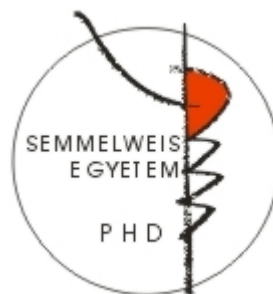


A human ABCB6 transzporter funkciójának tanulmányozása

Tézisek

Rakvács Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gergely Szakács Ph.D., kutatócsoport vezető

Bírálok: Dr. Geiszt Miklós DSc., egyetemi tanár
Dr. Lów Péter Ph.D., egyetemi tanár

A szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi János Ph.D., egyetemi tanár
A szigorlati bizottság tagjai: Dr. Papp Gergely Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Sveczer Ákos Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2019

Bevezetés

Az ABC (ATP kötő kazetta) szupercsalád az egyik legnagyobb fehérjecsald, mely rendkívül sokféle szerepet lát el baktériumokban, gombákban, növényekben és az állatvilágban is. Az ABC transzporterek az ATP-t hidrolíziséből származó energiát használják a szerkezetileg változatos szubsztrátjaik sejt vagy organelláris membránokon át történő transzlokációjához. Egy működőképes ABC fehérje jellemzően két nukleotidkötő domént (NBD) és két transzmembrán domént (TMD) tartalmaz. A féltranszporterek esetében, mint az ABCB6, a két polipeptidlánc dimerizáció révén alkot egy funkcionális egységet. A szubsztrát kötésért és a transzlokációjáért felelős TMD-k szekvenciája változatos, míg az az ATP kötésében és a hidrolízisében részt vevő NBD-k szekvenciája jóval konzerváltabb. Az emberi genomban szekvencia-homológia alapján 48 különböző ABC fehérjét azonosítottak, melyeket A-tól G-ig hét alcsaládba sorolnak. Doktori munkám során az ABCB6-ot, az ABCB alcsalád tagjának működését tanulmányoztam.

Az ABCB6 sejten belüli elhelyezkedése régóta vita tárgyát képezi. Az első konkrét mitokondriális funkcióról szóló elképzelés egy 2006-os publikációban jelent meg. Emlős sejteken végzett kísérletekben a szerzők a humán ABCB6 fiziológiás szerepét a porfirinek bioszintézisben látták, szubsztrátként pedig a coproporphyrinogen III-at azonosították. A transzporter mitokondriális lokalizációját azonban azóta számos publikációban megkérdőjelezték, melyekben bizonyítékot szolgáltatott annak lokalizációjára az endolizoszomális kontinuumban, a Golgi hálózatban és a plazmamembránban.

Kutatócsoportunk is többféle képalkotó technikát alkalmazva az ABCB6 endolizoszomális lokalizációját támasztotta alá. A pontos intracelluláris lokalizáció azonban csak megfelelő élettani szerep felfedezésével állapítható meg. Sajnos az ABCB6 fiziológiás funkciója az endolizoszomális rendszerben továbbra is kérdéses.

Genetikai vizsgálatok alapján viszont tudjuk, hogy az ABCB6 mutációi különféle fenotípusokat (FP, OC, DUH) okozhatnak. Az FP (familial pseudohyperkalemia) jellemzője, hogy a szobahőmérséklet alatt tárolt vérmintákban a K^+ ionok kiáramlanak a vörösvértestekből, jelentősen megnövelve az extracelluláris K^+ szintet. Az OC (ocular coloboma) egy szemfejlődési zavar. A DUH (dyschromatosis universalis hereditaria) a bőrön hipo- és hiperpigmentált foltok megjelenésével járó rendellenesség. Emellett 2012-ben az ABCB6-ot egy ritka vércsoport antigénként (Langereis) azonosították. Lan (-) vércsoportú személyekben már több mint 25 különböző recesszíven öröklődő ABCB6 mutációt azonosítottak. Azonban a protein hiánya nem vezet egyértelmű patológiás fenotípushoz, ugyanis a fehérjehiányos Lan (-

) betegek és az ABCB6 knockout egerek sem rendelkeznek hematológiai vagy pigmentációs rendellenességekkel.

Ezek a szerteágazó klinikai eredmények nem könnyítik meg az ABCB6 funkciójának megfejtését. A transzporter endolizoszómális lokalizációját az is alátámaszthatja, hogy a filogenetikai elemzések szerint az ABCB6 szekvenciális hasonlóságot mutat a HMT (Heavy Metal Tolerance) családba tartozó fehérjékkel. Az alacsonyabb rendű élőlényekben (*Schizosaccharomyces pombe*, a *Caenorhabditis elegans* és a *Drosophila melanogaster*) a HMT-1 a nehézfémek, főként a kadmium detoxifikációjában játszik szerepet. A fehérje az *S. pombe* és a *C. elegans* vakuoláris/endoszómális membránjában lokalizálódik, ahol a kadmiumkomplexek szekvesztrálását végzi.

Célkitűzések

Általános célom egy heterológ, in vitro rendszer létrehozása volt, mely lehetőséget nyújt az ABCB6 működésének és intracelluláris lokalizációjának tanulmányozására.

Először is azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az *S. pombe* és a *C. elegans hmt-1* deletált törzsek kadmium-érzékeny fenotípusát a humán ABCB6 képes lehet menekíteni, azaz a HMT-1 és az ABCB6 ortológ fehérjéknek tekinthetők. Emellett célom volt, hogy egy sejtes modell kidolgozásával az ABCB6-nak a melanogenezisben és a DUH fenotípus kialakításában betöltött szerepét tanulmányozzam.

Az alábbi konkrét célokat tűztem ki:

- A humán ABCB6 heterológ expressziója és lokalizációjának vizsgálata *S. pombe*-ban és *C. elegans*-ban
- Sikeres expresszió esetén az ABCB6 funkciójának elemzése a *hmt-1* hiányos, Cd-érzékeny törzsekben
- Az ABCB6 szerepének vizsgálata a Cd detoxifikációban humán sejtekben

Az ABCB6-nak a melanogenezisben és a DUH fenotípus kialakításában betöltött szerepének vizsgálatára:

- Az ABCB6 pigmentációban betöltött szerepének vizsgálata egy humán melanoma sejtvonalban.

- Olyan in vitro rendszer felállítása, melyben könnyedén tanulmányozható ABCB6 mutációinak hatása.

Módszerek

- ❖ Az ABCB6 cDNS konstrukciókat különböző expressziós plazmidokba klónoztuk (*S. pombe* - pREP1, *C. elegans* - pPD95.75 és emlős sejtek - EF1 lentivírus vektor). A HMT-1-HA és a különféle ABCB6 variánsok expresszióját immunoblot segítségével detektáltuk.
- ❖ A vakuólumok izolálása előtt az *S. pombe* sejteket CdCl₂-dal kezeltük, majd a szferoplasztokat a sejtfal enzimatis emésztésével hoztuk létre. A vakuólumokat differenciál centrifugálással izoláltuk, integritásukat áramlási citometriával ellenőriztük. A vakuoláris Cd-tartalmat grafit alapú atomabszorpciós spektrometriával (GFAAS) határoztuk meg.
- ❖ A heterológ HMT-1 vagy ABCB6 expressziójának hatását a modell organizmusokban Cd-tartalmú médiumban vizsgáltuk. A túlélési görbéket a Graph Pad Prism 7 szoftverrel illesztettük a szigmoid dózis-válasz modell alkalmazásával.
- ❖ A melanin-tartalom meghatározásához az MNT-1 sejteket NaOH-ban homogenizáltuk, és a melanin-tartalmukat a 405 nm hullámhosszon mért abszorbancia értékekből határoztuk meg.
- ❖ A transzporterek intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához a hmt-1-deletált *S. pombe* sejtben a transzporterek GFP-vel jelölt változatait fejeztettük ki. A sejtek vakuoláris membránját FM 4-64-el festettük, majd konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk őket.
- ❖ Az ABCB6 és a CeHMT-1 együttes lokalizációjának vizsgálatához az ABCB6::mCherry-t kifejező törzset kereszteztük a HMT-1::GFP-t expresszáló hímekkel, és a mindkét transzgént együtt expresszáló F1 utódokat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.
- ❖ Az ABCB6 és a CeHMT-1 szubcelluláris lokalizációjának meghatározására HMT-1::GFP vagy ABCB6::GFP-t expresszáló férgeket kereszteztünk olyan állatokkal,

melyek különböző endoszomális markereket expresszáltak: RAB5-mCherry, RAB7-mCherry vagy RAB10-mCherry.

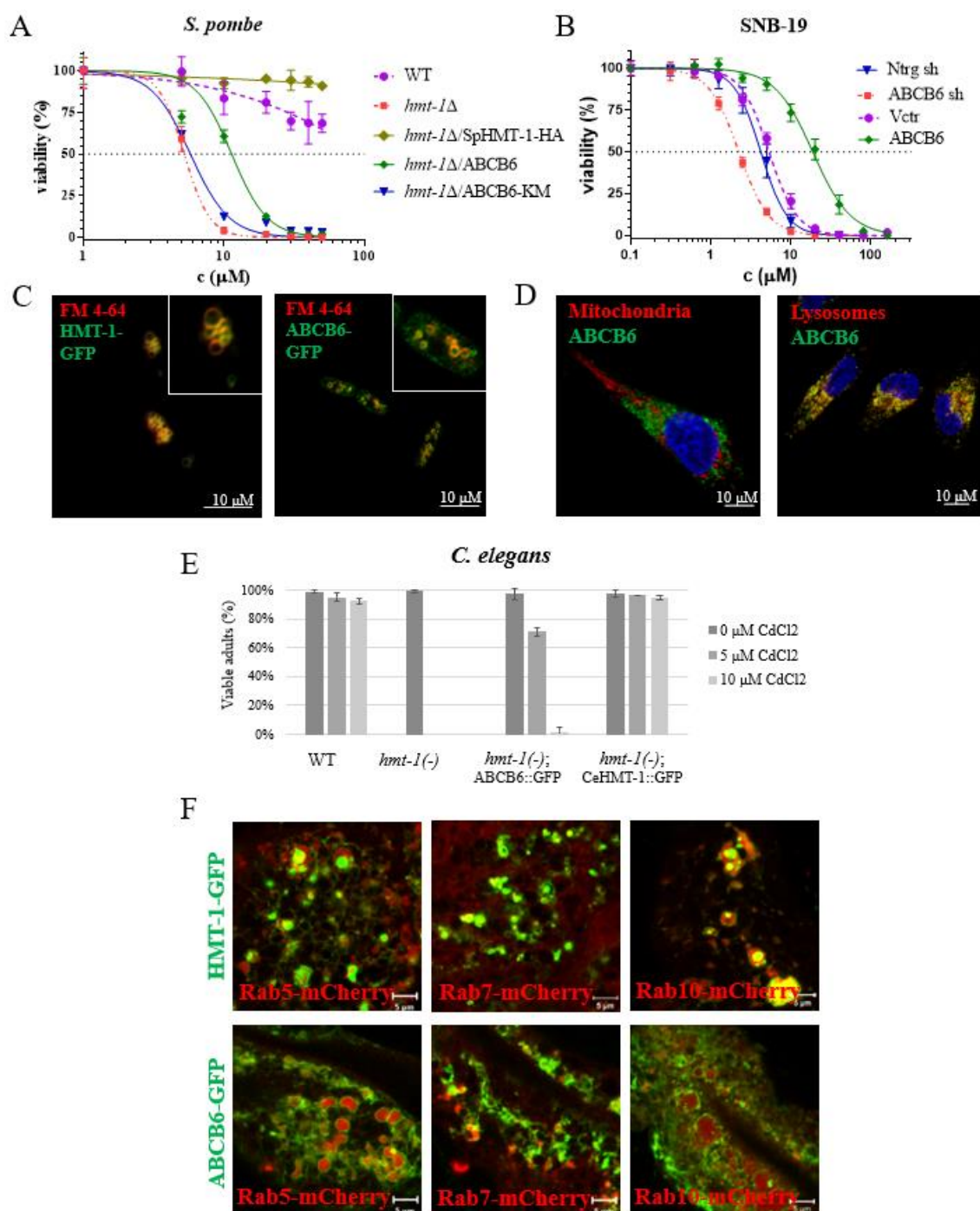
- ❖ Az ABCB6 variánsokat expresszáló HeLa, SNB-19 és MNT-1 humán sejteken immunfestést végeztünk különböző monoklonális antitestekkel.
- ❖ FISH elemzéshez a sejteket ABCB6 specifikus próbával és egy II. kromoszóma kontroll próbával jelöltük. Az interfázisokban levő sejteket fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.
- ❖ Az MNT-1 sejtvonalba a CRISPR / Cas módszert használtuk az ABCB6 gén módosításához. Először a homológ rekombináció segítségével módosítottuk az ABCB6 alléleket (ABCB6-GFP, ABCB6-SBP-GFP), majd a DNS hibajavítás másik folyamatát (NHEJ) használtuk ki az ABCB KO sejtek előállításához. Az egy sejtől származó klónokat a következő módszerekkel választottuk ki: Sanger szekvenálás, Real Time-PCR, immunoblot, áramlási citometria és konfokális mikroszkópia.

Eredmények

A HMT-1 és az ABCB kapcsolata

Az ABCB6 jelentős szekvencia azonosságot mutat a HMT-1 (nehézfém tolerancia faktor 1) fehérjékkel, amelyek evolúciósan konzervált szerepe, hogy a nehézfémekkel szemben toleranciát biztosítsanak a fémkomplexek intracelluláris szekvesztrációja révén.

Kísérleteinkben megmutattuk, hogy az ABCB6 képes menekíteni a HMT-1-hiányos *S. pombe* Cd-érzékeny fenotípusát (1A ábra). Konfokális mikroszkóppal az ABCB6-t az *S. pombe* sejtek vakuoláris membránjában azonosítottuk (1C ábra). Emellett az izolált vakuólumok Cd-tartalmának mérésekor azt tapasztaltuk, hogy az ABCB6 működése szükséges volt a kadmium transzportjához. A következő lépésben megállapítottuk, hogy az ABCB6 expressziója Cd toleranciát okozott a HMT-1 hiányos *C. elegans*-ban is (1E ábra). A fonálférgek mikroszkópos elemzése során az ABCB6 részleges kolokalizációt mutatott a korai, késői és bazolaterális endoszómák markereivel, hasonlóan a HMT-1-hez (1F ábra). Citotoxicitási esszékben igazoltuk az ABCB6 Cd detoxifikációban betöltött szerepét, a fehérje overexpressziója növelte a sejtek kadmiummal szembeni érzékenységét (1B ábra). Végül bizonyítékokat szolgáltatunk az ABCB6 lizoszomális elhelyezkedésére humán glioblastoma sejtekben (1D ábra).



1. ábra. A citotoxicitási vizsgálatban az ABCB6 menekíti a HMT-1-hiányos *S. pombe* sejtek Cd-érzékeny fenotípusát. **B** Az ABCB6 a HMT1-hez hasonlóan az élesztősejtek vakuoláris membránjában lokalizálódik. A vakuólum membránt FM 4-64-el festettük. **C** Az ABCB6 overexpressziója növelte, míg a fehérje csendesítése csökkentette a humán SNB-19 sejtek Cd toleranciáját. **D** Az ABCB6 az SNB-19 sejtek lizoszomájában található. Az ABCB6-ot OSK43 ABCB6 antitesttel (zöld), a sejtmagokat Hoechst 33342-vel (kék), az organelumokat

specifikus markerekkel (piros) jelöltük: mitokondriumok (AIF), lizoszómák (LAMP1). **E** ABCB6 megmenti a HMT-1-hiányos *C. elegans* Cd-érzékeny fenotípusát. **F** A CeHMT-1 és az ABCB6 azonos lokalizációt mutat *C. elegansban*. A transzporterek (zöld) részlegesen kolokalizálnak a korai (Rab5), a késői (Rab7) és a bazolaterális endoszómák (Rab10) markereivel (piros).

ABCB6 és a pigmentáció kapcsolata

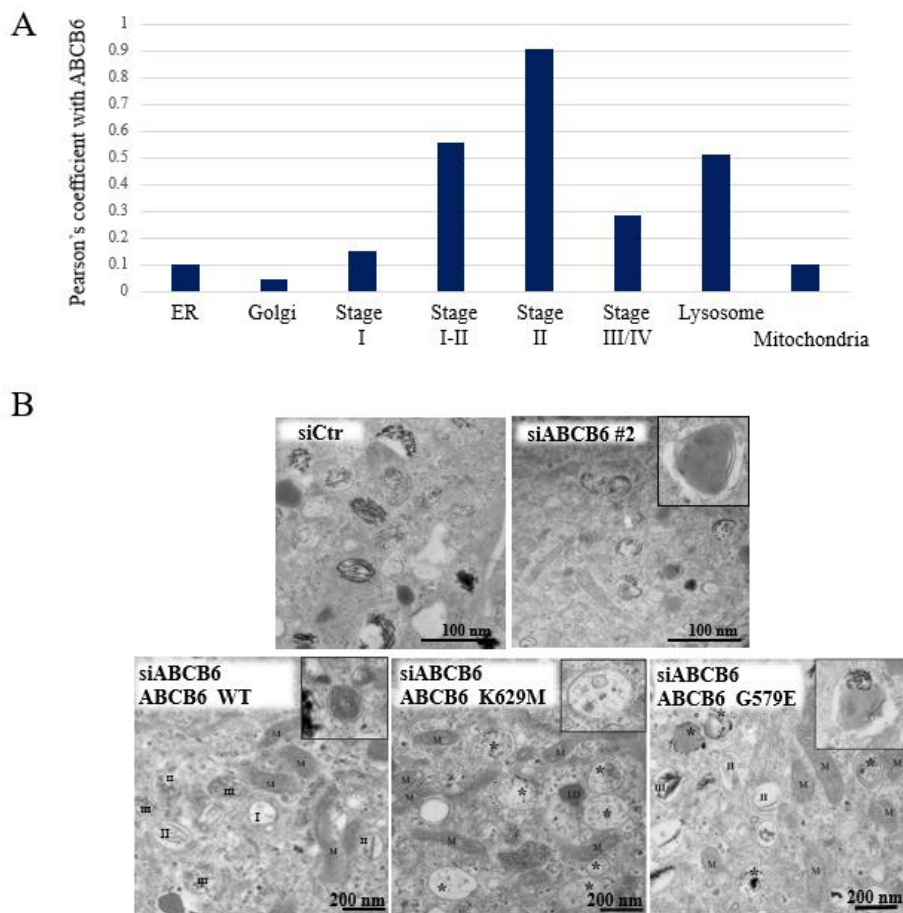
A korábban említett genetikai vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a DUH pigmentációs rendellenességet az *ABCB6* génjében található mutációk okozzák. Az, hogy az ABCB6 hogyan befolyásolja a bőr pigmentációját, még nem ismert. Kísérleti rendszerünkben ezért egy humán melanóma sejtvonalban, az MNT-1-ben vizsgáltuk az ABCB6 intracelluláris elhelyezkedését és funkcióját.

Korábbi eredményeinkkel összhangban megerősítettük az ABCB6 lokalizációját az endolizoszomális kontinuumban. A sejtfractionálási, a konfokális (2A ábra) és az elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a fehérje az MNT-1 sejtek lizoszómáiban és korai melanoszómáiban helyezkedik el.

Az ABCB6 melanogenezisben játszott szerepének megértéséhez először RNS interferenciával akadályoztuk meg a fehérje termelődését az MNT-1 sejtekben. Habár az ABCB6 csendesítése nem változtatta meg jelentősen a sejtek melanin szintjét, az siRNS konstrukciók között megfigyeltünk eltéréseket. Az ABCB6 csendesített sejtekben a melanoszomális fehérjék sejten belüli eloszlása nem szenvedett zavart, viszont az elektronmikroszkópos felvételek elemzése megváltozott melanoszomális struktúrákat tárt fel (2C ábra: siCtr, siABCB6). Az ABCB6 hiánya csökkentette az amiloid képződést, és a korai melanoszómákban speciális morfológiát mutató aggregátumok jelentek meg.

Az ABCB6 hatékony csendesítése az MNT-1 sejtekben lehetővé tette az ABCB6 variánsok menekítő hatásának tesztelését. A vad típusú ABCB6 expressziójának hatására szinte teljes mértékben eltűntek az aberráns struktúrákat, és helyreállt a normál fibrillumok képződése (2B ábra WT). A funkcionálisan inaktív K562M mutáns kifejeződése rendellenes kompartmentek felhalmozódását eredményezte, amelyek protofibrillekkel vagy apró aggregátumokkal voltak tele, de nem voltak megfigyelhetőek az ABCB6 csendesítése során tapasztalt abnormális struktúrák (2B ábra K562M). Ezzel szemben a DUH mutáns, az ABCB6

G579E expressziója aberráns korai (és kisebb mértékben késői) melanoszómák felhalmozódását eredményezte (2B ábra G579E). Összességében mindkét mutáció a nem pigmentált aberráns melanoszómák felhalmozódását és abnormális fibrillumok kialakulását okozta.



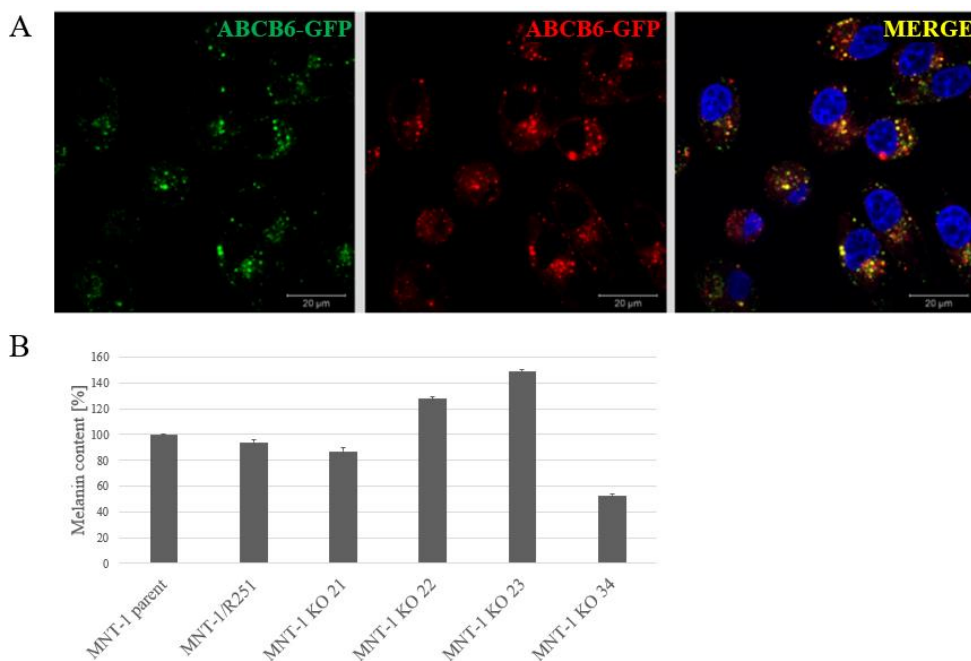
2. ábra. **A** Az endogén ABCB6 szubcelluláris lokalizációjának tanulmányozása immunfluoreszcencia jelöléssel és konfokális mikroszkóppal. A diagram az ABCB6 kolokalizációs együtthatóját mutatja különböző organelláris markerekkel. **B** MNT-1 sejtek ultravékony metszeteiről készült elektronmikroszkópos felvétel. A képek kontroll (siCtr), ABCB6 csendesített (siABCB6#2) vagy overexpresszálo (ABCB6 WT, ABCB6 K629M vagy ABCB6 G579E) de endogén ABCB6 csendesített sejteket mutatnak. A nagyításokon egyedi melanoszómák látszódnak.

CRISPR/Cas9 módszerrel létrehozott MNT-1 sejtvonalak

A CRISPR/Cas9 alapú génszerkesztési módszerrel az endogén ABCB6 lokalizációját, majd deléciójának funkcionális következményeit vizsgáltuk.

Először fluoreszcens in situ hibridizációs technikával megállapítottuk, hogy az MNT-1 sejtek négy ABCB6 alléllal rendelkeznek. Endogén módon GFP-vel jelölt ABCB6-t expresszáló sejteket terveztünk, amelyek megerősítették a lizoszomális lokalizációs mintázatot (3A ábra). Ezután SBP (Streptavidin-kötő peptid) jelölést is fuzionáltunk az ABCB6-GFP C terminális végéhez (ABCB6-SBP-GFP). Ezzel lehetővé vált az ABCB6 intracelluláris útjának nyomon követése a RUSH (retenció szelektív horgok segítségével) rendszerrel (nem látható).

Végül létrehoztuk az ABCB6 knock-out sejtvonalakokat. Előzetes elemzéseink alapján az ABCB6 génkiütött sejtvonalak eltérő melaninszinteket mutatnak (3B ábra).



3. ábra: **A** Az endogén ABCB6-GFP az MNT-1 sejtek lizoszómáiban lokalizálódik. **B** A létrehozott ABCB6 knock out sejtvonalakban változatos melaninszinteket figyeltünk meg.

Konklúzió

Az ABCB6 intracelluláris lokalizációja régóta vita tárgyát képezi, egymásnak ellentmondó eredmények születtek, melyek vagy a mitokondriális vagy az endolizoszomális elhelyezkedést próbálták igazolni. A pontos intracelluláris lokalizáció csak megfelelő fiziológiai funkció felfedezésével állapítható meg. Az endolizoszomális lokalizációt erősíti, hogy filogenetikai elemzések alapján az ABCB6 szignifikáns szekvencia azonosságot mutat a HMT-1 (nehézfém tolerancia faktor 1) fehérjékkel. Ezek a transzporterek a vakuoláris/endoszomális membránban találhatóak, és evolúciósan konzervált szerepük a nehézfémekkel szembeni tolerancia biztosítása a fémkomplexek intracelluláris megkötése révén. A hipotézisünk az volt, hogy az *S. pombe* és a *C. elegans* HMT-1 hiányos törzsek kadmium-érzékeny fenotípusát a humán ABCB6 expressziójával menekíteni tudjuk.

Kísérleteink során megmutattuk, hogy az ABCB6 a HMT-1-el megegyezően a sejtek vakuoláris/endoszomális membránjaiban van jelen, ráadásul a fémkomplexek intracelluláris szekvesztrálását is képes volt ellátni. Először is megmutattuk, hogy az ABCB6 képes toleranciát biztosítani a HMT-1-hiányos Cd érzékeny *S. pombe* és *C. elegans* törzsekben. Másrészt, kiderült, hogy az ABCB6 funkciója szükséges a kadmium vakuoláris szekréciójához. Ezen túlmenően az ABCB6 képes fokozott Cd toleranciát biztosítani humán glioblastoma sejtekben is. Ezek az eredmények funkcionális bizonyítékot szolgáltatnak az ABCB6 endolizoszomális kompartmentekben játszott szerepére, segítve, hogy jobban megértsük ennek a membrán transzporternek a fiziológiai szerepét.

Az ABCB6 melanogenezisben betöltött szerepének megismeréséhez olyan humán melanóma sejtekben (MNT-1) vizsgáltuk a vad típusú és a mutáns ABCB6 változatokat, melyet széles körben használnak a pigmentációs folyamatok modellezésére.

Korábbi eredményeinkkel összhangban megerősítettük az ABCB6 lokalizációját az MNT-1 sejtek endolizoszomális rendszerében, ezen belül a lizoszómákban és korai melanoszómákban. Ezt alátámasztottuk a CRISPR/Cas9 génszerkesztő technikával létrehozott sejtvonalakon, melyek GFP-címkével ellátott endogén ABCB6-ot expresszáltak. Az ABCB6 csendesítése során azt tapasztaltuk, hogy csökkent az amiloid képződés, és fehérje-lipid aggregátumok jelentek meg az MNT-1 sejtek korai és érett melanoszómáiban. A DUH mutáns G579E vagy az inaktív K562M mutáns variáns szintén nem pigmentált rendellenes melanoszómák felhalmozódását idézte elő, és nem tudta helyreállítani az amiloid fibrillumok

keletkezését. Feltételezzük, hogy az ABCB6 befolyásolja az amiloidogén fragmentumok képződését, vagy azok fibrillummá történő összeállását.

Tekintettel arra a kadmium viszonylag ritka előfordulására emlős sejtekben, összességében úgy gondoljuk, hogy az ABCB6 bizonyos fém-komplex szállításában játszhat szerepet az endolizoszomális rendszerben. Mivel a korai melanoszóma a melanoszóma és endolizoszomális utak kereszteződésén helyezkednek el, az ABCB6 szerepet játszhat a pigmentsejtek sejt-specifikus endolizoszomális működésében is. Kutatásaink alapján azt mondhatjuk, hogy az ABCB6 funkciója nem a mitokondriumhoz, hanem az endolizoszomális kompartmenthez kötődik. Ahhoz viszont, hogy az ABCB6 fiziológiai szerepét megértsük, még további kísérleteket kell végeznünk.

A dolgozathoz felhasznált publikációk

Rakvác Z, Kucsma N, Gera M, Igriczi B, Kiss K, Barna J, Kovács D, Vellai T, Bencs L, Reisecker JM, Szoboszlai N, Szakács G.

The human ABCB6 protein is the functional homologue of HMT-1 proteins mediating cadmium detoxification.

Cellular and Molecular Life Sciences. 2019 May 3. doi: 10.1007/s00018-019-03105-5.

PMID: 31053883

Bergam P, Reisecker JM, **Rakvác Z**, Kucsma N, Raposo G, Szakacs G, van Niel G. ABCB6 Resides in Melanosomes and Regulates Early Steps of Melanogenesis Required for PMEL Amyloid Matrix Formation.

Journal of Molecular Biology. 2018 Oct 12;430(20):3802-3818.

doi: 10.1016/j.jmb.2018.06.033. Epub 2018 Jun 22.

PMID: 29940187