

# **A humán ABCB6 transzmembrán fehérje sejten belüli lokalizációjának és funkciójának tanulmányozása**

Doktori értekezés tézisei

**Kiss Katalin**

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Program



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, Ph.D.

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna

A Doktori Program vezetője: Prof. Dr. Sass Miklós

MTA TTK  
Enzimológiai Intézet

Budapest

2014.

## BEVEZETÉS

Az ATP-Binding Casette, azaz ABC fehérjecs család az élővilág egyik legnépesebb fehérjecs családja. Tagjai a membránt többszörösen átívelő transzmembrán fehérjék, melyek ATP hidrolízis révén számos funkciót látnak el szinte minden élő szervezetben, így baktériumokban, gombákban, növényekben és az állatvilágban egyaránt. A Human Genome Project szekvenciaadatai alapján emberben 48 ABC fehérjét azonosítottak, a fehérjéket szekvencia hasonlóság alapján hét alcsaládra osztják (A-G jelölésű alcsaládok). Vizsgálataim fókuszában a B alcsalád 6. tagja, az ABCB6 fehérje állt.

Doktori munkám kezdetén az ABCB6 fehérjét az általánosan elfogadott nézet szerint a *Saccharomyces cerevisiae* ATM1 fehérje ortológjának tartották. Az ATM1 fehérje pontos funkciója nem ismert - feltételezhetően egy eddig nem azonosított molekulát transzportál a mitokondriumból a citoszólba, így szabályozva a mitokondriális vas-kén klaszter szintézist, végső soron a sejtek vasanyagcseréjét. 2006-ban megjelent közleményünkben Krishnamurthy és munkatársai egy új modellt javasoltak, melyben feltételezték, hogy az ABCB6 fehérje a mitokondrium külső mitokondriális membránjában található és a koproporfirinogen-III molekula mitokondriális importjáért, végső soron az eritroid érés és a hem szintézis szabályozásáért felel.

Menekítései vizsgálatok alapján a humán ABCB6 fehérje képes az *atm1* géndeléción okozta fenotípust revertálni élesztőkben, de jelentős ellentmondást jelent ugyanakkor, hogy erre a nem-funkcionáló ABCB6 mutáns is képes. Amennyiben az ABCB6 valóban a külső mitokondriális membránban található, úgy nem világos, miként helyettesíthetné a belső mitokondriális membránban található ATM1 funkcióját. A pontos funkcionális megfeleltetés azért is kérdéses, mert a két fehérje feltehetően ellentétes orientációt mutat: míg az ATM1 fehérje a mitokondriumból a citoszólba, az ABCB6 fehérje fordított irányba képes transzportálni. Továbbá, a belső mitokondriális membránnal szemben a dinamikusan változó külső mitokondriális membrán a kis molekulák számára átjárható, így kérdéses, hogy egy külső membránban elhelyezkedő aktív transzporter hogyan befolyásolhatja a hem prekursorok mitokondriális felvételét.

Doktori munkám ideje alatt számos publikáció jelent meg, melyek erősítették az ABCB6 funkcióját és lokalizációját illető kételyeinket. Egyes szerzők az ABCB6 fehérjét a plazma membránban, míg mások az endoplazmatikus retikulumban és a Golgiban mutatták ki, valamint az is bizonyítást nyert, hogy - szemben a mitokondriális fehérjékkel - az ABCB6 glikozilálódik. Patkány sejtekben kifejezve a humán ABCB6 fehérje a vezikuláris rendszerben volt látható, valamint megtalálható a lizoszómális proteomban is. Végül egy közelmúltban

megjelent közlemény kimutatta, hogy az ABCB6 egy ritka vércsoport antigénnek felel meg, azaz kifejeződik a vörösvértestek felszínén is.

Az ABCB6 fehérjéről megjelenő változatos, egymásnak ellentmondó közlemények megerősítettek minket abban, hogy a fehérje sejten belüli elhelyezkedéséről és funkciójáról kialakult közmegegyezés megkérdőjelezhető és az irodalomban elfogadott információk egy része téves lehet. Az ellentmondásos adatok tükrében ezért elhatároztuk, hogy a humán ABCB6 fehérjét először Sf9 rovarsejtes heterológ rendszerben, majd emlős sejtekben kifejezzük, és vizsgáljuk a fehérje funkcióját, sejten belüli elhelyezkedését, illetve eritroid érésben betöltött szerepét.

## CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a következő célokat tűztem ki:

- Célul tűztem ki az ABCB6 fehérje transzporter funkciójának vizsgálatát heterológ rovarsejtes rendszerben. Vizsgálni kívántam a humán ABCB6 működését az ABC fehérjék esetén sikeresen használt *in vitro* módszerekkel, többek közt ATPáz aktivitás és vezikuláris transzport mérésekkel, valamint a katalitikus ciklus jellemzésére alkalmas azido-ATP metodikával („trapping”).
- Céлом volt az endogén fehérje sejten belüli elhelyezkedésének és útjának vizsgálata emlős sejtekben sejtfractionálás, immunoaffinitás és mikroszkópos metodikákkal.
- Céлом volt továbbá az ABCB6 fehérje vizsgálata az eritroid érés során, továbbá az ABCB6 fehérje kifejeződésének vizsgálata egészséges egyénekből izolált vörösvértestek felszínén.
- Végül célom volt, hogy megvizsgáljam a fehérje N-terminális végének a fehérje funkciójában, illetve lokalizációjában betöltött szerepét.

## MÓDSZEREK

*Spodoptera frugiperda* (Sf9) rovarsejtekben rekombináns bakulovírus fertőzéssel túltermeltettem a teljes hosszúságú ABCB6 fehérjét, valamint annak inaktív mutáns (629M), illetve N-terminálisan csonkolt változatát (del205-ABCB6). A fehérjéket nagy mennyiségben tartalmazó membrán vezikulákat izoláltam, melyeket ATPáz esszéiben, illetve radiokativan jelölt azido-ATP felhasználásával elemeztem.

A K562 sejtekben hemin és imatinib-mezilát segítségével eritroid differenciációt indukáltunk. A porfirin szintézis mértékét a sejtekben a fluoreszcens intermedier, a protoporfirinigen-IX (PPIX) molekula mennyiségének mérésével jellemeztük, a PPIX fluoreszcencia értékét

áramlási citométerrel mértük. A differenciálódó sejtek hemoglobin tartalmát benzidines kimutatással állapítottuk meg.

Az ABCB6 fehérje és annak variánsainak túltermeltetését emlős sejtekben lentivírus transzdukcióval és tranziens transzfekcióval értük el, a génextpressziót RNS interferencia segítségével csendesítettük.

Sejtfractionálást differenciál centrifugálással és immunoaffinitás purifikációval végeztünk. Mitokondriumfrakciót az immunprecipitálást során TOM22 fehérje elleni antitest segítségével izoláltunk. A sejtfractionálás eredményeként kapott frakciókat különböző sejtorganellumokra jellemző fehérjék elleni antitestekkel jellemeztük.

A fehérje és változatainak sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkóppal, illetve elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket képelemző szoftverek segítségével elemeztük. Az endoszómális struktúrákat Rab5 fehérje konstitutívan aktív változatának (Q79L) GFP fúziós változatának kifejeztetésével tettük láthatóvá. A sejtfelszíni ABCB6 fehérjét OSK43, extracelluláris epitóppal rendelkező, ABCB6 fehérjét felismerő antitesttel jelöltük.

A vörösvértestek felszínén megtalálható ABCB6 mennyiségét antitest alapú áramlási citométer esszében mértük. A kísérletek Dr. Várady György (MTA TTK) végezte, az alacsonyabb ABCB6 expressziót mutató mintákban az ABCB6 fehérje kódoló régiójának szekvenálása Magdalena Koszarska (Országos Vérellátó Intézet) munkája. A sejtvonalak előállításában, fenntartásában, a dimerizációs kísérletben és a fehérjék Western blot analízisében Kucsma Nóra (MTA TTK) volt segítségemre.

## TÉZISEK

- A humán ABCB6 fehérje és a Walker-A régióban található konzervált lizint nélküli ABCB6(K629M) mutáns változat egyaránt expresszálódik Sf9 rovarsejtekben, vagyis mind a vad típusú, mind a katalitikus hely mutáns ABCB6 fehérje megfelelően feltekeredik és integrálódik rovarsejt membránba.
- Az Sf9 heterológ rendszerben kifejeztetett humán ABCB6 képes ATP-t kötni és hasítani; alap-, illetve szubsztrát stimulált ATPáz aktivitása azonban nem mérhető
- Az ABCB6(K629M) képes az ATP megkötésére, de az ATP hasítására már nem.
- A hemoglobin szintézis növekedésével párhuzamosan az ABCB6 fehérje mennyisége K562 sejtek kémiai szerekkel indukált eritroid differenciációja során nő. Az irodalmi állításokkal szemben azonban az ABCB6 fehérje expressziója és a *de novo* porfirin szintézis mértéke között nincs ok-okozati összefüggés.

- Az ABCB6 mennyisége a hemoglobin-szinttel párhuzamosan változik K562 sejtek eritroid irányú differenciációja során, de a fehérje túltermeltetése vagy éppen csendesítése nem befolyásolja a sejtek hemoglobin-tartalmát. Mindez megkérdőjelezi a fehérje feltételezett reguláló szerepét a hem szintézis és az eritroid érés folyamatában.
- Immunoaffinitás tisztítás és konfokális vizsgálatok alapján az ABCB6 fehérje nem a mitokondriumban, hanem az endo-lizoszómális rendszerben helyezkedik el K562, HEK293T és HeLa sejtekben egyaránt. Párhuzamosan megerősítettem, hogy a másik három mitokondriális ABC fehérje, az ABCB7, -B8 és -B10 fehérjék a mitokondriumban találhatóak.
- Eredményeinket elektronmikroszkópos felvételekkel is megerősítettük. ABCB6 fehérjét túltermelő HeLa sejtek vizsgálata során a fehérje döntően a multivezikuláris testekben, a multilamelláris lizoszómákban, valamint a denz lizoszómákban volt megtalálható.
- Az ABCB6 fehérje jelen van K562 és HeLa sejtek plazmamembránjában is, és az endoszómális rendszeren keresztül, dinamin függő módon internalizálódik.
- Az ABCB6 fehérje jelen van az érett vörösvértestek membránjában és az éretlen retikulociták felszínén egyaránt, valamint a retikulociták érése során a multivezikuláris testekben keletkező exoszómákban is megtalálható.
- Lan- vércsoportú vérminta Western blot analízise alapján megerősítettük a korábbi megfigyelést, miszerint az ABCB6 fehérje a Lan- vércsoport antigénje.
- Kutatóintézetünkben kidolgozott antitest alapú áramlási citométer metodikával a vörösvértestek felszínén megtalálható ABCB6 fehérje mennyiségét elemeztük, és az irodalom alapján várt előfordulási frekvenciánál nagyobb mértékben találtunk Lan- vagy ABCB6 fehérje expressziót csökkentő génváltozatokat. A Lan- vércsoport az irodalomban szereplő adatoknál nagyobb frekvenciával fordul elő az átlag populációban.
- Azonosítottunk két új, feltehetően Lan- fenotípust okozó ABCB6 génváltozatot, az R192Q mutációt és egy splice site mutációt. Egyben megerősítettük, hogy az R192W és G588S mutációk Lan- fenotípust okoznak.
- Az ABCB6 fehérje HMMTOP algoritmus jóslása alapján 5+6 transzmembrán hélixet tartalmaz. Az N-terminálisan elhelyezkedő, járulékos 5 transzmembrán hélix szekvenciája egyedi, más ismert fehérjéhez nem hasonlít.

- Az N-terminális, járulékos régió Sf9 heterológ rendszerben a vad típusú fehérjével hasonló módon képes ATP-t kötni és hidrolizálni, azaz nem szükséges a katalitikus aktivitáshoz.
- Kimutattuk, hogy emlős sejtekben az N-terminális, járulékos régió nem szükséges a dimerizációhoz.
- Megerősítettük továbbá, hogy emlős sejtekben az N-terminális, járulékos régió a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően glikozilációs helyet tartalmaz.
- Az ABCB6 fehérje N-terminális járulékos része a fehérje endo-lizoszómális elhelyezkedését és a sejten belüli útját szabályozza.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Az irodalomban domináns nézet szerint az ABCB6 fehérje a külső mitokondriális membránban helyezkedik el, a koproporfirinogen-III molekula mitokondriális importja révén az eritroid érés és a hem szintézis kulcsregulátora. A doktori munkám során nyert eredmények e modellt megcáfolják. Kimutattuk, hogy az ABCB6 fehérje a sejtek endo-lizoszómális rendszerében helyezkedik el és a plazmamembránból endoszómákon keresztül internalizálódik. Az ABCB6 fehérje jelen van a mitokondriumokat nem tartalmazó vörösvértestek felszínén és megtalálható a retikulociták érése során keletkező exoszómákban. Továbbá, a fehérje hiánya vagy túltermeltetése nem befolyásolja az eritroid érési folyamatokat és a hemoglobin szintézist K562 sejtekben. Elképzelhető, hogy az ABCB6 fehérjének szerepe van az eritroid érés és/vagy a hem bioszintetikus útvonal szabályozásában, de eredményeink alapján kijelenthető, hogy az ABC6 nem játszik közvetlen szerepet a porfirinek mitokondriális importjában.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A dolgozat témáját adó publikációk:

- **Kiss K**, Brozik A, Kucsma N, Toth A, Gera M, Berry L, Vallentin A, Vial H, Vidal M, Szakacs G: *Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes* PLOS One May 24, 2012
- Koszarska M, Kucsma N, **Kiss K**, Varady Gy, Gera M, Antalffy G, Andrikovics H, Tordai A, Studzian M, Strapagiel D, Pulaski L, Tani Y, Sarkadi B, Szakacs G: *Screening the expression of ABCB6 in erythrocytes reveals an unexpectedly high frequency of Lan mutations in healthy individuals*, PLOS One, közlésre elfogadva, 2014. szeptember

### A dolgozat témáját adó, közlésre beküldött publikáció:

- **Kiss K**, Kucsma N, Brozik A, Antalffy G, Tusnady G, Bergam P, van Niel G, Szakacs G: *Role of the N-terminal transmembrane domain in the endo-lysosomal targeting and function of the human ABCB6 protein*, közlésre beküldve

### További saját publikációk:

- **Kiss K**, **Katona M**, Angyal V, Kucsma N, Sarkadi B, Takáts Z, Szakács G.: *A mass spectrometry based functional assay for the quantitative assessment of ABC transporter activity*, Rapid Commun Mass Spectrom. 2009 Nov;23(21):3372-6
- Kobolak J, **Kiss K**, Polgar Z, Mamo S, Rogel-Gaillard C, Tancos Z, Bock I, Baji AG, Tar K, Pirty MK, Dinnyes A.: *Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos*. BMC Mol Biol. 2009 Sep 4;10:88.