

ABCG2 membrán transzporter fehérje sejten belüli közlekedésének vizsgálata: a vad típusú és SNP-t hordozó variánsok összehasonlítása

Doktori tézisek

Bartos Zsuzsa

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Homolya László, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Csanády László, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Dr. Goda Katalin, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottsága:

Elnök: Dr. Csala Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Rónai Zsolt, egyetemi docens

Dr. László Lajos, egyetemi docens

Budapest
2021

1. BEVEZETÉS

Az ABC (ATP-binding cassette) fehérjék az aktív transzporterek közé sorolhatók, mivel a szubsztrátok szállításához szükséges energiát ATP kötéséből és bontásából fedezik és a nukleotid hidrolízise vezet a fehérjének olyan konformáció változásához, amely az anyagok transzportját biztosítja. Az ABC transzporterek általában két nukleotid kötő doménből és két transzmembrán doménből állnak. Az ABCG2 az úgynevezett fél-transzporterek közé tartozik, mely homo-dimer formában alakot egy funkcionális egységet.

Az ABCG2 transzmembrán transzporter az emberi szervezetben számos határfelületein megtalálható a plazmamembránban, polarizált sejtekben pedig az apikális felszínen helyezkedik el. Az ABCG2 fő feladata a szervezet védelme, mely során endo- és xenobiotikumokat transzportál kifelé a sejtekből. A fehérje endogén szubsztrátjai közé tartozik a húgysav is, melynek exkréciójában a transzporter a gasztrointesztinális traktusban és a vese proximális tubulásában vesz részt. Mindemellett a gyógyszerek és kemoterápiás szerek transzportja révén az ABCG2 szerepet játszhat a multidrog rezisztencia kialakulásában is tumorsejtekben.

Az ABCG2-nek számos genetikai polimorfizmusa ismert, melyek döntő többsége (90%) SNP. Ezek közül a legtöbbet vizsgált változat a Q141K variáns, melynek előfordulási gyakorisága az ázsiai populációban magasabb (20-40%), azonban a kaukázusi etnikumban is eléri a 10%-ot. A Q141K mutációt hordozó változatról leírták, hogy funkcionálisan aktív transzporter, azonban a fehérje expressziója alacsonyabb a vad típushoz képest és trafficking problémákat mutat. Ez az SNP a húgysav kiválasztásának zavara révén gyakoribb elfordulással figyelhető meg köszvényes és hiperurikémiás betegekben, mint az egészséges embereknél.

2. CÉLKITŰZÉS

PhD munkám során az ABCG2 fehérje variánsok tanulmányozásával foglalkoztam:

- köszvényes betegek vérmintában azonosítottak egy új ABCG2 változatot, az M71V-t. Ez a változat a fehérje expresszióját a felére csökkenteti az eritrociták felszínén a vad típusal homozigóta formában. Az ABCG2-nek ezt az új mutációját kívántam *in vitro* körülmények között is jellemezni expresszió, lokalizáció és funkció tekintetében.
- az ABCG2 fehérje változatok plazmamembránba történő kihelyeződésének kinetikáját igyekeztem feltárni az endoplazmatikus retikulimtól (ER) a plazmamembránig. A vad típusú és SNP-t hordozó ABCG2 variánsok (M71V és Q141K) sejten belüli útjának összehasonlításával próbáltam minél jobban megérteni és magyarázatot találni a mutáns változatok csökkent fehérje és plazmamembrán expressziójára.
- különböző traffickinget befolyásoló anyagok hatásait kívántam vizsgálni az ABCG2 változatok fehérje érésére és sejten belüli közlekedésére.

3. MÓDSZEREK

- Kísérleteimhez pcDNA3.1, pEGFP, pIRES-GFP, pAcUW-21-L és Str-Ii_SBP-EGFP (RUSH vektor) plazmid konstrukciókat hoztam létre, melyek az ABCG2 vad típusú, M71V, K86M, vagy a Q141K változatát tartalmazták. A plazmidok előállításához mutagenézis PCR-t, klasszikus, restrikciós enzimes szubklónozást és Gibson-féle klónozási technikákat alkalmaztam.
- Méréseimhez humán (HEK293, HeLa), emlős (MDCKII) és rovar (Sf9) sejtvonalatokat használtam. Az ABCG2 fehérjét transzfekciót követően (Lipofectamine 2000, Magnetofection) tranziensen vizsgáltam.
- A plazmidokról átíródó ABCG2 mRNS szinteket qPCR technikával ellenőriztem.
- Az ABCG2-M71V in vitro jellemzését klasszikus molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel végeztem:
 - Az ABCG2 fehérje expressziójának vizsgálatára Western blot technikát alkalmaztam, melynél specifikus ABCG2 ellenanyag (Bxp-21) segítségével denzitometrálassal határoztam meg a protein tranziens kifejeződését.
 - Az M71V lokalizációját immunfluoreszcens jelöléseket (ABCG2 antitest: Bxp-21, bazolaterális marker: Na⁺-K⁺-ATPáz antitest, sejtmag: DAPI) követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltam.
 - Az ABCG2 változatok funkcionális vizsgálatához ATPáz aktivitás mérést alkalmaztam a transzporter variánsokat kifejező Sf9 membránpreparátumokon. A mérések során az ATP hasításból származó anorganikus foszfát mennyiségét kolorimetriásan határoztam meg spektrofotómeter segítségével.

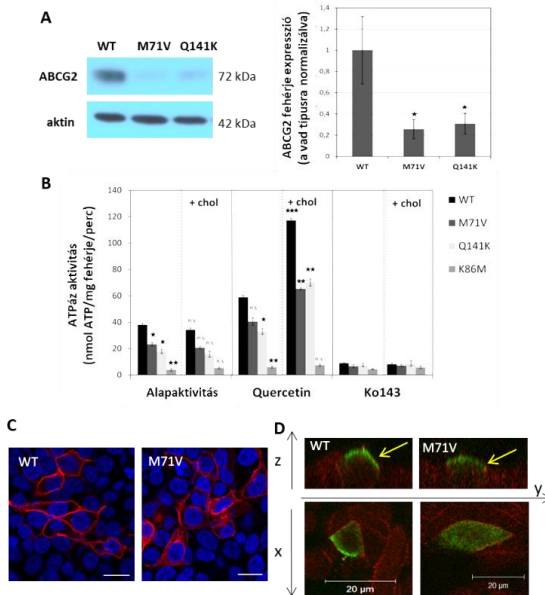
- Az ABCG2 sejten belüli mozgásának nyomon követéséhez a fehérje variánsait a RUSH (retention using selective hooks) rendszerben vizsgáltam:
 - Az ABCG2 variánsok fehérje expresszióját, valamint a fehérje érését Western blot módszerrel mértem (Bxp-21 antitest). Az ABCG2 N-glikozilált formájának azonosításához EndoH és PNGáz F glikozidáz enzimeket használtam.
 - Az ABCG2 sejten belüli lokalizációját biotin kezelés nélkül, illetve biotin hozzáadását követően különböző időpontokban: ER marker (élő sejtek jelölése ER-Tracker Red fluoreszcens festékkel), Golgi marker (immunfestés Giantin elleni antitesttel) és a plazmamembránba kijutott transzporter Alexa Fluor 647 konjugált 5D3 antitest jelölése (élő sejtek inkubálása konformáció specifikus ABCG2 antitesttel) mellet vizsgáltam konfokális mikroszkóp segítségével.
 - Az ABCG2 fehérje sejten belüli mozgásának tanulmányozásához a fentebb leírt jelölésekkel (ER, Golgi, plazmamembrán) készült felvételeket kolokalizációs elemzésnek vettem alá, mely során kolokalizációs koefficiens számoltam.

- Kezelésekhez használt anyagok: 5 μ M quercetin, 1 μ M Ko143, 1 μ M kolhicin, 1 mM 4-PBA (4-fenilbutirát), 100 μ M biotin, 2 μ M MG132, 10 nM BAF (Bafilomycin A1).

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az ABCG2-M71V in vitro jellemzése

Az M71V in vitro jellemzéséhez különféle vektorkonstrukciókat (pIRES-ABCG2, pcDNA3.1-ABCG2, pEGFP-ABCG2) hoztunk létre és transzfekciót követően HEK293, HeLa és MDCKII sejtekben tranziensen vizsgáltuk az ABCG2 fehérje variánsokat. A fehérje expressziós mérések során azt találtuk, hogy az M71V és a Q141K változatok jóval alacsonyabb fehérje expressziót mutatnak, mint a vad típusú ABCG2 (1. ábra A). A pIRES-GFP plazmidról expresszááló ABCG2 mRNS szinteket qPCR segítségével mértem, melynél nem volt megfigyelhető különbség a vad típusú és a mutációt hordozó változatok között. Az M71V mutációt hordozó transzporter funkcióképességének vizsgálatához Sf9 sejtek membránpreparátumain ATPáz aktivitás mérést végeztünk. A kapott eredményekből megállapítható, hogy az M71V ATPáz aktivitása alacsonyabb a vad típushoz viszonyítva, azonban indukáló szubsztrát (quercetin) jelenlétében és koleszterinnel töltött membránpreparátumokon a vad típushoz hasonlóan, a mutációt hordozó transzporter ATPáz aktivitása is megnő (1. ábra B). Az ABCG2-M71V fehérje változat lokalizációjának vizsgálata során HEK293 sejtekben azt találtuk, hogy az M71V variáns jelentős mértékben intracellulárisan található és a fehérjének csak egy kis része figyelhető meg a plazmamembránban (1. ábra C). Polarizáltatott MDCK sejtekben azonban az M71V a vad típushoz hasonlóan az apikális membránban lokalizál (1. ábra D).



1. ábra: Az ABCG2-M71V *in vitro* jellemzése. (A) ABCG2 variánsok fehérje expressziós vizsgálata. (B) ABCG2 variánsok ATPáz aktivitás mérése. (C) ABCG2 variánsok lokalizációjának vizsgálata HEK 293 sejtekben (ABCG2: Bxp-12, piros; sejtmag: DAPI, kék). (D) ABCG2 variánsok lokalizációjának vizsgálata polarizáltatott MDCKII sejtekben (ABCG2: Bxp-12, zöld; bazolaterális marker: anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$, piros).

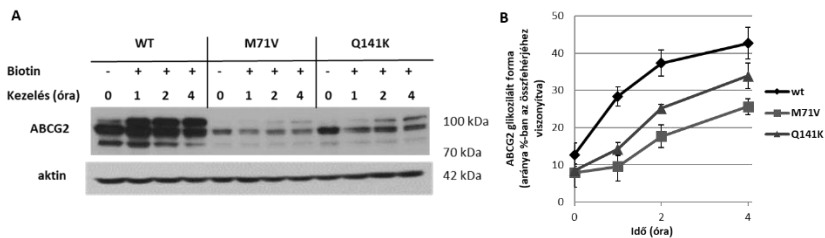
Végül annak tesztelése érdekében, hogy az M71V variáns mutáns fenotípusát tudjuk-e menteni különböző farmakonokkal: 4-fenilbutirát (4-PBA, farmakológiai chaperon, hőszokk fehérjék expresszióját indukálja) és kolhicin (köszvényben használt gyógyszer, mikrotubulus gátló) kezeléseket alkalmaztunk. Ezekkel a kezelésekkal a teljes fehérje expressziót jelentősen sikerült megnövelnünk mind a vad típusú, mind a mutációt hordozó ABCG2 variánsok esetében, azonban a fehérjék lokalizációjának a javítását a konfokális mikroszkópos eredmények alapján nem lehet biztonsággal kijelenteni.

4.2 A vad típusú és SNP-t hordozó ABCG2 változatok sejten belüli mozgásának vizsgálata

Az ABCG2 variánsok sejten belüli mozgásának vizsgálatához a RUSH rendszert alkalmaztuk. Ez a módszer egy bicisztronos vektoron alapszik, melyről expresszálódik egy horgony fehérje, amelyhez egy sztreptavidin van kapcsolva, valamint a vizsgálni kívánt riporter fehérje, amihez egy GFP és egy sztreptavidin-kötő fehérje (SBP) van kapcsolva. A vizsgálni kívánt fehérje a sztreptavidin-SBP kapcsolat révén kötve van a horgony fehérjének megfelelő donor kompartmentben, azonban biotin hozzáadásával a riporter fehérje felszabadul a donor kompartmentből és megkezdí útját a neki megfelelő célkompartment felé. Ezzel a fehérjék sejten belüli mozgását a hozzá kapcsolat GFP jele alapján mikroszkóppal monitorozni tudjuk. Mi a kísérleteinkhez egy ER-horgonyt tartalmazó konstrukciót használtunk, a riporter fehérje, pedig az ABCG2 különböző variánsai (vad típus, M71V, Q141K) voltak. A RUSH-ABCG2 konstrukciókkal HeLa sejteket transzfektálunk és a fehérjéket tranziensen vizsgáltuk.

A RUSH rendszerben vizsgálva az ABCG2 fehérje expresszióját azt találatuk, hogy a biotinnal nem kezelt mintáknál kettő, míg biotinnal való kezelés után három sáv jelenik meg a Western blot-on. Feltételeztük, hogy a harmadik felső sáv a fehérje érett, teljesen glikozilált formája, ezért a mintákat különböző glikozidáz enzimes (EndoH és PNGáz F) kezeléseknak vetettük alá. A PNGáz F enzimes kezelés hatására, ami a teljes cukorfát képes leemészteni a fehérjéről (mely a Golgiban alakul ki) eltűnt a harmadik felsős sáv. Ezzel bebizonyítottuk, hogy a RUSH rendszerben nem csak a fehérje mozgását, hanem az ABCG2 fehérje érését is képesek vagyunk nyomon követni az ER-ből való felszabadítás után. A bloton található felső sáv és az összfehérje arányából elemeztük az ABCG2 variánsok fehérje érésének kinetikáját, és azt találatuk, hogy az M71V és a Q141K változatok lassabb fehérje érést mutatnak a vad típushoz képest.

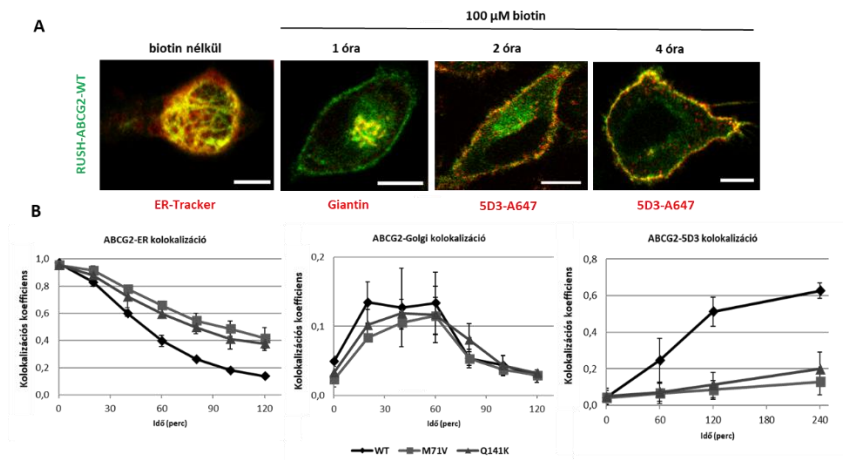
Ugyanakkor a mutációt hordozó ABCG2 variánsok a RUSH rendszerben vizsgálva is szignifikánsan alacsonyabb összfehérje expressziót eredményeznek a vad típushoz viszonyítva, azonban biotin hozzáadása után az összfehérje mennyisége nem csökkent egyik variáns esetében sem csökkent (2. ábra).



2. ábra: ABCG2 fehérje érésének vizsgálata a RUSH rendszerben. (A) Reprezentatív Western blot. (B) ABCG2 variánsok fehérje érésének kinetikája.

Az ABCG2 fehérje sejten belüli útjának vizsgálatához ER és Golgi markert alkalmaztuk, valamint a plazmamembránba kijutott transzportert is specifikusan jelölni kívántuk. A fehérje sejt felszínre való megérkezésének vizsgálatához beállítottam egy módszert, amely kombinálja a RUSH rendszert és az áramlási citometriás méréseknél használt 5D3 antitesttel, amely az ABCG2 fehérjét egy extracelluláris loop-ján is meri fel. A mérések során 5D3 antitestet tartalmazó médiummal inkubáltuk a sejteket, biotin nélkül, vagy biotinnal együtt, majd különböző időpontokban mostuk és fixáltuk a mintákat. Ezzel a módszerrel a médiumban lévő antitest csak akkor kötődik az ABCG2 fehérjéhez, ha az már kijutott a plazmamembránba. A különböző markerekkel és 5D3 antitesttel végzett mérésekből kolokalizációs koefficiens számoltunk és azt találtuk, hogy a vad típusú ABCG2 biotin hozzáadása után gyorsan kijut ez ER-ból, míg az M71V és Q141K variánsok egy része (40%) két óra után is az ER-ban marad. A Golgi markerrel végzett elemzés során nem találtunk különbséget a vad

típusú és a mutációt hordozó variánsok között, tehát az ER-ből kijutott fehérjék hasonló kinetikával haladtak át a Golgi-komplexen. Az ABCG2 plazmamembránban való vizsgálata során az volt megfigyelhető, hogy a vad típusú fehérje nagy része gyorsan kijut a sejtfelszínre, míg a mutáns változatok esetén egy lassabb trafficking tapasztalható a plazmamembránba (3. ábra).



3. ábra: ABCG2 fehérje sejtben belüli mozgásának kinetikája. (A) A vad típusú ABCG2 fehérje (zöld) vizsgálata a RUSH rendszerben ER-Tracker, anti-Giantin, vagy Alexa Fluor 647 konjugált 5D3 antitestes jelölések (piros) mellett. (B) ABCG2 variánsok és a különböző markerekkel végzett kolokalizációs analízis (kolokalizációs koefficiense).

Végezetül különböző trafficking-et befolyásoló anyagok hatását kívántuk vizsgálni az ABCG2 fehérje sejtben belüli útjára a RUSH rendszerben. A kezeléseknél 4-fenilbutirátot, MG132-t (proteaszóma inhibitor), valamint Bafilomycin A1-et (BAF, lizoszóma inhibitor) alkalmaztunk. Western blottal vizsgáltuk a kezelések fehérje expresszióra gyakorolt hatását és azt találtuk, hogy sem a 4-PBA, sem a BAF kezelésnek nincs hatása a vad típusú és a mutáns ABCG2

változatok összfehérje expressziójára, ugyanakkor az MG132 proteaszóma inhibitor szignifikánsan megnöveli az M71V variáns összfehérje szintjét, mind a biotinnal nem kezelt, mind a biotinnal kezelt minták esetében. Az ABCG2 glikozilált formájának elemzése során azt találtuk, hogy az MG132 kezelés megakadályozza a fehérje érett alakjának a kialakulását, míg a 4-PBA és BAF kezelések nincsenek hatással a fehérjeérésére. A kezelések hatását az ABCG2 lokalizációjára is megvizsgáltuk konfokális mikroszkóp segítségével. Eredményeinkből megállapítható, hogy a 4-PBA és a Bafilomycin A1 nem befolyásolja a fehérje lokalizációját a kezelt mintákhoz viszonyítva, azonban az MG132, proteaszóma gátló kezelésnél mindegyik ABCG2 variáns (4 órás biotin kezelést követően is) erős ER lokalizációt mutat.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az ABCG2-M71V-t *in vitro* rendszerben vizsgálva, hasonlóan a vörösvértesteken mért eredményekhez, alacsonyabb fehérje expressziót mutat a vad típushoz viszonyítva. Megállapítható, hogy a transzporter funkcionálisan működőképes, de csökkent ATPáz aktivitással rendelkezik. A mutációt hordozó fehérje elhelyezkedése a sejtben nem megfelelő: az ABCG2-M71V fehérje jelentős arányú intracelluláris lokalizációt mutat, míg a plazmamembránban csökkent expresszió figyelhető meg. Ugyanakkor polarizált sejtekben a vad típusú fehérjével megegyezően az M71V változat is képes kijutni az apikális membránszegmensbe. Farmakológiai kismolekulák (4-PBA és kolhicin) segítségével az M71V változat teljes fehérje expresszióját növelni lehet, azonban a mutáns fehérje lokalizációja a kezelések hatására döntően nem változik.

A RUSH rendszer használata potenciális lehetőséget nyújt az ABCG2 variánsok különböző sejtkompartmentekben (ER, Golgi, plazmamembrán) való vizsgálatához az ER-ből történő szinkronizált felszabadulást követően. Az M71V és Q141K változatok expressziója ebben a rendszerben is jóval alacsonyabbnak bizonyult, azonban ezzel a módszerrel sikerült megmérnünk a fehérje érésének kinetikáját, mely a mutánsok esetében lassabbnak bizonyult a vad típushoz képest. ER markerrel végzett kolokalizációs mérések alapján megállapítható, hogy a vad típusú ABCG2 viszonylag gyorsan felszabadul az endoplazmatikus retikulumból, míg a M71V és Q141K változatok egy jelentős része biotin kezelést követően is az ER-ben marad. A Golgi markerrel mért kolokalizációs eredményekből az látszik, hogy mind a vad típusú és mind a mutációt hordozó variánsok hasonló kinetikával haladnak át a Golgi komplexen az ER-ből való felszabadulást követően. A RUSH rendszert kombinálva az ABCG2-t extracelluláris epitópon felismerő 5D3 antitesttel olyan mérési technikát dolgoztam ki, mellyel az ABCG2 plazmamembránba való megérkezése időben detektálható

az ER-ből való elengedés után. Ezzel a módszerrel megfigyelhető, hogy a vad típusú ABCG2 fehérje viszonylag gyorsan eléri a sejtfelszín, ellentétben az M71V és a Q141K változatokkal, melyek esetében a plazmamembránba történő kijutás jóval lassabbnak bizonyult. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ABCG2-M71V és -Q141K polimorf variánsok plazmamembránba való kijutása valamilyen módon gátolt a sejten belüli útjuk a Golgi és a sejtfelszín közötti szakaszán. A RUSH rendszerben alkalmazott farmakológiai kezeléseknél a 4-PBA (farmakológiai chaperon) és a Bafilomycin A1 (lizoszóma inhibitor) nem voltak hatással az ABCG2 fehérjék expressziójára és a plazmamembránban való elhelyezkedésére. Az MG132 proteaszóma inhibitor szignifikánsan megnövelte az M71V változat összfehérje expresszióját, azonban a fehérje érett, glikozilált formájának a kialakulását és a transzporter plazmamembránba való kijutását a vad típus esetében is gátolta. Mindazonáltal a RUSH-ABCG2 rendszert alkalmasnak tartom a fehérje trafficking-jét befolyásoló anyagok tesztelésére, hiszen a kezelések pontos hatása egy ilyen dinamikus rendszerben sokkal inkább vizsgálható.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

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.

Bartos Z, Homolya L. Identification of specific trafficking defects of naturally occurring variants of the human ABCG2 transporter. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:615729.

6.2 Disszertációtól független közlemények:

Bistakova J, Forgacs Z, Bartos Z, Szivosne MR, Jambor T, Knazicka Z, Tvrda E, Libova L, Goc Z, Massanyi P, Lukac N. Effects of 4-nonylphenol on the steroidogenesis of human adrenocarcinoma cell line (NCI-H295R). *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2017;52(3):221-227.

Mózner O, Bartos Z, Zámbó B, Homolya L, Hegedűs T, Sarkadi B. Cellular Processing of the ABCG2 Transporter-Potential Effects on Gout and Drug Metabolism. *Cells.* 2019;8(10): 1215.

Zámbó B, Mózner O, Bartos Z, Török G, Várady G, Telbisz Á, Homolya L, Orbán T, Sarkadi B. Cellular expression and function of naturally occurring missense variants of the human ABCG2 multidrug transporter. *Cell Mol Life Sci*, 2020;77(2):365-378.

Becsky D, Szabó K, Gajdos T, Gyulai-Nagy S, Al-Gaadi D, Bartos Z, Balind A, Csernoch L, Dux L, Horvath P, Erdelyi M, Homolya L, Szentesi P, Keller-Pinter A. Syndecan-4 expression modulates cell polarity and migration by influencing centrosome positioning and intracellular calcium distribution. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 575227.