

DISS. ETH NO. 28000

***Structural studies of human ABC transporters ABCB1 and ABCB4***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

KAMIL NOSOL

*M.Sc.Eng. in Biotechnology, Warsaw University of Technology*

born on *02.07.1993*  
citizen of Poland

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Kaspar Locher*  
*Prof. Dr. Raimund Dutzler*  
*Prof. Dr. Rudolf Glockshuber*

2022

## Summary

Human organs have to be protected from a myriad of xenobiotic compounds. One of the mechanisms mitigating the toxic effects of drugs is to actively extrude them from the cell. ATP-binding cassette transporters play a major role by harnessing the energy from binding and hydrolyzing ATP molecules to translocate these xenobiotics across the membrane. ABC transporters can also be overexpressed in cancer cells, where they contribute to multi-drug resistance and make chemotherapy treatment ineffective. In particular, ABCB1 (P-glycoprotein) can interact with a wide spectrum of chemically and structurally diverse molecules, however, it was unknown why some of these compounds can be easily transported, while others act as inhibitors.

ABCB1 is a closely related homolog of human phosphatidylcholine translocator, ABCB4, with 86% amino acid sequence similarity. ABCB4 is a hepatobiliary transporter that translocates lipids from the inner leaflet of the apical membrane into liver canaliculi. The extruded lipids are constituents of mixed micelles that facilitate the formation of bile. These lipids alleviate the detergent-like property of bile salts and crystallization of cholesterol, both transported into canaliculi by ABCB11 and ABCG5/G8, respectively. The dysfunction of ABCB4, whether inherited or acquired, is thus associated with liver damage, including the most severe cases such as fibrosis and ultimately cirrhosis.

The limited knowledge about the mechanism of function of these transporters led to the here described research. At the beginning of this work, only three high resolution structures of the transporters were known: the closed conformation of both human ABCB1 and ABCB4, representing a post-translocation state, and the substrate-bound state of ABCB1 in occluded conformation. These structures revealed the general architecture of the transporters, but the mechanisms of ABCB1 inhibition and ABCB4 lipid translocation remained unknown. In addition, it was not clear why two structurally similar proteins have distinct substrate specificity and thus different physiological roles in the human body.

The goal of my doctoral thesis project was to combine structural and functional approaches to study both human ABCB1 and ABCB4, describe in detail the mechanisms

of these transporters, investigate how they interact with different substrates and inhibitors and elucidate distinct substrate specificities. *Chapter 1* gives a brief introduction to ABC transporters, multidrug resistance and hepatobiliary transport. *Chapter 2* discusses how the transport activity of ABCB1 is inhibited, and introduces the concept of an access tunnel, *i.e.*, a cavity adjacent to the binding pocket, a key feature where small molecules can bind and thus modulate the transporter. *Chapters 3 and 4* focus on the ABCB4 transporter. First, I present in detail a phage display technique that was employed to isolate Fab-fragments, so-called synthetic antibodies, specific to the transporter and describe the challenges associated with identifying the immunodominant epitope and how they were overcome. In the next step, two Fab-fragments binding two distinct halves of the transporter were employed for structural study and facilitated structure determination of ABCB4 in three distinct conformations. Then, I propose a structure-based transport mechanism, explain ABCB4's selectivity for phosphatidylcholine lipids and reveal the key role of residue W234 that engages in a cation- $\pi$  interaction with the choline headgroup of the lipid. Finally, *Chapter 5* presents a structural comparison between ABCB1 and ABCB4 and identifies structural elements that define the proteins' distinct functions. Furthermore, by modifying the binding pocket of ABCB1, I generated ABCB1-ABCB4 chimera proteins, which yielded gain-of-function of lipid translocation activity.

This work not only provides insight into conformational changes required for the function of ABCB1 and ABCB4, but also for the entire B-subfamily of human ABC transporters. The results elucidate the mechanism of ABCB1 inhibition, substrate specificity of ABCB4 and ABCB4-mediated transport mechanism and provide the basis for further studies of human ABC transporters.

# Zusammenfassung

Menschliche Organe müssen vor einer Vielzahl von xenobiotischen Verbindungen geschützt werden. Einer der Mechanismen, der die toxischen Wirkungen von Medikamenten mildert, besteht darin, diese aktiv aus der Zelle zu schleusen. Die ATP-bindenden Kassettentransporter spielen hierbei eine wichtige Rolle, indem sie die Bindungsenergie aus der Hydrolyse von ATP-Molekülen nutzen, um Xenobiotika durch die Membran zu translokieren. Auch in Krebszellen können ABC-Transporter überexprimiert werden, wo sie einer Chemotherapie entgegenwirken können und somit zur Multiresistenz beitragen. Insbesondere ABCB1, auch bekannt als P-Glykoprotein, interagiert mit einem breiten Spektrum von chemisch und strukturell unterschiedlichen Molekülen, jedoch war unbekannt, warum einige Verbindungen leicht transportiert werden, während andere als Inhibitoren wirken.

Der menschlichen Phosphatidylcholin-Translokator ABCB4 ist ein eng verwandtes Homolog des ABCB1 und weist eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von 86% auf. In der Funktion ist der ABCB4 ein hepatobiliärer Transporter, der Lipide aus der plasmatischen Seite der apikalen Membran in die Leberkanäle transportiert. Diese Lipide sind die Bestandteile von den Mischmizellen, die die Gallenbildung unterstützen. Die Lipide mildern die Detergens-ähnliche Eigenschaft von Gallensalzen und die Kristallisation von Cholesterin, welche durch den ABCB1 beziehungsweise durch den ABCG5/G8 in die Gallenkanälchen transportiert werden. Die Funktionsstörung von ABCB4, ob ererbt oder erworben, ist daher mit Leberschäden verbunden, darunter zählen einige der schwersten Fälle von Fibrose und Zirrhose.

Das begrenzte Wissen über den Funktionsmechanismus dieser Transporter führte zu der hier beschriebenen Forschungsarbeit. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur drei hochauflösende Strukturen dieser Transporter bekannt. Die beiden geschlossenen Konformationen des humanen ABCB1 und des humanen ABCB4, die jeweils einen Post-Translokations-Zustand darstellen, und zusätzlich der substratgebundene Zustand von ABCB1 in der okkludierten Konformation. Diese Strukturen zeigten die allgemeine Architektur der Transporter, aber die Mechanismen der ABCB1-Hemmung und der ABCB4-Lipidtranslokation konnten nicht bestimmt werden. Zusätzlich war es unklar, weshalb zwei strukturell so ähnliche Proteine eine so differenzierte Substratspezifität

besitzen und dadurch unterschiedliche Aufgaben im menschlichen Körper erfüllen können.

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, strukturelle und funktionelle Ansätze zu kombinieren, um sowohl humanes ABCB1 als auch ABCB4 zu untersuchen. Die Interaktion mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren wurde studiert, um den Mechanismus und die Substratspezifität dieser Transporter im Detail zu beschreiben. Das *Kapitel 1* gibt eine kurze Einführung in die Thematik der ABC-Transporter, der Multidrug-Resistenz und des hepatobiliären Transportes. Das *Kapitel 2* diskutiert, wie die Transportaktivität von ABCB1 gehemmt wird und stelle das Konzept eines Zugangskanal vor, bei dem es sich um eine zusätzliche Vertiefung neben der Bindungstasche handelt, in der kleine Moleküle den Transporter modulieren können. Die *Kapiteln 3* und *4* legen den Fokus auf den ABCB4-Transporter. Zunächst präsentiere ich im Detail eine Phagen-Display-Technik, die für die Herstellung und Isolation von für den Transporter spezifischen Fab-Fragmenten, sogenannte synthetische Antikörper, verwendet wurde und beschreibe die Herausforderungen, die mit der Identifizierung des immundominanten Epitops verbunden sind und wie diese überwunden wurden. Im nächsten Schritt wurden zwei Fab-Fragmente, die an zwei unterschiedlichen Epitopen des Transporters binden, für Strukturstudien verwendet. Diese Methode erleichterte die Strukturbestimmung von ABCB4 in drei unterschiedlichen Konformationen. Strukturbasierend postuliere ich einen Transportmechanismus, der die Selektivität von ABCB4 für Phosphatidylcholinlipide erklärt und die Schlüsselrolle der Aminosäure W234, die an einer Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit der Cholin Kopfgruppe des Lipids beteiligt ist, enthüllt. Schliesslich wird in *Kapitel 5* einen Strukturvergleich zwischen ABCB1 und ABCB4 und identifiziere Strukturelemente präsentiert, die die unterschiedlichen Funktionen der Proteine definieren. Darüber hinaus konnte durch die Modifikation der Bindungstasche von ABCB1 ein ABCB1-ABCB4-Chimärenproteine generiert werden, welches in einer neuen Funktion der Lipidtranslokationsaktivität resultierte.

Diese Arbeit liefert nicht nur einen Einblick in Konformationsänderungen, die für die Funktion von ABCB1 und ABCB4 erforderlich sind, sondern auch für die gesamte B-Unterfamilie der menschlichen ABC-Transporter. Die Ergebnisse verdeutlichen den Mechanismus der ABCB1-Hemmung, die Substratspezifität von ABCB4 und den ABCB4-vermittelten Transportmechanismus. Des Weiteren bilden sie die Grundlage für nachfolgende Studien zu humanen ABC-Transportern.