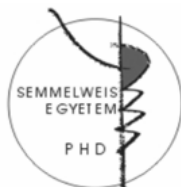


Két kevésbé ismert humán ABCG fehérje expressziója és funkcionális vizsgálata: ABCG1 és ABCG4 jellemzése

Doktori tézisek

Dr. Cserepes Judit

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Sarkadi Balázs
Közvetlen szakmai vezető: Dr. Homolya László

Hivatalos bírálók: Dr. Goda Katalin
Dr. Geiszt Miklós

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Machovich Raymund
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. L. Kiss Anna
Dr. Szilágyi László

Budapest
2008.

BEVEZETÉS

Az ABC (ATP-Binding Cassette) fehérjék integráns membránfehérjék, melyek az egyik legnépesebb fehérjecsaládot alkotják. A fehérjecsalád tagjai jelen vannak baktériumoktól kezdve az emberig valamennyi élő szervezetben. Emberben összesen 48 ABC fehérjét írtak le a Humán Genom Projekt során. Az ABC fehérjék működésük során ATP-t kötnek és hidrolizálnak; a fehérjék az ATP-kötésért felelős ún. ABC domén jelenléte alapján sorolódnak a fehérjecsaládba. Ezt a domént három rendkívül konzervált szekvencia alkotja, a Walker A, a Walker B és az ABC signature motívum. Az ABC fehérjék felépítésében résztvevő másik szerkezeti és funkcionális alegység a hat membránt átívelő hélixből álló transzmembrán domén. A mai elképzelés szerint egy funkcionálisan aktív fehérje minimálisan két ABC és két transzmembrán doménből épül fel. A humán ABC fehérjék között vannak olyanok, melyek egy fehérjeláncon belül tartalmazzák ezt a négy domént (ún. teljes transzporterek), és vannak olyanok, melyek két fehérje dimerizációja révén alakítják ki ezt az aktív szerkezetet (ún. fél-transzporterek).

Az ABC fehérjék funkciójuk alapján három csoportba sorolhatók: vannak aktív transzporterek, melyek szubsztrátjaik koncentrációgrádienssel szembeni transzportját katalizálják, vannak ioncsatornák, ahol az ATP-kötés és hidrolízis a csatorna nyitott-zárt állapotát szabályozza, végül pedig vannak a receptorok, melyek extracelluláris jelek a sejt belseje felé közvetítésében játszanak szerepet. Valamennyi ABC fehérje közös jellemzője, hogy az ATP kötés és hidrolízis során felszabaduló energiát használja funkciója betöltéséhez.

Az ABCG alcsaládba emberben öt fehérjét sorolunk. Az alcsalád tagjai fél-transzporterek, melyek csupán egyetlen ABC és

egyetlen transzmembrán domént tartalmaznak. Az alcsaládon belül vannak olyan fehérjék, melyek homodimert képeznek (ABCG2) és vannak olyanok, melyek heterodimert formálva válnak aktívvá (ABCG5 és ABCG8). Az ABCG2 fehérje – az alcsalád legtöbbet vizsgált tagja – multidrog transzporterként funkcionál, a legtöbb szövetben-szervben expresszálódva a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védekezésében játszik szerepet. Az ABCG5 és ABCG8 fehérjék heterodimert formálva növényi eredetű szterolok, ún. szitoszterolok aktív transzportjáért felelnek. A dimer bármely tagjának mutációja egy ritka örökletes kórkép, a szitoszterolémia kialakulását eredményezi; a betegség a transzporter aktivitásának kiesése következményeként növényi szterolok és a koleszterin megemelkedett plazmaszintjével, következményes ateroszklerózissal és szívinfarktussal jár.

Jóval kevesebbet tudunk ugyanakkor a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék működési mechanizmusáról, lokalizációjáról, fiziológiás illetve patológiás szerepéről. Munkánk kezdetén csupán az őket kódoló két gén volt ismert, illetve azok szabályozásáról állt rendelkezésre néhány adat. A két fehérje szöveti eloszlásának mRNS szintű vizsgálatáról illetve a transzkripció szabályozásának tanulmányozásáról számolt be néhány tanulmány. Mind az ABCG1, mind az ABCG4 expressziójának fokozódását megfigyelték makrofágok lipidekkel való telítése során. Ez az eredmény arra utalhat, hogy a két fehérje szerepet játszik előbbi sejtek lipid-homeosztázisában. Ugyanakkor ezek az eredmények megerősíteni látszottak a két fehérje lehetséges heterodimerizációjáról született feltevést.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk alapvető célja az ABCG1 és ABCG4 fehérje működési mechanizmusának feltárása, funkciójának megismerése volt. A következő konkrét célok megvalósításán dolgoztunk:

1. A humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék heterológ expressziós rendszerben – Sf9 rovarsejtekben – való kifejezését terveztük. A két vad típusú fehérjén túl azok inaktív mutáns variánsát is ki kívántuk alakítani és expresszálni.
2. Céljaink között szerepelt a fehérjék szelektív és szenzitív detektálása érdekében mind poliklonális, mind monoklonális antitestek létrehozása.
3. A fehérjék funkcionális jellemzését különböző *in vitro* módszerekkel terveztük megvalósítani, így ATP-áz aktivitás mérésével és a transzport aktivitás direkt kimutatásával. Előbbi módszerek felhasználásával nagyszámú vegyület kívántunk tesztelni, hogy azonosíthassuk a humán ABCG1 illetve ABCG4 transzportált szubsztrátjait.
4. További célul tűztük ki a két fehérje dimerizációs állapotának vizsgálatát, meghatározni, vajon ABCG2 fehérjéhez hasonlóan homodimerként, vagy ABCG5 és ABCG8 mintájára heterodimerként működnek.

MÓDSZEREK

A humán ABCG1 és ABCG4 cDNS-ét pAcUW21L transzfer vektorba klónoztuk, Sf9 sejteket transzfektáltunk, majd a szükséges inkubáció után összegyűjtöttük a bakulovírust tartalmazó felülúszókat. A fehérjék katalitikus centrumában mutációt hordozó, feltehetően inaktív variánsait PCR mutagenézissel alakítottuk ki. A funkcionális mérésekhez a bakulovírusokkal Sf9 sejteket fertőztünk, majd a sejtekből az ABCG1 és ABCG4 variánsokat tartalmazó membránpreparátumokat készítettünk.

ABCG1 és ABCG4 szelektív detektálására alkalmas poliklonális és monoklonális antitestek létrehozásához a két fehérje intracelluláris felét kifejeztük GST fúziós fehérje formájában, és megtisztítottuk. Egereket ezzel a fúziós fehérjével immunizálva, specifikus poliklonális ellenanyagokhoz jutottunk. A monoklonális antitesteket termelő hibridómák az antitest-termelő sejtek tumorsejtekkel történő fúziója révén készültek. Az így nyert minták közül a szelektív és szenzitív felismerésre alkalmas antitesteket Western blottal azonosítottuk.

A humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék funkcionális vizsgálatát különböző *in vitro* módszerekkel végeztük, így ATP-áz méréssel és a transzport aktivitás direkt detektálásával. Az ABCG1 és ABCG4 fehérjét tartalmazó membránok vanadát-szenzitív ATP-hasító képességét a felszabaduló inorganikus foszfát kimutatása révén vizsgáltuk. A fehérjék alapaktivitásának detektálásán túl, a két fehérjével kölcsönható szubsztrátok és inhibitorok azonosítása érdekében az ATP-áz aktivitás mérésével teszteltünk egy több mint 100 vegyületből álló molekula-könyvtárat.

A transzport aktivitás direkt vizsgálata során két, az ATP-áz aktivitás mérése során szubsztrátnak talált fluoreszcens festék felvételét detektáltuk ép sejteken, illetve membránvezikulákon áramlási citométerrel. Méréseink során vizsgáltuk mind a vad típusú, mind a mutáns fehérjék transzport aktivitását, inhibitorok jelenlétében és hiányában.

Az ABCG1 és ABCG4 fehérjék expressziójának hatását a sejtek életképességére a sejtek tripán-kék festése révén vizsgáltuk, meghatározva az élő sejtek arányát a fertőzést követő különböző időpontokban.

A humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék közti specifikus kölcsönhatás kimutatására vizsgáltuk a két fehérjét együttesen expresszáló membránok aktivitását. Munkánk során tanulmányoztuk a vad típusú és mutáns variánsokat különböző kombinációkban tartalmazó membránok alap-, illetve szubsztrát-stimulált ATP-áz aktivitását.

EREDMÉNYEK

A humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék egymás legközelebbi rokonai, jóslott aminosav-sorrendjük 72%-ban azonos. Szekvenciaelemzés és a membrán-topológia *in silico* modellezése (<http://www.enzim.hu/hmmtop>) alapján megállapítottuk, hogy a két fehérje csupán egyetlen ABC és egyetlen transzmembrán doménnel rendelkezik, valamint az ABC domén N-terminálisan helyezkedik el a transzmembrán doménhez képest.

Az ABCG1 és ABCG4 fehérjék funkcionális vizsgálatához a bakulovírus-Sf9 heterológ expressziós rendszert használtuk, melyet csoportunk sikerrel alkalmazott más ABC fehérjék, így az ABCG2 működésének vizsgálata során is. Ennek érdekében klónoztuk a humán ABCG1 és ABCG4 cDNS-ét a transzfer vektorba, és expresszáltuk a fehérjéket. ABCG1 és ABCG4 katalitikus centrumban mutációt hordozó, feltehetően inaktív mutáns variánsát a Walker A régióban található konzervált lizin metioninnal való helyettesítésével állítottuk elő (ABCG1_{K124M}, illetve ABCG4_{K108M}). Ez az aminosavcsere a fehérjék teljes funkcióvesztését eredményezte az ABCG2, illetve más ABC fehérjék esetén. Az Sf9 membránok háttér aktivitásának meghatározásához β -galaktozidáz expresszálo sejtekből készítettünk membránpreparátumot. Pozitív kontrollként az ABCG2 fehérje egyik variánsát használtunk (ABCG2_{R482G}), mely egy, az általunk használt módszerekkel sokat vizsgált, részletesen jellemzett fehérje. Mind ABCG2-t, mind annak inaktív mutáns változatát (ABCG2_{R482G,K86M}) expresszáltuk Sf9 sejtekben és membránt preparáltunk. Mind ABCG1, mind ABCG4 igen magas, ABCG2-vel közel azonos szinten expresszáldott az Sf9 sejtekben, mindkét fehérje kimutatható volt aspecifikus Coomassie festéssel is a membránok gélelektroforezisének követően.

Munkánk egyik sarkalatos pontja volt a fehérjék közti nagyfokú szekvenciális hasonlóság ellenére szelektív és szenzitív antitestek létrehozása az ABCG1 és ABCG4 ellen. A fehérjék teljes intracelluláris felét használva immunizálásra sikerült a két fehérje megkülönböztetésére alkalmas poliklonális és monoklonális antitesteket nyernünk. Mind a poliklonális, mind a monoklonális anti-G1 antitest érzékenyen ismerte fel ABCG1 vad típusú és mutáns variánsát Western bloton, ugyanakkor nem

kötődött egyetlen kontroll ABCG fehérjéhez sem, illetve egyetlen Sf9 membránfehérjéhez sem. Hasonlóképp, az ABCG4 és ABCG4_{K108M} fehérjékre is specifikus volt a poliklonális és monoklonális anti-G4 antitest. Mind az ABCG1, mind az ABCG4 kb. 60 kDa-nál futott, ami megfelel a jósolt aminosavszekvencia alapján várt értéknek. Az általunk előállított antitestek Western bloton túl alkalmasnak bizonyultak ABCG1 és ABCG4 fehérjék immunfestéssel történő vizsgálatára is.

A két tanulmányozott fehérje funkciójának vizsgálatát több különböző *in vitro* módszerrel végeztük. Az ATP-áz aktivitás vizsgálatának alapja, hogy az ABC fehérjék működésük során ATP-t kötnek és hidrolizálnak, így biztosítva az energiát funkciójuk betöltéséhez. Számtalan korábbi vizsgálat bizonyította, hogy az ABC fehérjék működése jól tanulmányozható az izolált Sf9 membránpreparátumok ATP-áz aktivitásának detektálása révén. Munkánk során az ABCG1 működésének vizsgálatakor a háttér aktivitáshoz viszonyítva magas ATP hasító képességet tapasztaltunk, mely a többi ABC fehérjéhez hasonlóan vanadát-szenzitív volt. Ezt az aktivitást teljes mértékben megszüntette a katalitikus centrumban kialakított mutáció, céljainknak megfelelően ABCG1_{K124M} aktivitása a háttérrel megegyező volt. Hasonlóképp, az ABCG4 esetén is sikerült a fehérjére specifikus aktivitást detektálni, míg az ABCG4_{K108M} variáns inaktív volt. Jóllehet a vad típusú ABCG4 ATP hasító képessége alacsonyabb volt az ABCG1 esetén tapasztaltnál, de a háttér aktivitástól szignifikánsan különbözött.

Az ABC fehérjék transzport-szubsztrátjainak jellemzője, hogy a fehérje ATP hasító képességét fokozzák, míg inhibitoraik gátolják azt. Ennek alapján a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjékkel kölcsönhatásba lépő vegyületek azonosítására

teszteltünk egy több mint 100 vegyületből álló molekulakönyvtárát. A tesztelt vegyületek között szerepeltek kemoterápiás szerek, receptor agonisták, ioncsatorna-szabályozók, hormonok, neurotranszmitterek, konjugált epesavak, koleszterin-származékok, stb. Előbbi vegyületek tesztelése során azonosítottunk két fluoreszcens festéket, melyek jelenlétében az ABCG1 aktivitása fokozódott. Mind rhodamin 123, mind rhodamin 6G koncentrációfüggő módon fokozta a vad típusú ABCG1 ATP-áz aktivitását, előbbi közel kétszeresére, utóbbi kb. másfélszeresére növelte a fehérje alapaktivitását. Mindemellett ezek a vegyületek nem voltak semmiféle hatással ABCG1_{K124M} aktivitására. Ugyanakkor, meglepő módon a tesztelt vegyületek között nem volt egyetlen sem, mely az ABCG4 aktivitását fokozni tudta volna.

Fenti molekulakönyvtár tesztelése szubsztrátok azonosításán túl lehetőséget adott az ABCG1 fehérje inhibitorainak azonosítására is. Az ioncsatorna blokkoló benzamil, az immunszuppresszáns ciklosporin A, a nemi hormon progeszteron, valamint a pajzsmirigyhormon L-tiroxin és trijód-tironin egyaránt gátolták ABCG1 alap-, illetve rhodamin-stimulált aktivitását. Az ABCG4 esetén tapasztalt alacsony ATP-áz aktivitás nem tette lehetővé a fehérje inhibitorainak azonosítását.

Az ATP-áz aktivitás mérés lehetőséget adott a vizsgált fehérjékkel kölcsönhatásba lépő vegyületek azonosítására. A transzport aktivitás detektálása egy másik, a fehérje aktivitásának direkt vizsgálatára szolgáló módszer. A következőkben az ABCG1 szubsztrátjának talált rhodamin vegyületek transzportját vizsgáltuk. Mivel ezek a vegyületek jól detektálható fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező festékek, transzportjuk vizsgálatára kétféle, a fluoreszcencia kimutatásán alapuló módszert használtunk. Az egyik módszer lényege a festék-felhalmozódás

mérése ép sejteken; ezt a módszert korábban sikerrel alkalmazták ABCG2, valamint más ABC transzporterek működésének vizsgálatára. Emellett kidolgoztunk egy új módszert, amikor a tanulmányozott fehérje által katalizált festékfelvételt áramlási citométerrel izolált membránvezikulákon mértük. Jóllehet a pozitív kontrollként használt ABCG2 fehérje esetén mindkét módszerrel detektálható volt az arra specifikus transzport aktivitás, az ABCG1 esetén sem az ép sejt, sem a vezikuláris módszerrel nem tudtuk a fehérje által mediált rhodamin-transzportot kimutatni. Eredményeink egy lehetséges magyarázata, hogy ABCG2, mely egy nagy kapacitású transzporter képes koncentráció-grádiens kialakítására az erősen membrán-permeábilis rhodamin festékek esetén is; ezzel szemben ezekben a mérési rendszerekben az ABCG1 alacsonyabb transzport aktivitása nem detektálható a passzív diffúzióval szemben.

Az előzőekben említett eredményeken túl ezek a transzport mérések egy további igen érdekes megfigyeléshez vezettek, mely meghatározta további vizsgálataink irányát. Ép sejteken végzett méréseink során lettünk figyelmesek ugyanis arra, hogy az ABCG1 fehérje kifejeződése az azt kifejező sejtek pusztulását eredményezi. Az Sf9 sejtek ABCG1-et kódoló bakulovírusral való fertőzése esetén a sejtek pusztulása jóval hamarabb megkezdődött, mint β -galaktozidázt, ABCG2-t, vagy ABCG1_{K124M}-et kifejező sejtek esetén. Ugyanakkor ABCG1-hez hasonlóan, az ABCG4 is fokozta a bakulovírus-fertőzött Sf9 sejtek pusztulását, míg ABCG4_{K108M} nem volt ilyen hatással. Mindezek – illetve a dolgozatban már be nem mutatott további vizsgálatok eredményei – alapján feltesszük, hogy mind ABCG1, mind ABCG4 rendelkezik valamilyen olyan hatással, mely eredményeképpen az őket expresszáló sejtek elpusztulnak.

Amint azt a bevezetőben már említettük, az ABCG alcsalád tagjai ún. fél-transzporterek, melyek homodimerként (ABCG2) vagy heterodimert alkotva (ABCG5 és ABCG8) funkcionálnak. Munkánk céljai között szerepelt a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék dimerizációs állapotának vizsgálata is. A fentebb bemutatott eredmények – miszerint mind ABCG1, mind ABCG4 önmagában expresszálna is szignifikáns ATP-áz aktivitással rendelkezik – arra utalnak, hogy ezek a fehérjék homodimerként funkcionálnak. Ugyanakkor, a szakirodalom felvet számos olyan érvet, mely a két fehérje heterodimerizációját valószínűsíti. Ezek között említendő a két fehérje közti rendkívül nagyfokú szekvenciális egyezés, a hasonló transzkripciós szabályozás, valamint a tény, hogy a két fehérje *Drosophila* homológia heterodimerként funkcionál. Az ABCG1 és ABCG4 lehetséges heterodimerizációjának vizsgálatához koexpresszáltuk a két fehérjét, különböző kombinációkban azok vad típusú és mutáns variánsait, és vizsgáltuk az izolált membránpreparátumok ATP-áz aktivitását. Kontrollként olyan membránokat használtunk, melyek ABCG1, illetve ABCG4 fehérjéket önmagukban – a koexpresszált fehérjékhez hasonló expressziós szinten – tartalmazták. Eredményeink azt mutatták, hogy a vad típusú fehérjéket együttesen kifejező membrán vizsgálata alapján nem eldönthető, hogy csupán a két fehérje aktivitásának összeadódását vagy egy heterodimer fehérje aktivitását detektáljuk. Ugyanakkor, a vad típusú és mutáns fehérjéket koexpresszálnó membránokon végzett kísérleteink bizonyító erejű eredményt adtak: az inaktív ABCG4_{K108M} teljes mértékben megszüntette a vele együtt kifejezett vad típusú ABCG1 aktivitását. Ennek a domináns negatív hatásnak a specifikus voltát bizonyítja, hogy az ABCG2_{K86M} nem volt semmiféle hatással a vele koexpresszálnó ABCG1 fehérjére, illetve ABCG4_{K108M} sem változtatta meg ABCG2 aktivitását. Ezek az

eredmények tehát igazolták a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék közti specifikus kölcsönhatás létrejöttét.

KÖVETKEZTETÉSEK

Dolgozatomban bemutatott munkám során expresszáltuk a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjéket, és elvégeztük funkcionális vizsgálatukat. Mindezt részben a más ABC fehérjéknél már sikerrel alkalmazott módszerek segítségével végeztük el; a két fehérjét a heterológ Sf9 sejt expressziós rendszer révén, az ATP-áz aktivitás mérés és direkt transzport aktivitás detektálása által jellemeztük. Az ABCG1 és ABCG4 fehérjék alapvető jellemzésén túl vizsgálataink ezeknek a transzportereknek számos említésre méltó sajátosságát fedték fel. Az ABCG1 fehérje viszonylag magas alap ATP-hasító képességgel rendelkezik, ami nem jellemző a legtöbb ABC transzporterre. Ugyancsak, a nagyszámú vegyületet tartalmazó molekula-könyvtárból, melyet más ABC fehérjék ismert szubsztrátjaiból állítottunk össze csupán két rhodamin festék rendelkezett aktivitás-fokozó hatással az ABCG1, de nem az ABCG4 esetén. Eredményeink alapján – jóllehet a két fehérje fiziológiás szubsztrátja továbbra sincs azonosítva – feltesszük, hogy a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék transzport-szubsztrátja valamely, a membránban jelenlevő endogén vegyület, és annak aktiváló hatása okozza a jól detektálható alapaktivitást. Ez a feltevés összhangban áll azokkal a közelmúltban megjelent eredményekkel, melyek felvetették az ABCG1 és ABCG4 fehérjék szerepét a lipid-homeosztázisban; vagyis lehetséges, hogy az endogén szubsztrát(ok) lipid természetű vegyület(ek). Funkcionális vizsgálataink, az ATP-áz és transzport aktivitás vizsgálatán túl kiterjedtek a fehérjék egy egészen egyedi

tulajdonságának vizsgálatára is, a fehérjék által okozott sejtpusztulás elemzésére. Ez egy egészen újszerű tulajdonság, melyhez hasonlót nem írtak le eddig egyetlen tanulmányozott ABC fehérje esetén sem.

Munkánk egy másik célja a fehérjék dimerizációs állapotának vizsgálata volt. Dolgozatomban bemutattam, hogy az ABCG1 és ABCG4 fehérjék mind homodimerként, mind heterodimert formálva képesek működni. Mivel a két fehérje szöveti eloszlása csupán részben fedi egymást, feltesszük, hogy a két fehérje heterodimert alkot azokban a szövetekben, ahol mindkét fehérje jelen van, míg máshol homodimerként működnek.

Összefoglalva, munkánkkal elsőként valósítottuk meg a humán ABCG1 és ABCG4 fehérjék expressziós rendszerben való kifejezését és funkcionális jellemzését, melyek a legújabb elképzelés szerint a lipid metabolizmusban illetve aterogenezisben szerepet játszó transzporterek. Munkánk eredményei alapot jelenthetnek a két fehérje működésének, azon keresztül pedig a lipid-anyagcsere, illetve ateroszklerózis további kutatása során.

Saját publikációk jegyzéke:

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization.

Cserepes J, Szentpetery Z, Seres L, Özvegy-Laczka C, Langmann T, Schmitz G, Glavinas H, Klein I, Homolya L, Váradi A, Sarkadi B, Elkind NB.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 30;320(3):860-7.

Seres L; Cserepes J; Elkind NB; Töröcsik D; Nagy L; Sarkadi B; Homolya L.

Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types

BBA – Biomembranes (közlésre elfogadva)

Egyéb publikációk:

The role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism, and Toxicity

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, and Sarkadi B.

Current Drug Delivery, 2004, 1, 27-42

Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters

Özvegy-Laczka Cs, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B.

Drug Resistance Updates 8, 2005, 15–26