

**Identification of a human mitochondrial ATP binding cassette transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Csere Péter

Programvezető:  
Prof. Dr. Fischer Emil

Alprogramvezető:  
Prof. Dr. Mózsik Gyula

Témavezető:  
Dr. Kispál Gyula

Pécsi Orvostudományi Egyetem  
Pécs, 1999.



## Bevezetés

Az ABC transzporter fehérje családba tartozó fehérjék közös jellemzője, hogy tartalmaznak egy ATP kötő kazettának (ATP-binding cassette) nevezett alegységet, melyhez az ATP hidrolízise kötött a transzport energia igényének fedezéséhez. Különböző ABC transzportereket azonosítottak szubsztrát specificitás, kémiai szerkezet, sejten belüli lokalizáció alapján.

Ezen fehérjék felépítésére egy konzervált struktúra jellemző. Dimerek, melyeknél a két monomer közül az egyik, egy hat, membránt áthidaló alfa hélixből álló transzmembrán, a másik, egy ATP kötő domén. A transzmembrán domén adja a szubsztrát specificitást, míg az ATP kötő alegység a filogenetikailag konzerváltabb rész. Ezen alegységek különböző multidomén felépítést mutathatnak.

Az emlős sejtekben ezen fehérje családba tartozik a P-glikoprotein, mely a multidrog rezisztenciát okozza tumorok esetén, de egyéb betegségek hátterében is kimutathatók, úgy mint perzisztáló hiperinzulinémiás hipoglikémia, cisztás fibrózis, Zellweger szindróma, adrenoleukodisztrófia.stb. A sejten belül minden membrán struktúrából izoláltak már ABC transzportert. Viszont csak egyetlen egyet a mitokondriumból, mégpedig az Atm1p fehérjét.

Az ATM1 gént munkacsoportunk azonosította korábban, ezen gén deléciója élesztőben erőteljes növekedési zavart okoz nem-fermentábilis szén forrás esetén, glükóz táptalajon is csak lassult növekedés tapasztalható. Azonban a

legszenbetűnőbb tulajdonság a nagyfokú mitokondriális vasfelhalmozás, ami az Atm1p mitokondriális vas anyagcserében betöltött szerepét sugallja.

A vas szinte minden élő sejt számára szükséges, asszimilációja két problémával állítja szembe a sejtet: szolubilis formába kell hozni, valamint a felvétele után meg kell akadályozni potenciális toxicitását. A felvételre az élő sejtekben különböző fehérjemolekulák rendszeréből álló egységek alakultak ki, melyek redukáló hatással rendelkeznek. A toxikus hatás kivédésére a vas ferritinhez vagy ennek megfelelő fehérjékhez kötötten tárolt. A mitokondrium a vas további metabolizálásában központi szerepet játszik. A mitokondriális intermedier vas pool egy szabad, nem-hem, nem vas-kén fehérje raktár, melynek kémiai természete még nem ismert, csakúgy mint a vas mitokondriumon belüli mozgása sem.

A vas a sejt normális működése során nem halmozódik fel, a felesleg nem toxikus formában raktározódik. Azonban, amennyiben nem ilyen, nem toxikus formájú raktár molekulákban tárolódik, hanem a különböző sejtalkotókban lerakódik, káros lesz a sejtire. Reaktív oxigén gyökök képződnek, melyek a biológiai makromolekulák mindegyikét károsítani képesek. Noha ellenük antioxidáns enzimek képződnek a sejtben, ezek nem mindig elegendőek a toxikus hatás kivédésére.

## Célkitűzések

Munkánk céljai a következők voltak:

1. Az Atm1 fehérje funkciójának meghatározása
2. Az esetleges vas anyagcserében betöltött szerepének tisztázása
3. A humán homológ azonosítása
4. Ezen humán homológ szerepe bizonyos megbetegedésekben

## Anyag és módszer

A kísérleteinket különböző *Saccharomyces cerevisiae* törzs felhasználásával végeztük, melyeket 1% élesztő kivonatból, 2% baktopeptonból álló táptalajon növesztettünk 2% gükózzal (YPD) vagy 3% glicerollal (YPG) illetve 2% galaktózzal (YPGal) szuplementálva. A szelektív táptalaj eléréséhez 0,7% élesztő nitrogén bázist, 2% glükózt az auxotrófiás igény szerint egészítettük ki leucinnal (30mg/l), adeninnal, hisztidinnel, lízinnel, triptofánnal, uracillal (20mg/l).

Az alkalmazott technikák közt szerepelt élesztő diszrupció; élesztő és humán mitokondrium izolálás; in vitro transzkripció és transláció; fehérje import izolált mitokondriumba; élesztő transzformálás; plazmid izolálás; citrátszintáz-, malát dehidrogenáz-, akonitáz-, kataláz enzim aktivitás mérés; nem-hem, nem vas-kén fehérjéhez kötött vas tartalom meghatározás a mitokondriumban; teljes

és oxidált glutathion meghatározás; fehérje SDS gőzelektroforézis; immunoblottolás; ellenanyag termelés nyúlban.

A statisztikai eredmények a t próba alapján kerültek kiszámításra.

## Eredmények

### *Az Atm1p lokalizálása:*

A kísérlet során sejtfrakciókat vizsgáltunk Atm1p elleni ellenanyaggal. Az ellenanyag a vad típusú mitokondriumban egy 70 kDa molekulásúlyú fehérjével ad reakciót, míg a citoszól, vagy egyéb szubcelluláris frakció esetén nem volt immunreakció. Ez azt mutatja, hogy az Atm1p a mitokondriumban fordul csak elő.

### *Az ATM1 deléció hatása a mitokondriális citokrómokra:*

A kísérlet az Atm1p celluláris szerepének megközelítését szolgálja. Mitokondriális és posztmitokondriális felülűszót izoláltunk vad és Atm1 deléciós élesztőkből ( $\Delta atm1$ ). A  $\Delta atm1$  mitokondriumok differenciál spektruma csak 10% aa<sub>3</sub>, b, c, c<sub>1</sub> holocitokrómot tartalmaztak. A c, c<sub>1</sub> holocitokróm hiány nem magyarázható az apoprotein bioszintézis zavarával, mivel szinte vad típusnak megfelelő mennyiségben volt jelen immunfestést követően. Azonban csak kis részben (10% vagy kevesebb) volt hemmel kovalensen kötött. Mindez azt jelenti, hogy a  $\Delta atm1$  sejtek holoform c citokrómjai súlyosan károsodottak.

Ezen eredmények ismeretében sor került más lokalizációjú, hem tartalmú fehérjék, mégpedig elsősorban a peroxiszómális kataláz-A vizsgálatára. Mind az enzim mennyisége és aktivitása meghatározásra került a vad ill. mutáns sejtekben. A vad és a  $\Delta atm1$  sejtek azonos mennyiségben mutattak immunfestődést, ellentétben a kataláz aktivitás mérés eredményeivel, ahol hússzor alacsonyabb volt  $\Delta atm1$  sejtek aktivitása, mely hem kofaktor hiányra utal. Meglepő módon kétszeres enzimaktivitás különbség volt csak a vad típushoz képest, amikor kb. harmincszoros overexpresszált mennyiségben volt jelen a kataláz-A a  $\Delta atm1$  ill. a vad sejtekben. Az overexpresszió nem hozott változást a növekedési zavarban ill. a mitokondriális citokróm deficienciában. Ez azt támasztja alá, hogy a  $\Delta atm1$  sejtek nem a priori defektívek a hem szintézisében, hanem annak lebontása, degradációja gyorsult fel.

*A  $\Delta atm1$  sejtek oxidatív stressz alatt állnak:*

Mivel az egyik lehetőség a hem degradáció okára az oxidatív károsodás, megvizsgáltuk, hogy a  $\Delta atm1$  sejtek mutatják-e ennek sajátosságait. A  $\Delta atm1$  sejtek hiperszenzitívek voltak a növekedés során oxidáló reagensekre, mint pl.  $H_2O_2$  jelenlétére. Továbbá a glutathion szint, egy fő antioxidáns a szabad gyökök okozta károsodás kivédésére, kétszeresen emelkedett volt  $\Delta atm1$  sejtekben, a vad típushoz képest, sőt az oxidált forma ötszörös emelkedést adott. Hasonló emelkedés nem volt más respiratórikusan inkompetens mutánsok

esetén, ami azt mutatja, hogy az *ATM1* gén deleciója oxidatív stresszt jelent a sejt számára.

*$\Delta atm1$  mitokondrium magas vastartalmú:*

Jól ismert oka az oxidatív stressznek a vas tartalom emelkedése. Ezért a szabad nem hem, nem vas-kén vas tartalmat meghatároztuk.  *$\Delta atm1$*  mitokondrium vastartalma harmincszor több mint a vad típusé. Más mitokondriális légzési láncban mutációt szenvedett sejteknél ez a különbség nem volt megfigyelhető.

A mitokondrium frakcionálása során kimutattuk, hogy a vas 20 %-a a szolubilis, míg 80 %-a membrán a frakcióban van. Ez azt mutatja, hogy a  *$\Delta atm1$*  sejteknél erősen károsodott a vashomeosztázis.

Meghatároztuk a mitokondriális akonitáz enzimaktivitását, mely  *$\Delta atm1$*  sejtekben kb. fele volt a vad típushoz képest. Citrátszintáz és malát dehidrogenáz szolgált kontrollként, ahol ez a csökkenés nem volt megfigyelhető.

Összeségében tehát a  *$\Delta atm1$*  sejtek szabad vasat halmoznak a mitokondriumban, és ez a vasfrakció nem szolubilis.

### *A humán ABC7 teljes szekvenciája:*

A humán ABC7 teljes szekvenciája egy ún. EST klónból származik, amely nagyfokú azonosságot mutatott az egér ABC7-es génnel, mely egy ABC transzportert kódol. A teljes EST klónt megszekvenáltuk, s a humán (hABC7) fehérje aminosavszekvenciáját meghatároztuk. A humán fehérje nagyfokú homológiát mutat az egér ABC7 proteinnel, valamint *Saccharomyces cerevisiae* Atm1p fehérjével. A szekvencia azonosság kiterjed mind a C terminálisra mind az N terminálisra. A szignifikáns homológia a membránt áthidaló régióban megnöveli annak valószínűségét, hogy az emlős és gomba fehérjék egymás funkcionális homológjai.

### *A humán ABC7 egy mitokondriális fehérje:*

A humán ABC7 szubcelluláris lokalizációját határoztuk meg. Az N terminálist vizsgáltuk vajon alkalmas-e egy mitokondriális cél szekvencia szerepét betölteni, s a fehérjét a mitokondriumba irányítani. Így egy fúziós fehérjét készítettünk az egér dihidrofolát-reduktázának és a humán ABC7 fehérje N terminálisának felhasználásával. A radiaktívan jelölt fehérjét izolált élesztő mitokondriummal együtt inkubáltuk, hogy az import megtörténhessen. Proteináz K kezelés biztosította, hogy a fel nem vett fehérjét megemésszük. A prekursor fehérje jelentős része egy rövidebb formában kimutatható volt a mitokondriumban, s proteináz K kezelésre rezisztens volt, ami a lezajlott importot mutatta. A mitokondrium külső membrán duzzasztással való szelektív felnyitása után is proteináz K rezisztens maradt az importált fúziós fehérje.

Detergenssel való kezelés után azonban a fehérje a proteázokra szenzitív lett, mutatva, hogy a mátrixban helyezkedett el.

A fehérjéknek a mitokondriális belső membránon át való importja membrán potenciált igényel. Ezt vizsgáltuk a membrán potenciál depléciójával szétkapcsoló ágens hatására. Ekkor sem a prekursor molekula hasadása érett fehérjévé, sem a proteáz rezisztencia nem volt megfigyelhető. Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a humán ABC7 fehérje N vége alkalmas mitokondriális cél szekvenciaként működni membránpotenciál függő módon. Mindez azt mutatja, hogy a humán ABC7 egy mitokondriális építőegység.

In vivo vizsgálva a szubcelluláris elhelyezkedését a humán ABC7 fehérjének az immunfestés során egy 68 kDa súlyú fehérje adott reakciót a humán máj mitokondriumban, de nem kaptunk kötődést a posztmitokondriális ill. a citoszól frakcióban. Összességében tehát megállapíthatjuk az in vitro és in vivo eredményekből, hogy a humán ABC7 egy mitokondriális elhelyezkedésű fehérje.

*A humán ABC7 képes a  $\Delta atm1$  élesztő mutánsokat funkcionálisan komplementálni:*

A humán ABC7 gént  $\Delta atm1$  élesztőben expresszáltuk. A humán ABC7 szintézise szinte vad szintű növekedést eredményezett, hasonlóan ahhoz, amikor ATM1 gén került beültetésre. Így a humán ABC7 nagyfokban képes kompenzálni a növekedési zavart, amit  $\Delta atm1$  sejteknél megfigyeltünk.

Vajon a humán ABC7 expresszió képes-e a többi, fenotípusban bekövetkezett változást is helyreállítani, úgy mint a magas vastartalmat a mitokondriumban, a citokróm és extramitokondriális hem tartalmú fehérjehiányt, valamint az oxidatív stressz indukálta celluláris glutathion emelkedést. A humán ABC7-tel komplementált *Δatm1* sejtekből izoláltunk mitokondriumot. Az izolált organellel vad típusúhoz hasonló mértékben tartalmaztak citokrómozókat, és az extramitokondriális hem tartalmú fehérje, a kataláz-A esetén is hasonló eredményt kaptunk. A komplementált sejtek mitokondriális vastartalma is mindössze kétszerese volt a vad típusúnak. A celluláris teljes és oxidált glutathiont is meghatároztuk a sejtlyzátumból. A humán ABC7-tel komplementált sejtek nagyfokú, de nem teljes mértékű csökkenést mutatnak a glutathion szint esetén. Összefoglalva, a humán ABC7 fehérje funkcionális orthológja a mitokondriális ABC transzporternek, az *Atm1p*-nek.

## Megbeszélés

Ebben az értekezésben olyan új eredmények kerültek összefoglalásra, melyek fontosak az *Atm1p* celluláris szerepének megértéséhez. Ez a fehérje a mitokondriumban helyezkedik el. A sejtek, amelyekből hiányzik az *Atm1p* súlyos deficienciát mutatnak a hem tartalmú extra- és intramitokondriális holoenzimek esetén. Ez azonban nem egy bioszintézisben bekövetkezett, vagy a transzport szintjén detektálható zavar, ugyanis a hem kellő mennyiségben

szintetizálódik. A  $\Delta atm1$  sejtek oxidatív reagensekre érzékenyek, és emelkedett mértékű a glutathion, annak is az oxidált formája, azaz ezen sejtek oxidatív stressz alatt állnak. Végül megfigyeltünk egy erőteljes vastartalom emelkedést a  $\Delta atm1$  sejtek mitokondriumában.

Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy a kulcsjelenség a mitokondriális vastartalom növekedés. Az adatokból kitűnik, hogy az  $Atm1p$  nem szállít vasat a mitokondriumba. Akkor azonban milyen szerepe lehet a mitokondriális vas felvételben? Exportálhat pl. egy vas kelátort, amely  $Atm1p$  hiány esetén felhalmozódik, s ennek eredményeként a vas is a mitokondriális mátrixban. De az  $Atm1p$  lehet egy regulátor fehérje is, mely a vas koncentráció függvényében szabályoz egy vastranszporter molekulát.

Ahhoz, hogy a mitokondriális vas metabolizmus okozta humán megbetegedéseket tanulmányozhassuk izoláltuk a humán homológot. Leírtuk, hogy ez a fehérje is a mitokondriumba lokalizált. Ezenfelül adataink megmutatták a mitokondriumon belüli elhelyezkedést is. Az *in vitro* import kísérletek kimutatták, hogy a mitokondriális cél információt a humán ABC7 N vége kódolja. Ez a N terminális különbözik a tipikus mitokondriális preszekvenciáktól, mivel több benne a hidrofób aminosav.

Az értekezésben levő eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a humán ABC7 az élesztő  $Atm1p$  homológja. Amennyiben  $\Delta atm1$  élesztő sejtekben a humán ABC7 fehérjét expresszáljuk, az a mitokondriumba kerül, és visszaállítja a  $\Delta atm1$  sejtek fenotípusát. Mégpedig egy szinte vad típusú növekedést

eredményez, másodszer humán ABC7-tel komplementált  $\Delta\text{atm1}$  sejtek vad típusnak megfelelő citokróom és extramitokondriális hem tartalmú fehérje koncentrációjúak, harmadszor a mitokondrium nem tartalmaz emelkedett mértékben vasat, végül a celluláris glutathion szint csökkent  $\Delta\text{atm1}$ -hez képest. Ezen adatok azt mutatják, hogy az  $\text{Atm1 p}$  és a humán ABC7 funkciója átfedi egymást, ugyanazon szubsztrátot szállítják.

A membránban elfoglalt helyzet alapján az  $\text{Atm1p/hABC7}$  exporterként működik. De mit szállíthat? Ennek megválaszolásában segíthet azonos komponensek vizsgálata, amelyek interakcióba lépnek ezen fehérjével. Az egyik ilyen az elágazó láncú aminosav transzamináz,  $\text{Bat1p}$  az élesztőben, amelynek overexpressziója a növekedési zavart, a termoszenzitív  $\Delta\text{atm1}$  sejteknél helyreállítja nem permisszív körülmények közt. Az elágazó láncú alfa ketosavak sziderofórként működnek egyes baktériumokban. Így előfordulhat, hogy az alfa ketosavak eukariótákban is hasonló szerepet töltenek be.

A humán ABC7 gén a kromoszómális lokalizációja Xq13.1-13.3. Ez a terület megegyezik az X-hez kötött öröklött szideroblasztos anémia esetén érintett területtel, s ezen sejtek szintén tartalmaznak nagymértékű vas depositumokat a mitokondriumban. Kutatásaink alapján felmerült annak a lehetősége, hogy ez a betegség ezen génhez kötött, s röviddel publikálásunk után megjelent egy közlemény, mely ezt az elképzelést teljes mértékben alátámasztotta.

Ez a tanulmány megadja az első lépést a mitokondriális vasanyagcsere megismeréséhez, ahol a komponensek azonosítása és funkcionális analízise a

cél. Az elsőként megismert élesztő komponens, az *Atm1p*-t kóóoló gén deléciója ill. ennek humán homológjának a mutációja súlyos következményekkel jár mindkét sejt esetén, ami a mitokondriális vasanyagcsere nagyfokú konzerváltságát, és ezen folyamatok fontosságát támasztja alá az eukarióta sejtek életében.

## **Saját eredményeim összefoglalása**

1. Az *Atm1* fehérje a mitokondrium belső membrán integráns fehérjéje
2. Az *ATM1* gén deléciója nem csökkenti a c típusú citokrómok apofehérjéinek szintézisét, viszont kb. 10%-ra csökkenti a holoenzimek mennyiségét.
3. A  $\Delta atm1$  sejtekből izolált mitokondriumok a vad típushoz képest harmincszor több vasat tartalmaznak.
4. A humán *ABC7* gén teljes szekvenciája meghatározásra került.
5. A humán *ABC7* a mitokondriumban helyezkedik el.
6. A humán *ABC7* az *Atm1p* ortológja, az *ATM1* gén deléciójának hatását részlegesen kiküszöböli.

Előadás:

1. **P. Csere**, B. Bódis, L. Nagy, Gy. Mózsik: Az alkohol hatása izolált patkány gyomornyálkahártya sejtekre  
1994. TDK házi konferencia
2. Mezey B., Tóth K., Habon T., Keller J., **Csere P.**: Postinfarctusos betegek követéses vizsgálata ergometriával és impedancia kardiográfiával  
1994. Balatonfüred, Magyar Kardiológus Társaság Tudományos Kongresszusa  
Kivonat megjelent a Card. Hung. Abstract Könyvében (1994. 9.o)
3. B. Bodis, **P. Csere**, O. Karadi, L. Nagy, Gy. Mozsik: Effect of ethanol, indomethacin and their combination on isolated gastric mucosal cells from the rats.  
1994. Balatonaliga Gastroenterológus Kongresszus  
Z. Gastroenterologie 32:280-281. (1994)
4. G. Varbiro, B. Debreceni, **P. Csere**, B. Sumegi, Gy. Mozsik: Analysis of heat shock proteins with monoclonal antibodies in rat lingual and buccal mucosa following 2',3'dideoxycytidine (ddC) treatment  
1995. Balatonaliga, Gastroenterológus Kongresszus  
Z. Gastroenterologie 5:314 (1995)
5. **P. Csere**, G. Varbiro, B. Sumegi, Gy. Mozsik: Has the AIDS treatment effect on the whole GI tract in heat shock protein level?  
1995. Pécs, IUPHAR symposium  
Dig. Dis. Sci. -41:442 (1996)
6. **P. Csere**, B. Debreceni, G. Varbiro, Gy. Mozsik, B. Sumegi, Gy. Kispal: Function of a mitochondrial multi-drug resistance transporter homolog, Atm1p.  
1996. Balatonaliga, Gastroenterológus Vándorgyűlés  
Z. Gastroenterologie 5:306 (1996)
7. G. Varbiro, B. Debreceni, **P. Csere**, B. Sumegi, Gy. Mozsik: The role of heat shock proteins in gastric cytoprotection  
1996. Balatonaliga, Gastroenterológus Vándorgyűlés  
Z. Gastroenterologie 5:338 (1996)
8. **P. Csere**, B. Debreceni, G. Varbiro, Gy. Mozsik, B. Sumegi, Gy. Kispal: Function of a mitochondrial multi-drug resistance transporter homolog, Atm1p.  
1996. Berlin 7<sup>th</sup> European students Conference at the Charite
9. **Csere P.**, Kispal Gy., Sümegi B. Mozsik Gy. :Egy mitochondrialis ABC-transporter functioi  
1997. Pote Tudomanyos szakosztalyi üles

10. Kispál Gyula, **Csere Péter**, Sümegi Balázs, Roland Lill Egy mitochondriális ABC transzporter (Atm1p) szerepe a vas anyagcserében. 1997. Sümeg, Biokémikus Vándorgyűlés
11. **Peter Csere**, Balazs Debreceni, Gyula Mozsik, Roland Lill, Balazs Sümegi, Gyula Kispal: The function of CPV motif 1997. Balatonaliga, Gastroenterológus Vándorgyűlés Z.Gastroenterologie 35:372 (1997)
12. **Peter Csere**, Gyula Kispal, Roland Lill, Gyula Mozsik: An ABC transporter might take part in iron homeostasis in human 1998. Balatonaliga, Gastroenterológus Vándorgyűlés Z. Gastroenterologie 36:420 (1998)
13. **Peter Csere**, Roland Lill, Gyula Kispal: Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p 1998. Third Workshop on Intracellular Transport and Maturation of Proteins, Sonderforschungsbereich 286, 1998

#### Könyvfejezet:

1. **P. Csere**, G. Varbiro, B. Sümegi, Gy. Mozsik: AIDS treatment and the heat shock protein level in the GI tract In: Gaginella T., Mozsik Gy., Rainsford K. D. (Eds). Biochemical Pharmacology as Approach to gastrointestinal Disease: From Basic Science to Clinical Perspectives. Kluwer academic Publisher, pp.287-295. (1997)

#### Publikált cikkek:

1. **P. Csere**, G. Varbiro, B. Sümegi, Gy. Mozsik: AIDS treatment and the heat shock protein level in the GI tract Inflammopharmacology 5: 83-91 (1997)
2. Gyula Kispal, **Peter Csere**, Bernard Guiard, Roland Lill: The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis FEBS letters 418 (1997) 346-350
3. **Peter Csere**, Roland Lill, Gyula Kispal: Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p FEBS letters 441 (1998) 266-270
4. Gyula Kispal, **Peter Csere**, Corinna Prohl, Roland Lill: The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins EMBO J.18 (1999) 3981-3989