

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



AZ ABCG1 TRANZSPORTER TÚLTERMELTETÉSÉNEK HATÁSA TRANZGÉNIKUS EGÉR EMBRIÓKBAN

Hoffmann Orsolya

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.
hoffmann@abc.hu

Összefoglalás

Az ABC (ATP-binding cassette) fehérjék minden eddig vizsgált szervezetben megtalálható, az aktív membrántranszportban elengedhetetlen szerepet játszó fehérjék, mutációik különböző örökletes megbetegedések okozói. Génjeik alkotják az egyik legnagyobb szupercsaládot, melyet nyolc alcsaládra osztanak, a bennük szereplő gének szekvencia-hasonlósága alapján. TDK munkám célkitűzése olyan transzgenikus modell létrehozása, mely túltermeli a 'White' alcsaládba tartozó ABCG1 fehérjét és katalitikus mutáns formáit. A transzgenikus modellben történő túltermeltetés segít a fehérje eddig nem tisztázott, pontos funkciójának megismerésében. Az ABCG1 hat transzmembrán és három ABC alegységből épül fel. Az ABC alegység egy ATP kötő domén. Ez a 200-250 aminosav hosszúságú szakasz az aktív transzport energianyeréséhez szükséges. Az ABCG1 fehérje első ABC motívumában létrehozott mutáció miatt az ATP aktivitás sérül, ennek következtében a fehérje elveszti funkcióját. Az általunk létrehozott DNS konstrukció és annak fent leírt mutáns formája egy erős promóter (CMV) szabályozása alatt termelteti túl minden sejtben az ABCG1 fehérjét. A DNS vektor tartalmaz egy riporter gént, mely ugyanazon sejt típusokban és ugyanolyan mértékben expresszál, mint az ABCG1. A tisztított DNS szakaszt mikroinjektálás segítségével juttattuk egysejtes egérzigóták előmagjaiba. A DNS beépülését követően több osztódáson keresztül figyelemmel kísértük az embriók fejlődési potenciálját. Előzetes eredményeink alapján a vad típusú fehérje túltermelése az embriók osztódásában zavart okoz, amit már előre jeleztek az in vitro kísérletek is. A túltermeltetett mutáns fehérje esetében ezt a hatást nem tapasztaltuk. Kutatási eredményeink lehetőséget biztosítanak egy ABCG1 fehérjét túltermelő transzgenikus egérvonal létrehozására.

Kulcsszavak: ABC (ATP-binding cassette), transzgenikus egér, mikroinjektálás, túltermeltetés

The effect of overexpression of ABCG1 in transgenic mouse zygotes

Abstract

ABC (ATP binding cassette) proteins can be found in all organisms. They play an important role in active membrane transport and their mutations cause several heritable diseases. Their genes make up one of the biggest super family that is divided into 8 subfamilies according to the similarities of gene sequences. The goal of my TDK work was to create a transgenic model that overexpresses the ABCG1 protein of the White subfamily and its catalytic mutant form. Overexpression in this transgenic model helps to understand the unexplored functions of the protein. ABCG1 has 6 transmembrane and 3 ABC units. Each ABC unit is an ATP binding domain. This unit of 200-250 amino acids is necessary for gaining energy for active transportation. Mutation in the ABC motive injures the ATP activity and because of this the protein loses its function. Our DNA construct and its catalytic mutant form overexpresses ABCG1 protein in each cell under the regulation of strong promoter (CMV). The DNA vector has a reporter gene that expresses at the same level in the same cells as ABCG1. The purified DNA fragment was microinjected into one cell stage mouse zygotes' pronuclei. The embryos' development potential was followed up throughout several divisions after DNA integration. According to previous results the overproduction of wild type proteins disturbs the division of embryos. However it was not noticed with the overexpressed mutant protein. Our results make it possible to create transgenic mouse lines overexpressing protein ABCG1.

Kulcsszavak: ABC (ATP-binding cassette), transgenic mouse, microinjection, overexpression



Irodalmi áttekintés

Az ABCG1 gén leírása a *Drosophila melanogaster white* gén homológjaként az 1990-es évek közepén látott napvilágot. A *white* gén egy ABC transzporter fehérje, amely a guanin és triptofán sejtbe jutásáért felelős a *Drosophila*-ban (Croop és mtsai, 1997). A *Drosophila white* gén megfelelőjét emberben és egérben is klónozták, ezt nevezzük ma ABCG1 (ABC8) génnek. Ez a gén szekvenciáját tekintve 55-58%-ban azonos a *Drosophila melanogaster white* génjével.

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) és polimorfizmus vizsgálatok segítségével a gént ember esetében a 21-es kromoszóma q karjának 22.3 lókusznál lokalizálták.

Klucken és mtsai (2000) kutatásaik során azokat a fehérjéket és mögöttük húzódó géneket keresték, amelyek szerepet játszanak a makrofágok lipoprotein felvételében. Azt találták, hogy az ABCG1 fehérje részt vesz a koleszterin beáramlásában, a monocitákból származó makrofágokban. Ezzel ellentétben azokban a makrofágokban, amelyek koleszterinnel telítettek, amit a koleszterin HDL3 receptor érzékel, az ABCG1 gén expressziója kevésbé kifejezett mértékű.

2004-ben jelent meg Štefková és munkatársainak (2004) cikke is, amely pontosan leírja az ABC transzporter fehérjék felépítését, szerkezetét, továbbá, hogy az ABC transzporterek nem közvetlenül játszanak szerepet szubsztrátjaik mozgásában, hanem ioncsatornák részeiként.

Magyar kutatók (Cserepes és mtsai, 2004) az ABCG1 és ABCG4 fehérjéket és ezek katalitikus mutáns alakjait termeltették rovar sejtekben. Létrehozták ezen fehérjék antitesteket, hogy segítsék a fehérjék funkciójának kiderítését, és igazolni tudják jelenlétüket a különböző membrán preparátumokban. Az Sf9 rovar sejt rendszert használták arra, hogy termeltessék, és biokémiaiileg elemezzék a fehérjéket. Úgy találták, hogy ezek az egymáshoz igen közel álló fehérjék vanadát érzékeny membrán ATPáz funkcióval bírnak. Továbbá megállapították, hogy a működő ABCG fehérjék létrejöttének feltétele a dimerizáció. Valamint, hogy az ABCG1 és ABCG4 fehérjék nemcsak heterodimerként, de homodimerként is működőképesek.

Kennedy és mtsai (2005) létrehoztak egy ABCG1 „knock out” egérvonalat. A fiatal ABCG1 $-/-$ egerek nem különböztek alomtársaiktól abban az esetben, ha alaptakarmányozást kaptak. Ugyanakkor az idősebb (15-24 hetes) ABCG1 $-/-$ egerek tüdejében már észrevehető a lipid felhalmozódás. Az egereket magas koleszterin tartalmú takarmánnyal etetve a zsírháztartás egyensúlya és a sejtek zsírtartalmának szabályozása felborul. Trigliceridek, koleszterin és foszfolipidek halmozódnak fel különböző szövetekben (Kennedy és mtsai, 2005). Kutatásaik megerősítették azt az elképzelést, hogy az ABCG1 gén szerepet játszik zsírháztartás homeosztázisának fenntartásában.



Kutatócsoportunk ezekre az irodalmi adatokra támaszkodva tűzte ki azt a célt, hogy létrehozzon egy *in vivo* modelt az ABCG1 fehérje funkciójának kiderítésére.

A DNS konstrukciók létrehozása

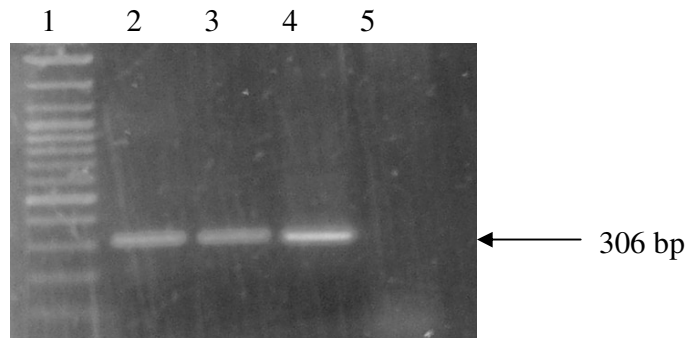
A DNS konstrukció alapját, az ABCG1 gént, Seres László bocsátotta rendelkezésünkre. Az ABCG1 gén vad és katalitikus mutáns alakját cDNS formájában kaptuk meg, plazmidba „csomagolva”. A mutáns alak csak egy pontmutációban különbözik az eredetitől, de ez a változtatás a transzporter molekula ATP-kötő képességének elvesztéséhez vezet.

A transzgén konstrukció létrehozásának első lépése volt az előbb leírt géneket tartalmazó pAcu-G1-Km és pAcu-G1-Wt plazmidok emésztése restriktív endonukleázzal, ami pontosan kivágta a megfelelő cDNS-t. Ezt ezután elektroforézissel elválasztottunk, majd a fragmentet izoláltuk. Az így megkapott cDNS-t a pIRES2-EGFP vektorba klónoztuk, majd *E. coli* DH5 α törzsébe transzformáltuk a vektort. A kultúrákból mini-, ill. maxiprep módszerekkel plazmid DNS-t izoláltunk. A plazmid DNS-t restriktív endonukleázzal emésztettük, elválasztottuk, izoláltuk és injektáló oldatot készítettünk belőle. Az injektáló oldatot, alacsony koncentrációban egysejtes egér embriók apai előmagjába juttatuk.

Mikroinjektálás

Az injektálás hatékonysága a vad típus esetében 5,2% (57 injektált embrióból 3-ban történt beépülés), míg a mutáns gént tartalmazó konstrukcióval szűrt embrióknál 3,2% (31 injektált embrióból 1-ben történt beépülés). Ez az arányt átlagosnak mondható. Sikerült megvalósítani mindkét konstrukció beépülését.

A sikeres transzgenézis miatt az UV fényben megvilágított embrió fluoreszkál. A riporter gén expressziója bizonyítja a transzgén beépülését a genomba. Természetesen ezt ellenőriztük PCR reakcióval is, melynek gélelektroforetikus képe látható az *1. képen*.



1. kép: A beépülést visszaellenőrző egycsaj PCR elektroforetikus képe

(1. csatorna: 1 kb DNS létra, 2. csatorna: a 2. képen látható embrió DNS-e, 3. csatorna: pozitív kontrol (injektáló oldat), 4. csatorna: pozitív plazmid kontrol, 5. csatorna: negatív kontrol, normál egér DNS)

Picture 1. Electrophoretic analysis of the one-cell PCR to verify transgene insertion

(lane 1: 1 kb DNA ladder, lane 2: DNA of the embryo shown in Picture 2., lane 3: positive control (injection fluid), lane 4: positive plasmid control, lane 5: negative control, DNA of a normal mouse)

Eredmények

Az ABC alcsaládba tartozó ABCG1 génnel és fehérjével már sok kutató foglalkozott, de pontos szerepe máig sem ismeretes. A funkció további vizsgálatához *in vivo* modellt készítettünk.

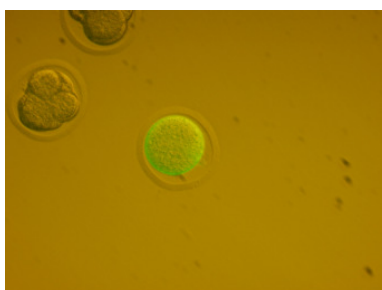
Munkánk célja a gén élő rendszerben történő vizsgálata volt. Ehhez létrehoztuk a szükséges DNS konstrukciókat az ABCG1 génből és annak katalitikus mutáns alakjából. Ahhoz, hogy az ABCG1 gén és a riporter gén expressziója együttes legyen egy bicisztronos konstrukciót állítottunk elő, és létrehoztuk a vad és a mutáns konstrukciót. A vektorokból a transzgenézishez szükséges injektáló oldatokat elkészítettük.

A mikroinjektálás módszerét választottuk a transzgénikus embriók előállításához. Sikerült létrehozni több olyan embriót, amelyekbe a transzgén beépült. A vad típusú konstrukció beépülésével az embrióban sikerült túlexpresszálni az ABCG1 gént, amely zavart okozott az embrió fejlődésében. Ez az osztódás megkezdésében nyilvánult meg, de érdekes módon nem vonta maga után az embrió elpusztulását. További két embrió mozaikosan tartalmazta a konstrukció vad típusát.

Mutáns alak beépülését is sikerült elérnünk. Két olyan embrió jött létre, amelyek mozaikosan tartalmazzák a mutáns konstrukciót. Ezek esetében az ABCG1 gén kifejeződése a normális szinten maradt, mivel a beépült mutáns alak funkcionálisan inaktív. Ezek az embriók a kísérleteink során tovább osztódtak.

Értékelés

Sikerült megvalósítani mindkét konstrukció beépülését. Az injektálás hatékonysága a vad típus esetében 5,2%, míg a mutáns gént tartalmazó konstrukcióval szűrt embrióknál 3,2%. A vad típusú ABCG1 gént tartalmazó konstrukció beépülése három esetben volt detektálható. A három sikeres transzgenézisből származó embriók egyike látható 2. képen. A sikeres transzgenézis miatt az UV fényben megvilágított embrió fluoreszkál. A riporter gén expressziója bizonyítja a transzgén beépülését a genomba. Természetesen ezt ellenőriztük PCR reakcióval is.



2. kép: Egysejtes transzgénikus embrió

Picture 2. One-cell transgenic embryo

A mikroinjektálás eredményeként létrehozott, másik kettő, szintén vad típusú konstrukciót hordozó embrió mozaikos beépülést mutatott. Az embriók eljutottak a 4 sejtes állapotig, de ott megrekedtek a fejlődésben. A mutáns ABCG1 gént tartalmazó konstrukció injektálása –melyet kontrollként használtunk- egy olyan embrió létrejöttét hozta, amelynek nem minden sejtje hordozta a transzgén. Ez az embrió blasztocisztává fejlődött.

Következtetések

Összegzésként megállapítható, hogy az ABCG1 gén és az általa kódolt ABCG1 transzporter fehérje fontos szerepet játszik valamilyen esszenciális anyagok szállításában. Irodalmi adatok (Štefková és mtsai, 2004, Kennedy és mtsai, 2005) szerint szubsztrátjai a zsírháztartás anyagai: koleszterol és foszfolipidek. Eredményeink alátámasztják az ABCG1 transzporter fehérje zavartalan működésének elengedhetetlen mivoltát.

Ha eredményeinket az irodalmi adatokkal (Štefková és mtsai, 2004, Cserepes és mtsai, 2004) összevetjük megállapítható, hogy azok megerősítik azt a feltevést, miszerint az ABCG1 gén és a róla íródó fehérje valamilyen „esszenciális út” résztvevője. Irodalmi adatokra (Klucken és mtsai, 2000) támaszkodva feltételezhető, hogy ez a fehérje a zsírháztartásban játszik szerepet.



Mivel létezik homo- és heterodimer formája is (*Cserpes és mtsai*, 2004), ezért expressziójának változása súlyos következményekkel jár (*Paragh és Harangi*, 2001). A megváltozott mértékű génkifejeződés miatt a szubsztrátok szállításában zavar következik be, amely akár súlyos fiziológiai problémákat is okozhat.

Ezt erősítik meg az általunk létrehozott vad típusú konstrukciót tartalmazó embriók is, amelyekben az ABCG1 fehérjét sikerült túltermeltetni. Ezek az embriók kivétel nélkül megrekedtek a fejlődésben. A konstrukció promotere a mögötte található géneket már korai embrionális korban „meghajtja”, így már ebben a fejlődési szakaszban megjelentek a fejlődési zavarok.

javaslatok

A kísérleti eredmények jobb alátámasztása érdekében el kell végezni a DNS integráció bizonyítását inverz PCR segítségével és a termelődő transzgénikus fehérje immunhisztokémiai vizsgálatát.

A konstrukció promotere (CMV) embrióban az igen korai, egysejtes állapotban általában még nem expresszál, kifejeződése csak az első osztódások után várható. Ez a tény nem mond ellen azzal, hogy a vad típus esetében látható az expresszió egysejtes állapotban is. Ez azzal magyarázható, hogy az adott embrió bár egysejtes állapotú volt, de kora megfelelt a 8-16 sejtes állapotnak. Ez lehetőséget biztosított a promóter bekapcsolódására. A jövőben természetesen több mikroinjektálásra van szükség az adatok részletesebb értékeléséhez.

További kísérleteinkben szeretnénk létrehozni olyan transzgénikus állatmodellt, amelyben az ABCG1 fehérje túlexpresszál. Az ilyen módon megváltoztatott fehérjearány megvilágíthatja a jövőben számunkra az ABCG1 fehérje pontos funkcióját. Elvezethet minket annak megértéséhez, hogy konkrétan az ABCG1 fehérje, illetve az ez által jobban megismert többi ABC transzporter fehérje mutációi miért okoznak súlyos megbetegedéseket az emberi szervezetben.

Köszönetnyilvánítás

Kiemelt köszönet illeti, Hiripi Lászlót (a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont tudományos munkatársa), aki minden támogatást megadott ahhoz, hogy ez a munka elkészülhessen. A gyakorlati és elméleti megvalósításában is elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Szeretnék köszönetet mondani Bösze Zsuzsannának (a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont tudományos tanácsadója), a munkacsoport vezetőjének.



Köszönöm Horvainé Szabó Máriának (egyetemi docens, SZIE, Sertés- és Kisállattenyésztési Tanszék) a hasznos segítségét.

Továbbá köszönet illeti a laboratórium dolgozóit, akik az összes kérdésemre feleltek és mindig, mindenben a segítségemre voltak.

Seres Lászlónak szeretném megköszönni, hogy rendelkezésre bocsátotta számunkra a plazmidokat.

Irodalomjegyzék

- Croop, M.J., Tiller, E.G., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S. and Wu, R.L. (1997): Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila white* gene. Gene, 185. 77-85.*
- Cserepes J., Szentpéteri Zs., Seres L., Özvegy-Laczka Cs., Langmann T., Schmitz G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya L., Váradi A., Sarkadi B. And Elkind, B. (2004): Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. Biochem. Biophys. Res. Comm., 320. 860-867.*
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, Á., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L. And Edwards, P.A. (2005): ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metabolism, 1. 121-131.*
- Klucken, J., Büchler, C., Orsó E., Kaminski, W.E., Porsch-Özçürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R. And Schmitz, G. (2000): ABCG1 the human homolog of the *Drosophila white* gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. PNAS, 97. 2.*
- Paragh Gy., Harangi M. (2001): The role of HDL in the prevention of cardiovascular events. Orvosi Hetilap, 142. 3. 121-6.*
- Štefkova, J., Poledne, R. and Hubáček, J.A. (2004): ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases. Physiol. Res., 53. 235-243.*