	6 ± 7	3
F297	Cathayanon H	2 ± 2	4 ± 2	0 ± 1	3 ± 1	2
F298	Casticin	1 ± 1	5 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	12
F299	Carpachromene	-3 ± 3	-3 ± 1	-6 ± 2	-5 ± 6	2
F300	Capillarisin	4 ± 2	5 ± 1	10 ± 3	14 ± 2	477
F301	Cajanin	2 ± 1	2 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	2
F302	Brousoflavonol F	0 ± 2	4 ± 1	10 ± 3	46 ± 8	851
F303	Brazilin	5 ± 1	34 ± 4	88 ± 13	130 ± 20	40
F304	Blumeatin B	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	2
F305	Blumeatin	1 ± 4	9 ± 1	11 ± 2	15 ± 4	8
F306	Biochanin A	1 ± 1	4 ± 1	0 ± 1	3 ± 1	3
F307	Bilobetin	25 ± 2	30 ± 5	36 ± 8	44 ± 6	14
F308	beta-Rhamnocitrin	5 ± 1	-7 ± 9	3 ± 2	8 ± 1	520
F309	Auriculasin	11 ± 3	14 ± 4	-9 ± 4	-45 ± 38	23
F310	Atalantoflavone	2 ± 1	5 ± 2	5 ± 2	11 ± 3	3
F311	Artoheterophyllin B	87 ± 13	101 ± 29	253 ± 23	289 ± 30	1
F312	Artocarpin	9 ± 1	9 ± 2	8 ± 1	4 ± 5	2



F313	Artemetin	4 ± 1	3 ± 2	5 ± 1	12 ± 6	5
F314	Aromadendrin	29 ± 9	59 ± 15	83 ± 19	245 ± 47	254
F315	Araneosol	5 ± 1	9 ± 1	1 ± 9	11 ± 2	6
F316	Apigenin	2 ± 7	29 ± 7	174 ± 18	222 ± 45	195
F317	Anhydroicaritin	-3 ± 2	-12 ± 13	-10 ± 11	-23 ± 14	472
F318	Angelicain	5 ± 1	3 ± 0	3 ± 1	4 ± 0	7
F319	Ampelopsin	7 ± 1	4 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	593
F320	Amentoflavone	15 ± 4	14 ± 2	3 ± 3	-5 ± 3	50
F321	Amaranol B	4 ± 1	24 ± 5	-10 ± 9	-1 ± 2	1
F322	Amaranol A	14 ± 11	14 ± 5	16 ± 8	25 ± 8	496
F323	Alpinumisoflavone	2 ± 0	3 ± 1	6 ± 1	-4 ± 2	2
F324	Aliarin	4 ± 2	6 ± 0	1 ± 0	0 ± 5	36
F325	Albanin A	19 ± 7	20 ± 3	9 ± 3	1 ± 8	35
F326	Agrimonalide	36 ± 11	21 ± 5	3 ± 7	-5 ± 7	4
F327	8-Prenylnaringenin	4 ± 0	6 ± 1	4 ± 1	16 ± 11	2
F328	8-Prenylluteone	4 ± 0	3 ± 0	4 ± 0	3 ± 2	72
F329	8-O-Demethyl-7-O-methyl-3,9-dihdropunctatin	1 ± 2	8 ± 6	-2 ± 1	3 ± 0	4
F330	8-Methoxykaempferol	5 ± 1	4 ± 1	-7 ± 4	4 ± 1	442
F331	8-Lavandulylkaempferol	10 ± 2	10 ± 4	13 ± 4	24 ± 3	831
F332	8-Isomulberrin hydrate	-1 ± 5	-1 ± 5	-5 ± 2	-4 ± 6	3
F333	8-Demethylsideroxylin	37 ± 13	13 ± 8	14 ± 11	3 ± 2	951
F334	8-Demethyleucalyptin	9 ± 3	16 ± 6	91 ± 24	130 ± 38	6
F335	7-O-Methylporiol	2 ± 1	3 ± 1	-3 ± 6	0 ± 1	4
F336	7-O-Methyleiodictyol	6 ± 1	4 ± 2	2 ± 1	4 ± 2	6
F337	7,4'-Di-O-methylapigenin	0 ± 2	3 ± 2	4 ± 1	10 ± 7	126
F338	7,3',4'-Trihydroxyflavone	14 ± 3	14 ± 1	15 ± 2	18 ± 0	1
F339	7,3',4'-Trihydroxy-3-benzyl-2H-chromene	4 ± 2	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 2	2
F340	6-Prenylnaringenin	6 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	3 ± 0	1
F341	6-Methoxynaringenin	5 ± 0	1 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	14
F342	6-Methoxyluteolin	3 ± 0	5 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	398
F343	6-Hydroxykaempferol	2 ± 1	6 ± 1	8 ± 4	13 ± 2	1
F344	6-Geranylnaringenin	4 ± 1	-5 ± 10	-6 ± 8	-6 ± 6	1
F345	6,8-Diprenylorobol	7 ± 1	-7 ± 6	7 ± 1	-4 ± 7	3
F346	6,8-Diprenylnaringenin	6 ± 1	3 ± 0	7 ± 4	15 ± 3	1
F347	6,8-Diprenylgenistein	7 ± 1	8 ± 2	4 ± 1	4 ± 1	1
F348	5-Hydroxy-7-methoxy-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one	4 ± 1	-1 ± 2	1 ± 2	4 ± 2	135
F349	5-Hydroxy-7-acetoxyflavone	6 ± 3	2 ± 1	3 ± 1	2 ± 2	5
F350	5-Hydroxy-7-acetoxy-8-methoxyflavone	-2 ± 11	3 ± 4	9 ± 4	17 ± 10	143
F351	5-Hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone	-4 ± 2	-3 ± 2	1 ± 2	0 ± 2	1

F352	5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	6 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	4 ± 2	8
F353	5,7-Di-O-methylquercetin	2 ± 2	0 ± 1	1 ± 2	3 ± 0	415
F354	5,7-Dihydroxychromone	5 ± 0	3 ± 1	0 ± 2	4 ± 0	5
F355	5,7-Dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone	6 ± 1	6 ± 3	5 ± 1	4 ± 1	6
F356	5,7-Dihydroxy-3,4',8-trimethoxyflavone	0 ± 2	-3 ± 2	0 ± 1	-3 ± 3	1
F357	5,7,4-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-3-prenylflavone	2 ± 4	4 ± 2	5 ± 2	7 ± 1	2
F358	5,7,4'-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-3',5'-diprenylflavone	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 0	6 ± 1	681
F359	5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone	9 ± 1	3 ± 2	3 ± 1	7 ± 2	22
F360	5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavanone	5 ± 1	0 ± 2	7 ± 4	-5 ± 1	293
F361	5,2',6'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	2 ± 0	2 ± 2	-4 ± 1	3 ± 2	2
F362	4-O-Methylsappanol	6 ± 0	7 ± 1	7 ± 0	11 ± 1	1
F363	4'-O-Methyllicoflavanone	-1 ± 4	-1 ± 5	-6 ± 7	-3 ± 8	1
F364	4'-Hydroxywogonin	1 ± 1	3 ± 1	-1 ± 1	0 ± 1	140
F365	4'-Demethyleucomin	11 ± 6	23 ± 3	25 ± 6	67 ± 5	29
F366	4-Demethyl-3,9-dihydroeucomin	12 ± 3	10 ± 2	6 ± 2	0 ± 6	10
F367	4',7-Di-O-methylnaringenin	5 ± 2	6 ± 3	0 ± 1	-3 ± 3	7
F368	4',5-Dihydroxyflavone	6 ± 1	19 ± 4	11 ± 4	16 ± 1	15
F369	4',5-Dihydroxy-3',5',6,7-tetramethoxyflavone	3 ± 2	-3 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	7
F370	4',5,7-Trihydroxy-6-prenylflavone	9 ± 1	22 ± 8	15 ± 2	-31 ± 13	94
F371	4',4'''-Di-O-methylcupressuflavone	17 ± 3	23 ± 4	30 ± 3	34 ± 3	18
F372	3-O-Methylquercetin	8 ± 0	6 ± 1	-5 ± 5	5 ± 3	486
F373	3'-O-Methylorobol	7 ± 1	-2 ± 10	6 ± 5	2 ± 6	2
F374	3-O-Acetylpinobanksin	5 ± 0	17 ± 4	27 ± 3	63 ± 10	183
F375	3'-Hydroxy-3,9-dihydroeucomin	6 ± 2	1 ± 1	4 ± 0	9 ± 3	2
F376	3-Deoxysappanone B	5 ± 0	4 ± 1	6 ± 1	3 ± 1	20
F377	3,8'-Biapigenin	9 ± 1	8 ± 1	1 ± 2	9 ± 2	48
F378	3,7-O-Diacetylpinobanksin	5 ± 2	1 ± 3	3 ± 1	3 ± 0	282
F379	3,6-Dimethoxyapigenin	1 ± 3	6 ± 3	2 ± 1	-1 ± 2	404
F380	3',5'-Diprenylgenistein	6 ± 1	5 ± 0	2 ± 2	5 ± 2	2
F381	3,5-Dihydroxy-4',7-dimethoxyflavone	7 ± 1	7 ± 1	5 ± 2	5 ± 0	6
F382	3',5-Dihydroxy-4',5',6,7-tetramethoxyflavone	3 ± 1	3 ± 1	-1 ± 0	9 ± 1	8
F383	3',5,5',7-Tetrahydroxyflavanone	5 ± 1	7 ± 9	36 ± 8	45 ± 12	190

F384	3',5,5',7-Tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavone	-7 ± 0	-19 ± 8	-10 ± 16	-7 ± 8	1
F385	2'-Hydroxygenistein	-2 ± 1	0 ± 0	-1 ± 0	-1 ± 0	1022
F386	2-Hydroxy-7-O-methylscillascillin	17 ± 4	33 ± 13	61 ± 10	186 ± 43	28
F387	2',5,7-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	7 ± 1	7 ± 0	2 ± 1	5 ± 1	10
F388	2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	6 ± 1	5 ± 1	13 ± 5	8 ± 18	142
F389	2,3-Dehydrokievitone	9 ± 1	4 ± 2	5 ± 1	6 ± 2	2
F390	2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	6 ± 0	-2 ± 2	-27 ± 7	-118 ± 15	750
F391	2,3,2'',3''-Tetrahydroochnaflavone	20 ± 3	63 ± 6	98 ± 11	118 ± 21	42
F392	11-Hydroxytephrosin	8 ± 2	7 ± 2	5 ± 0	6 ± 0	2
F393	(+)-Taxifolin	6 ± 1	4 ± 1	-5 ± 8	-1 ± 2	4
F394	(+)-Gallocatechin	6 ± 1	7 ± 4	23 ± 8	80 ± 14	2
F395	(+)-Catechin hydrate	9 ± 0	7 ± 0	7 ± 1	8 ± 0	223
F396	(±)-Sigmoidin A	4 ± 2	8 ± 2	7 ± 2	4 ± 1	2
F397	(±)-Pinocembrin	5 ± 1	5 ± 0	2 ± 0	7 ± 1	3
F398	(-)-Gallocatechin gallate	6 ± 1	6 ± 10	8 ± 4	9 ± 4	5
F399	(-)-Gallocatechin	3 ± 0	4 ± 1	4 ± 1	7 ± 8	3
F400	(-)-Epigallocatechin-3-(3''-O-methyl) gallate	3 ± 0	2 ± 1	4 ± 1	-3 ± 3	2
F401	(-)-Epigallocatechin(EGC)	4 ± 1	2 ± 0	7 ± 3	0 ± 2	1
F402	(-)-Epigallocatechin gallate	3 ± 1	3 ± 0	0 ± 1	3 ± 1	1
F403	(-)-Epicatechin-3-(3''-O-methyl) gallate	3 ± 0	3 ± 0	0 ± 0	-1 ± 1	30
F404	(-)-Epicatechin gallate	3 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 2	3
F405	(-)-Dihydroquercetin	3 ± 0	7 ± 1	15 ± 4	68 ± 8	426
F406	(-)-Catechin gallate(CG)	3 ± 3	0 ± 1	4 ± 3	3 ± 2	20

## **4.2. Badanie oddziaływań białko-białko oraz białko-substrat**

### **4.2.1. Badanie oddziaływań białko-białko**

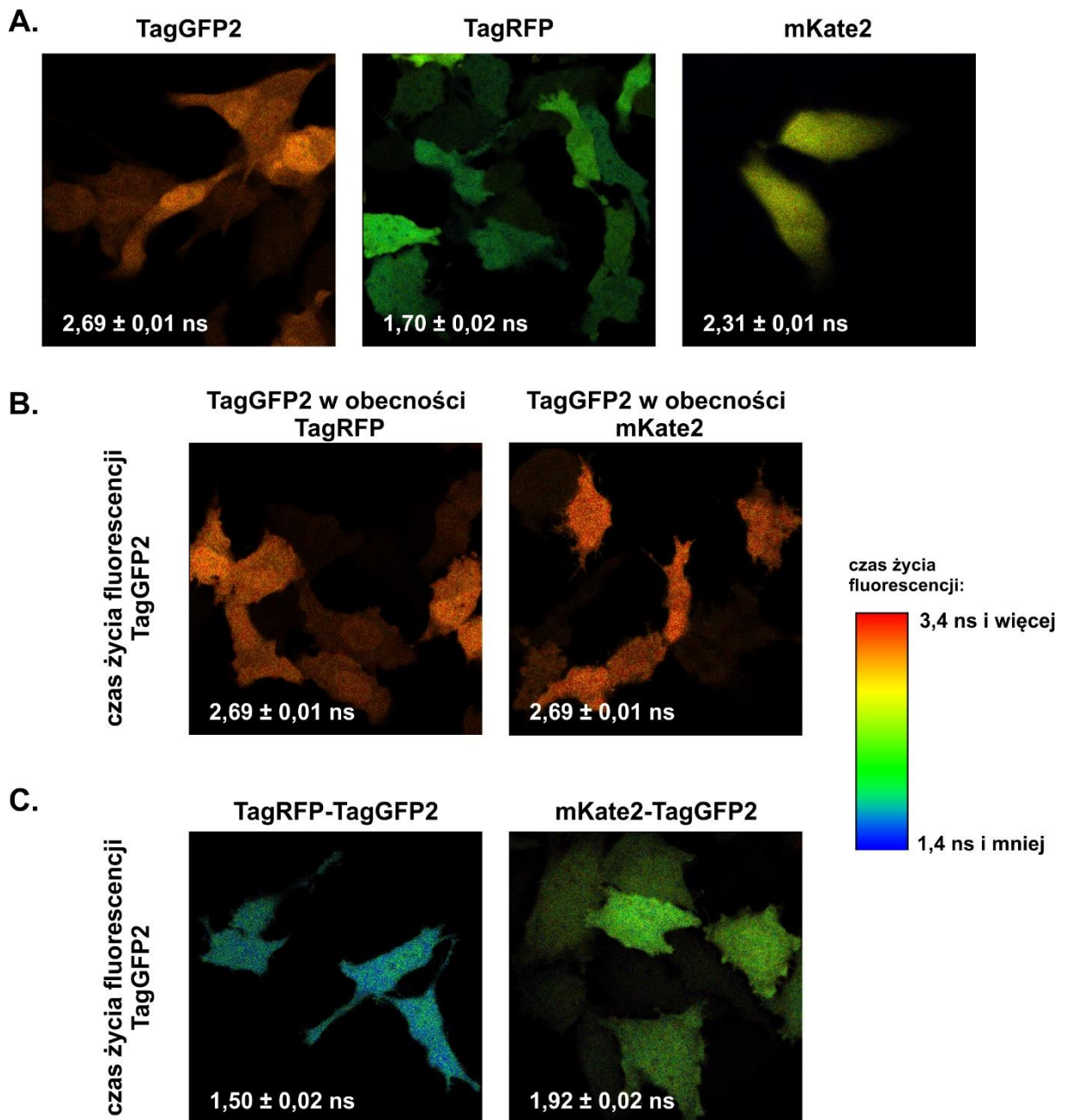
#### **4.2.1.1. Wybór pary białek fluoryzujących do badania oddziaływań**

W tej części niniejszej rozprawy wykorzystano zjawisko FRET do zbadania oddziaływań białko-białko oraz enzym-substrat dla białka ABCG2. W pierwszej kolejności sprawdzono, czy wykonując pomiary FRET można zaobserwować bezpośrednie, specyficzne oddziaływania między dwiema cząsteczkami białka tworzącymi aktywny enzym. W tym celu niezbędne było wybranie optymalnych białek fluoryzujących do konstrukcji białek fuzyjnych.

Ponieważ, jak opisano w podrozdziale 3.2.14.6., wyliczone wartości  $R_0$  dla pary białek TagGFP2/TagRFP i TagGFP2/mKate2 wskazują, że białko TagRFP jest lepszym akceptorem FRET dla TagGFP2 niż białko mKate2, postanowiono zweryfikować to eksperymentalnie za pomocą pomiarów FRET-FLIM. Wykonano pomiary czasu życia fluorescencji białek fluoryzujących w trzech eksperymentach. W pierwszym komórki stransfekowano przejściowo osobno za pomocą plazmidów niosących geny białek fluoryzujących: TagGFP2, TagRFP oraz mKate2. W drugim komórki stransfekowano przejściowo oddzielnie mieszaniną plazmidów niosących geny białek TagGFP2 i TagRFP oraz analogiczną mieszaniną TagGFP2 i mKate2. W trzecim komórki transfekowano przejściowo osobno za pomocą plazmidów niosących geny białek fuzyjnych TagRFP-TagGFP2 i mKate2-TagGFP2. Białko TagGFP2, będące donorem w parach FRET, umieszczono na C-końcu każdego z białek fuzyjnych, aby zwiększyć szanse na to, że w każdym białku fuzyjnym zawierającym dojrzały fluorofor białka TagGFP2 znajduje się również już dojrzały fluorofor białka akceptorowego (fragment transkryptu odpowiadający sekwencji akceptora ulega translacji wcześniej niż fragment odpowiadający sekwencji donora). Reprezentatywne obrazy uzyskane dla kolejnych eksperymentów przedstawiono kolejno na panelach ryciny 50. W każdym przypadku kolor pikseli wskazuje oszacowany czas życia fluorescencji danego białka. Dokładne wartości, podane na obrazach, uzyskano na podstawie pomiarów wykonanych dla trzech pól widzenia. Białko TagGFP2 ma najdłuższy czas życia fluorescencji, który wynosi  $2,69 \pm 0,01$  ns. Białka TagRFP oraz mKate2 charakteryzują się krótszym czasem życia fluorescencji, odpowiednio  $1,70 \pm 0,02$  ns oraz  $2,31 \pm 0,01$  ns.

W przypadku, kiedy w komórkach znajduje się mieszanina TagGFP2 i TagRFP lub TagGFP2 i mKate2, czas życia fluorescencji TagGFP2 (donor) jest taki sam (rycina 50B). Zarówno donor, jak i akceptor są w tym przypadku obecne w tych samych komórkach, ale ponieważ bezpośrednie kontakty między białkami są rzadkie i zupełnie przypadkowe, a ewentualne oddziaływania nie są specyficzne, średnie odległości między nimi są w danym momencie

znacznie większe niż odległość umożliwiającą wydajny FRET. Wydajność FRET wyliczona z równania (4) wynosi 0%.



**Rycina 50.** Obrazowanie czasu życia fluorescencji białek fluoryzujących w komórkach HeLa po 72 h od transfekcji. **A.** Komórki transfekowane plazmidami ekspresyjnymi niosącymi geny pojedynczych białek. **B.** Komórki transfekowane mieszaniną plazmidów pTagGFP2 i pTagRFP lub pTagGFP2 i pmKate2. **C.** Komórki transfekowane plazmidami niosącymi geny białek fuzyjnych: TagRFP-TagGFP2 lub mKate2-TagGFP2. Na panelach B i C przedstawiono czas życia fluorescencji białka TagGFP2 (donor w parze FRET). Wartości podane na obrazach to średnia  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 3$ .

W przypadku, kiedy w komórkach znajdują się białka fuzyjne, czas życia fluorescencji TagGFP2 jest niższy (rycina 50C). Donor i akceptor stanowią jedno białko, wobec czego odległość między nimi jest zawsze podobna i na tyle niewielka, że umożliwia wydajny FRET.

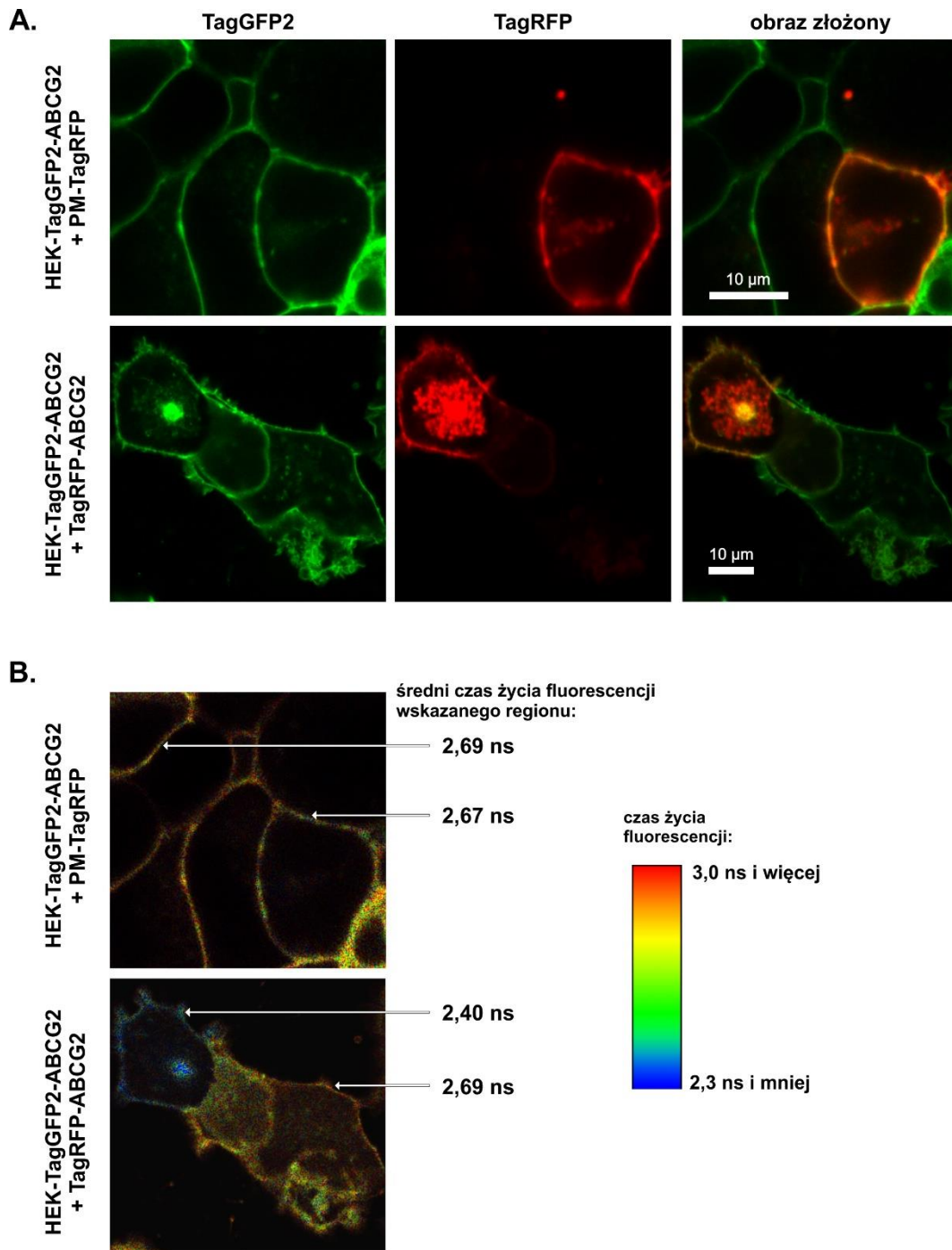
W białku TagRFP-TagGFP2 czas życia fluorescencji TagGFP2 ma wartość  $1,50 \pm 0,02$  ns. Wydajność FRET wynosi więc w tym wypadku  $44,2\% \pm 0,9\%$ . W białku mKate2-TagGFP2 czas życia fluorescencji TagGFP2 wynosi  $1,90 \pm 0,02$  ns, co przekłada się na wydajność FRET równą  $29,4\% \pm 1,0\%$ . Dowodzi to, że białko TagRFP jest lepszym akceptorem FRET dla TagGFP2 niż białko mKate2. W związku z tym to TagGFP2 i TagRFP wykorzystano w dalszych badaniach do wyznakowania białka ABCG2.

Korzystając z wyliczonych powyżej wartości  $R_0$  dla obu par białek, na podstawie wartości wydajności FRET można zgodnie z równaniem (2) obliczyć średnią odległość, w jakiej znajdują się od siebie donor i akceptor. W przypadku białka TagRFP-TagGFP2 odległość ta wynosi około 5,86 nm, a w przypadku białka mKate2-TagGFP2 wynosi ona około 5,77 nm. Obliczone odległości są podobne, ponieważ wszystkie trzy białka fluoryzujące mają podobną strukturę trzeciorzędową. Odległość między fluoroforem i aminokwasami łącznika pomiędzy białkami w białku fuzyjnym jest podobna w przypadku obu par donor/akceptor.

#### **4.2.1.2. Badanie oddziaływań ABCG2-ABCG2**

Obserwacje FLIM-FRET między oddziałującymi cząsteczkami białka ABCG2 prowadzono po dołączeniu białka fluoryzującego do N-końcowej części transportera (przed sekwencją NBD). W pierwszym doświadczeniu zastosowano komórki linii HEK-TagGFP2-ABCG2 (jak opisano w podrozdziale 3.2.9.) stabilnie transfekowane plazmidem niosącym gen białka TagGFP2-ABCG2. Komórki te transfekowano przejściowo za pomocą plazmidu ekspresyjnego niosącego gen białka fuzyjnego TagRFP-ABCG2, w którym białko fluoryzujące również znajduje się na N-końcu. W kontroli negatywnej komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 poddano transdukcji za pomocą preparatu CellLight™ Plasma Membrane-RFP. W komórkach zainfekowanych preparat ten powoduje ekspresję PM-TagRFP, czyli białka TagRFP, które jest zakotwiczone w błonie plazmatycznej komórek w regionach tratw lipidowych. Białko ABCG2 również znajduje się w tych regionach błony plazmatycznej. Komórki obrazowano na pomocą mikroskopii konfokalnej w dwóch kanałach fluorescencji odpowiadających TagGFP2 i TagRFP. Na rycinie 51A przedstawiono przykładowe pola widzenia, na których widoczne są zarówno komórki wykazujące jedynie ekspresję TagGFP2-ABCG2, jak i komórki, w których ekspresjonowane jest zmodyfikowane TagRFP. TagRFP-ABCG2 i PM-TagRFP mają zbliżoną lokalizację subkomórkową i znajdują się głównie w błonach plazmatycznych. Jak można zauważyć na obrazie złożonym, sygnał białka TagGFP2-ABCG2 kolokalizuje tak samo dobrze z sygnałem białka PM-TagRFP, jak z sygnałem TagRFP-ABCG2 w komórkach, które zawierają oba białka fluoryzujące. W błonach plazmatycznych tych komórek na obrazie złożonym obserwujemy sygnał o kolorze pomarańczowym, ponieważ jest on złożeniem pseudokolorów zielonego i czerwonego znajdujących się w tych samych pikselach.

Dla tak przygotowanych preparatów przeprowadzono obrazowanie FLIM, analizując fotony donora (emitowane przez TagGFP2-ABCG2). Na rycinie 51B przedstawiono obrazy uzyskane dla pól widzenia widocznych na rycinie 51A. Przy obrazach podano przykładowe czasy życia fluorescencji komórek wskazanych strzałkami. Analizowano jedynie regiony odpowiadające błonie plazmatycznej i uśredniono wyniki otrzymane dla 12 komórek. Czas życia TagGFP2-ABCG2 w nieobecności TagRFP jest taki sam jak w przypadku komórek, które zawierają wolny TagGFP2 (rycina 51A), i wynosi  $2,69 \pm 0,01$  ns. W komórkach z ekspresją PM-TagRFP czas życia TagGFP2-ABCG2 ulega niewielkiemu obniżeniu i ma średnią wartość  $2,66 \pm 0,01$  ns. W komórkach z ekspresją TagRFP-ABCG2 czas życia TagGFP2-ABCG2 ulega skróceniu do średniej wartości  $2,45 \pm 0,03$  ns. Wynik ten dowodzi, że w tym przypadku fluorofory białka TagRFP znajdują się bliżej fluoroforów białka TagGFP2, co umożliwia wydajne zachodzenie zjawiska FRET. Wydajność FRET wyliczona według równania (4) dla układu kontrolnego TagGFP2-ABCG2+PM-TagRFP wynosi  $1,1 \% \pm 0,4 \%$ . Dla pary TagGFP2-ABCG2+TagRFP-ABCG2 wynosi ona  $8,9 \% \pm 0,6 \%$ . W obu przypadkach białka fluoryzujące są zakotwiczone w tych samych regionach błony plazmatycznej komórek, ale specyficzne oddziaływania ABCG2-ABCG2 polegające na dimeryzacji podjednostek transportera powodują, że znacznie większa frakcja cząsteczek donora znajduje się blisko cząsteczek akceptora. Fluorescencja donora pochodzi w tym przypadku od cząsteczek TagGFP2-ABCG2, które z cząsteczkami TagRFP-ABCG2 tworzą dimery oraz kompleksy wyższego rzędu o losowej stechiometrii. Wyznaczenie bezwzględnych odległości między dwiema oddziałującymi cząsteczkami nie jest możliwe dla tak złożonej mieszaniny, niemniej jednak zakładając, że w każdej komórce obserwujemy podobny uśredniony stan, w którym każda wyznakowana cząsteczka ABCG2 jest związana z inną wyznakowaną cząsteczką ABCG2, średnia odległość między TagGFP2 i TagRFP wyliczona zgodnie z równaniem (2) na podstawie obserwowanej wydajności FRET (stosując wartość dla pary TagGFP2-TagRFP  $R_0 = 5,633$  nm) wynosi około 8,3 nm. Jest to odległość, która dość dobrze odpowiada odległości między zewnętrznymi krańcami domeny NBD w dimerze białka ABCG2 w strukturach opisanych za pomocą cryo-EM. Ta ostatnia odległość wynosi około 6 nm, w związku z czym uwzględniając wielkość samego białka fluoryzującego (którego promień wynosi około 2 nm) uzyskujemy odległości podobne do wartości średniej obliczonej na podstawie eksperymentu.

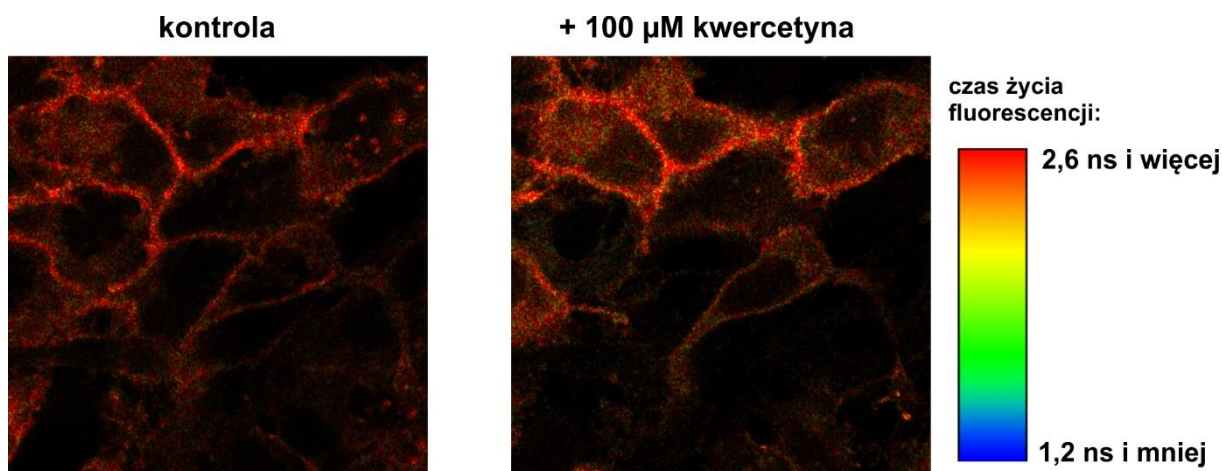


**Rycina 51.** Komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 obrazowane po 48 h od wprowadzenia genu białka PM-TagRFP lub TagRFP-ABCG2. **A.** Obrazy mikroskopowe wybranych pól widzenia. Fluorescencja TagGFP2 (500-560 nm); fluorescencja TagRFP (560-640 nm) **B.** Obrazy FLIM pól widzenia pokazanych w panelu A. Analizowano fotony odpowiadające fluorescencji białka TagGFP2-ABCG2. Strzałkami zaznaczono błony plazmatyczne wybranych komórek, dla których wyznaczono podane wartości czasów życia fluorescencji.

Wykonano doświadczenie, w którym zbadano, w jaki sposób na zjawisko FRET między wyznakowanymi cząsteczkami ABCG2 wpłynie obecność substratu. Komórki HeLa stransfekowano przejściowo mieszaniną równej ilości plazmidów niosących geny TagGFP2-ABCG2 i TagRFP-ABCG2, a następnie przyżyciowo zmierzono czas życia fluorescencji



TagGFP2-ABCG2 w tych samych komórkach w nieobecności oraz w obecności kwercetyny, która jest substratem ABCG2. Obraz FLIM przykładowego pola widzenia przedstawiono na rycinie 52.



**Rycina 52.** Obrazy FLIM tej samej grupy komórek HeLa z przejściową ekspresją TagGFP2-ABCG2 i TagRFP-ABCG2 wykonane przed i po godzinnej inkubacji z kwercetyną. Kolor pikseli odpowiada oszacowanej wartości czasu życia TagGFP2-ABCG2.

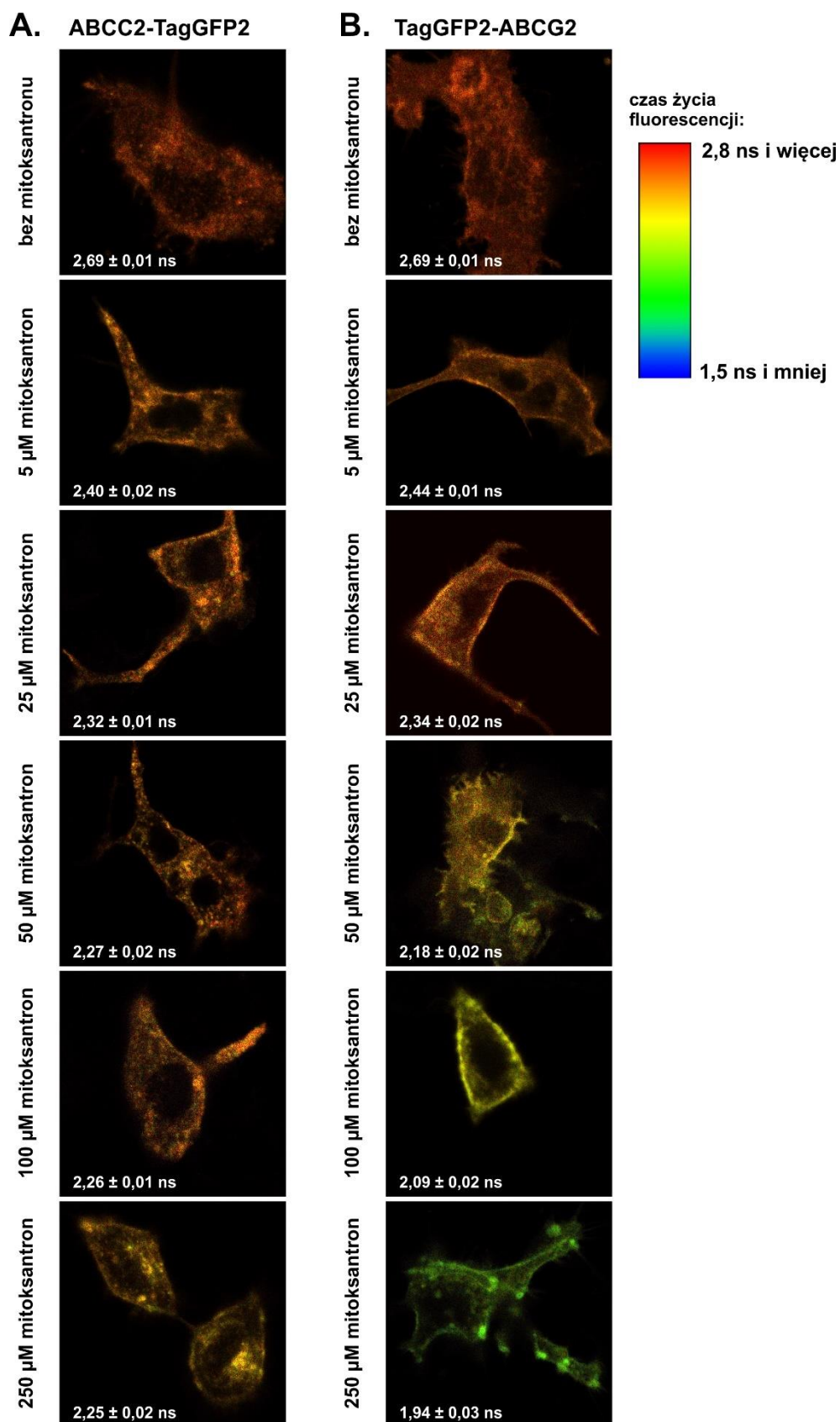
Wykonano pomiary czasu życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 w błonach plazmatycznych komórek na 4 polach widzenia, na każdym z nich przed i po dodaniu kwercetyny. Pomiary w obecności flawonoidu wykonano po upływie godziny od dodania związku. Jak wykazano wcześniej (patrz podrozdział 4.1.2.2.; rycina 37), po tym czasie osiągnięta jest równowaga między procesami dyfuzji przez błonę plazmatyczną komórek i transportem aktywnym zależnym od ABCG2. Przy określonym zewnątrzkomórkowym stężeniu substratu białko ABCG2 wykazuje wtedy maksymalną aktywność. Średni czas życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 oddziałującego z TagRFP-ABCG2 w nieobecności kwercetyny wynosi  $2,43 \pm 0,01$  ns ( $n = 4$ ). W obecności flawonoidu średni czas życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 w błonach plazmatycznych tych samych komórek obniża się i wynosi  $2,30 \pm 0,02$  ns ( $n = 4$ ). Wyjściowy średni czas życia fluorescencji oddziałującego TagGFP2-ABCG2 jest podobny jak w przypadku komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 ekspresyjnych TagRFP-ABCG2, co wskazuje, że w obu modelach obserwujemy podobny uśredniony stan. Stan ten ulega zmianie w komórkach, w których obecny jest substrat ABCG2. Jedno z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest takie, że w obecności kwercetyny rośnie aktywność enzymu, przez co większa część cząsteczek ABCG2 wyznakowanych TagGFP2 znajduje się w fazie cyklu transportu, w której odległość od drugiej cząsteczki ABCG2 tworzącej aktywny dimer (i wyznakowanej TagRFP) jest mniejsza. Ponownie korzystając z równania (2) możemy obliczyć, że przy takiej interpretacji uzyskanych wyników średnia odległość między donorem a akceptorem skracalaby się od wartości 8,2 nm w nieobecności substratu do wartości 7,6 nm w obecności kwercetyny.

## 4.2.2. Badanie oddziaływań białko-substrat

### 4.2.2.1. Badanie oddziaływań ABCG2-mitoksantron i ABCC2-mitoksantron

TagGFP2 w białku TagGFP2-ABCG2 może być także donorem FRET w parze z drobnocząsteczkowym fluoroforem znajdującym się odpowiednio blisko. Mitoksantron to lek przeciwnowotworowy będący substratem białka ABCG2 i charakteryzujący się fluorescencją o szerokim widmie wzbudzenia (Enache i Volanschi, 2011). Sprawia to, że może on być akceptorem FRET dla białka TagGFP2-ABCG2. Zbadano, w jaki sposób różne stężenia mitoksantronu wpływają na czas życia fluorescencji białka TagGFP2-ABCG2. Jako kontrolę zastosowano białko ABCC2, które również wyznakowano za pomocą TagGFP2. Komórki A549 transfekowano przejściowo, wprowadzając gen białka TagGFP2-ABCG2 lub gen białka ABCC2-TagGFP2. Po 48 h od transfekcji komórki traktowano różnymi stężeniami mitoksantronu i analizowano czas życia fluorescencji TagGFP2 przyłączonego do danego białka ABC. Obserwacje prowadzono przyżyciowo. Reprezentatywne obrazy FLIM oraz średni czas życia fluorescencji zmierzony w danym układzie dla 6 komórek przedstawiono na rycinie 53.

Czas życia fluorescencji dla ABCC2-TagGFP2 i TagGFP2-ABCG2 jest jednakowy w nieobecności mitoksantronu i taki sam jak w przypadku komórek, które zawierają wolny TagGFP2 (patrz rycina 50A). Czas życia fluorescencji obu białek fuzyjnych maleje zależnie od stężenia podanego mitoksantronu. Dowodzi to, że w obu przypadkach między białkiem fluorescencyjnym i mitoksantronem zachodzi FRET, którego wydajność jest większa dla wyższych stężeń leku. Oznacza to, że mitoksantron wiąże się specyficznie z białkiem transportowym. Można zauważyć, że powyższa zależność nie ma jednakowego przebiegu dla obu białek. W przypadku białka ABCC2-TagGFP2 czas życia fluorescencji skraca się do wartości około 2,3 ns już przy zewnątrzkomórkowym stężeniu leku równym 25  $\mu$ M, ale wartość ta utrzymuje się na porównywalnie niskim poziomie nawet przy dziesięciokrotnie wyższym stężeniu leku. W przypadku białka TagGFP2-ABCG2 wartości średniego czasu życia fluorescencji maleją niewiele przy najmniejszych stężeniach leku, ale przy najwyższych stężeniach mitoksantronu czas życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 jest niższy niż czas życia białka ABCC2-TagGFP2 traktowanego analogicznymi stężeniami leku.



**Rycina 53.** Obrazowanie czasu życia fluorescencji komórek A549 po 48 h od transfekcji plazmidami niosącymi gen białka ABCC2-TagGFP2 (A.) lub białka TagGFP2-ABCG2 (B.). Komórki preinkubowano przez godzinę w obecności wskazanego stężenia mitoksantronu. Na obrazach przedstawiono przykładowe komórki oraz podano czas życia fluorescencji donora. Wartości na obrazach reprezentują średnią wartość ± średni błąd średniej, n = 6.

Aby wyjaśnić zaobserwowane zależności, dla każdego układu eksperymentalnego wykonano analizę składowych krzywej zaniku fluorescencji (wykonując dopasowanie do równania (1) podanego w podrozdziale 3.2.14.4.), zakładając, że pierwsza składowa ma czas życia fluorescencji odpowiadający wartości obserwowanej w nieobecności akceptora (równy 2,69 ns). Założenie takie wymusza obecność frakcji cząsteczek, które nie wykazują FRET, w celu sprawdzenia, jak zmienia się czas życia fluorescencji frakcji cząsteczek, które wykazują FRET. Analiza wykazała, że niezależnie od stężenia mitoksantronu czas życia fluorescencji drugiej składowej – zarówno dla TagGFP2-ABCG2, jak i dla ABCC2-TagGFP2 – wynosi około 1,5 ns. Wynik ten wskazuje, że w przypadku obu białek cząsteczki mitoksantronu, które obniżają czas życia fluorescencji donora, znajdują się w stałej i podobnej odległości od TagGFP2, którym wyznakowane są oba transportery. Dowodzi to, że mitoksantron wykazuje specyficzne oddziaływania zarówno z ABCG2, jak i z ABCC2, w obu przypadkach przyłączając się do miejsca wiązania substratu, które znajduje się w podobnej odległości od białka fluoryzującego.

Wiedząc, że dla obu białek skrócenie czasu życia fluorescencji wynika z obecności frakcji cząsteczek, do których przyłączony jest mitoksantron, dla każdego punktu eksperymentalnego obliczono, jaki procent wszystkich cząsteczek donora stanowią te cząsteczki, które wykazują FRET (czyli te o założonym czasie życia fluorescencji równym 1,50 ns). Ponieważ zjawisko FRET stanowi jeden z typów wygaszania dynamicznego fluorescencji (wydajność kwantowa fluorescencji obniża się proporcjonalnie do czasu życia fluorescencji), to amplituda danej składowej krzywej zaniku fluorescencji, a nie całkowita intensywność, jest proporcjonalna do liczby cząsteczek emitujących fotony danej składowej krzywej zaniku fluorescencji (wartość amplitudy jest proporcjonalna do liczby cząsteczek w stanie wzbudzonym, nawet jeśli te cząsteczki nie wyemitują fotonu ze względu na FRET). Procent cząsteczek, które oddziałują z mitoksantronem, wyliczono więc na podstawie wzoru:

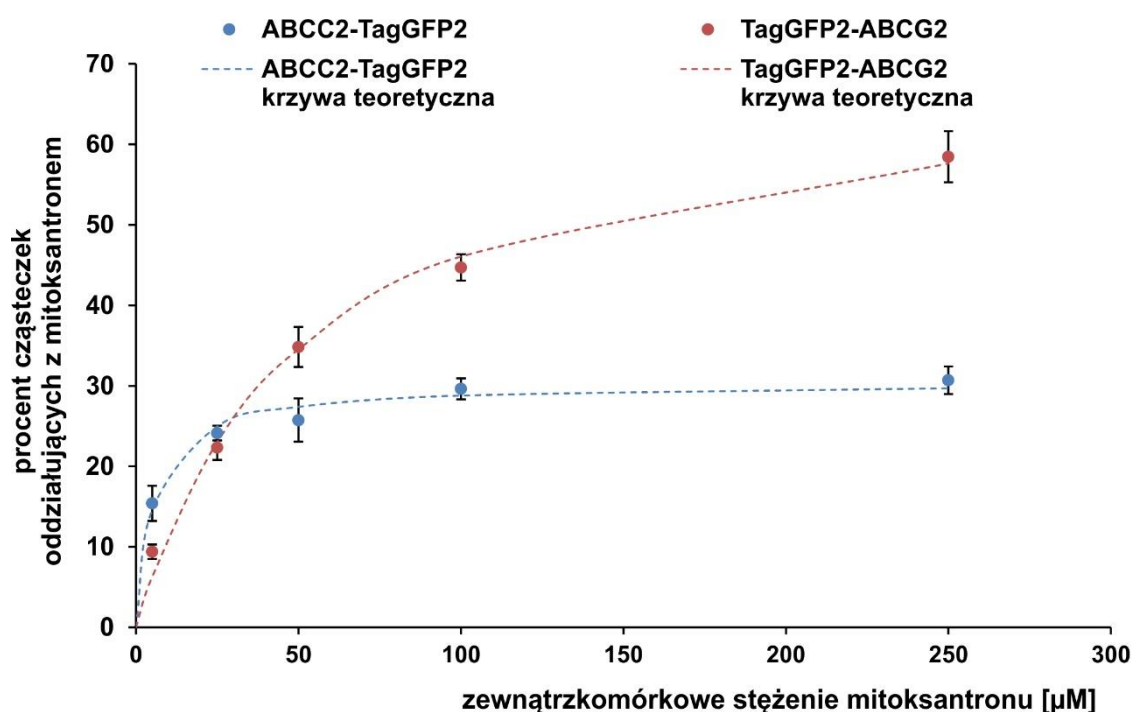
$$\frac{A_{1,50}}{A_{1,50} + A_{2,69}} \times 100\% \quad , \quad (6)$$

gdzie  $A_{1,50}$  to amplituda składowej o czasie życia 1,50 ns, a  $A_{2,69}$  to amplituda składowej o czasie życia 2,69 ns. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 54. Dla obu białek zaobserwowano kinetykę saturacyjną, zgodną z modelem odwracalnego procesu adsorpcji do ograniczonej liczby miejsc wiązania substratu.

Dane eksperymentalne dopasowano za pomocą nieliniowej metody najmniejszych kwadratów do krzywej o równaniu:

$$\theta = \theta_{max} \frac{c}{K_d + c} \quad , \quad (7)$$

gdzie  $\theta$  to procent cząsteczek donora, które wykazują FRET przy danym stężeniu  $c$  akceptora.  $\theta_{max}$  to maksymalny procent cząsteczek donora, które mogą wykazywać FRET.  $K_d$  odpowiada stałej dysocjacji akceptora od cząsteczek donora, co z kolei przekłada się na powinowactwo akceptora do donora, a eksperymentalnie jest to stężenie akceptora, przy którym połowa dostępnych miejsc wiązania (zawierających donor) jest wysycona.



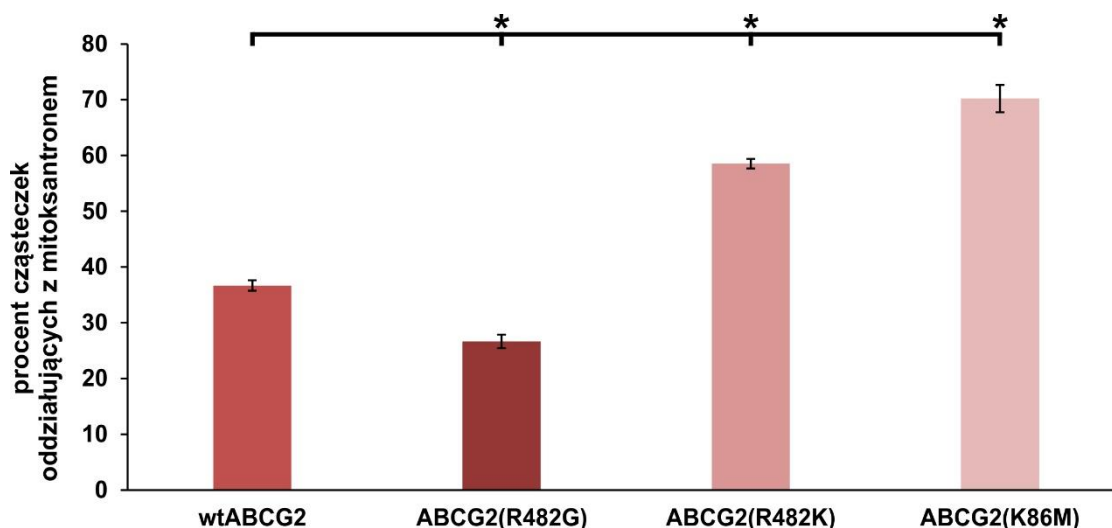
**Rycina 54.** Procent cząsteczek TagGFP2-ABCC2 i TagGFP2-ABCG2, które oddziałują z mitoksantronem w obecności różnego zewnątrzkomórkowego stężenia leku. Wartości wyliczono na podstawie równania (6) zgodnie z opisem w tekście. Wartości reprezentują średnią wartość  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 6$ . Wykres krzywej teoretycznej dopasowanej na podstawie danych eksperymentalnych do równania (7) przedstawiono za pomocą linii przerywanej.

W przypadku białka ABCC2-TagGFP2 wartość  $\Theta_{max}$  to jedynie około 30,4%, co wskazuje na to, że większość cząsteczek TagGFP2, które emitują fluorescencję, nie może wykazywać FRET z cząsteczkami mitoksantronu. Możliwe jest również, że znaczna część cząsteczek białka ABCC2-TagGFP2, które są produkowane w komórkach w nienaturalnie dużej ilości, jest niefunkcjonalna, to znaczy nie ma właściwej struktury trzeciorzędowej umożliwiającej wiązanie leku. Możliwe jest również, że część cząsteczek białka TagGFP2 odłącza się od białka

fuzyjnego ABCC2-TagGFP2 i w konsekwencji nie oddziałuje z cząsteczkami mitoksantronu, które wiążą się do transportera. Do tej frakcji cząsteczek, do której wiąże się mitoksantron, lek ma wysokie powinowactwo (czyli niską wartość  $K_d$ ). Połowa maksymalnej liczby miejsc wiązania jest zajęta przy zewnątrzkomórkowym stężeniu mitoksantronu równym 5,4  $\mu\text{M}$ . W przypadku białka TagGFP2-ABCG2 wartość  $\Theta_{\text{max}}$  to około 70,2%. Dowodzi to, że prawie wszystkie cząsteczki wyznakowanego fluorescencyjnie ABCG2 posiadają miejsce wiązania leku, czyli oddziałują tworząc dimer lub kompleksy wyższego rzędu. Możliwe jest, że ta część cząsteczek TagGFP2, która nie może wykazywać FRET, przyłączona jest do cząsteczek ABCG2, które nie sfałdowały się właściwie lub nie utworzyły właściwej struktury czwartorzędowej umożliwiającej wiązanie leku. Na podstawie danych przedstawionych na rycinie 54 można również zaobserwować, że połowa dostępnych miejsc wiązania w białku TagGFP2-ABCG2 zapełnia się przy dużo wyższym zewnątrzkomórkowym stężeniu mitoksantronu (50,2  $\mu\text{M}$ ), co wskazuje na to, że ten lek ma mniejsze powinowactwo do białka ABCG2 niż do białka ABCC2. Należy jednak pamiętać, że wspomniane powyżej wartości  $K_d$  dla obu transporterów to wartości pozorne, ponieważ wartości stężenia substratu (w tym wypadku cząsteczek donora, czyli mitoksantronu), z których wyliczono te stałe, to stężenia zewnątrzkomórkowe. Ze względu na procesy dyfuzji i transportu przez błonę plazmatyczną w bezpośrednim otoczeniu enzymu (czyli cząsteczek ABCG2 lub ABCC2) stężenie mitoksantronu jest inne. Ponieważ białka ABCG2 i ABCC2 mają różną szybkość transportu, przy tym samym zewnątrzkomórkowym stężeniu leku równowaga między procesami dyfuzji przez błonę i procesem transportu zależnym od transportera ABC ustala się przy innym stężeniu mitoksantronu w przestrzeni po cytoplazmatycznej stronie błony, w której zakotwiczony jest znakowany transporter. W takiej sytuacji z bezpośredniego porównania ze sobą wartości powinowactwa wyznaczonych na podstawie zewnątrzkomórkowego stężenia substratu nie można wyciągać wniosków ilościowych. Ponieważ mitoksantron jest bardzo szybko transportowany przez białko ABCG2, stężenie leku, które znajduje się w otoczeniu transportera, jest niższe niż stężenie zewnątrzkomórkowe, a w konsekwencji rzeczywiste powinowactwo mitoksantronu do ABCG2 jest wyższe niż odpowiadające wartości pozornej wyznaczonej powyżej.

W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, w jaki sposób modyfikacja aktywności transportowej białka ABCG2 wpływa na oddziaływania enzym-substrat obserwowane za pomocą opisanej powyżej techniki. Komórki A549 transfekowano przejściowo za pomocą plazmidów niosących gen wyznakowanego fluorescencyjnie za pomocą TagGFP2 białka ABCG2 o różnej sekwencji. Były to: białko o sekwencji referencyjnej (wtABCG2), białko o zmienionej specyficzności substratowej (mutacja R482G i mutacja R482K) oraz białko z mutacją w sekwencji Walkera A, przez co ten wariant nie może hydrolizować ATP (mutacja punktowa K86M). Po 48 h od

transfekcji komórki traktowano za pomocą 50  $\mu\text{M}$  mitoksantronu i po godzinie od dodania leku wykonywano przyżyciowe pomiary czasu życia fluorescencji odpowiednio zmodyfikowanych białek TagGFP2-ABCG2. Krzywe zaniku fluorescencji, podobnie jak poprzednio, rozdzielono na składowe odpowiadające frakcji cząsteczek wykazującej FRET (o czasie życia fluorescencji równym 1,50 ns) i nie wykazującej FRET (o czasie życia fluorescencji równym 2,69 ns). Dla każdego z białek wyliczono, jaki procent wszystkich cząsteczek TagGFP2-ABCG2 stanowią cząsteczki, które oddziałują z mitoksantronem. Wyniki przedstawiono na rycinie 55.



**Rycina 55.** Procent cząsteczek różnych wariantów sekwencyjnych białka TagGFP2-ABCG2, które oddziałują z mitoksantronem. Komórki A549 po 48 h od transfekcji obserwowano przyżyciowo po godzinnej preinkubacji z 50  $\mu\text{M}$  mitoksantronem. Podane wartości wyliczono na podstawie równania (6) zgodnie z opisem w tekście. Wartości reprezentują średnią wartość  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 6$ . \*  $p < 0,05$ .

Dla każdego z wariantów białka różna frakcja cząsteczek donora jest zaangażowana w oddziaływanie z akceptorem. W przypadku białka wtABCG2 dla zastosowanego zewnątrzkomórkowego stężenia mitoksantronu około 37% wszystkich cząsteczek TagGFP2-ABCG2 oddziałuje z lekiem. W przypadku białka ABCG2(R482G) mniejszy procent cząsteczek donora wykazuje FRET (około 27%). Wynikać to może z nałożenia się dwóch efektów. Po pierwsze, ten mutant punktowy białka ABCG2 znacznie lepiej transportuje antracykliny, w tym mitoksantron. Dzieje się tak ze względu na ułatwione przekazywanie impulsu allosterycznego niezbędnego do przesunięcia substratu poza miejsce wiązania. W konsekwencji białko krótszy okres spędza w stanie zajęty przez substrat związany do kieszeni pierwszej, gdzie znajduje się w odległości od TagGFP2, która umożliwia FRET. Po drugie, ze względu na zwiększoną aktywność transportową wewnątrzkomórkowe stężenie leku (w przestrzeni błony plazmatycznej wokół białka ABCG2) jest niższe w komórkach z TagGFP2-ABCG2(R482G) niż w komórkach z TagGFP2-wtABCG2. Sprawia to, że przy tym

samym zewnątrzkomórkowym stężeniu leku białko TagGFP2-ABCG2(R482G) ma mniejszą dostępną do wiązania liczbę cząsteczek akceptora.

W przypadku białka zawierającego mutację R482K wiadomo, że wariant ten nie jest w stanie transportować mitoksantronu, ale nie oznacza to, że nie jest w stanie wiązać substratu. Przeciwnie, substrat spędza dłuższy czas będąc związany do kieszeni pierwszej, bo nie jest transportowany. Dodatkowo nietransportowany lek osiąga w tym wypadku wyższe wewnątrzkomórkowe stężenie, co również zwiększa prawdopodobieństwo wiązania do kieszeni pierwszej enzymu. Wszystko to przekłada się na wyższy procent oddziaływań FRET obserwowany dla tego mutantu (około 59%). Białko TagGFP2-ABCG2(K86M) ma jeszcze wyższy procent oddziałujących cząsteczek TagGFP2 (około 70%), ponieważ mutacja ta całkowicie uniemożliwia aktywność ATPazową i w związku z tym blokuje aktywność transportową białka ABCG2. Zarówno dla białka TagGFP2-ABCG2(R482K), jak i dla białka TagGFP2-ABCG2(K86M) procent cząsteczek TagGFP2 oddziałujących z cząsteczkami mitoksantronu jest znacznie wyższy niż dla białka TagGFP2-wtABCG2. Dzieje się tak, ponieważ pomimo zmniejszonej lub zniesionej aktywności transportowej oba te warianty białka ABCG2 nadal wydajnie wiążą mitoksantron w kieszeni pierwszej enzymu umożliwiając wydajne oddziaływanie FRET.

#### **4.2.2.2. Badanie oddziaływań ABCG2-flawonoid**

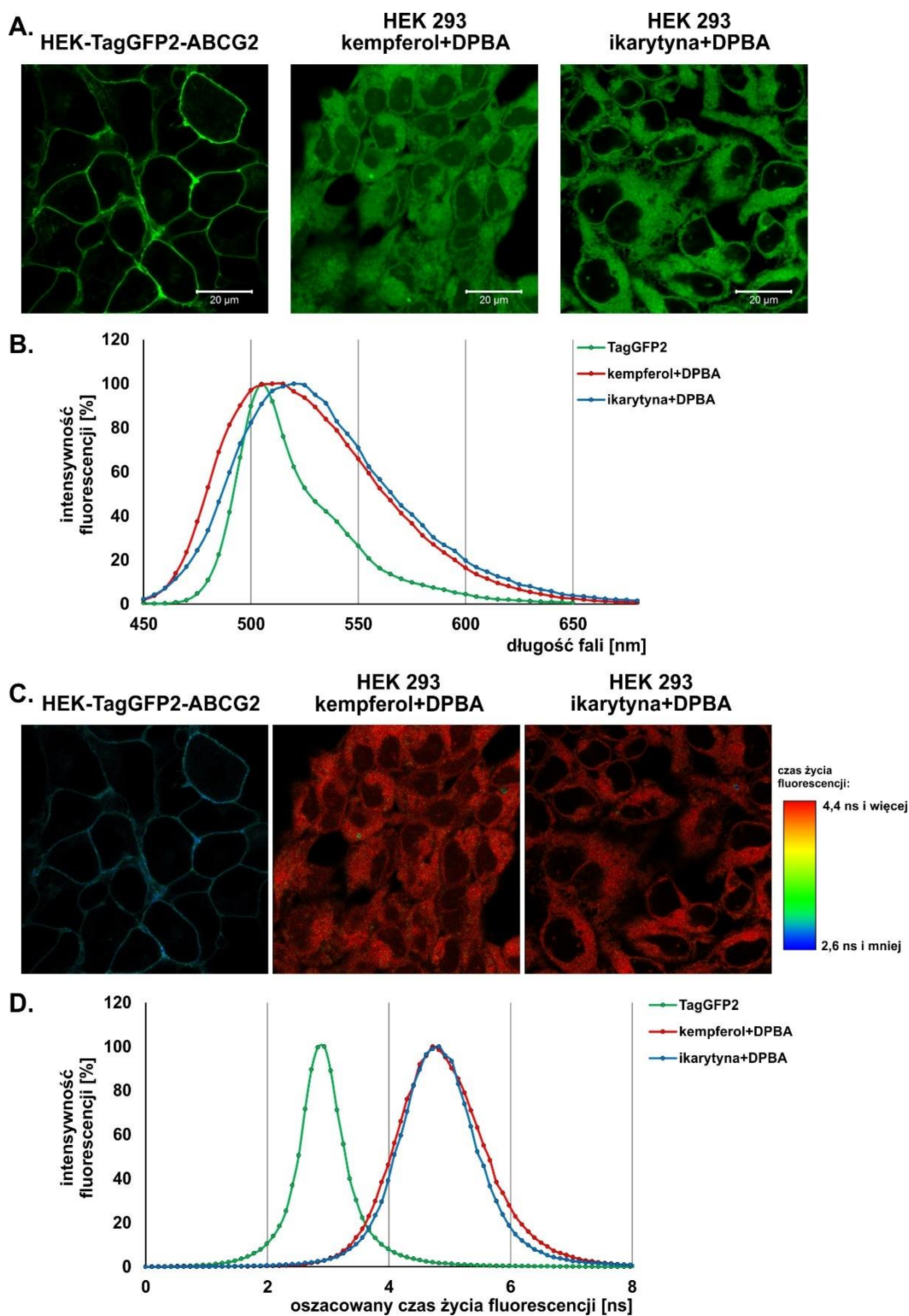
Zbadano, czy czasowo-rozdzielczą dekonwolucję obrazów FLIM można wykorzystać do oceny aktywności transportowej białka ABCG2 wyznakowanego za pomocą zielonego białka fluoryzującego. W tym celu wybrano dwa flawonoidy: kempferol i ikarytynę, ponieważ, jak wykazały wcześniejsze wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie, związki te tworzą w reakcji z DPBA produkty o intensywnej zielonej fluorescencji, a także ponieważ kempferol jest substratem ABCG2, a ikarytyna nie (patrz podrozdział 4.1.2.4, rycina 43). W doświadczeniu kontrolnym porównano fluorescencję białka TagGFP2-ABCG2 i produktów reakcji flawonoidów z DPBA. Przygotowano preparat komórek HEK-TagGFP2-ABCG2, a także preparaty komórek HEK 293 inkubowanych przez godzinę w obecności kempferolu lub ikarytyny, które następnie traktowano DPBA, przeprowadzając flawonoidy w ich fluoryzujące pochodne. Wykonano obrazowanie mikroskopowe przygotowanych preparatów stosując wzbudzenie laserem emitującym światło o długości fali 490 nm. Na rycinie 56A przedstawiono przykładowe obrazy mikroskopowe fluorescencji białka TagGFP2-ABCG2 w komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2 oraz fluorescencyjnych pochodnych kempferolu i ikarytyny znajdujących się wewnątrz komórek HEK 293. W komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2 sygnał fluorescencyjny zlokalizowany jest głównie w błonach plazmatycznych komórek. W przypadku komórek HEK 293 fluorescencja pochodnych flawonoidów zlokalizowana jest w cytozolu



komórek. Jak pokazano na rycinie 56B, widma emisji fluorescencji białka TagGFP2 oraz fluorescencyjnych pochodnych kempferolu (kempferol+DPBA) i ikarytyny (ikarytyna+DPBA) w dużej mierze się pokrywają przy ekscytacji światłem o długości fali 440 nm. Fluorofory mają podobne maksima emisji: TagGFP2 ok. 505nm, kempferol+DPBA ok. 510 nm, a ikarytyna+DPBA ok. 520 nm. Dodatkowo przy długości fali 550 nm, przy której różnice między widmami są największe, każdy z fluoroforów nadal wykazuje silną emisję fluorescencji: kempferol+DPBA ok. 66%, ikarytyna+DPBA ok. 71%, a TagGFP2 ok. 27% intensywności maksymalnej. Dlatego nie ma możliwości wiarygodnego optycznego rozdzielania pochodzących od nich sygnałów fluorescencyjnych w obrazie mikroskopowym na podstawie różnic w długości fali emisji, czyli tzw. dekonwolucji spektralnej.

Stosując czasowo-rozdzielczą spektroskopię fluorescencji, dla opisanych powyżej preparatów wykonano obrazowanie FLIM. Obrazy FLIM uzyskane dla pól widzenia pokazanych na rycinie 56A przedstawiono na rycinie 56C. Kolor pikseli na obrazie komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 (niebiesko-zielony) jest inny niż kolor pikseli na obrazie komórek HEK 293 zawierających fluorescencyjne pochodne flawonoidów (czerwony), ponieważ czas życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 jest różny od czasu życia fluorescencji kempferol+DPBA i ikarytyna+DPBA. Na rycinie 56D przedstawiono histogramy wartości czasów życia fluorescencji w pikselach obrazów przedstawionych na rycinie 56C. Część wspólna histogramów wynosi tylko około 5% ich sumarycznej powierzchni. Widać zatem, że możliwa jest wiarygodna czasowo-rozdzielcza dekonwolucja sygnałów (w tym samym pikselu obrazu w mikroskopie konfokalnym) pochodzących od TagGFP2-ABCG2 i od pochodnych flawonoidów.

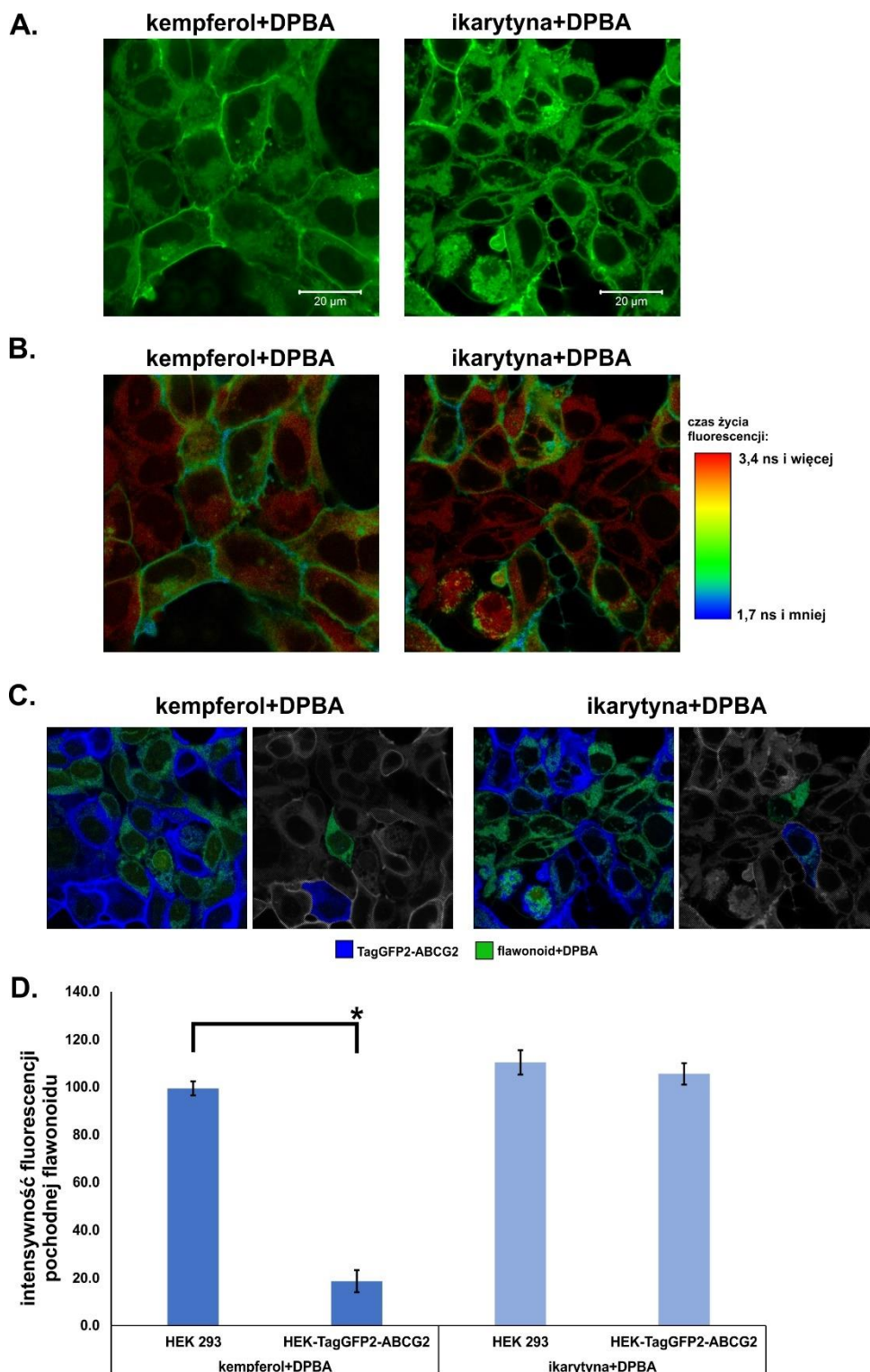
Dla każdego z fluoroforów krzywe zaniku fluorescencji sporządzone dla całego pola widzenia dopasowano do równania (1) (jak opisano w podrozdziale 3.2.14.4.). Umożliwiło to wyznaczenie dokładnych czasów życia fluorescencji dla każdego fluoroforu. Czas życia fluorescencji TagGFP2-ABCG2 wynosi  $2,69 \pm 0,01$  ns, czas życia fluorescencji kempferol+DPBA wynosi  $4,46 \pm 0,02$  ns, a czas życia fluorescencji ikarytyna+DPBA wynosi  $4,45 \pm 0,02$  ns. Przedstawione wartości to średnia  $\pm$  średni błąd średniej wyznaczone na podstawie pomiarów wykonanych dla czterech pól widzenia.



**Rycina 56.** Porównanie widm emisji fluorescencji oraz czasu życia fluorescencji TagGFP2, kempferol+DPBA i ikarytyna+DPBA. **A.** Konfokalne obrazy mikroskopowe komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 oraz komórek HEK 293 zawierających fluorescencyjne pochodne flawonoidów. W kolorze zielonym pokazano fluorescencję w zakresie 500-550 nm przy wzbudzeniu światłem o długości fali 490 nm. **B.** Widma emisji fluorescencji przy wzbudzeniu 440 nm. Widmo dla TagGFP2 sporządzono na podstawie danych udostępnionych przez producenta (<https://evrogen.com/products/TagGFP2/>). Widma dla fluorescencyjnych pochodnych flawonoidów sporządzono na podstawie danych opisanych w rozdziale 4.1.1.2. **C.** Obrazy FLIM wykonane dla pól widzenia przedstawionych w panelu A. **D.** Histogramy czasów życia fluorescencji oszacowanych w pojedynczych pikselach obrazów przedstawionych w panelu C.

Czasy życia fluorescencji pochodnych kempferol+DPBA i ikarytyna+DPBA nie różnią się od siebie. Dowodzi to, że struktura elektronowa oraz mechanizm ekscytacji i emisji fluorescencji są dla tych dwóch związków bardzo podobne. TagGFP2-ABCG2 charakteryzuje się znacząco krótszym czasem życia fluorescencji niż produkty reakcji flawonoidów z DPBA.

Przeprowadzono doświadczenie, w którym zbadano, czy obserwowane różnice w czasach życia fluorescencji umożliwiają jakościowe i ilościowe rozdzielanie sygnałów pochodzących od obu typów fluoroforów widocznych w tym samym pikselu. Przygotowano hodowlę mieszaną równej liczby komórek HEK 293 oraz HEK-TagGFP2-ABCG2. Komórki inkubowano z kempferolem lub z ikarytyną, po czym potraktowano je DPBA, przeprowadzając flawonoidy w ich fluorescencyjne pochodne. Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego, rejestrując intensywność zielonej fluorescencji oraz wykonując FLIM. Przykładowe obrazy intensywności fluorescencji przedstawiono na rycinie 57A. Obrazy FLIM tych samych pól widzenia przedstawiono na rycinie 57B. Ponieważ fluorescencja pochodnych flawonoidów zakumulowanych wewnątrz komórek HEK 293 jest emitowana w tym samym zakresie długości fali co fluorescencja białka TagGFP2-ABCG2, na podstawie obrazów intensywności fluorescencji nie można jednoznacznie odróżnić komórek HEK-293 od komórek HEK-TagGFP2-ABCG2. Obrazy FLIM umożliwiają łatwe rozróżnienie tych dwóch typów komórek. Komórki HEK 293 zawierają jedynie fluorofory charakteryzujące się długim czasem życia fluorescencji (kempferol+DPBA lub ikarytyna+DPBA) przedstawione na rycinie 57B w kolorze czerwonym. W komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2 rejestrowany sygnał pochodzi zarówno od białka TagGFP2-ABCG2, jak i od fluorescencyjnej pochodnej flawonoidu. Piksele błony plazmatycznej tych komórek mają kolor niebiesko-zielony, ponieważ dominuje w nich sygnał pochodzący od TagGFP2-ABCG2, o krótkim czasie życia fluorescencji. Piksele cytoplazmy komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 mają zróżnicowany kolor (zielony, pomarańczowy lub czerwony), ponieważ zarejestrowany średni czas życia fluorescencji pochodzi w nich od nałożenia różnej ilości sygnałów (a co za tym idzie intensywności pseudokolorów w pikselach) od TagGFP2-ABCG2 i fluorescencyjnej pochodnej flawonoidu.



**Rycina 57.** Badanie aktywności białka ABCG2 z wykorzystaniem FLIM. Mieszaniny komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 i komórek HEK-293 inkubowano przez godzinę w obecności kempferolu lub ikarytyny, a następnie traktowano za pomocą DPBA. **A.** Obrazy intensywności fluorescencji przykładowych pól widzenia. **B.** Obrazy FLIM zarejestrowane dla pól widzenia pokazanych w panelu A. **C.** Obrazy FLIM dwóch reprezentatywnych pól widzenia po dekonwolucji czasowo-rozdzielczej. Kolor i intensywność pikseli odpowiadają sygnałowi wskazanej składowej krzywej zaniku fluorescencji. Dla każdego pola widzenia na obrazie po prawo pokazano region odpowiadający pojedynczej komórce HEK 293 oraz HEK-TagGFP2-ABCG2 wybrany do analizy ilościowej. **D.** Analiza ilościowa intensywności fluorescencji pochodzącej od pochodnej flawonoidu w komórkach danego typu. Przedstawiono wartość średnią, słupki błędów to średni błąd średniej,  $n = 18$ , \*  $p < 0.05$ .

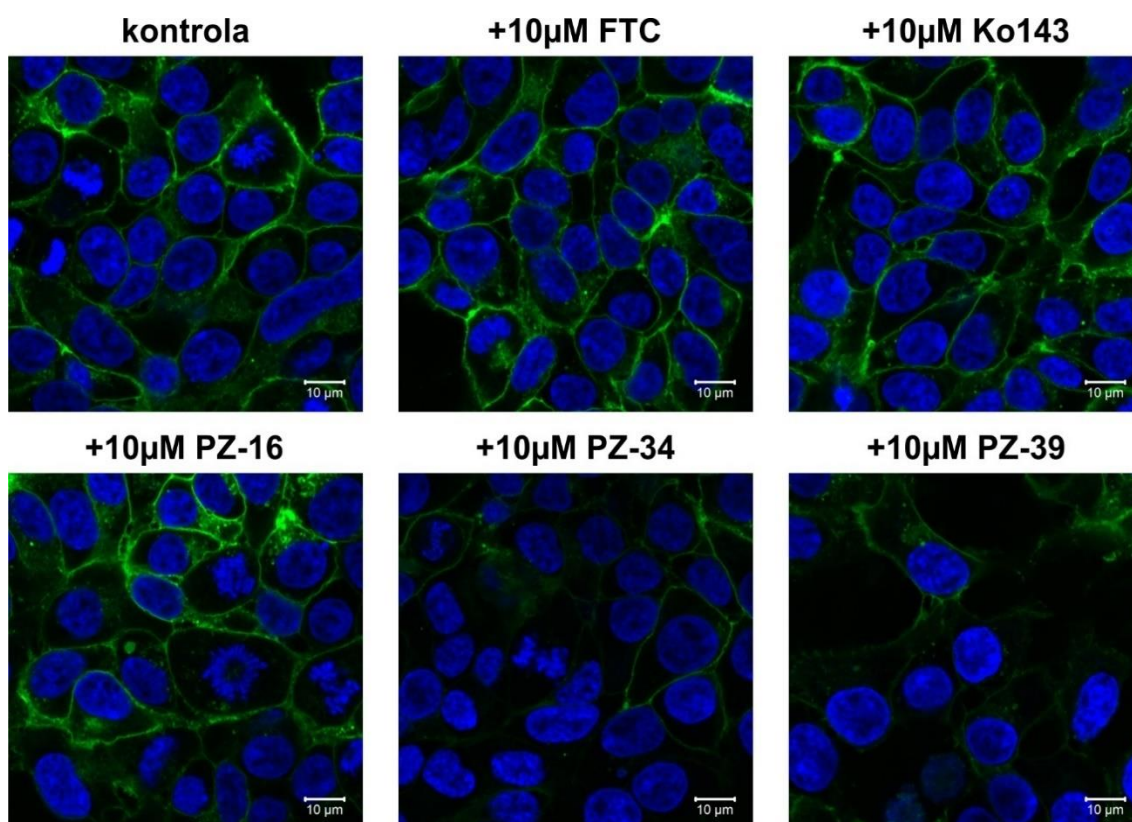
Aby umożliwić analizę ilościową, wykonano czasowo-rozdzielczą dekonwolucję obrazów FLIM (jak opisano w podrozdziale 3.2.14.5.) dla każdego pikselu, uzyskując dane dotyczące liczby fotonów pochodzących od TagGFP2-ABCG2 i od fluorescencyjnej pochodnej flawonoidu. W każdym pikselu obrazów sygnał pochodzący od TagGFP2-ABCG2 zakodowano na niebiesko, a sygnał pochodzący od pochodnej flawonoid+DPBA zakodowano na zielono. Intensywność każdego koloru określono przez liczbę fotonów danego typu. Przykładowe obrazy uzyskane po dekonwolucji przedstawiono na rycinie 57C. Komórki HEK 293 zawierają jedynie zielone piksele (emitują tylko sygnał pochodzący od pochodnych flawonoidów), a komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 zawierają piksele niebieskie i zielone o zróżnicowanej intensywności (złożenie sygnału od TagGFP2-ABCG2 i pochodnych flawonoidów). Z tego powodu bardzo łatwo można wyznaczyć regiony obrazów zawierające pojedyncze komórki danego typu (jak pokazano na rycinie 57C). Dla każdego flawonoidu na 3 polach widzenia zaznaczono w ten sposób po 6 komórek HEK 293 oraz HEK-TagGFP2-ABCG2. W tak wybranych regionach przeanalizowano dane dotyczące liczby fotonów wyemitowanych przez fluorescencyjną pochodną flawonoidu. Sumę wszystkich fotonów tego typu w danym regionie obrazu podzielono przez liczbę pikseli danego regionu uzyskując wartość odpowiadającą intensywności fluorescencji. Wyniki uzyskane dla wszystkich przeanalizowanych regionów przedstawiono na rycinie 57D.

W komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2 gęstość fotonów pochodzących od pochodnej kempferolu była znacząco niższa niż w komórkach HEK 293. Różnicy tej nie zaobserwowano w przypadku fluorescencyjnej pochodnej ikarytyny. Wynik ten potwierdza, że kempferol – w przeciwieństwie do ikarytyny - jest substratem białka ABCG2. Intensywność fluorescencji produktu kempferol+DPBA jest niższa w komórkach zawierających wyznakowane fluorescencyjnie białko ABCG2, ponieważ kempferol jest transportowany na zewnątrz tych komórek i jego stężenie jest w nich niższe, co skutkuje niższym stężeniem fluorescencyjnej pochodnej po derywatacji za pomocą DPBA. Ikarytyna, która nie jest substratem ABCG2, nie jest transportowana na zewnątrz komórek HEK-TagGFP2-ABCG2, dlatego gromadzi się w nich w takiej samej ilości jak w komórkach HEK 293. Powyższe doświadczenie dowodzi, że w przypadku, kiedy dekonwolucja spektralna nie jest możliwa, dekonwolucja czasowo-rozdzielcza może pozwolić na ilościową analizę aktywności białka ABCG2.

#### 4.3. Badanie zmian w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołanych inhibitorami

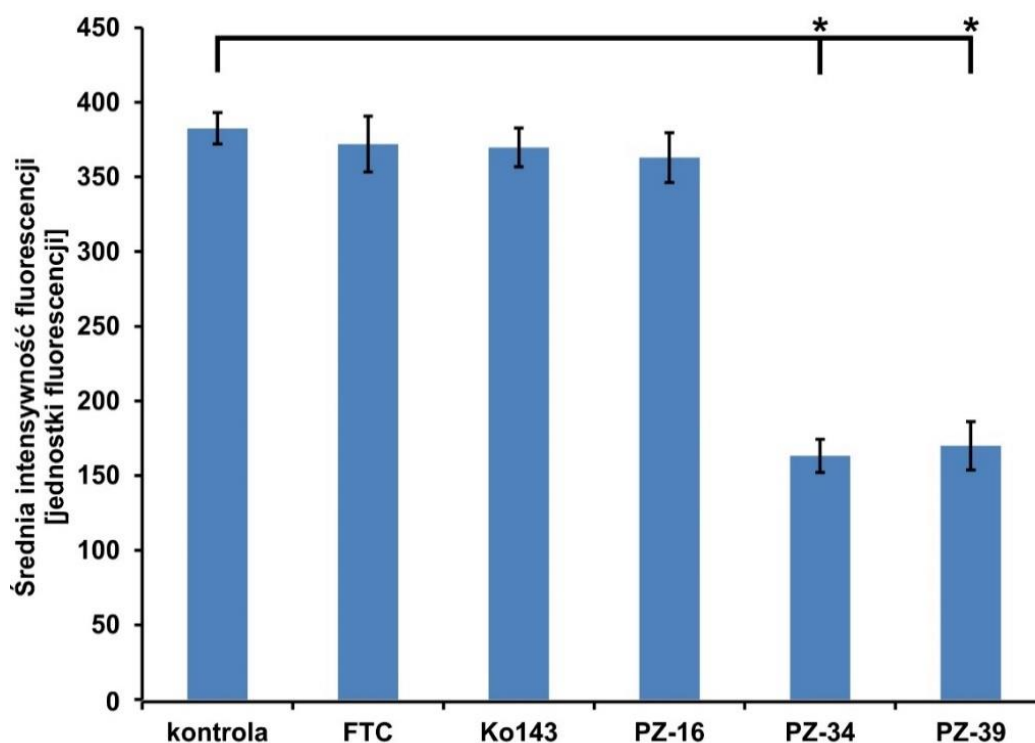
##### 4.3.1. Zmiany w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołane drobnocząsteczkowymi inhibitorami białka ABCG2

Stosując linię komórkową o stabilnej ekspresji białka ABCG2 wyznakowanego fluorescencyjnie białkiem TagGFP2 zbadano, w jaki sposób traktowanie drobnocząsteczkowymi inhibitorami ABCG2 wpływa na ekspresję i lokalizację komórkową tego białka. Komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 hodowano w obecności wybranych inhibitorów (FTC, Ko143, PZ-16, PZ-34, PZ-38 oraz PZ-39) przez 48 h w pełnym medium hodowlanym. Po tym czasie komórki utrwalano i wybarwiano ich jądra komórkowe. Sygnał fluorescencyjny białka TagGFP2-ABCG2 analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Na rycinie 58 przedstawiono przykładowe pola widzenia, a na rycinie 59 przedstawiono analizę ilościową sygnału białka TagGFP2-ABCG2 przeprowadzoną na podstawie obrazów komórek na czterech pola widzenia.



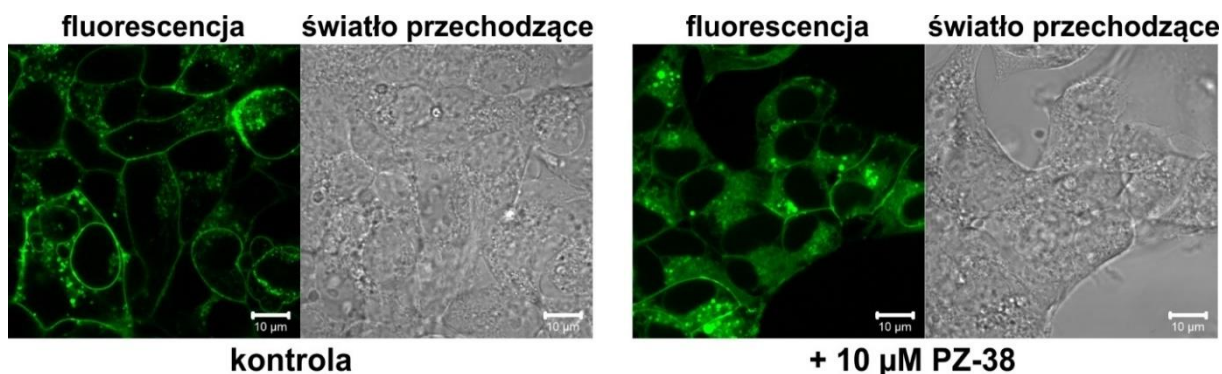
**Rycina 58.** Przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 po 48 h inkubacji z inhibitorami. Na zielono przedstawiono sygnał białka TagGFP2-ABCG2. Jądra komórkowe (niebieski sygnał) wybarwiono za pomocą Hoechst33342.

Trzy z badanych związków: FTC, Ko143 oraz PZ-16 nie powodują zmian w poziomie ekspresji białka. Nie powodują również zauważalnych zmian w lokalizacji wewnątrzkomórkowej – białko znajduje się głównie w błonach plazmatycznych. Dwa inhibitory: PZ-34 oraz PZ-39 powodują znaczne obniżenie ilości białka TagGFP2-ABCG2 po 48 h inkubacji. Tylko w nielicznych komórkach w tym przypadku białko znajduje się w błonach plazmatycznych, a jego ilość jest wtedy zauważalnie mniejsza, niż w komórkach kontrolnych.



**Rycina 59.** Poziom ekspresji białka TagGFP2-ABCG2 w komórkach linii HEK-TagGFP2-ABCG2 po 48 h inkubacji z wybranymi inhibitorami w stężeniu 10  $\mu$ M. Na wykresie przedstawiono wartości średnie intensywności fluorescencji w kanale TagGFP2, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 4; \* p < 0.05.

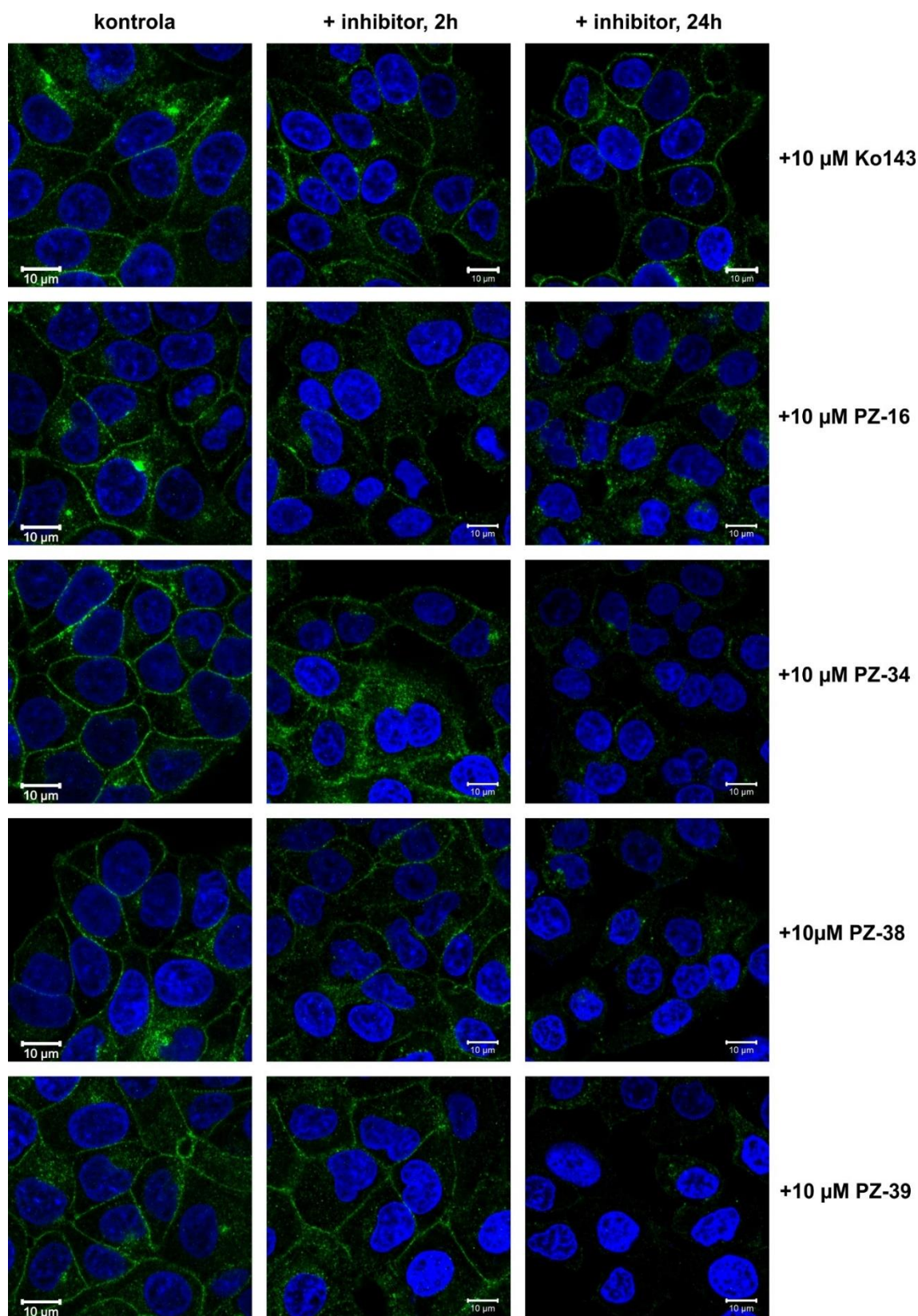
Inny inhibitor z rodziny PZ, PZ-38, wykazuje silną zieloną fluorescencję, której zakres emisji nakłada się na zakres emisji białka TagGFP2. Jak pokazano na rycinie 60, już 30-minutowa inkubacja z PZ-38 powoduje widoczne zwiększenie ilości sygnału fluorescencyjnego w strukturach błonowych komórek ze względu na gromadzenie się w nich inhibitora. Nie udało się również próba czasowo-rozdzielczego rozróżnienia sygnałów techniką FLIM, ponieważ czas życia fluorescencji PZ-38 jest zbyt zbliżony do czasu życia fluorescencji TagGFP2. W związku z tym nie udało się ocenić wpływu tego związku na ekspresję białka w komórkach HEK-TagGFP2-ABCG2.



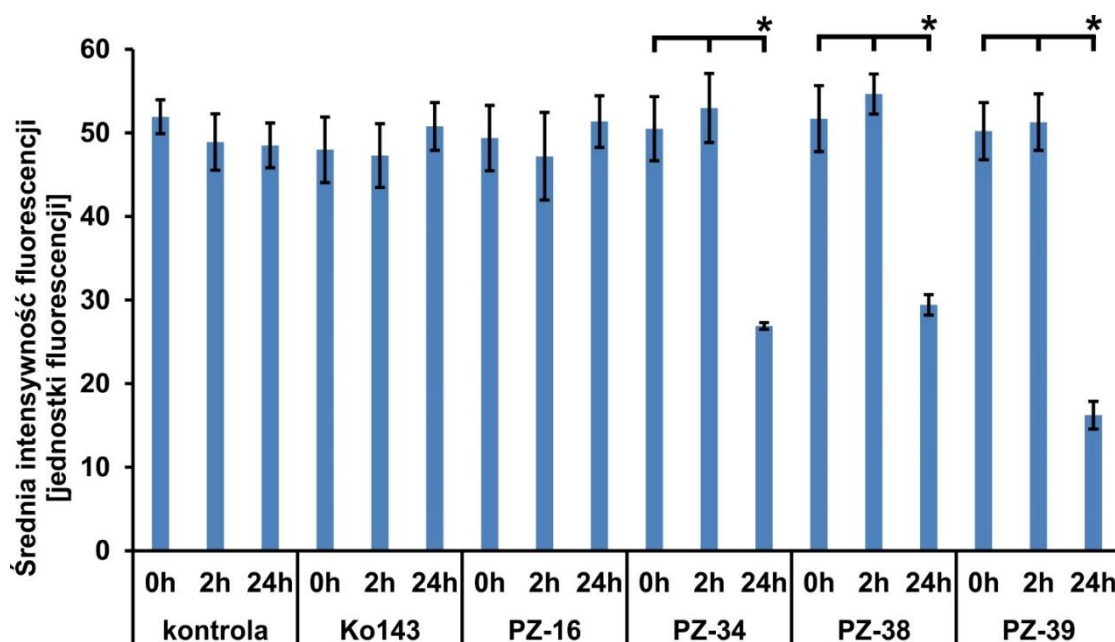
**Rycina 60.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 uzyskane w nieobecności inhibitorów (kontrola) lub po 30 minutowej inkubacji z PZ-38. Na zielono przedstawiono sygnał zarejestrowany kanale emisji TagGFP2.

Wpływ drobnocząsteczkowych inhibitorów ABCG2 na ekspresję i lokalizację tego białka zbadano również za pomocą innego modelu komórkowego. Do tego celu zastosowano linię nowotworową A549, ponieważ białko ABCG2 jest w niej ekspresjonowane na wysokim poziomie. Komórki hodowano przez 24 h w obecności inhibitorów. Aby zbadać zmiany zachodzące w czasie, tak samo przygotowane preparaty komórek utrwalano bezpośrednio po dodaniu inhibitorów (kontrola), po 2 h i po 24 h. Następnie białko ABCG2 barwiono immunofluorescencyjnie stosując przeciwciało BXP-34 rozpoznające wewnątrzkomórkowy epitet białka ABCG2. Aby umożliwić związanie się przeciwciała, komórki permeabilizowano buforem zawierającym Triton X-100. Preparaty komórek analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe pola widzenia pokazano na rycinie 61. Analizę ilościową wykonaną na podstawie czterech pól widzenia przedstawiono na rycinie 62.





**Rycina 61.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 po inkubacji z inhibitorami. Po inkubacji komórki utrwalono i białko ABCG2 wizualizowano immunofluorescencyjnie za pomocą przeciwciała BXP-34 i przeciwciała drugorzędowego zabarwionego Alexa Fluor 488 (zielony sygnał). Jądra komórkowe (niebieski sygnał) wybarwiono za pomocą Hoechst33342.



**Rycina 62.** Poziom ekspresji białka ABCG2 w komórkach linii A549 po inkubacji z inhibitorami. Na wykresie przedstawiono wartości średnie intensywności sygnału immunofluorescencyjnego ABCG2, słupki błędów to średni błąd średniej, n = 4, \* p < 0.05.

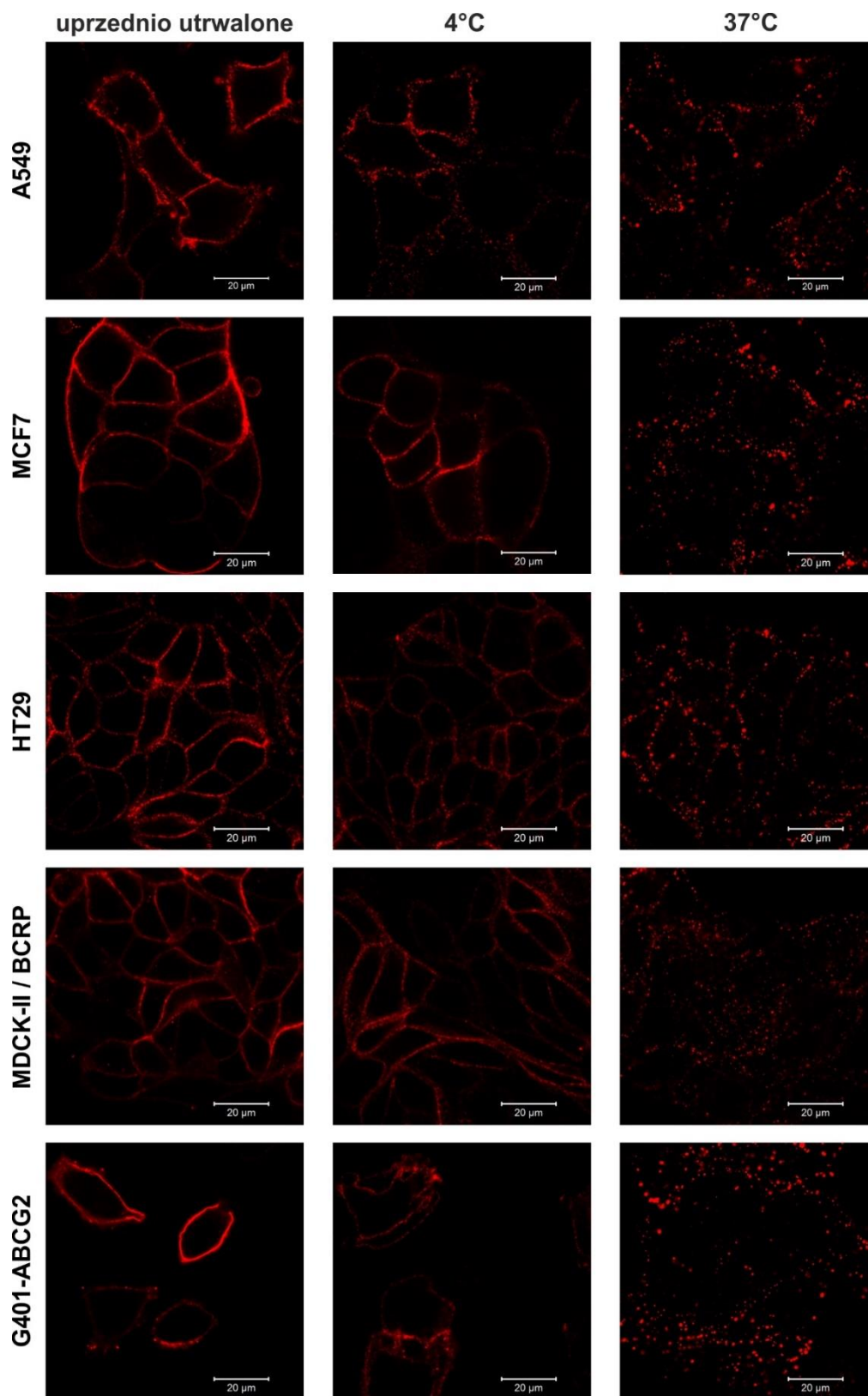
Żaden z inhibitorów nie powoduje zauważalnych zmian w ilości ani lokalizacji białka po 2 h inkubacji. Podobnie jak w komórkach kontrolnych, po 2 h transporter znajduje się głównie w błonach plazmatycznych. Po 24 h inkubacji jedynie Ko143 nie powoduje zmian ani w ilości, ani w lokalizacji białka ABCG2. PZ-34, PZ-38 i PZ-39 istotnie obniżają ilość białka ABCG2, a największy wpływ na ekspresję w linii A549 ma związek PZ-39 (rycina 62). Inkubacja z tym inhibitorem obniża poziom białka ABCG2 w błonach plazmatycznych niemal do ilości niewykrywalnej za pomocą immunofluorescencji (rycina 61). Frakcja białka, która pozostaje w komórkach po tym czasie, jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo, gdzie nie może pełnić funkcji eksportera. W przypadku związku PZ-16 całkowita ilość białka nie zmienia się znacząco w linii A549 po 24 h, ale duża część sygnału ulega translokacji z błony plazmatycznej do wnętrza komórek (rycina 61). Zwiększa się ilość sygnału zlokalizowanego wokół jąder komórkowych, a zmniejsza się ilość sygnału pochodzącego z błon plazmatycznych (widocznego na granicy między komórkami).

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje postawiono hipotezę, że zjawisko redystrybucji wewnątrzkomórkowej białka ABCG2 wywołane związaniem inhibitorów jest zjawiskiem występującym w odpowiedzi na określone zmiany konformacyjne. Zbadano, jaki wpływ na ekspresję i lokalizację transportera ma przeciwciało monoklonalne 5D3, które po związaniu się do epitopu zewnątrzkomórkowego blokuje białko ABCG2 w jednej z konformacji i tym samym uniemożliwia pełnienie funkcji eksportera.

#### **4.3.2. Zmiany w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2 wywołane interakcją z przeciwciałem 5D3**

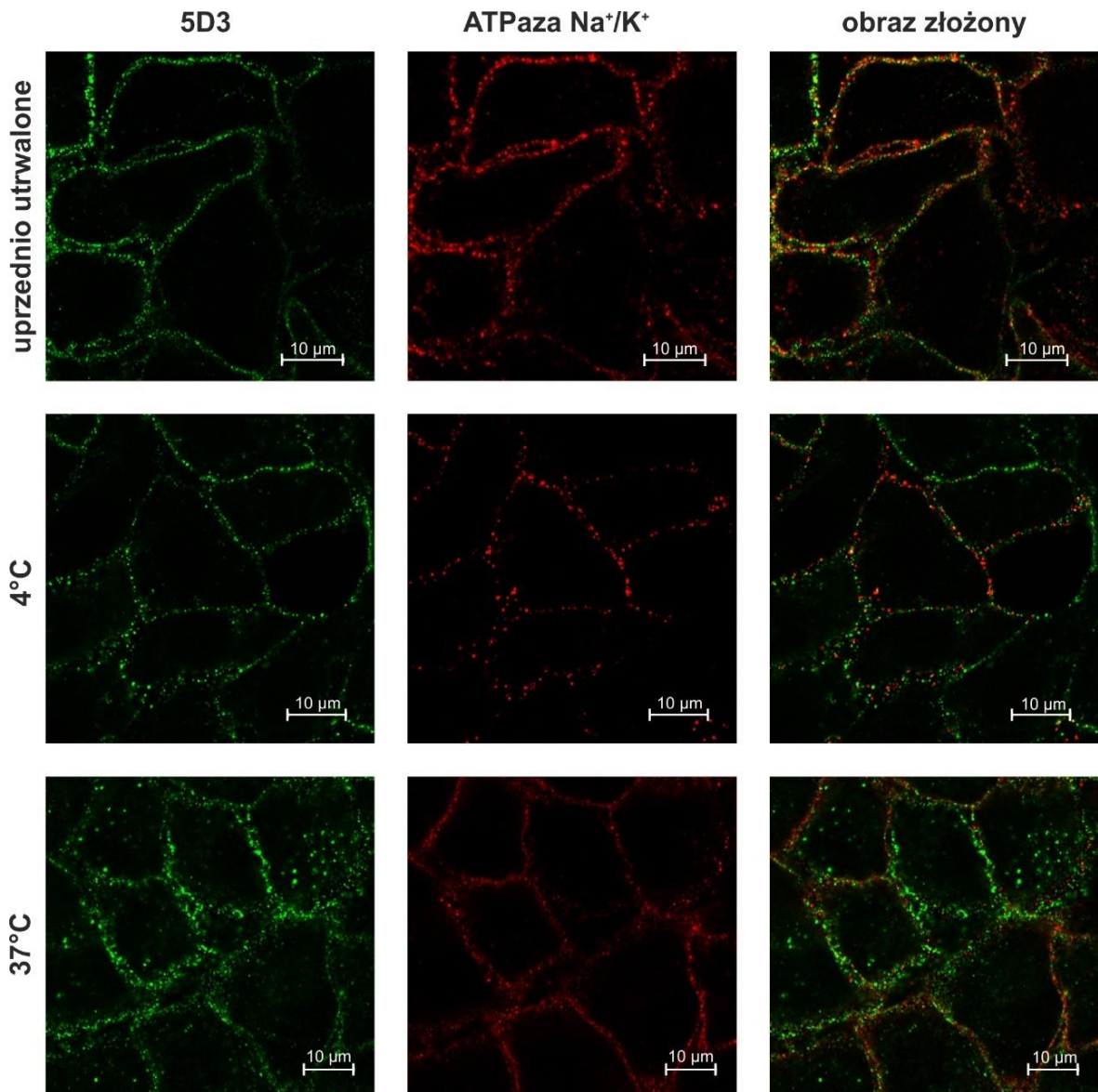
##### **4.3.2.1. Internalizacja białka ABCG2 stymulowana opsonizacją przez przeciwciało 5D3**

W doświadczeniu wstępnym przetestowano komórki pięciu różnych linii komórkowych o znanej wysokiej ekspresji białka ABCG2: A549, MCF7, HT29, MDCK-II/BCRP oraz G401-ABCG2 (opis linii patrz 3.1.4.). Komórki inkubowano z przeciwciałem 5D3 w trzech układach eksperymentalnych. W pierwszym komórki zostały uprzednio utrwalone, w drugim przeciwciało wiązano w niskiej temperaturze (4°C), a w trzecim przeciwciało inkubowano z komórkami w normalnej temperaturze hodowli (37°C). Dwa pierwsze układy miały na celu zablokowanie lub ograniczenie potencjalnych aktywnych procesów redystrybucji komórkowej białka ABCG2, w trzecim procesy te były możliwe. Po dwóch godzinach inkubacji z przeciwciałem komórki utrwalano, a związane przeciwciało pierwszorzędowe wykrywano (po uprzedniej permeabilizacji komórek) za pomocą wyznakowanego fluorescencyjnie przeciwciała drugorzędowego. Komórki analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe obrazy przedstawiono na rycinie 63. W komórkach uprzednio utrwalonych oraz w komórkach inkubowanych z przeciwciałem w niskiej temperaturze przeciwciało 5D3 lokalizuje się w błonach plazmatycznych komórek we wszystkich badanych modelach. W przypadku komórek inkubowanych przyżyciowo z przeciwciałem w normalnych warunkach hodowli (37°C) przeciwciało 5D3 ma wyraźnie inną lokalizację. Sygnał przeciwciała jest widoczny w postaci punktów o zróżnicowanej wielkości, których znaczna część wydaje się znajdować wewnątrz komórek. Podobne różnice w rozmieszczeniu sygnału widać we wszystkich badanych modelach komórkowych. W kolejnych eksperymentach przeanalizowano dokładniej zaobserwowane zjawisko w celu scharakteryzowania jego przebiegu oraz prześledzenia mechanizmów komórkowych biorących w nim udział.



**Rycina 63.** Przykładowe obrazy komórek różnych linii inkubowanych z przeciwciałem 5D3 w podanych warunkach. Na czerwono pokazano sygnał przeciwciała 5D3 wyznakowanego przeciwciałem drugorzędowym zabarwionym Alexa Fluor 555.

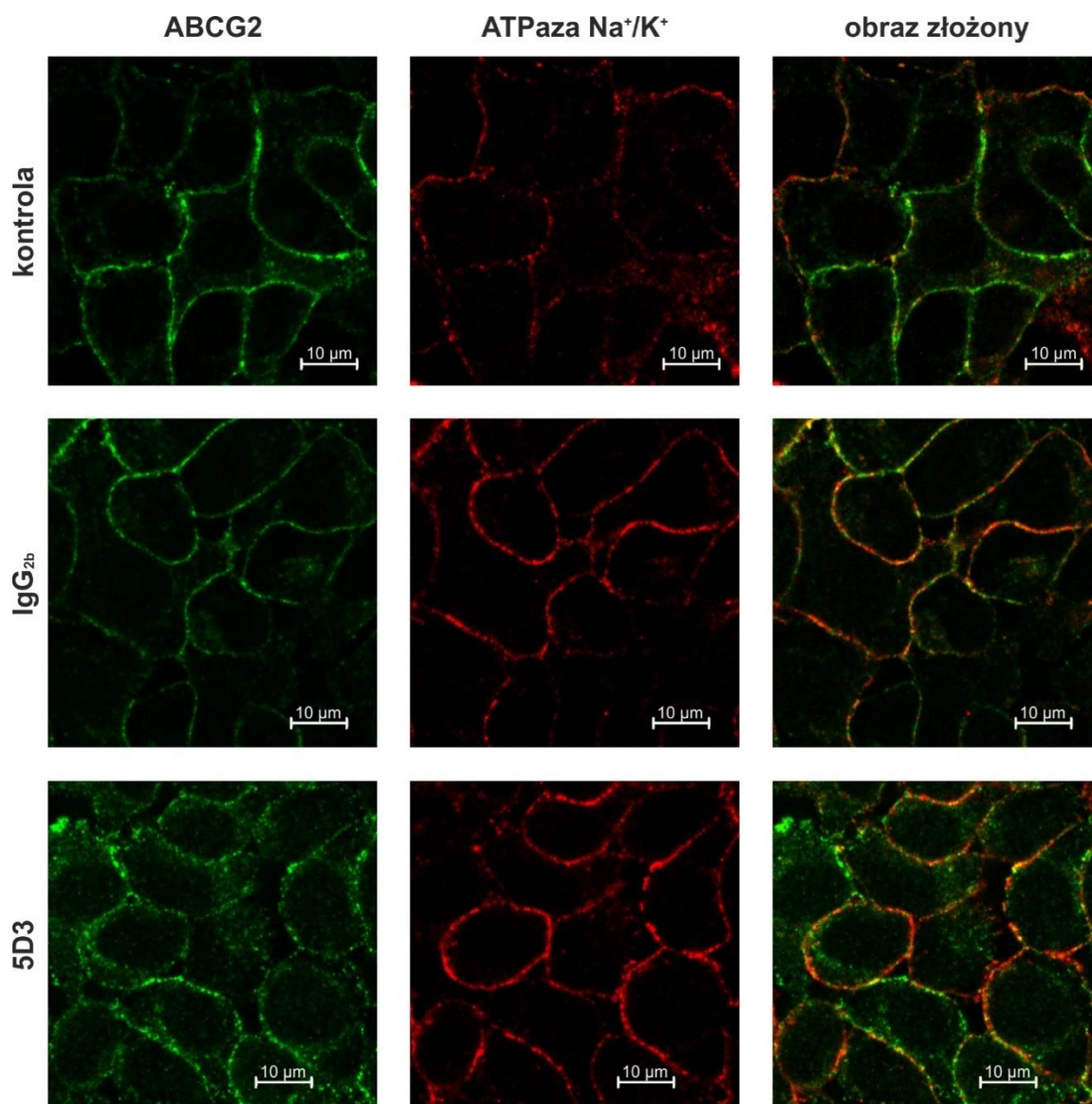
Utrwalone lub nieutrwalone komórki linii A549 traktowano przeciwciałem 5D3 przez 30 minut. Komórki traktowane przyżyciowo inkubowano w 4°C lub w 37°C. Następnie, po kolejnych 30 minutach inkubacji w takich samych warunkach w nieobecności przeciwciała, komórki traktowane przyżyciowo utrwalano i we wszystkich komórkach immunofluorescencyjnie wybarwiano związane przeciwciało 5D3. Jako marker błony plazmatycznej w komórkach wyznakowano fluorescencyjnie ATPazę sodowo-potasową. Komórki obrazowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe obrazy zestawiono na rycinie 64.



**Rycina 64.** Przykładowe obrazy komórek różnych linii inkubowanych z przeciwciałem 5D3 w podanych warunkach. Na zielono pokazano sygnał przeciwciała 5D3 wyznakowanego przeciwciałem drugorzędowym zabarwionym Alexa Fluor 488. Na czerwono przedstawiono sygnał ATPazy sodowo-potasowej wybarwionej przeciwciałem pierwszorzędowym i przeciwciałem drugorzędowym zabarwionym Alexa Fluor 555.

W komórkach uprzednio utrwalonych sygnał pochodzący od związanego przeciwciała 5D3 (kolor zielony) lokalizuje się wyłącznie w błonach plazmatycznych w regionach, w których znajduje się ATPaza sodowo-potasowa (sygnał czerwony). Sygnały w znacznej części lokalizują się w tych samych pikselach obrazu, dlatego na obrazie złożonym widoczne są na pomarańczowo. W komórkach, które inkubowano z 5D3 w niskiej temperaturze, sygnał pochodzący od tego przeciwciała również znajduje się głównie w błonach plazmatycznych w regionach, w których znajduje się ATPaza sodowo-potasowa, ale sygnały nie nakładają się tak dobrze jak w komórkach uprzednio utrwalonych. Wskazuje to, że nawet w niskiej temperaturze przeciwciało 5D3 związane do żywych komórek w pewnym stopniu zmienia swoją lokalizację. W przypadku kiedy przeciwciało 5D3 wiązano przyżyciowo w 37°C, jego lokalizacja jest wyraźnie różna. Sygnał jest widoczny w postaci nieregularnie rozmieszczonych punktów, których wygląd przypomina pęcherzyki endocytarne. Znaczna część sygnału jest widoczna wewnątrz komórek, poniżej warstwy, jaką wyznacza na przekrojach optycznych fluorescencja wyznakowanej ATPazy sodowo-potasowej. Wynik ten dowodzi, że inkubacja z przeciwciałem 5D3 zapoczątkowuje proces (zależny od temperatury), w którym przeciwciało jest transportowane do wnętrza komórek.

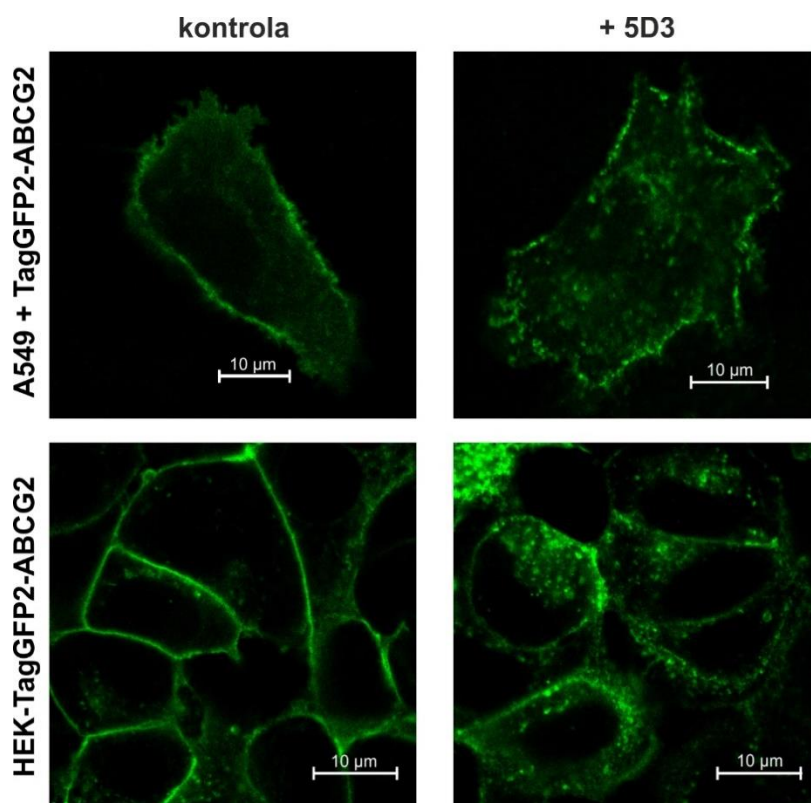
W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, czy w tym procesie zmienia się również lokalizacja białka ABCG2. Komórki linii A549 traktowano przez godzinę za pomocą przeciwciała 5D3. W kontroli negatywnej komórki traktowano za pomocą niespecyficznego, ale jednakowego izotypowo, mysiego przeciwciała IgG<sub>2b</sub>. Następnie w komórkach wybarwiano białko ABCG2, stosując przeciwciało BXP-34, które wiąże się do innego epitopu białka niż przeciwciało 5D3. Podobnie do poprzedniego schematu doświadczenia wybarwiano również ATPazę sodowo-potasową. Na rycinie 65 przedstawiono przykładowe obrazy tak przygotowanych preparatów.



**Rycina 65.** Przykładowe obrazy komórek A549 traktowanych w 37°C przeciwciałem 5D3 lub niespecyficznym przeciwciałem mysim klasy IgG<sub>2b</sub>. Na zielono przedstawiono sygnał ABCG2 wybarwionego immunofluorescencyjnie za pomocą przeciwciała BXP-34 i fragmentu Zenon-Alexa Fluor 488. Na czerwono przedstawiono sygnał ATPazy sodowo-potasowej wyznakowanej za pomocą przeciwciała pierwszorzędowego i fragmentu Zenon-Alexa Fluor 568.

W komórkach kontrolnych oraz w komórkach które były traktowane niespecyficznym mysim przeciwciałem o izotypie IgG<sub>2b</sub> sygnał pochodzący od wyznakowanego białka ABCG2 jest niemal wyłącznie zlokalizowany w błonach plazmatycznych komórek, gdzie znajduje się również sygnał ATPazy sodowo-potasowej. W przypadku, kiedy komórki traktowano przeciwciałem 5D3, znaczna część sygnału ABCG2 znajduje się wewnątrz komórek. Dowodzi to, że w efekcie specyficznego oddziaływania przeciwciała 5D3 i ABCG2 zapoczątkowany jest proces, w którym kompleks ABCG2-5D3 ulega internalizacji.

Następnie sprawdzono, czy opisywane zjawisko ma również miejsce w przypadku białka ABCG2 wyznakowanego fluorescencyjnie białkiem TagGFP2. Komórki HEK-TagGFP2-ABCG2 lub komórki A549 transfekowane przejściowo plazmidem niosącym gen białka TagGFP2-ABCG2 inkubowano z przeciwciałem 5D3 przez dwie godziny w normalnych warunkach hodowli. Następnie komórki utrwalano i preparaty analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe obrazy przedstawiono na rycinie 66.

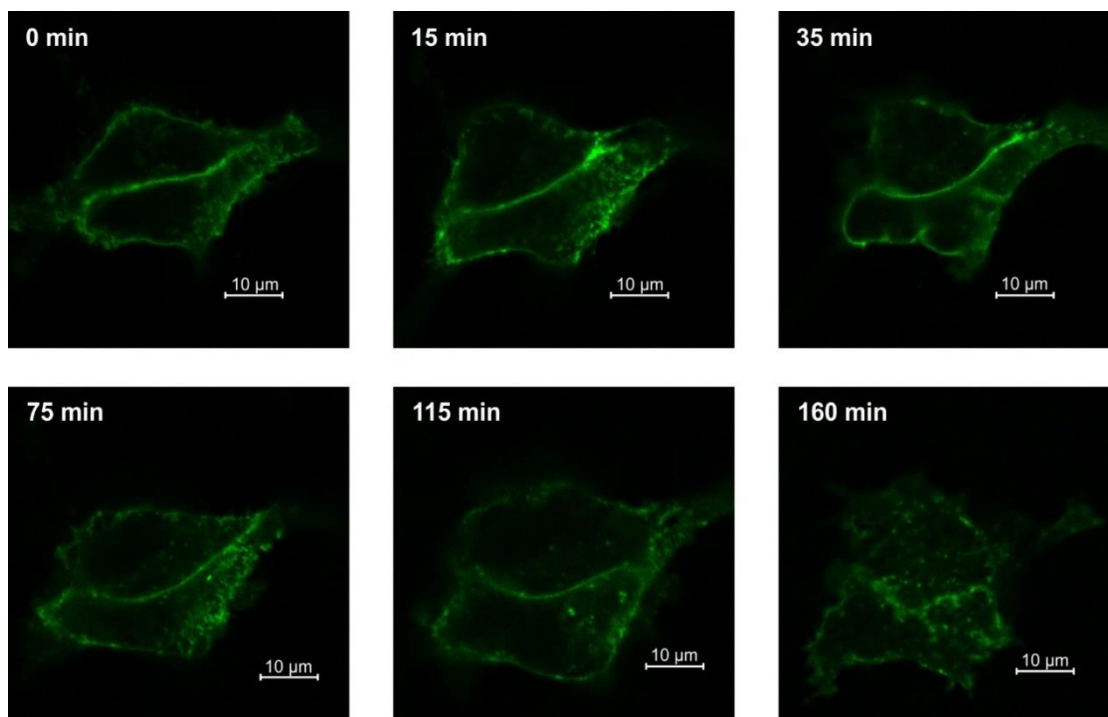


**Rycina 66.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 po 48 h od przejściowej transfekcji plazmidem niosącym gen białka TagGFP2-ABCG2 (A.) oraz komórek HEK-TagGFP2-ABCG2 (B.). Oba rodzaje komórek obrazowano w nieobecności (kontrola) oraz po 2 h inkubacji z przeciwciałem 5D3. Na zielono przedstawiono sygnał pochodzący od białka TagGFP2-ABCG2.

W obu liniach po inkubacji z przeciwciałem 5D3 białko fuzyjne TagGFP2-ABCG2 zmienia swoją lokalizację. W kontroli białko znajduje się głównie w błonach plazmatycznych komórek. Na obrazach konfokalnych sygnał fluorescencyjny tworzy wyraźny, ciągły kontur granicy komórek. Po inkubacji z 5D3 duża część sygnału białka TagGFP2-ABCG2 znajduje się wewnątrz komórek, a sygnał w błonach plazmatycznych staje się pofragmentowany. Przyłączenie przeciwciała 5D3 zapoczątkowuje proces, w wyniku którego białko TagGFP2-ABCG2 przemieszcza się z błony plazmatycznej do wnętrza komórek, w których gromadzi się w postaci pęcherzyków. W celu zbadania, czy zaobserwowane zjawisko wiązania przeciwciała 5D3 i internalizacji kompleksu 5D3-ABCG2 jest procesem ciągłym i postępującym w czasie, wykonano kolejne doświadczenia. W pierwszym z nich komórki A549 zawierające



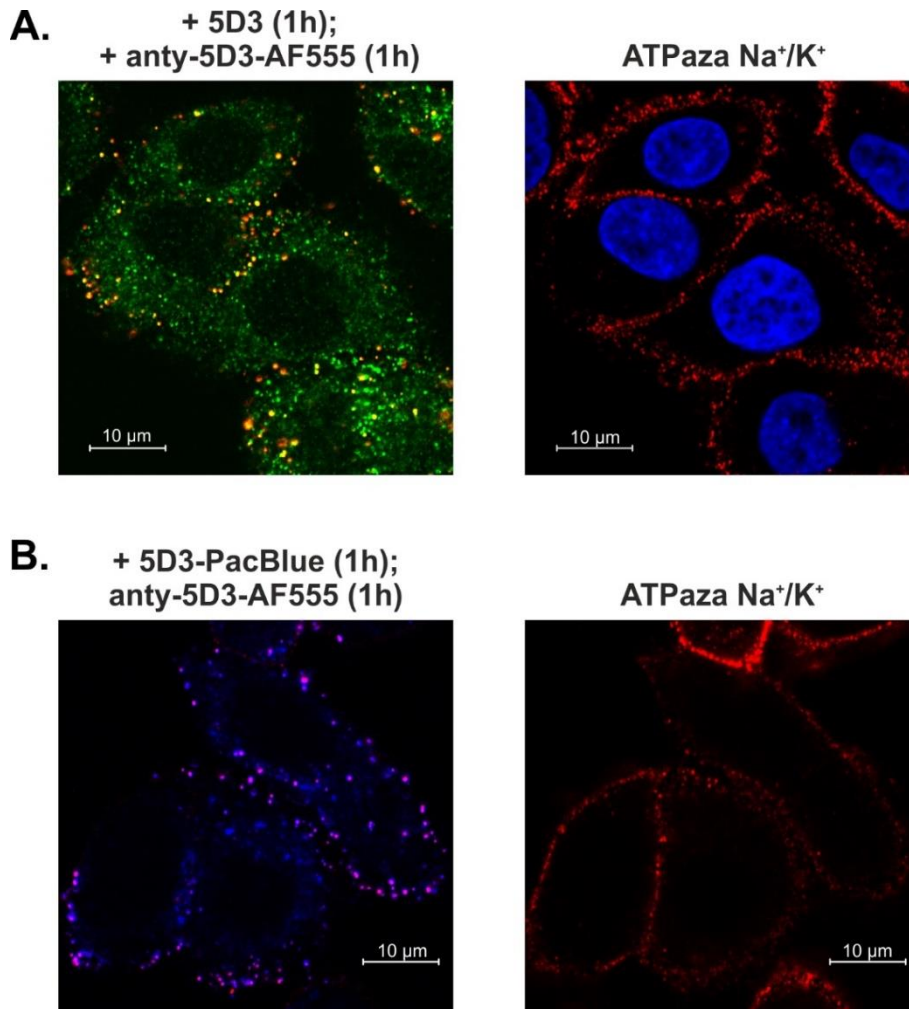
białko TagGFP2-ABCG2 inkubowano w obecności przeciwciała 5D3 i tą samą grupę komórek obserwowano następnie za pomocą mikroskopu konfokalnego, co pewien czas rejestrując obrazy. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 67.



**Rycina 67.** Obrazy mikroskopowe tej samej grupy komórek A549 przejściowo transfekowanych plazmidem nosącym gen TagGFP2-ABCG2 zarejestrowane po różnym czasie po dodaniu przeciwciała 5D3.

Zmiany w rozmieszczeniu sygnału białka TagGFP2-ABCG2 zaczynają być widoczne już po 15 minutach od rozpoczęcia inkubacji z przeciwciałem 5D3. Proces internalizacji części sygnału białka TagGFP2-ABCG2 postępuje w czasie, co skutkuje rosnącą liczbą wewnątrzkomórkowych pęcherzyków endocytarnych zawierających fluorescencyjnie wyznakowane białko. W kolejnym doświadczeniu komórki A549 poddano najpierw godzinnej przyżyciowej inkubacji z przeciwciałem 5D3 (rycina 68A) lub z przeciwciałem 5D3 wyznakowanym bezpośrednio za pomocą barwnika Pacific Blue (rycina 68B). Po tym czasie z medium hodowlanego usunięto nadmiar przeciwciała 5D3, a komórki inkubowano dalej przyżyciowo przez kolejną godzinę w obecności wyznakowanego Alexa Fluor 555 przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko 5D3. Ponieważ drugą inkubację również prowadzono przyżyciowo, przeciwciała drugorzędowe mogło się wiązać jedynie do tej porcji przeciwciała 5D3, która nadal była dostępna na powierzchni błon plazmatycznych komórek i która jeszcze nie uległa internalizacji. Ostatecznie komórki utrwalano i permeabilizowano. W przypadku komórek pokazanych na rycinie 68A wszystkie cząsteczki związanego przeciwciała 5D3 wyznakowano dodatkowo za pomocą przeciwciała drugorzędowego

wybarwionego Alexa Fluor 488. W komórkach wyznakowano również ATPazę sodowo-potasową. Dla zwiększenia czytelności ryciny sygnał ATPazy sodowo-potasowej, wyznaczający granicę błon plazmatycznych komórek na przekroju optycznym, przedstawiono na osobnym obrazie w danym panelu.



**Rycina 68.** Komórki A549 traktowano przez godzinę za pomocą przeciwciała 5D3 (panel A) lub za pomocą przeciwciała 5D3 wyznakowanego barwnikiem Pacific Blue (panel B, niebieski sygnał). Następnie przeciwciała usunięto i komórki inkubowano przyżyciowo przez kolejną godzinę w obecności przeciwciała drugorzędowego wybarwionego Alexa Fluor 555 skierowanego przeciwko 5D3 (panel A – pomarańczowy sygnał, panel B – różowy sygnał). Komórki następnie utrwalano i permeabilizowano. Przeciwciała 5D3 w komórkach pokazanych w panelu A wybarwiono dodatkowo za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 488 (zielony sygnał). ATPazę sodowo-potasową wybarwiono przeciwciałem pierwszorzędowym oraz przeciwciałem drugorzędowym wyznakowanym Alexa Fluor 594 (oba panele – czerwony sygnał na obrazie po prawo). Jądra komórkowe w panelu A (niebieski sygnał) wybarwiono za pomocą Hoechst33342.

Na obu panelach ryciny 68 widać, że duża część przeciwciała 5D3, która związała się do białka ABCG2 w trakcie pierwszej godziny inkubacji (odpowiednio sygnał zielony na panelu A i sygnał niebieski na panelu B) jest niedostępna dla przeciwciała drugorzędowego podawanego

w trakcie drugiej godziny inkubacji. Oznacza to, że już w trakcie pierwszej godziny inkubacji z 5D3 duża część tego przeciwciała uległa internalizacji po związaniu do białka ABCG2. Ta część przeciwciała 5D3, która była jeszcze dostępna na powierzchni komórek po pierwszej godzinie inkubacji, w czasie drugiej godziny inkubacji (podczas inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym) również uległa internalizacji – odpowiada jej sygnał fluorescencyjny widoczny pod błoną plazmatyczną komórek jako pomarańczowe punkty w komórkach w panelu A lub różowe punkty w komórkach w panelu B. Kolor tego sygnału jest kombinacją czerwonego pseudokoloru w jakim przedstawiono sygnał przeciwciała drugorzędowego, z którym przyżyciowo inkubowano komórki podczas drugiej godziny inkubacji, i odpowiednio zielonego (panel A) lub niebieskiego (panel B) pseudokoloru pochodzącego od barwnika, którym wyznakowano wszystkie cząsteczki związanego przeciwciała 5D3.

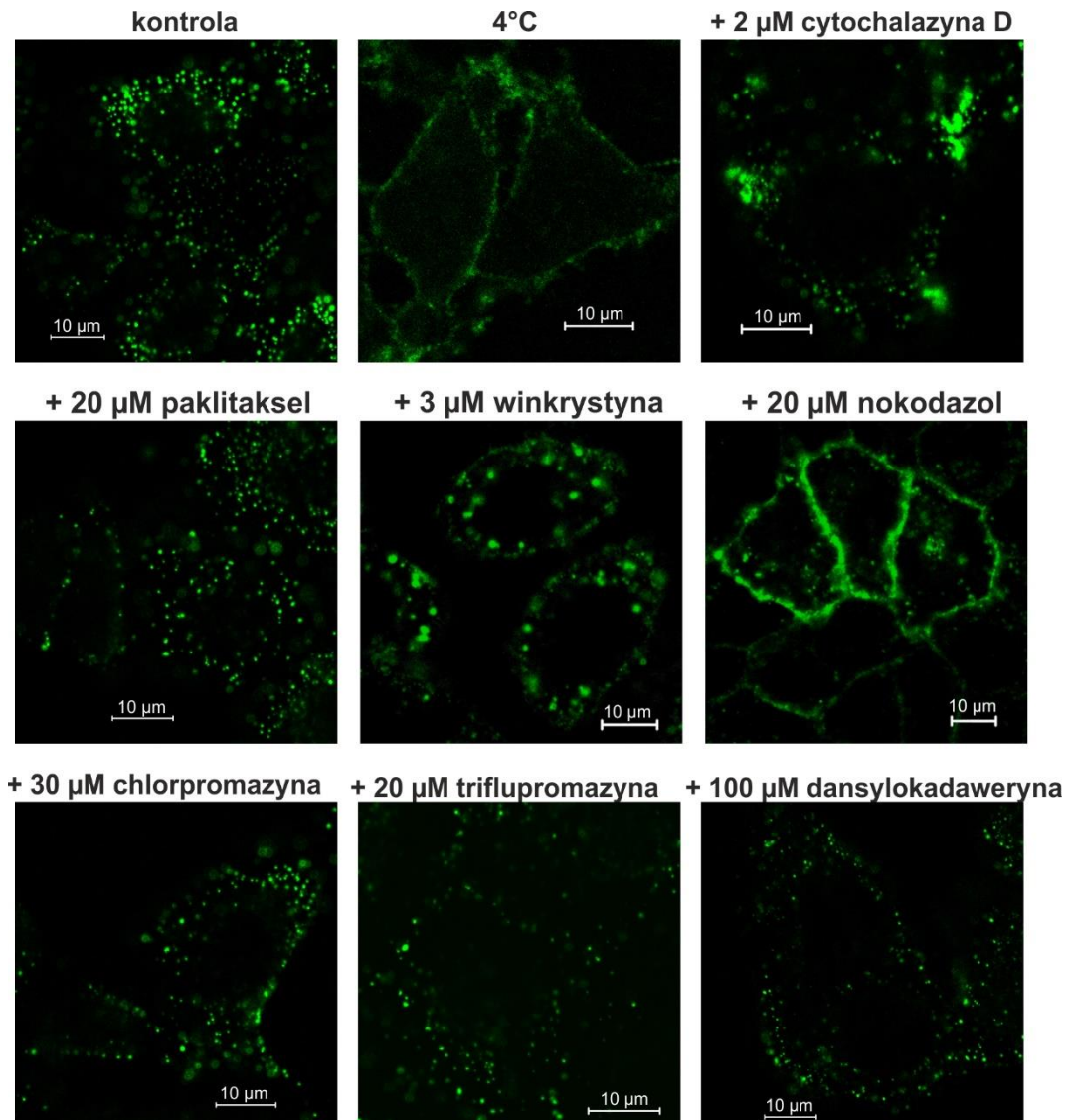
Wyniki powyższych doświadczeń dowodzą, że w efekcie związania przeciwciała 5D3 do białka ABCG2 w komórkach uruchamiany jest proces endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2. Już w ciągu kilkunastu minut od dodania do medium przeciwciała 5D3 białko ABCG2 wraz z przyłączonym przeciwciałem jest internalizowane. Ponieważ sam proces wiązania się przeciwciała obecnego w medium do nowych cząsteczek ABCG2 eksponowanych na zewnątrz błony plazmatycznej komórek jest rozciągnięty w czasie, również obserwowany proces endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2 rozpoczyna się po różnym czasie od początku obserwacji.

#### **4.3.2.2. Farmakologiczna inhibicja endocytozy białka ABCG2**

W celu poznania mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za opisane powyżej zjawisko endocytozy wykonano serię doświadczeń, w której komórki linii A549 inkubowano z przeciwciałem 5D3 w obecności drobnocząsteczkowych inhibitorów wybranych szlaków transportu wewnątrzkomórkowego. Następnie przeciwciało wizualizowano za pomocą immunofluorescencji, stosując przeciwciało drugorzędowe znakowane Alexa Fluor 488. W kontroli pozytywnej komórki inkubowano z przeciwciałem w nieobecności inhibitorów. W kontroli negatywnej przeciwciało inkubowano z komórkami w niskiej temperaturze, czyli w warunkach pełnego zahamowania aktywnych procesów endocytozy (kontrola 4°C). Przygotowane preparaty obrazowano za pomocą mikroskopii konfokalnej, a przykładowe obrazy przedstawiono na rycinach 69 i 70.

W kontroli pozytywnej, w nieobecności inhibitorów, sygnał fluorescencyjnie wyznakowanego kompleksu przeciwciała 5D3 i białka ABCG2 znajduje się wewnątrz komórek w postaci równomiernie rozmieszczonych pęcherzyków endocytarnych. W przeciwieństwie do tego w kontroli negatywnej (4°C) sygnał fluorescencyjny jest rozmieszczony wzdłuż krawędzi

komórek na przekroju optycznym, wskazując na jego lokalizację w błonach plazmatycznych komórek.



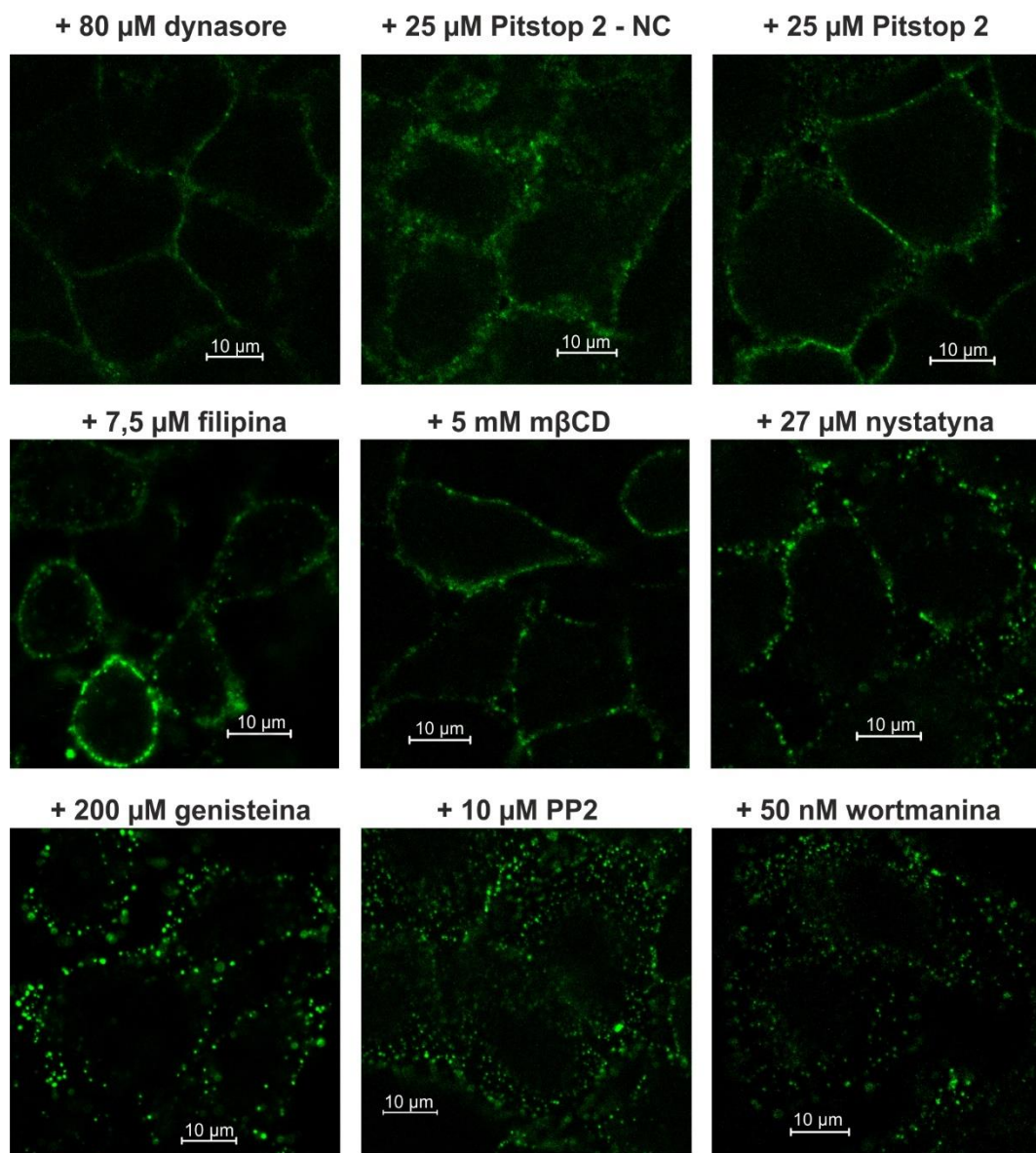
**Rycina 69.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 w których badano endocytozę kompleksu 5D3-ABCG2 w różnych warunkach temperaturowych lub w obecności inhibitorów. W warunkach opisanych na rycinie komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym przez godzinę, a następnie również przez godzinę z przeciwciałem wyznakowanym Alexa Fluor 488. Na zielono przedstawiono sygnał pochodzący od wyznakowanego kompleksu 5D3-ABCG2.

Zastosowanie inhibitorów zaburzających polimeryzację białek cytoszkieletu wykazało, że białka te odgrywają kluczową rolę na kolejnych etapach procesu endocytozy białka ABCG2. W komórkach traktowanych cytochalazyną D, inhibitorem polimeryzacji aktyny, sygnał fluorescencyjny kompleksu 5D3-ABCG2 jest widoczny w postaci dużych zgrupowań pęcherzyków endocytarnych zlokalizowanych wewnątrz komórek. Dowodzi to, że mikrofilamenty mają duże znaczenie jedynie na późniejszych etapach wewnątrzkomórkowego transportu i segregacji już uformowanych pęcherzyków endocytarnych zawierających białko

ABCG2. W komórkach traktowanych związkami uniemożliwiającymi prawidłową polimeryzację i depolimeryzację mikrotubul (paklitaksel, winkrystyna oraz nokodazol) zaburzenia widoczne są już na etapie formowania się pęcherzyków endocytarnych. Uniemożliwione jest ich prawidłowe zamykanie i segregacja, co powoduje, że sygnał fluorescencyjnie wyznakowanego kompleksu 5D3-ABCG2 jest rozmieszczony jedynie w bezpośredniej bliskości błon plazmatycznych komórek. Podobny obraz rozmieszczenia sygnału internalizowanego białka ABCG2 jest widoczny po zastosowaniu klasycznych inhibitorów szlaku endocytozy zależnego od klatryny: chlorpromazyny, triflupromazyny oraz monodansylokadaweryny. Chlorpromazyna oraz triflupromazyna to związki, które blokują oddziaływania dwóch kluczowych efektorów tego szlaku: klatryny oraz kompleksu białkowego AP2. Monodansylokadaweryna uniemożliwia natomiast prawidłowe oddzielanie się uformowanych pęcherzyków endocytarnych otoczonych płaszczem zbudowanym z klatryny. W przypadku każdego z tych inhibitorów endocytoza białka ABCG2 jest silnie ograniczona, a sygnał fluorescencyjny odpowiadający kompleksowi 5D3-ABCG2 jest rozmieszczony wzdłuż krawędzi komórek na przekroju optycznym.

Jak wykazują przykładowe obrazy mikroskopii konfokalnej zaprezentowane na rycinie 70, jeszcze większe ograniczenie endocytozy białka ABCG2 następuje po zastosowaniu dwóch innych inhibitorów używanych powszechnie przy hamowaniu procesów endocytozy zależnych od klatryny, ale nie pozostających bez wpływu na inne szlaki endocytozy, czyli dynasore oraz Pitstop 2. Dynasore to drobnocząsteczkowy inhibitor polimeryzacji dynaminy. Dynamina jest ważną GTPazą, która odpowiada za oddzielanie się od błony plazmatycznej pęcherzyków endocytarnych uformowanych na szlakach endocytozy zarówno zależnej, jak i niezależnej od klatryny. Zastosowanie tego inhibitora powoduje całkowite zatrzymanie procesu internalizacji białka ABCG2. Obserwowany sygnał fluorescencyjny kompleksu 5D3-ABCG2 po inkubacji z dynasore jest rozmieszczony analogicznie, jak w przypadku komórek poddanych działaniu przeciwciała 5D3 w temperaturze 4°C (rycina 69). Bardzo podobny obraz można zaobserwować również po zastosowaniu inhibitora Pitstop 2. Ten drobnocząsteczkowy związek jest stosowany jako specyficzny inhibitor endocytozy na szlaku zależnym od klatryny. Ma bardzo wysokie powinowactwo do N-końcowej domeny klatryny, przez co uniemożliwia jej wiązanie do białek efektorowych. Związek Pitstop 2 – NC jest stosowany jako kontrola negatywna do Pitstop2, ponieważ pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego nie wiąże się z klatryną, a w związku z tym efekty, które wywołuje, nie są specyficzne dla tej ścieżki endocytozy. Po inkubacji ze związkiem Pitstop 2 – NC również widoczne jest znaczne zahamowanie procesu endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2. Dowodzi to, że całkowite zablokowanie endocytozy obserwowane w przypadku związku Pitstop 2 jest złożeniem procesów specyficznej inhibicji szlaku zależnego od klatryny oraz efektu niespecyficznego względem tego białka.

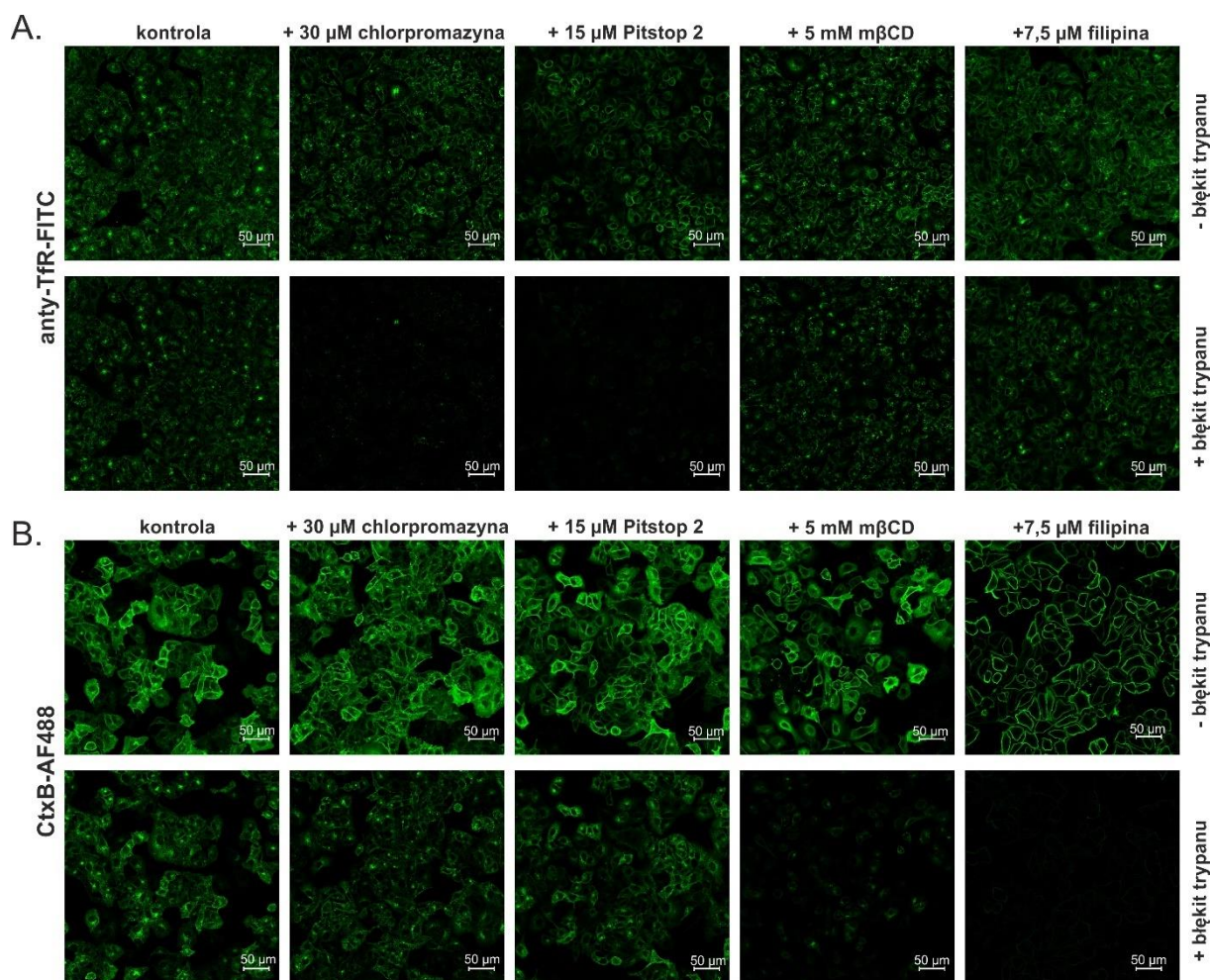
W następnej kolejności przetestowano wpływ trzech związków hamujących szlaki endocytozy zależnej od cholesterolu. Filipina, nystatyna oraz m $\beta$ CD to związki, które oddziałują z cholesterolem, uniemożliwiając procesy wpukania błony komórkowej, w które jest on zaangażowany. W przypadku wszystkich trzech wymienionych związków proces endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2 jest zablokowany. W komórkach traktowanych tymi inhibitorami sygnał fluorescencyjny wyznakowanego kompleksu jest rozmieszczony wzdłuż błon plazmatycznych komórek. Dowodzi to jednoznacznie, że cholesterol jest zaangażowany w obserwowane zjawisko internalizacji ABCG2.



**Rycina 70.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 w których badano endocytozę kompleksu 5D3-ABCG2 w obecności różnych inhibitorów. W warunkach opisanych na rycinie komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym przez godzinę, a następnie również przez godzinę z przeciwciałem wyznakowanym Alexa Fluor 488. Na zielono przedstawiono sygnał pochodzący od wyznakowanego kompleksu 5D3-ABCG2.

Ponieważ najważniejszym spośród szlaków endocytozy, w które zaangażowany jest cholesterol, jest szlak zależny od kaweoliny, przetestowano dwa inhibitory tego szlaku: genisteinę i PP2. Związki te są inhibitorami kinaz tyrozynowych (o różnym stopniu specyficzności), które stanowią kluczowy element funkcjonowania tego szlaku. Genisteina, będąca mało specyficznym inhibitorem, spowodowała zauważalne ograniczenie ilości powstających pęcherzyków endocytarnych. Związek PP2, będący inhibitorem kinaz tyrozynowych z rodziny Src, nie spowodował jednak zmian w ilości oraz rozmieszczeniu pęcherzyków endocytarnych. Lokalizacja wyznakowanego kompleksu 5D3-ABCG2 była po zastosowaniu tego inhibitora taka sama jak w komórkach nietraktowanych inhibitorami (rycina 69, kontrola). Podobnie inkubacja komórek z wortmaniną, silnym inhibitorem 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. phosphoinositide 3-kinase), zaangażowanej w procesy wewnątrzkomórkowego transportu (która reguluje również procesy endocytozy zależnej od kaweoliny), nie spowodowała zauważalnych zmian w ilości sygnału fluorescencyjnie wyznakowanego kompleksu 5D3-ABCG2 zgromadzonego wewnątrz komórek.

Ze względu na mnogość mechanizmów regulujących endocytozę analiza jakościowa przykładowych pól widzenia komórek traktowanych inhibitorami nie daje w pełni obiektywnych wyników, które można by jednoznacznie interpretować. Jest tak szczególnie w przypadku, kiedy w procesy internalizacji tego samego ładunku są zaangażowane jednocześnie różne szlaki endocytozy. Aby obiektywnie przeanalizować wpływ inhibitorów na proces endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2, opracowano nową metodę ilościowej analizy procesów internalizacji białka wyznakowanego fluorescencyjnie. Metoda ta polega na analizie przyżyciowych obrazów mikroskopowych komórek w tym samym polu widzenia, obrazowanych przed i po dodaniu błękitu trypanu. Barwnik ten nie przenika do wnętrza żywych komórek, a równocześnie wydajnie wygasa fluorescencję cząsteczek, do których ma dostęp, czyli cząsteczek fluoroforów związanych na zewnątrz komórek. W doświadczeniu kontrolnym nowo opracowaną metodę przetestowano stosując dwa dobrze scharakteryzowane markery dwóch różnych szlaków endocytozy. Pierwszy z markerów to receptor transferyny, który po związaniu ligandu jest internalizowany na drodze zależnej od klatryny. Drugi z nich to podjednostka B toksyny cholery (CtxB), która wnika do komórek stymulując endocytozę zależną od cholesterolu. Komórki A549 inkubowano z fluorescencyjnie wyznakowanym przeciwciałem skierowanym przeciw receptorowi transferyny (anty-TfR-FITC) lub z fluorescencyjnie wyznakowaną podjednostką B toksyny cholery (CtxB-AF488). Inkubacje prowadzono w nieobecności lub w obecności wybranych inhibitorów endocytozy. Po określonym czasie te same pola widzenia preparatów komórek obrazowano przyżyciowo w nieobecności i po dodaniu błękitu trypanu. Przykładowe obrazy uzyskane w ten sposób przedstawiono na rycinie 71.

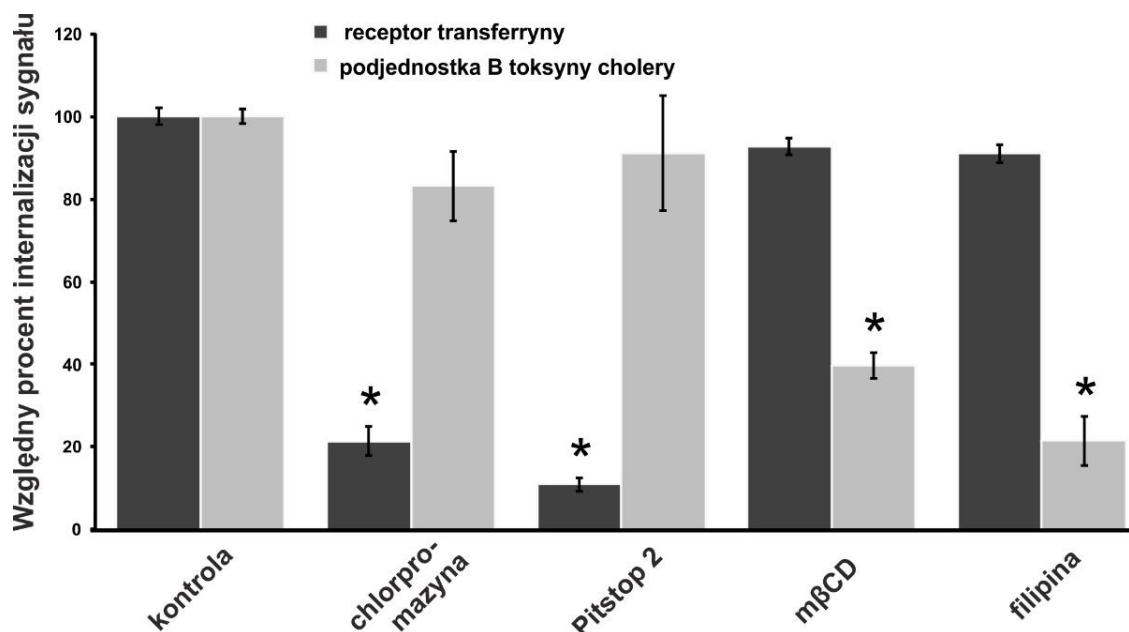


**Rycina 71.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 w których badano endocytozę białek markerowych w obecności różnych inhibitorów. W warunkach opisanych na rycinie komórki inkubowano z przeciwciałem anti-TfR-FITC (rozcieńczenie 1:10) przez 30 minut (**A.**) lub z CtxB-AF488 (w stężeniu 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) przez 15 minut (**B.**). Następnie po usunięciu nadmiaru fluoroforów te same pola widzenia obrazowano przyżyciowo przed i po dodaniu błękitu trypanu (końcowe stężenie 1,3  $\text{mg}/\text{ml}$ ).

Na podstawie średniej intensywności fluorescencji tych samych komórek przed i po dodaniu błękitu trypanu można obliczyć, jaka część całego rejestrowanego sygnału pochodzi z wnętrza komórek. Biorąc pod uwagę, jak dużo sygnału pochodzi z wnętrza komórek w przypadku kontroli nie traktowanej inhibitorami, obliczano, jak zmienia się względny procent internalizacji sygnału dla każdego z użytych markerów w przypadku komórek traktowanych danym inhibitorem (szczegóły opisano w podrozdziale 3.2.14.3.). Na rycinie 72 przedstawiono wyniki uzyskane na podstawie dwóch eksperymentów, w których komórki analizowano za każdym razem na czterech różnych polach widzenia. Internalizacja receptora transferyny została zahamowana inhibitorami szlaku zależnego od klatryny – chlorpromazyną oraz Pitstop 2. Na internalizację tego białka nie wpłynęła jednak obecność inhibitorów oddziałujących z cholesterolem. Po traktowaniu  $\text{m}\beta\text{CD}$  lub filipiną komórki internalizowały receptor transferyny tak samo jak w kontroli. Analogicznie chlorpromazyna i Pitstop 2 nie zahamowały

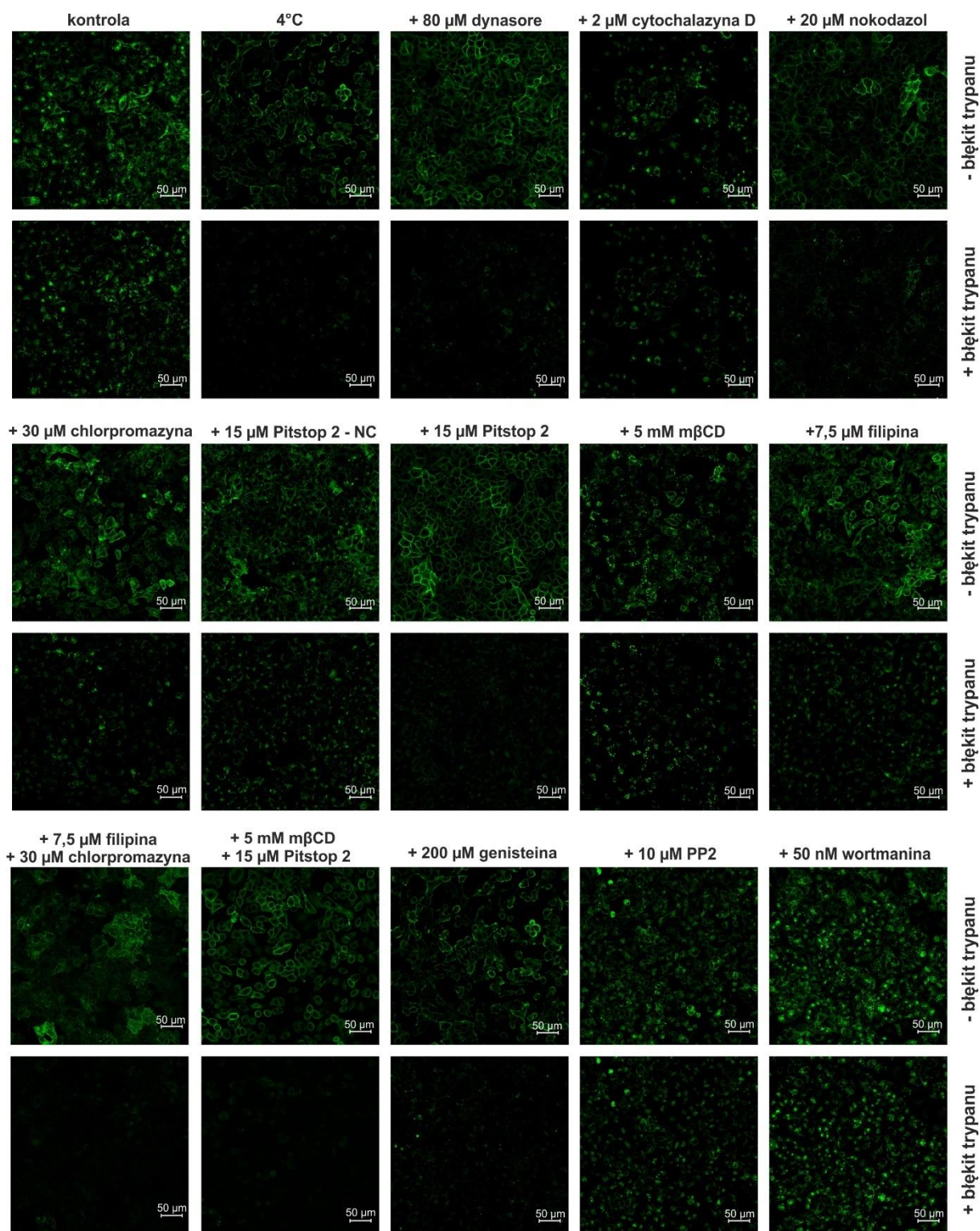


w znaczący sposób endocytozy podjednostki B toksyny cholery, ale ponieważ białko to wykorzystuje szlaki zależne od cholesterolu, inkubacja z m $\beta$ CD lub filipiną spowodowała, że znacznie mniejsza ilość tego białka przedostała się do wnętrza komórek. Wynik tego doświadczenia kontrolnego dowodzi, że opisana technika bardzo dobrze nadaje się do ilościowej oceny działania danego inhibitora endocytozy.

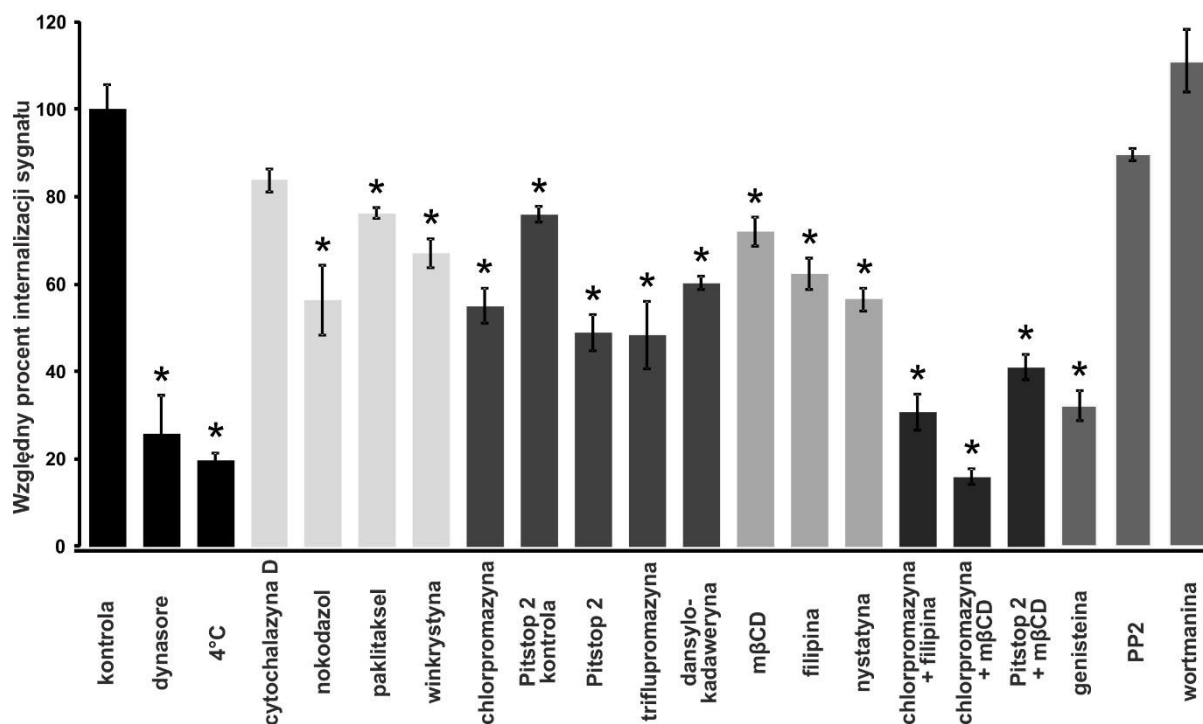


**Rycina 72.** Wpływ wybranych inhibitorów endocytozy na internalizację wyznakowanych fluorescencyjnie dwóch białek ulegających endocytozie za pomocą różnych szlaków endocytozy. Opracowano na podstawie analizy intensywności obrazów takich jak przedstawiono na rycinie 71 zgodnie z opisem w rozdziale 3.2.14.3. Przedstawiono wartość średnią  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 8$ . Porównywano różnice z odpowiednią kontrolą, \*  $p < 0,05$ .

Stosując opracowaną metodę zbadano, jaki wpływ na proces endocytozy kompleksu przeciwciała 5D3 z białkiem ABCG2 ma zastosowanie wybranych pojedynczych inhibitorów endocytozy lub mieszanek inhibitorów. W kontroli pozytywnej komórki inkubowano w nieobecności inhibitorów. W kontroli negatywnej przeciwciała inkubowano z komórkami w niskiej temperaturze (4°C). Ponieważ pomiary fluorescencji muszą być w tym wypadku wykonywane przyżyciowo, do stymulacji procesu endocytozy zastosowano przeciwciała 5D3 bezpośrednio wyznakowane za pomocą Alexa Fluor 488. Aby umożliwić wydajną internalizację, komórki inkubowano z przeciwciałem przez godzinę, a następnie, po usunięciu nadmiaru przeciwciała z medium hodowlanego, komórki inkubowano jeszcze przez kolejne 30 minut. Reprezentatywne pola widzenia, będące podstawą oceny ilościowej, przedstawiono na rycinie 72. Na rycinie 73 przedstawiono wyniki oceny ilościowej uzyskane na podstawie dwóch eksperymentów, w których komórki analizowano za każdym razem na czterech różnych polach widzenia.



**Rycina 72.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek A549 w których badano endocytozę kompleksu 5D3-ABCG2. W warunkach opisanych na rycinie komórki inkubowano z przeciwciałem 5D3-AF488 przez godzinę, a następnie po usunięciu nadmiaru przeciwciała przez kolejne 30 minut w normalnych warunkach hodowli. Następnie te same pola widzenia obrazowano przyżyciowo przed i po dodaniu błękitu trypanu (końcowe stężenie 1,3 mg/ml).



**Rycina 73.** Wpływ wybranych inhibitorów endocytozy na internalizację wyznakowanego fluorescencyjnie kompleksu 5D3-ABCG2. Opracowano na podstawie analizy intensywności obrazów takich jak przedstawiono na rycinie 72 zgodnie z opisem w rozdziale 3.2.14.3. Przedstawiono wartość średnią ± średni błąd średniej, n = 8, \* p < 0,05.

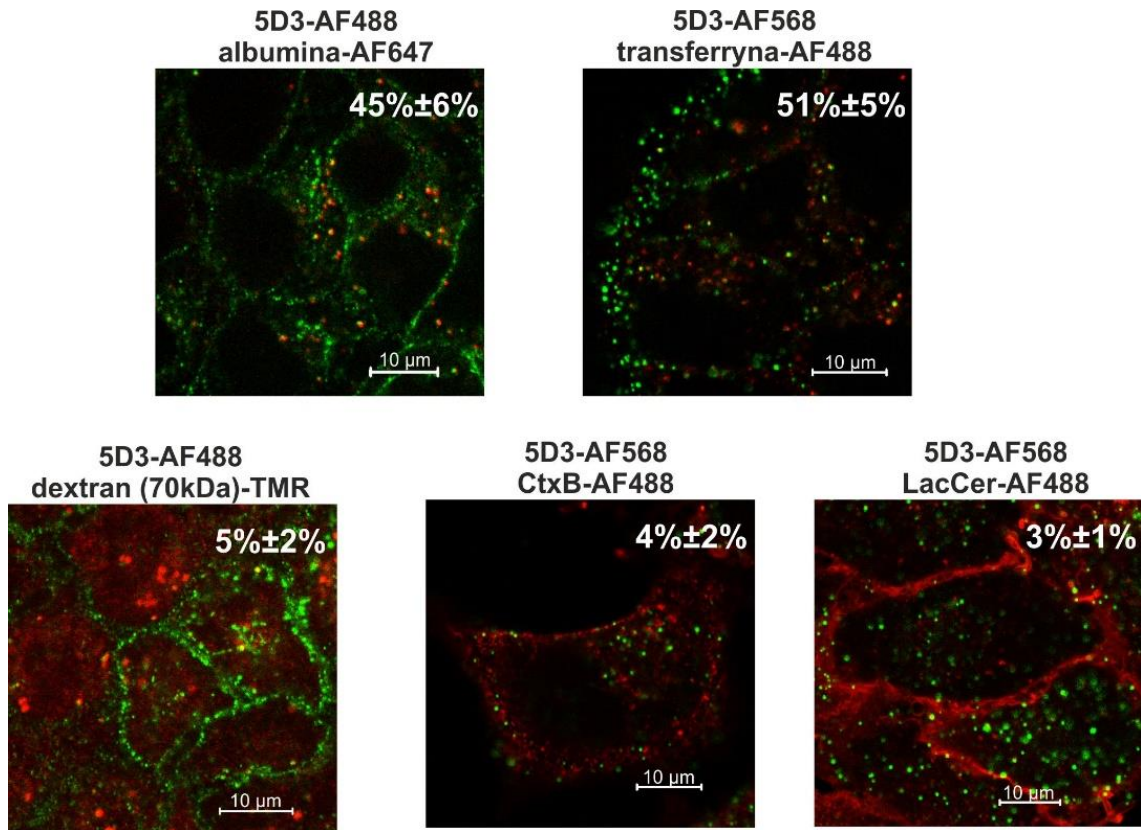
Prawie każdy z użytych inhibitorów obniża ilość internalizowanego kompleksu 5D3-ABCG2. Istotnego efektu nie wywołują jedynie cytochalazyna D, PP2 oraz wortmanina. Potwierdza to, że procesu internalizacji kompleksu 5D3-ABCG2 nie zaburza zahamowanie polimeryzacji aktyny. Istotnego efektu nie ma również specyficzne zahamowanie kinaz tyrozynowych z rodziny Src (PP2) oraz zahamowanie PI3K za pomocą wortmaniny. Ponieważ te kinazy są zaangażowane w procesy endocytozy zależne od kaweoliny, ten szlak endocytozy najprawdopodobniej nie jest tu zaangażowany. Istotne zahamowanie endocytozy można zaobserwować w przypadku zastosowania inhibitorów zaburzających polimeryzację mikrotubul (nokodazol, paklitaksel, winkrystyna), a także w przypadku zastosowania inhibitorów endocytozy klatrynozależnej (chlorpromazyna, triflupromazyna, dansylokadaweryna i Pitstop 2). Zastosowanie tych czynników ogranicza internalizację kompleksu 5D3-ABCG2 mniej więcej do połowy efektu obserwowanego w kontroli pozytywnej (4°C). Wskazuje to, że w proces endocytozy białka ABCG2 zaangażowany jest klasyczny szlak endocytozy klatrynozależnej. Inkubacje z inhibitorami wiążącymi się do cholesterolu (mβCD, filipina, nystatyna) również mniej więcej w połowie ograniczają proces endocytozy. Wykazuje to, że w proces internalizacji kompleksu 5D3-ABCG2 zaangażowane są mechanizmy komórkowe, w których istotny jest cholesterol. Można jednak zaobserwować, że zarówno ograniczenie jedynie procesów klatrynozależnych, jak i ograniczenie endocytozy

zależnej od cholesterolu tylko częściowo hamuje internalizację ABCG2. W przypadku, kiedy zastosuje się jednocześnie czynniki wpływające na oba opisane szlaki (chlorpromazyna + filipina, chlorpromazyna + m $\beta$ CD, Pitstop2 +m $\beta$ CD), proces internalizacji jest zahamowany w podobnym stopniu jak w kontroli pozytywnej (4°C). Podobnie maksymalny stopień zahamowania endocytozy obserwuje się przy użyciu dynasore. Wszystkie powyższe wyniki dowodzą, że proces internalizacji kompleksu 5D3-ABCG2 przebiega na drodze w pełni zależnej od dynaminy, częściowo na drodze endocytozy klatrynozależnej, a częściowo na drodze niezależnej od kaweoliny, ale zależnej od cholesterolu. Znaczny efekt inhibitorowy można również zaobserwować w przypadku zastosowania genisteiny. Ten izoflawonoid jest mało specyficznym inhibitorem kinaz tyrozynowych i wpływa na wiele procesów komórkowych. Genisteina jest substratem białka ABCG2 i może również bezpośrednio wpływać na sam proces wiązania przeciwciała 5D3. W związku z tym wysoki stopień zahamowania endocytozy obserwowany w tym przypadku trudno jest interpretować jednoznacznie.

#### **4.3.2.3. Kolokalizacja z markerami lokalizacji subkomórkowej**

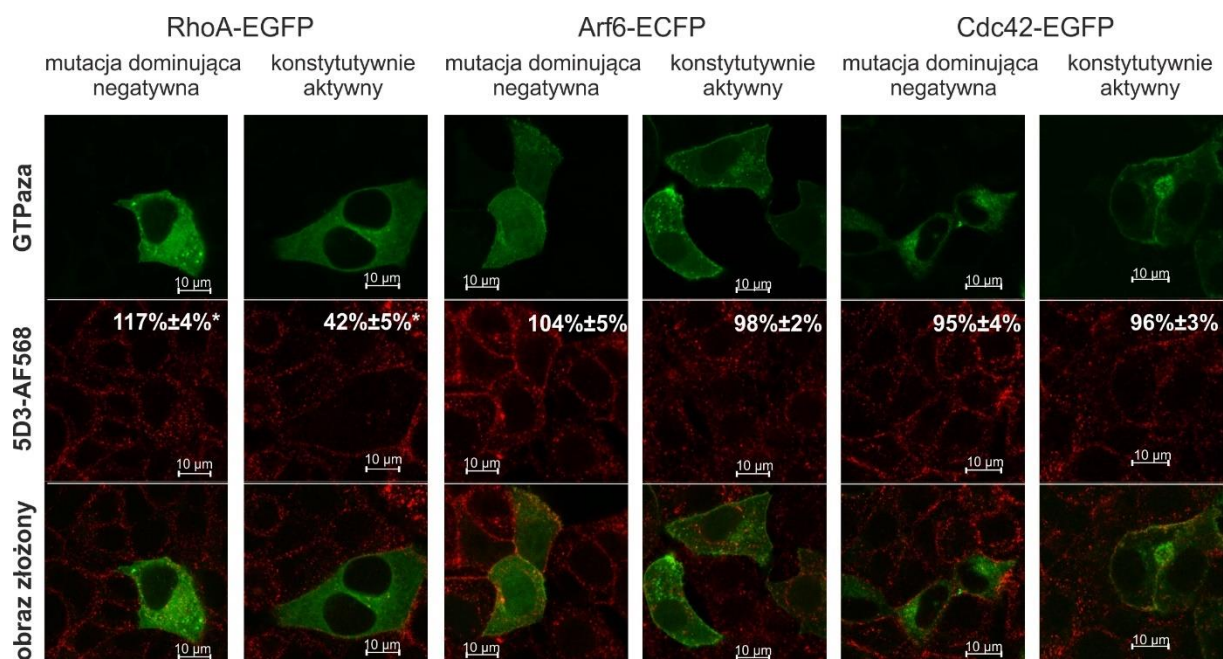
Aby uzyskać dodatkowe informacje dotyczące procesu endocytozy białka ABCG2 wywołanego związaniem przeciwciała 5D3, wykonano doświadczenia, w których jednocześnie przeprowadzano również endocytozę wyznakowanych fluorescencyjnie związków ulegających internalizacji na drodze dobrze opisanych szlaków endocytozy. Na rycinie 74 przedstawiono przykładowe obrazy komórek traktowanych w ten sposób. Dla ułatwienia interpretacji sygnał pochodzący od kompleksu 5D3-ABCG2 pokazano za pomocą zielonego pseudokoloru, a sygnały pochodzące od cząsteczek markerowych pokazano na czerwono. Na podstawie obrazów trzech pól widzenia w każdym doświadczeniu oceniano, jaki procent pikseli zawierających sygnał od 5D3-ABCG2 zawiera również sygnał fluorescencyjny cząsteczek markerowych. Znaczna kolokalizacja sygnałów w przypadku fluorescencyjnie wyznakowanej transferyny (Tf-Af488), która jest markerem szlaku zależnego od klatryny, dowodzi ponownie, że białko ABCG2 jest przynajmniej częściowo internalizowane na tej drodze. Podobnie wysoką kolokalizację sygnałów można zaobserwować w przypadku fluorescencyjnie wyznakowanej albuminy, która może być internalizowana zarówno na drodze zależnej, jak i niezależnej od klatryny (Khan i in., 2023; Sun i in., 2022). Brak kolokalizacji sygnału 5D3-ABCG2 z sygnałem pochodzącym od markera niespecyficznej pinocytozy fazy płynnej (dextran-TMR) dowodzi, że internalizacja białka ABCG2 jest procesem specyficznym i że za obserwowane zjawisko są odpowiedzialne jedynie procesy adsorpcyjne. Endosomy powstające w tych dwóch różnych procesach są kierowane do zupełnie różnych kompartmentów wewnątrz komórek. Podobny efekt uzyskuje się w przypadku zastosowania znakowanych fluorescencyjnie markerów endocytozy zależnej od kaweoliny: CtxB-AF488 oraz LacCer C5-BODIPY FL. W przypadku obu markerów fluorescencyjny sygnał wewnątrz komórek zupełnie nie kolokalizuje z sygnałem

kompleksu 5D3-ABCG2, dowodząc, że endocytoza ABCG2 nie przebiega na tej samej drodze. Potwierdza to wnioski wyciągnięte w doświadczeniach z zastosowaniem inhibitorów, że w procesy endocytozy białka ABCG2 po związaniu przeciwciała 5D3 nie jest zaangażowany szlak endocytozy zależny od kaweoliny.



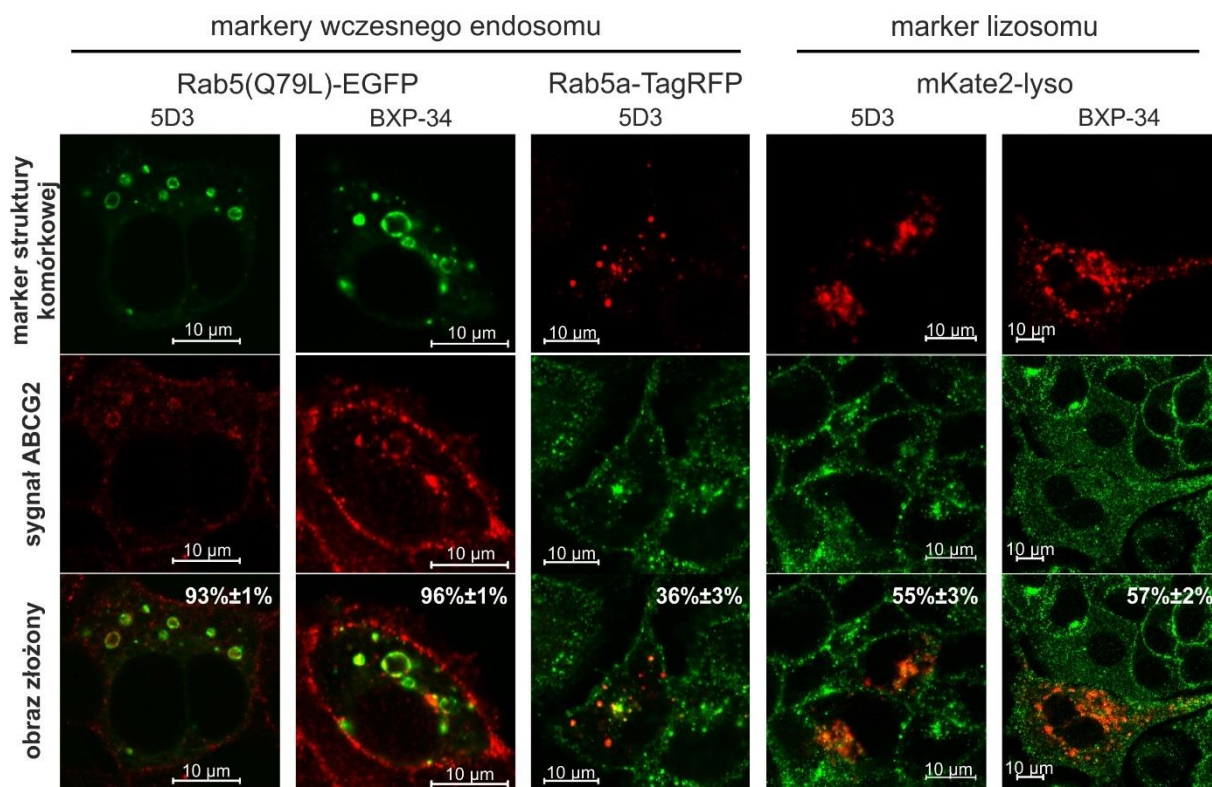
**Rycina 74.** Kolokalizacja sygnału ABCG2-5D3 i sygnału od standardowych markerów konkretnych szlaków endocytarnych. Pokazano przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek A549 w których jednocześnie zachodziła endocytoza białka ABCG2 oraz standardowych markerów endocytozy. Komórki A549 inkubowano przez określony czas z przeciwciałem 5D3-AF488 o stężeniu 5 µg/ml w 37°C razem z określonym markerem: dextran-TMR (stężenie 1 mg/ml, 40 minut) lub BSA-AF647 (stężenie 50 µg/ml, 60 minut). W przypadku pozostałych doświadczeń komórki inkubowano najpierw z nieznakowanym przeciwciałem 5D3 oraz danym markerem endocytozy (CtxB-AF488 w stężeniu 0,5 µg/ml, Tf-AF488 w stężeniu 25 µg/ml, BODIPY FL C5-LacCer w stężeniu 0,5 µM) przez 30 minut w temperaturze 4°C, a następnie po usunięciu nadmiaru odczynników komórki inkubowano przez 30 minut w 37°C z przeciwciałem drugorzędowym skierowanym przeciwko 5D3 wyznakowanym za pomocą Alexa Fluor 568. Dla ułatwienia interpretacji wyników w każdym przypadku sygnał pochodzący od wyznakowanego przeciwciała 5D3 przedstawiono za pomocą zielonego pseudokoloru, a sygnały od markerów przedstawiono za pomocą czerwonego pseudokoloru. Na obrazach podano również procent pikseli zawierających sygnał 5D3-ABCG2 jaki stanowią piksele pozytywne również w kanale odpowiedniego markera. Przedstawiono wartość średnią ± średni błąd średniej, n = 3.

W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, w jaki sposób na zjawisko internalizacji ABCG2 wpływa przejściowa ekspresja fluorescencyjnie znakowanych wariantów małych GTPaz o zmienionej aktywności (konstytutywnie aktywnych lub zawierających mutację negatywną dominującą) zaangażowanych w różne procesy związane z endocytozą. Komórki A549 transfekowano przejściowo za pomocą odpowiednich plazmidów niosących warianty białka RhoA, Arf6 lub Cdc42 w fuzji z dołączonym białkiem fluoryzującym (EGFP lub ECFP). Następnie w komórkach stymulowano endocytozę ABCG2 za pomocą przeciwciała 5D3 i sygnał od związanego przeciwciała 5D3 wizualizowano immunofluorescencyjnie. Następnie na tych samych polach widzenia w określano względny procent pikseli zawierających sygnał 5D3-ABCG2 w obrębie komórek zawierających fluorescencyjnie znakowany wariant danej GTPazy w odniesieniu do komórek nie zawierających tego białka. Wyniki zestawiono na rycinie 75. Jedynie w przypadku wariantów białka RhoA zaobserwowano zmiany w ilości internalizowanego przeciwciała 5D3. Endocytoza była o ok. 50% mniej efektywna w komórkach zawierających konstytutywnie aktywny wariant tego białka, a w komórkach zawierające dominujący negatywny wariant RhoA proces internalizacji był bardziej wydajny. Dowodzi to, że białko RhoA jest zaangażowane w procesy osłabiające endocytozę kompleksu 5D3-ABCG2. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami, że białko RhoA jest negatywnym regulatorem procesów endocytozy zależnych od klatryny (Lamaze i in., 1996) i ponownie dowodzi, że białko ABCG2 ulega częściowo endocytozie na tym szlaku. W przypadków wariantów białek Arf6 i Cdc42 nie zaobserwowano różnic w procesie endocytozy, co dowodzi, że te GTPazy nie są w istotny sposób zaangażowane w badany proces. Ponownie można na tej podstawie wykluczyć udział pinocytozy fazy płynnej (zależnej od Cdc42) oraz procesów niezależnych od klatryny regulowanych przez Cdc42 (procesy zależne od kaweoliny) i Arf6 (na przykład makropinocytoza i inne procesy uzależnione od niezakłóconego funkcjonowania włókien aktynowych).



**Rycina 75.** Wpływ przejściowej ekspresji znakowanych fluorescencyjnie wariantów małych GTPaz (zielony sygnał) regulujących wybrane szlaki endocytozy na przebieg internalizacji kompleksu ABCG2-5D3. Pokazano przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek A549 transfekowanych przejściowo za pomocą plazmidów niosących odpowiednie warianty wskazanych GTPaz. Komórki inkubowano przez godzinę z przeciwciałem 5D3 w normalnych warunkach hodowli, a następnie po utrwaleniu komórek, sygnał 5D3 wykrywano immunofluorescencyjnie za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 568 (czerwony sygnał). W procentach na obrazach przedstawiono względną ilość pikseli zawierających sygnał od fluorescencyjnie wyznakowanego przeciwciała 5D3 w obrębie komórek zawierających odpowiedni wariant GTPazy w stosunku do ilości pikseli w komórkach nie zawierających wariantu GTPazy na tym samym polu widzenia. Przedstawione wartości to średnia  $\pm$  średnie błąd średniej. Zaznaczono istotność różnic względem kontroli nie zawierającej wariantu GTPazy, \*  $p < 0,05$ .

W kolejnym doświadczeniu zbadano, jaka jest lokalizacja subkomórkowa internalizowanego białka ABCG2. Komórki A549 transfekowano przejściowo plazmidami niosącymi geny wyznakowanych fluorescencyjnie białek markerowych dwóch struktur wewnątrzkomórkowych: wczesnego endosomu (Rab5(Q79L)-EGFP lub Rab5a-TagRFP) oraz lizosomu (mKate2-lyso). Komórki inkubowano następnie z 5D3 i analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej, wykonując immunofluorescencyjne znakowanie przeciwciała 5D3 lub białka ABCG2 (za pomocą przeciwciała BXP-34). Przykładowe pola widzenia pokazano na rycinie 76. Wewnątrz komórek, które zawierały sygnał fluorescencyjny odpowiedniego markera lokalizacji subkomórkowej, określano, jaki procent pikseli pozytywnych w kanale fluorescencji, w którym wyznakowano kompleks 5D3-ABCG2, zawiera również sygnał pozytywny w kanale fluorescencji odpowiedniego markera struktury wewnątrzkomórkowej.



**Rycina 76.** Kolokalizacja sygnału 5D3-ABCG2 z białkowymi markerami struktur wewnątrzkomórkowych. Pokazano przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek A549 przejściowo zawierających fluorescencyjnie znakowane markery wczesnych endosomów (Rab5(Q79L)-EGFP, Rab5a-TagTFP) oraz marker lizosomu mKate2-lyso. Komórki inkubowano przez godzinę z przeciwciałem 5D3 lub z przeciwciałem 5D3-AF488 (w przypadku komórek zawierających Rab5a-TagRFP oraz części komórek zawierających mKate2-lyso) w normalnych warunkach hodowli, a następnie po utwaleniu komórek, sygnał nieznakowanego 5D3 wykrywano immunofluorescencyjnie za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 568. Dodatkowo w części komórek białko ABCG2 wyznakowano immunofluorescencyjnie za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała BXP-34 oraz odpowiedniego drugorzędowego przeciwciała (skierowanego przeciwko mysiemu IgG<sub>1</sub>) wyznakowanego za pomocą Alexa Fluor 568 (w komórkach z Rab5(Q79L)-EGFP) lub za pomocą Alexa Fluor 488 (w komórkach z mKate2-lyso). Odpowiednie sygnały pokazano w kolorach zielonym i czerwonym zgodnie z opisem po lewej stronie ryciny. Na obrazach przedstawiono procent pikseli zawierających sygnał 5D3-ABCG2 jaki stanowią piksele pozytywne również w kanale odpowiedniego markera. Przedstawiono wartość średnią ± średni błąd średniej, n = 3.

W przypadku komórek, w których ekspresji ulega białko Rab5(Q79L)-EGFP, praktycznie cały wewnątrzkomórkowy sygnał kompleksu 5D3-ABCG2 kolokalizuje z sygnałem struktur wczesnego endosomu. Dowodzi to, że niezależnie od początkowego mechanizmu procesu internalizacji białko ABCG2 po związaniu przeciwciała 5D3 trafia do wczesnego endosomu, a w przypadku zaburzonej dalszej segregacji endosomów, związanej z obecnością konstytutywnie aktywnej formy białka Rab5, całość sygnału kolokalizuje z tą strukturą. W przypadku niezmienionego wariantu białka Rab5a również można zaobserwować znaczącą, ale nie całkowitą kolokalizację sygnałów, ponieważ w tym przypadku pozostała część sygnału od 5D3-ABCG2 prawdopodobnie znajduje się w strukturach na dalszych etapach transportu wewnątrzkomórkowego. W przypadku komórek zawierających

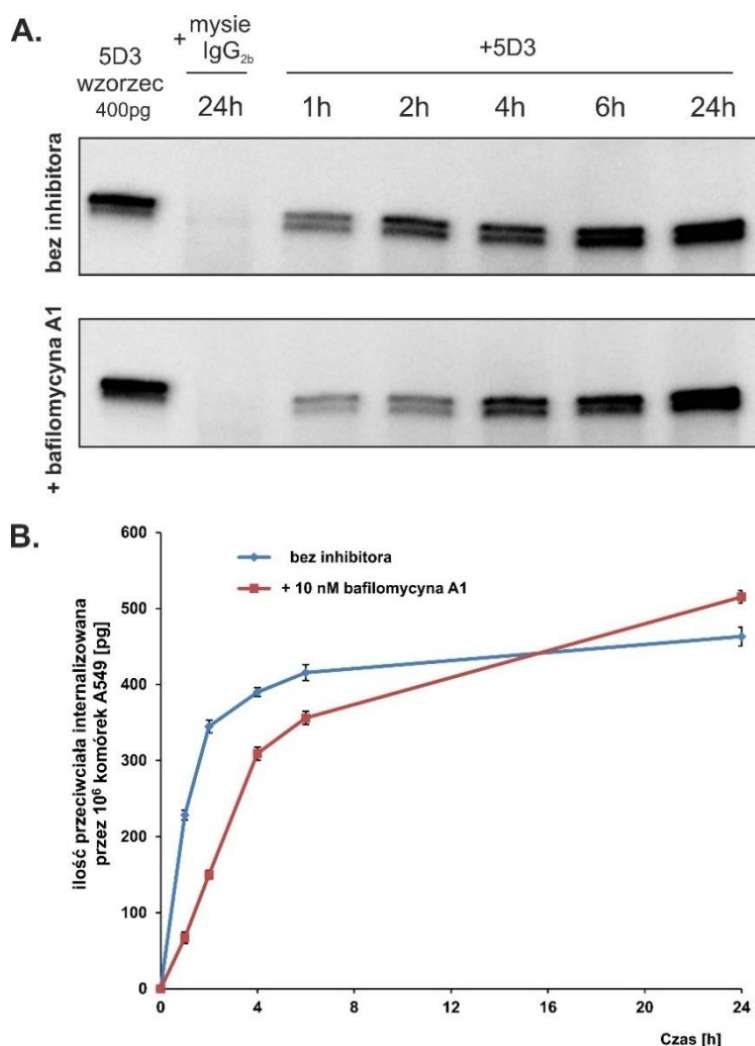


mKate2-lyso około 50% sygnału fluorescencyjnego kompleksu 5D3-ABCG2 kolokalizuje z sygnałem lizosomów, co sugeruje, że białko jest częściowo kierowane do degradacji w tej strukturze wewnątrzkomórkowej.

#### **4.3.2.4. Losy białka ABCG2 po internalizacji**

Następnie wykonano eksperyment, w którym zbadano, jak zmienia się w czasie ilość przeciwciała obecnego w komórkach A549. Jako kontrolę negatywną komórki inkubowano przez 24 h z niespecyficznym mysim przeciwciałem IgG<sub>2b</sub>. Dodatkowo, aby sprawdzić, czy przeciwciało ulega degradacji w lizosomach, przeprowadzono również eksperyment w obecności bafilomycyny A1 (inhibitora pomp protonowych zakwaszających wnętrze lizosomów). Ilość akumulowanego przeciwciała 5D3 analizowano techniką Western Blot. Przykładowy wynik przedstawiono na rycinie 77A. Na rycinie 77B przedstawiono analizę ilościową uzyskaną na podstawie trzech eksperymentów.

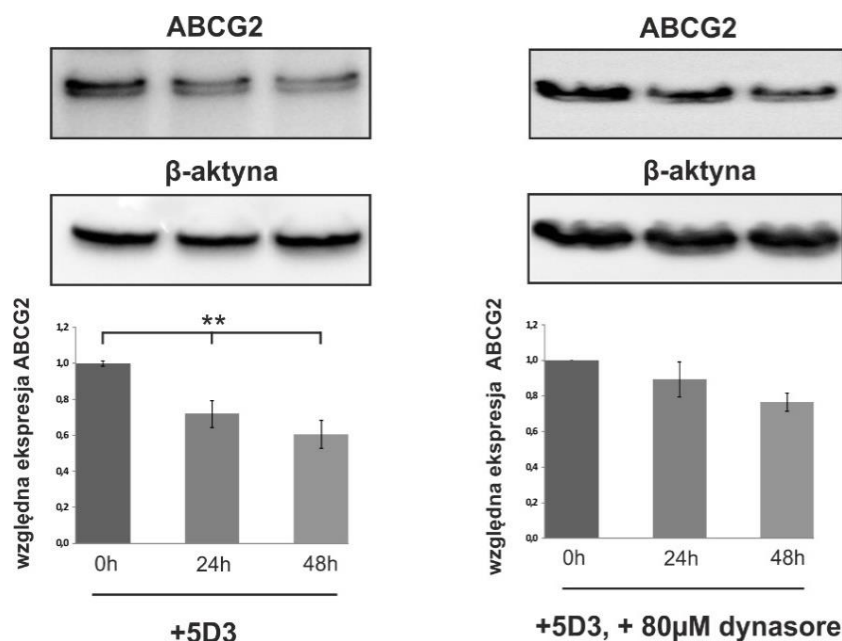
Podobnie jak wykazano w przypadku komórek analizowanych mikroskopowo, powyższe doświadczenie udowadnia, że przeciwciało 5D3 ulega szybkiej akumulacji w komórkach, a ilość miejsc wiązania niemal wysyca się po 6 godzinach inkubacji. W przypadku, kiedy endocytoza prowadzona jest w obecności bafilomycyny A1, ilość akumulowanego przeciwciała jest początkowo mniejsza, ale po 24 h inkubacji komórki zawierają więcej przeciwciała 5D3 niż komórki kontrolne. Wskazuje to na podwójny efekt działania bafilomycyny A1. Po pierwsze, ograniczenie zakwaszenia pęcherzyków lizosomalnych hamuje sam proces endocytozy; po drugie, uniemożliwia degradację pewnej części zinternalizowanego białka. W zgodzie z poprzednimi obserwacjami dowodzi to, że przeciwciało 5D3 jest częściowo kierowane do lizosomów, gdzie ulega degradacji.



**Rycina 77.** Analiza akumulacji przeciwciała 5D3 w komórkach A549 za pomocą Western Blot. Komórki inkubowano z przeciwciałem 5D3 lub niespecyficznym mysim przeciwciałem o tym samym izotypie (w stężeniu 5  $\mu\text{g/ml}$ ) w nieobecności lub obecności 10 nM bafilomycyny A1 przez podany okres czasu, a następnie przeciwciała zgromadzone w komórkach zagęszczano za pomocą paramagnetycznych kulek opłaszczonych białkiem G i białkiem A. W analogiczny sposób oczyszczono i naniesiono na żel znaną ilość przeciwciała 5D3 (wzorzec 5D3). Przeciwciała 5D3 znakowano za pomocą przeciwciała drugorzędowego skoniugowanego z HRP i wykrywano w reakcji chemiluminescencji. **A.** Przykładowe membrany, **B.** Wynik analizy densytometrycznej. Przedstawiono wartość średnią  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 3$ .

Kolejny eksperyment wykonano, aby sprawdzić, czy obserwowany powyżej efekt degradacji przeciwciała 5D3 idzie w parze z degradacją białka ABCG2. Komórki A549 traktowano za pomocą przeciwciała 5D3 w nieobecności lub obecności dynasore (w celu zahamowania procesów endocytozy kompleksu 5D3-ABCG2). Po 0 h, 24 h i 48 h ilość białka ABCG2 analizowano w tak traktowanych komórkach za pomocą techniki Western Blot. Względną ilość białka ABCG2 określano densytometrycznie w odniesieniu do ilości  $\beta$ -aktyny. Obrazy przykładowych membran oraz wyniki analizy ilościowej wykonane na podstawie trzech powtórzeń eksperymentu przedstawiono na rycinie 78.

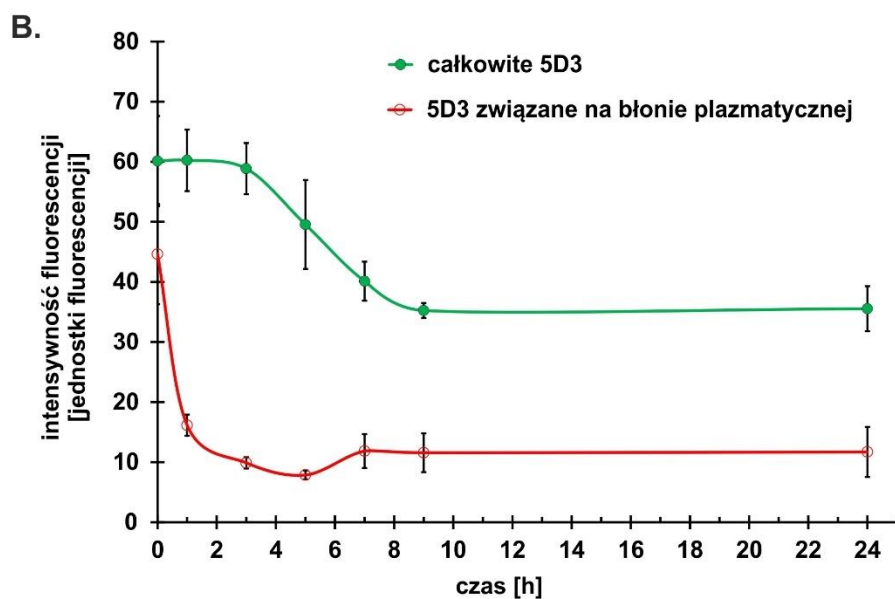
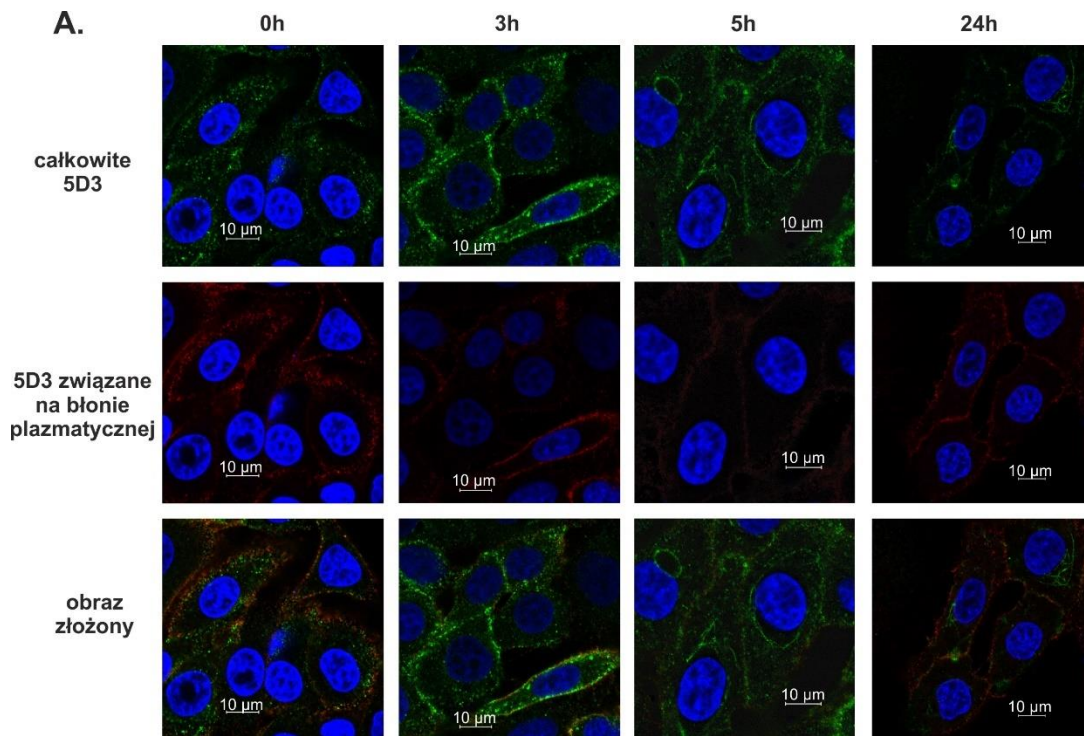
Całkowita ilość białka ABCG2 w komórkach maleje po długotrwałej inkubacji z przeciwciałem 5D3. W komórkach traktowanych równocześnie za pomocą dynasore nie stwierdzono istotnego efektu obniżenia poziomu białka, co dowodzi, że za obniżenie ilości ABCG2 jest odpowiedzialny proces endocytozy indukowany związaniem przeciwciała 5D3. Zgodnie również z wcześniejszymi wynikami sugeruje to, że kompleks 5D3-ABCG2 jest internalizowany w procesie endocytozy zależnym od dynaminy, a następnie częściowo jest kierowany do degradacji lizosomalnej.



**Rycina 78.** Analiza Western Blot ilości białka ABCG2 w komórkach A549 po traktowaniu za pomocą przeciwciała 5D3. Komórki inkubowano z przeciwciałem 5D3 (w stężeniu 5  $\mu$ g/ml) w nieobecności lub obecności 80  $\mu$ M dynasore przez podany okres czasu. Następnie w lizatach komórkowych oznaczano ilość ABCG2 oraz  $\beta$ -aktyny za pomocą odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych oraz przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z HRP. Sygnał wykrywano w reakcji chemiluminescencji. Przetawiono wynik analizy densytometrycznej względnej ekspresji białka ABCG2 (w odniesieniu do ekspresji  $\beta$ -aktyny). Przedstawiono wartość średnią  $\pm$  średni błąd średniej, n = 3, \*\* p < 0,001.

Aby jeszcze dokładniej zbadać wewnątrzkomórkowe losy przeciwciała 5D3, wykonano eksperyment typu „pulse-chase”. Przeciwciała 5D3 wiązano do komórek A549 przez 30 minut, a następnie po usunięciu przeciwciała hodowano komórki przez kolejne 24 h analizując w określonych punktach czasowych całkowitą ilość związanego przeciwciała 5D3, a także jego ilość dostępną od zewnątrz na błonach plazmatycznych komórek. W tym celu po określonym czasie komórki utrwalano i wykrywano w nich sygnał przeciwciała 5D3 przed oraz po permeabilizacji błon plazmatycznych, stosując odpowiednio różne fluorescencyjnie wyznakowane przeciwciała drugorzędowe. Preparaty analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przykładowe obrazy przedstawiono na rycinie 79A. Na rycinie 79B przedstawiono analizę ilościową sygnału wykonaną dla każdego punktu czasowego dla pięciu pól widzenia,

na których w odpowiednich kanałach fluorescencji określano ilość sygnału odpowiadającą całkowitej oraz dostępnej na błonie plazmatycznej części przeciwciała 5D3.

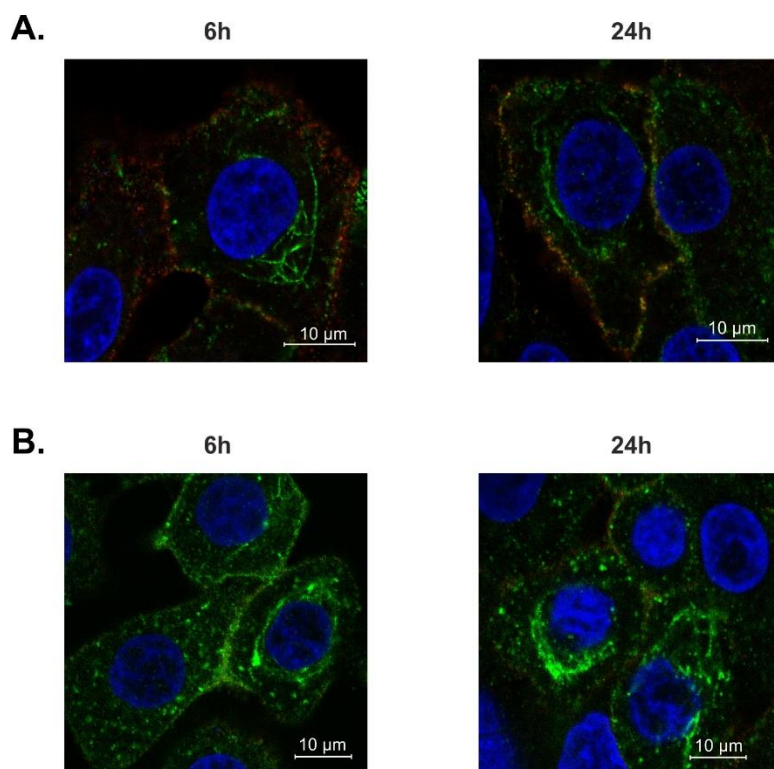


**Rycina 79.** Zmiany ilości przeciwciała 5D3 (całkowitego oraz wyeksponowanego na błonie plazmatycznej) w czasie 24 h po związaniu ograniczonej ilości przeciwciała. Komórki A549 inkubowano przez 30 min z przeciwciałem 5D3 (w stężeniu 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Następnie nadmiar przeciwciała usunięto i komórki inkubowano dalej w normalnych warunkach hodowli. Po wskazanym czasie komórki utrwalano i wykrywano przeciwciała 5D3 związane na błonie plazmatycznej za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 555 (czerwony sygnał). Następnie komórki drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 488 (zielony sygnał). Jądra komórkowe wybarwiono Hoechst 33342 (niebieski sygnał). **A.** Przykładowe konfokalne obrazy mikroskopowe komórek. **B.** Zmiany intensywności fluorescencji komórek w odpowiednich kanałach. Przedstawiono wartość średnią  $\pm$  średni błąd średniej,  $n = 5$ .

Ilość dostępnego przeciwciała obecna na powierzchni błon plazmatycznych komórek szybko obniża się w ciągu pierwszych godzin od rozpoczęcia eksperymentu. Już w początkowym punkcie czasowym (0 h), część związanego przeciwciała znajduje się wewnątrz komórek, ponieważ uległa internalizacji w trakcie wcześniejszych 30 minut, kiedy komórki inkubowano z przeciwciałem. Minimalną ilość dostępnego na powierzchni błon plazmatycznych przeciwciała 5D3 zaobserwowano po około 5 h od rozpoczęcia eksperymentu. Co ciekawe, w kolejnych godzinach eksperymentu przeciwciała 5D3 jest częściowo z powrotem transportowane na powierzchnię komórek i mniej więcej po 7 h ilość dostępna na błonach plazmatycznych już się nie zmienia. Całkowita ilość związanego przeciwciała 5D3 zaczyna obniżać się dopiero po około 3 h od rozpoczęcia eksperymentu. Mniej więcej po 9 h osiągnięta jest wartość minimalna i po 24 h od rozpoczęcia eksperymentu całkowita ilość obecnego w komórkach 5D3 już się nie zmienia. Porównując początkową i końcową wartość intensywności sygnału fluorescencyjnego można oszacować, że około jedna trzecia całego związanego przeciwciała ulega degradacji. Dodatkowo, po ustaleniu się równowagi, mniej więcej 25% przeciwciała 5D3 obecnego w komórkach jest dostępna na błonach plazmatycznych.

Następnie sprawdzono, w jaki sposób zmienia się lokalizacja subkomórkowa białka ABCG2 po długim czasie od związania przeciwciała 5D3 i czy losy kompleksu 5D3-ABCG2 są takie same jak losy samego przeciwciała 5D3. Ponownie przeprowadzono doświadczenie typu „pulse-chase” i po czasie 6 h oraz 24 h od rozpoczęcia eksperymentu w komórkach wyznakowano przeciwciała 5D3 obecne na błonie plazmatycznej oraz wyznakowano przeciwciała 5D3 lub białko ABCG2 obecne w całej komórce. Reprezentatywne konfokalne obrazy mikroskopowe przedstawiono na rycinie 80.

Porównując barwienie przeciwciała 5D3 oraz barwienie białka ABCG2 można zauważyć, że znajdują się one w tych samych kompartmentach komórkowych zarówno po 6 h, jak i po 24 h od rozpoczęcia doświadczenia. Dowodzi to, że przez cały czas trwania doświadczenia to zmiany konformacyjne wywoływane związaniem przeciwciała 5D3 są odpowiedzialne za zmiany w lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2. Po 24 h od związania przeciwciała 5D3 białko ABCG2 w przeważającej części znajduje się wewnątrz komórek w postaci pęcherzyków regularnie rozmieszczonych wokół jąder komórkowych (rycina 80B).



**Rycina 80.** Subkomórkowa lokalizacja kompleksu 5D3-ABCG2 (całkowitego oraz wyeksponowanego w błonie komórkowej) po 6 h i 24 h od związania ograniczonej ilości przeciwciała. Komórki A549 inkubowano przez 30 min z przeciwciałem 5D3 (w stężeniu 5 µg/ml). Następnie nadmiar przeciwciała usunięto i komórki inkubowano dalej w normalnych warunkach hodowli. Po wskazanym czasie komórki utrwalano i wykrywano przeciwciało 5D3 związane na błonie plazmatycznej za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 555 (**A. i B.**, czerwony sygnał). Następnie komórki permeabilizowano i wykrywano całkowitą ilość przeciwciała 5D3 za pomocą przeciwciała drugorzędowego wyznakowanego Alexa Fluor 488 (**A.** zielony sygnał) lub znakowano białko ABCG2 za pomocą pierwszorzędowego przeciwciała BXP-34 oraz drugorzędowego przeciwciała wyznakowanego Alexa Fluor 488 (**B.** zielony sygnał). Jądra komórkowe wybarwiono Hoechst 33342 (niebieski sygnał).

## 5. Dyskusja

Białko ABCG2 stanowi niezwykle ciekawy i ważny obiekt badań naukowych. Przez wiele lat czołowe zespoły naukowe z całego świata skupiały się na badaniu jego aktywności, regulacji, genetyki molekularnej i struktury. Mimo tego wielkiego wysiłku badawczego i tak zadziwiająco mało do tej pory wiadomo o biologii ABCG2 w kontekście jego biogenezy, losów wewnątrzkomórkowych czy mechanizmów regulacji lokalizacji w obrębie komórki. Rozwój wiedzy o tym białku hamowany jest nadal również przez ograniczoną liczbę dostępnych wiarygodnych testów aktywności, a także łatwych i tanich wysokoprzepustowych metod, które pozwalałyby na ustalenie, czy dany związek (np. nowy lek) jest substratem i/lub inhibitorem tego transportera. Biorąc pod uwagę kluczową rolę ABCG2 w farmakokinetyce ogromnej liczby związków na poziomie kluczowych tkanek i całego organizmu, jest to ważna luka w wiedzy naukowej, która nadal stwarza atrakcyjne możliwości wyboru tematyki badawczej. Niniejsza praca skupia się więc po części na tworzeniu i walidacji nowych narzędzi niezbędnych do badania specyficzności substratowej, aktywności i lokalizacji komórkowej ABCG2. W toku przeprowadzonych prac udało się stworzyć innowacyjne technologie poszerzające paletę dostępnych metod badania biologii białka ABCG2. Pozwoliło to również na poczynienie interesujących obserwacji naukowych poszerzających wiedzę na temat tego ważnego transportera oporności wielolekowej, broniącego kluczowe narządy organizmu przed potencjalnie szkodliwymi ksenobiotykami. Badania dotyczące białka ABCG2, opisane w niniejszej pracy, dotyczą zagadnień z zakresu biochemii, biologii molekularnej oraz biologii komórki. W tych trzech obszarach zidentyfikowano luki w istniejącej wiedzy naukowej dotyczącej białka ABCG2 i repertuarze metod badawczych umożliwiających badanie multispecyficznych transporterów błonowych, ich specyficzności substratowej, aktywności biochemicznej oraz lokalizacji subkomórkowej. Strukturę niniejszej pracy determinuje fakt, że niezbędnym dla eksperymentalnego przetestowania założonych hipotez w odniesieniu do wszystkich trzech obszarów zainteresowania było opracowanie nowych, oryginalnych metod badawczych, bez których rozwinięcie wiedzy o ABCG2 nie byłoby możliwe. Umożliwiło to wytyczenie nowych ścieżek badań zarówno odnośnie biologii transportera ABCG2, jak i innych transporterów błonowych.

Aktualna literatura dotycząca białka ABCG2, podobnie jak w przypadku innych błonowych transporterów ABC, bogata jest w informacje dotyczące spektrum substratów transportowych (Grigoreva i in., 2022). Bardzo dużą grupę ważnych fizjologicznie substratów białka ABCG2 stanowią związki polifenolowe. W literaturze wykazano wcześnie interakcje ABCG2 z naturalnymi związkami polifenolowymi, najpierw jako inhibicję transportu klasycznych (w tym fluoryzujących) substratów przez polifenole (zwłaszcza flawonoidy) (Cooray i in., 2004), a potem również jako prawdopodobny transport flawonoidów i ich metabolitów przez ABCG2

(Brand i in., 2008). Bezpośrednio możliwość transportu flawonoidów przez ABCG2 wykazano przy zastosowaniu chemicznego oznaczenia stężenia substratu dopiero w 2011 roku (An i in., 2011). Flawonoidy często wymieniane są w literaturze jako zarówno ważne fizjologiczne substraty, jak i obiecujące specyficzne inhibitory ABCG2, ponieważ dla większości z nich oddziaływanie z innymi białkami oporności wielolekowej jest znikome (Peña-Solórzano i in., 2017). Ponieważ flawonoidy stanowią niezwykle różnorodną pod względem chemicznym grupę substancji transportowanych przez ABCG2, trudno jest znaleźć w literaturze prace, które opisywałyby i porównywałyby je w sposób systematyczny w oparciu o eksperymenty przeprowadzone na dużej liczbie różnorodnych związków. Najczęściej badania ograniczają się do opisu jedynie wąskiej grupy substancji, co pozwala jedynie na wyciągnięcie ograniczonych wniosków dotyczących związku struktura-aktywność (Gandhi i Morris, 2009).

W toku niniejszej pracy dzięki wykorzystaniu techniki fluorescencyjnej derywatywacji flawonoidów, a także dzięki zastosowaniu metod wysokoprzepustowych, udało się zidentyfikować wiele nowych substratów oraz potencjalnych inhibitorów aktywności białka ABCG2. Praca na szerokiej gamie związków pochodzenia naturalnego umożliwiła również określenie nowych reguł specyficzności substratowej i zaobserwowanie ciekawych zależności między strukturą a aktywnością. Wśród przetestowanych flawonoidów udało się zidentyfikować wcześniej nieznaną, bardzo dobrą polifenolową substrat białka ABCG2, które można stosować jako nowe, tanie i łatwo dostępne substancje modelowe. Dużym osiągnięciem niniejszej pracy jest również przystosowanie znanej od dawna, choć mało rozpowszechnionej w praktyce metody fluorescencyjnej derywatywacji związków polifenolowych, wykorzystywanej do tej pory w ograniczonym zakresie w fitochemii oraz botanice, i zastosowanie jej w biologii komórek zwierzęcych do badania aktywności białka ABCG2. Szczegółowa wiedza dotycząca tej metody uzyskana przy okazji niniejszej pracy może być również wykorzystana w przyszłości przy badaniu interakcji flawonoidów z organizmami zwierzęcymi: ich biodystrybucji w komórkach, tkankach i narządach oraz oddziaływania z innymi białkami, w tym transportowymi.

Flawonoidy są powszechnie występującymi związkami naturalnymi pochodzenia roślinnego. Stanowią one codzienny element naszej diety, ponieważ znajdują się w wielu spożywanych owocach i warzywach (Panche i in., 2016). Od zarania dziejów stanowią również ważny element medycyny naturalnej. Dla wielu z tych substancji nadal nie określono jednak dokładnych mechanizmów działania oraz nie opisano w wystarczający sposób interakcji, w jakie mogą wchodzić z innymi substancjami przyjmowanymi z pożywieniem, a także z syntetycznymi lekami stosowanymi w medycynie konwencjonalnej. W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się coraz większą akceptację i zainteresowanie metodami ziołolecznictwa oraz podobnymi metodami leczenia opartymi na produktach pochodzenia



naturalnego. Dzieje się tak zarówno w krajach rozwijających się, w których ze względu na ograniczoną dostępność i wysoki koszt zarejestrowanych produktów leczniczych medycyna często opiera się na naturalnych mieszankach ziołowych, jak i w krajach rozwiniętych, w których ziołowe suplementy diety stanowią modną alternatywę dla medycyny konwencjonalnej (Janabi i in., 2020; Solnier i in., 2023). Wiele flawonoidów ma udowodnione działanie farmakologiczne. Mogą być stosowane na przykład jako substancje o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym i przeciwwirusowym (Batiha i in., 2020). Są również bardzo efektywnymi naturalnymi przeciwutleniaczami (Ullah i in., 2023). Wiele związków z tej grupy stanowi również punkt wyjścia do projektowania i syntezy nowych leków (Zhao i in., 2023). Wszystko to powoduje, że niezwykle istotne staje się określenie, w jaki sposób białko ABCG2 reguluje farmakokinetykę i farmakodynamikę tych substancji.

Jednym z ważnych odkryć poczynionych w toku niniejszej pracy jest identyfikacja kilkudziesięciu flawonoidów jako nieznanymi uprzednio substratów i/lub inhibitorów białka ABCG2, z istotnymi implikacjami dla ich farmakokinetyki w organizmie ludzkim. Wśród nowo poznanych substratów bardzo wydajnie transportowanych przez ABCG2 znajduje się na przykład eriodiktiol. Ta substancja izolowana ze „świętej rośliny” *Eriodictyon californicum*, występującej naturalnie na terenach Kalifornii (Ameryka Północna) jest w stanie wpływać na zmysł smaku, podobnie jak dwa inne flawonoidy z tego samego źródła (homoeriodiktiol i sterubina). Właściwości maskowania gorzkiego smaku spożywanych pokarmów oraz leków, jakie wykazuje ten flawonoid, są dobrze znane i szeroko wykorzystywane w przemyśle dodatków do żywności, gdzie materiał z tej rośliny sprzedawany jest pod nazwą yerba santa (Ley i in., 2005). Substancja ta ma również wiele bezpośrednich zastosowań farmakologicznych (Guo i in., 2023), ale w niniejszej pracy po raz pierwszy opisano jej oddziaływanie z białkiem ABCG2.

Dwa inne ściśle strukturalnie powiązane ze sobą związki, fisetyna i fustyna (nazywana również dihydrofisetyną), także stanowią nowo zidentyfikowane substraty ABCG2 o opisanej uprzednio aktywności biologicznej. Oba związki wytypowano niedawno jako substancje o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym w terapii COVID-19 (Wang i in., 2022). Fisetyna ma również szereg innych, dobrze udokumentowanych właściwości farmakologicznych. Należy na przykład do grupy związków aktywujących sirtuiny, przez co wykazano, że może przedłużać średni czas życia (Yousefzadeh i in., 2018). Wykazuje także właściwości przeciwnowotworowe (Kumar i in., 2023), choć jej potencjał terapeutyczny jest ograniczony, ponieważ wykazuje mnogość niepożądanych aktywności biologicznych, a jej farmakokinetyka dopiero zaczyna być badana (Vishwas i in., 2022).

Galangina to kolejny nowo zidentyfikowany dobry substrat białka ABCG2. Ten związek, posiadający wiele aktywności biologicznych, został wyizolowany z alpinii lekarskiej *Alpinia officinarum*. Ze względu na jego powszechne występowanie w żywicach roślinnych, ważnym źródłem tego związku jest kit pszczeli. Opisano jego działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe (Pillai i in., 2018). Dobrze znane jest również jego działanie przeciwzapalne (Thapa i in., 2023). Uprzednio dla galanginy wykazano jedynie, że w formie zmetabolizowanej jest transportowana przez komórki Caco-2, ale mechanizm molekularny nie został zidentyfikowany (Barrington i in., 2009).

Wśród innych ciekawych nowych substratów białka ABCG2 można też wymienić dwa podobne strukturalnie flawonoidy; w niniejszej pracy wykazano, że zarówno robinetyna, jak i dihydrorobinetyna są bardzo dobrze transportowane przez białko ABCG2. Oba flawonoidy są stosowane jako markery starzenia win przechowywanych w drewnianych beczkach - z ich ścian z czasem do płynnego produktu spożywczego ekstrahują się znaczne ilości tych związków (Sanz i in., 2012). Robinetyna została również niedawno zidentyfikowana jako silny inhibitor proteazy wirusa SARS-CoV-2 (Krüger i in., 2023). Podobnie jak w przypadku wielu innych flawonoidów w przeszłości dla tego związku sugerowano jedynie właściwości inhibitorowe w odniesieniu do białka ABCG2 (Schutte i in., 2006). Innym nowym interesującym substratem ABCG2 jest orobol, polifenol należący do izoflawonoidów. Jest on znanym, silnym inhibitorem kinazy PI3K, przez co znalazł się w grupie związków badanych pod kątem potencjalnej regulacji cytotoksyczności leków przeciwnowotworowych (Isonishi i in., 2007). Wykazano, że orobol znacząco uczulał komórki nowotworowe na działanie cytostatyków, choć efektu tego nie powiązano wówczas z oddziaływaniem na białka oporności wielolekowej. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie dowodzą, że na obserwowany przez autorów efekt terapeutyczny duży wpływ mogła mieć inhibicja białka ABCG2.

Wśród innych nieznanymi wcześniej substratów ABCG2 można też wymienić takie związki o znaczącej aktywności farmakologicznej jak akacetyna (Zhang i in., 2023), hydrangenol (Myung i in., 2019), steppogenina (Cha i in., 2023), cykloheterofilina (Shim, 2021), dalbergioidyna (Ren i in., 2016) i izosakuronetyna (Janyou i in., 2023). Ten ostatni związek był badany pod kątem właściwości przeciwutleniających w szczurzym modelu udaru niedokrwienego mózgu. Analizowano wpływ tego flawonoidu na barierę krew-mózg, nie biorąc pod uwagę opisanego w niniejszej pracy bezpośredniego efektu, jaki wywołuje on na białko ABCG2, co zmienia interpretację uzyskanych w tej pracy wyników.

Wiele flawonoidów to nieefektywne substraty, lecz skuteczne inhibitory aktywności białka ABCG2 wobec innych substratów (wiążą się z wysokim powinowactwem, ale są mało wydajnie transportowane). Ponieważ efekt inhibicji transportu łatwiej jest mierzyć (stosując modelowe

fluorescencyjne substraty tego transportera) niż oddziaływania substratowe, wiele polifenoli już dawno zaklasyfikowano do tej grupy (Zhang i in., 2004). Właściwości inhibitorowe względem białka ABCG2 zostały potwierdzone w niniejszej pracy na przykład dla takich flawonoidów jak kempferol, chryzyna, hesperetyna, genisteina i silibininina A. Udało się również zidentyfikować inhibitory białka ABCG2 nie opisywane wcześniej. Można tu wymienić na przykład eukaliptynę, flawonoid o właściwościach przeciwbakteryjnych izolowany z liści eukaliptusa (Takahashi i in., 2004), czy noreugeninę, prosty chromon pozyskiwany między innymi z pędów chwytny wielkiej *Pisonia grandis* i wykazujący właściwości przeciwbakteryjne (Kayed i in., 2021). Dzięki zastosowaniu różnych modeli eksperymentalnych w niniejszej pracy udało się również udowodnić, że eter 3,4'-dimetylowy kwercetyny, znany również jako 3-O-metylotamariksetyna i wyizolowany po raz pierwszy z trudziczki czworokątnej *Combretum quadrangulare* stosowanej przeciw chorobom zakaźnym w afrykańskiej medycynie tradycyjnej (Toume i in., 2011), stanowi skuteczny, nieznan wcześniej inhibitor białka ABCG2. W przeciwieństwie do kwercetyny związek ten ma bardzo wysokie powinowactwo do ABCG2 (wydajnie konkuruje o miejsca wiązania z Ko143), ale prawie nie jest transportowany. Oprócz właściwości przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych (Dallagnol i in., 2022) nie ma on znanych właściwości farmakologicznych, w szczególności wobec organizmu ludzkiego, więc jest bardzo dobrym potencjalnym kandydatem do hamowania aktywności białka ABCG2 z uniknięciem niepożądanych efektów ubocznych, często obserwowanych dla innych flawonoidów. Innym bardzo ciekawym inhibitorem zidentyfikowanym po raz pierwszy w niniejszej pracy jest genkwanina. Flawonoid ten występuje powszechnie u roślin z różnych grup systematycznych, jest między innymi jednym z wielu związków pozyskiwanych z wawrzynka genkwa *Daphne genkwa*, który znajduje się wśród najważniejszych roślin leczniczych tradycyjnej medycyny chińskiej (Kai i in., 2004).

Co ciekawe, inny związek strukturalnie powiązany z genkwaniną i również pozyskiwany z tego samego źródła roślinnego, hydroksygenkwanina, okazał się być w niniejszej pracy świetnym substratem ABCG2, transportowanym efektywnie przez ten transporter. Hydroksygenkwanina była opisywana jako inhibitor białka ABCG2, który uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków (Li i in., 2022). Wyniki doświadczeń opisanych w niniejszej pracy dowodzą, że faktycznie związek ten wchodzi w interakcje z białkiem ABCG2 i może stanowić jego inhibitor kompetycyjny, ale charakteryzuje się wysoką szybkością graniczną transportu i wartością  $K_m$ . Dlatego równie wydajne zahamowanie transportu leków przez ABCG2 można zapewne uzyskać *in vivo* przy dużo niższych stężeniach genkwaniny niż hydroksygenkwaniny. Porównanie aktywności białka ABCG2 względem tych dwóch flawonoidów prowadzi do ciekawych wniosków dotyczących związku struktura-aktywność (SAR, ang. structure–activity relationship). Hydroksygenkwanina różni się od genkwaniny

jedynie obecnością grupy hydroksylowej w pozycji 3' pierścienia fenyłowego (patrz rycina 17). Genkwanina, która nie posiada w tym miejscu grupy hydroksylowej, ma wysokie powinowactwo do transportera, ale niską szybkość transportu. Hydroksygenkwanina, związek posiadający grupę hydroksylową, jest wiązany mało wydajnie, ale transportowany z dużo większą wydajnością.

Podobną relację obserwuje się w przypadku kempferolu i kwercetyny, które również różnią się obecnością grupy hydroksylowej w pozycji 3' w kwercetynie. Pierwszy z tych związków jest dobrym inhibitorem i słabym substratem, a drugi jest bardzo dobrze transportowany i oddziałuje z transporterem z umiarkowanym powinowactwem. Oba te przykłady pokazują, że obecność dwóch grupy hydroksylowych (w pozycji 3' i 4') w pierścieniu fenyłowym 2-fenylobenzopiranolów (patrz rycina 17) sprawia, że polifenol słabiej oddziałuje z białkiem ABCG2, ale za to jest transportowany bardzo sprawnie. W przypadku obecności jednej grupy hydroksylowej w pozycji 4' tego pierścienia, wiązanie do ABCG2 jest silne, ale związek uprzednio podejmowane próby SAR nie umożliwiły wyciągnięcia takich wniosków, ponieważ ze względu na ograniczenia metodologiczne próby te były prowadzone na wąskich grupach związków (Gandhi i Morris, 2009; Pick i in., 2011). Zastosowanie bardzo dużej liczby flawonoidów w niniejszej pracy umożliwiło również wykazanie innej zależności struktura-aktywność, w tym przypadku zbieżnej z sugerowaną uprzednio przez innych badaczy (Zhang i in., 2005). Wykazano, że grupa metoksylova w kempferydzie w miejscu grupy hydroksylowej w kempferolu sprawia, że kempferyd jest bardziej wydajnie transportowany przez białko ABCG2. Zidentyfikowane SAR mogą w przyszłości pomóc przy racjonalnym projektowaniu nowych inhibitorów białka ABCG2 oraz przy weryfikowaniu *in silico* potencjalnej transportowalności różnych związków przez to białko. Na podkreślenie zasługuje, że technika fluorescencyjnej derywatywacji flawonoidów, opisana w tej pracy, może być również z powodzeniem zastosowana przy badaniu SAR innych transporterów błonowych, które również mają duże znaczenie w farmakokinetyce związków polifenolowych, takich jak ABCB1 i transportery z rodziny OATP (Satoh i in., 2015).

Jak szczegółowo opisano powyżej, do tej pory opisano tylko kilka flawonoidów, które stanowią substraty białka ABCG2. Dla znacznie większej liczby związków udowodniono, że są one w stanie hamować aktywność tego transportera wobec innych substratów. Ta dysproporcja w ilości zidentyfikowanych substratów w stosunku do związków o właściwościach inhibitorowych (które są jedynie potencjalnymi substratami) wynika głównie z ograniczeń dotychczas stosowanych technik umożliwiających śledzenie losów polifenoli w komórkach. Bezpośredni transport flawonoidów, podobnie jak innych niefluorescencyjnych związków, zwykle bada się znakując je radioaktywnie lub wykorzystując czasochłonne i kosztowne techniki analityczne (np. wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową).

Najlepszą alternatywą dla tych technik jest zastosowanie metod fluorymetrycznych, jednakże nie było dotychczas w literaturze standardowych metod derywatywacji flawonoidów do badań transportu. Jednym z głównych osiągnięć naukowych niniejszej pracy jest adaptacja do tego celu klasycznej techniki uwidaczniania flawonoidów, stosowanej do tej pory głównie w badaniach z zakresu biochemii roślin w chromatografii cienkwarstwowej (Buer i in., 2007; J Simão i in., 2018). Z chemicznego punktu widzenia jest to reakcja bardzo uniwersalna, ponieważ fluorogenna derywatywacja flawonoidów bazuje na obecności odpowiednio ułożonych grup tlenowych przy pierścieniach polifenoli (patrz rycina 15). Mimo to do tej pory technika ta była stosowana w bardzo ograniczonym zakresie, do wykrywania obecności wąskiej grupy związków w roślinach (Böttner i in., 2021). Badania przeprowadzone w niniejszej pracy na bardzo dużej liczbie flawonoidów (406 różnych związków pochodzenia naturalnego i ich półsyntetycznych pochodnych) wykazały, że metoda derywatywacji z wykorzystaniem DPBA z powodzeniem nadaje się do wizualizacji większości z przetestowanych polifenoli. Co więcej wykazano, że reakcja tworzenia pochodnej flawonoid+DPBA przebiega szybko, nieodwracalnie i ilościowo (w pełni zużywając substrat) już w temperaturze pokojowej, a zmierzone wartości intensywności fluorescencji powstałego produktu można łatwo przeliczyć na wyjściowe stężenie danego flawonoidu w próbce.

Opisywana metoda derywatywacji flawonoidów z DPBA posiada wiele unikalnych zalet nawet w porównaniu do metod fluorescencyjnej derywatywacji zupełnie innych, łatwiejszych w wykrywaniu związków. Ważną taką zaletą jest fakt, że derywatywacja flawonoidów za pomocą DPBA może być stosowana zarówno w lizatach komórkowych, jak i do pomiaru stężenia flawonoidów w żywych komórkach. Opisano na przykład metodę wizualizacji polipeptydów zawierających cysteinę za pomocą pochodnych chlorobenzoksadiazoli (Masuda i in., 2004). Technika ta jest z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji i analizy chromatograficznej analitów, ale nie może być zastosowana w przypadku obserwacji prowadzonych na hodowlach komórkowych. Znana jest również metoda znakowania fluorescencyjnego peptydów polegająca na specyficznej derywatywacji peptydów zawierających 3-nitrotyrozinę fluorogennym związkiem o nazwie APPD (Dremina i in., 2011). Niestety związek ten nie wchodzi do żywych komórek, dlatego niemożliwe jest oznaczanie tej istotnej modyfikacji w materiale biologicznym bez jego homogenizacji i izolacji analitów.

Ze względu na to, że flawonoidy i inne polifenole o analogicznej budowie są związkami ściśle pochodzenia roślinnego, w przypadku derywatywacji flawonoidów za pomocą DPBA w komórkach zwierzęcych nie obserwuje się reakcji z endogennymi związkami. Dlatego reakcja jest specyficzna dla z roślinnych związków polifenolowych dodanych do tych komórek z zewnątrz, zapewniając przy tym detekcję szerokiego spektrum tych ksenobiotyków. Warto zauważyć, że tę samą technikę zastosowano niedawno (już po pierwszej publikacji przez

naszą grupę metody opracowanej w ramach niniejszej pracy) do wykrywania egzogennych flawonoidów w komórkach śluzowców (Ferrara i Thompson, 2019).

Pochodne flawonoid+DPBA charakteryzuje wysoka fotostabilność, dzięki czemu wyniki uzyskiwane opracowaną w niniejszej pracy metodą są wiarygodne i mają niską niepewność pomiaru. Produkty derywatywacji cechuje również wysoka stabilność chemiczna w złożonym środowisku cytozolu komórek zwierzęcych, co jest jeszcze istotniejsze z punktu widzenia zastosowań praktycznych do badania transportu flawonoidów jako ksenobiotyków, które same mogą w niektórych typach komórek ulegać efektywnemu metabolizmowi (Cassidy i Minihane, 2017). Ponadto relatywnie lipofilowe cząsteczki flawonoidów, które stanowią często bardzo dobre substraty do transportu, dramatycznie zmieniają pod wpływem reakcji z DPBA swoje właściwości fizykochemiczne, co stanowi kluczowy element przydatności opisywanej metody przy badaniu aktywności białka ABCG2, a potencjalnie również innych transporterów flawonoidów. Jako polarne, hydrofilowe cząsteczki, pochodne flawonoid+DPBA nie tylko nie są już w stanie biernie wyciekać z komórek (ponieważ nie mogą już przenikać przez błony plazmatyczne), ale również nie są już substratami ABCG2 ani innych transporterów błonowych. Wszystko to sprawia, że rozdzielczość czasowa (to znaczy precyzja, z jaką można analizować zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia flawonoidów) opisywanej techniki jest znakomita. Dalsze zastosowanie tej metody umożliwiło już między innymi dokładne pomiary parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej transportu niektórych flawonoidów przez ABCG2 (Rozanski i in., 2019). Wykorzystywane do tej pory techniki badania transportu przez białko ABCG2 opierały się o użycie kilku modelowych fluorescencyjnych substratów tego białka, takich jak mitoksantron (Homolya i in., 2011) czy Hoechst 33342 (Zámbó i in., 2018). Jak wykazano w niniejszej rozprawie, fluorescencyjna derywatywacja flawonoidów umożliwia wykorzystanie ich jako nowych modelowych substratów do badania enzymologii białka ABCG2.

Nowym substratem zidentyfikowanym w tej pracy, który świetnie nadaje się do tego celu, jest luteolina. Ten tani i łatwo dostępny w dużych ilościach produkt naturalny (obecny w wysokim stężeniu np. w cykorii i w papryce, z których jest komercyjnie izolowany) (Manzoor i in., 2017) jest bardzo wydajnie transportowany przez białko ABCG2, jednocześnie mając do niego umiarkowane powinowactwo. Transport luteoliny przez ABCG2 jest w związku z tym efektywnie hamowany zarówno przez nietransportowane inhibitory, jak i przez substraty wiążące się do transportera z większym powinowactwem (na przykład chryzyna). Dodatkowo luteolina tworzy z DPBA produkt flawonoid+DPBA o wyjątkowo jasnej fluorescencji, w związku z czym pomiar intensywności fluorescencji jest prosty i pozwala z wysoką czułością wyznaczyć jej stężenie, co z kolei umożliwia dokładne wyznaczanie parametrów kinetycznych (szybkość transportu, powinowactwo). Dzięki temu, stosując niezależnie dwie różne techniki pomiaru

oraz wykorzystując luteolinę jako modelowy substrat ABCG2, udało się w niniejszej pracy określić, że eksperymentalna stała inhibicji ( $K_i$ ) dla Ko143, kanonicznego inhibitora tego transportera, wynosi około 280 nM. Jest to zgodne z doniesieniami innych badaczy (Kita i in., 2021) i potwierdza koncepcję wykorzystania luteoliny jako substratu modelowego do tego typu badań. Przeprowadzone w niniejszej pracy porównanie aktywności substratowej białka ABCG2 dla kempferolu i luteoliny wykazało, że kempferol, stosowany w przeszłości przez innych badaczy jako modelowy substrat ABCG2 (An i in., 2011), jest relatywnie mało wydajnie transportowany (niskie  $V_{max}$ ) i wiąże się do transportera z wysokim powinowactwem, co uniemożliwia zastosowanie go jako modelowego substratu przy badaniu inhibicji transportu prowadzonego przez ABCG2. Luteolina nadaje się natomiast do tego celu bardzo dobrze. Wiadomo również, że jest ona substratem do transportu także dla innych białek błonowych. Zastosowanie derywatywacji z DPBA umożliwiło wykazanie, że ten flawonoid jest transportowany przez białko ABCB1, i praktyczne oznaczenie zmian w aktywności ABCB1 w modelu komórek traktowanych farmakologicznie (Sadowska-Bartosz i in., 2016). Ciekawostką dodatkowo zachęcającą do stosowania tego konkretnego związku może być fakt, że luteolina została po raz pierwszy zsyntetyzowana chemicznie przez polskiego chemika Stanisława Kostaneckiego (v. Kostanecki i in., 1900).

W wyniku doświadczeń opisanych w niniejszej pracy wytypowano również sporą ilość innych flawonoidów, które tworzą jasne fluorescencyjne pochodne i w związku z tym mogą także stać się modelowymi substratami do badania białka ABCG2 (należy tu wymienić hydroksygenkwaninę i orobol), a potencjalnie również innych transporterów ABC i ogólnie zwierzęcych transporterów błonowych. Istnieją badania wskazujące, że flawonoidy są również transportowane przez inne transportery błonowe. Wykazano na przykład, że niektóre flawonoidy są w stanie hamować napływ dichlorofluoresceiny do komórek, za który odpowiedzialny jest transporter OATP1B1, co pośrednio sugeruje, że flawonoidy są importowane do komórek przez ten transporter (Xiang i in., 2020). Wykorzystując opracowaną w niniejszej pracy metodologię można byłoby wykazać istnienie tego transportu w sposób bezpośredni. Innym przykładem ważnego z praktycznego punktu widzenia wyniku osiągniętego w tej pracy jest identyfikacja naturalnych flawonoidów, które w ogóle nie są substratami dla transportu przez ABCG2, np. ikarytyna i izotymonina. Podobne doświadczenia z łatwością można będzie również przeprowadzić dla innych ważnych z farmakokinetycznego punktu widzenia transporterów flawonoidów, dając racjonalne podstawy teoretycznej predykcji bioaktywności konkretnych związków w ludzkim organizmie.

Jak zaprezentowano w niniejszej pracy, w pełni ilościowe pomiary fluorescencji pochodnej flawonoid+DPBA można prowadzić wykorzystując różnorodną aparaturę. Nadaje się do tego zarówno spektrofluorymetr (pomiary w lizatach komórkowych), czytnik płytek wielodołkowych

(pomiar w małej objętości cieczy lub w monowarstwie komórek), jak i obrazowanie mikroskopowe (mikroskopia fluorescencyjna lub konfokalna). Choć w niniejszej pracy tego nie sprawdzono, z uwagi na właściwości produktów derywatywacji oczywiste jest, że z powodzeniem można by do analizy transportu flawonoidów tą metodą zastosować pomiary przy użyciu cytometrii przepływowej. Taka uniwersalność praktyczna metody jest bardzo istotna z punktu widzenia szerokiego jej wdrożenia przez grupy badawcze dysponujące aparaturą o różnym stopniu zaawansowania. Metoda fluorescencyjnej derywatywacji flawonoidów za pomocą DPBA pozwala na znaczne poszerzenie arsenału technik eksperymentalnych dostępnych badaczom białka ABCG2. Jak zademonstrowano w niniejszej pracy, umożliwia ona nie tylko dokładniejsze zbadanie specyficzności substratowej białka czy poszukiwanie nowych inhibitorów, ale może też być z powodzeniem zastosowana do badania parametrów kinetycznych enzymu. Wymienione zalety opracowanej metody sprawiają, że jest ona coraz częściej stosowana w zespołach badaczy transporterów ABC (Özvegy-Laczka i in., 2023). Ze względu na duży potencjał aplikacyjny tej metody nie tylko dla naukowców, ale również dla firm farmaceutycznych testujących oddziaływanie pożywienie-lek (rekomendacje Międzynarodowego Konsorcjum Transporterowego obejmują obowiązkowe badanie zachodzących na transporterach oddziaływań pożywienie-lek dla potencjalnych leków (Zamek-Gliszczyński i in., 2018)), własność intelektualną dotyczącą nowo opracowanej metody poddano międzynarodowej ochronie patentowej (Studzian i Pułaski, 2018).

Ważnym elementem niniejszej pracy jest wieloaspektowe praktyczne wykorzystanie techniki FLIM do badania własności białka ABCG2. Technika FLIM zyskuje coraz większą popularność w biologii, ponieważ umożliwia pomiary nawet niewielkich zmian konformacyjnych badanej cząsteczki lub zmian zachodzących w jej mikrośrodowisku (Loidolt-Krueger, 2023). Pomiary FLIM cząsteczek wykazujących naturalną fluorescencję doprowadziły na przykład do wielu cennych odkryć dotyczących procesów metabolizmu komórkowego (Schaefer i in., 2019; Stringari i in., 2015). Znanych jest także wiele egzogennych fluorescencyjnych sond, w oparciu o zmiany czasu życia fluorescencji których można monitorować niewielkie zmiany temperatury, lepkości, pH, czy też stężenia określonych jonów w układach biologicznych (Ogikubo i in., 2011; Okabe i in., 2012; Suhling i in., 2019). Jednym z podstawowych zastosowań, jakie umożliwia FLIM, jest czasowo-rozdzielcza dekonwolucja sygnałów pochodzących od kilku fluoroforów o znacząco różnym czasie życia fluorescencji, obecnych w tym samym materiale biologicznym (Mannam i in., 2022). Taka dekonwolucja umożliwia na przykład wyeliminowanie z rejestrowanych obrazów sygnału niepożądanych fluoroforów (fluorescencja tła), co w przypadku skomplikowanych układów biologicznych może mieć duże znaczenie (Cubeddu i in., 2002). Często pomiary FLIM stosuje się również, aby lepiej zrozumieć fotochemię danego fluoroforu (Studzian i in., 2019).



Wysoka czułość pomiarów sprawia również, że FLIM jest jedną z podstawowych metod wykorzystywanych do badania zjawiska FRET. Pomiary wydajności FRET od wielu lat stanowią potężne narzędzie do badań w biologii strukturalnej i biologii komórki (Algar i in., 2019). Można w ten sposób oceniać oddziaływania makrocząsteczka-makrocząsteczka (Park i in., 2015), ligand-receptor (Stockmann i in., 2017), czy też oddziaływania między związkami drobnocząsteczkowymi (Yuan i in., 2013). Jedną z głównych zalet FRET-FLIM jest fakt, że na wynik dokonywanych pomiarów nie wpływa stężenie badanej substancji w układzie (ponieważ czas życia fluorescencji jest wielkością intensywną), co ma kluczowe znaczenie przy opisywaniu oddziaływań FRET w układach żywych, gdzie eksperymentator ma ograniczoną kontrolę nad stężeniem każdej z oddziałujących cząsteczek. Zjawisko FRET, którego wydajność silnie zależy od odległości między oddziałującymi partnerami donor/akceptor, często jest badane za pomocą starszych metod klasycznych. W metodzie uwrażliwionej emisji (SE, ang. sensitized emission) ocenia się zmiany w intensywności akceptora przy wzbudzeniu światłem o długości fali odpowiadające ekscytacji donora, a w metodzie fotowycielenia akceptora (AP, ang. acceptor photobleaching) ocenia się wzrost intensywności fluorescencji donora po zniszczeniu fluoroforu akceptora. Jednak te techniki klasyczne mają wyraźne wady w porównaniu z FRET-FLIM: wymagają użycia skomplikowanych kontroli stężeniowych, fotowycielanie nieodwracalnie ingeruje w fotochemię (a przez to potencjalnie w oddziaływania) akceptora, a kwantyfikacja jest możliwa tylko w zakresie stężeń, w którym zależność fluorescencji od stężenia jest liniowa, co uniemożliwia zastosowanie tych metod dla ciemniejszych fluoroforów. Ze względu na tę obiektywną przewagę nad technikami klasycznymi narzędzia wykorzystujące FLIM do badania FRET są nieodzownym elementem współczesnych badań z zakresu biologii molekularnej w odniesieniu zarówno do endogennych, jak i egzogennych fluoroforów.

Technika FLIM pozwala wyciągać wnioski dotyczące czasu życia fluoroforu i jego związku z jego strukturą, których nie da się osiągnąć klasycznymi technikami pomiarów intensywności fluorescencji. Dzięki zastosowaniu tej techniki pomiaru udało się lepiej zrozumieć fotochemiczne właściwości fluoroforu flawonoid+DPBA. Jak pokazano na rycinie 16, w wyniku reakcji z DPBA powstaje fluorescencyjna pochodna difenyloborinianowa flawonoidu. Struktura chemiczna tej cząsteczki jest bardzo zbliżona do struktury rodziny dobrze znanych barwników fluorescencyjnych BODIPY, w których również elementem strukturalnym warunkującym absorpcję i emisję fotonów jest delokalizacja ładunku między ujemnie naładowanym atomem boru a dodatnio naładowanym atomem azotu (Rybczynski i in., 2021). Co ciekawe, czas życia fluorescencji niepodstawionego BODIPY jest bardzo długi i wynosi około 7 ns, ale jego strukturalne pochodne z podstawnikami dobranymi w celu zmiany parametrów spektralnych

wzbudzenia i emisji mają przy okazji krótsze czasy życia fluorescencji (Schmitt i in., 2009). Na przykład związek BODIPY 630/650 ma już czas życia równy około 4 ns.

Bardzo zbliżony czas życia fluorescencji wykazują również pochodne flawonoid+DPBA, dla których dane uzyskano w toku niniejszej pracy. Zarówno ikarytyna+DPBA, jak i kempferol+DPBA, dwie pochodne o niemal identycznych właściwościach spektralnych i zielono-żółtej emisji fluorescencji, mają czas życia równy około 4,5 ns, czyli pośredni między bardzo długim czasem niepodstawionego BODIPY (który wykazuje emisję przesuniętą w kierunku niebieskich długości fali), a krótszym czasem życia fluorescencji BODIPY 630/650, który charakteryzuje się emisją przesuniętą w kierunku czerwonych długości fali. Sugeruje to, że fotochemiczne właściwości różnych pochodnych flawonoid+DPBA są analogiczne do tych obserwowanych w przypadku barwników BODIPY. Częściowo tłumaczy to również, dlaczego relatywnie niewielkie modyfikacje struktury cząsteczek flawonoidów są w stanie dramatycznie zmienić właściwości spektralne ich pochodnych flawonoid+DPBA. Podobnie jak w przypadku BODIPY zachowana jest taka sama bazalna struktura fluoroforu, ale konfiguracja otaczających grup funkcyjnych jest w stanie znacząco wpłynąć na fluorescencję danej pochodnej. Ciekawe byłoby dalsze zbadanie zaobserwowanych powyżej zależności. Interesujące byłoby wykonanie pomiaru czasu życia fluorescencji pochodnych flawonoid+DPBA, które znacząco różnią się właściwościami spektralnymi od pochodnych kempferol+DPBA i ikarytyna+DPBA. Całkiem prawdopodobnie, możliwe byłoby zaobserwowanie korelacji między długością fali maksimum emisji fluorescencji a czasem życia fluorescencji danej pochodnej. Struktura elektronowa cząsteczki fluoroforu białka fluoryzującego jest zwykle znacząco różna od struktury fluoroforu drobnocząsteczkowego. Dlatego czas życia fluorescencji białka fluoryzującego jest zwykle również różny, a dodatkowo wiadomo, że w obrębie tej samej klasy białek fluoryzujących czas życia fluorescencji zależy od właściwości spektralnych białka (Canty i in., 2018).

Podobnie jak można to zaobserwować w przypadku pochodnych BODIPY, czas życia fluorescencji białek fluoryzujących jest zwykle tym krótszy, im bardziej czerwoną fluorescencją emituje dane białko. Nie jest to jednak regułą bez wyjątków, ponieważ jak udowadniają wyniki uzyskane w niniejszej pracy, białko mKate2, którego maksimum emisji znajduje się przy długościach fali wyższych niż maksimum emisji białka TagRFP (patrz rycina 26), charakteryzuje się dłuższym czasem życia fluorescencji. Ponieważ czas życia fluorescencji TagGFP2 jest znacząco różny od czasu życia fluorescencji zbadanych pochodnych flawonoid+DPBA (kempferolu i ikarytyny), możliwa jest wiarygodna dekonwolucja sygnałów fluorescencyjnych pochodzących od tych dwóch typów fluoroforów, co zademonstrowano w niniejszej pracy na przykładzie porównania aktywności transportowej białka ABCG2 względem kempferolu i ikarytyny. Niemal pewne jest też, że w przypadku zastosowania dwóch

substratów ABCG2 różniących się od siebie fotochemicznie i przy wykorzystaniu odpowiedniego algorytmu dekonwolucji (takiego na przykład jak zademonstrowano tutaj: (Mannam i in., 2022)) możliwe byłoby również czasowo-rozdzielcze rozróżnienie sygnału pochodzącego od każdego z nich.

Stosując pomiary FRET-FLIM, udało się również udowodnić eksperymentalnie oddziaływanie białko-białko zachodzące między cząsteczkami ABCG2. W tym celu początkowo wyznakowano cząsteczki ABCG2 za pomocą zielonego białka fluoryzującego TagGFP2, które pełniło w parze FRET rolę donora. Klasycznym akceptorem stosowanym w parze z tym białkiem fluoryzującym jest TagRFP (Shcherbo i in., 2009). Ponieważ na eksperymentalnie zmierzoną wartość wydajności FRET mogą wpływać także różne czynniki niezwiązane z zakresem nakładania się widm donora i akceptora (Lam i in., 2012), w parze z TagGFP2 przetestowano eksperymentalnie również inne czerwone białko fluoryzujące – mKate2.

Okazało się, że zgodnie z analizą teoretycznie wyliczonych wartości  $R_0$  białko TagRFP jest dużo wydajniejszym akceptorem FRET w parze z TagGFP2 niż białko mKate2. Biorąc pod uwagę teoretycznie przewidywane wartości  $R_0$  oraz eksperymentalnie wyznaczone wartości wydajności FRET w dwóch analogicznych białkach fuzyjnych (odpowiednio TagGFP2-TagRFP i TagGFP2-mKate2) obliczono odległości między fluoroforami w obu parach, uzyskując zbieżne wartości. Nie jest to zaskakujące, ponieważ pomimo tego, że białko TagGFP2 pochodzi z organizmu (*Aequorea macrodactyla*) o innej przynależności systematycznej niż *Entacmaea quadricolor*, z którego uzyskano białka TagRFP i mKate2, ich struktury przestrzenne są do siebie bardzo zbliżone (Somermeyer i in., 2022; Subach i in., 2010). Odległość między fluoroforem zlokalizowanym w centralnej części struktury białka a aminokwasem znajdującym się w łączniku białka fuzyjnego wynosi około 2,4 nm w przypadku białka TagGFP2 oraz 2,2 nm w przypadku białek TagRFP i mKate2. Wyznaczona eksperymentalnie odległość między fluoroforami (ok. 5,8 nm) bardzo dobrze zgadza się z sumą powyższych wartości, biorąc dodatkowo pod uwagę długość linkera łączącego oba białka, która powinna wynosić ok. 1 nm. Białka ABCG2 wyznakowane w tej samej komórce za pomocą TagGFP2 i za pomocą TagRFP oddziaływały ze sobą w odległości, która umożliwiła zachodzenie FRET między fluoroforami przyłączonymi do różnych cząsteczek transportera. Pomiary FLIM-FRET wykazały, że czas życia fluorescencji TagGFP2 był znacząco niższy, niż wyjściowy czas życia fluorescencji TagGFP2, jeżeli w komórkach znajdowały się różnie wyznakowane białka ABCG2.

Procesy dimeryzacji/oligomeryzacji ABCG2 badały już wcześniej inne grupy badawcze, nie była w tych pomiarach jednak wykorzystywana technika FLIM. W historycznie pierwszej pracy, w której badano wydajność FRET między cząsteczkami ABCG2, wykorzystano klasyczną parę

białek fluoryzujących CFP/YFP, a do oszacowania wydajności FRET zastosowano metodę AP (Ni i in., 2010).. W pracy tej dla białka o sekwencji referencyjnej podano średnią wydajność zjawiska FRET około 20%, czyli wyższą niż obserwowana w niniejszej pracy. Obserwacje opisane w cytowanym artykule prowadzono na komórkach przejściowo transfekowanych mieszaniną plazmidów niosących sekwencje donora lub akceptora w fuzji z ABCG2. Wyższa wartość obserwowanej wydajności FRET może zatem wynikać z niefizjologicznie wysokiej ekspresji białka ABCG2 w komórkach HEK 293 w przypadku cytowanego artykułu. Może też wynikać z zastosowania metody AP, która często prowadzi do rozbieżnych wyników FRET dla tej samej pary donor-akceptor między różnymi laboratoriami ze względu na różnice aparaturowe (Zal i Gascoigne, 2004). Badając proces FRET między oddziałującymi cząsteczkami ABCG2 znalogicznie wyznakowanymi za pomocą CFP i YFP, inna grupa badawcza wykazała niedawno, że diterpenoid pochodzenia roślinnego kryptotanszynon zaburza proces oligomeryzacji ABCG2, co uniemożliwia aktywność transportową białka, ale jedynie w komórkach o bardzo wysokiej ekspresji ABCG2 lub w komórkach zawierających receptor estrogenowy  $\alpha$  (Ni i in., 2021). Do badania procesu oligomeryzacji cząsteczek ABCG2 jeszcze inna grupa badawcza zastosowała zjawisko dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji (BiFC, ang. bimolecular fluorescence complementation). W metodzie tej białko fluoryzujące (najczęściej pochodna YFP) jest dzielone na dwa fragmenty, które osobno nie wykazują fluorescencji, ale gdy dołączone są do odpowiednio blisko oddziałujących ze sobą partnerów (w tym wypadku dwóch dimeryzujących cząsteczek ABCG2), ulegają rekonstrukcji w pełne, funkcjonalne białko fluoryzujące. Autorom udało się zademonstrować sygnał fluorescencyjny od połączonego białka YFP, ale na podstawie tych obserwacji fenomenologicznych można wyciągnąć jedynie jakościowe, a nie ilościowe wnioski.

W ramach niniejszej pracy stosując technikę FRET-FLIM udało się nie tylko ponownie potwierdzić eksperymentalnie, że białko ABCG2 bierze udział w specyficznych oddziaływaniach białko-białko, ale udało się wykazać, że średnia odległość między oddziałującymi cząsteczkami transportera zmienia się w obecności substratu transportowego. Podobnych eksperymentów nie wykonywano dotychczas na białku ABCG2. W odniesieniu do innych transporterów ABC np. w przypadku białka ABCC1 udowodniono, że wyznakowanie transportera białkami fluoryzującymi (para GFP/RFP) prowadzi do otrzymania biosensora FRET, który wykazuje różną wydajność transferu energii w zależności od zmian konformacyjnych indukowanych związaniem substratów lub inhibitorów (Osa-Andrews i in., 2018). Autorzy mogli na tej podstawie oszacować siłę oddziaływania z transporterem wybranych substratów i inhibitorów. Wyniki uzyskiwane dla opisanego powyżej biosensora były analizowane jedynie na podstawie względnych intensywności fluorescencji (obniżenie intensywności fluorescencji donora), wobec czego obarczone były na pewno błędem

wynikającym z nierównej ilości donora fluoryzującego w różnych komórkach. Tego błędu można byłoby uniknąć, stosując metodę pomiaru FRET-FLIM zastosowaną tutaj. Dokładne pomiary wykonane tą techniką pozwoliły nawet na zaobserwowanie niewielkiego obniżenia czasu życia fluorescencji donora w komórkach, które zawierały razem białko TagGFP2-ABCG2 i białko PM-TagRFP. Ten marginalny FRET zachodzący między białkami można zapewne wytłumaczyć przypadkowymi oddziaływaniami pomiędzy donorem i akceptorem obecnymi w tych samych fragmentach błony plazmatycznej komórek o ograniczonej powierzchni (tratwy lipidowe), w ten sposób niezależnie potwierdzając tezę o występowaniu ABCG2 w tej lokalizacji subkomórkowej (Szilagyí i in., 2019). Może to ewentualnie być częściowo wyjaśnione ogólnym „zatłoczeniem” w błonie plazmatycznej komórek zawierających dwa nadeksprymowane białka fuzyjne. Podobny efekt jest obserwowany w przypadku innych białek (Boersma i in., 2015). Dodatkowe obniżenie czasu życia fluorescencji donora w oligomerze białka TagGFP2-ABCG2/TagRFP-ABCG2 zaobserwowano w wyniku dodania do komórek kwercetyny, która jest dobrym substratem tego transportera. Zakładając, że zmierzone różnice wynikają ze zmian konformacyjnych w strukturze białka pod wpływem aktywności katalitycznej, ustalono, że różnica między odległością w konformacji spoczynkowej (w nieobecności substratu) a odległością w konformacji aktywnej (w obecności substratu) wynosi średnio 0,6 nm. Odległość ta bardzo dobrze zgadza się z różnicą w odległościach między skrajnymi fragmentami dwóch domen TMD w dimerze białka ABCG2 odpowiednio w konformacji otwartej do wnętrza (Orlando i Liao, 2020) i konformacji otwartej na zewnątrz (Manolaridis i in., 2018). Sugeruje to, że faktycznie stymulacja aktywności transportowej białka ABCG2 spowodowana obecnością kwercetyny przestawia większość oligomerów transportera z pozycji spoczynkowej do pozycji aktywnej.

W niniejszej pracy zjawisko FRET-FLIM zostało również użyte do pomiarów oddziaływań substrat-enzym. Tego typu pomiarów nie stosowano do tej pory do badania oddziaływań fluorescencyjnych substratów z białkami ABC. Koncepcja wykorzystania pomiarów FRET była natomiast stosowana do innych rodzajów enzymów (Nguyen i in., 2014). Drobnocząsteczkowy ligand jest wtedy zwykle dodatkowo znakowany fluorescencyjnie odpowiednim fluoroforem, który stanowi akceptor w parze FRET z enzymem, który jest wyznakowany odpowiednim donorem. W niniejszej pracy wykorzystano naturalną fluorescencję mitoksantronu, który może być akceptorem FRET w parze z białkiem TagGFP2, a dodatkowo jest modelowym substratem ABCG2. Białko ABCC2 zostało użyte dla porównania, jako potencjalnie wykazujące odmienne parametry wiązania i transportu tego substratu. Co ciekawe, pomiary FLIM udowodniły, że mitoksantron wiązał się do obu białek w podobnej odległości od białkowego znacznika fluorescencyjnego, co doprowadziło do wniosku, że w przypadku obu transporterów mitoksantron oddziałuje z kieszenią wiążącą substrat, która znajduje się w podobnej odległości

od dołączonego donora (TagGFP2). Wiadomo, że dla większości ludzkich białek ABC odległość między miejscem wiązania substratu a domeną NBD, do której w naszym przypadku przyłączony jest TagGFP2, jest podobna (Szöllösi i in., 2018). Białka ABC znane są z bardzo szerokiej specyficzności substratowej, dlatego nie dziwi, że mitoksantron, który jest modelowym substratem ABCG2, wiąże się również do białka ABCC2. W literaturze nie ma dobrze opisanych bezpośrednich dowodów na to, że ABCC2 jest transporterem mitoksantronu. Wiadomo jednak, że komórki, w których nadekspresji ulega ten transporter, są bardziej odporne na ten lek, choć informacja ta pojawia się w tekście artykułu przeglądowego jedynie jako „wyniki niepublikowane” (Borst i in., 2000).

Ponieważ białko ABCC2 jest od początku historii badań nad nim jednoznacznie kojarzone z opornością na typowe antracykliny (doksorubicyna i daunorubicyna), autorom wydawało się zapewne, że wyniki dla kolejnej antracykliny w pełnym kształcie są nieciekawe lub mało znaczące i nie zasługują na opublikowanie. Takie zachowanie uniemożliwia jednak ocenę wiarygodności oryginalnych wyników tych doświadczeń przez innych badaczy. Można niestety domniemywać, że w wielu podobnych sytuacjach wyniki uznawane przez środowisko naukowe za „nieciekawe” ulegają zagubieniu w danych niepublikowanych lub w doniesieniach konferencyjnych, utrudniając rzetelną dyskusję własnych wyników kolejnym badaczom. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły, że białko ABCC2 zgodnie z oczekiwaniem jest również transporterem mitoksantronu. Jak wynika z analizy uzyskanych wyników, powinowactwo mitoksantronu do ABCG2 jest niższe niż do ABCC2. Prawdopodobnie ABCC2 ma przy tym zdecydowanie niższą szybkość graniczną transportu (na co może wskazywać wykazany w niniejszej pracy fakt, że większość cząsteczek ABCC2 wydaje się być niezdolnych do wiązania mitoksantronu), a zatem z punktu widzenia przepływu cząsteczek jest relatywnie mniej znaczącym farmakokinetycznie transporterem tego leku. Potwierdza to przeważające w literaturze wątpliwości co do faktycznego znaczenia ekspresji ABCC2 w klinicznym zjawisku oporności wielolekowej nowotworów *in vivo* (Xiao i in., 2021).

Analogiczne pomiary FRET-FLIM wykonane dla różnych wariantów białka ABCG2 częściowo potwierdziły, a częściowo uzupełniły wiedzę na temat kluczowego wpływu argininy w pozycji 482 tego białka na jego specyficzność substratową (Özvegy-Laczka i in., 2005). Doświadczenia wykonywane uprzednio na opisywanych wariantach białka ABCG2 pokazywały jedynie, że w porównaniu z wariantem białka o sekwencji referencyjnej (wtABCG2) białko niosące mutację R482G wydajniej transportuje antracykliny, w tym również mitoksantron. Pomiary FRET-FLIM wykonane w niniejszej pracy sugerują, że przyspieszenie transportu wynika ze skrócenia czasu, przez jaki mitoksantron oddziałuje z miejscem wiązania substratu. W przeciwieństwie do tego białko, które ma mutację R482K i które nie jest w stanie transportować mitoksantronu, nadal jest w stanie wydajnie wiązać ten lek w miejscu aktywnym,

a mierzone oddziaływania wydają się silniejsze, ponieważ mitoksantron, nie ulegając transportowi, spędza więcej czasu w stanie związanym. Wyniki te są zbieżne z rolą argininy w pozycji 482 w procesie transportu, którą opisują inni badacze na podstawie struktur uzyskanych metodą cryo-EM (Yu i in., 2021).

Białka oporności wielolekowej są bardzo istotne zarówno dla fizjologicznej homeostazy komórek i całego organizmu, jak i w patofizjologii klinicznej (zwłaszcza w przypadku chemoterapii nowotworów). Można domniemać, że zarówno biogeneza, jak i lokalizacja wewnątrzkomórkowa transporterów oporności wielolekowej (w tym ABCG2) są ściśle regulowane ze względu na kluczowe funkcje detoksyfikacyjne, jakie te białka pełnią. Niestety w przypadku białka ABCG2 mechanizmy regulujące lokalizację subkomórkową nie zostały na razie szczegółowo zbadane. Podążając tropem opisanego, lecz niedostatecznie wyjaśnionego mechanistycznie zjawiska obniżania ekspresji białka ABCG2 przez niektóre substancje (nazwane przez odkrywców inhibitorami dynamicznymi) (Peng i in., 2010), w niniejszej pracy udało się odkryć i scharakteryzować nowe interesujące zjawisko: stymulowaną wiązaniem przeciwciała endocytozę ludzkiego białka oporności wielolekowej ABCG2, którą scharakteryzowano następnie poprzez staranne zastosowanie innowacyjnych ilościowych technik obrazowania, opartych o mikroskopię konfokalną. Uzyskane wyniki zostały częściowo opisane i przedyskutowane w publikacji z naszej grupy badawczej (Studzian i in., 2015), jednak od czasu ich publikacji pojawiło się znacznie więcej informacji o strukturze białka ABCG2, warto zatem zwrócić tutaj również uwagę na kilka dodatkowych problemów. Dokładne badanie tego zjawiska jest szczególnie interesujące w dwóch aspektach: fizjologicznej funkcji tego potencjalnego naturalnego mechanizmu regulacji aktywności białek z rodziny ABC poprzez modulację ich ekspresji we właściwym miejscu aktywności – błonie plazmatycznej, a także potencjalnego zastosowania praktycznego tego procesu do celowanego dostarczania leków do wnętrza komórek, w których białka oporności wielolekowej podlegają nadekspresji w błonie komórkowej, np. komórek nowotworowych.

Wewnątrzkomórkowy transport (ang. cellular trafficking) białek błonowych można rozdzielić na dwa oddzielne etapy, które czasem wykorzystują jednak powiązane ze sobą mechanizmy: transport białka po translacji do ER i dalej do błony plazmatycznej (czyli biogeneza), w komórkach spolaryzowanych często powiązane z sortowaniem cząsteczek białka do apikalnych lub bazo-lateralnych domen błon plazmatycznych, oraz transport dojrzałego, funkcjonalnego białka w przeciwnym kierunku, z błon plazmatycznych do struktur wewnątrzkomórkowych, z różnorodnym dalszym losem jego cząsteczek (czyli recykling /degradacja białka). W przypadku białka ABCG2 już sam proces translacji, fałdowania oraz nabywania odpowiednich modyfikacji potranslacyjnych (glikozylacja, utworzenie mostków disiarczkowych) jest bardzo złożony i podatny na zaburzenia. Znanych jest wiele

polimorfizmów, które uniemożliwiają właściwą ekspresję białka już na tym etapie (Zámbó i in., 2020). Źle sfałdowane lub nieodpowiednio zmodyfikowane białko jest kierowane do degradacji proteasomalnej (Sugiyama i in., 2011). Jednym z najlepiej przebadanych pod tym kątem wariantów jest białko ABCG2 z mutacją Q141K, która stanowi jeden z najczęściej występujących w populacji polimorfizmów genetycznych zmieniających sekwencję aminokwasową (Imai i in., 2002). W przypadku tego wariantu białka wykazano między innymi, że gdy maksymalna wydajność proteasomu zostanie osiągnięta, źle sfałdowane białko ulega agregacji w specjalnej strukturze zwanej agresomem (ang. aggresome) otoczonej klatką z wimentyny. Następnie źle sfałdowane białko jest degradowane na drodze autofagii (Basseville i in., 2012). Białko o prawidłowej strukturze trzeciorzędowej jest następnie transportowane na drodze ER – aparat Golgiego – pęcherzyki sieci trans-Golgi (TGN, ang. trans-Golgi network) – błona plazmatyczna. W przypadku białka ABCG2 mechanizmy biorące udział w tym procesie nie były szczegółowo badane. Na przykładzie innych białek ABC (ABCA1, ABCC7) wiadomo jednak, że białka podróżują między ER a aparatem Golgiego w specjalnych pęcherzykach zawierających kompleks COPII (Tanaka i in., 2008; Wang i in., 2004). Następnie w trakcie transportu w obrębie aparatu Golgiego białko ABCG2 ulega końcowej glikozylacji. Na każdym z etapów istnieją mechanizmy regulujące, które w przypadku wykrycia niewłaściwej struktury białka kierują je z powrotem do ER, a stamtąd do degradacji w proteasomie (Basseville i in., 2012).

Równie ważne jak procesy transportu z ER do błony plazmatycznej są procesy transportu dojrzałego białka w przeciwnym kierunku. Doświadczenia, w których blokowano syntezę nowych białek za pomocą cykloheksimidu, wykazały, że ilość białka ABCG2 w komórkach spada do połowy po około 54 godzinach od syntezy (Mo i Zhang, 2011). Nie wiadomo jednak, w jaki sposób i pod wpływem jakich czynników regulatorowych białko ulega endocytozie i degradacji. Dla innych transporterów ABC również nie ma dobrze udokumentowanych badań wyjaśniających te procesy. Wiadomo jednak, że poziom ekspresji błonowej transporterów jest ściśle i w różny sposób regulowany w zależności od stopnia polaryzacji komórek oraz ról, jakie komórki pełnią w konkretnych tkankach i narządach. Ogólnie znana reguła dla białek błonowych głosi, że lokalizacja w błonach plazmatycznych komórek jest uzależniona od oddziaływań kotwiczących z białkami regulatorowymi, a ważną rolę odgrywają przy tym modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja czy ubikwitynacja (Ben Saad i in., 2021).

Dla wielu transporterów ABC udowodniono, że aktywność określonych kinaz jest kluczowa w procesie regulacji lokalizacji subkomórkowej. Jedną z takich kinaz jest kinaza Pim-1. W przypadku białka ABCB1 obniżenie poziomu tej kinazy powoduje, że transporter ma niższą ekspresję w błonach plazmatycznych i szybciej jest kierowany do degradacji (Xie i in., 2010). Podobny efekt zaobserwowano dla białka ABCG2 (Natarajan i in., 2013). Sugeruje to, że



fosforylacja przez Pim-1 jest czynnikiem stabilizującym transportery w błonie plazmatycznej. Inną kinazą, która również może być zaangażowana w regulację lokalizacji białka ABCG2 poprzez utrzymywanie go w błonach plazmatycznych, jest Akt (Aust i in., 2004; Bleau i in., 2009; Takada i in., 2005). W przypadku białka ABCB4 zidentyfikowano oddziałujące z nim białko regulatorowe RACK1, które jest aktywatorem kinazy PKC. Kinaza ta może fosforylować różne białka błonowe i stabilizować ich lokalizację w błonach plazmatycznych (Adams i in., 2011). Zademonstrowano również, że usunięcie z komórek białka RACK1 zmienia lokalizację subkomórkową białka ABCB4 na wewnątrzkomórkową (Ikebuchi i in., 2009). Znanymi regulatorami lokalizacji subkomórkowej białek ABC są także białka regulatorowe zawierające motyw PDZ. Wykazano na przykład, że zawierające ten motyw białko EBP50 jest odpowiedzialne za utrzymywanie w błonach plazmatycznych białek ABCC2 i ABCB4 (Li i in., 2010; Venot i in., 2016). Innym białkiem z tym motywem, które także zwiększa stabilność ABCC2 w błonach plazmatycznych, jest białko PDZK1 (Emi i in., 2011). Ważnymi białkami regulującymi wewnątrzkomórkowy transport białek ABC między błoną plazmatyczną a wewnątrzkomórkowymi kompartmentami endosomalnymi są małe GTPazy. Regulują one z pewnością procesy endocytozy oraz recyrkulacji transporterów ABC w obrębie różnych struktur błonowych (Kroll i in., 2021). Białko ABCB11 jest na przykład utrzymywane w komórkach w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach endosomalnych, których skład i lokalizacja jest determinowana obecnością białka Rab11 (Lapierre i in., 2001). Białka obecne w pęcherzykach dzięki oddziaływaniom białka Rab11 z jego ligandami oraz transportowi pęcherzyków zależnemu od miozyny VB są utrzymywane w stałym obiegu między kompartmentami wewnątrzkomórkowymi a błoną plazmatyczną (Wakabayashi i in., 2004). W przypadku białka ABCG2 wykazano, że jest ono transportowane w endosomach zawierające białko Rab5a oraz białko Rab22 (Yousaf i Ali, 2020). Obserwacje te są zbieżne z poczynionymi w niniejszej rozprawie, gdzie zademonstrowano, że w trakcie wymuszonej przez związanie przeciwciała 5D3 endocytozy białko ABCG2 podróżuje w głąb komórek w pęcherzykach zawierających białko Rab5. Mimo tych izolowanych danych, dostępnych w literaturze, dotychczas dla białka ABCG2 nie było możliwe opisanie spójnego, jednolitego systemu regulacji lokalizacji subkomórkowej. Możliwe zatem, że mamy do czynienia z szeregiem niezwiązanych ze sobą efektów. Na przykład drobnocząsteczkowe inhibitory dynamiczne z rodziny PZ wiążą się do białka ABCG2 i stymulują szybki proces endocytozy, którego efektem jest niemal całkowita lizosomalna degradacja białka (Peng i in., 2009, 2010). Autorzy tych doniesień nie wykluczają, że te związki mogą także wpływać bezpośrednio na dojrzewające w ER ABCG2 i kierować je od razu do degradacji. W niniejszej pracy wykazano, że stymulowany związaniem przeciwciała 5D3 proces endocytozy rozpoczyna się bezpośrednio w błonie plazmatycznej (ponieważ przeciwciało w żywych komórkach wiąże się jedynie od zewnątrz błony plazmatycznej), a ponadto tylko częściowo prowadzi do degradacji lizosomalnej.

Pozostała część zakumulowanego wewnątrzkomórkowo transportera może ostatecznie ulegać recyrkulacji do błony plazmatycznej. Można stąd wnioskować, że proces obserwowany po związaniu przeciwciała 5D3 przebiega wielotorowo, podczas gdy po traktowaniu związkami PZ ABCG2 jest kierowane jedynie do lizosomów, prawdopodobnie na drodze konkretnego typu procesu internalizacji. Te przypuszczenia mogą potwierdzać inne wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Szczegółowa ilościowa analiza inhibicji farmakologicznej różnych komórkowych efektorów endocytozy ujawniła, że obserwowany proces internalizacji przeciwciała 5D3-ABCG2 przebiega na kilku różnych drogach, choć wszystkie te procesy są zależne od dynaminy. Można wydzielić składowe endocytozy: zależną i niezależną od klatryny. Każdy z tych szlaków jest odpowiedzialny za mniej więcej podobną frakcję internalizowanego ABCG2. Endocytoza zależna od klatryny zwykle prowadzi do degradacji lizosomalnej (Zhang i in., 2016). W przypadku endocytozy białka ABCG2 stymulowanej związaniem 5D3 tylko około 30% białka jest degradowane, co sugeruje, że pewna frakcja białka transportowanego do wnętrza komórek na tej drodze unika degradacji w lizosomach i jest sortowana do innego typu pęcherzyków endosomalnych. W literaturze można również znaleźć informacje na temat innych czynników obniżających ekspresję ABCG2 w błonach plazmatycznych. Inkubacja komórek z kofeiną oraz kilkoma innymi ksantynami również skutkuje zintensyfikowaną degradacją lizosomalną białka (Ding i in., 2012). Jednak w przeciwieństwie do doświadczeń z inhibitorami PZ i do wyników uzyskanych w niniejszej pracy brak jest w tym przypadku dowodów na to, że ksantyny oddziałują z ABCG2 bezpośrednio. Nieznany jest również mechanizm, na drodze którego umiarkowany stres oksydacyjny odpowiada za obniżanie ekspresji ABCG2 w błonach plazmatycznych (Erdei i in., 2013). Co ciekawe, białko ABCG2 również w tym przypadku było częściowo kierowane do degradacji, a częściowo akumulowało się w kompartmentach wewnątrzkomórkowych, skąd mogło ulegać recyrkulacji do błon plazmatycznych. Pomimo tego, że autorzy uznali opisany efekt za niespecyficzny, ponieważ obserwowali go również dla innych białek błonowych, wydaje się on mieć analogiczny przebieg i skutki, jak opisana w tej pracy endocytoza białka ABCG2 po związaniu przeciwciała 5D3. Całkiem prawdopodobne jest więc, że oba te zjawiska mają podobny przebieg i są odpowiedzią na podobne zmiany strukturalne w białku ABCG2.

U podstaw większości problemów z badaniem zmian lokalizacji subkomórkowej białka ABCG2, ale także wszystkich innych białek ABC i ogólnie białek błonowych, leży niedoskonałość metod badawczych. Przebieg procesu endocytozy bada się najczęściej, stosując zestaw nie zawsze specyficznych inhibitorów farmakologicznych (Ivanov, 2008). Dużym wyzwaniem jest różnorodność istniejących dróg endocytozy, na które wpływ mają nie tylko wielkość i struktura internalizowanej cząsteczki, jej lokalizacja w obrębie mikro-domen błony plazmatycznej, czy zestaw oddziałujących białek efektorowych, ale również maszynyria

białkowa charakterystyczna dla danego typu komórek (Rennick i in., 2021). Wszystko to sprawia, że wiarygodne opisanie procesów endocytozy odpowiedzialnych za dane zjawisko jest niezwykle trudne. Dodatkowym problemem przy stosowaniu technik egzogennej modulacji przebiegu endocytozy, np. farmakologicznych inhibitorów jej konkretnych szlaków, jest subiektywny charakter metod oceny efektów tej modulacji. Nadal dominującym sposobem określania efektów inhibicji jest czysto jakościowa, subiektywna analiza obrazów mikroskopowych (Belda-Palazón i Rodriguez, 2022). Przy założeniu, że badane zjawisko ma jednoznaczny i dobrze określony przebieg, pozwala czasem oczywiście na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków. Endocytoza jest jednak zwykle złożeniem wielu procesów, które z jednej strony są odrębne i różnią się mechanizmem i zaangażowanymi składnikami komórki, ale z drugiej strony częściowo na siebie wpływają (Thottacherry i in., 2019). Aby przynajmniej częściowo zaradzić opisywanym problemom, w niniejszej pracy opracowano nową technikę wiarygodnego ilościowego badania przebiegu internalizacji białek błonowych. Ponieważ metoda ta opiera się na obrazowaniu mikroskopowym, umożliwia zarazem wyciągnięcie wniosków jakościowych (na analizowanych obrazach można subiektywnie ocenić wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie sygnału) i ilościowych, nadających się do obiektywnej analizy przez wnioskowanie statystyczne. Wygaszanie zewnątrzkomórkowej fluorescencji fluoroforów za pomocą błękitu trypanu było już wcześniej stosowane do ilościowej oceny endocytozy (Avelar-Freitas i in., 2014). Do tej pory jednak komórki analizowano w takim przypadku techniką cytometrii przepływowej, co z jednej strony uniemożliwia wyciągnięcie wniosków jakościowych, a z drugiej strony znacząco zwiększa ryzyko artefaktów metodycznych (np. wybiórczego przenikania błękitu trypanu do subpopulacji uszkodzonych komórek), ponieważ brak jest możliwości kontrolowania stanu błony komórkowej i wizualizacji rozmieszczenia sygnału fluorescencyjnego w obrębie komórki. Klasyczną metodą ilościowej oceny procesów internalizacji jest biotynylacja białek błonowych (Tham i Moukhles, 2017). Najczęściej po kowalencyjnym wyznakowaniu za pomocą biotyny cząsteczek białkowych eksponowanych na powierzchni komórek uruchamia się badany proces endocytozy, po czym utrwalone i permeabilizowane komórki sonduje się za pomocą odpowiednio znakowanej streptawidyny (Bitsikas i in., 2014). O ile ta metoda pozwala na wyciągnięcie wniosków jakościowych i ilościowych przy zastosowaniu odpowiednich technik obrazowania, to jest ona bardziej czasochłonna i pracochłonna niż metoda opracowana w ramach niniejszej pracy. Pozostawia też wątpliwości dotyczące specyficzności sygnału wykrywanego w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach, a długotrwały i zależny od struktury pierwszorzędowej charakter biotynylacji zewnątrzkomórkowych fragmentów białek uniemożliwia badanie przebiegu szybkich procesów internalizacji w czasie.

W wyniku przeprowadzonych w tej pracy badań udało się wyjaśnić, że pod wpływem wiązania przeciwciała skierowanego przeciwko zewnątrzkomórkowemu epitopowi ABCG2 następuje szybka internalizacja przeważającej części powstających kompleksów białko-przeciwciało. Należy pamiętać, że przeciwciało 5D3 jest specyficzne konformacyjnie, wiążąc się tylko do tych cząsteczek (dimerów) ABCG2, które w danym momencie przybierają odpowiednią (otwartą do wnętrza) formę strukturalną, zatem część cząsteczek ABCG2 obecnych w błonie plazmatycznej nie może ulegać temu procesowi. Endocytoza ABCG2 ma mechanizm mieszany, częściowo zależnym od klatryny, a częściowo od cholesterolu. Internalizowany kompleks trafia do systemu endosomalnego i stamtąd może częściowo ulegać sortowaniu do lizosomów i trawieniu (przy czym sortowaniu i trawieniu ulega cały kompleks przeciwciało-transporter, co sugeruje, że rozpoznawanie zablokowanej konformacji ABCG2 ma znaczenie nie tylko dla inicjalizacji procesu internalizacji, ale również dla decyzji o jego dalszym losie), a częściowo zatrzymaniu w kompartmentie endosomalnym i recyrkulacji z powrotem do błony plazmatycznej. Nie w pełni udało się wyjaśnić, co w przypadku wiązania przeciwciała 5D3 jest bodźcem molekularnym odpowiedzialnym za internalizację. Najbardziej prawdopodobny wydaje się mechanizm, w którym sygnałem do rozpoczęcia internalizacji ABCG2 nie są zmiany konformacyjne pojawiające się w odpowiedzi na związanie przeciwciała, lecz przesunięcie równowagi między różnymi typami konformacji naturalnie występującymi w cyklu aktywności (zbyt długie utrzymywanie białka w jednej konformacji, która normalnie nie jest stabilna). Na podstawie szeregu badań wiadomo, że przeciwciało 5D3 wiąże się tylko do białka ABCG2 o właściwej strukturze czwartorzędowej (funkcjonalny dimer dwóch cząsteczek białka) i tylko w ściśle określonej fazie cyklu transportu (konformacja otwarta do wnętrza), przez co przeciwciało to jest klasycznym inhibitorem akompetycyjnym – zwiększa powinowactwo substratów do enzymu, a jednocześnie zmniejsza szybkość graniczną (Özvegy-Laczka i in., 2008; Özvegy-Laczka i in., 2005). Dzieje się tak, ponieważ po pierwsze opsonizacja uniemożliwia dalsze zmiany konformacyjne niezbędne w procesie transportu, a po drugie zablokowana konformacja umożliwia maksymalny, najmniej ograniczony dostęp substratu do miejsca inicjalnego wiązania się z transporterem (kieszoni pierwszej, patrz podrozdział 1.3.3.). Te dwie właściwości sprawiły, że przeciwciało 5D3 jest stosowane do testowania oddziaływania substratów i inhibitorów z ABCG2 (Telbisz i in., 2012). Każdy związek o powinowactwie do kieszeni pierwszej enzymu po związaniu sprawia, że stabilizuje się na pewien czas (do momentu zajścia procesu transportu) konformacja otwartą do wnętrza, co w konsekwencji ułatwia wiązanie przeciwciała 5D3 (zwiększa frakcję cząsteczek dostępnych dla tego wiązania). Na podstawie porównania wiązania się przeciwciała 5D3 do białka ABCG2 w obecności i nieobecności testowanych związków można ocenić, czy (i jak stabilnie) dana substancja oddziałuje z miejscem aktywnym ABCG2. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że aby wiarygodnie stosować przeciwciało 5D3 do ilościowej oceny ekspresji białka

ABCG2 (do czego nadal jest stosowane najpowszechniej), należy badać komórki uprzednio utrwalone lub wiązanie prowadzić w 4°C, szczególnie jeśli intensywność sygnału fluorescencyjnego ocenia się techniką cytometrii przepływowej, gdzie niemożliwe jest odróżnienie sygnału pochodzącego z błony plazmatycznej od sygnału wewnątrzkomórkowego. Również w przypadku zastosowania 5D3 do testów funkcjonalnych, które muszą być prowadzone przyżyciowo w temperaturze optymalnej dla aktywności białka, konieczne jest wzięcie pod uwagę progresywnego procesu internalizacji i ograniczenie czasu ekspozycji na przeciwciało dla uniknięcia artefaktów związanych z różną dostępnością cząsteczek zinternalizowanych i obecnych na powierzchni komórki.

Transportery oporności wielolekowej były badane jako potencjalne tarcze dla leków od samego początku ich poznawania, głównie oczywiście z punktu widzenia hamowania ich niekorzystnej terapeutycznie własności polegającej na obniżaniu stężenia chemoterapeutyków w komórkach nowotworowych (Zheng i in., 2021). Jednak mimo trzech dekad intensywnych badań żaden inhibitor białka oporności wielolekowej nie wszedł do onkologicznej praktyki klinicznej – badania kliniczne nie wykazały znaczącej poprawy skuteczności klasycznej chemoterapii w ich obecności. Tym niemniej badania farmaceutyczne nad związkami oddziałującymi z transporterami oporności wielolekowej są nadal prowadzone: z jednej strony wiadomo coraz więcej o fizjologicznych funkcjach tych białek w normalnych tkankach, w tym ich kluczowej roli w farmakokinetyce (wchłanianiu, dystrybucji i eliminacji) większości ksenobiotyków, i modulacja tej roli wydaje się jeszcze istotniejsza z punktu widzenia farmakologicznego niż wąskie zastosowanie w terapii onkologicznej (Giacomini i Huang, 2022). Z drugiej strony nadekspresja białek oporności wielolekowej w nowotworach spotykana jest w niektórych przypadkach klinicznych i niektórzy uczeni nie tracą nadziei, że możliwe będzie zahamowanie oporności (przy założeniu, że jest ona rzeczywiście powodowana przez ekspresję transporterów) lub wykorzystanie transporterów jako markerów (wiadomo, że białko ABCG2 jest markerem nowotworowych komórek macierzystych, patrz podrozdział 1.5.2.3.) pozwalających na celowaną terapię cytotoksyczną, uszkadzającą silniej komórki nowotworowe niż sąsiadujące komórki normalnej tkanki (Yin i in., 2021).

Jedną z rozważanych potencjalnych strategii terapeutycznych jest immunoterapia – kierowanie leków cytotoksycznych za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko białkom (w tym przypadku białkom oporności wielolekowej) eksprymowanym w zwiększonej ilości na powierzchni komórek nowotworowych (Fan i in., 2023). Celowane dostarczanie leków przez koniugację z przeciwciałami to popularny i intensywnie badany wariant interwencji terapeutycznych. Podczas gdy pierwsze chronologicznie rozwiązania polegały głównie na dostarczaniu leku do powierzchni komórek i wykorzystaniu efektu koncentracji jego cząsteczek w ich sąsiedztwie, oczywiste było, że efektywniejsze byłoby ewentualne ułatwienie przenikania

koniugatów toksyna-przeciwciała do wnętrza komórki. Można tu wykorzystać spontaniczną, konstytutywną endocytozę wszystkich składników błony, tzw. endocytozę recyklingową, której zachodzenie umożliwia wciąganie do komórki w charakterze „pasażera na gapę” również dowolnego kompleksu hapten-przeciwciała-toksyna (Schrama i in., 2006). Jednak najskuteczniejsza terapia tego rodzaju wykorzystuje naturalne zjawiska stymulowanej endocytozy receptorowej, w których związanie ligandu (lub symulującego go przeciwciała) do cząsteczki białka receptorowego na powierzchni komórki powoduje zmianę konformacji i aktywne kierowanie takiej cząsteczki białka do kompartmentów wewnątrzkomórkowych (Hammood i in., 2021). Ponieważ związanie niektórych przeciwciał, skierowanych przeciwko epitopom konformacyjnym na powierzchni białka, może funkcjonalnie imitować związanie ligandu z receptorem poprzez stabilizację przejściowych konformacji lub wpływ na strukturę czwartorzędową, takie przeciwciała mogą zastępować ligand i ulegać specyficznej endocytozie (same lub w postaci fuzji z dowolnym ładunkiem) przez komórki wykazujące wysoką ekspresję receptora (Candelaria i in., 2021). Odkryte w niniejszej pracy zjawisko jest pierwszym przypadkiem analogicznego zachowania białka o aktywności transportera błonowego, dla którego nie są znane naturalne ligandy wielkocząsteczkowe, które wiązałyby się od zewnątrz komórki. Obecność tego mechanizmu można wykorzystać do planowego dostarczanie leków (w tym cytotoksycznych leków przeciwnowotworowych) do komórek wykazujących podwyższoną ekspresję ABCG2. Wykorzystując wyniki opisane w niniejszej pracy, w naszej grupie badawczej zrealizowano w ostatnich latach projekt badawczy obejmujący konstrukcję immunotoksyny skierowanej przeciwko ABCG2 i opartej na szkielecie przeciwciała 5D3. Zakończył się on sukcesem (udało się specyficznie eliminować z hodowli komórkowej komórki ekspresyjną ABCG2), a jego wyniki będą niedługo opublikowane (Grzela i in., w przygotowaniu).

Ponieważ w niepublikowanych badaniach naszego zespołu udało się również wykazać podobne zjawisko stymulowanej internalizacji po opsonizacji białka ABCB1 przeciwciałem specyficznym konformacyjnie, budzi to nadzieję, że analogiczne interwencje terapeutyczne można potencjalnie wycelować w komórki ekspresyjną inne białka oporności wielolekowej. Immunoterapia wspomagana endocytozą może drastycznie obniżyć ryzyko skutków ubocznych dzięki zastosowaniu toksyn, które muszą znaleźć się wewnątrz komórki, aby wyrzucić efekt bólczy, a samodzielnie nie mogą ulegać spontanicznej internalizacji. Substancje takie będą mogły bezpiecznie znaleźć się w krwiobiegu, nie oddziałując z komórkami o niskim poziomie ekspresji białka oporności wielolekowej (rozpoznawanego przez przeciwciała), a wywierać silną toksyczność na komórki nowotworowe, do których będą aktywnie internalizowane.

Pomimo tego, że w niniejszej pracy udało się zbadać wiele aspektów biologii białka ABCG2, wiele pytań dotyczących tego wielofunkcyjnego transportera pozostaje bez odpowiedzi. Ze względu na niezwykle szeroką specyficzność substratową białka ABCG2 i nietypowy przebieg procesu rozpoznawania i wiązania cząsteczki substratu niejasne jest, czy kiedykolwiek możliwe będzie skuteczne teoretyczne przewidywanie jego specyficzności substratowej (tzn. projektowanie nowych substratów i inhibitorów oraz predykcja aktywności wobec istniejących związków naturalnych i syntetycznych). Dlatego tak ważne jest, aby poszukiwać nowych metod badania aktywności tego transportera, które będą łatwe w zastosowaniu i interpretacji wyników, skalowalne, wysokoprzepustowe i elastyczne w stosunku do struktury potencjalnych substratów i inhibitorów. Kroki poczynione w tym kierunku w niniejszej pracy są tym cenniejsze, że reprezentują jakościowy, znaczący postęp w stosunku do metod stosowanych dotychczas. W zakresie zrozumienia efektów zmian konformacyjnych, a przez to aktywności białka ABCG2 i jej regulacji, również wiele wątpliwości pozostaje nierozwiązanych. W ostatnich latach ukazało się wiele prac, w których badacze, opierając się o struktury uzyskane techniką cryo-EM, starają się lepiej zrozumieć molekularnej szczegóły mechanizmu funkcjonowania tego ważnego transportera. W prezentowanej pracy przedstawiono i zwalidowano wachlarz komplementarnych technik mikroskopowego badania aktywności i lokalizacji ABCG2, nie tylko poszerzając arsenal dla innych badaczy, ale także prezentując wyniki typu proof-of-concept bezpośrednio poszerzające wiedzę o tym transporterze. W dalszej kolejności istotne będzie m.in. wdrożenie opartych na tej bazie technik mikroskopowych umożliwiających (analogiczne do zademonstrowanego w pracy na modelowych przykładach) bezpośrednio testowanie hipotez dotyczących przejść konformacyjnych w ABCG2, geometrii, kinetyki i termodynamiki wiązania substratów, a także związku między strukturą, aktywnością i lokalizacją subkomórkową. Niezwykle ważne wydaje się też zbadanie, czy wiązanie przeciwciała monoklonalnego 5D3 do powierzchni białka jest procesem analogicznym do jakiegoś naturalnie występującego mechanizmu fizjologicznej regulacji ekspozycji ABCG2 na powierzchni komórek, a także czy obserwowane zjawisko jest ograniczone tylko do białka ABCG2 i jego bliskich analogów, czy może jest elementem bardziej uniwersalnego sposobu regulowania aktywności transporterów błonowych.

## 6. Wnioski

1. DPBA jest unikalnym narzędziem, które można zastosować do badania mechanizmów i kinetyki transportu naturalnych związków polifenolowych przez błony plazmatyczne komórek ssaczych.
2. Luteolina jest nowo zidentyfikowanym dobrym substratem modelowym do badania aktywności i inhibicji transportera ABCG2.
3. Ludzkie białko ABCG2 jest prawdopodobnie zdolne do transportu większości związków z grupy naturalnych flawonoidów.
4. Flawonoidy oddziałujące z białkiem ABCG2 różnią się od siebie znacząco zarówno efektywnością transportu, jak i powinowactwem do transportera, co ma konsekwencje dla ich farmakokinetyki oraz oddziaływań pożywienie-lek i pożywienie-pożywienie.
5. Metoda FRET-FLIM umożliwia nie tylko wiarygodną identyfikację oddziaływań substrat transportowy-transporter, ale także ich ilościowy opis kinetyczny.
6. Wygaszanie zewnątrzkomórkowej fluorescencji przy użyciu błękitu trypanu w połączeniu z mikroskopią konfokalną umożliwia ilościową analizę mechanizmów internalizacji białek błonowych.
7. Zablokowanie ABCG2 w konformacji otwartej do środka prawdopodobnie wywołuje internalizację transportera na drodze szybkiej endocytozy o mieszanym mechanizmie. Na ten proces składa się endocytoza zależna od klatryny i endocytoza zależna od cholesterolu.
8. Powyższe zjawisko jest potencjalnie istotnym fizjologicznym mechanizmem regulacji funkcji ABCG2 w ekspresujących je komórkach, zarówno poprzez wycofywanie transportera z błony plazmatycznej, jak i częściową degradację internalizowanego białka.



## 7. Bibliografía

1. Adachi, T., Nakagawa, H., Chung, I., Hagiya, Y., Hoshijima, K., Noguchi, N., Kuo, M. T., i Ishikawa, T. (2007). Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *Journal of Experimental Therapeutics i Oncology*, 6(4), 335–348.
2. Adams, D. R., Ron, D., i Kiely, P. A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-22>
3. Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Muñoz-Martínez, F., Bates, S. E., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., i Pérez-Victoria, J. M. (2005). Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Research*, 65(11), 4852–4860. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1817>
4. Akamine, Y., Sugawara-Kikuchi, Y., Uno, T., Shimizu, T., i Miura, M. (2017). Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylclozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects of CYPs and ABC transporters polymorphisms. *Annals of Clinical Biochemistry*, 54(6), 677–685. <https://doi.org/10.1177/0004563216686377>
5. Alfaras, I., Pérez, M., Juan, M. E., Merino, G., Prieto, J. G., Planas, J. M., i Alvarez, A. I. (2010). Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4523–4528. <https://doi.org/10.1021/jf9042858>
6. Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S., i Medintz, I. L. (2019). FRET as a biomolecular research tool—Understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature Methods*, 16(9), 815–829. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8>
7. Allcock, A., Fukuda, Y., Lin, W., Chen, T., i Schuetz, J. D. (2017). Identification of ABCG2 Inhibitors as a New Combination Therapy to Improve Outcome in AML. *The FASEB Journal*, 31(1\_supplement), 1064.3-1064.3. [https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.1064.3](https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.1064.3)
8. Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J. H. M., Koomen, G.-J., i Schinkel, A. H. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(6), 417–425.
9. Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., i Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research*, 58(23), 5337–5339.
10. Álvarez, A. I., Vallejo, F., Barrera, B., Merino, G., Prieto, J. G., Tomás-Barberán, F., i Espín, J. C. (2011). Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(11), 2008–2012. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040881>
11. Alvi, A. J., Clayton, H., Joshi, C., Enver, T., Ashworth, A., Vivanco, M., Dale, T. C., i Smalley, M. J. (2003). Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Research : BCR*, 5(1), R1-8. <https://doi.org/10.1186/bcr563>
12. An, G., Gallegos, J., i Morris, M. E. (2011). The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(3), 426–432. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035212>
13. An, G., Gallegos, J., i Morris, M. E. (2011). The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metabolism and Disposition:*

- The Biological Fate of Chemicals*, 39(3), 426–432.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.035212>
14. An, G., i Morris, M. E. (2011). The sulfated conjugate of biochanin A is a substrate of breast cancer resistant protein (ABCG2). *Biopharmaceutics i Drug Disposition*, 32(8), 446–457. <https://doi.org/10.1002/bdd.772>
  15. Ando, T., Kusuhara, H., Merino, G., Alvarez, A. I., Schinkel, A. H., i Sugiyama, Y. (2007). Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(10), 1873–1879. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014969>
  16. Arnaud, L. (2012). Identification of two new blood group systems, Langereis (LAN) and Junior (JR). *ISBT Science Series*, 7(1), 256–259. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2012.01555.x>
  17. Asakawa, C., Ogawa, M., Kumata, K., Fujinaga, M., Kato, K., Yamasaki, T., Yui, J., Kawamura, K., Hatori, A., Fukumura, T., i Zhang, M.-R. (2011). [11C]sorafenib: Radiosynthesis and preliminary PET study of brain uptake in P-gp/Bcrp knockout mice. *Bioorganic i Medicinal Chemistry Letters*, 21(8), 2220–2223. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.002>
  18. Aust, S., Obrist, P., Jaeger, W., Klimpfinger, M., Tucek, G., Wrba, F., Penner, E., i Thalhammer, T. (2004). Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Laboratory Investigation*, 84(8), 1024–1036. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700127>
  19. Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., i Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(4), 307–3015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143437>
  20. Azuma, Y., Takada, M., Shin, H.-W., Kioka, N., Nakayama, K., i Ueda, K. (2009). Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes to Cells: Devoted to Molecular i Cellular Mechanisms*, 14(2), 191–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01261.x>
  21. Azzariti, A., Porcelli, L., Xu, J.-M., Simone, G. M., i Paradiso, A. (2006). Prolonged exposure of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib (Iressa(TM)) and to the antiangiogenic agent ZD6474: Cytotoxic and biomolecular effects. *World Journal of Gastroenterology*, 12(32), 5140–5147. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i32.5140>
  22. Barrington, R., Williamson, G., Bennett, R. N., Davis, B. D., Brodbelt, J. S., i Kroon, P. A. (2009). Absorption, Conjugation and Efflux of the Flavonoids, Kaempferol and Galangin, Using the Intestinal CACO-2/TC7 Cell Model. *Journal of functional foods*, 1(1), 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2008.09.011>
  23. Basseville, A., Tamaki, A., Ierano, C., Trostel, S., Ward, Y., Robey, R. W., Hegde, R. S., i Bates, S. E. (2012). Histone deacetylase inhibitors influence chemotherapy transport by modulating expression and trafficking of a common polymorphic variant of the ABCG2 efflux transporter. *Cancer Research*, 72(14), 3642–3651. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2008>
  24. Bates, S. E., Medina-Pérez, W. Y., Kohlhagen, G., Antony, S., Nadjem, T., Robey, R. W., i Pommier, Y. (2004). ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(2), 836–842. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.063149>
  25. Batiha, G. E.-S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., i Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules*, 10(2), 202. <https://doi.org/10.3390/biom10020202>
  26. Beemiller, P., Hoppe, A. D., i Swanson, J. A. (2006). A Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Signal Transition Regulates ARF1 and ARF6 during Fcγ Receptor-Mediated Phagocytosis. *PLOS Biology*, 4(6), e162. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040162>

27. Beéry, E., Rajnai, Z., Abonyi, T., Makai, I., Bánsághi, S., Erdő, F., Sziráki, I., Herédi-Szabó, K., Kis, E., Jani, M., Márki-Zay, J., Tóth, G. K., i Krajcsi, P. (2012). ABCG2 modulates chlorothiazide permeability—In vitro-characterization of its interactions. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(3), 349–353.
28. Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>
29. Belda-Palazón, B., i Rodriguez, P. L. (2022). Microscopic Imaging of Endosomal Trafficking of ABA Receptors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2462, 59–69. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2156-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2156-1_5)
30. Ben Saad, A., Bruneau, A., Mareux, E., Lapalus, M., Delaunay, J.-L., Gonzales, E., Jacquemin, E., Ait-Slimane, T., i Falguières, T. (2021). Molecular Regulation of Canalicular ABC Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2113. <https://doi.org/10.3390/ijms22042113>
31. Bhatia, A., Schäfer, H.-J., i Hrycyna, C. A. (2005). Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: Evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry*, 44(32), 10893–10904. <https://doi.org/10.1021/bi0503807>
32. Bihorel, S., Camenisch, G., Lemaire, M., i Scherrmann, J.-M. (2007). Influence of breast cancer resistance protein (Abcg2) and p-glycoprotein (Abcb1a) on the transport of imatinib mesylate (Gleevec) across the mouse blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, 102(6), 1749–1757. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04808.x>
33. Birmingham, B. K., Bujac, S. R., Elsby, R., Azumaya, C. T., Wei, C., Chen, Y., Mosqueda-Garcia, R., i Ambrose, H. J. (2015). Impact of ABCG2 and SLCO1B1 polymorphisms on pharmacokinetics of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin acid in Caucasian and Asian subjects: A class effect? *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(3), 341–355. <https://doi.org/10.1007/s00228-014-1801-z>
34. Bitsikas, V., Corrêa, I. R., i Nichols, B. J. (2014). Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *eLife*, 3, e03970. <https://doi.org/10.7554/eLife.03970>
35. Bleau, A.-M., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E. I., Huse, J. T., Brennan, C. W., i Holland, E. C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007>
36. Boersma, A. J., Zuhorn, I. S., i Poolman, B. (2015). A sensor for quantification of macromolecular crowding in living cells. *Nature Methods*, 12(3), 227–229, 1 p following 229. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3257>
37. Borst, P., Evers, R., Kool, M., i Wijnholds, J. (2000). A Family of Drug Transporters: The Multidrug Resistance-Associated Proteins. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), 1295–1302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
38. Böttner, L., Grabe, V., Gablenz, S., Böhme, N., Appenroth, K. J., Gershenzon, J., i Huber, M. (2021). Differential localization of flavonoid glucosides in an aquatic plant implicates different functions under abiotic stress. *Plant, Cell i Environment*, 44(3), 900–914. <https://doi.org/10.1111/pce.13974>
39. Boumendjel, A., Nicolle, E., Moraux, T., Gerby, B., Blanc, M., Ronot, X., i Boutonnat, J. (2005). Piperazinobenzopyranones and phenalkylaminobenzopyranones: Potent inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(23), 7275–7281. <https://doi.org/10.1021/jm050705h>
40. Bram, E., Ifergan, I., Shafran, A., Berman, B., Jansen, G., i Assaraf, Y. G. (2006). Mutant Gly482 and Thr482 ABCG2 mediate high-level resistance to lipophilic antifolates. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58(6), 826–834. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0230-9>
41. Brand, W., van der Wel, P. A. I., Rein, M. J., Barron, D., Williamson, G., van Bladeren, P. J., i Rietjens, I. M. C. M. (2008). Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(9), 1794–1802. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019943>

42. Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Wielinga, P., van Tellingen, O., Schinkel, A. H., i Schellens, J. H. M. (2005). 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 Research*, *65*(7), 2577–2582. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2416>
43. Brendel, C., Scharenberg, C., Dohse, M., Robey, R. W., Bates, S. E., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Wang, Y., Wennemuth, G., Burchert, A., Boudriot, U., i Neubauer, A. (2007). Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia*, *21*(6), 1267–1275. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404638>
44. Bruhn, O., i Cascorbi, I. (2014). Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opinion on Drug Metabolism i Toxicology*, *10*(10), 1337–1354. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.952630>
45. Buer, C. S., Muday, G. K., i Djordjevic, M. A. (2007). Flavonoids Are Differentially Taken Up and Transported Long Distances in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *145*(2), 478–490. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101824>
46. Burger, H., van Tol, H., Boersma, A. W. M., Brok, M., Wiemer, E. A. C., Stoter, G., i Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, *104*(9), 2940–2942. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1398>
47. Burger, H., van Tol, H., Brok, M., Wiemer, E. A. C., de Bruijn, E. A., Guetens, G., de Boeck, G., Sparreboom, A., Verweij, J., i Nooter, K. (2005). Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biology i Therapy*, *4*(7), 747–752. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.7.1826>
48. Calcagno, A. M., Fostel, J. M., To, K. K. W., Salcido, C. D., Martin, S. E., Chewing, K. J., Wu, C.-P., Varticovski, L., Bates, S. E., Caplen, N. J., i Ambudkar, S. V. (2008). Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. *British Journal of Cancer*, *98*(9), 1515–1524. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604334>
49. Campbell, P. K., Zong, Y., Yang, S., Zhou, S., Rubnitz, J. E., i Sorrentino, B. P. (2011). Identification of a novel, tissue-specific ABCG2 promoter expressed in pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Leukemia Research*, *35*(10), 1321–1329. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.05.004>
50. Candeil, L., Gourdiere, I., Peyron, D., Vezzio, N., Copois, V., Bibeau, F., Orsetti, B., Scheffer, G. L., Ychou, M., Khan, Q. A., Pommier, Y., Pau, B., Martineau, P., i Del Rio, M. (2004). ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *International Journal of Cancer*, *109*(6), 848–854. <https://doi.org/10.1002/ijc.20032>
51. Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L., i Daniels-Wells, T. R. (2021). Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.607692>
52. Canty, L., Hariharan, S., Liu, Q., Haney, S. A., i Andrews, D. W. (2018). Peak emission wavelength and fluorescence lifetime are coupled in far-red, GFP-like fluorescent proteins. *PLOS ONE*, *13*(11), e0208075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208075>
53. Canu, B., Fioravanti, A., Orlandi, P., Di Desidero, T., Ali, G., Fontanini, G., Di Paolo, A., Del Tacca, M., Danesi, R., i Bocci, G. (2011). Irinotecan synergistically enhances the antiproliferative and proapoptotic effects of axitinib in vitro and improves its anticancer activity in vivo. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 217–229. <https://doi.org/10.1593/neo.101334>
54. Cassidy, A., i Minihane, A.-M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(1), 10–22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051>

55. Ceckova, M., Vackova, Z., Radilova, H., Libra, A., Buncek, M., i Staud, F. (2008). Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: Interference of EGFP. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 22(8), 1846–1852. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.09.001>
56. Cha, S., Kim, H.-G., Jang, H., Lee, J., Chao, T., Baek, N.-I., Song, I.-S., i Lee, Y. M. (2023). Steppogenin suppresses tumor growth and sprouting angiogenesis through inhibition of HIF-1 $\alpha$  in tumors and DLL4 activity in the endothelium. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 108, 154513. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154513>
57. Chapman, J. M., i Muday, G. K. (2021). Flavonols modulate lateral root emergence by scavenging reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100222. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014543>
58. Chearwae, W., Shukla, S., Limtrakul, P., i Ambudkar, S. V. (2006). Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1995–2006. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0087>
59. Chen, J. S., Pardo, F. S., Wang-Rodriguez, J., Chu, T. S., Lopez, J. P., Aguilera, J., Altuna, X., Weisman, R. A., i Ongkeko, W. M. (2006). EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*, 116(3), 401–406. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000195075.14093.fb>
60. Chen, Y., Agarwal, S., Shaik, N. M., Chen, C., Yang, Z., i Elmquist, W. F. (2009). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(3), 956–963. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.154781>
61. Chen, Z.-S., Robey, R. W., Belinsky, M. G., Shchaveleva, I., Ren, X.-Q., Sugimoto, Y., Ross, D. D., Bates, S. E., i Kruh, G. D. (2003). Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) by ABCG2: Effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Research*, 63(14), 4048–4054.
62. Chitwood, P. J., Juszkievicz, S., Guna, A., Shao, S., i Hegde, R. S. (2018). EMC Is Required to Initiate Accurate Membrane Protein Topogenesis. *Cell*, 175(6), 1507–1519.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.009>
63. Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., i Scherrmann, J.-M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Research*, 64(9), 3296–3301. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2033>
64. Clark, R., Kerr, I. D., i Callaghan, R. (2006). Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *British Journal of Pharmacology*, 149(5), 506–515. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706904>
65. Cleophas, M. C., Joosten, L. A., Stamp, L. K., Dalbeth, N., Woodward, O. M., i Merriman, T. R. (2017). ABCG2 polymorphisms in gout: Insights into disease susceptibility and treatment approaches. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 10, 129–142. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S105854>
66. Colabufo, N. A., Pagliarulo, V., Berardi, F., Contino, M., Inglese, C., Niso, M., Ancona, P., Albo, G., Pagliarulo, A., i Perrone, R. (2008). Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: Involvement of Multi Drug Resistance proteins. *European Journal of Pharmacology*, 601(1–3), 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.038>
67. Cooray, H. C., Blackmore, C. G., Maskell, L., i Barrand, M. A. (2002). Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*, 13(16), 2059–2063. <https://doi.org/10.1097/00001756-200211150-00014>
68. Cooray, H. C., Janvilisri, T., van Veen, H. W., Hladky, S. B., i Barrand, M. A. (2004). Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(1), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.040>

69. Cox, M. H., Kapoor, P., Briggs, D. A., i Kerr, I. D. (2018). Residues contributing to drug transport by ABCG2 are localised to multiple drug-binding pockets. *Biochemical Journal*, 475(9), 1553–1567. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170923>
70. Cubeddu, R., Comelli, D., D'Andrea, C., Taroni, P., i Valentini, G. (2002). Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35(9), R61. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/35/9/201>
71. Dai, C., Tiwari, A. K., Wu, C.-P., Su, X.-D., Wang, S.-R., Liu, D., Ashby, C. R., Huang, Y., Robey, R. W., Liang, Y., Chen, L., Shi, C.-J., Ambudkar, S. V., Chen, Z.-S., i Fu, L. (2008). Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. *Cancer Research*, 68(19), 7905–7914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0499>
72. Dallagnol, A. M., Dallagnol, V. C., Vignolo, G. M., Lopes, N. P., i Brunetti, A. E. (2022). Flavonoids and Phenylethylamides Are Pivotal Factors Affecting the Antimicrobial Properties of Stingless Bee Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(39), 12596–12603. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04120>
73. de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., i Bates, S. E. (1999). Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Letters*, 146(2), 117–126. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00182-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00182-2)
74. De Cesare, M., Beretta, G. L., Tinelli, S., Benedetti, V., Pratesi, G., Penco, S., Dallavalle, S., Merlini, L., Pisano, C., Carminati, P., i Zunino, F. (2007). Preclinical efficacy of ST1976, a novel camptothecin analog of the 7-oxyiminomethyl series. *Biochemical Pharmacology*, 73(5), 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.11.004>
75. de Jong, F. A., Marsh, S., Mathijssen, R. H. J., King, C., Verweij, J., Sparreboom, A., i McLeod, H. L. (2004). ABCG2 pharmacogenetics: Ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(17), 5889–5894. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0144>
76. De Rosa, M. F., Sillence, D., Ackerley, C., i Lingwood, C. (2004). Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7867–7876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305645200>
77. de Vries, N. A., Zhao, J., Kroon, E., Buckle, T., Beijnen, J. H., i van Tellingen, O. (2007). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: Two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(21), 6440–6449. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1335>
78. de Wolf, C., Jansen, R., Yamaguchi, H., de Haas, M., van de Wetering, K., Wijnholds, J., Beijnen, J., i Borst, P. (2008). Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 3092–3102. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0427>
79. Dehghan, A., Köttgen, A., Yang, Q., Hwang, S.-J., Kao, W. L., Rivadeneira, F., Boerwinkle, E., Levy, D., Hofman, A., Astor, B. C., Benjamin, E. J., van Duijn, C. M., Witteman, J. C., Coresh, J., i Fox, C. S. (2008). Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: A genome-wide association study. *Lancet (London, England)*, 372(9654), 1953–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61343-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61343-4)
80. Ding, R., Shi, J., Pabon, K., i Scotto, K. W. (2012). Xanthines down-regulate the drug transporter ABCG2 and reverse multidrug resistance. *Molecular Pharmacology*, 81(3), 328–337. <https://doi.org/10.1124/mol.111.075556>
81. Dinneen, J. L., i Ceresa, B. P. (2004). Expression of dominant negative rab5 in HeLa cells regulates endocytic trafficking distal from the plasma membrane. *Experimental Cell Research*, 294(2), 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.006>
82. Diop, N. K., i Hrycyna, C. A. (2005). N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry*, 44(14), 5420–5429. <https://doi.org/10.1021/bi0479858>

83. Dohse, M., Scharenberg, C., Shukla, S., Robey, R. W., Volkmann, T., Deeken, J. F., Brendel, C., Ambudkar, S. V., Neubauer, A., i Bates, S. E. (2010). Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 38(8), 1371–1380. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031302>
84. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., i Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
85. Dremina, E. S., Li, X., Galeva, N. A., Sharov, V. S., Stobaugh, J. F., i Schöneich, C. (2011). A Methodology for Simultaneous Fluorogenic Derivatization and Boronate Affinity Enrichment of 3-Nitrotyrosine Containing Peptides. *Analytical biochemistry*, 418(2), 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.024>
86. Du, Y., Funderburgh, M. L., Mann, M. M., SundarRaj, N., i Funderburgh, J. L. (2005). Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(9), 1266–1275. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0256>
87. Ebert, B., Seidel, A., i Lampen, A. (2005). Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*, 26(10), 1754–1763. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi139>
88. Ebert, B., Seidel, A., i Lampen, A. (2007). Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 96(2), 227–236. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl147>
89. Eclov, R. J., Kim, M. J., Smith, R., Ahituv, N., i Kroetz, D. L. (2018). Rare Variants in the ABCG2 Promoter Modulate In Vivo Activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(5), 636–642. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.079541>
90. Ee, P. L. R., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X., Ross, D. D., i Beck, W. T. (2004). Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Research*, 64(4), 1247–1251.
91. Eisenblätter, T., Hüwel, S., i Galla, H.-J. (2003). Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood–brain barrier. *Brain Research*, 971(2), 221–231. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02401-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02401-6)
92. Ejendal, K. F. K., Diop, N. K., Schweiger, L. C., i Hrycyna, C. A. (2006). The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 15(7), 1597–1607. <https://doi.org/10.1110/ps.051998406>
93. Elkind, N. B., Szentpétery, Z., Apáti, A., Ozvegy-Laczka, C., Várady, G., Ujhelly, O., Szabó, K., Homolya, L., Váradi, A., Buday, L., Kéri, G., Német, K., i Sarkadi, B. (2005). Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Research*, 65(5), 1770–1777. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3303>
94. Emi, Y., Nomura, S., Yokota, H., i Sakaguchi, M. (2011). ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein. *Journal of Biochemistry*, 149(2), 177–189. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq131>
95. Enache, M., i Volanschi, E. (2011). Spectral studies on the molecular interaction of anticancer drug mitoxantrone with CTAB micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2), 558–565. <https://doi.org/10.1002/jps.22289>
96. Enokizono, J., Kusuhara, H., Ose, A., Schinkel, A. H., i Sugiyama, Y. (2008). Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(6), 995–1002. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019257>
97. Enokizono, J., Kusuhara, H., i Sugiyama, Y. (2007). Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and intestinal efflux of

- troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(2), 209–214. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012567>
98. Enokizono, J., Kusuhara, H., i Sugiyama, Y. (2007). Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Molecular Pharmacology*, 72(4), 967–975. <https://doi.org/10.1124/mol.107.034751>
  99. Erdei, Z., Sarkadi, B., Brózik, A., Szebényi, K., Várady, G., Makó, V., Péntek, A., Orbán, T. I., i Apáti, Á. (2013). Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *European Biophysics Journal: EBJ*, 42(2–3), 169–179. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0838-0>
  100. Erlichman, C., Boerner, S. A., Hallgren, C. G., Spieker, R., Wang, X. Y., James, C. D., Scheffer, G. L., Maliepaard, M., Ross, D. D., Bible, K. C., i Kaufmann, S. H. (2001). The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Research*, 61(2), 739–748.
  101. Fan, J., To, K. K. W., Chen, Z.-S., i Fu, L. (2023). ABC transporters affects tumor immune microenvironment to regulate cancer immunotherapy and multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 66, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100905>
  102. Farinha, C. M., i Canato, S. (2017). From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: Mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(1), 39–55. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2387-7>
  103. Ferrara, B. T., i Thompson, E. P. (2019). A method for visualizing fluorescence of flavonoid therapeutics in vivo in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *BioTechniques*, 66(2), 65–71. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0084>
  104. Ferreira, R. J., Bonito, C. A., Cordeiro, M. N. D. S., Ferreira, M.-J. U., i Santos, D. J. V. A. dos. (2017). Structure-function relationships in ABCG2: Insights from molecular dynamics simulations and molecular docking studies. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15452-z>
  105. Fetsch, P. A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K., i Bates, S. E. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Letters*, 235(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.024>
  106. Fu, D., van Dam, E. M., Brymora, A., Duggin, I. G., Robinson, P. J., i Roufogalis, B. D. (2007). The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1773(7), 1062–1072. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.023>
  107. Fukudo, M., Ikemi, Y., Togashi, Y., Masago, K., Kim, Y. H., Mio, T., Terada, T., Teramukai, S., Mishima, M., Inui, K.-I., i Katsura, T. (2013). Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of erlotinib and pharmacogenomic analysis of plasma and cerebrospinal fluid drug concentrations in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Pharmacokinetics*, 52(7), 593–609. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0058-5>
  108. Furukawa, T., Wakabayashi, K., Tamura, A., Nakagawa, H., Morishima, Y., Osawa, Y., i Ishikawa, T. (2009). Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharmaceutical Research*, 26(2), 469–479. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9752-7>
  109. Gál, Z., Hegedüs, C., Szakács, G., Váradi, A., Sarkadi, B., i Özvegy-Laczka, C. (2015). Mutations of the central tyrosines of putative cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequences modify folding, activity, and sterol-sensing of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1848(2), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.006>
  110. Gallus, J., Juvale, K., i Wiese, M. (2014). Characterization of 3-methoxy flavones for their interaction with ABCG2 as suggested by ATPase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(11), 2929–2938. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.003>



111. Gandhi, Y. A., i Morris, M. E. (2009). Structure–Activity Relationships and Quantitative Structure–Activity Relationships for Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *The AAPS Journal*, 11(3), 541–552. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9132-1>
112. García-Escarp, M., Martínez-Muñoz, V., Sales-Pardo, I., Barquinero, J., Domingo, J. C., Marin, P., i Petriz, J. (2004). Flow cytometry-based approach to ABCG2 function suggests that the transporter differentially handles the influx and efflux of drugs. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 62(2), 129–138. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20072>
113. Gedeon, C., Anger, G., Piquette-Miller, M., i Koren, G. (2008). Breast cancer resistance protein: Mediating the trans-placental transfer of glyburide across the human placenta. *Placenta*, 29(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.08.004>
114. Gervasini, G., de Murillo, S. G., Jiménez, M., de la Maya, M. D., i Vagace, J. M. (2017). Effect of polymorphisms in transporter genes on dosing, efficacy and toxicity of maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Gene*, 628, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.025>
115. Giacomini, K. M., i Huang, S. M. (2022). More Than Pharmacokinetics: Transporters in Clinical Pharmacology. *Clinical Pharmacology i Therapeutics*, 112(3), 423–426. <https://doi.org/10.1002/cpt.2710>
116. Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., i Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1797–1806. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1797>
117. Gotanda, K., Tokumoto, T., Hirota, T., Fukae, M., i Ieiri, I. (2015). Sulfasalazine disposition in a subject with 376C>T (nonsense mutation) and 421C>A variants in the ABCG2 gene. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(5), 1236–1237. <https://doi.org/10.1111/bcp.12654>
118. Grigoreva, T. A., Sagaidak, A. V., Novikova, D. S., i Tribulovich, V. G. (2022). Implication of ABC transporters in non-proliferative diseases. *European Journal of Pharmacology*, 935, 175327. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175327>
119. Guo, C., Liu, F., Qi, J., Ma, J., Lin, S., Zhang, C., Zhang, Q., Zhang, H., Lu, R., i Li, X. (2018). A Novel Synthetic Dihydroindeno[1,2-b] Indole Derivative (LS-2-3j) Reverses ABCB1- and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123264>
120. Guo, S., Xing, N., Xiang, G., Zhang, Y., i Wang, S. (2023). Eriodictyol: A review of its pharmacological activities and molecular mechanisms related to ischemic stroke. *Food i Function*, 14(4), 1851–1868. <https://doi.org/10.1039/d2fo03417d>
121. Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C., i Drewe, J. (2005). Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochemical Pharmacology*, 70(5), 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.031>
122. Haider, A. J., Cox, M. H., Jones, N., Goode, A. J., Bridge, K. S., Wong, K., Briggs, D., i Kerr, I. D. (2015). Identification of residues in ABCG2 affecting protein trafficking and drug transport, using co-evolutionary analysis of ABCG sequences. *Bioscience Reports*, 35(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20150150>
123. Hammood, M., Craig, A. W., i Leyton, J. V. (2021). Impact of Endocytosis Mechanisms for the Receptors Targeted by the Currently Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs)—A Necessity for Future ADC Research and Development. *Pharmaceuticals*, 14(7), 674. <https://doi.org/10.3390/ph14070674>
124. Hauswald, S., Duque-Afonso, J., Wagner, M. M., Schertl, F. M., Lübbert, M., Peschel, C., Keller, U., i Licht, T. (2009). Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(11), 3705–3715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2048>

125. Hazlehurst, L. A., Foley, N. E., Gleason-Guzman, M. C., Hacker, M. P., Cress, A. E., Greenberger, L. W., De Jong, M. C., i Dalton, W. S. (1999). Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line. *Cancer Research*, *59*(5), 1021–1028.
126. He, X., Wang, J., Wei, W., Shi, M., Xin, B., Zhang, T., i Shen, X. (2016). Hypoxia regulates ABCG2 activity through the activation of ERK1/2/HIF-1 $\alpha$  and contributes to chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Biology i Therapy*, *17*(2), 188–198. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1139228>
127. Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apáti, A., Magócsi, M., Német, K., Orfi, L., Kéri, G., Katona, M., Takáts, Z., Váradi, A., Szakács, G., i Sarkadi, B. (2009). Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British Journal of Pharmacology*, *158*(4), 1153–1164. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00383.x>
128. Henrich, C. J., Robey, R. W., Bokesch, H. R., Bates, S. E., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Dean, M., i McMahon, J. B. (2007). New inhibitors of ABCG2 identified by high-throughput screening. *Molecular Cancer Therapeutics*, *6*(12 Pt 1), 3271–3278. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0352>
129. Henrich, C. J., Robey, R. W., Takada, K., Bokesch, H. R., Bates, S. E., Shukla, S., Ambudkar, S. V., McMahon, J. B., i Gustafson, K. R. (2009). Botryllamides: Natural Product Inhibitors of ABCG2. *ACS chemical biology*, *4*(8), 637–647. <https://doi.org/10.1021/cb900134c>
130. Henriksen, U., Fog, J. U., Litman, T., i Gether, U. (2005). Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(44), 36926–36934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502937200>
131. Heyes, N., Kapoor, P., i Kerr, I. D. (2018). Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *46*(12), 1886–1899. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083030>
132. Higashino, T., Takada, T., Nakaoka, H., Toyoda, Y., Stiburkova, B., Miyata, H., Ikebuchi, Y., Nakashima, H., Shimizu, S., Kawaguchi, M., Sakiyama, M., Nakayama, A., Akashi, A., Tanahashi, Y., Kawamura, Y., Nakamura, T., Wakai, K., Okada, R., Yamamoto, K., ... Matsuo, H. (2017). Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open*, *3*(2), e000464. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2017-000464>
133. Higgins, C. F., i Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural i Molecular Biology*, *11*(10), 918–926. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>
134. Hirai, T., Fukui, Y., i Motojima, K. (2007). PPAR $\alpha$  agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. *Biological i Pharmaceutical Bulletin*, *30*(11), 2185–2190. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.2185>
135. Hirano, M., Maeda, K., Matsushima, S., Nozaki, Y., Kusuhara, H., i Sugiyama, Y. (2005). Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Molecular Pharmacology*, *68*(3), 800–807. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014019>
136. Hiwase, D. K., Saunders, V., Hewett, D., Frede, A., Zrim, S., Dang, P., Eadie, L., To, L. B., Melo, J., Kumar, S., Hughes, T. P., i White, D. L. (2008). Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: Therapeutic implications. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(12), 3881–3888. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5095>
137. Ho, R. H., Choi, L., Lee, W., Mayo, G., Schwarz, U. I., Tirona, R. G., Bailey, D. G., Stein, C. M., i Kim, R. B. (2007). Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. *Pharmacogenetics and genomics*, *17*(8), 647–656. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3280ef698f>
138. Hodin, S., Basset, T., Jacquerooux, E., Delezay, O., Clotagatide, A., Perek, N., Mismetti, P., i Delavenne, X. (2018). In Vitro Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition.

- European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 43(2), 183–191.  
<https://doi.org/10.1007/s13318-017-0434-x>
139. Homolya, L., Fu, D., Sengupta, P., Jarnik, M., Gillet, J.-P., Vitale-Cross, L., Gutkind, J. S., Lippincott-Schwartz, J., i Arias, I. M. (2014). LKB1/AMPK and PKA Control ABCB1 Trafficking and Polarization in Hepatocytes. *PLOS ONE*, 9(3), e91921.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091921>
  140. Homolya, L., Orbán, T. I., Csanády, L., i Sarkadi, B. (2011). Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(1), 154–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.031>
  141. Honjo, Y., Hrycyna, C. A., Yan, Q. W., Medina-Pérez, W. Y., Robey, R. W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., i Bates, S. E. (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Research*, 61(18), 6635–6639.
  142. Honjo, Y., Morisaki, K., Huff, L. M., Robey, R. W., Hung, J., Dean, M., i Bates, S. E. (2002). Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biology i Therapy*, 1(6), 696–702.  
<https://doi.org/10.4161/cbt.322>
  143. Horsey, A. J., Briggs, D. A., Holliday, N. D., Briddon, S. J., i Kerr, I. D. (2020). Application of fluorescence correlation spectroscopy to study substrate binding in styrene maleic acid lipid copolymer encapsulated ABCG2. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(6), 183218. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183218>
  144. Horsey, A. J., Cox, M. H., Sarwat, S., i Kerr, I. D. (2016). The multidrug transporter ABCG2: Still more questions than answers. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 824–830. <https://doi.org/10.1042/BST20160014>
  145. Houghton, P. J., Germain, G. S., Harwood, F. C., Schuetz, J. D., Stewart, C. F., Buchdunger, E., i Traxler, P. (2004). Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Research*, 64(7), 2333–2337.
  146. Hu, C. F., Huang, Y. Y., Wang, Y. J., i Gao, F. G. (2016). Upregulation of ABCG2 via the PI3K-Akt pathway contributes to acidic microenvironment-induced cisplatin resistance in A549 and LTEP-a-2 lung cancer cells. *Oncology Reports*, 36(1), 455–461.  
<https://doi.org/10.3892/or.2016.4827>
  147. Hu, L.-L., Wang, X.-X., Chen, X., Chang, J., Li, C., Zhang, Y., Yang, J., Jiang, W., i Zhuang, S.-M. (2007). BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Carcinogenesis*, 28(8), 1740–1744.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm113>
  148. Hu, W., i Liu, W. (2010). Side populations of glioblastoma cells are less sensitive to HSV-TK/GCV suicide gene therapy system than the non-side population. *In Vitro Cellular i Developmental Biology. Animal*, 46(6), 497–501. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9274-6>
  149. Huang, F.-F., Zhang, L., Wu, D.-S., Yuan, X.-Y., Yu, Y.-H., Zhao, X.-L., Chen, F.-P., i Zeng, H. (2014). PTEN regulates BCRP/ABCG2 and the side population through the PI3K/Akt pathway in chronic myeloid leukemia. *PloS One*, 9(3), e88298.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088298>
  150. Huang, J., i Ecker, G. F. (2023). A Structure-Based View on ABC-Transporter Linked to Multidrug Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(2), 495.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28020495>
  151. Huang, L., Wang, Y., i Grimm, S. (2006). ATP-dependent transport of rosuvastatin in membrane vesicles expressing breast cancer resistance protein. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(5), 738–742.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.105.007534>
  152. Huls, M., Brown, C. D. A., Windass, A. S., Sayer, R., van den Heuvel, J. J. M. W., Heemskerk, S., Russel, F. G. M., i Masereeuw, R. (2008). The breast cancer resistance

- protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney International*, 73(2), 220–225. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002645>
153. Huss, W. J., Gray, D. R., Greenberg, N. M., Mohler, J. L., i Smith, G. J. (2005). Breast cancer resistance protein-mediated efflux of androgen in putative benign and malignant prostate stem cells. *Cancer Research*, 65(15), 6640–6650. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2548>
  154. Ieiri, I., Suwannakul, S., Maeda, K., Uchimar, H., Hashimoto, K., Kimura, M., Fujino, H., Hirano, M., Kusuhara, H., Irie, S., Higuchi, S., i Sugiyama, Y. (2007). SLCO1B1 (OATP1B1, an uptake transporter) and ABCG2 (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(5), 541–547. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100190>
  155. Iida, A., Saito, S., Sekine, A., Mishima, C., Kitamura, Y., Kondo, K., Harigae, S., Osawa, S., i Nakamura, Y. (2002). Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *Journal of Human Genetics*, 47(6), 285–310. <https://doi.org/10.1007/s100380200041>
  156. Ikebuchi, Y., Takada, T., Ito, K., Yoshikado, T., Anzai, N., Kanai, Y., i Suzuki, H. (2009). Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 39(11), 1091–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2009.00544.x>
  157. Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., i Sugimoto, Y. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Molecular Pharmacology*, 64(3), 610–618. <https://doi.org/10.1124/mol.64.3.610>
  158. Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., i Sugimoto, Y. (2005). Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Research*, 65(2), 596–604.
  159. Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki, Y., i Sugimoto, Y. (2002). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(8), 611–616.
  160. Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., i Sugimoto, Y. (2004). Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Research*, 64(12), 4346–4352. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0078>
  161. Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., i Sugimoto, Y. (2002). Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 93(3), 231–235. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb02162.x>
  162. Ishii, M., Iwahana, M., Mitsui, I., Minami, M., Imagawa, S., Tohgo, A., i Ejima, A. (2000). Growth inhibitory effect of a new camptothecin analog, DX-8951f, on various drug-resistant sublines including BCRP-mediated camptothecin derivative-resistant variants derived from the human lung cancer cell line PC-6. *Anti-Cancer Drugs*, 11(5), 353–362. <https://doi.org/10.1097/00001813-200006000-00005>
  163. Islam, F., Gopalan, V., i Lam, A. K. (2020). Detention and Identification of Cancer Stem Cells in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2129, 177–191. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0377-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0377-2_14)
  164. Isonishi, S., Saitou, M., Saitou, M., Yasuda, M., i Tanaka, T. (2007). Differential regulation of the cytotoxicity activity of paclitaxel by orobol and platelet derived growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Oncology Reports*, 18(1), 195–201.
  165. Ivanov, A. I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 440, 15–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9_2)
  166. J Simão, M., J S Barboza, T., G Vianna, M., Garcia, R., Mansur, E., P R Ignacio, A. C., i Pacheco, G. (2018). A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of in vitro derived materials of four Passiflora species. *Anais Da Academia*

*Brasileira De Ciencias*, 90(3), 2805–2813. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170809>

167. Jackson, S. M., Manolaridis, I., Kowal, J., Zechner, M., Taylor, N. M. I., Bause, M., Bauer, S., Bartholomaeus, R., Bernhardt, G., Koenig, B., Buschauer, A., Stahlberg, H., Altmann, K.-H., i Locher, K. P. (2018). Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nature Structural i Molecular Biology*, 25(4), 333–340. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0049-1>
168. Janabi, A. H., Kamboh, A. A., Saeed, M., Xiaoyu, L., BiBi, J., Majeed, F., Naveed, M., Mughal, M. J., Korejo, N. A., Kamboh, R., Alagawany, M., i Lv, H. (2020). Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(2), 140–153. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2019.35125.8353>
169. Jani, M., Makai, I., Kis, E., Szabó, P., Nagy, T., Krajcsi, P., i Lespine, A. (2011). Ivermectin interacts with human ABCG2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 94–97. <https://doi.org/10.1002/jps.22262>
170. Jani, M., Szabó, P., Kis, E., Molnár, E., Glavinas, H., i Krajcsi, P. (2009). Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2. *Biological i Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 497–499. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.497>
171. Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L., i van Veen, H. W. (2005). Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *The Biochemical Journal*, 385(Pt 2), 419–426. <https://doi.org/10.1042/BJ20040791>
172. Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Reuter, G., Balakrishnan, L., i van Veen, H. W. (2003). Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20645–20651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301358200>
173. Janyou, A., Moohammadaree, A., Jumnongprakhon, P., Tocharus, C., Chokchaisiri, R., Suksamran, A., i Tocharus, J. (2023). Effects of isosakuranetin on cerebral infarction and blood brain barrier damage from cerebral ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Journal of Biomolecular Structure i Dynamics*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2205940>
174. Jones, P. M., i George, A. M. (2023). The Switch and Reciprocating Models for the Function of ABC Multidrug Exporters: Perspectives on Recent Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2624. <https://doi.org/10.3390/ijms24032624>
175. Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R. P. J. O., Rosing, H., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.202607599>
176. Jonker, J. W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A. E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T. C., i Schinkel, A. H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature Medicine*, 11(2), 127–129. <https://doi.org/10.1038/nm1186>
177. Jonker, J. W., Smit, J. W., Brinkhuis, R. F., Maliepaard, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., i Schinkel, A. H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(20), 1651–1656. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.20.1651>
178. Jordanides, N. E., Jorgensen, H. G., Holyoake, T. L., i Mountford, J. C. (2006). Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood*, 108(4), 1370–1373. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003145>
179. Juan-Carlos, P.-D. M., Perla-Lidia, P.-P., Stephanie-Talia, M.-M., Mónica-Griselda, A.-M., i Luz-María, T.-E. (2021). ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine.

- Molecular Biology Reports*, 48(2), 1883–1901. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06155-w>
180. Juliano, R. L., i Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 455(1), 152–162. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
  181. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., i Sugimoto, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *International Journal of Cancer*, 97(5), 626–630. <https://doi.org/10.1002/ijc.10100>
  182. Kai, H., Koine, T., Baba, M., i Okuyama, T. (2004). [Pharmacological effects of Daphne genkwa and Chinese medical prescription, „Jyu-So-To“]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 124(6), 349–354. <https://doi.org/10.1248/yakushi.124.349>
  183. Kapoor, P., Horsey, A. J., Cox, M. H., i Kerr, I. D. (2018). ABCG2: Does resolving its structure elucidate the mechanism? *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1485–1494. <https://doi.org/10.1042/BST20180145>
  184. Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L. A., Ross, D. D., i Kohno, S. (2001). Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(5), 1216–1223. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4267>
  185. Kawahara, I., Nishikawa, S., Yamamoto, A., Kono, Y., i Fujita, T. (2020). The Impact of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) on Drug Transport Across Caco-2 Cell Monolayers. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(6), 491–498. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.088674>
  186. Kayed, A. M., Genady, E. A. M., Kadry, H. A., i Elghaly, E.-S. M. (2021). New phytoconstituents, anti-microbial and cytotoxic activities of *Acacia etbaica* Schweinf. *Natural Product Research*, 35(24), 5571–5580. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1797725>
  187. Keskitalo, J. E., Pasanen, M. K., Neuvonen, P. J., i Niemi, M. (2009). Different effects of the ABCG2 c.421C>A SNP on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin and simvastatin. *Pharmacogenomics*, 10(10), 1617–1624. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.85>
  188. Khan, I., Gril, B., Paranjape, A. N., Robinson, C. M., Difilippantonio, S., Biernat, W., Bieńkowski, M., Pęksa, R., Duchnowska, R., Jassem, J., Brastianos, P. K., Metellus, P., Bialecki, E., Woodroffe, C. C., Wu, H., Swenson, R. E., i Steeg, P. S. (2023). Comparison of Three Transcytotic Pathways for Distribution to Brain Metastases of Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 22(5), 646–658. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0815>
  189. Khunweeraphong, N., Stockner, T., i Kuchler, K. (2017). The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Scientific Reports*, 7(1), 13767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>
  190. Kim, J., Park, J. M., Roh, Y., Kim, I.-W., Hasan, T., i Choi, M.-G. (2015). Enhanced efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2 in colon cancers. *BMC cancer*, 15, 504. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1514-4>
  191. Kim, K.-A., Joo, H.-J., i Park, J.-Y. (2011). Effect of ABCG2 genotypes on the pharmacokinetics of A771726, an active metabolite of prodrug leflunomide, and association of A771726 exposure with serum uric acid level. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67(2), 129–134. <https://doi.org/10.1007/s00228-010-0916-0>
  192. Kim, Y., i Chen, J. (2018). Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science*, 359(6378), 915–919. <https://doi.org/10.1126/science.aar7389>
  193. Kipp, H., i Arias, I. M. (2000). Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Seminars in Liver Disease*, 20(3), 339–351. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9388>

194. Kipp, H., Pichetshote, N., i Arias, I. M. (2001). Transporters on Demand: INTRAHEPATIC POOLS OF CANALICULAR ATP BINDING CASSETTE TRANSPORTERS IN RAT LIVER\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7218–7224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007794200>
195. Kita, D. H., Guragossian, N., Zatonni, I. F., Moure, V. R., Rego, F. G. de M., Lusvarghi, S., Moulenat, T., Belhani, B., Picheth, G., Bouacida, S., Bouaziz, Z., Marminon, C., Berredjem, M., Jose, J., Gonçalves, M. B., Ambudkar, S. V., Valdameri, G., i Le Borgne, M. (2021). Mechanistic basis of breast cancer resistance protein inhibition by new indeno[1,2-b]indoles. *Scientific Reports*, 11(1), 1788. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79892-w>
196. Kobayashi, D., Ieiri, I., Hirota, T., Takane, H., Maegawa, S., Kigawa, J., Suzuki, H., Nanba, E., Oshimura, M., Terakawa, N., Otsubo, K., Mine, K., i Sugiyama, Y. (2005). Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(1), 94–101. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001628>
197. Kokubo, S., Ohnuma, S., Murakami, M., Kikuchi, H., Funayama, S., Suzuki, H., Kajiwara, T., Yamamura, A., Karasawa, H., Sugisawa, N., Ohsawa, K., Kano, K., Aoki, J., Doi, T., Naitoh, T., Ambudkar, S. V., i Unno, M. (2021). A Phenylfurocoumarin Derivative Reverses ABCG2-Mediated Multidrug Resistance In Vitro and In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12502. <https://doi.org/10.3390/ijms222212502>
198. Komatani, H., Kotani, H., Hara, Y., Nakagawa, R., Matsumoto, M., Arakawa, H., i Nishimura, S. (2001). Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. *Cancer Research*, 61(7), 2827–2832.
199. Komori, H., Yamada, K., i Tamai, I. (2018). Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(5), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.006>
200. Kovacsics, D., Brózik, A., Tihanyi, B., Matula, Z., Borsy, A., Mészáros, N., Szabó, E., Németh, E., Fóthi, Á., Zámbo, B., Szüts, D., Várady, G., Orbán, T. I., Apáti, Á., i Sarkadi, B. (2020). Precision-engineered reporter cell lines reveal ABCG2 regulation in live lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 175, 113865. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113865>
201. Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., i Schuetz, J. D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24218–24225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313599200>
202. Kroll, T., Prescher, M., Smits, S. H. J., i Schmitt, L. (2021). Structure and Function of Hepatobiliary ATP Binding Cassette Transporters. *Chemical Reviews*, 121(9), 5240–5288. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00659>
203. Krüger, N., Kronenberger, T., Xie, H., Rocha, C., Pöhlmann, S., Su, H., Xu, Y., Laufer, S. A., i Pillaiyar, T. (2023). Discovery of Polyphenolic Natural Products as SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors for COVID-19. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(2), 190. <https://doi.org/10.3390/ph16020190>
204. Kukal, S., Guin, D., Rawat, C., Bora, S., Mishra, M. K., Sharma, P., Paul, P. R., Kanojia, N., Grewal, G. K., Kukreti, S., Saso, L., i Kukreti, R. (2021). Multidrug efflux transporter ABCG2: Expression and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78(21–22), 6887–6939. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03901-y>
205. Kumar, R. M., Kumar, H., Bhatt, T., Jain, R., Panchal, K., Chaurasiya, A., i Jain, V. (2023). Fisetin in Cancer: Attributes, Developmental Aspects, and Nanotherapeutics. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(2), 196. <https://doi.org/10.3390/ph16020196>
206. Lagas, J. S., van der Kruijssen, C. M. M., van de Wetering, K., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2009). Transport of diclofenac by breast cancer resistance protein (ABCG2) and stimulation of multidrug resistance protein 2 (ABCC2)-mediated drug

- transport by diclofenac and benzbromarone. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(1), 129–136. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023200>
207. Lagas, J. S., van Waterschoot, R. A. B., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2010). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 319–326. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0663>
  208. Lam, A., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J. D., Cranfill, P. J., Baird, M. A., McKeown, M. R., Wiedenmann, J., Davidson, M. W., Schnitzer, M. J., Tsien, R. Y., i Lin, M. Z. (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature methods*, 9(10), 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
  209. Lamaze, C., Chuang, T.-H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M., i Schmid, S. L. (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*, 382(6587), 177–179. <https://doi.org/10.1038/382177a0>
  210. Lambert, T. J. (2019). FPbase: A community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*, 16(4), 277–278. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>
  211. Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Mercer, J. A., Bähler, M., i Goldenring, J. R. (2001). Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1843–1857. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1843>
  212. László, L., Sarkadi, B., i Hegedűs, T. (2016). Jump into a New Fold-A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter. *PloS One*, 11(10), e0164426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164426>
  213. Lee, C. A., O'Connor, M. A., Ritchie, T. K., Galetin, A., Cook, J. A., Ragueneau-Majlessi, I., Ellens, H., Feng, B., Taub, M. E., Paine, M. F., Polli, J. W., Ware, J. A., i Zamek-Gliszczynski, M. J. (2015). Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: Practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 43(4), 490–509. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.062174>
  214. Lee, J.-Y., Kinch, L. N., Borek, D. M., Wang, J., Wang, J., Urbatsch, I. L., Xie, X.-S., Grishin, N. V., Cohen, J. C., Otwinowski, Z., Hobbs, H. H., i Rosenbaum, D. M. (2016). Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature*, 533(7604), 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature17666>
  215. Lee, S. S., Jeong, H.-E., Yi, J.-M., Jung, H.-J., Jang, J.-E., Kim, E.-Y., Lee, S.-J., i Shin, J.-G. (2007). Identification and functional assessment of BCRP polymorphisms in a Korean population. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(4), 623–632. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012302>
  216. Lefèvre, F., i Boutry, M. (2018). Towards Identification of the Substrates of ATP-Binding Cassette Transporters. *Plant Physiology*, 178(1), 18–39. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00325>
  217. Ley, J. P., Krammer, G., Reinders, G., Gatfield, I. L., i Bertram, H.-J. (2005). Evaluation of Bitter Masking Flavanones from Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H. i A.) Torr., Hydrophyllaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 6061–6066. <https://doi.org/10.1021/jf0505170>
  218. Li, H., Jin, H.-E., Kim, W., Han, Y.-H., Kim, D.-D., Chung, S.-J., i Shim, C.-K. (2008). Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. *Pharmaceutical Research*, 25(11), 2601–2612. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9678-0>
  219. Li, J., Cusatis, G., Brahmer, J., Sparreboom, A., Robey, R. W., Bates, S. E., Hidalgo, M., i Baker, S. D. (2007). Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biology i Therapy*, 6(3), 432–438. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.3.3763>
  220. Li, M., Wang, W., Soroka, C. J., Mennone, A., Harry, K., Weinman, E. J., i Boyer, J. L. (2010). NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function.



- The Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19299–19307.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096081>
221. Li, Y.-Q., Murakami, M., Huang, Y.-H., Hung, T.-H., Wang, S.-P., Wu, Y.-S., Ambudkar, S. V., i Wu, C.-P. (2022). Hydroxygenkwanin Improves the Efficacy of Cytotoxic Drugs in ABCG2-Overexpressing Multidrug-Resistant Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12763.  
<https://doi.org/10.3390/ijms232112763>
  222. Liao, R., Sun, J., Zhang, L., Lou, G., Chen, M., Zhou, D., Chen, Z., i Zhang, S. (2008). MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(3), 805–817. <https://doi.org/10.1002/jcb.21668>
  223. Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H., i Bates, S. E. (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 11), 2011–2021.
  224. Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K.-M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P. R., Horn, T., Skovsgaard, T., i Bates, S. E. (2002). Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1565(1), 6–16. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00492-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00492-3)
  225. Liu, W., Baer, M. R., Bowman, M. J., Pera, P., Zheng, X., Morgan, J., Pandey, R. A., i Oseroff, A. R. (2007). The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate enhances the efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(8), 2463–2470.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1599>
  226. Liu, Y., Yang, Y., Qi, J., Peng, H., i Zhang, J.-T. (2008). Effect of cysteine mutagenesis on the function and disulfide bond formation of human ABCG2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 33–40.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.138115>
  227. Loidolt-Krueger, M. (2023). New Confocal Microscope for Quantitative Fluorescence Lifetime Imaging with Improved Reproducibility. *Microscopy Today*, 31(1), 24–31.  
<https://doi.org/10.1093/mictod/qaac006>
  228. Macalou, S., Robey, R. W., Jabor Gozzi, G., Shukla, S., Grosjean, I., Hegedus, T., Ambudkar, S. V., Bates, S. E., i Di Pietro, A. (2016). The linker region of breast cancer resistance protein ABCG2 is critical for coupling of ATP-dependent drug transport. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(9), 1927–1937.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2118-5>
  229. 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., i Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*, 61(8), 3458–3464.
  230. Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., Floot, B. G., i Schellens, J. H. (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research*, 59(18), 4559–4563.
  231. Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., Tohgo, A., Hausheer, F. H., van Waardenburg, R. C., de Jong, L. A., Pluim, D., Beijnen, J. H., i Schellens, J. H. (2001). Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(4), 935–941.
  232. Mallini, P., Chen, M., Mahkamova, K., Lennard, T. W. J., Pan, Y., Wei, D., Stemke-Hale, K., Kirby, J. A., Lash, G. E., i Meeson, A. (2023). Hypoxia-Driven TGF $\beta$  Modulation of Side Population Cells in Breast Cancer: The Potential Role of ER $\alpha$ . *Cancers*, 15(4), 1108. <https://doi.org/10.3390/cancers15041108>

233. Mannam, V., Yuan, X., i Howard, S. (2022). Deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XXII*, 11965, 38–43. <https://doi.org/10.1117/12.2608910>
234. Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H., i Locher, K. P. (2018). Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*, 563(7731), 426–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0680-3>
235. Manzoor, M. F., Ahmad, N., Manzoor, A., i Kalsoom, A. (2017). Food based phytochemical luteolin their derivatives, sources and medicinal benefits. *Int. J. Agr. Life. Sci*, 3(2), 195–207. <https://doi.org/10.22573/spg.ijals.017.s12200084>
236. Marchetti, S., de Vries, N. A., Buckle, T., Bolijn, M. J., van Eijndhoven, M. A. J., Beijnen, J. H., Mazzanti, R., van Tellingen, O., i Schellens, J. H. M. (2008). Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1-/-/Mdr1a/1b-/- (triple-knockout) and wild-type mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2280–2287. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2250>
237. Marchetti, S., Oostendorp, R. L., Pluim, D., van Eijndhoven, M., van Tellingen, O., Schinkel, A. H., Versace, R., Beijnen, J. H., Mazzanti, R., i Schellens, J. H. (2007). In vitro transport of gimatecan (7-t-butoxyiminomethylcamptothecin) by breast cancer resistance protein, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein 2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12 Pt 1), 3307–3313. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0461>
238. Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D., i Garry, D. J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Developmental Biology*, 265(1), 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.09.028>
239. Mastrangelopoulou, M., Grigalavicius, M., Raabe, T. H., Skarpen, E., Juzenas, P., Peng, Q., Berg, K., i Theodossiou, T. A. (2022). Predictive biomarkers for 5-ALA-PDT can lead to personalized treatments and overcome tumor-specific resistances. *Cancer Reports*, 5(12), e1278. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1278>
240. Masuda, M., Toriumi, C., Santa, T., i Imai, K. (2004). Fluorogenic derivatization reagents suitable for isolation and identification of cysteine-containing proteins utilizing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(3), 728–735. <https://doi.org/10.1021/ac034840i>
241. Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., Takada, Y., Oikawa, Y., Inoue, H., Suzuki, K., Okada, R., Nishiyama, J., Domoto, H., Watanabe, S., Fujita, M., ... Shinomiya, N. (2009). Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: A function-based genetic analysis in a Japanese population. *Science Translational Medicine*, 1(5), 5ra11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000237>
242. Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H., i Sugiyama, Y. (2005). Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1059–1067. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085589>
243. Matteini, P., Agati, G., Pinelli, P., i Goti, A. (2011). Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 142(9), 885. <https://doi.org/10.1007/s00706-011-0545-z>
244. McDevitt, C. A., Collins, R. F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I. D., Ford, R. C., i Callaghan, R. (2006). Purification and 3D Structural Analysis of Oligomeric Human Multidrug Transporter ABCG2. *Structure*, 14(11), 1623–1632. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.08.014>

245. McDevitt, C. A., Crowley, E., Hobbs, G., Starr, K. J., Kerr, I. D., i Callaghan, R. (2008). Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *The FEBS Journal*, 275(17), 4354–4362. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06578.x>
246. Meeson, A. P., Hawke, T. J., Graham, S., Jiang, N., Elterman, J., Hutcheson, K., Dimaio, J. M., Gallardo, T. D., i Garry, D. J. (2004). Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 22(7), 1305–1320. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0077>
247. Merino, G., Alvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H., i Prieto, J. G. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(4), 690–695. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008219>
248. Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Pulido, M. M., Molina, A. J., Alvarez, A. I., i Schinkel, A. H. (2005a). Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(5), 614–618. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003319>
249. Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A. E., i Schinkel, A. H. (2005b). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1758–1764. <https://doi.org/10.1124/mol.104.010439>
250. Milane, A., Vautier, S., Chacun, H., Meininger, V., Bensimon, G., Farinotti, R., i Fernandez, C. (2009). Interactions between riluzole and ABCG2/BCRP transporter. *Neuroscience Letters*, 452(1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.12.061>
251. Minderman, H., Brooks, T. A., O'Loughlin, K. L., Ojima, I., Bernacki, R. J., i Baer, M. R. (2004). Broad-spectrum modulation of ATP-binding cassette transport proteins by the taxane derivatives ortataxel (IDN-5109, BAY 59-8862) and tRA96023. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(5), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0745-2>
252. Mitomo, H., Kato, R., Ito, A., Kasamatsu, S., Ikegami, Y., Kii, I., Kudo, A., Kobatake, E., Sumino, Y., i Ishikawa, T. (2003). A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: Critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *The Biochemical Journal*, 373(Pt 3), 767–774. <https://doi.org/10.1042/BJ20030150>
253. Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., i Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research*, 59(1), 8–13.
254. Miyata, H., Takada, T., Toyoda, Y., Matsuo, H., Ichida, K., i Suzuki, H. (2016). Identification of Febuxostat as a New Strong ABCG2 Inhibitor: Potential Applications and Risks in Clinical Situations. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 518. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00518>
255. Mizuarai, S., Aozasa, N., i Kotani, H. (2004). Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *International Journal of Cancer*, 109(2), 238–246. <https://doi.org/10.1002/ijc.11669>
256. Mizuno, N., Suzuki, M., Kusuhara, H., Suzuki, H., Takeuchi, K., Niwa, T., Jonker, J. W., i Sugiyama, Y. (2004). Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 32(9), 898–901.
257. Mizuno, N., Takahashi, T., Kusuhara, H., Schuetz, J. D., Niwa, T., i Sugiyama, Y. (2007). Evaluation of the role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the urinary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-

- pyrazolin-5-one). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(11), 2045–2052. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.016352>
258. Mo, W., Qi, J., i Zhang, J.-T. (2012). Different roles of TM5, TM6, and ECL3 in the oligomerization and function of human ABCG2. *Biochemistry*, 51(17), 3634–3641. <https://doi.org/10.1021/bi300301a>
259. Mo, W., i Zhang, J.-T. (2011). Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(1), 1–27.
260. Momper, J. D., Tsunoda, S. M., i Ma, J. D. (2016). Evaluation of Proposed In Vivo Probe Substrates and Inhibitors for Phenotyping Transporter Activity in Humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 56 Suppl 7, S82-98. <https://doi.org/10.1002/jcph.736>
261. Moore, J. M., Bell, E. L., Hughes, R. O., i Garfield, A. S. (2023). ABC transporters: Human disease and pharmacotherapeutic potential. *Trends in Molecular Medicine*, 29(2), 152–172. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.11.001>
262. Morisaki, K., Robey, R. W., Ozvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K., Sarkadi, B., i Bates, S. E. (2005). Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 56(2), 161–172. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0931-x>
263. Mouthon, M. A., Fouchet, P., Mathieu, C., Sii-Felice, K., Etienne, O., Lages, C. S., i Boussin, F. D. (2006). Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the „side population”. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 807–817. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04118.x>
264. Móznér, O., Bartos, Z., Zámbo, B., Homolya, L., Hegedűs, T., i Sarkadi, B. (2019). Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism. *Cells*, 8(10), 1215. <https://doi.org/10.3390/cells8101215>
265. Myllynen, P., Kumm, M., Kangas, T., Ilves, M., Immonen, E., Rysä, J., Pirilä, R., Lastumäki, A., i Vähäkangas, K. H. (2008). ABCG2/BCRP decreases the transfer of a food-born chemical carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in perfused term human placenta. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.07.006>
266. Myung, D.-B., Han, H.-S., Shin, J.-S., Park, J. Y., Hwang, H. J., Kim, H. J., Ahn, H. S., Lee, S. H., i Lee, K.-T. (2019). Hydrangenol Isolated from the Leaves of *Hydrangea serrata* Attenuates Wrinkle Formation and Repairs Skin Moisture in UVB-Irradiated Hairless Mice. *Nutrients*, 11(10), 2354. <https://doi.org/10.3390/nu11102354>
267. Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Komada, M., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K., i Ishikawa, T. (2008). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *The Biochemical Journal*, 411(3), 623–631. <https://doi.org/10.1042/BJ20071229>
268. Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiba, S., i Ishikawa, T. (2009). Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *The FEBS Journal*, 276(24), 7237–7252. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07423.x>
269. Nakagawa, R., Hara, Y., Arakawa, H., Nishimura, S., i Komatani, H. (2002). ABCG2 confers resistance to indolocarbazole compounds by ATP-dependent transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(4), 669–675. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02712-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02712-2)
270. Nakamura, Y., Oka, M., Soda, H., Shiozawa, K., Yoshikawa, M., Itoh, A., Ikegami, Y., Tsurutani, J., Nakatomi, K., Kitazaki, T., Doi, S., Yoshida, H., i Kohno, S. (2005). Gefitinib („Iressa”, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance. *Cancer Research*, 65(4), 1541–1546. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2417>
271. Nakanishi, T., Bailey-Dell, K. J., Hassel, B. A., Shiozawa, K., Sullivan, D. M., Turner, J., i Ross, D. D. (2006). Novel 5' untranslated region variants of BCRP mRNA are differentially expressed in drug-selected cancer cells and in normal human tissues: Implications for drug resistance, tissue-specific expression, and alternative promoter

- usage. *Cancer Research*, 66(10), 5007–5011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4572>
272. Nakanishi, T., Chumsri, S., Khakpour, N., Brodie, A. H., Leyland-Jones, B., Hamburger, A. W., Ross, D. D., i Burger, A. M. (2010). Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *British Journal of Cancer*, 102(5), 815–826. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605553>
273. Nakanishi, T., Doyle, L. A., Hassel, B., Wei, Y., Bauer, K. S., Wu, S., Pumplin, D. W., Fang, H.-B., i Ross, D. D. (2003). Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Molecular Pharmacology*, 64(6), 1452–1462. <https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1452>
274. Nakanishi, T., Karp, J. E., Tan, M., Doyle, L. A., Peters, T., Yang, W., Wei, D., i Ross, D. D. (2003). Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(9), 3320–3328.
275. Nakanishi, T., Shiozawa, K., Hassel, B. A., i Ross, D. D. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood*, 108(2), 678–684. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4020>
276. Nakatomi, K., Yoshikawa, M., Oka, M., Ikegami, Y., Hayasaka, S., Sano, K., Shiozawa, K., Kawabata, S., Soda, H., Ishikawa, T., Tanabe, S., i Kohno, S. (2001). Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(4), 827–832. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5850>
277. Nakauchi, H. (2004). Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells. *Cornea*, 23(8 Suppl), S2-7. <https://doi.org/10.1097/01.icc.0000136664.18129.4f>
278. Natarajan, K., Bhullar, J., Shukla, S., Burcu, M., Chen, Z.-S., Ambudkar, S. V., i Baer, M. R. (2013). The Pim kinase inhibitor SGI-1776 decreases cell surface expression of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug transport by Pim-1-dependent and -independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 85(4), 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.006>
279. Nguyen, T. G., Honson, N. S., Arns, S., Davis, T. L., Dhe-Paganon, S., Kovacic, S., Kumar, N. S., Pfeifer, T. A., i Young, R. N. (2014). Development of Fluorescent Substrates and Assays for the Key Autophagy-Related Cysteine Protease Enzyme, ATG4B. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(3), 176–189. <https://doi.org/10.1089/adt.2013.561>
280. Ni, W., Fan, H., Zheng, X., Xu, F., Wu, Y., Li, X., Wang, A., Huang, S., Chen, W., Wang, S., i Lu, Y. (2021). Cryptotanshinone Inhibits ER $\alpha$ -Dependent and -Independent BCRP Oligomer Formation to Reverse Multidrug Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.624811>
281. Ni, W., Ji, J., Dai, Z., Papp, A., Johnson, A. J., Ahn, S., Farley, K. L., Lin, T. S., Dalton, J. T., Li, X., Jarjoura, D., Byrd, J. C., Sadee, W., Grever, M. R., i Phelps, M. A. (2010). Flavopiridol pharmacogenetics: Clinical and functional evidence for the role of SLCO1B1/OATP1B1 in flavopiridol disposition. *PloS One*, 5(11), e13792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013792>
282. Ni, Z., Mark, M. E., Cai, X., i Mao, Q. (2010). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in intact cells. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), 1–11.
283. Noguchi, K., Kawahara, H., Kaji, A., Katayama, K., Mitsuhashi, J., i Sugimoto, Y. (2009). Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Science*, 100(9), 1701–1707. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01213.x>

284. Ogikubo, S., Nakabayashi, T., Adachi, T., Islam, M. S., Yoshizawa, T., Kinjo, M., i Ohta, N. (2011). Intracellular pH sensing using autofluorescence lifetime microscopy. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 115(34), 10385–10390. <https://doi.org/10.1021/jp2058904>
285. Oh, E. S., Kim, C. O., Cho, S. K., Park, M. S., i Chung, J.-Y. (2013). Impact of ABCC2, ABCG2 and SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics of pitavastatin in humans. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(3), 196–202.
286. Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., i Uchiyama, S. (2012). Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications*, 3, 705. <https://doi.org/10.1038/ncomms1714>
287. Orbán, T. I., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Elkind, N. B., Sarkadi, B., i Homolya, L. (2008). Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(3), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.172>
288. Orlando, B. J., i Liao, M. (2020). ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. *Nature Communications*, 11(1), 2264. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16155-2>
289. Osa-Andrews, B., Tan, K. W., Sampson, A., i Iram, S. H. (2018). Development of Novel Intramolecular FRET-Based ABC Transporter Biosensors to Identify New Substrates and Modulators. *Pharmaceutics*, 10(4), 186. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040186>
290. Otero, J. A., Miguel, V., González-Lobato, L., García-Villalba, R., Espín, J. C., Prieto, J. G., Merino, G., i Álvarez, A. I. (2016). Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 10(2), 238–247. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002141>
291. Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., i Sarkadi, B. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(1), 111–117. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5130>
292. Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Várady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J. D., Váradi, A., Kéri, G., Orfi, L., Németh, K., i Sarkadi, B. (2004). High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Molecular Pharmacology*, 65(6), 1485–1495. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1485>
293. Özvegy-Laczka, C., Köblös, G., Sarkadi, B., i Váradi, A. (2005). Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: Major differences in transport capacity and substrate recognition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1668(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.11.005>
294. Ozvegy-Laczka, C., Laczkó, R., Hegedus, C., Litman, T., Várady, G., Goda, K., Hegedus, T., Dokholyan, N. V., Sorrentino, B. P., Váradi, A., i Sarkadi, B. (2008). Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26059–26070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803230200>
295. Özvegy-Laczka, C., Ungvári, O., i Bakos, É. (2023). Fluorescence-based methods for studying activity and drug-drug interactions of hepatic solute carrier and ATP binding cassette proteins involved in ADME-Tox. *Biochemical Pharmacology*, 209, 115448. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115448>
296. Özvegy-Laczka, C., Várady, G., Köblös, G., Ujhelly, O., Cervenak, J., Schuetz, J. D., Sorrentino, B. P., Koomen, G.-J., Váradi, A., Németh, K., i Sarkadi, B. (2005). Function-dependent Conformational Changes of the ABCG2 Multidrug Transporter Modify Its Interaction with a Monoclonal Antibody on the Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4219–4227. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411338200>

297. Pál, A., Méhn, D., Molnár, E., Gedey, S., Mészáros, P., Nagy, T., Glavinas, H., Janáky, T., von Richter, O., Báthori, G., Szente, L., i Krajcsi, P. (2007). Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: Improved in vitro model to study function of human ABCG2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(3), 1085–1094. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.119289>
298. Pan, G., Giri, N., i Elmquist, W. F. (2007). Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(7), 1165–1173. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.014274>
299. Panche, A. N., Diwan, A. D., i Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
300. Park, H., Kang, H., Ko, W., Lee, W., Jo, K., i Lee, H. S. (2015). FRET-based analysis of protein-nucleic acid interactions by genetically incorporating a fluorescent amino acid. *Amino Acids*, 47(4), 729–734. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1900-2>
301. Patting, M. (2008). Evaluation of Time-Resolved Fluorescence Data: Typical Methods and Problems. W U. Resch-Genger (Red.), *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I* (T. 5, s. 233–258). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/4243\\_2008\\_020](https://doi.org/10.1007/4243_2008_020)
302. Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J. W., i Schinkel, A. H. (2005). Human breast cancer resistance protein: Interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(1), 144–152. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.073916>
303. Pavlíková, L., Šereš, M., Breier, A., i Sulová, Z. (2022). The Roles of microRNAs in Cancer Multidrug Resistance. *Cancers*, 14(4), 1090. <https://doi.org/10.3390/cancers14041090>
304. Peña-Solórzano, D., Stark, S. A., König, B., Sierra, C. A., i Ochoa-Puentes, C. (2017). ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Medicinal Research Reviews*, 37(5), 987–1050. <https://doi.org/10.1002/med.21428>
305. Peng, H., Dong, Z., Qi, J., Yang, Y., Liu, Y., Li, Z., Xu, J., i Zhang, J.-T. (2009). A novel two mode-acting inhibitor of ABCG2-mediated multidrug transport and resistance in cancer chemotherapy. *PloS One*, 4(5), e5676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005676>
306. Peng, H., Qi, J., Dong, Z., i Zhang, J.-T. (2010). Dynamic vs static ABCG2 inhibitors to sensitize drug resistant cancer cells. *PloS One*, 5(12), e15276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015276>
307. Perez, M., Blazquez, A. G., Real, R., Mendoza, G., Prieto, J. G., Merino, G., i Alvarez, A. I. (2009). In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. *Chemico-Biological Interactions*, 180(1), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.009>
308. Pick, A., Müller, H., Mayer, R., Haenisch, B., Pajeva, I. K., Weigt, M., Bönisch, H., Müller, C. E., i Wiese, M. (2011). Structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorganic i Medicinal Chemistry*, 19(6), 2090–2102. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.043>
309. Piehler, A. P., Hellum, M., Wenzel, J. J., Kaminski, E., Haug, K. B. F., Kierulf, P., i Kaminski, W. E. (2008). The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. *BMC Genomics*, 9, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-165>
310. Pillai, M. K., Young, D. J., i Bin Hj Abdul Majid, H. M. (2018). Therapeutic Potential of *Alpinia officinarum*. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(14), 1220–1232. <https://doi.org/10.2174/1389557517666171002154123>
311. Plasschaert, S. L. A., van der Kolk, D. M., de Bont, E. S. J. M., Kamps, W. A., Morisaki, K., Bates, S. E., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Vellenga, E., i de Vries, E. G. E. (2003). The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(14), 5171–5177.

312. Poirier, A., Portmann, R., Cascais, A.-C., Bader, U., Walter, I., Ullah, M., i Funk, C. (2014). The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: Why, when, and how? *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 42(9), 1466–1477. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.058248>
313. Polgar, O., Robey, R. W., i Bates, S. E. (2008). ABCG2: Structure, function and role in drug response. *Expert Opinion on Drug Metabolism i Toxicology*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.1.1>
314. Poller, B., Iusuf, D., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2011). Differential impact of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) on axitinib brain accumulation and oral plasma pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(5), 729–735. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.037317>
315. Poller, B., Wagenaar, E., Tang, S. C., i Schinkel, A. H. (2011). Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier. *Molecular Pharmaceutics*, 8(2), 571–582. <https://doi.org/10.1021/mp1003898>
316. Pollex, E. K., Anger, G., Hutson, J., Koren, G., i Piquette-Miller, M. (2010). Breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated glyburide transport: Effect of the C421A/Q141K BCRP single-nucleotide polymorphism. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 38(5), 740–744. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.030791>
317. Pollex, E., Lubetsky, A., i Koren, G. (2008). The role of placental breast cancer resistance protein in the efflux of glyburide across the human placenta. *Placenta*, 29(8), 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.05.001>
318. Polli, J. W., Olson, K. L., Chism, J. P., John-Williams, L. S., Yeager, R. L., Woodard, S. M., Otto, V., Castellino, S., i Demby, V. E. (2009). An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-([2-(methylsulfonyl)ethyl]amino)methyl]-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(2), 439–442. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024646>
319. Poonkuzhali, B., Lamba, J., Strom, S., Sparreboom, A., Thummel, K., Watkins, P., i Schuetz, E. (2008). Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(4), 780–795. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.018366>
320. Pradhan, M., Bembinster, L. A., Baumgarten, S. C., i Frasor, J. (2010). Proinflammatory cytokines enhance estrogen-dependent expression of the multidrug transporter gene ABCG2 through estrogen receptor and NF{ $\kappa$ }B cooperativity at adjacent response elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31100–31106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155309>
321. Qadir, M., O'Loughlin, K. L., Fricke, S. M., Williamson, N. A., Greco, W. R., Minderman, H., i Baer, M. R. (2005). Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(6), 2320–2326. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1725>
322. Rabindran, S. K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K. I., Annable, T., i Greenberger, L. M. (1998). Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Research*, 58(24), 5850–5858.
323. Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W., i Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Research*, 60(1), 47–50.
324. Rajendra, R., Gounder, M. K., Saleem, A., Schellens, J. H. M., Ross, D. D., Bates, S. E., Sinko, P., i Rubin, E. H. (2003). Differential effects of the breast cancer resistance



- protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin. *Cancer Research*, 63(12), 3228–3233.
325. Rasouli, A., Yu, Q., Dehghani-Ghahnaviyeh, S., Wen, P.-C., Kowal, J., Locher, K. P., i Tajkhorshid, E. (2023). Differential dynamics and direct interaction of bound ligands with lipids in multidrug transporter ABCG2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(1), e2213437120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213437120>
  326. Ren, X., Bo, Y., Fan, J., Chen, M., Xu, D., Dong, Y., He, H., Ren, X., Qu, R., Jin, Y., Zhao, W., i Xu, C. (2016). Dalbergioidin Ameliorates Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis by Suppressing the TGF- $\beta$  Signal Pathway. *Mediators of Inflammation*, 2016, 5147571. <https://doi.org/10.1155/2016/5147571>
  327. Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., i Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 266–276. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>
  328. Ricci, J. W., Lovato, D., i Larson, R. S. (2015). ABCG2 Inhibitors: Will They Find Clinical Relevance? *Journal of Depression and Anxiety*, 04(05). <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000138>
  329. Robey, R. W., Fetsch, P. A., Polgar, O., Dean, M., i Bates, S. E. (2006). The livestock photosensitizer, phytylporphyrin (phylloerythrin), is a substrate of the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.04.003>
  330. Robey, R. W., Honjo, Y., Morisaki, K., Nadjem, T. A., Runge, S., Risbood, M., Poruchynsky, M. S., i Bates, S. E. (2003). Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *British Journal of Cancer*, 89(10), 1971–1978. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601370>
  331. Robey, R. W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J. T., Litman, T., i Bates, S. E. (2001). A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1512(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(01\)00308-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(01)00308-x)
  332. Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., i Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(7), 452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
  333. Robey, R. W., Steadman, K., Polgar, O., i Bates, S. E. (2005). ABCG2-mediated transport of photosensitizers: Potential impact on photodynamic therapy. *Cancer Biology i Therapy*, 4(2), 187–194.
  334. Robey, R. W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., i Bates, S. E. (2004). Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Research*, 64(4), 1242–1246.
  335. Robey, R. W., To, K. K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., i Bates, S. E. (2009). ABCG2: A perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.003>
  336. Robey, R. W., Zhan, Z., Piekarz, R. L., Kayastha, G. L., Fojo, T., i Bates, S. E. (2006). Increased MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from patients receiving depsipeptide (FR901228, FK228, NSC630176). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(5), 1547–1555. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1423>
  337. Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., i Doyle, L. A. (1999). Atypical multidrug resistance: Breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(5), 429–433. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.5.429>
  338. Rozanski, M., Studzian, M., i Pulaski, L. (2019). Direct Measurement of Kinetic Parameters of ABCG2-Dependent Transport of Natural Flavonoids Using a Fluorogenic Substrate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 371(2), 309–319. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.261347>

339. Rudin, C. M., Liu, W., Desai, A., Karrison, T., Jiang, X., Janisch, L., Das, S., Ramirez, J., Poonkuzhali, B., Schuetz, E., Fackenthal, D. L., Chen, P., Armstrong, D. K., Brahmer, J. R., Fleming, G. F., Vokes, E. E., Carducci, M. A., i Ratain, M. J. (2008). Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(7), 1119–1127. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1128>
340. Rybczynski, P., Smolarkiewicz-Wyczachowski, A., Piskorz, J., Bocian, S., Ziegler-Borowska, M., Kędziera, D., i Kaczmarek-Kędziera, A. (2021). Photochemical Properties and Stability of BODIPY Dyes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6735. <https://doi.org/10.3390/ijms22136735>
341. Sadowska-Bartosz, I., Grębowski, J., Kępką, E., Studzian, M., Bartosz, G., i Pułaski, Ł. (2016). ABCB1-overexpressing MDCK-II cells are hypersensitive to 3-bromopyruvic acid. *Life Sciences*, 162, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.012>
342. Saito, H., Hirano, H., Nakagawa, H., Fukami, T., Oosumi, K., Murakami, K., Kimura, H., Kouchi, T., Konomi, M., Tao, E., Tsujikawa, N., Tarui, S., Nagakura, M., Osumi, M., i Ishikawa, T. (2006). A new strategy of high-speed screening and quantitative structure-activity relationship analysis to evaluate human ATP-binding cassette transporter ABCG2-drug interactions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1114–1124. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.099036>
343. Sampson, K. E., Brinker, A., Pratt, J., Venkatraman, N., Xiao, Y., Blasberg, J., Steiner, T., Bourner, M., i Thompson, D. C. (2015). Zinc finger nuclease-mediated gene knockout results in loss of transport activity for P-glycoprotein, BCRP, and MRP2 in Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 43(2), 199–207. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.057216>
344. Sanz, M., Fernández de Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Cadahía, E., Hernández, M. T., Estrella, I., i Martínez, J. (2012). Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Analytica Chimica Acta*, 732, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.061>
345. Sarankó, H., Tordai, H., Telbisz, Á., Özvegy-Laczka, C., Erdős, G., Sarkadi, B., i Hegedűs, T. (2013). Effects of the gout-causing Q141K polymorphism and a CFTR  $\Delta F508$  mimicking mutation on the processing and stability of the ABCG2 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(1), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.054>
346. Satoh, H., Fuchikami, H., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Ohdo, S., i Sawada, Y. (2015). Inhibitory effects and structure-activity relationship of flavonoids with respect to human organic anion-transporting polypeptides, OATP2B. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 5(3), 33–40.
347. Schaefer, P. M., Kalinina, S., Rueck, A., von Arnim, C. A. F., i von Einem, B. (2019). NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 95(1), 34–46. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23597>
348. Schellens, J. H., Maliepaard, M., Scheper, R. J., Scheffer, G. L., Jonker, J. W., Smit, J. W., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2000). Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 922, 188–194. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb07037.x>
349. Schmitt, A., Hinkeldey, B., Wild, M., i Jung, G. (2009). Synthesis of the core compound of the BODIPY dye class: 4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *Journal of Fluorescence*, 19(4), 755–758. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0446-7>
350. Schrama, D., Reisfeld, R. A., i Becker, J. C. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2), 147–159. <https://doi.org/10.1038/nrd1957>
351. Schutte, M. E., Freidig, A. P., van de Sandt, J. J. M., Alink, G. M., Rietjens, I. M. C. M., i Groten, J. P. (2006). An in vitro and in silico study on the flavonoid-mediated modulation of the transport of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)

- through Caco-2 monolayers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(2), 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.08.005>
352. Sesink, A. L. A., Arts, I. C. W., de Boer, V. C. J., Breedveld, P., Schellens, J. H. M., Hollman, P. C. H., i Russel, F. G. M. (2005). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*, 67(6), 1999–2006. <https://doi.org/10.1124/mol.104.009753>
  353. Shafran, A., Ifergan, I., Bram, E., Jansen, G., Kathmann, I., Peters, G. J., Robey, R. W., Bates, S. E., i Assaraf, Y. G. (2005). ABCG2 harboring the Gly482 mutation confers high-level resistance to various hydrophilic antifolates. *Cancer Research*, 65(18), 8414–8422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4547>
  354. Shcherbo, D., Souslova, E. A., Goedhart, J., Chepurnykh, T. V., Gaintzeva, A., Shemiakina, I. I., Gadella, T. W., Lukyanov, S., i Chudakov, D. M. (2009). Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC Biotechnology*, 9, 24. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-24>
  355. Shen, Y., Yang, L., i Li, L. (2022). Cancer stem-like cells contribute to paclitaxel resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 15(4), 183–190.
  356. Shim, J.-H. (2021). Inhibitory Effects of Cycloheterophyllin on Melanin Synthesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2526. <https://doi.org/10.3390/molecules26092526>
  357. Shiozawa, K., Oka, M., Soda, H., Yoshikawa, M., Ikegami, Y., Tsurutani, J., Nakatomi, K., Nakamura, Y., Doi, S., Kitazaki, T., Mizuta, Y., Murase, K., Yoshida, H., Ross, D. D., i Kohno, S. (2004). Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *International Journal of Cancer*, 108(1), 146–151. <https://doi.org/10.1002/ijc.11528>
  358. Shukla, S., Robey, R. W., Bates, S. E., i Ambudkar, S. V. (2006). The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. *Biochemistry*, 45(29), 8940–8951. <https://doi.org/10.1021/bi060552f>
  359. Shukla, S., Skoumbourdis, A. P., Walsh, M. J., Hartz, A. M. S., Fung, K. L., Wu, C.-P., Gottesman, M. M., Bauer, B., Thomas, C. J., i Ambudkar, S. V. (2011). Synthesis and characterization of a BODIPY conjugate of the BCR-ABL kinase inhibitor Tassigna (nilotinib): Evidence for transport of Tassigna and its fluorescent derivative by ABC drug transporters. *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), 1292–1302. <https://doi.org/10.1021/mp2001022>
  360. Shukla, S., Wu, C.-P., Nandigama, K., i Ambudkar, S. V. (2007). The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12 Pt 1), 3279–3286. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0564>
  361. Singh, A., Wu, H., Zhang, P., Happel, C., Ma, J., i Biswal, S. (2010). Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), 2365–2376. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0108>
  362. Sjöstedt, N., Holvikari, K., Tammela, P., i Kidron, H. (2017). Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein and Multidrug Resistance Associated Protein 2 by Natural Compounds and Their Derivatives. *Molecular Pharmaceutics*, 14(1), 135–146. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00754>
  363. Skoglund, K., Boiso Moreno, S., Jönsson, J.-I., Vikingsson, S., Carlsson, B., i Gréen, H. (2014). Single-nucleotide polymorphisms of ABCG2 increase the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in the K562 chronic myeloid leukemia cell line. *Pharmacogenetics and Genomics*, 24(1), 52–61. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000022>
  364. Sobek, K. M., Cummings, J. L., Bacich, D. J., i O’Keefe, D. S. (2017). Contrasting roles of the ABCG2 Q141K variant in prostate cancer. *Experimental Cell Research*, 354(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.020>

365. Solnier, J., Chang, C., i Pizzorno, J. (2023). Consideration for Flavonoid-Containing Dietary Supplements to Tackle Deficiency and Optimize Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8663. <https://doi.org/10.3390/ijms24108663>
366. Somermeyer, L., Fleiss, A., Mishin, A. S., Bozhanova, N. G., Igolkina, A. A., Meiler, J., Alaball Pujol, M.-E., Putintseva, E. V., Sarkisyan, K. S., i Kondrashov, F. A. (2022). Heterogeneity of the GFP fitness landscape and data-driven protein design. *ELife*, 11, e75842. <https://doi.org/10.7554/eLife.75842>
367. Sparreboom, A., Gelderblom, H., Marsh, S., Ahluwalia, R., Obach, R., Principe, P., Twelves, C., Verweij, J., i McLeod, H. L. (2004). Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 76(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.03.003>
368. Staud, F., Vackova, Z., Pospechova, K., Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., Cygalova, L., Nachtigal, P., i Fendrich, Z. (2006). Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 53–62. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105023>
369. Stein, U., Lage, H., Jordan, A., Walther, W., Bates, S. E., Litman, T., Hohenberger, P., i Dietel, M. (2002). Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-Glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *International Journal of Cancer*, 97(6), 751–760. <https://doi.org/10.1002/ijc.10131>
370. Stewart, C. F., Leggas, M., Schuetz, J. D., Panetta, J. C., Cheshire, P. J., Peterson, J., Daw, N., Jenkins, J. J., Gilbertson, R., Germain, G. S., Harwood, F. C., i Houghton, P. J. (2004). Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Research*, 64(20), 7491–7499. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0096>
371. Stiburkova, B., Pavelcova, K., Zavada, J., Petru, L., Simek, P., Cepek, P., Pavlikova, M., Matsuo, H., Merriman, T. R., i Pavelka, K. (2017). Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (Oxford, England)*, 56(11), 1982–1992. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex295>
372. Stockmann, H., Todorovic, V., Richardson, P. L., Marin, V., Scott, V., Gerstein, C., Lake, M., Wang, L., Sadhukhan, R., i Vasudevan, A. (2017). Cell-Surface Receptor–Ligand Interaction Analysis with Homogeneous Time-Resolved FRET and Metabolic Glycan Engineering: Application to Transmembrane and GPI-Anchored Receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 139(46), 16822–16829. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09359>
373. Storch, C. H., Eehalt, R., Haefeli, W. E., i Weiss, J. (2007). Localization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Lipid Rafts/Caveolae and Modulation of Its Activity by Cholesterol in Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 257–264. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.122994>
374. Stringari, C., Wang, H., Geyfman, M., Crosignani, V., Kumar, V., Takahashi, J. S., Andersen, B., i Gratton, E. (2015). In vivo single-cell detection of metabolic oscillations in stem cells. *Cell Reports*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.007>
375. Studzian, M., Bartosz, G., i Pułaski, L. (2015). Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: Trafficking mechanisms and intracellular fate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(8), 1759–1771. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.011>
376. Studzian, M., i Pułaski, L. (2018). *Method of studying abcg2 protein activity and use of 2-aminoethyl diphenylborinate* (European Union Patent Nr EP3117212B1). <https://patents.google.com/patent/EP3117212B1/pt>
377. Studzian, M., Pułaski, Ł., Tomalia, D. A., i Klajnert-Maculewicz, B. (2019). Non-Traditional Intrinsic Luminescence (NTIL): Dynamic Quenching Demonstrates the Presence of Two Distinct Fluorophore Types Associated with NTIL Behavior in Pyrrolidone-Terminated PAMAM Dendrimers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(29), 18007–18016. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02725>

378. Subach, O. M., Malashkevich, V. N., Zencheck, W. D., Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Almo, S. C., i Verkhusha, V. V. (2010). Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins. *Chemistry i Biology*, 17(4), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.005>
379. Subauste, M. C., Von Herrath, M., Benard, V., Chamberlain, C. E., Chuang, T.-H., Chu, K., Bokoch, G. M., i Hahn, K. M. (2000). Rho Family Proteins Modulate Rapid Apoptosis Induced by Cytotoxic T Lymphocytes and Fas\*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9725–9733. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9725>
380. Sugiyama, T., Shuto, T., Suzuki, S., Sato, T., Koga, T., Suico, M. A., Kusahara, H., Sugiyama, Y., Cyr, D. M., i Kai, H. (2011). Posttranslational negative regulation of glycosylated and non-glycosylated BCRP expression by Derlin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(3), 853–858. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.074>
381. Suhling, K., Teijeiro-Gonzalez, Y., Steinmark, I. E., James, A. L., Economou, A. M., Yahioğlu, G., Marois, A. L., Hirvonen, L. M., Nedbal, J., Levitt, J. A., Chung, P.-H., Dreiss, C. A., Beavil, A. J., Beavil, R. L., Ortiz-Zapater, E., Lorenz, C. D., Parsons, M., Crnjar, A., Cornell, B., i Molteni, C. (2019). Fluorescence lifetime imaging for viscosity and diffusion measurements. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIX*, 10882, 115–123. <https://doi.org/10.1117/12.2508744>
382. Summer, R., Kotton, D. N., Sun, X., Ma, B., Fitzsimmons, K., i Fine, A. (2003). Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(1), L97-104. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00009.2003>
383. Sun, H., Yumiko, U.-T., Hideyuki, M., i Junya, N. (2022). Internalization of FITC-albumin in human adipose-derived stem cells: Involvement of clathrin and caveolin. *Pharmazie*, 5, 141–146. <https://doi.org/10.1691/ph.2022.2340>
384. Suvannasankha, A., Minderman, H., O’Loughlin, K. L., Nakanishi, T., Greco, W. R., Ross, D. D., i Baer, M. R. (2004). Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: Discordance between expression and function. *Leukemia*, 18(7), 1252–1257. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403395>
385. Suzuki, M., Suzuki, H., Sugimoto, Y., i Sugiyama, Y. (2003). ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22644–22649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212399200>
386. Szabelski, M., Ilijev, D., Sarkar, P., Luchowski, R., Gryczynski, Z., Kapusta, P., Erdmann, R., i Gryczynski, I. (2009). Collisional Quenching of Erythrosine B as a Potential Reference Dye for Impulse Response Function Evaluation. *Applied Spectroscopy*, 63(3), 363–368.
387. Szatmari, I., Vámosi, G., Brazda, P., Balint, B. L., Benko, S., Széles, L., Jeney, V., Ozvegy-Laczka, C., Szántó, A., Barta, E., Balla, J., Sarkadi, B., i Nagy, L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23812–23823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604890200>
388. Szilagyi, J. T., Gorczyca, L., Brinker, A., Buckley, B., Laskin, J. D., i Aleksunes, L. M. (2019). Placental BCRP/ABCG2 Transporter Prevents Fetal Exposure to the Estrogenic Mycotoxin Zearalenone. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 168(2), 394–404. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy303>
389. Szöllösi, D., Rose-Sperling, D., Hellmich, U. A., i Stockner, T. (2018). Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(4), 818–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.028>
390. Takada, T., Suzuki, H., Gotoh, Y., i Sugiyama, Y. (2005). Regulation of the Cell Surface Expression of Human Bcrp/Abcg2 by the Phosphorylation State of Akt in Polarized Cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(7), 905–909. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003228>

391. Takada, T., Yamamoto, T., Matsuo, H., Tan, J. K., Ooyama, K., Sakiyama, M., Miyata, H., Yamanashi, Y., Toyoda, Y., Higashino, T., Nakayama, A., Nakashima, A., Shinomiya, N., Ichida, K., Ooyama, H., Fujimori, S., i Suzuki, H. (2018). Identification of ABCG2 as an Exporter of Uremic Toxin Indoxyl Sulfate in Mice and as a Crucial Factor Influencing CKD Progression. *Scientific Reports*, 8(1), 11147. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29208-w>
392. Takahashi, T., Kokubo, R., i Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 60–64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01538.x>
393. Tamura, A., Onishi, Y., An, R., Koshihara, S., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Priebe, W., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K., i Ishikawa, T. (2007). In vitro evaluation of photosensitivity risk related to genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2 and inhibition by drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22(6), 428–440.
394. Tamura, A., Wakabayashi, K., Onishi, Y., Takeda, M., Ikegami, Y., Sawada, S., Tsuji, M., Matsuda, Y., i Ishikawa, T. (2007). Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Science*, 98(2), 231–239. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00371.x>
395. Tamura, A., Watanabe, M., Saito, H., Nakagawa, H., Kamachi, T., Okura, I., i Ishikawa, T. (2006). Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: Identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Molecular Pharmacology*, 70(1), 287–296. <https://doi.org/10.1124/mol.106.023556>
396. Tan, K. P., Wang, B., Yang, M., Boutros, P. C., Macaulay, J., Xu, H., Chuang, A. I., Kosuge, K., Yamamoto, M., Takahashi, S., Wu, A. M. L., Ross, D. D., Harper, P. A., i Ito, S. (2010). Aryl hydrocarbon receptor is a transcriptional activator of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Molecular Pharmacology*, 78(2), 175–185. <https://doi.org/10.1124/mol.110.065078>
397. Tanaka, A. R., Kano, F., Ueda, K., i Murata, M. (2008). The ABCA1 Q597R mutant undergoes trafficking from the ER upon ER stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(4), 1174–1178. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.018>
398. Tandia, M., Mhiri, A., Paule, B., Saffroy, R., Cailliez, V., Noé, G., Farinotti, R., i Bonhomme-Faivre, L. (2017). Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): Monocentric study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79(4), 759–766. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3268-y>
399. Tang, H., Huang, W., Yang, Q., Lin, Y., Chen, Y., i Shu, P. (2020). Jianpi Yangwei decoction promotes apoptosis and suppresses proliferation of 5-fluorouracil resistant gastric cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 337. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03135-8>
400. Tang, S. C., Lagas, J. S., Lankheet, N. A. G., Poller, B., Hillebrand, M. J., Rosing, H., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2012). Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *International Journal of Cancer*, 130(1), 223–233. <https://doi.org/10.1002/ijc.26000>
401. Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., i Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
402. Telbisz, Á., Hegedüs, C., Özvegy-Laczka, C., Goda, K., Várady, G., Takáts, Z., Szabó, E., Sorrentino, B. P., Váradi, A., i Sarkadi, B. (2012). Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European*

- Federation for Pharmaceutical Sciences*, 45(1–2), 101–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.021>
403. Telbisz, Á., Hegedüs, C., Váradi, A., Sarkadi, B., i Özvegy-Laczka, C. (2014). Regulation of the Function of the Human ABCG2 Multidrug Transporter by Cholesterol and Bile Acids: Effects of Mutations in Potential Substrate and Steroid Binding Sites. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(4), 575–585.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.113.055731>
404. Telbisz, A., Müller, M., Ozvegy-Laczka, C., Homolya, L., Szente, L., Váradi, A., i Sarkadi, B. (2007). Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1768(11), 2698–2713.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.026>
405. Telbisz, Á., Özvegy-Laczka, C., Hegedüs, T., Váradi, A., i Sarkadi, B. (2013). Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochemical Journal*, 450(2), 387–395.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20121485>
406. Tham, D. K. L., i Moukhles, H. (2017). Determining Cell-surface Expression and Endocytic Rate of Proteins in Primary Astrocyte Cultures Using Biotinylation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 125, 55974. <https://doi.org/10.3791/55974>
407. Thapa, R., Afzal, O., Alfawaz Altamimi, A. S., Goyal, A., Almalki, W. H., Alzarea, S. I., Kazmi, I., Jakhmola, V., Singh, S. K., Dua, K., Gilhotra, R., i Gupta, G. (2023). Galangin as an inflammatory response modulator: An updated overview and therapeutic potential. *Chemico-Biological Interactions*, 378, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110482>
408. Thottacherry, J. J., Sathe, M., Prabhakara, C., i Mayor, S. (2019). Spoilt for choice: Diverse endocytic pathways function at the cell surface. *Annual review of cell and developmental biology*, 35, 55–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062710>
409. Tiwari, A. K., Sodani, K., Dai, C.-L., Abuznait, A. H., Singh, S., Xiao, Z.-J., Patel, A., Talele, T. T., Fu, L., Kaddoumi, A., Gallo, J. M., i Chen, Z.-S. (2013). Nilotinib potentiates anticancer drug sensitivity in murine ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-multidrug resistance xenograft models. *Cancer Letters*, 328(2), 307–317.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.001>
410. Tiwari, A. K., Sodani, K., Wang, S.-R., Kuang, Y.-H., Ashby, C. R., Chen, X., i Chen, Z.-S. (2009). Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochemical Pharmacology*, 78(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.002>
411. To, K. K. W., Robey, R. W., Knutsen, T., Zhan, Z., Ried, T., i Bates, S. E. (2009). Escape from hsa-miR-519c enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(10), 2959–2968.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0292>
412. To, K. K. W., Robey, R., Zhan, Z., Bangiolo, L., i Bates, S. E. (2011). Upregulation of ABCG2 by romidepsin via the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Molecular Cancer Research: MCR*, 9(4), 516–527. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0270>
413. To, K. K. W., Zhan, Z., i Bates, S. E. (2006). Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8572–8585.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00650-06>
414. Toume, K., Nakazawa, T., Ohtsuki, T., Arai, M. A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., i Ishibashi, M. (2011). Cycloartane Triterpenes Isolated from Combretum quadrangulare in a Screening Program for Death-Receptor Expression Enhancing Activity. *Journal of Natural Products*, 74(2), 249–255. <https://doi.org/10.1021/np100784t>
415. Tournier, N., Valette, H., Peyronneau, M.-A., Saba, W., Goutal, S., Kuhnast, B., Dollé, F., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., i Bottlaender, M. (2011). Transport of selected PET radiotracers by human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2): An in vitro screening. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 52(3), 415–423. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.079608>

416. Toyoda, Y., Mančíková, A., Krylov, V., Morimoto, K., Pavelcová, K., Bohatá, J., Pavelka, K., Pavlíková, M., Suzuki, H., Matsuo, H., Takada, T., i Stiburkova, B. (2019). Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040363>
417. Tsuchiya, K., Hayashida, T., Hamada, A., Oka, S., i Gatanaga, H. (2016). Brief Report: High Peak Level of Plasma Raltegravir Concentration in Patients With ABCB1 and ABCG2 Genetic Variants. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 72(1), 11–14. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000893>
418. Tsuchiya, K., Hayashida, T., Hamada, A., Oki, S., Oka, S., i Gatanaga, H. (2017). High plasma concentrations of dolutegravir in patients with ABCG2 genetic variants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 27(11), 416–419. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000308>
419. Turner, J. G., Gump, J. L., Zhang, C., Cook, J. M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, M. J., Dalton, W. S., i Sullivan, D. M. (2006). ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 108(12), 3881–3889. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-009084>
420. Ueshima, S., Hira, D., Fujii, R., Kimura, Y., Tomitsuka, C., Yamane, T., Tabuchi, Y., Ozawa, T., Itoh, H., Horie, M., Terada, T., i Katsura, T. (2017). Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in Japanese patients with atrial fibrillation. *Pharmacogenetics and Genomics*, 27(9), 329–336. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000294>
421. Ullah, S., Amen, Y., i Shimizu, K. (2023). Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of *Juncus decipiens* (Buchenau) Nakai (common rush). *Natural Product Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2223749>
422. Urquhart, B. L., Ware, J. A., Tirona, R. G., Ho, R. H., Leake, B. F., Schwarz, U. I., Zaher, H., Palandra, J., Gregor, J. C., Dresser, G. K., i Kim, R. B. (2008). Breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug disposition: Intestinal expression, polymorphisms and sulfasalazine as an in vivo probe. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(5), 439–448. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282f974dc>
423. v. Kostanecki, St., Różycki, A., i Tambor, J. (1900). Synthese des Luteolins. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 33(3), 3410–3417. <https://doi.org/10.1002/cber.190003303121>
424. Van Hattum, A. H., Schlüper, H. M. M., Hausheer, F. H., Pinedo, H. M., i Boven, E. (2002). Novel camptothecin derivative BNP1350 in experimental human ovarian cancer: Determination of efficacy and possible mechanisms of resistance. *International Journal of Cancer*, 100(1), 22–29. <https://doi.org/10.1002/ijc.10434>
425. van Herwaarden, A. E., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Brinkhuis, R. F., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Research*, 63(19), 6447–6452.
426. van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, J. W., i Schinkel, A. H. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis*, 27(1), 123–130. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi176>
427. van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J. W., Rosing, H., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2007). Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Molecular and Cellular Biology*, 27(4), 1247–1253. <https://doi.org/10.1128/MCB.01621-06>
428. van Loevezijn, A., Allen, J. D., Schinkel, A. H., i Koomen, G. J. (2001). Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorganic i Medicinal Chemistry Letters*, 11(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(00\)00588-6](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(00)00588-6)
429. Vander Borght, S., Libbrecht, L., Katoonizadeh, A., van Pelt, J., Cassiman, D., Nevens, F., Van Lommel, A., Petersen, B. E., Fevery, J., Jansen, P. L., i Roskams, T. A.



- (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is expressed by progenitor cells/reactive ductules and hepatocytes and its expression pattern is influenced by disease etiology and species type: Possible functional consequences. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 54(9), 1051–1059. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6912.2006>
430. Vasiliou, V., Vasiliou, K., i Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281–290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
431. Venot, Q., Delaunay, J.-L., Fouassier, L., Delautier, D., Falguières, T., Housset, C., Maurice, M., i Ait-Slimane, T. (2016). A PDZ-Like Motif in the Biliary Transporter ABCB4 Interacts with the Scaffold Protein EBP50 and Regulates ABCB4 Cell Surface Expression. *PLoS One*, 11(1), e0146962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146962>
432. Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., i Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins—A unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.001>
433. Vethanayagam, R. R., Wang, H., Gupta, A., Zhang, Y., Lewis, F., Unadkat, J. D., i Mao, Q. (2005). Functional analysis of the human variants of breast cancer resistance protein: I206L, N590Y, and D620N. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(6), 697–705. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.003657>
434. Vishwas, S., Singh, S. K., Gulati, M., Awasthi, A., Khursheed, R., Corrie, L., Kumar, R., Collet, T., Loebenberg, R., Porwal, O., Gupta, S., Jha, N. K., Gupta, P. K., Devkota, H. P., Chellappan, D. K., Gupta, G., Adams, J., i Dua, K. (2022). Harnessing the therapeutic potential of fisetin and its nanoparticles: Journey so far and road ahead. *Chemico-Biological Interactions*, 356, 109869. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109869>
435. Volk, E. L., Farley, K. M., Wu, Y., Li, F., Robey, R. W., i Schneider, E. (2002). Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Research*, 62(17), 5035–5040.
436. Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshiba, S., Hoshijima, K., Komada, M., i Ishikawa, T. (2007). Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27841–27846. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700133200>
437. Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J., i Arias, I. M. (2005). Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15087–15092. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503702102>
438. Wakabayashi, Y., Lippincott-Schwartz, J., i Arias, I. M. (2004). Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: Constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 15(7), 3485–3496. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0737>
439. Wang, B., Ding, Y., Zhao, P., Li, W., Li, M., Zhu, J., i Ye, S. (2022). Systems pharmacology-based drug discovery and active mechanism of natural products for coronavirus pneumonia (COVID-19): An example using flavonoids. *Computers in Biology and Medicine*, 143, 105241. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105241>
440. Wang, F., Xue, X., Wei, J., An, Y., Yao, J., Cai, H., Wu, J., Dai, C., Qian, Z., Xu, Z., i Miao, Y. (2010). Hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations. *British Journal of Cancer*, 103(4), 567–574. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605724>
441. Wang, H., Lee, E.-W., Zhou, L., Leung, P. C. K., Ross, D. D., Unadkat, J. D., i Mao, Q. (2008). Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Molecular Pharmacology*, 73(3), 845–854. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041087>

442. Wang, S. W. J., Chen, Y., Joseph, T., i Hu, M. (2008). Variable isoflavone content of red clover products affects intestinal disposition of biochanin A, formononetin, genistein, and daidzein. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*, 14(3), 287–297. <https://doi.org/10.1089/acm.2007.0617>
443. Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S.-I., i Baba, M. (2003). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Molecular Pharmacology*, 63(1), 65–72. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.65>
444. Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.-S., Bannykh, S., Wilson, I. A., Riordan, J. R., i Balch, W. E. (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 65–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401035>
445. Wang, X., Nitanda, T., Shi, M., Okamoto, M., Furukawa, T., Sugimoto, Y., Akiyama, S., i Baba, M. (2004). Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochemical Pharmacology*, 68(7), 1363–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.052>
446. Wei, H., Davies, J. E., i Harper, M. T. (2020). 2-Aminoethoxydiphenylborate (2-APB) inhibits release of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles from platelets. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0244-9>
447. Weidner, L. D., Zoghbi, S. S., Lu, S., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Pike, V. W., Mulder, J., Gottesman, M. M., Innis, R. B., i Hall, M. D. (2015). The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), 384–393. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225482>
448. Weiss, J., Rose, J., Storch, C. H., Ketabi-Kiyanvash, N., Sauer, A., Haefeli, W. E., i Efferth, T. (2007). Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 238–245. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl474>
449. Wierdl, M., Wall, A., Morton, C. L., Sampath, J., Danks, M. K., Schuetz, J. D., i Potter, P. M. (2003). Carboxylesterase-mediated sensitization of human tumor cells to CPT-11 cannot override ABCG2-mediated drug resistance. *Molecular Pharmacology*, 64(2), 279–288. <https://doi.org/10.1124/mol.64.2.279>
450. Woehlecke, H., Osada, H., Herrmann, A., i Lage, H. (2003). Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *International Journal of Cancer*, 107(5), 721–728. <https://doi.org/10.1002/ijc.11444>
451. Wong, K., Briddon, S. J., Holliday, N. D., i Kerr, I. D. (2016). Plasma membrane dynamics and tetrameric organisation of ABCG2 transporters in mammalian cells revealed by single particle imaging techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.002>
452. Woodward, O. M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B., i Köttgen, M. (2009). Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10338–10342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901249106>
453. Woodward, O. M., Tukaye, D. N., Cui, J., Greenwell, P., Constantoulakis, L. M., Parker, B. S., Rao, A., Köttgen, M., Maloney, P. C., i Guggino, W. B. (2013). Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 5223–5228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214530110>
454. Xiang, Y., Liu, S., Yang, J., Wang, Z., Zhang, H., i Gui, C. (2020). Investigation of the interactions between flavonoids and human organic anion transporting polypeptide 1B1 using fluorescent substrate and 3D-QSAR analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5), 183210. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183210>

455. Xiao, H., Zheng, Y., Ma, L., Tian, L., i Sun, Q. (2021). Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 648407. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648407>
456. Xiao, Y., Davidson, R., Smith, A., Pereira, D., Zhao, S., Soglia, J., Gebhard, D., de Morais, S., i Duignan, D. B. (2006). A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCK II cell line. *Molecular Pharmaceutics*, 3(1), 45–54.
457. Xie, Y., Burcu, M., Linn, D. E., Qiu, Y., i Baer, M. R. (2010). Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Molecular Pharmacology*, 78(2), 310–318. <https://doi.org/10.1124/mol.109.061713>
458. Xie, Y., Xu, K., Linn, D. E., Yang, X., Guo, Z., Shimelis, H., Nakanishi, T., Ross, D. D., Chen, H., Fazli, L., Gleave, M. E., i Qiu, Y. (2008). The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3349–3356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707773200>
459. Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., i Zhang, J.-T. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19781–19789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310785200>
460. Xu, J., Peng, H., Chen, Q., Liu, Y., Dong, Z., i Zhang, J.-T. (2007). Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Research*, 67(9), 4373–4381. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3169>
461. Yamada, A., Maeda, K., Kamiyama, E., Sugiyama, D., Kondo, T., Shiroyanagi, Y., Nakazawa, H., Okano, T., Adachi, M., Schuetz, J. D., Adachi, Y., Hu, Z., Kusuhara, H., i Sugiyama, Y. (2007). Multiple human isoforms of drug transporters contribute to the hepatic and renal transport of olmesartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(12), 2166–2176. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017459>
462. Yamasaki, Y., Ieiri, I., Kusuhara, H., Sasaki, T., Kimura, M., Tabuchi, H., Ando, Y., Irie, S., Ware, J., Nakai, Y., Higuchi, S., i Sugiyama, Y. (2008). Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 84(1), 95–103. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100459>
463. Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y., i Sugimoto, Y. (2004). Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1119–1125.
464. Yang, C. H., Schneider, E., Kuo, M. L., Volk, E. L., Rocchi, E., i Chen, Y. C. (2000). BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 60(6), 831–837. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00396-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00396-8)
465. Yang, J. J., Milton, M. N., Yu, S., Liao, M., Liu, N., Wu, J.-T., Gan, L., Balani, S. K., Lee, F. W., Prakash, S., i Xia, C. Q. (2010). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein affect disposition of tandutinib, a tyrosine kinase inhibitor. *Drug Metabolism Letters*, 4(4), 201–212.
466. Yang, Y., Ji, N., Teng, Q.-X., Cai, C.-Y., Wang, J.-Q., Wu, Z.-X., Lei, Z.-N., Lusvardi, S., Ambudkar, S. V., i Chen, Z.-S. (2020). Sitravatinib, a Tyrosine Kinase Inhibitor, Inhibits the Transport Function of ABCG2 and Restores Sensitivity to Chemotherapy-Resistant Cancer Cells in vitro. *Frontiers in Oncology*, 10, 700. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00700>
467. Yang, Z., Zhu, W., Gao, S., Yin, T., Jiang, W., i Hu, M. (2012). Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: Reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 40(10), 1883–1893. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.043901>

468. Ye, Q., Liu, K., Shen, Q., Li, Q., Hao, J., Han, F., i Jiang, R.-W. (2019). Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00487>
469. Yin, W., Xiang, D., Wang, T., Zhang, Y., Pham, C. V., Zhou, S., Jiang, G., Hou, Y., Zhu, Y., Han, Y., Qiao, L., Tran, P. H.-L., i Duan, W. (2021). The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Scientific Reports*, 11(1), 10791. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89931-9>
470. Yoshioka, S., Katayama, K., Okawa, C., Takahashi, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., i Sugimoto, Y. (2007). The identification of two germ-line mutations in the human breast cancer resistance protein gene that result in the expression of a low/non-functional protein. *Pharmaceutical Research*, 24(6), 1108–1117. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9235-2>
471. Yousaf, M., i Ali, M. (2020). Modulation of ABCG2 surface expression by Rab5 and Rab21 to overcome multidrug resistance in cancer cells. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 50(8), 988–996. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1716107>
472. Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y. Y., Melos, K. I., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., McGuckian, C., Wade, E. A., Kato, J. I., Grassi, D., Wentworth, M., Burd, C. E., Arriaga, E. A., Ladiges, W. L., Tchkonja, T., ... Niedernhofer, L. J. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 36, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.015>
473. Yu, Q., Ni, D., Kowal, J., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Stahlberg, H., i Locher, K. P. (2021). Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism. *Nature Communications*, 12(1), 4376. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24651-2>
474. Yuan, J., Lv, H., Peng, B., Wang, C., Yu, Y., i He, Z. (2009). Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(6), 1103–1110. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0838-z>
475. Yuan, L., Lin, W., Zheng, K., i Zhu, S. (2013). FRET-Based Small-Molecule Fluorescent Probes: Rational Design and Bioimaging Applications. *Accounts of Chemical Research*, 46(7), 1462–1473. <https://doi.org/10.1021/ar300273v>
476. Zaher, H., Khan, A. A., Palandra, J., Brayman, T. G., Yu, L., i Ware, J. A. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Molecular Pharmaceutics*, 3(1), 55–61. <https://doi.org/10.1021/mp050113v>
477. Zal, T., i Gascoigne, N. R. J. (2004). Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells. *Biophysical Journal*, 86(6), 3923–3939. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.022087>
478. Zamber, C. P., Lamba, J. K., Yasuda, K., Farnum, J., Thummel, K., Schuetz, J. D., i Schuetz, E. G. (2003). Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics*, 13(1), 19–28.
479. Zábó, B., Bartos, Z., Móznér, O., Szabó, E., Várady, G., Poór, G., Pálkás, M., Andrikovics, H., Hegedűs, T., Homolya, L., i Sarkadi, B. (2018). Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25695-z>
480. Zábó, B., Móznér, O., Bartos, Z., Török, G., Várady, G., Telbisz, Á., Homolya, L., Orbán, T. I., i Sarkadi, B. (2020). Cellular expression and function of naturally occurring variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(2), 365–378. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03186-2>
481. Zamek-Gliszczyński, M. J., Hoffmaster, K. A., Humphreys, J. E., Tian, X., Nezasa, K.-I., i Brouwer, K. L. R. (2006). Differential involvement of Mrp2 (Abcc2) and Bcrp (Abcg2)

- in biliary excretion of 4-methylumbelliferyl glucuronide and sulfate in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 459–467.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.101840>
482. Zamek-Gliszczyński, M. J., Nezasa, K.-I., Tian, X., Kalvass, J. C., Patel, N. J., Raub, T. J., i Brouwer, K. L. R. (2006). The important role of Bcrp (Abcg2) in the biliary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in mice. *Molecular Pharmacology*, 70(6), 2127–2133.  
<https://doi.org/10.1124/mol.106.026955>
483. Zamek-Gliszczyński, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S.-W., Zhang, L., Zhang, Y., i International Transporter Consortium. (2018). Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology i Therapeutics*, 104(5), 890–899.  
<https://doi.org/10.1002/cpt.1112>
484. Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R. L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., Epstein-Barash, H., Kuchimanchi, S., Peng, C. G., Ruda, V. M., Del Conte-Zerial, P., Hengstler, J. G., Kalaidzidis, Y., Koteliansky, V., i Zerial, M. (2012). Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485(7399), 465–470.  
<https://doi.org/10.1038/nature11133>
485. Zhang, G., Dong, J., Lu, L., Liu, Y., Hu, D., Wu, Y., Zhao, A., i Xu, H. (2023). Acacetin exerts antitumor effects on gastric cancer by targeting EGFR. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1121643. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1121643>
486. Zhang, G.-N., Zhang, Y.-K., Wang, Y.-J., Gupta, P., Ashby, C. R., Alqahtani, S., Deng, T., Bates, S. E., Kaddoumi, A., Wurlpel, J. N. D., Lei, Y.-X., i Chen, Z.-S. (2018). Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor PD153035 reverses ABCG2-mediated multidrug resistance in non-small cell lung cancer: In vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 424, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.040>
487. Zhang, S., Yang, X., Coburn, R. A., i Morris, M. E. (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochemical Pharmacology*, 70(4), 627–639. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.017>
488. Zhang, S., Yang, X., i Morris, M. E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular Pharmacology*, 65(5), 1208–1216. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1208>
489. Zhang, S., Yang, X., i Morris, M. E. (2004). Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharmaceutical Research*, 21(7), 1263–1273. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000033015.84146.4c>
490. Zhang, X., Sun, N., Zheng, M., i Kim, K.-M. (2016). Clathrin-mediated endocytosis is responsible for the lysosomal degradation of dopamine D3 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(4), 245–251.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.104>
491. Zhang, Y., Gupta, A., Wang, H., Zhou, L., Vethanayagam, R. R., Unadkat, J. D., i Mao, Q. (2005). BCRP transports dipyrindamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical Research*, 22(12), 2023–2034. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-8384-4>
492. Zhang, Y., Wang, H., Unadkat, J. D., i Mao, Q. (2007). Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(12), 2154–2158.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.107.018044>
493. Zhao, W., Zheng, X.-D., Tang, P. Y.-Z., Li, H.-M., Liu, X., Zhong, J.-J., i Tang, Y.-J. (2023). Advances of antitumor drug discovery in traditional Chinese medicine and natural active products by using multi-active components combination. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21963>

494. Zheng, Y., Ma, L., i Sun, Q. (2021). Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.648407>
495. 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., i Sorrentino, B. P. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine*, 7(9), 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>
496. Zhu, W., Xu, H., Wang, S. W. J., i Hu, M. (2010). Breast cancer resistance protein (BCRP) and sulfotransferases contribute significantly to the disposition of genistein in mouse intestine. *The AAPS Journal*, 12(4), 525–536. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9209-x>

## Aneks

**Tabela 1.** Lista flawonoidów i ich pochodnych oferowana przez firmę TimTec jako biblioteka związków o nazwie FL-500 Flavonoid Derivatives. Flawonoidy które przyporządkowano na podstawie ich struktury do grupy związków potencjalnie ulegających fluorescencyjnej derywatywacji za pomocą DPBA zaznaczono na kolor zielony. Typ struktury opisano zgodnie z kryteriami przedstawionymi na rycinach 17, 19, 21. Flawonoidom nadano kolejne numery identyfikacyjne F. Związki pochodzenia naturalnego opisano nazwami zwyczajowymi. Nazwy związków, jako część charakterystyki substancji, udostępnione są przez firmę w języku angielskim i w tej formie zostały przedstawione poniżej.

L.p.	Numer katalogowy	Masa molowa [g/mol]	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Typ struktury	Numer identyfikacyjny
1	ST001473	242.70	(2Z)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one			
2	ST001551	283.30	N-[4-[(2E)-3-(2-fluorophenyl)prop-2-enyl]phenyl]acetamide			
3	ST001553	279.34	N-[4-[(2E)-3-(4-methylphenyl)prop-2-enyl]phenyl]acetamide			
4	ST002028	380.44	(2E)-1-(2H,3H,4H-benzo[b]1,4-dioxepan-7-yl)-3-(9-anthryl)prop-2-en-1-one			
5	ST002033	327.21	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(2-naphthyl)prop-2-en-1-one			
6	ST002037	421.36	(2E)-1-(3,4-dibutoxyphenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-one			
7	ST002041	311.59	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-one			
8	ST002042	337.20	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
9	ST002045	295.14	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(4-fluorophenyl)prop-2-en-1-one			
10	ST002046	291.18	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(4-methylphenyl)prop-2-en-1-one			
11	ST002047	307.18	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
12	ST002048	356.05	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-(4-bromophenyl)prop-2-en-1-one			
13	ST002049	327.21	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-naphthylprop-2-en-1-one			
14	ST002051	294.35	(2E)-1-(2H,3H,4H,5H-benzo[b]1,4-dioxocan-8-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one			
15	ST002052	276.31	(2E)-3-(4-fluorophenyl)-1-naphthylprop-2-en-1-one			
16	ST002053	292.76	(2E)-3-(4-chlorophenyl)-1-naphthylprop-2-en-1-one			
17	ST002054	337.22	(2E)-3-(4-bromophenyl)-1-naphthylprop-2-en-1-one			
18	ST002086	333.26	(2E)-3-(2,4-dichlorophenyl)-1-[4-(tert-butyl)phenyl]prop-2-en-1-one			
19	ST002088	298.81	(2E)-1-[4-(tert-butyl)phenyl]-3-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-one			
20	ST002104	313.31	(2E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(2-nitrophenyl)prop-2-en-1-one			
21	ST004140	282.36	2-[(4-ethoxyphenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
22	ST004177	310.42	2-[(4-butoxyphenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
23	ST004243	282.36	2-[(2-ethoxyphenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
24	ST005802	298.36	2-[(2,5-dimethoxyphenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
25	ST007406	382.41	4-((1Z)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl 4-fluorobenzenesulfonate			
26	ST007410	456.90	2-(4-ethoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl 4-chlorobenzenesulfonate			
27	ST008289	354.47	4,4-dimethyl-8-phenyl-2-thioxospiro[1,3-diazaperhydroine-6,4'-chromane]-13-ol			
28	ST008326	396.51	4,4-dimethyl-8-phenyl-2-thioxospiro[1,3-diazaperhydroine-6,4'-chromane]-13-yl acetate			
29	ST008330	349.17	6-chloro-2-(6-chloro(2H,4H-benzo[e]1,3-dioxin-8-yl))chromen-4-one			
30	ST008331	325.28	2-(2H,3H-benzo[e]1,4-dioxin-6-yl)-6-nitrochromen-4-one			
31	ST012202	417.37	2-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl 4-nitrobenzoate			
32	ST014809	372.38	N-[4-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl](3-nitrophenyl)carboxamide			
33	ST014848	364.23	3-(2,4-dichlorophenyl)-8-[(dimethylamino)methyl]-7-hydroxychromen-4-one			
34	ST019933	236.31	(2E)-3-(2,4-dimethylphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one			
35	ST019949	250.34	(2E)-1-phenyl-3-(2,4,6-trimethylphenyl)prop-2-en-1-one			

36	ST020081	278.31	2-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-ylmethylene)-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
37	ST020733	306.36	2-[(4-butoxyphenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
38	ST020736	278.31	2-[(4-ethoxyphenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
39	ST021133	335.40	7-hydroxy-3-phenyl-8-(piperidylmethyl)chromen-4-one			
40	ST021140	419.44	8-[[bis(methylethyl)amino]methyl]-7-hydroxy-3-phenyl-2-(trifluoromethyl)chromen-4-one			
41	ST023308	370.31	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxychromen-4-one, oxamethane, oxam ethane, oxamethane	isorhamnetin	1A	F1
42	ST023898	463.45	8-[(2,6-dimethylmorpholin-4-yl)methyl]-7-hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)-2-(trifluoromethyl)chromen-4-one			
43	ST024081	379.46	7-hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)-8-[(4-methylpiperidyl)methyl]chromen-4-one			
44	ST024364	264.28	2-[(2-methoxyphenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
45	ST024365	294.31	2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
46	ST024366	371.35	2-[[4-(2-nitrophenoxy)phenyl]methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
47	ST024367	280.28	2-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
48	ST024368	268.70	2-[(2-chlorophenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
49	ST024369	279.25	2-[(2-nitrophenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
50	ST024370	309.28	2-[(4-methoxy-3-nitrophenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
51	ST024698	816.77	4-(7-{6-[(3E)-4-(4-acetyloxyphenyl)-2-oxobut-3-enyl]-3,4,5-triacetyloxy(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)}(2R)-5-acetyloxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl acetate			
52	ST024699	454.39	7-acetyloxy-2-(3,4-diacetyloxyphenyl)-4-oxochromen-5-yl acetate			
53	ST024700	742.64	2-(3,4-diacetyloxyphenyl)-4-oxo-7-[3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-5-yl acetate			
54	ST024701	512.43	3,7-diacetyloxy-2-(3,4-diacetyloxyphenyl)-4-oxochromen-5-yl acetate			
55	ST024702	1030.90	4,5-diacetyloxy-2-[5,7-diacetyloxy-2-(3,4-diacetyloxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl oxy]-6-[(3,4,5-triacetyloxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))methyl]-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-3-yl acetate			
56	ST024703	286.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	luteolin	1C	F2
57	ST024704	448.38	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-4-one	cynaroside	1C	F3
58	ST024706	302.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	quercetin	1A	F4
59	ST024709	324.38	(2S)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenylchroman-4-one	glabranin	1D	F5
60	ST024710	610.53	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-{3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))methyl](2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)}chromen-4-one	rutin	1C	F6
61	ST024712	446.41	5-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-4-one	7-O-β-D-glucoside biochanin A	2C	F7
62	ST024713	268.27	7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
63	ST024731	656.60	{3,4,5-triacetyloxy-6-[5-acetyloxy-3-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-6-yloxy]-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)methyl acetate			
64	ST024734	458.42	5-(6-acetyloxy-3,5,7-trimethoxy-4-oxochromen-2-yl)-2-methoxyphenyl acetate			
65	ST024793	378.41	2-(2-methoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl thiophene-2-carboxylate			
66	ST024795	424.47	4-[(2E)-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)prop-2-enyl]phenyl thiophene-2-carboxylate			
67	ST026594	238.24	7-hydroxy-2-phenylchromen-4-one			
68	ST026808	474.47	4-[(1,3-dioxocyclopenta[3,4-a]benzen-2-ylidene)methyl]-2-methoxyphenyl 3,4,5-trimethoxybenzoate			
69	ST030560	286.24	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	kaempferol	1A	F8
70	ST031276	604.30	N-[3-((1E)-3-{3-[(4-bromophenyl)carbonylamino]phenyl}-3-oxoprop-1-enyl)phenyl] (4-bromophenyl)carboxamide			



71	ST031278	745.88	N-(3-{N-[4-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl]carbamoyl}-5-(2,2-diphenylacetyl)amino)phenyl)-2,2-diphenylacetamide			
72	ST031282	502.53	N-[4-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl][2-(2-methoxyphenyl)-1,3-dioxobenz o[c]azolin-5-yl]carboxamide			
73	ST031283	617.62	N-[4-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl][3,5-bis(1,3-dioxobenz o[c]azolidin -2-yl)phenyl]carboxamide			
74	ST031314	317.39	N-[3-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl](2E,4E)hexa-2,4-dienamide			
75	ST031315	317.39	N-[4-((1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl)phenyl](2E,4E)hexa-2,4-dienamide			
76	ST031318	269.37	(2E)-1-(3-aminophenyl)-3-(4-methylthiophenyl)prop-2-en-1-one			
77	ST031321	292.16	(2E)-1-(3-aminophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-one			
78	ST098835	286.24	7-hydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one	7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone	1F	F9
79	ST033522	482.44	(2S,3S)-2-[(2S,3S)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)(2H,3H-benzo [e]1,4-dioxin-6-yl)]-3,5,7-trihydroxychroman-4-one	silibinin A	1B	F10
80	ST035555	270.30	(2E)-1-(4-ethoxyphenyl)-3-(2-fluorophenyl)prop-2-en-1-one			
81	ST035556	260.69	(2E)-1-(4-chlorophenyl)-3-(2-fluorophenyl)prop-2-en-1-one			
82	ST035557	286.76	(2E)-1-(4-chlorophenyl)-3-(4-ethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
83	ST035691	318.80	(2E)-3-(3-chlorophenyl)-1-(4-phenylphenyl)prop-2-en-1-one			
84	ST097621	254.24	5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	4'-hydroxy-5-hydroxyizoflavone	2A	F11
85	ST038026	268.27	3-hydroxy-2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one	2'-methoxyflavonol	1A	F12
86	ST038325	298.30	2-(2,5-dimethoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one	2',5'-dimethoxyflavonol	1A	F13
87	ST041961	293.37	(2E)-3-(4-morpholin-4-ylphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one			
88	ST044457	384.39	ethyl 2-[2-(2,3-dimethoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yloxy]acetate			
89	ST045882	348.33	2-(4-fluoro-3-phenoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one		1C	F14
90	ST048880	283.71	3-[2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethylidene]-1H-benzo[d]azolidin-2-one			
91	ST049545	321.16	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(3,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-on e			
92	ST051039	371.39	2-{4-[(1E)-3-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-1-enyl]phenoxy}acetamide			
93	ST051246	253.26	(2E)-1-(4-nitrophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one			
94	ST055360	254.24	5-hydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1C	F15
95	ST055361	254.24	7-hydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
96	ST055362	304.30	3-(3,4-dihydroxyphenyl)benzo[f]chromen-1-one		1F	F16
97	ST055363	282.30	2-(2,3-dimethoxyphenyl)chromen-4-one			
98	ST055364	238.24	2-(2-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
99	ST055366	268.27	7-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
100	ST055367	268.27	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
101	ST055368	302.33	3-(4-methoxyphenyl)benzo[f]chromen-1-one			
102	ST055369	236.27	8-methyl-2-phenylchromen-4-one			
103	ST055624	302.28	(2S)-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one		1C	F17
104	ST055650	304.26	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one, hydrate	fisetin	1A	F18
105	ST055657	292.29	7-methoxy-8-phenylfurano[2,3-h]chromen-6-one			
106	ST055658	252.27	3-hydroxy-6-methyl-2-phenylchromen-4-one	6-methylflavonol	1A	F19
107	ST055810	407.81	4-[(2E)-3-(2-chlorophenyl)prop-2-enoyl]phenyl 4-nitrobenzoate			
108	ST055811	407.81	4-[(2E)-3-(3-chlorophenyl)prop-2-enoyl]phenyl 3-nitrobenzoate			
109	ST055817	501.35	2-(4-ethoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl 4-bromobenzenesulfonate			
110	ST055981	284.27	5,6-dihydroxy-7-methoxy-2-phenylchromen-4-one		1C	F20
111	ST055982	254.24	3-hydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1A	F21
112	ST055983	254.24	7-hydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
113	ST055984	282.30	6-methoxy-2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one			
114	ST055986	254.24	2-(2,4-dihydroxyphenyl)chromen-4-one			
115	ST055987	304.30	2-(3,4-dihydroxyphenyl)benzo[h]chromen-4-one	3',4'-benzoflavone	1F	F22
116	ST055988	282.30	3,6-dimethoxy-2-phenylchromen-4-one			
117	ST055989	282.30	6-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			

118	ST055991	254.24	3-hydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1A	F23
119	ST055992	298.30	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one	3',4'-dimethoxyflavonol	1A	F24
120	ST055993	268.27	3-hydroxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one	3'-methoxyflavonol	1A	F25
121	ST055994	268.27	6-hydroxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
122	ST055995	268.27	7-hydroxy-2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one			
123	ST055996	268.27	8-hydroxy-7-methoxy-2-phenylchromen-4-one			
124	ST055997	288.30	2-(4-hydroxyphenyl)benzo[h]chromen-4-one			
125	ST055998	288.30	3-(4-hydroxyphenyl)benzo[f]chromen-1-one			
126	ST055999	252.27	7-hydroxy-3-methyl-2-phenylchromen-4-one			
127	ST056000	288.30	2-(2-hydroxyphenyl)benzo[h]chromen-4-one			
128	ST056001	268.27	6-hydroxy-7-methoxy-2-phenylchromen-4-one			
129	ST056002	288.30	3-(2-hydroxyphenyl)benzo[f]chromen-1-one			
130	ST056003	252.27	2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one			
131	ST056004	268.27	2-(4-hydroxyphenyl)-5-methoxychromen-4-one			
132	ST056007	252.27	2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
133	ST056008	270.24	3,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	5-deoxykeampferol	1A	F26
134	ST056009	270.24	3,6-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	6,4'-dihydroxyflavonol	1A	F27
135	ST056010	270.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxychromen-4-one	5,3',4'-trihydroxyflavone	1C	F28
136	ST056012	270.24	7,8-dihydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1F	F29
137	ST056013	270.24	7,8-dihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1F	F30
138	ST056014	270.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one	3',4'-dihydroxyflavonol	1A	F31
139	ST056194	326.35	2-methyl-4-(4-methylphenyl)-3a-nitro-1H,9bH-chroman[4,3-d]1,2-oxazolidine			
140	ST056204	340.38	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one			
141	ST056228	268.27	6-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
142	ST056229	266.30	2-(4-methoxyphenyl)-6-methylchromen-4-one			
143	ST056246	328.32	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-7-methoxychromen-4-one		1A	F32
144	ST056247	328.32	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-6-methoxychromen-4-one	6,2',4'-trimethoxyflavonol	1A	F33
145	ST056248	298.30	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one	2',4'-dimethoxyflavonol	1A	F34
146	ST056249	328.32	2-(2,3-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-6-methoxychromen-4-one		1A	F35
147	ST056250	328.32	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-6-methoxychromen-4-one	6,3',4'-trimethoxyflavonol	1A	F36
148	ST056251	312.32	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-6-methylchromen-4-one		1A	F37
149	ST056252	282.30	3-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-6-methylchromen-4-one	4'-methoxy-6-methylflavonol	1A	F38
150	ST056253	312.32	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-6-methylchromen-4-one	3',4'-dimethoxy-6-methylflavonol	1A	F39
151	ST056254	312.32	5,6,7-trimethoxy-2-phenylchromen-4-one			
152	ST056255	252.27	7-hydroxy-5-methyl-2-phenylchromen-4-one			
153	ST056256	298.30	3-hydroxy-6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one	6,4'-dimethoxyflavonol	1A	F40
154	ST056258	270.24	7,8-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1F	F41
155	ST056259	270.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxychromen-4-one		1F	F42
156	ST056288	270.24	3,5,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one			
157	ST056298	450.40	7-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]-5,6-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one, hydrate		1C	F43
158	ST056301	270.24	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1C	F44
159	ST056352	270.24	5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	genistein	2A	F45
160	ST057152	270.24	5,6,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one	baicalein	1C	F46
161	ST057176	290.27	(3S,2R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol	catechin	1G	F47
162	ST057186	480.38	8-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one			
163	ST057233	286.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one	fisetin	1A	F48
164	ST057235	318.24	3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one	myricetin	1A	F49
165	ST057236	272.26	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	naringenin	1C	F50
166	ST057247	610.57	5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-{3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))methyl](2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)}chroman-4-one		1C	F51
167	ST057268	254.24	7,8-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one		1F	F52
168	ST057370	312.32	2-(2,3-dimethoxyphenyl)-6-methoxychromen-4-one			
169	ST057371	312.32	3,7-dimethoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
170	ST057372	312.32	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one			
171	ST057515	254.24	7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
172	ST057541	268.27	5-hydroxy-7-methoxy-2-phenylchromen-4-one		1C	F53

173	ST057580	284.27	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one		2A	F54
174	ST057630	302.33	1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one			
175	ST057634	314.34	2-(2,3-dimethoxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one			
176	ST057635	342.35	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,6-dimethoxychromen-4-one			
177	ST057636	342.35	2-(2,3-dimethoxyphenyl)-3,6-dimethoxychromen-4-one			
178	ST057637	342.35	7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromen-4-one			
179	ST057638	312.32	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxychromen-4-one			
180	ST057639	312.32	3,6-dimethoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
181	ST057640	256.26	6-hydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)chroman-4-one			
182	ST057641	270.28	2-(4-hydroxyphenyl)-3-methoxychroman-4-one			
183	ST057643	284.31	5,7-dimethoxy-2-phenylchroman-4-one			
184	ST057644	282.30	3-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
185	ST057645	282.30	3-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
186	ST057646	282.30	3,7-dimethoxy-2-phenylchromen-4-one			
187	ST057647	282.30	5-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
188	ST057648	282.30	7-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
189	ST057649	268.27	7-hydroxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one			
190	ST057656	272.26	(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F55
191	ST057709	286.24	2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,6-dihydroxychromen-4-one		1A	F56
192	ST057710	270.24	2-(2,3-dihydroxyphenyl)-6-hydroxychromen-4-one		1F	F57
193	ST057711	286.24	2-(2,3-dihydroxyphenyl)-3,6-dihydroxychromen-4-one		1A	F58
194	ST057729	254.24	6-hydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
195	ST057770	284.31	(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F59
196	ST058410	490.58	8-bromo-3-(4-bromophenyl)-6-chloro-4-phenylchromen-2-one			
197	ST058412	318.76	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-chlorochroman-4-one			
198	ST058414	314.34	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxychroman-4-one			
199	ST058433	270.71	2-(4-chlorophenyl)-6-methylchromen-4-one			
200	ST058434	314.34	7-hydroxy-3,4-diphenylchromen-2-one			
201	ST058442	250.30	6-methyl-2-(3-methylphenyl)chromen-4-one			
202	ST058451	312.32	3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one			
203	ST058458	240.26	2-(3-hydroxyphenyl)chroman-4-one			
204	ST058459	266.30	2-(4-methoxyphenyl)-8-methylchromen-4-one			
205	ST059080	240.26	2-(2-hydroxyphenyl)chroman-4-one			
206	ST059081	301.14	6-bromo-2-phenylchromen-4-one			
207	ST059082	238.24	5-hydroxy-2-phenylchromen-4-one	5-hydroxyflavone	1C	F60
208	ST059299	356.33	4-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolen-5-yl)-2-methyl-3a-nitro-1H,9bH-chromano[4,3-d]1,2-oxazolidine			
209	ST059300	346.77	4-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3a-nitro-1H,9bH-chromano[4,3-d]1,2-oxazolidine			
210	ST059590	238.24	2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
211	ST059616	254.24	6-hydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
212	ST059618	270.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-hydroxychromen-4-one		1A	F61
213	ST059619	286.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,6-dihydroxychromen-4-one		1F	F62
214	ST059620	286.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxychromen-4-one		1A	F63
215	ST059621	254.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)chromen-4-one		1F	F64
216	ST059622	318.24	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7,8-tetrahydroxychromen-4-one	gossypetin	1A	F65
217	ST059828	272.73	8-chloro-2-(4-methylphenyl)chroman-4-one			
218	ST059837	338.27	2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one, hydrate, hydrate	morin	1A	F66
219	ST059919	238.29	(2E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one			
220	ST059922	284.31	(2E)-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F67
221	ST059923	314.34	(2E)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
222	ST059924	314.34	(2E)-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F68
223	ST059925	270.24	3,7-dihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1A	F69
224	ST060160	238.24	2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one			
225	ST060286	472.41	7-acetyloxy-2-(3,4-diacetyloxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxochroman-3-yl acetate		1C	F70
226	ST060287	360.36	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethoxychroman-4-one		1A	F71
227	ST060837	266.30	7-ethoxy-4-phenylchromen-2-one			
228	ST065428	325.36	N-{4-[(2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]phenyl}acetamide			
229	ST066889	284.27	5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one	acacetin	1C	F72
230	ST066904	268.27	3-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one		1A	F73

231	ST066973	383.42	4-(3-fluorophenyl)-2-methyl(1,2,5-trihydropyrimidino[1,2-a]benzimidazol-3-yl) phenyl ketone			
232	ST069293	270.24	6,7-dihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1F	F74
233	ST069294	254.24	6,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one		1F	F75
234	ST069305	254.29	5-methoxy-2-phenylchromen-4-one			
235	ST069306	315.17	6-bromo-2-(3-methylphenyl)chromen-4-one			
236	ST069307	298.30	3-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one		1A	F76
237	ST069324	254.24	5,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one		1C	F77
238	ST069348	236.27	6-methyl-2-phenylchromen-4-one			
239	ST069360	252.27	5-methoxy-2-phenylchromen-4-one			
240	ST069833	326.78	2-[(6-chloro-2H,4H-benzo[e]1,3-dioxan-8-yl)methylene]-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
241	ST070122	254.29	2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
242	ST070123	264.32	2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
243	ST070174	416.50	(2E)-3-[3-(benzimidazol-2-ylthiomethyl)-4-methoxyphenyl]-1-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one			
244	ST070175	392.88	(2E)-3-[4-[(2-chlorophenyl)methoxy]-3-ethoxyphenyl]-1-phenylprop-2-en-1-one			
245	ST070176	378.85	(2E)-3-[3-[(4-chlorophenoxy)methyl]-4-methoxyphenyl]-1-phenylprop-2-en-1-one			
246	ST070177	389.41	(2E)-3-[4-methoxy-3-[(4-nitrophenoxy)methyl]phenyl]-1-phenylprop-2-en-1-one			
247	ST070178	401.46	N-(4-[[5-[(1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl]-2-methoxyphenyl]methoxy]phenyl)acetamide			
248	ST070181	473.78	2-[(4-methoxy-3-[(2,4,6-trichlorophenoxy)methyl]phenyl)methylene]-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
249	ST070182	343.21	(2E)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(1-hydroxy(2-naphthyl)prop-2-en-1-one			
250	ST070183	377.44	(2E)-1-(1-hydroxy(2-naphthyl))-3-(9-methylcarbazol-3-yl)prop-2-en-1-one		3F	F78
251	ST070194	450.96	(2E)-3-[3-[(4-chloro-5-methyl-2-(methylethyl)phenoxy)methyl]-4-methoxyphenyl]-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F79
252	ST070203	442.55	(2E)-3-[3-[(2-cyclohexylphenoxy)methyl]-4-methoxyphenyl]-1-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one			
253	ST070204	402.49	(2E)-3-[3-[(2,3-dimethylphenoxy)methyl]-4-methoxyphenyl]-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
254	ST070239	429.47	2-[(4-methoxy-3-[(3-methyl-4-nitrophenoxy)methyl]phenyl)methylene]-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
255	ST070242	399.45	(2E)-3-[3-(benzotriazolylmethyl)-4-methoxyphenyl]-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
256	ST070252	455.35	(2E)-3-[3-[(4-bromo-3,5-dimethylpyrazolyl)methyl]-4-methoxyphenyl]-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
257	ST070262	402.45	(2E)-1-(2H,3H-benzo[3,4-e]1,4-dioxin-6-yl)-3-[4-methoxy-3-(phenoxy)methyl]phenylprop-2-en-1-one			
258	ST070287	343.21	(2E)-3-(2,6-dichlorophenyl)-1-(1-hydroxy(2-naphthyl)prop-2-en-1-one		3F	F80
259	ST070634	432.38	3-[4-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]phenyl]-5,7-dihydroxychromen-4-one		2A	F81
260	ST070865	282.30	3-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-7-methylchromen-4-one	4'-methoxy-7-methylflavonol	1A	F82
261	ST070866	270.26	2-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-7-methylchromen-4-one		1A	F83
262	ST070867	358.39	3-hydroxy-7-methyl-2-[4-(phenylmethoxy)phenyl]chromen-4-one		1A	F84
263	ST070868	308.38	2-[4-(tert-butyl)phenyl]-3-hydroxy-7-methylchromen-4-one		1A	F85
264	ST070869	296.32	2-(4-ethoxyphenyl)-3-hydroxy-7-methylchromen-4-one	4'-ethoxy-7-methylflavonol	1A	F86
265	ST070967	240.23	2-(4-fluorophenyl)chromen-4-one			
266	ST072162	580.54	(2S)-7-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3-[(2S,6S,3R,4R,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	naringin	1D	F87
267	ST072170	610.53	3-[6-[(2S,2R,3R,4R,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]methyl][(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihydroxy(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]-2-(2,3-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one		1C	F88
268	ST072640	240.26	(2E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one		3F	F89

269	ST072642	332.36	2-(3,4-dimethoxyphenyl)benzo[h]chromen-4-one			
270	ST072691	347.23	2-[(5-bromo-2-methoxyphenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
271	ST072734	358.42	4-[(3-oxobenzo[b]thiophen-2-ylidene)methyl]phenyl benzoate			
272	ST074452	462.46	2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yl 3,4,5-trimethoxybenzoate			
273	ST074453	432.43	2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yl 3,4-dimethoxybenzoate			
274	ST074454	402.40	2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yl 4-methoxybenzoate			
275	ST074455	310.31	2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yl acetate			
276	ST074456	268.27	6-hydroxy-2-[(4-methoxyphenyl)methylene]benzo[b]furan-3-one			
277	ST074488	252.27	6-hydroxy-2-[(4-methylphenyl)methylene]benzo[b]furan-3-one			
278	ST074501	386.40	methyl 4-[(3-oxo-2-(phenylmethylene)benzo[3,4-b]furan-6-yloxy)methyl]benzoate			
279	ST074502	355.35	2-[2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yloxy]acetamide			
280	ST074528	368.39	methylethyl 2-[2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yloxy]acetate			
281	ST074529	298.30	2-[(2,4-dimethoxyphenyl)methylene]-6-hydroxybenzo[b]furan-3-one			
282	ST074530	467.32	2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methylene]-6-[(4-bromophenyl)methoxy]benzo[b]furan-3-one			
283	ST074531	328.32	6-hydroxy-2-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylene]benzo[b]furan-3-one			
284	ST074554	340.33	methyl 2-[2-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-oxobenzo[3,4-b]furan-6-yloxy]acetate			
285	ST074555	298.30	2-[(2,5-dimethoxyphenyl)methylene]-6-hydroxybenzo[b]furan-3-one			
286	ST074562	270.24	3,6-dihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl)chromen-4-one		1A	F90
287	ST074635	420.20	2-[(5-ethoxy-4-hydroxy-3-iodophenyl)methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
288	ST074636	424.26	2-[(5-ethoxy-4-hydroxy-3-iodophenyl)methylene]benzo[b]thiophen-3-one		3F	F91
289	ST074911	404.46	5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-8,8-dimethyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-8H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one		2A	F92
290	ST075446	298.30	3-hydroxy-6-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one		1C	F93
291	ST075648	288.26	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychroman-4-one	eriodictyol	1D	F94
292	ST075672	369.24	6-chloro-4-(6-chloro-7-hydroxy-2,4,4-trimethylchroman-2-yl)benzene-1,3-diol			
293	ST076514	340.33	2-[2-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yloxy]propanoic acid			
294	ST076515	333.39	2-[2-[4-(tert-butyl)phenyl]-4-oxochromen-3-yloxy]ethanenitrile			
295	ST076521	324.38	2-(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)-6,8-dimethylchromen-4-one			
296	ST076522	312.32	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-methoxychromen-4-one			
297	ST076527	294.31	2-(6,8-dimethyl-4-oxochromen-2-yl)benzoic acid			
298	ST076528	294.35	3-hydroxy-6-methyl-2-[4-(methylethyl)phenyl]chromen-4-one		1A	F95
299	ST076530	370.40	2-[[3-methoxy-4-(phenylmethoxy)phenyl]methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
300	ST076533	296.32	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6,8-dimethylchromen-4-one			
301	ST076534	310.35	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,8-dimethylchromen-4-one			
302	ST076542	340.38	2-[[3-(phenylmethoxy)phenyl]methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
303	ST076545	277.28	2-(4-oxo-2-phenylchromen-3-yloxy)ethanenitrile			
304	ST076546	374.35	4-[(1,3-dioxocyclopenta[3,4-a]benzen-2-ylidene)methyl]-2-methoxyphenyl furan-2-carboxylate			
305	ST076550	291.31	2-[2-(4-methylphenyl)-4-oxochromen-3-yloxy]ethanenitrile			
306	ST077089	300.27	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one		1C	F96
307	ST077094	462.41	5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-4-one		1C	F97

308	ST077097	530.49	{3,4,5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxochromen-7-yl oxy]-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)methyl (2E)but-2-enoate		1C	F98
309	ST077098	622.58	5-hydroxy-6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-7-(3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))methyl](2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)oxy)chromen-4-one		1C	F99
310	ST077103	462.41	methyl 6-[(2S)-5-hydroxy-2-(2-hydroxyphenyl)-4-oxochroman-7-yloxy]-3,4,5-trihydroxy-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-carboxylate		1D	F100
311	ST077105	580.55	2-[(2S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxochroman-7-yloxy]-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-3-yl (2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate		1D	F101
312	ST077108	346.29	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-8-methoxychromen-4-one		1A	F102
313	ST077110	696.62	{6-[3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-8-methoxy-4-oxochromen-7-yloxy]-3,4-dihydroxy-5-(3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)oxy)-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)methyl acetate		1A	F103
314	ST077122	450.44	2-(8,9-dimethoxy-6-oxo-1,2-dihydro-12H-chromeno[3,4-b]furano[2,3-h]chromen-2-yl)prop-2-enyl acetate			
315	ST077124	374.35	6-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,5,7-trimethoxychromen-4-one			
316	ST077132	900.80	4-(5-acetyloxy-4-oxo-7-(3,4,5-triacetyloxy-6-[(3,4,5-triacetyloxy(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))methyl](2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy))chromen-3-yl)phenyl acetate			
317	ST077133	368.34	7-acetyloxy-3-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-5-yl acetate			
318	ST077134	832.77	{6-[(2S)-5-acetyloxy-2-(4-acetyloxyphenyl)-4-oxochroman-7-yloxy]-3,4,5-triacetyloxy-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)methyl (2E)-3-(4-acetyloxyphenyl)prop-2-enoate			
319	ST077135	598.56	{3,4,5-triacetyloxy-6-[3-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-7-yloxy]-2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)methyl acetate			
320	ST077136	742.64	2-acetyloxy-4-[5-acetyloxy-4-oxo-7-(3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-3-yl)phenyl acetate			
321	ST077137	656.60	3-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-7-(3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-5-yl acetate			
322	ST077138	408.45	(2S)-7-acetyloxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-4-oxo-2-phenylchroman-5-yl acetate			
323	ST077139	340.33	(2S)-7-acetyloxy-4-oxo-2-phenylchroman-5-yl acetate			
324	ST077156	418.40	2-(4-hydroxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chroman-4-one			
325	ST078051	518.56	(2E)-1-(4-[(2E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enyl]phenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
326	ST078083	310.31	methyl 4-((1E)-3-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-oxoprop-1-enyl)benzoate			
327	ST078115	342.35	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
328	ST078351	303.16	(2E)-3-(4-bromophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one			
329	ST078865	314.29	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one	3',4'-dimethoxy-7-hydroxyflavonol	1A	F104
330	ST078866	298.30	3-hydroxy-7-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one		1A	F105
331	ST079062	321.38	2-[[4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl]methylene]cyclopenta[1,2-a]benzene-1,3-dione			
332	ST079153	240.26	7-hydroxy-2-phenylchroman-4-one			
333	ST079165	332.78	(2E)-3-(2-chlorophenyl)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
334	ST079166	270.28	5-hydroxy-7-methoxy-2-phenylchroman-4-one		1C	F106
335	ST079167	254.29	(2E)-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one		3 chalcone	F107
336	ST079544	312.32	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
337	ST079545	297.27	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one			

338	ST079546	312.32	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(2,3-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one		
339	ST079547	282.30	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(2-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one		
340	ST079548	282.30	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one		
341	ST079564	344.37	7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4-phenylchromen-2-one		
342	ST079566	348.79	3-(3-chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylchromen-2-one		
343	ST079946	411.28	4-((2Z)-3-(2,4-dichlorophenyl)prop-2-enoyl)phenyl 4-methylbenzoate		
344	ST079947	415.45	4-((2Z)-3-[4-(methylethyl)phenyl]prop-2-enoyl)phenyl 4-nitrobenzoate		
345	ST079948	384.47	4-((2E)-3-[4-(methylethyl)phenyl]prop-2-enoyl)phenyl 4-methylbenzoate		
346	ST079949	386.40	4-((2E)-3-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)prop-2-enoyl)phenyl 4-methylbenzoate		
347	ST079950	384.46	4-((2E)-3-naphthylprop-2-enoyl)phenyl thiophene-2-carboxylate		
348	ST079951	358.44	4-((2Z)-3-naphthylprop-2-enoyl)phenyl 2,2-dimethylpropanoate		
349	ST079952	471.73	4-((2Z)-3-(5-bromo-2-methoxyphenyl)prop-2-enoyl)phenyl 4-chlorobenzoate		
350	ST079954	645.59	3-(2H,3H-benzo[3,4-e]1,4-dioxan-6-yl)-4-oxo-2-(trifluoromethyl)chromen-7-yl 3-phenyl-2-[(phenylmethoxy)carbonylamino]propanoate		
351	ST079955	595.53	phenylmethyl 2-[[3-(2H,3H-benzo[3,4-e]1,4-dioxan-6-yl)-4-oxo-2-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]oxycarbonyl]pyrrolidinecarboxylate		
352	ST079961	392.45	4-((2E)-3-naphthylprop-2-enoyl)phenyl 4-methylbenzoate		
353	ST079962	422.52	2-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl decanoate	1C	F108
354	ST079964	344.75	methyl 2-(6-chloro-2-oxo-4-phenylchromen-7-yl)oxyacetate		
355	ST080006	368.84	4-((2E)-3-(3-chlorophenyl)prop-2-enoyl)phenyl thiophene-2-carboxylate		
356	ST080007	397.26	4-((2E)-3-(3-chlorophenyl)prop-2-enoyl)phenyl 4-chlorobenzoate		
357	ST080008	475.39	4-((2E)-3-[4-(methylethyl)phenyl]prop-2-enoyl)phenyl 2,5-dichlorobenzenesulfonate		
358	ST080024	407.81	2-((2E)-3-(4-chlorophenyl)prop-2-enoyl)phenyl 4-nitrobenzoate		
359	ST080274	358.78	methyl 2-(6-chloro-2-oxo-4-phenylchromen-7-yl)oxypropanoate		
360	ST080275	468.46	2-methyl-3-(4-nitrophenyl)-4-oxochromen-7-yl 2-[(tert-butoxy)carbonylamino]propanoate		
361	ST080277	454.44	3-(4-nitrophenyl)-4-oxochromen-7-yl 2-[(tert-butoxy)carbonylamino]propanoate		
362	ST080278	508.51	3-(4-nitrophenyl)-4-oxochromen-7-yl 2-[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]propanoate		
363	ST080280	571.63	3-(4-fluorophenyl)-2-methyl-4-oxochromen-7-yl 2-[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-3-phenylpropanoate		
364	ST080301	508.51	3-(4-nitrophenyl)-4-oxochromen-7-yl 3-[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]propanoate		
365	ST080500	312.32	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one		
366	ST080501	295.34	(2E)-1-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolan-5-yl)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one		
367	ST080512	336.39	{2-methoxy-5-[(1-oxo(2-3,4-dihydronaphthylidene)methyl)phenyl]methyl acetate		
368	ST080603	240.26	2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one		
369	ST080606	221.26	2-(phenylmethylene)-1H-benzo[d]azolin-3-one		
370	ST081006	352.43	4-(6-hydroxy-2,3,3a,9a-pentahydrocyclopenta[1,2-b]chromane-9,1'-cyclopentane-3a-yl)benzene-1,3-diol		
371	ST081057	423.33	2-[[5-bromo-2-(phenylmethoxy)phenyl]methylene]benzo[b]thiophen-3-one		
372	ST081327	353.42	(2-[[4-(diethylamino)phenyl]methylene]-3-oxocyclopenta[2,3-a]benzenylidene)methane-1,1-dicarbonitrile		
373	ST081356	256.26	(2E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	3 chalcone	F109
374	ST081387	367.23	3-(2,4-dichlorophenyl)-4-phenylchromen-2-one		
375	ST081388	348.79	3-(2-chlorophenyl)-7-hydroxy-4-phenylchromen-2-one		
376	ST081389	254.24	7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one		

377	ST081391	416.38	7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)]chromen-4-one			
378	ST081483	458.37	3-(2-methoxyphenyl)-4-oxo-2-(trifluoromethyl)chromen-7-yl 2-fluorobenzoate			
379	ST081567	293.32	ethyl 4-oxo-2-phenylhydroquinoline-6-carboxylate			
380	ST081580	430.46	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl 3-phenylpropanoate			
381	ST081581	467.52	N-cyclohexyl-2-[4-oxo-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromen-6-yloxy]acetamide			
382	ST081587	349.43	5-(azaperhydroepinylmethyl)-6-hydroxy-2-phenylchromen-4-one			
383	ST081588	367.40	6-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-5-(morpholin-4-ylmethyl)chromen-4-one			
384	ST081598	324.33	3-(2H,3H,4H-benzo[b]1,4-dioxepan-7-yl)-7-hydroxy-2-methylchromen-4-one			
385	ST081626	254.24	3,5-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one	5-hydroxyflavonol	1A	F110
386	ST082229	290.68	7-chloro-2-(4-fluorophenyl)-3-hydroxychromen-4-one		1A	F111
387	ST083078	352.39	methylethyl 2-[2-(4-methylphenyl)-4-oxochromen-6-yloxy]acetate			
388	ST083089	348.38	4-oxo-2-phenylchromen-6-yl thiophene-2-carboxylate			
389	ST083092	328.75	2-(2-chlorophenyl)-4-oxochromen-3-yl propanoate			
390	ST083122	295.29	2-(4-oxo-2-phenylchromen-6-yloxy)acetamide			
391	ST083129	337.38	7-hydroxy-8-(morpholin-4-ylmethyl)-3-phenylchromen-4-one			
392	ST083130	372.80	methylethyl 2-[3-(4-chlorophenyl)-4-oxochromen-7-yloxy]acetate			
393	ST083652	374.39	(2E)-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
394	ST083653	358.39	(2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
395	ST083654	268.27	5-hydroxy-2-(3-methoxyphenyl)chromen-4-one		1C	F112
396	ST083655	282.30	5-methoxy-2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one			
397	ST083656	282.30	5-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one			
398	ST083657	282.30	7-methoxy-2-(2-methoxyphenyl)chromen-4-one			
399	ST083658	344.36	(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
400	ST083683	280.32	7-(methylethoxy)-3-phenylchromen-4-one			
401	ST085112	495.36	2-(2,4-diacetyloxy-5-chlorophenyl)-6-chloro-2,4,4-trimethylchroman-7-yl acetate			
402	ST085121	381.46	2-[[4-(4-methylpiperazinyl)-3-nitrophenyl]methylene]benzo[b]thiophen-3-one			
403	ST085666	284.31	2-(3,4-dimethoxyphenyl)chroman-4-one			
404	ST085667	284.31	2-(2,3-dimethoxyphenyl)chroman-4-one			
405	ST085668	300.27	3,5,7-trihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one	kaempferide	1A	F113
406	ST085669	300.31	2-(4-hydroxyphenyl)-5,7-dimethoxychroman-4-one			
407	ST085670	254.24	3-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	4'-hydroxyflavonol	1A	F114
408	ST085671	268.27	3-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchromen-4-one		1A	F115
409	ST085672	328.32	3-hydroxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromen-4-one		1A	F116
410	ST085773	676.67	7-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)oxy]-3-[(2S,6S,3R,4R,5R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yl)oxy]-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromen-4-one		1C	F117
411	ST085906	374.39	3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-hydroxy-4-phenylchromen-2-one			
412	ST086116	268.27	3-hydroxy-7-methoxy-2-phenylchromen-4-one		1A	F118
413	ST086243	326.35	2-(3,4-diethoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one	3',4'-diethoxyflavonol	1A	F119
414	ST086259	406.46	2-(4-methylphenyl)-4-oxochromen-3-yl 4-methylbenzenesulfonate			
415	ST086260	436.49	2-(4-ethoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl 4-methylbenzenesulfonate			
416	ST086510	282.30	7,8-dimethoxy-2-phenylchromen-4-one			
417	ST086511	298.30	2-(2,3-dimethoxyphenyl)-3-hydroxychromen-4-one		1A	F120
418	ST086622	238.24	3-hydroxy-2-phenylchromen-4-one		1A	F121
419	ST088176	355.48	1-(3-methylphenyl)-2-(2,2,3-trimethyl(1,2,3-trihydrobenzo[f]isoquinolin-4-ylidene)ethan-1-one			
420	ST088823	308.29	2-(4-[[1,3-dioxocyclopenta[3,4-a]benzen-2-ylidene)methyl]phenoxy)acetic acid			
421	ST090287	310.31	(2E)-1-(2H,3H-benzo[3,4-e]1,4-dioxan-6-yl)-3-(2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolen-5-yl)prop-2-en-1-one			
422	ST092286	298.34	(2E)-3-phenyl-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
423	ST092287	314.34	(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one			



424	ST092291	254.24	3,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one		1A	F122
425	ST092293	270.28	(2E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one	4'-methoxy-2'-hydroxychalcone	3 chalcone	F123
426	ST092296	268.31	(2E)-1-(4-hydroxy-2-methylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
427	ST092297	358.35	2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5,6,7-trimethoxychromen-4-one			
428	ST092710	254.29	7-methoxy-2-phenylchroman-4-one			
429	ST092742	307.39	2-[[4-(dimethylamino)phenyl]methylene]-5-methoxy-3,4-dihydronaphthalen-1-one			
430	ST092763	335.58	2-(4-bromophenyl)-6-chlorochromen-4-one			
431	ST092764	380.04	6-bromo-2-(4-bromophenyl)chromen-4-one			
432	ST093690	236.27	2-(4-methylphenyl)chromen-4-one			
433	ST093738	394.54	4,4-dimethyl-8-phenyl-2-prop-2-enylthiospiro[3,4,5,6-tetrahydropyrimidine-6,4'-chromane]-13-ol			
434	ST094800	395.46	(2Z)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-methylphenyl)-3-(4-prop-2-enyloxyphenyl)prop-2-en-1-one			
435	ST094806	377.89	(2E)-1-{4-[(diethylamino)sulfonyl]phenyl}-3-(3-chlorophenyl)prop-2-en-1-one			
436	ST094856	303.32	(2E)-1-naphthyl-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one			
437	ST094874	295.34	N-{4-[(2E)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enoyl]phenyl}acetamide			
438	ST094877	385.42	(2Z)-2-benzoxazol-2-yl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(4-methylphenyl)prop-2-en-1-one			
439	ST094880	399.45	(2E)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-ethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one			
440	ST094881	383.45	(2E)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-ethoxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)prop-2-en-1-one			
441	ST094882	387.41	(2Z)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-ethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)prop-2-en-1-one			
442	ST094883	369.42	(2Z)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-ethoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one			
443	ST094884	400.39	(2Z)-2-benzoxazol-2-yl-1-(4-methoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one			
444	ST077114	416.38	3-(4-hydroxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3,4,5,6-tetrahydropyran-2-yloxy)]chromen-4-one			

**Tabela 2.** Lista flawonoidów naturalnego pochodzenia oferowana przez firmę Chemfaces. Flawonoidy które przyporządkowano na podstawie ich struktury do grupy związków potencjalnie ulegających fluorescencyjnej derywacji za pomocą DPBA zaznaczono na kolor zielony. Typ struktury opisano zgodnie z kryteriami przedstawionymi na rycinach 17, 19, 21. Flawonoidom nadano kolejne numery identyfikacyjne F. Nazwy związków, jako część charakterystyki substancji, udostępnione są przez firmę w języku angielskim i w tej formie zostały przedstawione poniżej.

L.p.	Numer katalogowy	Masa molowa [g/mol]	Numer CAS.	Nazwa zwyczajowa	Typ struktury	Numer identyfikacyjny
1	CFN92795	354.50	76265-12-8	Yukovanol	1B	F124
2	CFN97089	284.30	632-85-9	Wogonin	1C	F125
3	CFN98816	338.40	51225-30-0	Wighteone	2A	F126
4	CFN97916	404.50	4449-55-2	Warangalone	2A	F127
5	CFN98172	374.34	479-91-4	Vitexicarpin	1C	F128
6	CFN97314	230.22	82-57-5	Visnagin		
7	CFN97545	514.43	96684-81-0	Viscidulin III tetraacetate		
8	CFN97488	346.30	92519-91-0	Viscidulin III	1C	F129
9	CFN92214	330.30	92519-93-2	Viscidulin II	1C	F130
10	CFN97489	302.20	92519-95-4	Viscidulin I	1A	F131
11	CFN98483	272.30	35878-41-2	Vestitol		
12	CFN98290	314.30	25739-41-7	Velutin	1C	F132
13	CFN98841	330.30	520-32-1	Tricin	1C	F133
14	CFN99610	272.30	147517-06-4	Thunberginol C	3G	F134
15	CFN90170	716.60	30462-34-1	Theaflavin-3-gallate	1E	F135
16	CFN98599	704.63	28543-07-9	Theaflavin-3'-gallate	1E	F136
17	CFN99130	868.70	30462-35-2	Theaflavin 3,3'-di-O-gallate	1E	F137
18	CFN98597	564.49	4670-05-07	Theaflavin	1E	F138
19	CFN98755	542.50	48236-96-0	Tetrahydroamentoflavone	1D	F139
20	CFN97864	410.42	76-80-2	Tephrosin		
21	CFN99920	300.26	548-77-6	Tectorigenin	2A	F140
22	CFN98840	268.30	520-28-5	Tectochrysin	1C	F141
23	CFN98734	304.30	480-18-2	Taxifolin	1B	F142
24	CFN90240	372.37	481-53-8	Tangeretin		
25	CFN97027	316.30	603-61-2	Tamarixetin	1A	F143
26	CFN98808	568.50	509077-91-2	Taiwanhomoflavone B	1C	F144
27	CFN96061	298.30	94451-48-6	Syzalterin	1C	F145
28	CFN97844	270.24	120-05-8	Sulfuretin	3B	F146
29	CFN98949	288.30	56486-94-3	Steppogenin	1D	F147
30	CFN92005	424.50	97938-30-2	Sophoraflavanone G	1D	F148
31	CFN92635	424.50	121927-91-1	Sophoraflavanone C	1D	F149
32	CFN92216	374.40	55084-08-7	Skullcapflavone II	1C	F150
33	CFN98643	314.30	41060-16-6	Skullcapflavone I	1C	F151
34	CFN99599	372.37	2306-27-6	Sinensetin		
35	CFN99542	482.44	22888-70-6	Silymarin		

36	CFN92155	556.52	106293-99-6	Sikokianin A		
37	CFN98394	312.30	3122-87-0	Sideroxylin	1C	F152
38	CFN97204		72061-63-3	Sepinol		
39	CFN98557	286.24	529-53-3	Scutellarein	1C	F153
40	CFN98869	312.30	52706-07-7	Scillascillin	2B	F154
41	CFN98847	580.60	521-34-6	Sciadopitysin	1C	F155
42	CFN92014	284.30	102067-84-5	Sappanone A	3D	F156
43	CFN92832	318.28	111254-19-4	Sappanol		
44	CFN92416	488.57	86450-77-3	Sanggenone K		
45	CFN99704	708.71	81422-93-7	Sanggenone D	1B	F157
46	CFN99593	708.71	80651-76-9	Sanggenone C	1B	F158
47	CFN97979	422.50	92280-12-1	Sanggenon N	1D	F159
48	CFN97893	492.60	1351931-30-0	Sanggenol P		
49	CFN92787	422.50	329319-20-2	Sanggenol L	1D	F160
50	CFN92695	424.50	174423-30-4	Sanggenol A	1D	F161
51	CFN99883	328.30	19103-54-9	Salvigenin	1C	F162
52	CFN98366	286.30	2957-21-3	Sakuranetin	1D	F163
53	CFN98672	288.30	4382-34-7	Robtin	1G	F164
54	CFN98780	302.20	490-31-3	Robinetin	1A	F165
55	CFN92217	344.30	70028-59-0	Rivularin	1C	F166
56	CFN97724	300.27	569-92-6	Rhamnocitrin	1A	F167
57	CFN98429	330.30	33429-83-3	Quercetin 3,4'-dimethyl ether	1C	F168
58	CFN99272	302.24	117-39-5	Quercetin		
59	CFN98246	566.50	23624-21-7	Putraflavone	1C	F169
60	CFN90189	284.26	552-59-0	Prunetin	2A	F170
61	CFN98453	330.30	3443-28-5	Prudomestin	1A	F171
62	CFN99560	866.77	37064-30-5	Procyanidin C1		
63	CFN99559	578.52	23567-23-9	Procyanidin B3		
64	CFN99558	578.52	29106-49-8	Procyanidin B2	1E	F172
65	CFN99557	578.52	20315-25-7	Procyanidin B1	1E	F173
66	CFN99556	594.52	4852-22-6	Proanthocyanidins	1E	F174
67	CFN98202	552.50	22136-74-9	Podocarpusflavone A	1C	F175
68	CFN98739	270.30	480-37-5	Pinostrobin	1D	F176
69	CFN99211	340.33	111441-88-4	Pinocembrin diacetate		
70	CFN99096	298.30	109592-60-1	Pinocembrin acetate	1D	F177
71	CFN98740	256.30	480-39-7	Pinocembrin	1D	F178
72	CFN98917	272.30	548-82-3	Pinobanksin	1B	F179
73	CFN96054	342.39	76122-57-1	Phaseollidin hydrate		
74	CFN98611	324.37	37831-70-2	Phaseollidin		
75	CFN92036	352.72	1429-30-7	Petunidin chloride		
76	CFN92034	336.72	134-01-0	Peonidin chloride		
77	CFN98957	344.30	569-80-2	Penduletin	1C	F180
78	CFN92132	306.70	134-04-3	Pelargonidin chloride		

79	CFN96045	316.30	22384-63-0	Pedalitin	1C	F181
80	CFN99010	314.30	520-12-7	Pectolarigenin	1C	F182
81	CFN97280	318.30	80453-44-7	Padmatin	1B	F183
82	CFN98433	344.30	33708-72-4	Pachypodol	1C	F184
83	CFN97917	404.50	482-53-1	Osajin	2A	F185
84	CFN98540	284.26	480-11-5	Oroxilin A	1D	F186
85	CFN98737	286.20	480-23-9	Orobol	2C	F187
86	CFN92422	300.30	73695-94-0	Onysilin	1D	F188
87	CFN98876	330.30	529-40-8	Ombuin	1A	F189
88	CFN92218	270.20	4443-09-08	Norwogonin	1C	F190
89	CFN98679	232.20	4439-68-3	Norkhellol	3A	F191
90	CFN98528	372.37	5240-95-9	Noricaritin	1A	F192
91	CFN99027	192.20	1013-69-0	Noreugenin	3A	F193
92	CFN92346	354.40	28610-31-3	Noranhydroicaritin	1A	F194
93	CFN98726	402.39	478-01-3	Nobiletin		
94	CFN97981	352.38	53734-75-1	Neorauflavene		
95	CFN97919	354.38	53734-74-0	Neorauflavane		
96	CFN92694	436.45	62596-35-4	Neocyclomorusin		
97	CFN92152	542.49	90411-12-4	Neochamaejasmine B		
98	CFN92151	542.49	90411-13-5	Neochamaejasmine A		
99	CFN92222	322.35	41060-15-5	Neobavaisoflavone		
100	CFN99848	356.30	18196-13-9	Naringenin-4',7-diacetate	1D	F195
101	CFN98616	314.33	38302-15-7	Naringenin trimethyl ether		
102	CFN98603	398.36	3682-04-0	Naringenin triacetate		
103	CFN98742	272.25	480-41-1	Naringenin		
104	CFN98877	318.24	529-44-2	Myricetin		
105	CFN97085	422.50	62949-79-5	Mulberrin	1C	F196
106	CFN98475	298.30	3570-62-5	Moslosooflavone	1C	F197
107	CFN97086	438.50	62949-93-3	Morusinol	1C	F198
108	CFN97083	420.50	62596-29-6	Morusin	1C	F199
109	CFN99929	302.24	480-16-0	Morin		
110	CFN98596	328.36	74805-91-7	Methylpogonone B	2B	F200
111	CFN98595	342.34	74805-92-8	Methylpogonone A	2B	F201
112	CFN98411	270.28	32383-76-9	Medicarpin		
113	CFN92035	366.75	643-84-5	Malvidin chloride		
114	CFN97949	126.11	118-71-8	Maltol		
115	CFN99746	284.26	19908-48-6	Maackiain		
116	CFN99787	344.32	152743-19-6	Lysionotin	1C	F202
117	CFN98655	354.40	41743-56-0	Luteone	2A	F203
118	CFN98784	286.24	491-70-3	Luteolin		
119	CFN97939	370.35	135905-53-2	Lupinol C		
120	CFN97245	406.50	76754-24-0	Lupalbigenin	2A	F204
121	CFN99156		578-86-9	Liquiritigenin		

122	CFN92385	346.30	489-33-8	Limocitrin	1A	F205
123	CFN92289	338.40	72357-31-4	Licoflavone C	1C	F206
124	CFN92343	356.40	152464-78-3	Leachianone G	1D	F207
125	CFN97560	438.50	97938-31-3	Leachianone A	1D	F208
126	CFN92320	424.50	68401-05-8	Kuwanon E	1D	F209
127	CFN96031	422.50	123702-94-3	Kuwanol C	1D	F210
128	CFN92390	440.50	254886-77-6	Kushenol X	1B	F211
129	CFN92342	386.40	254886-76-5	Kushenol W	1D	F212
130	CFN92002	256.25	102490-65-3	Kushenol N		
131	CFN92345	508.60	101236-51-5	Kushenol M		
132	CFN92344	440.49	101236-50-4	Kushenol L		
133	CFN92534	472.53	101236-49-1	Kushenol K		
134	CFN92001	454.51	99119-69-4	Kushenol I		
135	CFN92388	424.50	99119-72-9	Kushenol E	1D	F213
136	CFN92391	438.50	99119-73-0	Kushenol C	1A	F214
137	CFN92348	492.60	99217-64-8	Kushenol B		
138	CFN92000	408.50	99217-63-7	Kushenol A	1D	F215
139	CFN92003	438.51	34981-26-5	Kurarinone		
140	CFN92533	456.53	855746-98-4	Kurarinol		
141	CFN98423	314.30	3301-49-3	Kumatakenin	1C	F216
142	CFN97303	260.24	82-02-0	Khellin		
143	CFN97839	326.39	1238116-48-7	Kazinol U	1E	F217
144	CFN97569	392.49	99624-27-8	Kazinol B		
145	CFN92431	394.50	99624-28-9	Kazinol A		
146	CFN99686	454.38	16274-11-6	Kaempferol tetraacetate		
147	CFN92510	300.30	22044-80-0	Kaempferol 5-methyl ether	1A	F218
148	CFN99479	412.40	143724-69-0	Kaempferol 3,4,7-triacetate	1C	F219
149	CFN98838	286.24	520-18-3	Kaempferol		
150	CFN98782	282.33	491-54-3	Kaempferide		
151	CFN90386	330.29	18085-97-7	Jaceosidin	1C	F220
152	CFN99482	486.42	14397-69-4	Jaceidin triacetate		
153	CFN99032	360.30	10173-01-0	Jaceidin	1C	F221
154	CFN92777	284.10	480-14-8	Izalpinine	1A	F222
155	CFN97166	338.40	68436-47-5	Isowigtheone	2A	F223
156	CFN97562	330.30	98755-25-0	Isothymusin	1C	F224
157	CFN92436	360.30	99615-01-7	Isothymonin	1C	F225
158	CFN97016	286.32	60102-29-6	Isosativan		
159	CFN98743	286.30	480-43-3	Isosakuranetin	1D	F226
160	CFN98735	316.26	480-19-3	Isorhamnetin		
161	CFN97739	330.33	4431-42-9	Isopedicin		
162	CFN92153	542.49	871319-96-9	Isoneochamaejasmin A		
163	CFN92223	322.35	40357-43-5	Isoneobavaisoflavone		
164	CFN97226	270.28	74560-05-7	Isomedicarpin		

165	CFN97594	354.36	94805-83-1	Isocoflavanol	1A	F227
166	CFN90174	566.51	548-19-6	Isoginkgetin	1C	F228
167	CFN96071	422.50	478158-77-9	Isoerysenegalensein E	2A	F229
168	CFN92794	336.30	121747-89-5	Isoderrone	2A	F230
169	CFN97894	404.50	121747-90-8	Isochandalone	2A	F231
170	CFN92150	542.49	93859-63-3	Isochamaejasmin		
171	CFN92063	570.54	865852-48-8	Isochamaejasmenin B		
172	CFN97042	282.29	610778-85-3	Isobonducellin		
173	CFN98400	324.37	31524-62-6	Isobavachin		
174	CFN98450	388.50	34366-34-2	Isoapetalic acid	3A	F232
175	CFN99788	386.35	41743-73-1	Irisfloreutin		
176	CFN98527	368.38	118525-40-9	Icaritin	1A	F233
177	CFN97592	354.35	95456-43-2	Hydroxytuberosone		
178	CFN98021	300.30	20243-59-8	Hydroxygenkwanin	1C	F234
179	CFN98745	256.30	480-47-7	Hydrangenol	3G	F235
180	CFN97850	406.48	114542-44-8	Honyucitrin	1C	F236
181	CFN97720	284.31	606-91-7	Homopteroicarpin		
182	CFN97891	316.30	482-01-9	Homoferreirin	2B	F237
183	CFN99491	300.30	1447-88-7	Hispidulin	1C	F238
184	CFN92007	538.50	19202-36-9	Hinokiflavone	1C	F239
185	CFN98236	580.60	23132-13-0	Heveaflavone	1C	F240
186	CFN98842	302.30	520-33-2	Hesperetin	1D	F241
187	CFN99778	302.24	527-95-7	Herbacetin	1A	F242
188	CFN99106	284.26	40957-83-3	Glycitein		
189	CFN99464	422.50	142474-52-0	Glyasperin A	1A	F243
190	CFN97977	340.40	87440-56-0	Glepidotin B	1B	F244
191	CFN99731	324.37	59870-68-7	Glabridin		
192	CFN98659	324.37	41983-91-9	Glabranin		
193	CFN90173	566.51	481-46-9	Ginkgetin	1C	F245
194	CFN98670	284.30	437-64-9	Genkwanin	1C	F246
195	CFN98681	270.24	446-72-0	Genistein		
196	CFN97883	352.40	129145-51-3	Gancaonin M	2A	F247
197	CFN97548	306.30	970-73-0	Galocatechin	1E	F248
198	CFN92776	284.10	6665-74-3	Galangin 3-methyl ether	1C	F249
199	CFN98918	270.20	548-83-4	Galangin	1A	F250
200	CFN98042	288.30	20725-03-5	Fustin	1B	F251
201	CFN97918	438.50	911004-72-3	Furowanin A	2C	F252
202	CFN99962	268.26	485-72-3	Formononetin		
203	CFN98176	286.24	528-48-3	Fisetin		
204	CFN99817	404.50	173429-83-9	Ficusin A	2A	F253
205	CFN90337	300.30	24211-30-1	Farrerol	1D	F254
206	CFN99417	462.45	13364-94-8	Exoticin		
207	CFN97806	338.35	166547-20-2	Eurycarpin A		

208	CFN97418	344.30	855-96-9	Eupatorin	1C	F255
209	CFN92698	346.30	29536-44-5	Eupatoletin	1A	F256
210	CFN90190	344.31	22368-21-4	Eupatilin	1C	F257
211	CFN92669	408.49	80510-05-0	Euchrestaflavanone A		
212	CFN92668	474.59	119061-09-5	Euchrenone B1		
213	CFN92667	406.47	171828-81-2	Euchrenone A10		
214	CFN99452	368.38	14004-35-4	Eucalyptin acetate		
215	CFN98395	326.40	3122-88-1	Eucalyptin	1C	F258
216	CFN97096	354.40	63807-85-2	Erythrinin C	2A	F259
217	CFN92231	320.34	63807-86-3	Erythrinin A		
218	CFN98098	352.30	221150-19-2	Erysubin B	2A	F260
219	CFN98097	352.30	221150-18-1	Erysubin A	2A	F261
220	CFN96072	422.48	154992-17-3	Erysenegalensein E	2A	F262
221	CFN98050	314.30	20869-95-8	Ermanin	1C	F263
222	CFN92835	314.38	162616-72-0	Eriosemation		
223	CFN92552	246.30	175448-02-9	Eriosematin A	3A	F264
224	CFN99719	288.25	552-58-9	Eriodictyol		
225	CFN98020	500.45	20194-41-6	Epicatechin pentaacetate		
226	CFN98781	290.30	490-46-0	Epicatechin	1E	F265
227	CFN90486	366.75	125536-25-6	Dracorhodin perchlorate		
228	CFN92679	522.59	194794-50-8	Dracoflavan C2		
229	CFN92680	522.59	194794-49-5	Dracoflavan C1		
230	CFN92683	538.59	194794-47-3	Dracoflavan B2		
231	CFN92682	538.59	194794-44-0	Dracoflavan B1		
232	CFN92681	794.88	132185-42-3	Dracoflavan A		
233	CFN96035	398.40	1372527-42-8	Dodoviscin J	1C	F266
234	CFN96015	386.40	1372527-40-6	Dodoviscin I	1C	F267
235	CFN96007	454.50	1372527-39-3	Dodoviscin H	1C	F268
236	CFN96016	500.60	1372527-25-7	Dodoviscin A	1C	F269
237	CFN90210	300.26	520-34-3	Diosmetin	1C	F270
238	CFN97194	318.30	70411-27-7	Dihydrotamarixetin	1B	F271
239	CFN98671	304.30	4382-33-6	Dihydrorobinetin	1B	F272
240	CFN92591	286.30	18956-18-8	Dihydrooxylin A	1D	F273
241	CFN96075	324.40	104055-79-0	Dihydrobovatin	1D	F274
242	CFN99854	304.30	18422-83-8	Dihydromorin	1B	F275
243	CFN92828		103680-87-1	Dihydrobonducellin		
244	CFN97097	338.40	63807-90-9	Dihydroalpinumisoflavone	2A	F276
245	CFN98234	330.30	22934-99-2	Desmethoxycentaureidin	1C	F277
246	CFN97689	336.34	76166-59-1	Derrone	2A	F278
247	CFN96046	422.50	246870-75-7	Derrisoflavone B	2A	F279
248	CFN97716	286.24	61854-36-2	Demethoxycapillarisin	3A	F280
249	CFN92033	338.70	528-53-0	Delphinidin chloride	1E	F281
250	CFN96085	408.40	59086-93-0	Dehydrotoxicarol	2D	F282

251	CFN97906	284.31	3466-23-7	Dehydrodeguelin		
252	CFN97934	394.42	522-17-8	Deguelin		
253	CFN97931	288.30	30368-42-4	Dalbergoidin	2B	F283
254	CFN98774	254.24	486-66-8	Daidzein		
255	CFN92417	420.45	19275-51-5	Cyclomulberrin		
256	CFN97714	418.45	62596-34-3	Cyclomorusin	1C	F284
257	CFN97748	502.56	36545-53-6	Cycloheterophyllin	1C	F285
258	CFN92418	352.34	145643-96-5	Cyclocommunol		
259	CFN99741	322.70	528-58-5	Cyanidin Chloride	1E	F286
260	CFN92532	356.40	597542-74-0	Cudraflavanone B	1D	F287
261	CFN98902	320.34	53947-92-5	Corylin		
262	CFN92228	338.35	775351-91-2	Corylifol C		
263	CFN92226	390.47	775351-88-7	Corylifol A		
264	CFN97126	314.30	6601-62-3	Cirsimaritin	1C	F288
265	CFN90418	344.32	41365-32-6	Cirsilineol	1C	F289
266	CFN98612	306.31	37921-38-3	Cimifugin		
267	CFN99622	360.30	14965-20-9	Chrysosplenol D	1C	F290
268	CFN97026	374.40	603-56-5	Chrysosplenetin	1C	F291
269	CFN98785	300.30	491-71-4	Chrysoeriol	1C	F292
270	CFN98741	254.20	480-40-0	Chrysin	1C	F293
271	CFN92154	542.49	69618-96-8	Chamaejasmine		
272	CFN92064	570.54	865852-47-7	Chamaejasmenin D		
273	CFN92061	584.57	89595-70-0	Chamaejasmenin C		
274	CFN92062	570.54	89595-71-1	Chamaejasmenin A		
275	CFN92815	542.49	93413-00-4	Chamaechromone		
276	CFN90433	360.31	17313-52-9	Centaureidin	1C	F294
277	CFN97872	334.30	75513-81-4	Cedrin	1B	F295
278	CFN97912	318.30	31076-39-8	Cedeodarin	1B	F296
279	CFN92773	440.49	1303438-52-9	Cathayanon I		
280	CFN92663	424.50	1303438-51-8	Cathayanon H	1B	F297
281	CFN99682	500.45	16198-01-9	Catechin pentaacetate		
282	CFN99646	290.27	154-23-4	Catechin		
283	CFN98732	374.40	479-91-4	Casticin	1C	F298
284	CFN98969	336.30	57498-96-1	Carpachromene	1C	F299
285	CFN90317	316.26	56365-38-9	Capillarisin	3A	F300
286	CFN99140	300.30	20575-57-9	Calycosin		
287	CFN98419	300.26	32884-36-9	Cajanin	2A	F301
288	CFN97736	272.25	492-14-8	Butin		
289	CFN92664	422.50	162558-94-3	Broussoflavonol F	1A	F302
290	CFN92774	452.50	99217-70-6	Broussoflavonol B		
291	CFN98711	286.30	474-07-7	Brazilin	1E	F303
292	CFN97274	332.30	79995-67-8	Blumeatin B	1B	F304
293	CFN99278	302.30	118024-26-3	Blumeatin	1D	F305



294	CFN99734	284.26	491-80-5	Biochanin A	2A	F306
295	CFN98846	552.50	521-32-4	Bilobetin	1C	F307
296	CFN97992	338.40	161099-42-9	Bidwillol A		
297	CFN92328	316.30	90-19-7	beta-Rhamnocitrin	1A	F308
298	CFN98006	338.40	19879-30-2	Bavachinin		
299	CFN98007	324.37	19879-32-4	Bavachin		
300	CFN97861	300.26	101691-27-4	Barpisoiflavone A		
301	CFN98069	322.35	213912-46-0	Barbacarpan		
302	CFN98783	270.24	491-67-8	Baicalein		
303	CFN96062	420.50	60297-37-2	Auricularin	2C	F309
304	CFN97991	336.30	119309-02-3	Atalantoflavone	1C	F310
305	CFN99273	504.60	1174017-37-8	Artoheterophyllin B	1C	F311
306	CFN97239	436.50	7608-44-8	Artocarpin	1C	F312
307	CFN97530	430.40	95135-98-1	Artemetin acetate		
308	CFN98731	388.40	479-90-3	Artemetin	1C	F313
309	CFN98736	288.30	480-20-6	Aromadendrin	1B	F314
310	CFN98797	374.40	50461-86-4	Araneosol	1C	F315
311	CFN98843	270.20	520-36-5	Apigenin	1C	F316
312	CFN98647	320.34	41347-49-3	Anhydrotuberosin		
313	CFN98526	368.38	38226-86-7	Anhydroicaritin	1A	F317
314	CFN96057	314.33	133442-54-3	Angophorol		
315	CFN98789	292.30	49624-66-0	Angelicain	3A	F318
316	CFN98326	320.30	27200-12-0	Ampelopsin	1B	F319
317	CFN99526	538.46	1617-53-4	Amentoflavone	1C	F320
318	CFN98226	334.30	226561-02-0	Amaronol B	3C	F321
319	CFN98225	320.30	226560-96-9	Amaronol A	3C	F322
320	CFN98440	336.30	34086-50-5	Alpinumisoflavone	2A	F323
321	CFN98489	270.28	36052-37-6	Alpinetin		
322	CFN97117	338.35	65388-03-6	alpha-Isowighteone		
323	CFN96008	416.40	84294-77-9	Aliarin	1C	F324
324	CFN92325	354.40	73343-42-7	Albanin A	1C	F325
325	CFN98073	314.30	21499-24-1	Agrimolide	3G	F326
326	CFN92347		550-79-8	Afrormosine		
327	CFN98744		480-44-4	Acacetin		
328	CFN92016	340.40	53846-50-7	8-Prenylnaringenin	1D	F327
329	CFN97899	422.50	125002-91-7	8-Prenylluteone	2A	F328
330	CFN97827		135384-00-8	8-Prenyldaidzein		
331	CFN97500	316.30	93078-83-2	8-O-Demethyl-7-O-methyl-3,9-dihydropunctatin	2B	F329
332	CFN92382	316.30	571-74-4	8-Methoxykaempferol	1A	F330
333	CFN97475		90996-27-3	8-Methoxybonducellin		
334	CFN96053	422.50	883859-83-4	8-Lavandulylkaempferol	1A	F331
335	CFN97581	440.50	N/A	8-Isomulberrin hydrate	1C	F332

336	CFN98025		202846-95-5	8-Hydroxy-3,5,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone		
337	CFN92139	298.30	80621-54-1	8-Demethylsideroxylin	1C	F333
338	CFN98954	312.30	5689-38-3	8-Demethyleucalyptin	1C	F334
339	CFN96038	300.30	206560-99-8	7-O-Methylporiol	1D	F335
340	CFN98833	302.30	51857-11-5	7-O-Methylesteriodictyol	1D	F336
341	CFN92156	298.29	402828-38-0	7-Methoxyneochamaejasmine A		
342	CFN92768	238.24	6665-86-7	7-Hydroxyflavone		
343	CFN98910	300.31	54377-24-1	7-Hydroxy-5,8-dimethoxyflavanone		
344	CFN99099	268.26	110064-50-1	7-Hydroxy-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one		
345	CFN92671	256.30	1180504-64-6	7-Hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)chroman		
346	CFN99014	330.33	100079-34-3	7-Hydroxy-2',5,8-trimethoxyflavanone		
347	CFN98819	298.30	5128-44-9	7,4'-Di-O-methylapigenin	1C	F337
348	CFN92675	270.28	1178893-64-5	7,4'-Dihydroxyhomioisoflavanone		
349	CFN98606	310.39	376361-96-5	7,4'-Dihydroxy-3'-prenylflavan		
350	CFN92389	284.26	947611-61-2	7,3'-Dihydroxy-5'-methoxyisoflavanone		
351	CFN97811	272.30	162290-05-3	7,3'-Dihydroxy-4'-methoxyflavan		
352	CFN97786	270.24	2150-11-0	7,3',4'-Trihydroxyflavone	1F	F338
353	CFN99209	270.30	1111897-60-9	7,3',4'-Trihydroxy-3-benzyl-2H-chromene	3E	F339
354	CFN92017	340.40	68236-13-5	6-Prenylnaringenin	1D	F340
355	CFN97529	302.30	94942-49-1	6-Methoxynaringenin	1D	F341
356	CFN92706	316.30	520-11-6	6-Methoxyluteolin	1C	F342
357	CFN92370	302.20	4324-55-4	6-Hydroxykaempferol	1A	F343
358	CFN92019	408.50	97126-57-3	6-Geranylnaringenin	1D	F344
359	CFN97171	218.25	68799-41-7	6-Acetyl-2,2-dimethylchroman-4-one		
360	CFN97705	422.48	66777-70-6	6,8-Diprenylorobol	2A	F345
361	CFN92018	408.50	68236-11-3	6,8-Diprenylnaringenin	1D	F346
362	CFN97935	406.50	51225-28-6	6,8-Diprenylgenistein	2A	F347
363	CFN97960	484.54	1246926-09-9	5'-Prenylalariin		
364	CFN97060	286.28	61775-19-7	5-O-Methylnaringenin		
365	CFN98291	298.30	259653-54-8	5-Hydroxy-7-methoxy-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one	3D	F348
366	CFN97139	296.30	6674-40-4	5-Hydroxy-7-acetoxyflavone	1C	F349
367	CFN97535	326.30	95480-80-1	5-Hydroxy-7-acetoxy-8-methoxyflavone	1C	F350
368	CFN99241	300.30	113981-49-0	5-Hydroxy-7,8-dimethoxyflavanone	1D	F351
369	CFN98361	328.30	29080-58-8	5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	1C	F352
370	CFN92321	422.47	1221762-70-4	5'-Geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone		
371	CFN97240	284.26	7622-53-9	5-Deoxycajanin		
372	CFN99409	296.27	132351-58-7	5-Acetoxy-7-hydroxyflavone		
373	CFN92429	330.30	13459-07-9	5,7-Di-O-methylquercetin	1A	F353

374	CFN92662	284.31	1036-72-2	5,7-Dimethoxyflavanone		
375	CFN97761	178.14	31721-94-5	5,7-Dihydroxychromone	3A	F354
376	CFN98403	314.30	3162-45-6	5,7-Dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone	1C	F355
377	CFN99666	344.30	1570-09-8	5,7-Dihydroxy-3,4',8-trimethoxyflavone	1C	F356
378	CFN97138	338.31	6665-78-7	5,7-Diacetoxyflavone		
379	CFN98240	368.34	23246-80-2	5,7-Diacetoxy-8-methoxyflavone		
380	CFN98818	428.39	5128-43-8	5,7-Diacetoxy-3,4',8-trimethoxyflavone		
381	CFN96042	332.35	105330-59-4	5,7,4'-Tri-O-methylcatechin		
382	CFN97995	398.40	959421-20-6	5,7,4-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-3-prenylflavone	1C	F357
383	CFN97838	466.53	1246926-08-8	5,7,4'-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-3',5'-diprenylflavone	1C	F358
384	CFN98393	362.30	310888-07-4	5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyflavanone	1D	F359
385	CFN97833	370.40	1268140-15-3	5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavanone	1D	F360
386	CFN92322	422.47	376361-87-4	5,7,2',4'-Tetrahydroxy-3-geranylflavone		
387	CFN92215	360.30	98187-98-5	5,2',6'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	1C	F361
388	CFN99068	318.30	104778-16-7	4-O-Methylsappanol	3E	F362
389	CFN97958	354.40	1038753-13-7	4'-O-Methyllicoflavanone	1D	F363
390	CFN92769	318.32	112529-37-0	4-O-Methylepisappanol		
391	CFN98960	300.30	57096-02-3	4'-Hydroxywogonin	1C	F364
392	CFN90419	162.14	1076-38-6	4-Hydroxycoumarin		
393	CFN92588	256.30	27348-54-5	4'-Hydroxy-7-methoxyflavan		
394	CFN98457	284.30	34818-83-2	4'-Demethyleucomin	3D	F365
395	CFN99082	286.30	107585-77-3	4-Demethyl-3,9-dihydroeucomin	3E	F366
396	CFN98364	300.30	29424-96-2	4',7-Di-O-methylnaringenin	1D	F367
397	CFN92855		2196-14-7	4',7-Dihydroxyflavone		
398	CFN97137	254.20	6665-67-4	4',5-Dihydroxyflavone	1C	F368
399	CFN97322	374.40	83133-17-9	4',5-Dihydroxy-3',5',6,7-tetramethoxyflavone	1C	F369
400	CFN97161	338.40	68097-13-2	4',5,7-Trihydroxy-6-prenylflavone	1C	F370
401	CFN97224	566.50	74336-91-7	4',4''-Di-O-methylcupressuflavone	1C	F371
402	CFN99615		1486-69-7	3-O-Methylquercetin tetraacetate		
403	CFN99616	316.30	1486-70-0	3-O-Methylquercetin	1C	F372
404	CFN98492	300.30	36190-95-1	3'-O-Methylorobol	2A	F373
405	CFN98845	314.30	52117-69-8	3-O-Acetylpinobanksin	1B	F374
406	CFN99685	254.24	162602-04-2	3-Hydroxy-5,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavan		
407	CFN97247	330.33	76792-94-4	3-Hydroxy-4',5,7-trimethoxyflavanone		
408	CFN99081	316.30	107585-75-1	3'-Hydroxy-3,9-dihydroeucomin	3E	F375
409	CFN97892	490.59	1334309-44-2	3'-Geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavone		
410	CFN99229	286.30	113122-54-6	3-Deoxysappanone B	3E	F376

411	CFN92770	302.32	112408-68-1	3'-Deoxy-4-O-methylsappanol		
412	CFN92771	302.32	1052714-12-1	3'-Deoxy-4-O-methylepisappanol		
413	CFN97043	256.25	61135-91-9	3,9-Dihydroxypterocarpan		
414	CFN99025	538.50	101140-06-1	3,8'-Biapigenin	1C	F377
415	CFN99051	356.30	103553-98-6	3,7-O-Diacetylpinobanksin	1B	F378
416	CFN97961	330.30	22697-65-0	3,6-Dimethoxyapigenin	1C	F379
417	CFN92665	406.50	104055-80-3	3',5'-Diprenylgenistein	2A	F380
418	CFN99651	314.30	15486-33-6	3,5-Dihydroxy-4',7-dimethoxyflavone	1A	F381
419	CFN99214	374.40	111537-41-8	3',5-Dihydroxy-4',5',6,7-tetramethoxyflavone	1C	F382
420	CFN99673	288.30	160436-10-2	3',5,5',7-Tetrahydroxyflavanone	1D	F383
421	CFN99369	346.30	125537-92-0	3',5,5',7-Tetrahydroxy-4',6-dimethoxyflavone	1C	F384
422	CFN97558	332.35	97914-19-7	3,4'-Dihydroxy-3,5',7-trimethoxyflavan		
423	CFN99264	300.35	116384-26-0	3',4',7-Trimethoxyflavan		
424	CFN99812	432.42	17245-30-6	3',4',5',3,5,6,7-Heptamethoxyflavone		
425	CFN98617	274.27	38412-82-7	3,4,4',7-Tetrahydroxyflavan		
426	CFN92004	452.54	270249-38-2	2'-Methoxykurarinone		
427	CFN97950	288.25	58124-18-8	2-Hydroxynaringenin		
428	CFN99257	286.20	1156-78-1	2'-Hydroxygenistein	2A	F385
429	CFN97687	270.24	7678-85-5	2'-Hydroxydaidzein		
430	CFN98844	342.30	52096-50-1	2-Hydroxy-7-O-methylscillascillin	2B	F386
431	CFN92673	240.25	41680-08-4	2H-1-Benzopyran-7-yloxy		
432	CFN92674	286.32	770729-34-5	2H-1-Benzopyran-5-ol		
433	CFN99221	302.30	112408-71-6	2',5,7-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	1D	F387
434	CFN97285	288.30	80604-16-6	2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	1D	F388
435	CFN97286	442.42	80604-17-7	2',5,6',7-Tetraacetoxyflavanone		
436	CFN98062	394.42	211799-56-3	2',4',5'-Trimethoxy-2'',2''-dimethylpyrano[5'',6'':6,7]isoflavone		
437	CFN97223	354.40	74161-25-4	2,3-Dehydrokievitone	2A	F389
438	CFN97277	304.30	80366-15-0	2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	1B	F390
439	CFN97157	542.50	678138-59-5	2,3,2'',3''-Tetrahydrochonaflavone	1D	F391
440	CFN96058	384.38	221002-11-5	1''-Methoxyerythrinin C		
441	CFN97933	396.39	150226-21-4	12-Deoxo-12alpha-acetoxyelliptone		
442	CFN97996	426.40	72458-85-6	11-Hydroxytephrosin	2E	F392
443	CFN92834	512.59	956103-75-6	(2R)-8-Methylsocotrin-4'-ol		
444	CFN99183	424.50	17654-26-1	(+)-Taxifolin	1B	F393
445	CFN99138	256.30	970-73-0	(+)-Gallocatechin	1E	F394
446	CFN99568	308.28	7295-85-4	(±)-Catechin hydrate		
447	CFN90163	304.25	225937-10-0	(+)-Catechin hydrate	1E	F395
448	CFN98280	274.27	2545-00-8	(+)-Afzelechin		
449	CFN92415	306.27	176046-04-1	(±)-Sigmoidin A	1D	F396

450	CFN92629	308.28	68745-38-0	(±)-Pinocembrin	1D	F397
451	CFN98030	284.26	2035-15-6	(-)-Maackiain		
452	CFN99571	458.37	4233-96-9	(-)-Galocatechin gallate	1E	F398
453	CFN99137	306.27	3371-27-5	(-)-Galocatechin	1E	F399
454	CFN92081	472.40	83104-87-4	(-)-Epigallocatechin-3-(3"-O-methyl) gallate	1E	F400
455	CFN97549	306.30	970-74-1	(-)-Epigallocatechin(EGC)	1E	F401
456	CFN99569	458.38	989-51-5	(-)-Epigallocatechin gallate	1E	F402
457	CFN92080	456.40	83104-86-3	(-)-Epicatechin-3-(3"-O-methyl) gallate	1E	F403
458	CFN99570	442.38	1257-08-5	(-)-Epicatechin gallate	1E	F404
459	CFN98271	274.27	24808-04-6	(-)-Epiafzelechin		
460	CFN92413	304.30	111003-33-9	(-)-Dihydroquercetin	1B	F405
461	CFN98504	442.37	130405-40-2	(-)-Catechin gallate(CG)	1E	F406