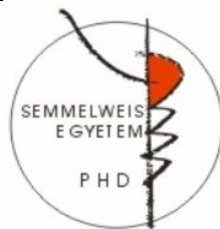


A plazmamembrán receptorok közötti interakciók szerepe a β -arresztin aktiváció szabályozásában

Doktori tézisek

Dr. Tóth András Dávid

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Bögel Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Vas Virág, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fürst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Sperlách Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest
2018

Bevezetés

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) alkotják a plazmamembrán receptorok legnépesebb családját. Szerepük van számos kémiai (mint például neurotranszmitterek, hormonok, parakrin felszabaduló molekulák) és fizikai inger sejten belüli hatásainak közvetítésében. Ezen fehérjék kiemelkedő orvosi biológia jelentőséget jól mutatja az a tény, hogy a ma felírt gyógyszerek körülbelül 1/3-a rendelkezik GFKR támadásponttal.

A GFKR-ek jelüket intracelluláris effektorok aktiválásával közvetítik. A több száz lehetséges kölcsönható fehérje közül a heterotrimer G-fehérjék mellett a β -arresztinek bírnak kitüntetett szereppel. A β -arresztinek kötése az agonista-aktivált receptorhoz egy kétlépcsős folyamat. Először a receptor a G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK-k) által foszforilált C-terminálishoz kapcsolódnak, majd az aktív állapotú receptor transzmembrán hélicei által kialakított kötőhelyhez. A kialakult kötés tranziens (A-osztályú, csak a plazmamembrán mentén történő), vagy stabil (B-osztályú, endoszómában is fennmaradó) lehet. A β -

arresztinek számos módon befolyásolhatják a receptor funkcióját. Gátolhatják a receptor további G-fehérje kötődését, azaz elősegítik a receptor deszenzitizációját, de fontos szerepük van a plazmamembránban megtalálható receptorok számának szabályozásában a receptor endocitózisának kiváltásán keresztül. Mindkét említett mechanizmus hozzájárul az ismételt gyógyszeradás esetén fellépő csökkent gyógyszerhatáshoz a GFKR aktivitást célzó terápiás eljárásokban. Ráadásul nemcsak a GFKR-ról induló jel leállításában szerepelhetnek, hanem a kialakult jelet minőségileg is módosíthatják, így effektor fehérje szereppel is bírnak a jelátvitelben. Erre a legjobban ismert példa a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktivitásának β -arresztin-függő szabályozása. A β -arresztinekről eddig úgy gondolták, hogy alapvetően az agonista-aktivált receptorok homológ szabályozásában szerepelnek, míg a heterológ, más receptorról induló szabályozási folyamatok (például heterológ receptor foszforiláció hatására létrejövő deszenzitizáció) függetlenek a β -arresztintől.

Mára már elfogadott tény, a GFKR-ek nemcsak egyetlen aktív és inaktív konformációval rendelkezhetnek,

hanem számos, tulajdonságaikban eltérő térszerkezetet is felvehetnek. Mivel egyes GFKR ligandumok (ún. jelátvitel-szelektív agonisták) képesek lehetnek a receptor olyan konformációját stabilizálni, amely szelektíven csak bizonyos effektorokat aktiválnak, így lehetőség teremtődött jelátvitel-specifikus terápiás stratégiák kidolgozására, melyek közül számos jelenleg is klinikai vizsgálatok alatt állnak.

A GFKR-ek jelátvitelét összetett mechanizmusok szabályozzák. Ismert, hogy a GFKR-ek magasabb rendű szerveződésekbe (dimerekbe vagy oligomerekbe) is tömörülhetnek, mely komplexek alapvetően befolyásolhatják az egyes protomerek működését. A dimeren belüli allosztérikus kölcsönhatás szabályozhatja a receptorok konformációját, így azok effektor aktivációs képességét is. Megjegyzendő, hogy a dimerizáció kutatását nagymértékben megnehezíti, hogy a jelenleg rendelkezésre álló módszerek nagyrésze korlátozott megbízhatóságú, ezért a receptor dimerizáció jelensége viták tárgyát is képezi. Egyre több adata utal arra azonban, hogy a GFKR dimerek részt vesznek az élettani folyamatok finomszabályozásában, továbbá a receptor

dimerek megváltozott működését feltételezik számos betegség hátterében. Behatároltak ismereteink azonban arról, hogy a dimerizáció milyen hatással van a β -arresztinek aktivációjára, továbbá keveset tudunk arról is, hogy bizonyos hatóanyagok, mint például a jelátvitel-szelektív ligandumok milyen módon befolyásolják a receptor dimerek működését.

Célkitűzés

Ph.D. munkám során az AT₁ angiotenzin és más receptorok közötti kölcsönhatások szerepét kutattam a β -arresztin kötés szabályozásában.

Vizsgálataim első felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

- igazolható-e az AT₁ angiotenzin receptor (AT₁R)- β_2 adrenerg receptor (β_2 AR) heterodimer létezése a munkacsoport által kifejlesztett megbízhatóbb metodikai módszerrel;
- mi a szerepe az AT₁R- β_2 AR heterodimerizációnak a β -arresztin kötésben;
- mi a hatása a jelátvitel-szelektív AT₁R aktivációnak az AT₁R- β_2 AR heterodimer működésére?

Munkám második részében az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- képes-e az AT₁R heterológ foszforilációt követően β -arresztin kötésre;
- amennyiben az AT₁R köt heterológ útvonalon β -arresztint, különbözik-e a β -arresztin konformációja és funkciója?

Módszerek

Sejtkultúra és transzfekeció

HEK 293T és COS-7 sejt vonalak kultúráit 100 IU/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomocinnal és 10% főtális borjúsérummal kiegészített DMEM médiumban tartottuk fent 37 °C-on 5% CO₂-tartalom mellett. A kísérletekhez a sejteket OptiMEM médiumban Lipofectamine 2000 használatával transzfekektáltuk a gyártó instrukcióinak megfelelően. A méréseket 24 (HEK 293T sejtek) ill. 48 óra (COS-7 sejtek) elteltével végeztük el.

Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

A fluoreszcens fehérje expressziójára a fluoreszcencia (510 nm-es excitáció mellett 535 nm-en mért emisszió) mértékéből következtettünk. A BRET követéséhez mértük a donor és az akceptor emissziós maximumán a fényintenzitást 530 és 480 nm-es filterek segítségével a luciferáz szubsztrát cöclenterazin *h* (5 µM) adása után, a BRET titrációs kísérletek és a mutáns donor-jelölt konstrukciók expressziójának vizsgálata során meghatároztuk a teljes lumineszcenciát is filter használata

nélkül, a fluoreszcencia és lumineszcencia értékeket Thermo Scientific Varioskan Flash multimode plate reader mértük. Minden kísérletet duplikátumban vagy triplikátumban végeztünk el. A BRET követésére a BRET hányadost képeztük ($I_{530\text{nm}}/I_{480\text{nm}}$), a Δ BRET jel a BRET hányados stimulus hatására létrejövő változását jelzi a vivőanyaggal kezelt sejtekben mért jelhez képest.

Az Rluc8- β -arresztin2-FLAsH szenzorok intramolekuláris BRET jelének követéséhez a sejteket 500 nM FLAsH-EDT₂-vel jelöltük 12,5 μ M etán-ditol (EDT) és 0,1% DMSO jelenlétében módosított Ringer oldatban 1 óráig szobahőn. A felesleges és aspecifikusan kötődő FLAsH festéket 250 μ M EDT tartalmú oldattal távolítottuk el. Ezután ugyanazt a mérési protokollt követtük, mint az intermolekuláris BRET kísérletek esetében.

Konfokális mikroszkópia és képanalízis

A plazmamembrán mentén található β -arresztin klaszterek életidejének meghatározásához idősorozatos felvételeket készítettünk a sejtek aljáról 10 másodpercenként 190 másodpercig Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal 63 \times objektív

használatával 37 °C-on. A felvételek analíziséhez ImageJ szoftvert, majd gépi tanulási módszert (machine learning) használtunk a 10. képen található arresztin pöttyök követésére korábbi és későbbi felvételeken. A módszerrel a különböző felvételek közötti pöttymozgásokat, illetve megjelenést, vagy eltűnést tudunk vizsgálni. A pöttyöket életidejük alapján két alcsoportba osztottuk.

A β -arresztin kötés osztálytípusának meghatározásához a felvételeket a sejtek közepének keresztmetszetéről készítettük stimulálás után 20-40 perccel 37 °C-on.

Koprecipitációs kísérletek

A sejteket NES-BirA (biotin ligáz), β -arresztin2-Cerulean és/vagy AT₁R-YFP-BAP (BAP: biotin akceptor peptid) konstrukciókkal transzfektáltuk. 24 óra elteltével 150 μ M biotint adtunk hozzájuk 20-24 óráig, hogy az AT₁R-YFP-BAP jelentős mértékben biotinizálódhasson. Ezután a médiumot szérum- és biotinmentes, 1% borjúszérum albumint és antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumra cseréltük 2-4 óráig, majd a sejteket 20 percig stimuláltuk 37 °C-on. A reakciókat jégre

helyezéssel és jéghideg foszfát pufferelt sóoldattal (PBS), majd a mintákat lizáltuk. A biotin-jelölt fehérjéket a lizátumból NeutrAvidin agaróz rezinnel húztuk le. A fluoreszcensen jelölt fehérjék mennyiségét a YFP és Cerulean fluoreszcencia mérésével határoztuk meg. Fluoreszcens felvételeket is készítettünk a NeutrAvidin gyöngyökről konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal 20x objektív használatával.

Western blot

A sejteket SDS mintapufferben felkapartuk, a mintákat röviden szonikáltuk, főztük 15 percig 95 °C-on, 4 °C-on 20800 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót SDS poliakrilamid gélelektroforézissel megfuttattuk, majd polivinilidén-fluorid membránokra blottoltuk át. A membránokat 5% zsírszegény tejport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (PBST) 1 óráig szobahőn blokkoltuk, majd az elsődleges antitesttel (egér anti-foszfó-p44/42 MAPK vagy nyúl anti-p44/42 MAPK 5% tejport tartalmazó PBST-ben 1:1000-ben hígítva) inkubáltuk 4 °C-on egész éjszakán keresztül. A membránokat háromszor mostuk PBST-vel 10 percig,

tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesttel (kecske anti-egér vagy kecske anti-nyúl, 5% tejpport tartalmazó PBST oldatban 1:5000-ben hígítva) 1 óráig szobahőn inkubáltuk, majd mostuk újra háromszor. Az antitesteket kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá. Az antitesteket a membránról guanidin HCl-alapú oldat segítségével távolítottuk el az ismételt elsődleges antitest kezelés előtt.

Statisztikai analízis

GraphPad Prism szoftvert alkalmaztunk a görbék létrehozásához, a statisztikai analízishez és a görbeillesztéshez. A kísérletek értékeléséhez páros kétmintás t-próbát, egymintás t-próbát, Bonferroni post-hoc teszttel támogatott hagyományos vagy ismételt mérésű egyszempontos varianciaanalízist, kovariancia analízist vagy Bonferroni post-hoc teszttel támogatott kétszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk.

Eredmények

Az AT₁R és a β_2 AR közötti kölcsönhatások vizsgálata

Korábbi irodalmi adatok szerint az AT₁ angiotenzin és a β_2 adrenerg receptorok képesek egymással fizikai kölcsönhatást kialakítani, ami befolyásolhatja a két receptor funkcióját. Kísérleteinkben először igazolni kívántuk a heterodimer létezését, ehhez a munkacsoport által kifejlesztett, a dimerizáció megbízható kimutatására alkalmas módosított kvantitatív BRET vizsgálatot alkalmaztuk. Ezután megvizsgáltuk, hogy a heterodimerizáció befolyásolja-e a dimer alegységek β -arresztin kötési képességét egy BRET alapú kísérleti felállás segítségével. A sejtekben donor (Sluc)-jelölt β_2 AR-t, akceptor (Venus)-jelölt β -arresztin2-t és jelöletlen AT₁R-t koexpresszáltattunk. Így képesek voltunk szelektíven követni a β_2 AR β -arresztin2 kötését, és megfigyelni az AT₁R stimuláció hatását a β_2 AR- β -arresztin2 interakcióra. Az AT₁R agonista angiotenzin II (AngII) önmagában csak egy kis mértékű BRET hányados emelkedést hozott létre, míg meglepő módon a két receptor szimultán aktivációja potenciózta a β_2 AR és a β -arresztin2 közötti asszociációt HEK 293T és COS-7

sejtekben is. Érdekes módon a β_2 AR aktivációja nem befolyásolta szignifikánsan az AT_1R β -arresztin2 kötését, ami a dimer aszimmetrikus szabályozását mutatja. Gátlószerek és jelátvitelükben károsodott receptormutánsok alkalmazásával kimutattuk, hogy a G-fehérje ill. a β -arresztin2 kötés nem feltételei a megfigyelt potencírozó hatásnak, azonban annak nagyságát meghatározta az AT_1R expressziójának mértéke. Ezen eredmények a dimerizáció oki szerepe mellett szólnak. Megvizsgáltuk, hogy az AT_1R aktivitását különböző módon befolyásoló ligandumok miként hatnak a heterodimer működésére. Ha izoproterenol (ISO) mellett jelátvitel-szelektív AT_1R agonista TRV120023-mal is stimuláltunk, az AngII hatáshoz hasonlóan emelkedett β_2 AR- β -arresztin2 kötését tapasztaltunk, ezzel szemben a hagyományos AT_1R inverz agonista kandezartánnal történő kezelés nem volt hatással. Hogy pontosabb képet kaphassunk a fokozott β -arresztin2 kötés háttérében álló mechanizmusról, megmértük a plazmamembrán β -arresztin2 klaszterek életidejét konfokális mikroszkópia segítségével. AngII és ISO kostimuláció hatására szignifikánsan megnőtt a β -arresztin2 klaszterek

élettartama az önálló ISO kezeléshez képest, amiből arra következtethettünk, hogy a heterodimerizáció miatt megemelkedett $\beta_2\text{AR}$ - β -arresztin2 kötés a két fehérje közötti stabilabb interakció következménye. Megvizsgáltuk, hogy a heterodimerizáció befolyásolja-e a $\beta_2\text{AR}$ aktiváció hatására kialakuló cAMP jelet. ISO és AngII vagy TRV120023 kostimuláció hatására elnyújtottabb cAMP jelet tapasztaltunk, mutatva, hogy az AT_1R aktiváció a $\beta_2\text{AR}$ -t nemcsak β -arresztin kötésében, hanem cAMP szignalizációjában is befolyásolja.

Az inaktív AT_1R heterológ, β -arresztinen keresztüli szabályozásának vizsgálata

Habár az általános elképzelés szerint az aktív receptor állapot a β -arresztin kötés elengedhetetlen feltétele, azt feltételeztük, hogy a β -arresztinek akár az inaktív receptorokhoz is képesek lehetnek kapcsolódni, ha a receptor a C-terminálisán megfelelő helyen foszforilálódik. A GRK-k elsősorban az aktív receptorokat foszforilálják, ezzel szemben más kinázok, mint például a protein kináz C (PKC), a receptort annak aktiváltságától függetlenül képesek foszforilálni. Mivel az AT_1R esetében

a PKC és a GRK foszforilációs helyek átfednek egymással, megvizsgáltuk, hogy a PKC foszforiláció előidéz-e AT_1R - β -arresztin interakciót a receptor stimulációjának hiányában is. Ennek megfelelően specifikus PKC-aktivátor forbol-észter (PMA) hatására koprecipitálni tudtuk NeutrAvidin gyöngyökkel a biotinizált AT_1R -YFP-BAP fehérjét β -arresztin2-Ceruleannal. A heterológ β -arresztin2 kötést valós időben is vizsgáltuk Rluc8-jelölt AT_1R és β -arresztin2-Venus közötti BRET mérésekkel, mely kötés kinetikájában lassabbnak mutatkozott az AngII által kiváltotthoz képest. Hasonló hatást tapasztaltunk, ha a PKC aktivációt α_{1A} adrenerg ($\alpha_{1A}AR$) vagy epidermális növekedési faktor receptor stimulációjával váltottuk ki. A PKC szerepét a folyamatban gátlószerek (GF109203X vagy staurosporin) alkalmazásával bizonyítottuk, míg a heterológ β -arresztin2 kötésnek az AT_1R konstitutív aktivitásától való függését inverz agonista (kandezartán) előkezeléssel zártuk ki. BRET és konfokális mikroszkópos méréseinkben mutánsok alkalmazásának segítségével azt találtuk, hogy mind a receptor C-terminális S-T klasztere (T332, S335, T336, S338), mind a β -arresztin2 N-

doménjének két konzervált lizinje (K10,11) szükséges a receptor stabil β -arresztin kötéséhez. Ezen régiók közvetlenül kapcsolódnak egymással, mely kapcsolatot elneveztünk stabilitási kapcsolónak. Ugyanezen mérésekben azt tapasztaltuk, hogy a PMA-indukált heterológ β -arresztin2 kötés az AngII által kiváltotthoz hasonlóan B-osztályú, viszont teljes mértékben függ a stabilitási kapcsoló kialakulásán, mivel ezen régiók elmutálása megszüntette a PMA hatást. Vizsgáltuk a β -arresztin2 konformációját is intramolekuláris β -arresztin2 FIAsh BRET bioszenzorok segítségével. Azt találtuk, hogy PMA hatásra a β -arresztin2 eltérő konformációban és különböző dinamikával kötődik az AT₁R-hez AngII ill. PMA hatásra. Továbbá a stabilitási kapcsoló elemeinek elmutálása esetén a β -arresztin megint más konformációt vett fel, így legalább 3 aktív β -arresztin2 konformációt különböztethettünk meg. A β -arresztinek szerepelnek az AT₁R sejten belüli sorsának szabályozásában. Ennek követésére BRET méréseket végeztünk Rluc8-jelölt AT₁R és Venus-jelölt intracelluláris vezikula markerek (Rab4, Rab5, Rab7, Rab11) között. AngII és PMA kezelés hatására is BRET jel növekedést kaptunk mind a négy Rab

konstrukció esetében, ami a receptornak a plazmamembránról intracelluláris vezikulákba történő redisztribúcióját mutatja, azonban PMA stimuláció után a receptor degradációs (Rab7) útvonalon való megjelenése elmaradt. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin2 eltérően szabályozza a receptor sejten belüli sorsát. Ismert, hogy az aktivált β -arresztinek képesek lehetnek receptor- β -arresztin-MAPK komplexek formálódásának kiváltására. Megvizsgáltuk, hogy az inaktív receptorhoz kötődő β -arresztin is rendelkezik-e ezzel a tulajdonsággal. Ennek vizsgálatához BRET-alapú kísérleti felállást dolgoztunk ki, melyben energiatranszfert mértünk AT₁R-Rluc8 és Venus-MEK1 vagy ERK2-Venus között overexpresszált β -arresztin2 jelenlétében. PMA hatásra szignifikáns mértékű BRET jel emelkedést kaptunk, ami kisebb volt az AngII esetében tapasztaltnál, de arányos volt az AT₁R- β -arresztin2 kötés mértékével. Hasonló eredményeket figyeltünk meg, ha a PKC aktivációt α_{1A} AR stimulációval hoztuk létre. Ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy nemcsak az aktív receptorok vehetnek részt a

jelátviteli folyamatokban, hanem az inaktív receptorok is hozzájárulhatnak jelátviteli komplexek kialakulásához.

Következtetések

Megbízhatóbb kvantitatív BRET módszer segítségével megerősítettük, hogy a β_2 adrenerg receptor és az AT_1 angiotenzin receptor heterodimereket képez. Részletesen vizsgáltuk a β_2AR - AT_1R heterodimerizáció funkcionális jelentőségét. Kimutattuk, hogy a β_2AR β -arresztin kötését potenciózza az AT_1R együttes aktivációja. Megállapítottuk, hogy az interakció növekedésének hátterében a β_2AR - β -arresztin kötés stabilitásának emelkedése szerepel. Kimutattuk, hogy a konvencionális AT_1 receptor antagonistákhoz képest a jelátvitel-szelektív AT_1 receptor agonisták eltérő módon befolyásolják a β_2 adrenerg- AT_1 angiotenzin receptor heterodimer működését.

Kimutattuk, hogy az AT_1R ligandumkötéstől és a receptor aktív konformációjától függetlenül is képes β -arresztin2 kötésre PKC aktiváció hatására. Megállapítottuk, hogy az inaktív AT_1R - β -arresztin2 kötés szerkezeti alapja a stabilitási kapcsoló struktúra, amely a receptor C-terminális foszforilált szerin-treonin klaszterei

és a β -arresztin2 N-doménjének konzervált lizinjei között kialakuló kapcsolat. Kimutattuk, hogy a stabilitási kapcsoló az AT_1R - β -arresztin2 interakció stabilizálása mellett részt vesz a β -arresztin2 aktív konformációjának kialakításában is.

Megállapítottuk, hogy az agonista-aktivált dinamikus konformációhoz képest a β -arresztin2 eltérő, statikus konformációban kapcsolódik a PKC-foszforilált AT_1R -hez.

A PKC-foszforilált AT_1R -hez kötött β -arresztin2 kiváltja a receptor endocitózisát, viszont a sejten belüli sorsát a homológ útvonalhoz képest másképpen befolyásolja. Emellett kimutattuk, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin2 kiváltja AT_1R - β -arresztin2-MAPK jelátviteli komplexek képződését, ami felveti az AT_1R lehetséges vázfehérje szerepét más receptorokról induló jelátviteli utak szabályozásában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Tóth AD¹, Prokop S¹, Gyombolai P, Várnai P, Balla A, Gurevich VV, Hunyady L, Turu G. (2018)

Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins.

J Biol Chem, 293(3):876-892. **IF: 4,125**

¹ Társelsőszerzők.

Tóth AD, Gyombolai P, Szalai B, Várnai P, Turu G, Hunyady L. (2017)

Angiotensin type 1A receptor regulates β -arrestin binding of the β_2 -adrenergic receptor via heterodimerization

Mol Cell Endocrinol, 442:113-124. **IF: 3,754**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények:

Prokop S, Perry NA, Vishnivetskiy SA, **Toth AD**, Inoue A, Milligan G, Iverson TM, Hunyady L, Gurevich VV.

Differential manipulation of arrestin-3 binding to basal and agonist-activated G protein-coupled receptors.

Cell Signal, 36:98-107. **IF: 3,937**

Szakadáti G, **Tóth AD**, Oláh I, Erdélyi LS, Balla T, Várnai P, Hunyady L, Balla A. (2015)

Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation.

Mol Pharmacol, 87(6):972-81. **IF: 3,931**

Gyombolai P, **Tóth AD**, Tímár D, Turu G, Hunyady L. (2015)

Mutations in the 'DRY' motif of the CB1 cannabinoid receptor result in biased receptor variants.

J Mol Endocrinol, 54(1):75-89. **IF: 2,947**