Az 1-es típusú angiotenzin II receptor jelátvitel-szelektív aktivációjának hatása a receptor sorsára

Doktori tézisek

Dr. Szakadáti Gyöngyi

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
Dr. Balla András, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Liliom Károly, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Reményi Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fürst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Sperlágh Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest
2017

Bevezetés

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer létfontosságú szereppel bír a kardiovaszkuláris rendszer, valamint a só- és vízháztartás egyensúlyának szabályozásában, melynek köszönhetően igen fontos farmakológiai támadáspont is egyben. Ezt támasztják alá a klinikumban gyakran alkalmazott 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT_1R) blokkolók, valamint angiotenzin konvertáló enzim gátlók morbiditást és mortalitást csökkentő hatásai is.

Ezen rendhagyó endokrin rendszer egyik fő végrehajtó molekulája az angiotenzin II (AngII), mely hormon a vérnyomás és a plazmatérfogat szabályozását többek között az értónus növelésén, az aldoszteronszekréció, a szívizom-kontraktilitás és a szimpatikus idegrendszeri aktivitás fokozásán keresztül valósítja meg. Az AngII előbb felsorolt hatásait G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) családjába tartozó AT_1R-en keresztül fejti ki. Az AT_1R aktív konformációja igen sokrétű és szerteágazó jelátviteli hálózatot hoz működésbe, melybe mind G-fehérje-függő, mind pedig G-fehérjék működésétől független mechanizmusok is beletartoznak. A G-fehérje-független jelátviteli mechanizmusok szabályozásában a β-arresztinek játszanak központi regulátor szerepet, mely molekulákról ismert, hogy a receptor G-fehérjétől való szétkapcsolásában, azaz deszenzitizációjában, valamint a receptor internalizációjának elindításában is részt vesznek.

Az elmúlt évtizedek kutatásainak köszönhetően világossá vált, hogy a különböző ligandok eltérő aktív konformációban

stabilizálhatják a receptort, mely így eltérő mértékben képes aktiválni a különböző jelátviteli útvonalakat. A jelenséget jelátvitel-szelektív aktivációnak nevezzük. A jelátvitel-szelektív aktiváció évtizedek óta a GFKR-ek kutatásának egyik központi témája, és számos jelátvitel-szelektív AngII analóg AT_1R agonista is ismert már az irodalomban. Közöttük egy újabb vegyület a TRV120027 is, mely klinikai vizsgálatok tárgyát képezte szívelégtelenség kezelésében. Az ezen ligand által aktivált AT_1R ugyanis G-fehérjét nem képes kötni, azonban β-arresztin-kötése, ezáltal pedig a G-fehérje-független jelátvitele továbbra is megmarad, mely klinikailag igen előnyös hatáskombinációt eredményez.

A GFKR-ekre jellemző továbbá, hogy aktiválódást követően foszforilálódnak, deszenzitizálódnak, majd pedig internalizálódnak a sejt belsejébe. A lefűződött vezikulából először kialakul a korai endoszóma, melyből a receptor vagy a lizoszómális lebontás irányába, vagy pedig reciklizáló endoszómák segítségével a plazmamembrán felé folytathatja tovább az útját. Ezen internalizációs és externalizációs mechanizmusok összessége alapvetően meghatározza a receptorok, ezáltal pedig a sejtek érzékenységét és válaszkésségét.

Célkitűzések

Számos információval rendelkezünk már a GFKR-ek és köztük az AT_1R funkcionálisan szelektív aktivációjának mechanizmusáról és jelátviteli következményeiről. Kevéssé ismert azonban a szelektíven aktivált receptor további sejten belüli sorsa, mely meghatározó szereppel bír a sejtek érzékenységében. Munkánk célja ezért az AT_1R, mint kiemelkedően fontos funkcionálisan szelektív farmakológiai célpont, intracelluláris sorsának vizsgálata volt jelátvitel-szelektív ligandok hatására.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változik az AT_1R internalizációja jelátvitel szelektív aktivációt követően?
- Milyen mechanizmus játszik meghatározó szerepet az elfogult ligand által aktivált AT_1R korai endoszómákban való megjelenésében?
- Tapasztalható-e különbség a jelátvitel szelektív módon aktivált AT_1R-ok sejten belüli hosszabb távú sorsában, összevetve az AngII stimulált receptorokkal?

Módszerek

DNS konstrukciók

A sárgafluoreszcens fehérjével (eYFP) jelölt β-arresztin2-t munkacsoportunk korábban készítette el, hasonlóan a vad típusú és a DRY/AAY mutáns AT_1R-ok *Renilla* luciferázzal (Rluc) jelölt változatait is. A DRY/AAY AT_1R-ban az Asp125 és Arg126 aminosavakat alaninnal helyettesítettük, mely mutációk G-fehérje kötésre képtelen AT_1R-t eredményeztek.

Az AT_1R vezikuláris transzportjának vizsgálataihoz YFP-vel jelölt Rb4, Rab5, Rab7 és Rab11 konstrukciókat készítettünk a munkacsoportunk által már korábban is használt zöld fluoreszcens fehérjét (eGFP) tartalmazó konstrukciókból, a GFP-t kódoló szakasz YFP-re cserélésével. A PLCδ1 enzim foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfátot (PtdIns(4,5)P_2) kötő pleckstrin homológia doménjének (PH-domén) YFP-vel jelölt változatát szintén munkacsoportunk által korábban lett létrehozva (PLCδ1-PH-YFP). A PLCδ1-PH-szuper *Renilla* luciferáz konstrukció készítésénél pedig a PLCδ1-PH-YFP plazmid eYFP-t kódoló régiója került kicserélésre a szuper *Renilla* luciferáz (Sluc) szekvenciájára.

Sejtkultúra és transzfekció

Kísérleteinkhez humán embrionális vesesejteket (HEK 293, illetve HEK293T) alkalmaztunk. A sejteket 100 IU/ml penicillint, 100 μg/ml streptomycint és 10 % hőinaktivált FBS-t tartalmazó

Dulbecco által módosított médiumban (DMEM) tartottuk fenn 37°C-on 5% CO_2 tartalmú termosztátban. A kísérletekhez a sejteket 10 cm-es edényekben tenyésztettük, majd a transzfekció előtt tripszinezéssel felszedtük, és Lipofectamine 2000 reagenssel, Opti-MEM® médiumban tranziensen transzfektáltuk.

Biolumineszcencia Rezonancia Energiatranszfer (BRET) mérések

A BRET technika alapja, hogy egy biolumineszcens energiadonor szubsztrátjának bontása során a felszabaduló energia, egy részét, megfelelő közelség esetén (10 nm>), rezonancia útján képes átadni az energiaakceptor molekulának. A gerjesztett akceptor molekula ennek hatására saját emissziós spektrumán fényt bocsát ki. Kísérleteinkben az egyik vizsgálandó fehérjét általában az energia donor *Renilla* luciferázzal (Rluc), míg a partner molekulát az energiaakceptor sárga fluoreszcens fehérjével (YFP) jelöltük meg.

A BRET mérések kivitelezése 24 órával a transzfekció után fehér aljú 96-lyukú tálcákon történt. A sejteken lévő 10% FBS tartalmú DMEM médiumot a kísérletek előtt módosított Krebs-Ringer oldatra cseréltük. A BRET méréseket a *Renilla* luciferáz szubsztrátjának, a cölenterazin *h*-nak (5 μM) hozzáadását követően kezdtük meg Berthold Mithras LB 940, illetve Varioskan Flash többcsatornás lemezolvasó készülékekkel 37 °C-on. Az energiaakceptor, illetve az energiadonor emissziós maximumain, 485 és 530 nm-es hullámhosszokon detektáltunk fényintenzitásokat

melyek hányadosát, BRET hányadosnak vagy BRET jelnek nevezzük. A molekuláris közelség létrejöttét a hányados emelkedése jelzi, míg a távolság növekedésével a hányados csökken. Az adatokat úgy ábrázoltuk, hogy az ingerelt sejtek értékeiből kivontuk a kontroll, csak vívőanyagott kapott sejteken mért értékeket, illetve a stimulálás előtti átlagértékeket.

Western blot kísérletek

24 órával a kísérlet előtt HEK 293 sejteket transzfektáltunk Rluc, AT_1R-Rluc vagy DRY/AAY AT_1R-Rluc konstrukciókkal, majd a sejteket 100 nM AngII-vel vagy 10 μM SII-AngII-vel kezeltük 5 percig 37°C-on. A sejteket SDS mintapufferben felkapartuk, majd 12%-os SDS poliakrilamid géleken megfuttattuk, és a fehérjéket polivinilidén-fluorid membránokra átblottoltuk. 1 órás blokkolást követően a membránokat 1 órára 1:1000 hígításban elsődleges antitestekkel (α-foszfo-ERK1/2 és α-totál-ERK1/2), majd pedig HRP-vel konjugáltatott megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órát szobahőmérsékleten. Az antitesteket felerősített kemilumineszcencia módszerrel tettük láthatóvá.

Citoplazmatikus Ca^{2+} mérés sejtszuszpenzión

A HEK 293 sejteket Lipofectamine 2000 reagens segítségével AT_1R-Rluc konstrukciókkal transzfektáltuk, majd 24 óra elteltével a sejteket enyhe tripszines kezeléssel mobilizáltuk és

Fura-2/AM tartalmú médiumban 45 percig szobahőmérsékleten sötétben inkubáltuk. A mérés előtt a sejteket lecentrifugáltuk és Fura-2/AM mentes médiumban reszuszpendáltuk, majd PTI Deltascan spectrofluorometer segítségével 340, illetve 380 nm-en történő excitációt követően 505 nm-en detektáltunk emissziót. Az emittált fénysugarak intenzitásának hányadosából következtettünk a minta intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja.

Konfokális mikroszkópia

A laborunk által korábban létrehozott GFP-vel jelölt AT_1R-t stabilan kifejező HEK 293 sejteket különböző AII-vel, illetve TRV120027-el stimuláltuk, miközben a receptor lokalizációját Zeiss LSM 710 konfokális lézer mikroszkóp segítségével követtük nyomon. A GFP fluorofort 488 nm hullámhosszú argon lézerrel gerjesztettük. A konfokális felvételek elemzését ZEN, illetve MetaMorph szoftverek segítségével végeztük el.

Adatok elemzése, statisztikai analízis

Az adatok elemzéséhez és az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism 4.03 valamint a Sigmaplot 10.0 programot használtuk. Statisztikai módszerként egy-, illetve kétszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd Bonferroni, vagy Tukey post hoc tesztet alkalmaztunk. A 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Az AT_1R agonista indukált endocitózisának nyomon követése BRET módszerrel

Első kísérleteinkben citoplazmatikus Ca^{2+} méréssel, illetve az ERK1/2 foszforilációjának nyomon követésével ellenőriztük a *Renilla* luciferázzal (Rluc) jelölt AT_1R-ek működőképességét. Ezt követően az AT_1R korai endoszómákban való megjelenését vizsgáltuk meg BRET módszerrel. Kísérleteinkben Rluc-al jelölt AT_1R és a YFP-vel jelölt Rab5 fehérje közötti energiatranszfer létrejöttét követtük nyomon. Azt tapasztaltuk, hogy AngII ingerlés hatására a vad típusú AT_1R-hoz képest gyorsabban jelent meg a G-fehérje kötésére képtelen DRY/AAY jelátvitel-szelektív mutáns AT_1R a Rab5-tartalmú korai endoszómákban. Ezt követően megvizsgáltunk néhány szintén β-arresztin jelátvitelre szelektív AngII analógot, [Sar^1,Ile^8]-AngII (SI-AngII), [Sar^1,Ile^4,Ile^8]-AngII (SII-AngII), TRV120023 (TRV3), TRV120027 (TRV7). Ezen ligandok hatására is hasonló jelenséget tapasztaltunk, az AT_1R gyorsabb korai endoszómákban való megjelenését, összevetve az AngII ingerlésnél tapasztaltakkal. A vizsgált jelátvitel-szelektív ligandokhoz hasonlóan alacsonyabb affinitással rendelkező angiotenzin IV (AngIV), mely mind a G-fehérje-függő, mind pedig a G-fehérje-független jelpályákat képes aktiválni, az AngII-nél látottakhoz hasonló internalizációs kinetikát eredményezett.

A jelátvitel szelektíven aktivált AT_1R eltérő internalizációjának jellemzése

A következőkben konfokális mikroszkópiával is bizonyítottuk, hogy a jelátvitel-szelektíven aktivált AT_1R korai internalizációja felgyorsult, melyhez a munkacsoportunk által korábban létrehozott GFP-vel jelölt AT_1R-t stabilan kifejező HEK 293 sejteket használtuk.

A különböző endocitótikus útvonalak szerepének vizsgálatához 300 mM szacharózzal gátoltuk a klatrinmediált endocitózist, míg filipinnel a kaveolamediált útvonalat. Szacharóz előkezelés gátolta mind az AngII, mind pedig a SII-AngII hatására létrejövő internalizációt, míg a filippin előkezelés nem befolyásolta a ligandok hatására megfigyelhető internalizációs különbséget. Szintén nem befolyásolta a korai internalizációt a Ca^{2+} jel gátlása BAPTA előkezeléssel.

A β-arresztin2-kötés vizsgálatakor ugyanakkor azt találtuk, hogy jelátvitel-szelektív aktivációt követően kisebb mértékű a β-arresztin2-kötés erőssége, az AngII által kiváltotthoz képest. Hasonlóan kisebb mértékű β-arresztin2-kötést tapasztaltunk AngIV alkalmazása esetén is. Dózis-hatás görbék készítésével meggyőződtünk továbbá arról is, hogy a tapasztalt eltérések, nem a szubmaximális ligand koncentrációknak köszönhetők.

A plazmamembrán PtdIns(4,5)P_2 szintézisének és depléciójának szerepe az AT_1R teljes agonista és funkcionálisan szelektív agonista indukált internalizációjában

A plazmamembránban található PtdIns(4,5)P_2 szerepét is megvizsgáltuk az AT_1R korai internalizációjára. Első körben meggyőződtük róla, hogy a β-arresztin jelátvitelre szelektív ligandjaink (SI-AngI, SII-AngII, TRV3 és TRV7), valóban nem hoznak létre G-fehérje aktivációt és így PtdIns(4,5)P_2 bontást.

Kis dózisú wortmaninnal gátolva a foszfatidilinozitol 3 - kinázokat nem tapasztaltunk változást a korai internalizációban, azonban a foszfatidilinozitol 4-kinázok (PI4K) gátlásával az AngII-re, illetve AngIV-re létrejövő internalizáció teljesen gátlódott, míg a TRV3-ra létrejövő egyáltalán nem változott. Az A1 gátlószerrel ezt követően meggátoltuk a PI4KA, míg a PIK93 vegyülettel a PIKB izoformákat. A PI4KA izoforma gátlásával teljesen megszünt az AT_1R korai endoszómákban való megjelenése AngII, AngIV hatására, azonban TRV3 ingerlésnél nem tapasztaltunk változást.

A PtdIns(4,5)P_2 szintézisét követően a PtdIns(4,5)P_2 bontásának szerepét is megvizsgáltuk. Domináns negatív GRK2 konstrukció kifejeztetésével meggátoltuk az AngII-re létrejövő G_q-fehérje aktivációt és így a PtdIns(4,5)P_2 bontást, melynek hatására az AngII-re létrejövő korai internalizáció felgyorsult, míg TRV3 alkalmazásakor nem változott.

Ezt követően más GFKR hatására létrejövő PtdIns(4,5)P_2 bontás szerepét elemeztük. α1-adrenerg receptor előzetes

ingerlésének hatására az AT_1R korai internalizációja lelassult, mind AngII, mind pedig TRV3 hatására.

Az AT_1R sejten belüli további sorsának nyomon követése Rab kis G-fehérjék segítségével

Utolsó célkitűzésként az AT_1R Rab4 tartalmú korai reciklizáló endoszómákban, Rab7 tartalmú késői endoszómákban és lizoszómákban, valamint Rab11 tartalmú késői reciklizáló endoszómákban való megjelenését vizsgáltuk. Mindegyik vizsgált kompartmentben korábban jelent meg az AT_1R jelátvitel szelektív aktivációt követően, mint AngII ingerlés hatására. A Rab7 tartalmú lizoszómákban kevéssé, míg a Rab11 tartalmúakban az AngII-nél tapasztaltakhoz képest gyorsabban és nagyobb mértékben jelent meg a receptor mind jelátvitel-szelektív aktivációt követően, mind pedig AngIV hatására.

Utolsó kísérleteinkkel pedig megállapítottuk, hogy a BAPTA előkezeléssel végzett Ca^{2+} keláció nincs hatással az AT_1R hosszú távú sejten belüli sorsára.

Következtetések

Eredményeink alapján a következő következtetések vonhatók le:

Az AT_1R korábban jelenik meg a Rab5 tartalmú korai endoszómákban β-arresztin jelátvitel szelektív aktivációt követően, mint AngII stimulus hatására.

A megváltozott korai internalizáció nem különböző endocitotikus útvonalakon keresztül jön létre, valamint sem az eltérő β-arresztin kötés erősség, sem pedig a Ca^{2+} jel hiánya nem játszik szerepet a folyamatban. A G-fehérje aktiváció következtében létrejövő PtdIns(4,5)P_2 bontás, majd pedig reszintézis viszont meghatározó az AngII által kiváltott lassabb internalizációban. Ezáltal feltételezhetjük, hogy a G-fehérje aktiváció- és PtdIns(4,5)P_2 depléció hiánya tehető felelőssé a gyorsabb korai internalizációért, β-arresztin jelátvitel elfogult ligandok esetén.

Továbbá az AT_1R Rab4, Rab7, illetve Rab11 tartalmú endoszómákban való megjelenése is eltérő funkcionálisan szelektív aktivációt követően. A receptor korábban jelenik meg ezen fehérjékkel jelzett kompartmentekben, elfogult ligand általi aktiváció esetén, mint a nem szelektív AngII vagy pedig AngIV alkalmazásakor. A receptor késői intracelluláris sorsát nem befolyásolja a Ca^{2+} jel hiánya, azonban a β-arresztin kötés erőssége jól korrelál a folyamattal.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

I. **Szakadati G**, Toth AD, Olah I, Erdelyi LS, Balla T, Varnai P, Hunyady L, Balla A. (2015) Investigation of the Fate of Type I Angiotensin Receptor after Biased Activation. Mol Pharmacol, 87: 972. **IF:3,931**

II. Balla A, Toth DJ, Soltesz-Katona E, **Szakadati G**, Erdelyi LS, Varnai P, Hunyady L. (2012) Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. J Biol Chem, 287: 9090-9099. **IF:4,651**