

Jelátvitel-specifikus agonisták hatásainak vizsgálata

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) alkotják az integráns membrán-receptorok legnagyobb csoportját. A különböző ligandok eltérő receptor konformációkat stabilizálnak, továbbá egy adott GFKR-nek nem csak több aktív konformációja létezhet, hanem aktivációjakor többféle jelátviteli folyamat is létrejöhet, melyet egyes agonisták szelektíven befolyásolhatják (ezt a jelenséget nevezzük jelátvitel-szelektív agonizmusnak). Az elmúlt években nyilvánvalóvá vált, hogy a más-más receptorkonformációkhoz köthető, eltérő jelátviteli utak és receptorszabályozási útvonalak szelektív, útvonal-specifikus ligandok által befolyásolhatóak. Lehetséges, például a receptor internalizációt szelektíven, G-fehérje-aktiválás nélkül elindítani, így a receptor működését leállítani. Ennek ellenkezője is megvalósítható: szelektív ligand alkalmazásával internalizáció és deszenzitizáció nélkül G-fehérje aktiválást létrehozni, így kisszámú sejtfelszíni receptorral is nagy sejtválaszt lehet elérni. A pályázatban kitűzött céloknak megfelelően több GFKR jelátviteli folyamatait vizsgáltuk.

Az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT1R) jelátvitel-szelektív agonizmusa

Az AngII központi szerepet játszik a vérkeringés és a só-vízháztartás szabályozásában. Az AngII a célsejtek felszínén található AT1R-hoz kötődik, mely elsősorban Gq fehérjén keresztül intracelluláris Ca^{2+} -jel kialakulását és protein-kináz C aktiválódását eredményezi, illetve képes MAPK kaskádok aktiválására is. Az aktivált AT1R kapcsolódik a β -arresztin fehérjékkel, melyek az AT1R G-fehérje független jelátviteli mechanizmusaiért felelősek. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy nemcsak a receptor plazmamembránban való mozgása, illetve az elindított jelátviteli mechanizmusok különbözhetnek a jelátvitel szelektív agonisták alkalmazásával, hanem a receptor sejten belüli sorsa (intracelluláris feldolgozása) is jelentősen eltérhet. Vizsgálataink során vad típusú, valamint G-fehérje aktivációra képtelen DRY/AAY-AT1R mutáns sorsát vizsgáltuk AngII, valamint G-fehérje független útvonalakat szelektíven aktiváló jelátvitel szelektív agonisták (SII-AngII, TRV120023, TRV120027) hatására. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az AngII stimulustól eltérően, a jelátvitel szelektív agonista ligandokkal történő aktiváció során a vad típusú receptor korábban jelenik meg a korai endoszómákban. Bebizonyítottuk, hogy a gyorsabb internalizáció annak következménye, hogy ezen ligandok nem indítanak PI(4,5)P2 bontást a sejtmembránban. Ezzel ellentétben az internalizálódott receptor intracelluláris sorsának alakulásában viszont a β -arresztin kötés nagysága és fenntartottsága bír döntő szereppel. Kísérleteink felfedték azt is, hogy az aktivált AT1R és a β -arresztin kötés nagyságát és időbeli alakulását a különböző agonisták eltérő receptor affinitása határozza meg (Szakadati, 2015). Adataink alapján elmondhatjuk, hogy a jelátvitel-szelektív aktiváció fontos szerepet játszhat a receptor hosszú távú sorsában, valamint az externalizáció/internalizáció egyensúlyában. Ezen folyamatok megváltoztatják a sejtfelszínen lévő receptorszámot, melynek befolyásolása szelektív ligandokkal klinikailag fontos lehet.

A 2-es típusú vazopresszin receptor (V2R) vizsgálata

A szervezet víz-homeosztázisának fenntartásában kulcsszerepet játszik a vese koncentráló és hígító működése, amelyet az arginin-vazopresszin rendszer szabályoz a V2R-

on keresztül. A V2R funkcióvesztő mutációi nefrogén diabetes insipidus betegséghez (NDI) vezethetnek. A betegség kialakulásának oka a cAMP másodlagos hírvivő molekula nem megfelelő mennyiségű képződése, amely hátterében a receptor csökkent plazmamembrán expressziója, csökkent ligand- vagy G-fehérje affinitása, valamint fokozott internalizációja állhat. Genetikai analízissel egy eddig nem karakterizált mutációt azonosítottunk egy NDI betegben (N321K-V2R mutáció). Kimutattuk, hogy a mutáns receptor plazmamembrán kifejeződése hasonló a vad típuséhoz. Az N321K-V2R emelkedett EC_{50} érték mellett képes intracelluláris cAMP jelet elindítani vazopresszin stimulus hatására. Kísérleteink egyik célja volt, hogy olyan ligandot (farmakochaperont) találjunk, amely a mutáns receptor károsodott funkcióit helyreállítja. E célból a Vichem Chemie (Prof. Dr. Kéri György) „core library” vegyülettárát használtuk nagy áteresztő képességű (HTS) kísérletsorozatunkban. 400 vegyület hatását vizsgáltuk nagy koncentrációban vad típusú és mutáns receptort kifejező sejteken. Az általunk kifejlesztett EPAC-BRET szonda segítségével a vegyületek cAMP szintre gyakorolt hatását mértük, másrészt a vegyületekkel történő előkezelést követően a fiziológiás ligand (vazopresszin) hozzáadásnak hatását vizsgáltuk. A vizsgált vegyületkönyvtárban nem találtunk olyan hatóanyagot, mely a cAMP szintet a sejtekben befolyásolja. Ezzel szemben egy peptid ligand, a valin-dezmopresszin hatékonyan stimulálta az N321K-V2R-t, de magas koncentrációban sem váltott az vazopresszinhez hasonló vazokonstriktort (V1R-on keresztüli mellékhatást) patkány artériákon. Az eredményeik alapján a beteg terápiájának alapja egy szelektív agonista (pl. valin-dezmopresszin) adása lehet (Erdélyi, 2014).

A nefrogén kóros antidiuresis szindróma (NSIAD) egy közelmúltban feltárt betegség, amelyet a V2R funkciónerő mutációja okoz. Kísérleteinkben karakterizáltunk egy NSIAD betegséget okozó V2R mutáció (I130N-V2R) sejtéleti hatásait. A konstitutívan aktív receptor sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkópiával és áramlási citometriával vizsgáltuk. A funkcionális vizsgálatokban a sejtek cAMP jelátvitelét és a mutáns receptor internalizációs tulajdonságok meghatározását biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) módszerrel HEK293 sejtekben végeztük. Kimutattuk az I130N-V2R jelentősen emelkedett konstitutív aktivitását, amely V2R inverz agonista tolvaptannal gátolható, a fiziológiás ligand vazopresszinnel tovább fokozható volt. A receptor kisebb sejtfelszíni kifejeződésének hátterében a konstitutív internalizációt azonosítottuk, amely folyamat β -arresztin függetlennek bizonyult. Kimutattuk, hogy az internalizáció tolvaptannal és domináns negatív dinamin kifejezésével gátolható volt. Az eredményeik alapján a beteg terápiájának alapja tolvaptan adása lehet (Erdélyi, 2015).

Az 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1R) vizsgálata

A CB1R az agonista megkötését követően elsősorban $G_{i/o}$ -fehérjéket aktivál. A CB1R bazális aktivitással rendelkezik és konstitutívan internalizál. Korábbi adataink alapján agonista stimulus hatására a β -arresztin2 a CB1R-hoz kötődik, mely felvetette annak a lehetőségét, hogy a β -arresztin2 adapter fehérjeként szerepet játszik a receptor internalizációjának létrehozásában. A receptor internalizációját HaloTag-gel jelölt CB1R felhasználásával konfokális mikroszkópos kísérletekben vizsgáltuk. Eredményeink szerint a domináns-negatív β -arresztin2-RFP expressziója, illetve β -arresztin2 géncsendesítése siRNS módszerrel egyaránt gátolta a CB1R agonista hatására létrejövő internalizációját. A vizsgálatokat BRET méréssel is elvégeztük, melynek során a megfelelően jelölt CB1R és egy

plazmamembrán marker segítségével követtük a receptor internalizációját. Az agonista hozzáadásának hatására létrejövő internalizációt a domináns-negatív β -arresztin2, illetve a β -arresztin2-siRNS egyidejű expresszálása gátolta. Szintén szelektíven gátolta a β -arresztin2-siRNS expresszálása az endogén CB1R agonista indukált internalizációját Neuro-2 a egér neuroblasztóma sejtekben. Kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a CB1R agonista-indukált internalizációjában a β -arresztin2 fontos szerepet játszik (Gyombolai, 2013). További kísérleteinkben megvizsgáltuk mutáns CB1-receptorok G-fehérje aktivációs, illetve β -arresztin kötési tulajdonságait különböző agonisták hatására. Kimutattuk, hogy a CB1R-DAA mutáns G-fehérje-szelektív, míg a CB1R-AAY a β -arresztin kötés irányába elfogult. Ezen mutánsok alkalmazása segítséget jelenthet a CB1R, illetve a Ca^{2+} -mobilizáló hormonok hatására felszabaduló endokannabinoidok vaszkuláris hatásainak pontosabb megértésében (Gyombolai, 2015).

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy érfal simaizom-sejtekben az AngII hatására aktiválódó AT1R jelátvitel során endokannabinoidok (pl. 2-AG) szabadulnak fel, melyek CB1R-aktiváción keresztül mérsékelik a vazokonstriktor hatást. E hatás CB1R hiányos egerek ereiben nem figyelhető meg. A CB1R agonista WIN55212 vazodilatátor hatása a gracilis és koronária erekben nagyobbak adódtak, mint az aortában. Az eredmények arra utalnak, hogy az értónus komplex szabályozási rendszerében a lokálisan keletkező endokannabinoidok vazodilatátor védő hatást fejtenek ki egyes érterületek vérkeringésére (Szekeres, 2012). További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a CB1R gátlása, valamint a CB1R-ok hiánya egyaránt fokozza egyes GFKR agonisták vazokontrakciós hatásait. A vazokonstriktós hatás továbbnőtt DAG-lipáz enzim gátlás, valamint csökkent MAG-lipáz gátlás hatására, mely a jelátvitel során keletkező endokannabinoidok jelenlétére utal. Kimutattuk, hogy AngII-indukált 2-AG-termelés fokozódik MAG-lipáz, illetve csökken DAG-lipáz gátlás hatására. Igazoltuk, hogy a CB1R gátlás fokozta az AngII-indukálta kalcium jel fenntartott fázisát, illetve a CB1R-gátlás fokozza az AngII vérnyomásemelő hatását (Szekeres, 2015). Kimutattuk továbbá, hogy az AT1R- és más, G_q -jelátvitel-függő 2-AG felszabadulás és CB1R-aktiváció következtében kialakuló vazokonstriktiót mérséklő hatás nem jelentkezik CB1R-génhiányos egerekben, valamint olyan agonisták esetében, melyek a $G_{12/13}$ -Rho-függő jelátviteli útvonalat nagyobb mértékben aktiválják (pl. $\text{PGF}_{2\alpha}$). *In vivo* méréseinkben megfigyeltük, hogy az Ang II-indukálta akut vérnyomásemelkedést MAG-lipáz gátlása mérsékli, illetve a korábban megfigyelt CB1R-gátlás hatására létrejövő fokozott vérnyomás-emelkedés CB1R-génhiányos egereken nem volt megfigyelhető. Eredményeinket összehasonlítva tehát megállapíthatjuk, hogy a GPCR agonista-függő endokannabinoid felszabadulás következtében kialakuló CB1R-aktiváció vazokonstriktiót mérséklő hatásában jelátvitel-szelektivitás és érterület-függő diverzitás jelentkezik, illetve e jelenség *in vivo* körülmények között is kimutatható Ang II-indukálta akut hipertóniában.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációja.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorokról az elmúlt két évtized eredményei alapján általánosan elfogadottá vált, hogy dimereket, illetve magasabb rendű oligomereket képesek alkotni. A dimerizáció alapvetően befolyásolhatja e receptorok működését, ezáltal fontos szerepet játszhat számos fiziológiás és patofiziológiás folyamatban, valamint a különböző

receptor dimerek szelektív farmakológiai befolyásolása kedvezőbb hatás-mellékhatás profilú gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethet. A receptor dimerek megbízható kimutatása máig nem teljesen megoldott kérdésköre az irodalomnak. A leggyakrabban alkalmazott módszer a valódi dimerizációnak a plazmamembrán fehérjék nem-specifikus interakcióitól való elkülönítésére az ún. kvantitatív Biolumineszcencia Rezonancia Energia Transzfer (qBRET) módszere. Ezekben a mérésekben energiadonorral jelzett receptor kifejeződését konstans értéken kell tartani, amely nagy kihívás expressziós kísérleti rendszerekben. Munkánk során számítógépes Monte Carlo szimulációkkal, valamint egy indukálható dimerizációs rendszer segítségével kísérletesen igazoltuk, hogy a klasszikus qBRET módszer sok esetben téves pozitív eredményekhez vezethet, és kidolgoztunk egy új típusú qBRET alapú módszert, mely segítségével nagyobb biztonsággal különíthető el a dimerizáció a nem-specifikus interakcióktól. A javaslatunk alapján a dimerizáció, tehát a specifikus BRET interakció megítéléséhez a BRET arányt kell ábrázolni az energiaakceptor kifejeződés függvényében. Ezen új típusú módszerrel számos receptor-receptor pár dimerizációját vizsgáltuk meg. Eredményeink alapján a dimerizáció specifikus folyamat, ugyanis a vizsgált receptorok közül csak a V2 vazopresszin receptorok közti és a CaSR kalciumérzékelő receptorok közti homodimerizáció, valamint a V2 és V1a vazopresszin receptorok között létrejövő heterodimerizáció bizonyult valódi specifikus kapcsolatnak. Ezzel ellentétben, a vizsgált receptorok nem adnak specifikus heterodimert az angiotenzin receptorokkal, a beta2-adrenerg és a CB1 receptorral (Szalai, 2014).