

Az ABCG2 multidrog transzporter fehérje szerkezetének és működésének vizsgálata

Kutatási előzmények

Az ABC transzporter membránfehérjék az ATP elhasítása (ATPáz aktivitás) révén nyerik az energiát az általuk végzett változatos transzport-folyamatokhoz. Számos ABC fehérje aktív transzporterként működik, míg egyes tagjaik membráncsatornát, vagy éppen receptort alkotnak. Jelenleg 48 emberi ABC transzportert ismerünk. Alapvető felépítésük hasonló, aminosavsorrendjükben jellegzetes motívumokat találunk, bennük kétféle nagyobb szerkezeti egység, a transzmembrán domén (TMD) és az ABC (ATP Binding Cassette) domén van jelen. A működő transzporterek általában két homológ molekulafélből állnak, mindkettőben egy-egy TMD és ABC domén található.

Igen fontos tagjai ennek a csoportnak a rosszindulatú daganatok széleskörű, ún. multidrog rezisztenciáját okozó fehérjék, amelyeknek fiziológiai szerepe a toxikus xenobiotikumok kipumpálása a sejtekből és a szövetekből. A malignus tumorok gyógyszeres terápiája során az eredménytelenség oka az esetek jelentős részében az, hogy a beteg tumorsejtjei a multidrog rezisztencia fenotípust mutatják. A jelenség hátterében a leggyakrabban multidrog ABC transzporterek magas szintű expressziója áll.

A multidrog transzportereknek jelenleg három fő csoportját ismerjük: a P-glükoproteint (más néven ABCB1, MDR1), a “multidrog rezisztenciához társult transzporter”-eket (ABCC1-10, MRP) és az “emlőrák rezisztencia fehérjét” (ABCG2, BCRP vagy MXR). A transzporterek működésének pontos molekuláris részleteit egyelőre nem ismerjük. A transzport/ATPáz ciklus egyes lépéseiről (pl. ATP-kötés, az átmeneti komplex kialakulása) azonban rendelkezünk már részletesebb ismeretekkel. Tudjuk, hogy a ciklus lényeges eleme a két ABC domén közötti pozitív kooperativitás, valamint a drog-kötésnek az ATP hidrolízis sebességére kifejtett stimuláló/reguláló hatása.

Az ABC transzporterek patobiokémiai, molekuláris biológiai hátterének megértése pontosabb diagnosztikai módszerek kifejlesztését segítheti elő, és a transzporterek működésének mélyebb ismerete olyan terápiás szerekhez vezethet el, amelyek a multidrog rezisztencia transzporterek működését “felfüggesztik”, így a kemoterápiás szerek koncentrációja eléri a tumorsejtekben a hatásos értéket. Ugyancsak rendkívül fontos kvantitatív és specifikus diagnosztikai módszerek kifejlesztése a transzporterek felismerésére a daganatos sejtekben.

Kutatócsoportunkban elsősorban a xenobiotikumok és a lipidek transzportjában résztvevő fehérjéket vizsgáljuk, kitüntetett szerepet adva azoknak a fehérjéknek, amelyek működései vagy hibái valamilyen emberi betegséghez kapcsolódnak. Ennek érdekében több alkalmas *in vitro* expressziós rendszert (bakulovirus-rovarsejt, ill. retrovirus-emplős sejt) alkalmazunk, a fehérjék kifejeződését monoklonális és poliklonális antitestek széles palettájának alkalmazásával követjük. Több munkánkban igazoltuk, hogy az alkalmazott rendszerekben az ABC fehérjék aktív formában, natív membrán-inszerciós topológiával épülnek be a sejtmembránba. Gyors, PCR-alapú mutagenézis módszereket állítottunk be, és az előállított mutánsokat is a fenti rendszerekben expresszáljuk. Az ABC fehérjéket izolált membrán-preparátumokban direkt, vezikuláris transzport-aktivitásuk, ATP-kötő képességük, ATPáz aktivitásuk és nukleotid okkluziós aktivitásuk alapján jellemezzük.

Az ép sejteket alkalmazó rendszerekben mind az ABC fehérjék intracelluláris lokalizációját, mind transzport funkcióit változatos technikákkal elemezzük. Kísérleteinkben alapvetően támaszkodunk a sejtekben fluoreszcens jelző-molekulák detektálására, mind mikroszkópos, mind áramlási citometriás módszerek segítségével.

Az ABCG2 (BCRP, MXR) fehérje a legkésőbb azonosított emberi multidrog ABC transzporter, amelynek azonban igen fontos szerepe lehet mind a daganatok kemoterápia-rezisztenciájában, mind a fiziológias xenobiotikum transzportban. Az ABCG2 fiziológias szerepe különösen jelentős lehet az őssejtekben és a placentában, ahol a fehérje magas szinten expresszálódik.

Az ABCG2 fehérje szerkezetileg ún. ABC fél-transzporter, azaz csak egy ABC és transzmembrán domént tartalmaz, így csakis dimér formában válhat működőképpé. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a fehérje homodimériként működőképes és mind jellegzetes transzport, mind drog-stimulált ATPáz aktivitással rendelkezik. Drog-rezisztencia vizsgálatok során derült fény arra, hogy különböző sejtvonalakban több mutáns, ill. polimorf ABCG2 fehérje volt megtalálható. Ezek közül a 482-es aminosav két mutációja sejtvonalakban alapvetően eltérő drog-rezisztencia típusokat okozott.

Kutatási eredmények

1. Az ABCG2 fehérje mutáns változatainak előállítás, részletes funkcionális vizsgálata

Az ABCG2 fehérje 482-es aminosavának (R) két mutációját (G, ill. T) először drogokkal szelektált daganatsejt-vonalakban találták meg, és kiderült, hogy ezek alapvetően eltérő drog-rezisztencia típusokat okoznak. A 482-es aminosav szerepének tisztázása érdekében számos mutáns variánst állítottunk elő, amelyeket kifejeztünk mind rovarsejtes (Sf9), mind emlős-sejtes expressziós rendszerekben. Kimutattuk, hogy a mutációk jelentősen befolyásolták az ABCG2 szubsztrát felismerését és transzport sebességét. A mutánsokat mind ATPáz aktivitásuk, mind direkt drog-transzportáló képességük, valamint gyógyszer-rezisztenciát okozó tulajdonságaik tekintetében részletesen jellemeztük (Ózvegy-Laczka és mtsai, BBA, 2005). Az eredmények arra utalnak, hogy ennek az aminosavnak központi szerepe van az ABCG2 drog-felismerő régiójában, a kérdéses aminosavak mérete és töltése alapvetően befolyásolja ezt a funkciót. A később megszületett homológia modellek ugyancsak igazolták ennek a régióknak a szerepét, amely a membrán citoplazmikus oldalán, de a membránt átívelő hélixek közvetlen közelében helyezkedik el.

A kutatások során előállítottuk, kifejeztük, és részletesen elemeztük az ABCG2 fehérje polimorf variációit, amelyek a populáció jelentős részében előfordulnak, és befolyásolhatják a gyógyszerek egyéni hatásait (Morisaki és mtsai, 2005). Ezek a variációk igen fontos szerepet játszhatnak a gyógyszerhatások személyre szabott, egyéni jellemzőiben, mind a farmakológiai, mind a toxikológiai vonatkozásokban (Cervenák és mtsai, 2005).

Részletes mutáció-analízist végeztünk az ABCG2 fehérje dimerizációjában feltehetően résztvevő molekularészek szerepére vonatkozóan is. Az USA NIH-NCI kutatóival szoros együttműködésben előállítottunk számos olyan mutáns formát, amelyek szerepét a dimerizációban a molekuláris modellek sugallták. Előállítottunk, majd mind Sf9, mind emlős sejtekben kifejeztük, és részletesen jellemeztük a G553 aminosav

mutáns variációit (Polgár és mtsai, 2006). Érdekes módon az alapvető dimer-képződést ezek a mutációk nem akadályozták, ugyanakkor a fehérje lokalizációját és transzport funkcióját jelentősen megváltoztatták.

2. Az ABCG2 transzporter funkcionális vizsgálata monoklonális antitesttel

Részletesen vizsgáltuk az ABCG2 fehérjét a sejt felszínen felismerő monoklonális antitest (5D3) kölcsönhatásait a transzporter fehérjével. Nemzetközi együttműködésben megkaptuk ezt az antitestet, ill. a termelő hibridómát, így változatos jelölési, ill. módosítási módszereket alkalmazhattunk. A munka első fázisában megállapítottuk, hogy az ABCG2 fehérjét a sejt felszínen felismerő, és annak funkcióját blokkoló monoklonális antitest a transzporter konformációjától függően reagál a sejt felszíni epitóppal. Részletesen elemeztük a transzporter katalitikus ciklusának és az antitest kapcsolódásának jellemzőit (Özvegy-Laczka és mtsai, 2005a).

A molekuláris modellek alapján feltételeztük, hogy az 5D3 antitest az ABCG2 sejt felszíni, harmadik extracelluláris hurkával (EC3) reagálhat, ezért az ebben a régióban elvégzett kémiai módosítások, ill. mesterséges mutációk hatásait elemeztük. Az EC3 szerepe az ABCG2 dimerizációjában már kimutatott volt, az itt elhelyezkedő három cisztein közül az egyik (C603) igazoltan S-S híd képzésével stabilizálja az ABCG2 dimér szerkezetet. Kémiai keresztkötők segítségével megállapítottuk, hogy a molekulászerkezet stabilizálása nagymértékben megnöveli az 5D3 antitest kötődését, ugyanakkor a dimér szerkezet kovalens keresztkötése önmagában nem jár ilyen változással.

Ugyancsak nemzetközi együttműködésben megkaptuk azokat az ABCG2 mutáns variánsokat, amelyekben a transzporter sejt felszíni szakaszaiban mindhárom jelenlévő cisztein (C592, C603 és C608) egyenként, ill. többszörös módon alaninra van kicserélve. Ezeket a mutáns fehérjéket HEK sejtekben kifejeztettük és alapvető tulajdonságaikat megvizsgáltuk. Ilyen módon közvetlenül vizsgálhattuk a transzporter konformációjától függően az antitesttel reagáló sejt felszíni epitópokat, ill. abban a dimerizációban résztvevő ciszteinek szerepét. A munka során megállapítottuk, hogy az 5D3 kötődést az S-S híd képzésében résztvevő C608 mutációja nem befolyásolja, míg a másik két cisztein jelenléte alapvetően fontos ehhez a kötődéshez. Bár a fehérje transzport funkciója megőrződik, az intramolekuláris S-S hidakat képző ciszteinek hiánya megakadályozza az 5D3 kötődést és felismerést. A kísérletes eredmények és molekuláris dinamikai szimuláció alapján modellt alkottunk az ABCG2 külső, EC3 hurkának szerkezetére vonatkozóan. (Özvegy-Laczka és mtsai, 2008).

3. Az ABCG2 transzporter és a membrán lipidek kölcsönhatásainak vizsgálata

A projekt során kísérleteket végeztünk az ABCG2 fehérje lipid-kölcsönhatásainak részletes vizsgálatára. A sejtmembrán koleszterin tartalmának módosítására ciklodextrint (CD), ill. koleszterinnel töltött ciklodextrint (CD-C) alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy az emlős sejtmembránok ciklodextrin kezelésének hatására, amely a sejtek életképességét még nem befolyásolja, az ABCG2 transzport aktivitása jelentősen csökken, és a csökkenés arányos a koleszterin kivonás mértékével. Ugyanakkor az Sf9 rovarsejtek membránjában alapvetően alacsony a koleszterin tartalom, ennek megfelelően az ilyen sejtekben kifejezett ABCG2 transzport aktivitása alacsony. Koleszterin töltés hatására az

Sf9 membránban az ABCG2 transzport aktivitása jelentősen fokozódik, jól mérhetővé válik a drog-stimulált ATPáz aktivitás is. Érdekes módon, a koleszterin hatása csak a vad-típusú ABCG2 fehérje esetén jelentkezik, míg az R482G vagy R482T mutánsok gyakorlatilag érzéketlenek a membrán koleszterin tartalmára. A részletes eredményeket nemzetközi folyóiratban közzeltük (Telbisz és mtsai, 2007), valamint szabadalmi beadványt készítettünk és adtuk be.

Az ABCG2 fehérje aktivitásának poszt-transzlációs, lipidek által történő szabályozása jelentős módosulást okozhatja a daganatos sejtek gyógyszer-rezisztenciájának de a gyógyszerek szervezeten belüli megoszlásának is. ezért az ilyen irányú vizsgálatokat, újabb mutációk és lipid-hatások analizálásával tovább folytatjuk.

4. Az ABCG2 transzporter és célzott hatású rákellenes vegyületek kölcsönhatásainak vizsgálata

A kutató munka során részletesen vizsgáltuk a célzott intracelluláris targetekre ható új rákellenes szerek, a tirozin kináz gátló (TKI) vegyületek esetleges kölcsönhatásait az ABC multidrog transzporterekkel. Ez a kölcsönhatás jelentősen befolyásolhatja az új gyógyszerek ellen kilakuló rezisztenciát.

Megállapítottuk, hogy az ABCG2 fehérje aktívan képes eltávolítani a sejtekből a klinikumban is használatos EGFR receptor blokkoló Iressa nevű gyógyszert. Részletesen vizsgáltuk a transzport mechanizmusát és következményeit A431 modell daganatsejtekben, amelyek túlélése az EGF receptor aktivitásához kötődik (Elkind és mtsai, 2005). Átfogó elemzést közzeltünk a tirozin kináz gátlók és az ABC multidrog transzporterek kölcsönhatásairól (Özvegy-Laczka és mtsai, DRU, 2005).

A munka folytatása során elsősorban a krónikus mieloid leukémia gyógyítására a klinikumban is alkalmazott, a Bcr-Abl fehérjére ható TKI vegyületeket vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az ABCG2 fehérje aktívan képes eltávolítani a sejtekből a Bcr-Abl tirozin kináz aktivitását gátló Gleevec (Imatinib mezilát, STI571) gyógyszert. Részletesen vizsgáltuk a transzport mechanizmusát és következményeit a multidrog transzporterek kifejező, Bcr-Abl pozitív K562 tumorsejtekben (Hegedűs és mtsai, közlés alatt).

5. Az ABCG2 szabályozásának, lokalizációjának és funkciójának vizsgálata - új módszerek kifejlesztése

Az ABCG2 fehérje expressziójának szabályozása egyelőre igen kevésbé ismert terület. A Debreceni Egyetemmel együttműködésben vizsgáltuk a PPR gamma receptor aktiválásának hatását az ABCG2 expresszióra és funkcióra, elemeztük az ABCG2 fehérje szerepét a dendritikus sejtek differenciálódása során. Eredményeink szerint a specifikus lipid-receptorok aktiválódásának hatására a dendritikus sejtekben jelentős mértékben megnő az ABCG2 kifejeződése, amely egyben gyógyszer-, illetve xenobiotikum-rezisztencia kialakulását is eredményezi (Szatmári és mtsai, 2006). Ezek a hatások az immunválasz kialakulásában fontos meghatározók lehetnek.

A sejten belüli lokalizáció és funkció együttes vizsgálatának érdekében elkészítettünk és kifejeztettünk egy zöld fluoreszcens fehérje (GFP)-ABCG2 kiméra fehérjét. Megfelelő előkísérletek után sikerült olyan kiméra konstrukciót létrehozunk, amely a vad-típusú

ABCG2 transzporterhez mindenben hasonló aktivitást és membrán lokalizációt mutat, ugyanakkor jól követhető fluoreszcens mikroszkópos vagy áramlási citometriás technikákkal. Igazoltuk, hogy az így kifejezett fehérje gyógyszer rezisztenciát okoz, mivel aktívan ki-transzportálja az ABCG2 szubsztrát vegyületeket, és a vad-típusú fehérjéhez hasonló ATPáz aktivitást és koleszterin-érzékenységet mutat (Orbán és mtsai, 2008).

A GFP kiméra fehérje alkalmazása új lehetőségeket kínál a gyógyszer kölcsönhatások, ill. a transzporter fehérje lokalizációjának dinamikus vizsgálatára. Jelenleg ilyen irányban folynak a további kísérletek.

6. Az ABCG2 transzporter vizsgálata őssejtekben

Számos korábbi közlemény utalt arra, hogy vérképző, ill. egyéb szöveti őssejtekben az ABCG2 fehérje magas szinten fejeződik ki, így jelentős szerepe lehet az őssejtek toxikus hatásokkal szembeni védelmében. A jelen projektben emberi embrionális őssejtekben, és a belőlük differenciálódó sejtekben és szövetekben vizsgáltuk az ABCG2 fehérje expresszióját és funkcióját. A szakirodalomban elsőként sikerült bemutatni, hogy a nem-differenciálódott embrionális őssejtek is igen magas ABCG2 expressziót mutatnak, amely jól korrelál a differenciálatlan sejtekre jellemző egyéb markerekkel (Oct4, Nanog, SSEA4). A differenciálódás első lépéseiben az ABCG2 szint igen alacsonyra esik, míg a későbbi differenciálódás során egyes szövetekben újra megjelenik. Kísérleteinkben részletesen elemeztük az ABCG2 mRNS alapján a fehérje expressziójához vezető promoter-használatot. Megállapítottuk, hogy a nem-differenciálódott őssejtekben a differenciált szövetekétől eltérő mRNS mintázat és promoter használat jelenik meg (Apáti és mtsai, 2008).

7. A projekthez kapcsolódó eredmények, összefoglaló közlemények

A projekt során az ABCG2 fehérjével rokon, több más ABC transzporter molekuláris szintű vizsgálatát is elvégeztük. Az ABCG5/ABCG8 fehérjéket *in vitro* rendszerben kifejeztettük, transzport tulajdonságaikat részletesen elemeztük (Müller és mtsai, 2006). Részletesen vizsgáltuk az ABCG1 és ABCG4 fehérje kifejeződését és funkcióját (Seres és mtsai, 2008). Együttműködésben továbbfejlesztettük az MDR-ABC transzporterek diagnosztikai módszereit hematológiai és szolid tumorok vizsgálatára (Jakab és mtsai, 2005, Schwab és mtsai, 2007). Nemzetközi együttműködésben jellemeztük egy ABC transzporterekre ható specifikus toxin molekuláris hatásmechanizmusát (Fuller et al, 2007).

Több, magas impakt faktorú nemzetközi folyóiratban közzeltünk átfogó, review cikkeket az ABC transzporterekről (Özvegy-Laczka és mtsai, 2005, Cervenák és mtsai, 2006, Tusnády és mtsai, 2006, Sarkadi és mtsai, 2006, Szakács és mtsai, 2008, Hegedűs és mtsai, 2009a, 2009b).