

# Membránfehérjék vizsgálata vörösvértesteken, a kapcsolódó genetikai variánsok azonosítása és jellemzése

Doktori tézisek

**Zámbó Boglárka**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sarkadi Balázs, PhD, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Enyedi Balázs, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Goda Katalin, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nyitray László, DSc, egyetemi tanár

Dr. Rónai Zsolt, PhD, egyetemi docens

Budapest

2018

## **Bevezetés:**

Az eukarióta sejtek komplexitásának egyik alappillére a kompartmentalizáció. Az egyes kompartmenteket lipidek határolják, melyen az anyagok átjutása csak kontrollált módon, membránfehérjéken keresztül lehetséges. A legtöbb élőlény genomjának 20-30%-a membránfehérjét kódol, a humán genom is csaknem 10.000 membránfehérjét foglal magában. Ezek a fehérjék kiemelten fontosak a gyógyszerhatóanyag tervezéskor: sok anyag ezeken hat, vagy szubsztrátja lehet a membránban lokalizálódó transzportereknek, így az ADME-Tox folyamatok aktív résztvevői ezek a fehérjék. Jelenlegi becslések szerint a jövőben a gyógyszerek csaknem fele membránfehérjéket célozhat meg.

A vörösvértetek könnyen hozzáférhetőek és mivel rendkívül sok van ezekből a sejtekből akár egy csepp vérben is, kiválóan használhatóak a membránfehérje szintek vizsgálatára. A membránfehérjék mennyiségének meghatározása viszont nehézségekbe ütközik, mivel a lipidkörnyezet megnehezíti az izolálásukat és vizsgálatukat. Egy másik nehezítő tényező, ha ezeknek a fehérjéknek többféle variánsa megtalálható a sejtek felszínén. A különféle proteomikai irányú kísérletek (tömegspektrometria, 2D és 1D gél-proteomikai, 2D-nano-HPLC eredmények) eredményei ellentmondóak, gyakran fontos vércsoport antigéneket nem találtak meg, viszont olyan fehérjéket azonosítottak, amelyek egyéb vérsejtekre jellemzőek. Ugyanakkor ezeket a méréseket összevetve megállapítható, hogy a vörösvértetekben több mint 300 membránfehérje megtalálható, köztük több olyan is, amelyek diagnosztikai vagy prognosztikai célból érdekesek lehetnek.

Munkacsoportunk beállított egy olyan, antitest jelölésen alapuló technikát, mely segítségével kvantitatívan tudjuk mérni vörösvértetekben a membránfehérjék mennyiségét. A méréseinkhez csupán egy csepp vér levétele szükséges. Két fehérje mérése során több önkéntes véradó donor esetén kiugróan alacsony fehérjeszintet tapasztaltunk. Az egyik fehérje a vörösvértetek fő kalcium-ion exportere, a PMCA4b volt. A másik az ABCG2 xeno- és endobiotikum transzporter, mely a bélben fontos szerepet játszik a húgysav eltávolításában is, így szoros összefüggést mutattak ki a fehérje diszfunkciója és a köszvény kialakulása között.

### **Célkitűzés:**

PhD munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

1. Az alacsonyabb PMCA4b fehérje szinttel rendelkező önkéntes donorok genetikai vizsgálatát szerettem volna elvégezni, a csökkent expresszió hátterében meghúzódó genetikai variáns(oka)t azonosítani.

Az eredmények alapján szerettem volna továbbá az azonosított variánsok expresszióra gyakorolt hatásának pontos molekuláris mechanizmusát megérteni.

2. Az alacsonyabb ABCG2 fehérje szinttel rendelkező önkéntes donorok és köszvényes betegek genetikai vizsgálatát szerettem volna elvégezni, a csökkent expresszió hátterében meghúzódó genetikai variáns(oka)t feltárni.

Az eredmények alapján szerettem volna ebben az esetben is az azonosított variánsok expresszióra gyakorolt hatásának pontos molekuláris mechanizmusát megérteni.

### **Módszerek:**

1. Fehérje szintek meghatározása vörösvértesteken egy új, a munkacsoport által beállított technika segítségével:

#### *Véradó donorok*

Az egyik csoportunk 155 (PMCA4b) és 127 (ABCG2) intézeti egészséges fiatal véradó önkéntesből állt, tőlük ujjbegyszúrással vettünk vért. Emellett a klinikus partnereinktől (ORFI, Dr. Poór Gyula és Dr. Pálincás Márton) is kaptunk EDTA-antikoagulált vérmintákat, köszvényes betegektől (n=64) és nembn és korban megegyező kontrolloktól (n=37).

#### *Ghostok képzése és jelölés*

A jelölés előtt a vörösvértestekből az antitestek számára átjárható membránt (ún. ghostokat) készítettünk egyhe paraformaldehides fixálással. Ezeket a ghostokat egy plate-en először megfelelő elsődleges (anti-PMCA4b – JA3, anti-ABCG2 – Bxp-34) antitestekkel inkubáltunk, majd Alexa Fluor-488 konjugált másodlagos antitesttel

jelöltük. A ghostok, kis méretüknél fogva, nem különülnek el megfelelően az FSC-SSC csatornában, ezért jelölt búzacóra agglutinint (WGA-Alexa Fluor-647) használtunk az elválasztásukra.

#### *Mérés áramlási citométeren*

A mérést HTS-sel (plate olvasóval) felszerelt Canto II (BD) áramlási citométeren végezzük. A kapuzás során először az FSC-SSC csatornában a ghostokat elkülönítjük a nem fixálódott sejtektől. Ezután a WGA-Alexa Fluor-647 jele alapján a ghostokat elkülönítjük a kosz-zónától. Az antitest jelünket az Alexa Fluor-488 fluoreszcencia alapján határozzuk meg a ghostokon. A relatív expressziót úgy kaptuk meg, hogy az elsődleges antitestet tartalmazó lyukak fluoreszcenciájának mediánját elosztottuk az azonos mintán izotípus antitesttel mért medián értékekkel.

## 2. Genetikai analízis és DNS-konstrukciók

#### *Sanger-szekvenálás*

A genomiális DNS-t vérből nyertük ki. Az exonokat és exon-intron határokat tartalmazó szakaszokat primerek segítségével PCR-rel szaporítottuk fel, majd Sanger-szekvenálásra küldtük.

#### *TaqMan alapú genotipizálás*

Az azonosított mutációkat és SNP-eket TaqMan alapú qPCR módszerrel határoztam meg nagyobb mintaszámon. A próba specificitását szekvenálással ellenőriztem minden esetben.

#### *DNS konstrukciók*

A pcDNA-ABCG2 vektorban mutagenezissel készítettem el az M71V mutációt hordozó konstrukciót. A mutáns c-DNS-t szubklónoztam pEGFP-C1 és pIRES2 vektorokba.

Az *ATP2B4* enhanszer vizsgálathoz pGL3-basic vektorba az *ATP2B4* gén 1. intronjában elhelyezkedő haplotípus részletet helyeztem be. Az enhanszert egy vad típust hordozó és egy homozigóta variáns hordozó kontrollból nyertem ki PCR segítségével.

### 3. Az M71V variáns vizsgálata sejteken

Az M71V mutáció hatását HEK293H és HeLa sejteken végeztem. A sejtvonalakat lipofektaminnal transzfektáltam. Kezelés esetén 24 órával a transzfekció után adtam a sejtekhez a különféle anyagokat: 1 mM 4-PBA-val (Dr. Váradi Andrástól kaptuk), 1  $\mu$ M kolhicinnel (Sigma-Aldrich) és inkubáltam további 24 órán át a mérés előtt. A felszíni expressziót egy külső ABCG2 epitópot felismerő antitesttel határoztam meg (5D3). Az ABCG2 funkciójának meghatározásához Hoechst 33342 festéket használtam. A transzport mérés előtt 5 percig 37 °C-on inkubáltam a sejteket 2  $\mu$ M KO-143 inhibitorral vagy a nélkül. A mérés 1  $\mu$ M Hst hozzáadásával indult. 80 másodpercig – mivel ez volt a szubsztrát felvételének lineáris fázisa - folyamatos mintavételezéssel követtem nyomon a Hst jelét áramlási citométeren a GFP-pozitív (azaz transzfektálódott) sejteken.

### 4. Az *ATP2B4* enhanszer vizsgálata

HEK293H és K562 sejteken végeztem el az *ATP2B4* enhanszer vizsgálatát. A sejtvonalakat lipofektaminnal transzfektáltam, majd 48 órával transzfekció után mértem. A relatív expressziót a régióról dual-luciferáz esszével határoztam meg a gyártó leírása szerint.

### 5. Vörösvértest membránpreparátum készítése és Western-blot

A vörösvértestekből Wolf-Schatzman módszerrel izoláltam membránt. A vörösvértest membránfehérje preparátumokból egyforma mennyiséget (Lowry-Folin módszer alapján) vittünk fel akrilamid géltre. Elektroforézis után PVDF membránra átblottoltuk a fehérjéket és immunfestettük a membránt. Az alábbi elsődleges antitesteket használtuk: anti-pan PMCA (5F10), anti-PMCA4 (JA9), anti-PMCA4b (JA3), anti-PMCA1 (NR1). Majd tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-egér antitesttel jelöltük tovább. Pierce ECL Western Blot szubsztrát segítségével luminográfiás eljárást használtunk a fehérjék megjelenítésére, majd röntgenfilmen rögzítettük a jeleket.

### 6. Kalcium transzport mérések vörösvértesteken

A vörösvértestek kalcium transzport aktivitását Fluo-4 fluoreszcencia alapú kalcium influx mérésekkel határoztam meg áramlási citométeren. A mérés során Fluo-4-gyel

előinkubáltam a vörösvértesteket, majd ionomycin hozzáadásával indítottam a kalcium-ion influxot. Úgy állítottam be a kalcium-ion és ionomycin koncentrációt, hogy az *ATP2B4* haplotípus 1 vad típusú vörösvértestekben 15 perc alatt a kezdeti alacsony szintre állt vissza az intracelluláris kalcium szint.

## **Eredmények:**

### 1. A PMCA4b vizsgálata

#### *1.1 A Western-blot analízis eredményei vörösvértest membránokon*

A Western-blot során a citométeres mérések szerinti két alacsonyabb és egy normál PMCA4b expressziót mutató ember PMCA4b, PMCA4, PMCA1 és pán-PMCA szintjeit határoztuk meg. Ez alapján a PMCA4b helyett nincs jelen a PMCA4a variánst, azaz nincs splicingot érintő változás a génben. A PMCA4b mérete megfelelő, csak a szintje csökkent le a membránban. Nincs érdemleges kompenzáció a PMCA1 fehérje által.

#### *1.2 Az ATP2B4 gén exon-szekvenálása és qPCR vizsgálata*

Kiválasztottam hat eltérő expresszióval rendelkező (két nagyon alacsony, kettő közepes és kettő normális vagy magasabb expressziót mutató) egyént, rajtuk vizsgáltam Sanger-szekvenálással az exonokat és exon-intron határ régiókat. A szekvenálás három haplotípust (együtt öröklődő gyakori SNP-k, „allél”, H1, H2 és H3) és egy 5'UTR-ben, a promóter környékén elhelyezkedő variánst tárt fel. Ezek közül egyik sem okoz a fehérje szekvenciában változást, hiszen vagy nem kódoló régióban van, vagy szinonim SNP. A teljes önkéntes donor mintákon a három haplotípus SNP-i közül egy-egyre specifikus (ún. haplotípus jelölő vagy tagging SNP) és a promóter variánsra specifikus qPCR genotipizáló próbákat futtattam, melynek eredménye azt mutatta, hogy a H1 felelős a csökkent PMCA4b fehérje szintért.

#### *1.3 Kalcium efflux mérések vörösvértesteken*

A mérést egy – a H1-re homozigóta hordozó – donor, egy heterozigóta és egy vad típusú donor vörösvértestjein végeztem el. A heterozigóta és homozigóta egyén vörösvértestjei sérült PMCA4b funkciót mutattak, a mérési időintervallumban a

vörösvértestjeik nem voltak képesek maradéktalanul kipumpálni a bejutó kalciumot, ellentétben a vad típussal. Ezzel sikerült alátámasztanunk, hogy a csökkent fehérje szint a membránban a pumpafunkció romlásával is együtt jár.

#### *1.4 Dual-luciferáz mérések a haplotípus hatásának vizsgálatára*

A haplotípusnak csak az eritroid eredetű K562 sejtekben volt expressziót csökkentő hatása, a kontroll HEK293 sejtekben nem volt hatása az expresszióra. Tehát ez a régió egy eritroid specifikus enhanszer, mely más sejtvonalakban nagy valószínűséggel nem működik.

## 2. Az ABCG2 vizsgálata

### *2.1 Az ABCG2 fehérje szintje köszvényes és kontroll embereken*

64 köszvényes betegen, 37 nemben és korban illő kontroll és 127 egészséges (intézeti) kontroll egyén vörösvértestjein végeztük el az ABCG2 fehérjeszint méréseket. Összehasonlítva a köszvényes csoportot a teljes kontroll csoporttal megállapítottam, hogy az ABCG2 fehérje szintje szignifikánsan csökkent a betegeken.

### *2.2 TaqMan alapú genotipizálás a Q141K gyakori variánsra*

Mivel a hazai populációban minden ötödik ember hordozza a Q141K variánst, és tudjuk, hogy csökkenti a fehérje expressziós szintjét, ezért TaqMan alapú genotipizálással állapítottuk meg az egyes csoportokon belül a Q141K előfordulását. Az eredmények azt mutatták, hogy ez az SNP mind heterozigóta, mind homozigóta formában gyakoribb volt az alacsonyabb expressziójú egyének között, illetve feldúsultak a köszvényes egyének között. A heterozigóta egyéneknek az átlagos vörösvértest ABCG2 expressziós szintje  $82\% \pm 17\%$ , a homozigóta hordozóknak  $56\% \pm 7\%$  volt a homozigóta vad típusúakhoz viszonyítva.

### *2.3 Sanger-szekvenálás*

Néhány önkéntes véradó esetén a vörösvértest ABCG2 expresszió csökkenése nem volt magyarázható a Q141K jelenlétével (mindannyian közel 50%-os ABCG2 expressziót mutattak). Ezekben az esetekben Sanger-szekvenálást végeztem a gén teljes kódoló és exon-intron határ régióin. Találtam három egyént, akik heterozigóta formában

hordozták az R236X mutációt, mely a fehérje korai terminálódását és lebontását okozza. Találtam egy embert, aki az R383C variánst hordozza. Mindezek mellett két (egy köszvényes és egy kontroll) egyénben találtam egy új, eddig nem karakterizált, M71V aminosav cserével (n.211A>G, rs148475733) járó mutációt.

#### *2.4 TaqMan alapú genotipizálás a mutációkra nagy mintaszámon*

További 278 egészséges véradó donorból (Országos Vérellátó Szolgálat, Dr. Andrikovics Hajnalka) származó DNS-en megvizsgáltam a mutációk jelenlétét qPCR alapú genotipizáló próbákkal. A minor allél frekvenciák a következők: MAF(R236X)=0,0037; MAF(M71V)=0,0049; MAF(Q141K)= 0,0963. Az R383C-t nem fordult elő egyszer sem a 278 fős mintában. Az M71V a többi ritka variánshoz viszonyítva hasonló gyakoriságban fordul elő, a magyar (kaukázusi eredetű) populáció körülbelül 1%-a heterozigóta formában hordozza.

#### *2.5 Membrán expressziós vizsgálatok emlős sejteken*

Mind HEK293, mind HeLa sejtekben az M71V fehérje szintje körülbelül 60-70% a vad típusúhoz viszonyítva, hasonlóan a Q141K variánshoz. Vagyis ugyanúgy, mint a vörösvértesteken, a tranziens expressziós kísérletekben is csökkent membránfehérje szintet tapasztaltunk.

#### *2.6 Funkcionális vizsgálatok emlős sejteken*

Az M71V variánst hordozó fehérje transzportálta a Hoechst 33342 festéket. Vagyis a pumpafunkció sértetlen, csak a fehérje szintje csökken le.

#### *2.7 A sérült ABCG2 fehérje kiegészése a membránba kémia chaperonok segítségével*

A klinikumban is használt kolhicin kezelés hatására mind a vad típusú, mind az M71V variánst hordozó fehérje szintje megemelkedett. A 4-PBA csak a vad típusú fehérje szintjét emelte meg szignifikánsan.



### **Következtetések:**

1. A vörösvértest expressziós mérések alkalmasak eddig nem azonosított variánsok megtalálására

A vörösvértest expressziós mérések során csupán egy csepp vérből a levételt követő három órán belül akár 10-20 membránfehérje szintjét meg tudjuk állapítani. Munkám során az általunk kifejlesztett módszert a hazai populációban jellemző, expressziós szintet érintő variánsok azonosítására használtam két fehérje, a PMCA4b kalcium exporter és az ABCG2 endo- és xenobiotikum transzporter esetén.

- A PMCA4b esetén találtam egy eritroid specifikus enhanszerben elhelyezkedő haplotípust, melynek protektív hatása van malária esetén GWA tanulmányok alapján.

- Az ABCG2 génben több defektív mutációt azonosítottam. Az R236X a fehérje korai terminálódását és lebomlását okozza. Az R383C egy fontos sóhíd megszűnését okozza, mely következtében a fehérje inaktív és instabil. Ezek mellett egy új, eddig nem ismert variánst is azonosítottam, az M71V-t, mely a hazai populációban viszonylag gyakori.

2. A vörösvértest expressziós mérések prognosztikai vagy diagnosztikai szempontból is hasznosak lehetnek

- PMCA4b esetén az azonosított haplotípus szoros korrelációban volt a vörösvértest expressziós értékekkel, azaz a haplotípus kimutatására alkalmas lehet ez a módszer.

- Az ABCG2-ben több olyan variáns előfordul, mely a fehérje szintjét vagy aktivitását befolyásolja. A GWA tanulmányok alapján az ABCG2 egyéb szabályozó régióiban előforduló, például intronikus vagy promóter SNP-k is szerepet játszhatnak a köszvényben, tehát valahogyan az ABCG2 aktivitását vagy expresszióját befolyásolhatják. A vörösvértest expressziós mérések során is találtunk olyan önkéntes donorokat, akik alacsonyabb ABCG2 szinttel rendelkeznek, de az exon szekvenálás során nem sikerült feltárni a háttérben húzódó variánst vagy egyéb regulációs módosulásokat. Ezért a vörösvértest alapú membránszint meghatározás kifejezetten előnyös lehet ennek a fehérjének a klinikai vizsgálata során.

Tehát az általunk beállított vörösvértest szinteket célzó mérések – az új variánsok azonosítása mellett - alkalmasak lehetnek a membránfehérjék direkt kvantitatív meghatározására prognosztikai vagy diagnosztikai célokból. A szakirodalomban nem találtam más hasonló módszert, mely egy csepp vérből képes lenne több membránfehérje szintjén párhuzamosan, gyorsan és egyszerűen meghatározni. A legtöbb molekuláris diagnosztikai labor felszerelt áramlási citométerrel, így a módszer alkalmas lehet a jövőben a klinikus partnerek segítésére is.

### 3. A vörösvértest expressziós mérések limitációi

- A vörösvértesteken több mint 300 membránfehérje megtalálható a legújabb tömegspektrometriás adatok alapján. Viszont lehetnek olyan fehérjék, melyek ezeken a sejteken nem expresszálódnak, így ezekben az esetekben a módszer nem alkalmas a fehérjeszint mérésekre.
- A membránfehérjék jelölésére jó antitestekkel kell rendelkezniük. Az általunk kipróbált 40 fehérjét célzó antitestből összesen 35 tudta egyáltalán detektálni a fehérjét, és ezek közül is csak 11 adott a kvantitatív mérés szempontjából megfelelő jelet.

### 4. A PMCA4b-t érintő haplotípus jelentősége

A PMCA4b fehérjét kódoló *ATP2B4* génben azonosítottam egy haplotípust, mely:

- a vörösvértesteken heterozigóta formában körülbelül 75%-os, homozigóta formában körülbelül 50%-os fehérjeexpressziót eredményez. A többi PMCA izoforma és variáns nem érintett.
- körülbelül 0,1 minor allél frekvenciával rendelkezik Magyarországon, de a malária endemikus területeken ennél jóval gyakoribb.
- befolyásolja a vörösvértestek kalcium exportját, mivel ez a vörösvértestek fő kalcium exporter fehérjéje.
- egy eritroid specifikus enhanszerben van, mely az eritroid sejtvonalakban irányítja a fehérje expresszióját. Más típusú sejtekben valószínűleg nincs hatással az expresszióra.

## 5. Az ABCG2-ben azonosított SNP-k, mutációk jelentősége

Köszvényes betegeket és egészséges kontrollokat vizsgálva megállapítottam, hogy:

- a köszvényes betegek vörösvértestjein az ABCG2 szintje alacsonyabb.
- a köszvényes emberekben gyakrabban fordul elő az ABCG2 gyakori, Q141K aminosav cserét okozó variánsa. Ez a variáns csökkent expressziót okoz a vörösvértesteken is.

Emellett több embert találtam, akik közel 50%-os expresszióval rendelkeztek. Ezekben az emberekben három ritka mutációt azonosítottam:

- az R236X a fehérje korai terminálódását és lebomlását okozza.
- az R383C aminosav csere a fehérje egyik kritikus sóhídját teszi tönkre, így a fehérje nem működik és instabil.
- az M71V-t ez idáig nem azonosították. Egyszerű sejtes módszerekkel alátámasztottam, hogy az M71V aktív, csak instabil és lebomlik. Ezt sikerült kolhicinnel korigálnom.

### **Saját publikációk:**

Várady G, Szabó E, Fehér Á, Németh A, Zámbó B, Pákáski M, Janka Z & Sarkadi B (2015) Alterations of membrane protein expression in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* 2015;1(3):334–338.

Zámbó B, Várady G, Padányi R, Szabó E, Németh A, Langó T, Enyedi Á & Sarkadi B. Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene. *Cell Calcium* 2017;65:73–79.

Zámbó B, Bartos Z, Mózner O, Szabó E, Várady G, Poór G, Pálinkás M, Andrikovics H, Hegedus T, Homolya L & Sarkadi B. Clinically relevant mutations in the ABCG2 transporter uncovered by genetic analysis linked to erythrocyte membrane protein expression. *Sci. Rep.* 2018;8(1):7487.2.