

Streszczenie

Ludzkie białko oporności wielolekowej ABCG2 należy do nadrodziny białek ABC, będącej jedną z najliczniejszych grup białek błonowych, występującą u wszystkich organizmów żywych. U człowieka białko ABCG2 funkcjonuje jako transporter wielu substancji o znaczeniu fizjologicznym – metabolitów, składników pożywienia, leków. Jego aktywność ma znaczenie w farmakokinetyce leków i innych ksenobiotyków, w farmakologicznych oddziaływaniach lek-lek, pożywienie-lek i pożywienie-pożywienie, a szczególnie w funkcji tkanek barierowych (nie pozwalających toksynom dostawać się do szczególnie wrażliwych miejsc organizmu). Dodatkowo białko ABCG2 jest jednym z trzech transporterów z nadrodziny ABC, dla których postuluje się udział w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów. Podczas gdy dla prawidłowego funkcjonowania zdrowych tkanek barierowych jego ekspresja jest nieodzowna, jego patologiczna nadekspresja w komórkach zmienionych nowotworowo może być odpowiedzialna za zniesienie ich wrażliwości na chemioterapeutyki, a w konsekwencji za niepowodzenie leczenia.

Choć literatura przedmiotu bogata jest w informacje dotyczące specyficzności substratowej i mechanizmu aktywności białka ABCG2, nadal wiele ważnych naturalnych substratów pozostaje niezidentyfikowanych, nie potrafimy również formułować ogólnych reguł predykcji oddziaływań ABCG2 ze związkami drobnocząsteczkowymi. Stosunkowo mało wiadomo również o jego biogenezie, losach wewnątrzkomórkowych i mechanizmach regulacji lokalizacji w obrębie komórki. Identyfikacja tych luk w wiedzy, a także w niezbędnym do jej poszerzenia repertuarze metod badawczych, była impulsem do podjęcia badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Wysiłek badawczy skupił się na stworzeniu innowacyjnych narzędzi, niezbędnych do badania aktywności białka ABCG2; na opracowaniu i walidacji metod wykorzystujących te narzędzia i nowoczesne techniki pomiarowe (głównie mikroskopowe); oraz na weryfikacji szczegółowych hipotez dotyczących oddziaływania konkretnych substratów i inhibitorów z ABCG2. W toku prowadzonych prac udało się znacząco poszerzyć paletę dostępnych metod badania biologii białka ABCG2, znacząco zwiększyć liczbę znanych substratów i inhibitorów tego białka, a także poczynić interesujące obserwacje naukowe zwiększające zasób wiedzy o ABCG2 i ogólnie o transporterach błonowych.

Wśród najważniejszych przedmiotów zainteresowania znalazły się: określenie specyficzności substratowej białka w stosunku do znanych oraz nowych związków polifenolowych o potencjalnej aktywności farmakologicznej; zbadanie mechanizmu i kinetyki oddziaływania ABCG2 z wybranymi substratami i inhibitorami; oraz zbadanie subkomórkowej redystrybucji białka ABCG2 w odpowiedzi na zmiany konformacyjne oraz stymulacje farmakologiczne. W pracy zaawansowano szereg technik spektroskopowych i obrazowania biologicznego, opartych w dużej mierze o mikroskopię konfokalną, a także samodzielnie przygotowanych

materiałów modelowych (plazmidów ekspresyjnych, linii komórkowych). Użyto ich do opracowania nowych, oryginalnych metod badawczych, bez których eksperymentalne przetestowanie założonych hipotez w odniesieniu do trzech obszarów zainteresowania, dotyczących specyficzności substratowej, aktywności i lokalizacji subkomórkowej ABCG2, nie byłoby możliwe.

W wyniku przeprowadzonych prac udało się przystosować metodę derywatywacji fluorescencyjnej flawonoidów za pomocą estru 2-aminoetylowego kwasu difenyloborinowego (DPBA) do badania aktywności transportowej białka ABCG2 w komórkach ssaczych. Umożliwiło to identyfikację kilkudziesięciu flawonoidów, związków naturalnych pochodzenia roślinnego obecnych w żywności, jako nieznanych uprzednio substratów białka ABCG2, z istotnymi implikacjami dla ich farmakokinetyki w organizmie ludzkim. Flawonoid luteolinę udało się zidentyfikować i opisać jako dobry nowo zidentyfikowany substrat modelowy do badania aktywności i inhibicji transportera ABCG2. Zastosowano obrazowanie czasu życia fluorescencji (FLIM) do czasowo-rozdzielczej dekonwolucji obrazu, co wykorzystano przy pomiarach aktywności białka ABCG2. Wdrożono również metodę bazującą na pomiarach Försterowskiego rezonansowego transferu energii (FRET) w celu określania powinowactwa substratu do białka transportowego w żywej komórce. Stosując pomiary FRET-FLIM udało się również udowodnić eksperymentalnie oddziaływanie białko-białko między cząsteczkami ABCG2.

Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik obrazowania, opartych o mikroskopię konfokalną, udało się odkryć i dokładnie scharakteryzować nowe interesujące zjawisko: stymulowaną wiązaniem przeciwciała endocytozę ludzkiego białka oporności wielolekowej ABCG2. W wyniku przeprowadzonych badań udało się wyjaśnić, że stabilizacji jednej z możliwych konformacji białka przez przeciwciało następuje szybka internalizacja kompleksu białko-przeciwciało, zachodząca na drodze endocytozy o mechanizmie mieszanym, częściowo zależnym od klatryny, częściowo od cholesterolu. Udało się również wyjaśnić, że internalizowany kompleks trafia do systemu endosomalnego, gdzie ulega częściowo kierowaniu do lizosomów i trawieniu, a częściowo zatrzymaniu w kompartmentach endosomalnym i recyclingowi z powrotem do błony plazmatycznej.

Summary

The human multidrug resistance protein ABCG2 belongs to the ABC protein superfamily, which is one of the largest groups of membrane proteins found in all living organisms. In humans the ABCG2 protein functions as a transporter for many substances of physiological importance - metabolites, dietary compounds, drugs. Its activity is important for the pharmacokinetics of drugs and other xenobiotics, in pharmacological drug-drug, food-drug and food-food interactions, and especially in the function of barrier tissues (which prevent toxins from reaching particularly sensitive areas of the body). In addition, the ABCG2 protein is one of three transporters from the ABC superfamily, involvement of which is postulated in the phenomenon of multidrug resistance of cancer. While its expression is essential for the proper functioning of healthy barrier tissues, its pathological overexpression in neoplastic cells may be responsible for making them less sensitive to chemotherapeutic agents and consequently for treatment failure.

Although the literature on the subject is rich in data on substrate specificity and mechanism of ABCG2 protein activity, many important natural substrates still remain unidentified, and we are unable to formulate general rules for predicting the interactions of ABCG2 with small molecule compounds. Relatively little is also known about its biogenesis, intracellular fate and mechanisms of regulation of localization within the cell. Identification of these gaps in knowledge, as well as in the repertoire of research methods necessary to expand it, was the impulse for undertaking research described in this doctoral dissertation. The research effort focused on creating innovative tools necessary to study the activity of the ABCG2 protein; on the development and validation of methods using these tools and modern measurement techniques (mainly microscopic ones); and on the verification of detailed hypotheses regarding the interaction of specific substrates and inhibitors with ABCG2. In the course of this work, it was possible to significantly expand the range of available methods for studying the biology of the ABCG2 protein, to considerably increase the number of known substrates and inhibitors of this protein, and to make interesting scientific observations that increased the knowledge base on ABCG2 and membrane transporters in general.

Among the most important foci of interest were: determination of protein substrate specificity in relation to known and new polyphenolic compounds with potential pharmacological activity; researching the mechanism and kinetics of ABCG2 interaction with selected substrates and inhibitors; and investigation of subcellular redistribution of the ABCG2 protein in response to conformational changes and pharmacological stimuli.

The described work led to development a number of spectroscopic and biological imaging techniques, largely based on confocal microscopy, as well as self-prepared model materials (expression plasmids, cell lines). They were used to develop new, original research methods,

without which it would not be possible to experimentally test the assumed hypotheses in relation to the three areas of interest: substrate specificity, activity and subcellular localization of ABCG2.

As a result of conducted work, it was possible to adapt the method of fluorescent derivatization of flavonoids using diphenylboronic acid 2-aminoethyl ester (DPBA) to study the transport activity of the ABCG2 protein in mammalian cells. This made possible the identification of several dozen flavonoids, natural compounds of plant origin present in food, as previously unknown substrates of the ABCG2 protein, with significant implications for their pharmacokinetics in the human body. The flavonoid luteolin has been identified and described as a good newly identified model substrate for studying the activity and inhibition of the ABCG2 transporter. Fluorescence lifetime imaging (FLIM) was used for time-resolved deconvolution of the image, which was used to measure the activity of the ABCG2 protein. A method based on Förster resonance energy transfer (FRET) measurements was also implemented to determine the affinity of the substrate for the transport protein in a living cell. Using FRET-FLIM measurements, it was also possible to experimentally prove the protein-protein interaction between ABCG2 molecules.

Thanks to the use of advanced imaging techniques based on confocal microscopy, it was possible to discover and characterize a new interesting phenomenon: antibody binding-stimulated endocytosis of the human multidrug resistance protein ABCG2. As a result of conducted research, it was possible to explain that the stabilization of one of possible conformations of the protein by the antibody is followed by rapid internalization of the protein-antibody complex, which occurs by endocytosis with a mixed mechanism, partly dependent on clathrin, partly on cholesterol. It was also possible to explain that the internalized complex goes to the endosomal system, where it is partly directed to lysosomes and digested, and partly retained in the endosomal compartment and recycled back to the plasma membrane.