

dc_46_10

Akadémiai doktori értekezés tézisei

**HUMÁN ABC TRANSZPORTEREK
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA**

Homolya László

MTA-SE Membránbiológiai Kutatócsoport

Budapest, 2010.

1. Bevezetés

Az ATP-Binding Cassette (ABC) transzporterek a fehérjék egyik legnépesebb családját alkotják. Az ABC szuperfehérjecs család tagjai a legtöbb élő szervezetben megtalálhatóak a baktériumoktól kezdve egészen az emberig. Definíciójuk szerint a fehérjéket három konzervatív szekvencia motívum megléte alapján soroljuk ehhez a családhoz. Ezek az ATP-kötő fehérjékre jellemző Walker A, Walker B, valamint az ABC transzportereket megkülönböztető „ABC signature” motívum. Az emberi fajban 48 ABC fehérjét azonosítottak, melyeket hét alcsaládba soroljuk. Az alcsaládokat ABCA-tól ABCG-ig betűkóddal jelöljük, az egyes fehérjéket az alcsaládon belül pedig egy további számmal azonosítjuk.

A szekvencia homológián túl az ABC transzporterek nagyfokú szerkezeti hasonlóságot is mutatnak, jellemzően kétféle, funkcionálisan és szerkezetileg elkülönülő egységből épülnek fel. A fent említett konzervált szekvenciákat a citoplazmatikusan elhelyezkedő, 200-250 aminosavból álló globuláris szerkezet, az ún. ABC-egység vagy másképpen nukleotid-kötő domén (NBD) foglalja magába. A fehérjecs család erről az „ATP-kötő kazettáról” nyerte az ABC nevet. Ez a domén képezi a fehérje katalitikus centrumát, itt történik a fehérje működéséhez szükséges ATP-kötés és hidrolízis. Az ABC transzporterek másik jellegzetes szerkezeti egysége a transzmembrán domén (TMD), amely tipikusan 6 membránon átívelő hélixből áll. Általánosan elfogadottá vált, hogy egy működőképes ABC transzporter legalább 2 nukleotid-kötő doménből és 2 transzmembrán doménből áll.

Némelyik ABC transzporter molekulasúlyát tekintve nagyjából fele akkora, mint az ún. „kanonikus” transzporterek, egyetlen NBD-ből, illetve egyetlen TMD-ből állnak. Ezeknek a „féltranszportereknek” dimerizálódniuk kell ahhoz, hogy működőképes egységet alkossanak. Az ABCG alcsalád tagjai is féltranszporterek, ráadásul esetükben a domén sorrend is fordított a szokásoshoz képest, az NBD N-termiálisan helyezkedik el a TMD-hez viszonyítva.

Az ABC transzporterek integráns membránfehérjék, melyek az ATP kötés és hidrolízis energiáját hasznosítva látják el funkciójukat. A legtöbb humán ABC fehérje aktív transzporter, azaz az elektrokémiai hajtóerővel szemben végzi az anyagok transzlokációját. Találunk azonban arra is példát, amikor egy ABC transzporter ionszatórnaként funkcionál (pl. CFTR) vagy hogy más transzporterek működését meghatározó regulátor fehérjeként (pl. SUR1).

Az aktív transzporterként működő ABC fehérjék sajátossága, hogy szemben a P-típusú ATPázokkal, esetükben a transzport ciklus során nem jön létre foszforilált komplex. A hidrolízis eredményeképpen egy feszült állapotú intermedier jön létre, ami kulcsszerepet játszik a transzportált szubsztrát transzlokációjában és a molekulán belüli affinitási viszonyok

megváltozásában. Szintén fontos jellemzője ezeknek a transzportereknek, hogy mind az átmeneti komplex kialakulását, mind az ATP hidrolízis sebességét a legtöbb esetben fokozza a transzportált szubsztrátok jelenléte.

Az ABC transzporterek számos élettani folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszanak. Sokan közülük részt vesznek a szervezet szintű detoxifikálásban (MDR1), az endo- és xenobiotikum elleni védelemben, az oxidatív stressz mérséklésében (MRP1), valamint különböző abszorpciós és szekréciós folyamatok szabályozásában (pl. SUR1/ABCC8). Más ABC fehérjék a lipidanyagcserében töltenek be fontos szerepet (ABCA1, ABCB4, ABCB11), de találunk példát arra is, hogy az MHC I-típusú antigénprezentációban (TAP1/TAP2) vagy a hámfelületek ionháztartásának szabályozásában (CFTR) vesznek részt.

A számos fontos élettani funkcióból következően több ismert örökletes betegség köthető az ABC transzporterekben bekövetkező mutációkhoz. Példaként hozhatjuk a CFTR-t a cisztikus fibrózissal összefüggésben, amely a kaukázusi populációban az egyik leggyakoribb öröklődő betegség. Ritkábban előforduló betegségek, mint a Stargardt-betegség kialakulásáért az ABCA4-ben, a Dubin-Johnson szindrómáért az ABCC2-ben, a pseudoxanthoma elasticum kórképért az ABCC6 transzporter génjében bekövetkező mutációk tehetők felelőssé.

Fontos gyógyászati jelentőséggel bírnak az ún. multidrog transzporterek, melyek a humán tumorokban és *in vitro* sejtes modellekben kereszt-, azaz multidrog-rezisztenciát (MDR) okoznak kémiaiilag és szerkezetileg a legkülönbözőbb citotoxikus drogokkal szemben. Közös jellemzőjük, hogy nagyon széles szubsztrát-felismerő képességgel rendelkeznek, így a klasszikus értelemben vett szubsztrát-specifitásról nem is beszélhetünk ezen transzporterek esetében. Mára már általánosan elfogadottá vált, hogy a multidrog transzporterek a tumorsejtek plazmamembránjában elhelyezkedve a sejtekből kipumpálják a citotoxikus anyagokat, a hatásos „sejtölő” szint alatt tartva az intracelluláris drog koncentrációt. A 48 humán ABC fehérje közül elsősorban az MDR1 (P-glikoprotein, ABCB1) transzportert, az ún. multidrog rezisztencia-asszociált fehérjét (MRP1, ABCC1), valamint az ABCG2 (MXR, BCRP) féltranszportert hozzák összefüggésbe a multidrog rezisztenciával. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy leírtak olyan eseteket is, ahol más ABC transzporterek, pl. az MRP2 (ABCC2), az MDR3 (ABCB4), vagy a BSEP (ABCB11) okoztak keresztrezisztenciát különböző citotoxikus szerekkel szemben.

A korábbi évek kutatómunkája során kimutattuk, hogy az MDR1 fehérje szubsztrátként ismeri fel számos fluoreszcens indikátor AM formáját, és hatékonyan képes kipumpálni a sejtekből. Megfigyelésünk alapja, hogy az MDR1 fehérjét expresszáló sejtekben a festék citoplazmatikus felhalmozódása – a transzportert nem-expresszáló sejtekhez képest - csak

csekély mértékben következik be. Amennyiben MDR1 gátlószert vagy nagy-affinitású szubsztrátot adunk feleslegben a sejtekhez, felfüggeszthetjük a transzporter festékeltávolító aktivitását, és a kontroll sejtekhez hasonló mértékű festékfelhalmozódást érhetünk el. E jelenség alapján kidolgoztunk egy kvantitatív módszert (calcein assay) az MDR1 funkcionális detektálására. Az MDR1 aktivitásának mennyiségi meghatározására egy olyan normalizált mérőszámot vezettünk be, amely egyenes összefüggést mutat a transzporter aktivitással és független a kísérleti körülményektől. Ezt a mérőszámot MDR aktivitásfaktornak (MAF) neveztük el, és a következőképpen kaphatjuk meg:

$$MAF = \frac{F_v - F_0}{F_v}$$

ahol F_v a transzporter teljes gátlása mellett mért festékfelvételi sebesség, F_0 pedig a gátlószert nélküli kapott érték. Korábbi munkáinkban megmutattuk, hogy az MDR aktivitás faktor széles határok között független értéket ad az alkalmazott festék AM koncentrációjától, az inkubálási időtől, a pH-tól és egyéb kísérleti paraméterektől.

Az ABCG2 fehérje az ABCG alcsaládnhoz tartozó féltranszporter. Ezt a fehérjét eredetileg szelektált multidrog-rezisztens sejtvonalakból klónozták, később igazolták, hogy ez a fehérje atipikus multidrog rezisztenciát képes okozni. Endogén expressziója számos szövetben kimutatható, ezek között meg kell említeni a petefészket, a vesét, az emlő hámsejtjeit, a vékonybelet, a vér-agy gátat és a placentát. Az ABCG2 több őssejt-típusban is megtalálható, és elsődlegesen felelős az ún. „side population” fenotípusért, melyet az őssejtek diagnosztikus markereként is szoktak használni. Az ABCG2 szubsztrátjai között számos tumorelles szer szerepel, mint például a mitoxantron, topotekán, flavopiridol, methotrexát. Bár fiziológias szubsztrátjai a mai napig nincsenek feltérképezve, az Abcg2-deficiens egerekkel kapott eredmények arra utalnak, hogy ez a transzporter fontos szerepet játszhat a különböző toxikus anyagok elleni védelemben, valamint a sejt porfirin-háztartásában.

Az ABC fehérjecsald több tagja fontos szerepet játszik a sejtek, illetve a szervezet lipidháztartásában. Különleges és speciális funkciót látnak el a hepatociták kanalikuláris membránjában elhelyezkedő ABC transzporterek. Ezek közül az ABCB11 (BSEP, sister Pgp) fehérje végzi az epesók kanalikuláris kiválasztását, míg az ABCB4 (MDR3) fehérje a foszfatidil-kolin (PC) szekréciójáért felelős. Általánosan elfogadott, hogy az ABCB4 transzporter floppázként működik, azaz a transzportált szubsztrátját a sejtmembrán belső rétegéből a külsőbe fordítja, ami végeredményben nettó kiáramláshoz vezet. A foszfatidil-kolinban feldúsult, feszült állapotú membránrészek egyrészt lefűződnek, PC-vezikulákat hozva létre, másrészt a PC az epekanalikulusba szekretált epesókkal vegyes micellákat képez.

Kiemelt szereppel bír a lipidanyagcserében az ABCA1 transzporter, amely a reverz koleszterin transzport egyik meghatározó eleme. Ez a transzporter felelős a koleszterin és a foszfolipidek lipid-szegény apolipoproteinekre (pl. apoA-I-re) történő transzportjáért mind a periférián, mind a májban és a vékonybélben, - fontos szerepet töltve be a felesleges celluláris koleszterin eltávolításában, illetve a nascens HDL partikulumok előállításában. Bár az ABCA1 egy igen széles körben kutatott transzporter, működési mechanizmusa a mai napig vitatott. Egyrészt kétséges, hogy maga az ABCA1 fehérje transzporter-e vagy csak elősegíti a foszfolipidek és a koleszterin kiáramlását a sejtekből, másrészt megkérdőjelezzük, hogy a transzportfolyamathoz szükséges-e a közvetlen ABCA1-apoA-I kapcsolat, harmadrészt vitatják, hogy mindez a sejt felszínen vagy endocitotikus vezikulákban zajlik.

Az ABCA1 fehérje mutációi húzódnak meg a Tangier-betegség hátterében, amelyet nagyon alacsony HDL-szint, a különböző szövetekben (pl. makrofágokban) történő nagyfokú koleszterin felhalmozódás és korai megjelenésű ateroszklerózis jellemez. Újabban több más familiáris HDL-hiányos betegség, valamint egy igen ritka, öröklődő vérzékenység, a Scott betegség genetikai okaként írtak le az *ABCA1* génben lévő mutációkat.

Egyre növekvő figyelem irányul az ABCG1 féltranszporterre, amely fehérjéről azt feltételezik, hogy a HDL partikulumok további lipidálásáért, koleszterinnel való feltöltéséért tehető felelőssé. Az ABCG4, amely az ABCG1 legközelebbi rokona, az utóbbival - az egész fehérjét tekintve - 72 %-os szekvenenciaazonosságot, bizonyos transzmembrán hélixek vonatkozásában (TMH2 és TMH5) pedig 100 %-os azonosságot mutat. Az ABCG1 alacsony szintű, ubikviter szöveti eloszlást mutat, azonban bizonyos szövetekben, mint az agy, a lép és a tüdő, viszonylag magas expressziót ér el. Hepatikus kifejeződése a szöveti makrofágokra (Kupffer-sejtekre) korlátozódik. Makrofágokban, dendritikus sejtekben, endotél sejtekben és a máj parenchima sejtjeiben expressziója jelentős mértékben fokozható a lipidanyagcseréhez köthető transzkripciós szabályozás révén (LXR, RXR, PPAR γ útvonalakon). Az ABCG4 expressziója – az ABCG1-gyel szemben – csak bizonyos szövetekre korlátozódik, így az agyban és a szemben viszonylag magas ABCG4 szintet találtak, míg a makrofágokban kismértékű expressziót mutattak ki. Az ABCG1-hez hasonlóan az ABCG4 expressziója is indukálható oxiszterollokkal és retiniodokkal, valamint LXR- és RXR-agonistákkal. Mindezek megerősítik azt a feltételezést, hogy ezek a fehérjék funkciója a lipidanyagcseréhez köthető.

2. Célkitűzések

Munkánk alapvető célja az ABC transzporterek transzporttulajdonságainak megismerése, működési mechanizmusának, funkciójának és élettani szerepének megértése. Ezen belül munkánk során a következő konkrét célok megvalósítását tűztük ki feladatul:

- 1.) **Az MRP1 multidrog transzporter funkcionális detektálására** alkalmas fluoreszcens módszert kívántunk kidolgozni, hogy annak segítségével részletesen jellemezzük a fehérje transzporttulajdonságait.
- 2.) Igazolni kívántuk, hogy a korábban kidolgozott módszer, **a calcein assay** nemcsak kutatási célokra alkalmazható, hanem **diagnosztikai jelentőséggel bír a rákgyógyászatban**.
- 3.) Célul tűztük ki **az ABCG2 multidrog fehérje transzporttulajdonságainak** vizsgálatát többféle szempontból. Egyrészt fel kívántuk táni az ABCG2 kölcsönhatását az **Iressa (Gefitinib) nevű tumorelles szerrel**, másrészt vizsgálni akartuk **a membrán koleszterintartalmának** az ABCG2 transzportaktivitására gyakorolt hatását.
- 4.) Módszert kívántunk kidolgozni annak a hipotézisnek az igazolására, hogy **a multidrog transzporterek** nem a citoplazmából szállítják a transzportált szubsztátot a külső térbe, hanem **közvetlenül a membránból pumpálják ki** ezeket a molekulákat.
- 5.) Célul tűztük ki a két kevésbé ismert ABC féltranszporter, **az ABCG1 és az ABCG4 alapvető karakterizálását**: szubsztátjaiknak feltérképezését, dimerizációs partnerük, szubcelluláris lokalizációjuk és szerepük megismerését.
- 6.) Létre akartunk hozni egy olyan kísérleti eszközt, amely lehetővé teszi **az ABCA1 sejt felszíni expressziójának szenzitív követését**, és módszerünkkel vizsgálni kívántuk a különböző koleszterinszint-csökkentő szerek esetleges hatását az ABCA1 sejt felszíni expressziójára és funkciójára.
- 7.) Végül célul tűztük ki a multidrog transzporterek szerepének megértését a szervezet szintjén, az általuk alkotott **védelmi hálózat működésének megismerését**.

3. Az eredmények összefoglalása

Munkám során néhány kiválasztott ABC transzporter jellemzésével foglalkoztam. Ezek között szerepeltek olyanok, amelyek a tumorok multidrog-rezisztenciájáért tehető felelőssé (MDR1, MRP1 és ABCG2), illetve olyanok, amelyek esetlegesen a lipidanyagcserében játszanak szerepet (ABCG1, ABCG4 és ABCA1). Alapvető célunk volt ezen fehérjék működésének megértése, ezért a vizsgálatok nagy részében vagy kidolgoztunk olyan módszert, vagy céljainknak megfelelően módosítottunk meglévő olyan mérési technikát, amellyel specifikusan és megfelelő érzékenységgel tudjuk az adott ABC transzporter aktivitását követni. Ezekkel a funkcionális mérésekkel erőfeszítéseket tettünk a felsorolt ABC fehérjék transzporttulajdonságainak, működési mechanizmusának és alapvető funkciójának megismerésére. Konkrétan a következő eredményeket sikerült vizsgálataink során elérni:

- 1.) Megmutattuk, hogy az MRP1 transzporter képes a calcein acetoxi-metilésztert kipumpálni a sejtekből, így a **calcein assay segítségével nemcsak az MDR1, hanem az MRP1 is vizsgálható**. Megmutattuk, hogy specifikus MRP1 gátlók segítségével a két multidrog transzporter egymás melletti is kimutatható. A kiterjesztett calcein assay segítségével feltártuk, hogy **bizonyos drogokat az MRP1 glutation-konjugátumként pumpál ki a sejtekből**, míg vannak olyanok, melyek transzportja a **glutationtól független**.
- 2.) Sikeresen alkalmaztuk a calcein módszert tumoros betegekből származó klinikai mintákon. Megmutattuk, hogy akut mieloid leukémiában a kemoterápiára adott válasz tekintetében a **calcein assay-vel meghatározott MDR fenotípus prognosztikai jelentőségű faktor**.
- 3.) Egyértelműen megmutattuk, hogy az ABCG2 multidrog transzportert expresszáló sejtekben tapasztalható **Iressa-val szembeni rezisztencia az ABCG2 transzport-aktivitásának a következménye**. Kimutattuk továbbá, hogy a **membrán koleszterintartalma** jelentős mértékben, szelektíven és reverzibilisen **modulálja az ABCG2 transzportaktivitását**.

- 4.) **Az ABCG2 multidrog transzportert GFP-címkével láttuk** el oly módon, hogy a fehérje funkciója és legfőbb jellemvonásai teljes mértékben megőrződtek. A GFP-címkézett variánsok felhasználásával kimutattuk, hogy az ABCG2 az egyik legfontosabb drog-szubsztrátját, a mitoxantront nem a klasszikus mechanizmus révén transzportálja, hanem **közvetlenül a membránból pumpálja ki a sejtekből.**
- 5.) Heterológ expressziós rendszerben sikeresen **kifejeztettük az ABCG1 és ABCG4 fehérjéket**, és mindkettő ellen **létrehoztunk megfelelően érzékeny, specifikus monoklonális ellenanyagot.** Megmutattuk, hogy mindkét fehérje **rendelkezik ATPáz aktivitással**, és **az ABCG1 esetében azonosítottunk 2 szubsztrátot** (rodamin123 és a rodamin6G) és **3 gátlószert** (benzamil, ciklosporin A, L-tiroxin). Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy ezek a féltranszporterek **mind homo-, mind heterodimerként képesek működni.**
- 6.) Az **ABCG1** szerepének vizsgálata során kimutattuk, hogy ez a fehérje **apoptózist indukál makrofágokban** és egyéb sejtípusokban, amely jelenség egyértelműen a fehérje aktivitásának a következménye. Mivel a makrofágok apoptózisa rendkívül fontos az ateroszklerotikus léziók fejlődésében, megfigyeléseink lényeges, új szerepkörbe helyezik az ABCG1 fehérjét.
- 7.) Az ABCA1 transzporterrel végzett munkánk eredményeképpen létrehoztunk egy olyan kísérleti eszközt, amely alkalmas **az ABCA1 sejtfelszíni expressziójának érzékeny és megbízható detektálására.** Ennek az assay-rendszernek a segítségével kimutattuk, hogy **az ezetimib** nevű gyógyszer **az ABCA1 sejtfelszíni megjelenését funkció-függő módon befolyásolja.**
- 8.) Végül megmutattuk, hogy **a multidrog transzporterek** a toxin metabolizmusban résztvevő enzimekkel és egyéb transzporterekkel együtt egy olyan **összefüggő, koordinált működésű hálózatot alkotnak a szervezetben**, amelynek feladata a különböző toxikus hatású anyagok: endo- és xenobiotikumok hatásának semlegesítése és azok eltávolítása a szervezetből.

4. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T., and Sarkadi, B.: Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett*, 1996. **383**(1-2): 99-104.
2. Hollo, Z., Homolya, L., Hegedus, T., Muller, M., Szakacs, G., Jakab, K., Antal, F., and Sarkadi, B.: Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res*, 1998. **18**(4C): 2981-7.
3. Karaszi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakacs, G., Hollo, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejto, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B., and Kappelmayer, J.: Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 2001. **112**(2): 308-14.
4. Elkind, N.B., Szentpetery, Z., Apati, A., Ozvegy-Laczka, C., Varady, G., Ujhelly, O., Szabo, K., Homolya, L., Varadi, A., Buday, L., Keri, G., Nemet, K., and Sarkadi, B.: Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res*, 2005. **65**(5): 1770-7.
5. Telbisz, A., Muller, M., Ozvegy-Laczka, C., Homolya, L., Sente, L., Varadi, A., and Sarkadi, B.: Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(11): 2698-713.
6. Orban, T.I., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Elkind, N.B., Sarkadi, B., and Homolya, L.: Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **367**(3): 667-73.
7. Homolya, L., Orban, T.I., Csanady, L., and Sarkadi, B.: Mitoxantrone expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 2010. in press.
8. Cserepes, J., Szentpetery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Varadi, A., Sarkadi, B., and Elkind, N.B.: Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(3): 860-7.
9. Seres, L., Cserepes, J., Elkind, N.B., Torocsik, D., Nagy, L., Sarkadi, B., and Homolya, L.: Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(10): 2378-87.
10. Kasza, I., Hegyi, Z., Szabo, K., Andrikovics, H., Nemet, K., Varadi, A., Sarkadi, B., and Homolya, L.: Model system for the analysis of cell surface expression of human ABCA1. *BMC Cell Biol*, 2009. **10**: 93.
11. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., and Varadi, A.: Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev*, 2006. **86**(4): 1179-236.
12. Homolya, L., Varadi, A., and Sarkadi, B.: Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*, 2003. **17**(1-4): 103-14.
13. Bakos, E., and Homolya, L.: Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 2007. **453**(5): 621-41.

5. Egyéb saját közlemények jegyzéke

1. Sarkadi, B., Tordai, A., Homolya, L., Scharff, O., and Gardos, G.: Calcium influx and intracellular calcium release in anti-CD3 antibody-stimulated and thapsigargin-treated human T lymphoblasts. *J Membr Biol*, 1991. **123**(1): 9-21.
2. Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesman, M.M., and Sarkadi, B.: Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem*, 1993. **268**(29): 21493-6.
3. Hollo, Z., Homolya, L., Davis, C.W., and Sarkadi, B.: Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1191**(2): 384-8.
4. Sarkadi, B., Muller, M., Homolya, L., Hollo, Z., Seprodi, J., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Price, E.M., and Boucher, R.C.: Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter. *Faseb J*, 1994. **8**(10): 766-70.
5. Homolya, L., Hollo, M., Muller, M., Mechetner, E.B., and Sarkadi, B.: A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer*, 1996. **73**(7): 849-55.
6. Lazarowski, E.R., Homolya, L., Boucher, R.C., and Harden, T.K.: Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): 24348-54.
7. Lazarowski, E.R., Homolya, L., Boucher, R.C., and Harden, T.K.: Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. *J Biol Chem*, 1997. **272**(33): 20402-7.
8. Cressman, V.L., Lazarowski, E., Homolya, L., Boucher, R.C., Koller, B.H., and Grubb, B.R.: Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): 26461-8.
9. Homolya, L., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Koller, B.H., and Boucher, R.C.: Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y(2) receptor (-/-) mice. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): 26454-60.
10. Homolya, L., Steinberg, T.H., and Boucher, R.C.: Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol*, 2000. **150**(6): 1349-60.
11. Hegedus, T., Sessler, T., Scott, R., Thelin, W., Bakos, E., Varadi, A., Szabo, K., Homolya, L., Milgram, S.L., and Sarkadi, B.: C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(3): 454-61.
12. Sinko, E., Ilias, A., Ujhelly, O., Homolya, L., Scheffer, G.L., Bergen, A.A., Sarkadi, B., and Varadi, A.: Subcellular localization and N-glycosylation of human ABCC6, expressed in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **308**(2): 263-9.
13. Ujhelly, O., Ozvegy, C., Varady, G., Cervenak, J., Homolya, L., Grez, M., Scheffer, G., Roos, D., Bates, S.E., Varadi, A., Sarkadi, B., and Nemet, K.: Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(4): 403-12.

14. Paszty, K., Antalffy, G., Penheiter, A.R., Homolya, L., Padanyi, R., Ilias, A., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Enyedi, A.: The caspase-3 cleavage product of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4b is activated and appropriately targeted. *Biochem J*, 2005. **391**(Pt 3): 687-92.
15. Apati, A., Orban, T.I., Varga, N., Nemeth, A., Schamberger, A., Krizsik, V., Erdelyi-Belle, B., Homolya, L., Varady, G., Padanyi, R., Karaszi, E., Kemna, E.W., Nemet, K., and Sarkadi, B.: High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(12): 2700-9.
16. Hegedus, C., Szakacs, G., Homolya, L., Orban, T.I., Telbisz, A., Jani, M., and Sarkadi, B.: Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(1): 47-56.
17. Hou, Y.X., Li, C.Z., Palaniyandi, K., Magtibay, P.M., Homolya, L., Sarkadi, B., and Chang, X.B.: Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport. *Biochemistry*, 2009. **48**(38): 9122-31.
18. Orban, T.I., Apati, A., Nemeth, A., Varga, N., Krizsik, V., Schamberger, A., Szebenyi, K., Erdei, Z., Varady, G., Karaszi, E., Homolya, L., Nemet, K., Gocza, E., Miskey, C., Mates, L., Ivics, Z., Izsvak, Z., and Sarkadi, B.: Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells*, 2009. **27**(5): 1077-87.
19. Torocsik, D., Barath, M., Benko, S., Szeles, L., Dezso, B., Poliska, S., Hegyi, Z., Homolya, L., Szatmari, I., Lanyi, A., and Nagy, L.: Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol*, 2010. **184**(10): 5456-65.
20. Sarkadi, B., Orban, T.I., Szakacs, G., Varady, G., Schamberger, A., Erdei, Z., Szebenyi, K., Homolya, L., and Apati, A.: Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells*, 2010. **28**(1): 174-6.