

KIS G-FEHÉRJE AKTIVÁLÓDÁS VIZSGÁLATA ANGITENZIN HATÁSMECHANIZMUSÁBAN

Az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT_1R) egy hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérjéhez kapcsolt receptor, amely rendkívül széles spektrumú jelátviteli folyamatokat aktivál angiotenzin II kötődését követően. Az AT_1R a heterotrimer G-fehérjéken kívül kis G-fehérjék (pl. Ras, Rho, Rac) aktiválásán keresztül is szabályoz egyes sejtfunciókat, mint pl. a génexpressziót, aktin citoskeleton, vezikuláris transzportot és a mikrotubulus szerveződést. Ezen folyamatok pontosabb megértése alapvető a kardiovaszkuláris remodelling, endothel diszfunkció és egyéb patológiás történések vizsgálatában.

A Pályázatban a végzett munkáink a mérésekhez használni kívánt molekuláris szondák előállítására, a BRET (biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer), illetve a FRET (fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer) mérés beállítására, valamint agonista stimulus hatására történő kis G-fehérje aktiválódás vizsgálatára összpontosítottak. Munkáink során elsősorban BRET alapú kísérleti módszer kifejlesztésére összpontosítottunk, különböző kis G-fehérjék aktiválódásának mérése céljából növekedési faktorok, citokinek, hormonok hatására élő sejtekben. A tesztrendszerek kifejlesztése során mindig figyelembe vettük, hogy a mérési módszer HTS (High Throughput System) alapon is működhessen, így biztosítva a megvizsgálható vegyületek nagy számát későbbi orvosbiológiai kutatásokban. A BRET vizsgálatok elvégzéséhez speciálisan nagy érzékenységű Berthold gyártmányú Mithras multilabel readert használtunk, 96-lyukú plateket és élő adherens sejteket használva. A fúziós és mutáns fehérjék létrehozása, valamint a BRET mérések kivitelezése a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében történt (Prof. Hunyady László labor). A kísérletekhez szükséges DNS szakaszokat humán adrenokortikális H295R sejtekből vagy EST klónokból nyertük, a konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz egy ZEISS LSM510 pásztázó lézer konfokális rendszert használtunk. A FRET mérések kivitelezése Dr. Várnai Péter laborjában (Semmelweis Egyetem Élettani Intézet) történt.

BRET alapú rendszer kifejlesztése kis G-fehérjék aktiválódás mérésére

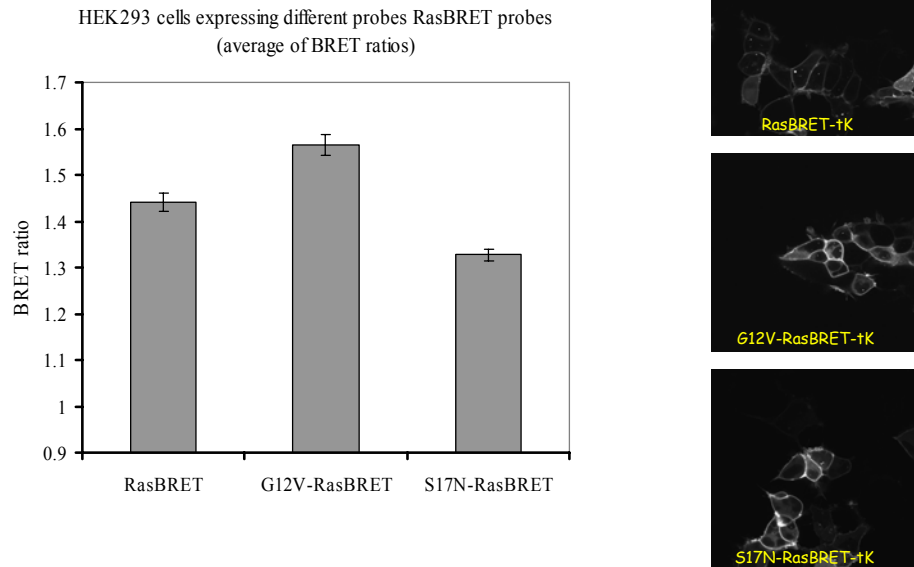
Kis G-fehérje aktiválódás mérésére az irodalomban már leírtak olyan szondákat, melyek alkalmasak a kis G-fehérjék sejten belüli aktiválódási állapotuk, illetve az ebben bekövetkező változások meghatározására fluoreszcens mikroszkóppal FRET alapú mérésekben, mikroszkópos felvételeken, kép-analizáló szoftverek segítségével. A BRET módszeren alapuló mérések nagy előnye a FRET mérésekkel szemben a nagy érzékenység és automatizálhatóság, ezért mi BRET alapon működő szondákat készítettünk. A mérési módszer optimalizálása érdekében többféle molekuláris szondát készítettünk és a DNS konstruktokat eukarióta sejtben fehérje kifejeződés létrehozására alkalmas plazmidokba építettük be. A BRET mérés során egy sejtpermeábilis szubsztrát (coelenterazin h) hatására a vizsgált fehérjéhez kapcsolt renilla luciferáz (lumineszcens ‘energiadonor’) fotonokat emittál, mely a két vizsgált fehérje (úgynevezett „intermolekuláris” szondák), vagy ugyanazon fehérje különböző részei („intramolekuláris” szondák) molekuláris szintű (< 100 Å) közelsége esetén energiáttranszfert képes kiváltani, mely szintén a vizsgált fehérjéhez kapcsolt YFP (‘energiaakceptor’) fényemisszióját hozza létre. Szondáink első változataiban a kis G-fehérje aktiválódás méréséhez olyan intramolekuláris szondát terveztünk és készítettünk, mely egy polipeptidláncon belül tartalmazza az összes szükséges komponenset. A Ras kis G-fehérje aktiválódás méréséhez használt (RasBRET) szondában a YFP-hez kötöttük a Ras-t, mely egy flexibilis linkeren keresztül kapcsolódik egy Ras-kötő doménhez (RBD), ezen RBD-hez pedig C-terminálisan helyezkedik el a renilla luciferáz és egy CAAX domén (plazmamembránba targetál, a H-Ras fehérjéből származik). A RhoA kis G-fehérje aktiválódás méréséhez használt (RhoBRET) szondában a YFP-hez kötöttük a PKN RBD doménjét, mely egy flexibilis linkeren keresztül kapcsolódik a RhoA protein, ettől pedig C-terminálisan helyezkedik el a lumineszcens ‘donor’ és a CAAX domén. A Rac aktiválódás BRET módszerrel történő méréséhez használt szonda (RacBRET) a PAK CRIB doménjét használtuk, mely egy flexibilis linkeren keresztül kapcsolódik a Rac-hoz, ezen RBD-hez pedig C-terminálisan helyezkedik el a lumineszcens ‘donor’ és egy CAAX domén. A konstruktokat HEK293 (human embryonic kidney) epitél sejtekben expresszáltuk és működésüket epidermális növekedési faktor (EGF), vagy angiotenzin II (AngII) stimulus hatására vizsgáltuk. Ezen kísérleti felállásban a kis G-fehérje aktiválódás hatására BRET-

jel növekedését várjuk, hiszen ezen intramolekuláris szondákban nyugalmi helyzetben egymáshoz viszonylag távol van az akceptor a donortól (RBD nem kötődik a kis G-fehérjéhez), de aktiválódás során az RBD kötődik a kis G-fehérjéhez, így a polipeptidlánc két vége közelebb kerül egymáshoz, nagyobb energiáttranszfer lesz (a BRET-jel nő). A sejteket 24 órával a vizsgálatok előtt a szondákat tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk 96-lyukú, poli-L-lizinnel kezelt edényekben és az adherens sejteken végeztük a BRET mérést 6 órás szérum-megvonást követően. Az expresszálni kívánt plazmidokat a HEK293 sejtek esetén Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen, USA), míg a H295R sejtek esetén nukleotranszfektálással (Amaxa, Németország) vittük be a sejtekbe. A Ras aktiválódását mérő szondáknak elkészítettük két mutáns verzióját is, hogy megvizsgáljuk a bioszenzoraink hozzávetőleges dinamikai tartományát (kis G-fehérjék stabilan expresszálódó GDP-kötött 'inaktív', vagy GTP-kötött 'aktív' formái), mivel az aktív formák expresszálásával maximális BRET jelet detektálhatunk, míg a GDP-kötött mutánsok a mérhető BRET-jelet minimálisra csökkentik.

A RasBRET szonda viszonylag magas BRET-jelet ad már nyugalmi állapotban lévő sejtekben is (mely pl. EGF kezelés hatására emelkedik, ld. később), míg a G12V RasBET ('aktív' forma) szonda expresszálása ezt a BRET-jelet még tovább növeli, illetve az S17N RasBRET ('inaktív' forma) expresszálása csökkenti (1. ábra). A RasBRET szonda működésének validálásán túl ezen eredmény azt is mutatja hol van az a dinamikai tartomány, ahol a különböző stimulusok hatására bekövetkező változásokat mérhetünk.

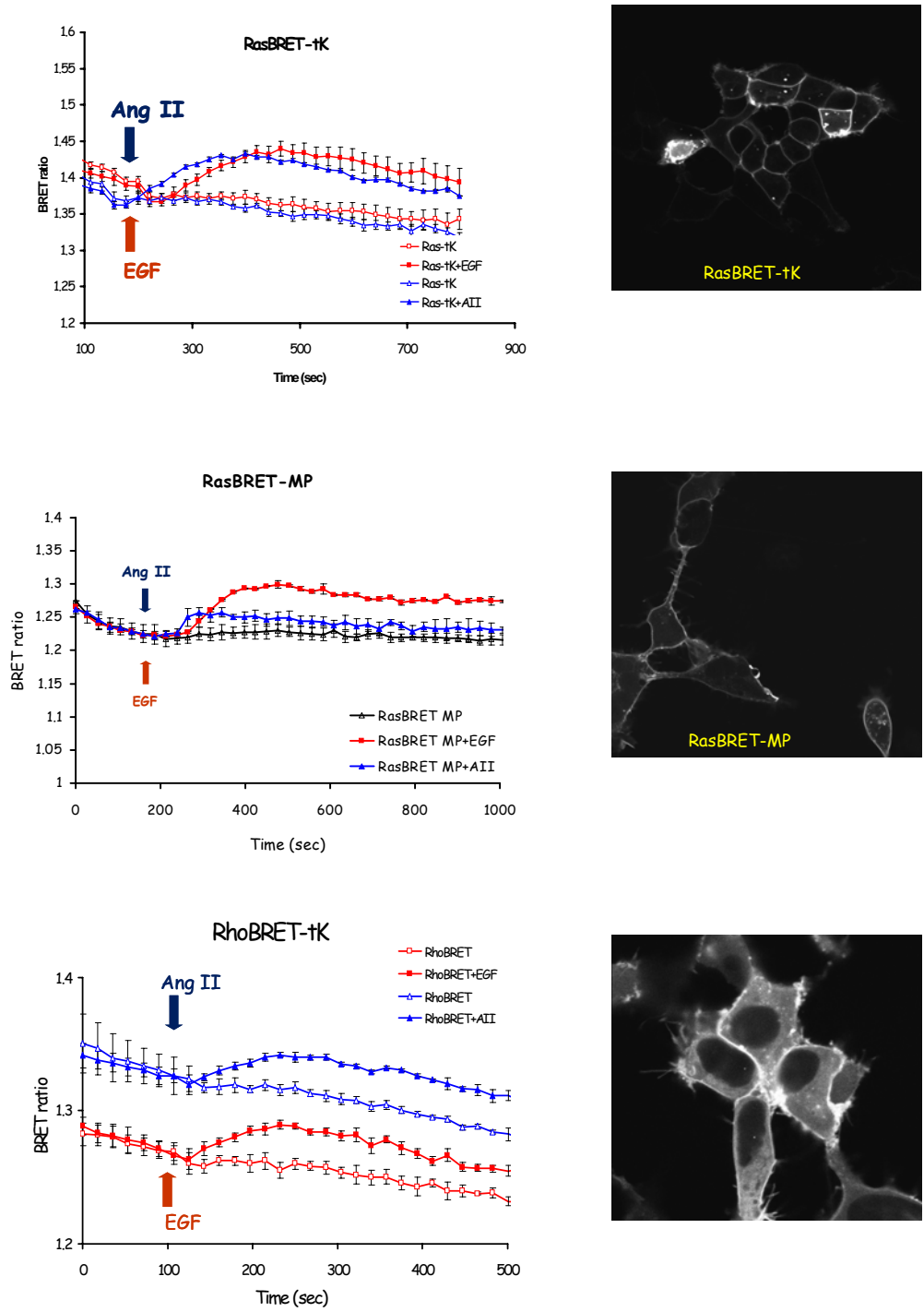
A RasBRET mintájára elkészítettük a RhoA aktiválódás mérésére használni kívánt konstruktok első verzióját (RhoBRET), mely szintén jól működő bioszenzorként működik (ld. később). Az elsőként elkészített intramolekuláris szondák mellett, az esetlegesen nagyobb dinamikai tartományban, illetve specifikusabban működő szondák kifejlesztése érdekében, a RasBRET intermolekuláris verzióját is elkészítettük, mely konstruktoknál a YFP-Ras és a RBD-luciferáz külön polipeptidláncban található, illetve az ún. RevRasBRET szondában az akceptor és a donor pozícióját megcseréltük. A Rho-, illetve RacBRET szondák esetében is számos variánst készítettünk jobban működő szondák kifejlesztése érdekében (intramolekuláris verziók). A 2. ábrán néhány

intramolekuláris típusú RasBRET, illetve a RhoBRET szondákkal kapott BRET-jel változás látható élő HEK293 sejtekben különböző stimulusok hatására.



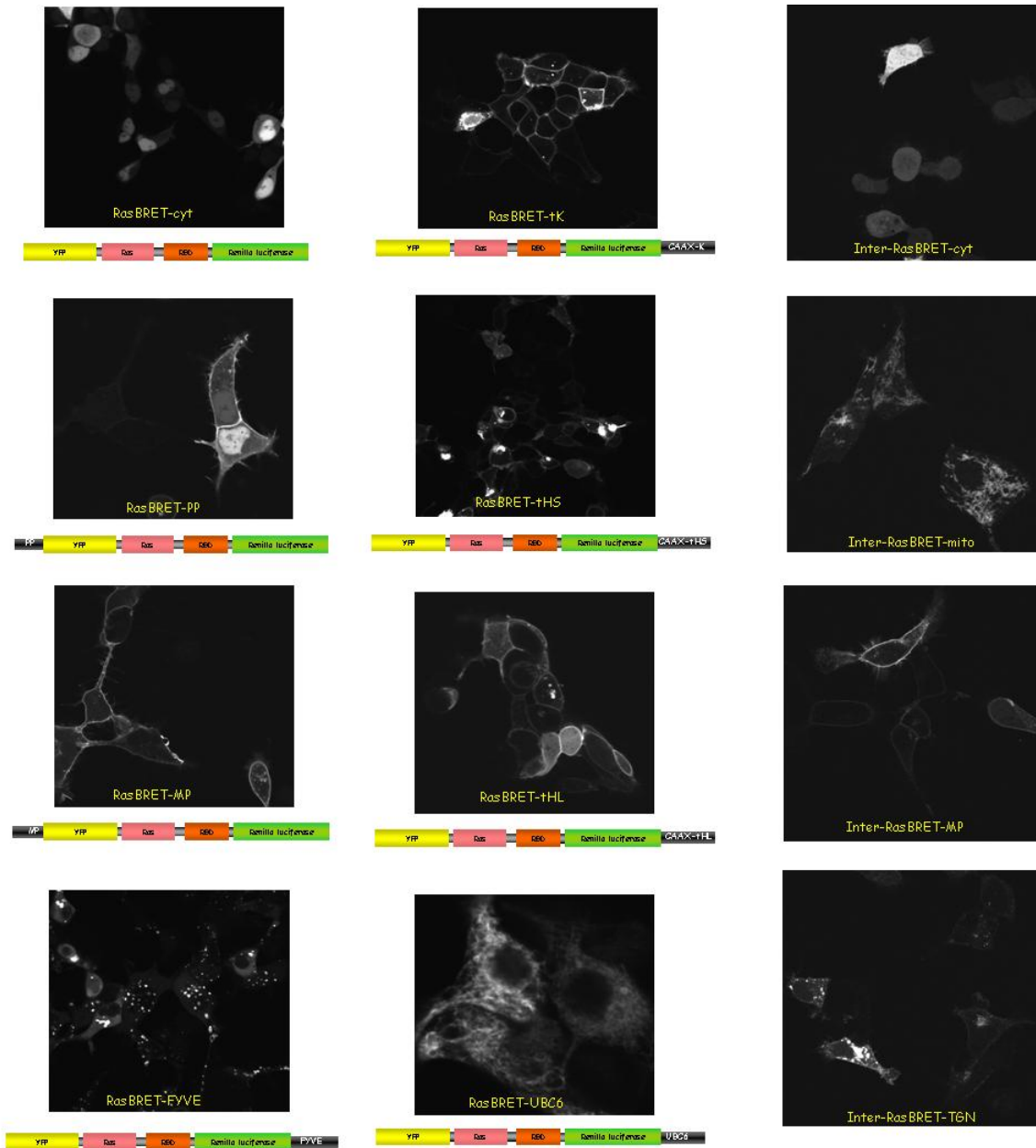
1. ábra. BRET-jelek különböző RasBRET szondák expresszásiakor. Az akceptort nem tartalmazó RasBRET (Δ YFP-RasBRET) szonda ~ 0.85 -ös értéket ad.

A különböző kis G-fehérjék aktiválódásának vizsgálatára készített szondáknak (RasBRET, RhoBRET, RacBRET) a különböző intracelluláris kompartmentekhez targetált verzióit is elkészítettük. Ezen szondák felhasználásával vizsgáltuk kis G-fehérje aktiválódást élő sejtek különböző intracelluláris helyein növekedési faktorok és hormonok hatására élő sejtekben. Az intracelluláris kis G-fehérje aktiválódás kimutatására és jellemzésére a kis G-fehérje aktiválódás méréséhez használt (pl. RasBRET) szondák N-, vagy C-terminális végéhez fűzionáltuk a különböző targetáló szekvenciákat. Ezen szekvenciák az expresszálandó szondát a megfelelő intracelluláris kompartmenthez irányítják. Kísérleteinkhez a citoplazmatikus (a) szondán kívül az N, illetve C-terminális véghez kapcsoltuk a: (b) tandem palmitoilálás konszenzus szekvencia (plazmamembrán, nagy affinitás); (c) mirisztoilálás és palmitoilálás konszenzus szekvencia (kisebb plazmamembrán affinitás); (d) TGN (Golgi); (e) AKAP (mitokondrium); (f) K-Ras CAAX, -tK (nem-lipid raft); (g) H-Ras hosszú CAAX, -tHL



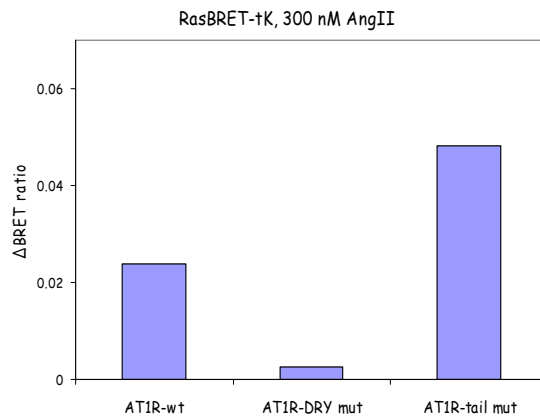
2. ábra. BRET-jelek változása stimulus (50 ng/ml EGF vagy 100 nM AngII) hatására HEK293 sejtekben. Az EGF-receptort a sejt endogéne tartalmazza, míg az angiotenzin receptort (AT_{1A} -R) transzjektáltuk HEK293 sejtekben. Az EGF válszoknál kisebb AngII válaszok magyarázata lehet, hogy az AT_{1A} -R nem található meg minden sejten, mivel a transzjektációs hatékonyság ~ 50%-os HEK293 sejtekben.

(inkább plazmamembrán); (h) H-Ras rövid CAAX, -tHS (plazma-, endomembránok); (i) FYVE (endoszómák); (j) UBC6 (endoplazmatikus retikulum); (k) Sac1 (endoplazmatikus retikulum) irányító peptideket. Konfokális mikroszkóppal ellenőriztük, hogy a különböző intracelluláris, illetve plazmamembrán kompartmentekbe irányított szondák lokalizációja megfelelt az előzetesen vártaknak (3. ábra).



3. ábra. Néhány BRET szonda lokalizációja HEK293 sejtekben. Konfokális mikroszkópos felvételek (Zeiss LSM510).

Az intramolekuláris szondáinkkal végzett BRET mérések alapján a plazmamembránra targetált (függetlenül attól, hogy raftokba vagy nem raftokba) Ras- és RhoBRET szondák agonista stimulusra BRET-jel emelkedést mutatnak. EGF receptor kináz inhibitor alkalmazásával kimutattuk, hogy az AngII hatására bekövetkező kis G-fehérje aktiválódás nem a hagyományos útvonalon történő, ún. EGF receptor transzaktiváció eredménye a plazmamembránban (nem mutatjuk), mely az AngII és EGF stimulus okozta kis G-fehérje aktiválódás kinetikájának különbözőségéből is sejthető (ld. 2. ábra, MP-RasBRET). A sejtek belsejébe targetált szondák esetében a transz-Golgi-hoz targetált intramolekuláris konstrukt mutatott kis G-fehérje aktiválódást, melynek mértéke nem volt statisztikailag szignifikáns. Ezek után elhatároztuk, hogy megpróbálkozunk szondáink intermolekuláris verzióinak elkészítésével, mely konstruktoknál az adott kis G-fehérje, illetve annak GTP-kötött 'aktív' formáját felismerő specifikus domén külön polipeptidláncban található. Ezen szondák segítségével sikerült nemcsak a plazmamembránon, de a sejten belül is szignifikáns kis G-fehérje aktiválódást kimutatnunk a transz-Golgi, endoplazmatikus retikulum, illetve mitokondriumok külső membránján. Különböző AT_{1A}R konstruktok koexpressziójával (vad típusú; mutáns, mely nem képes internalizálódni; illetve mutáns, mely heterotrimer G-fehérjét aktiválni képtelen) meg tudjuk állapítani, hogy a kapott intracelluláris aktiválódás a plazmamembrán eredetű, vagy az internalizálódott receptorok működése hatására jön-e létre (4. ábra).



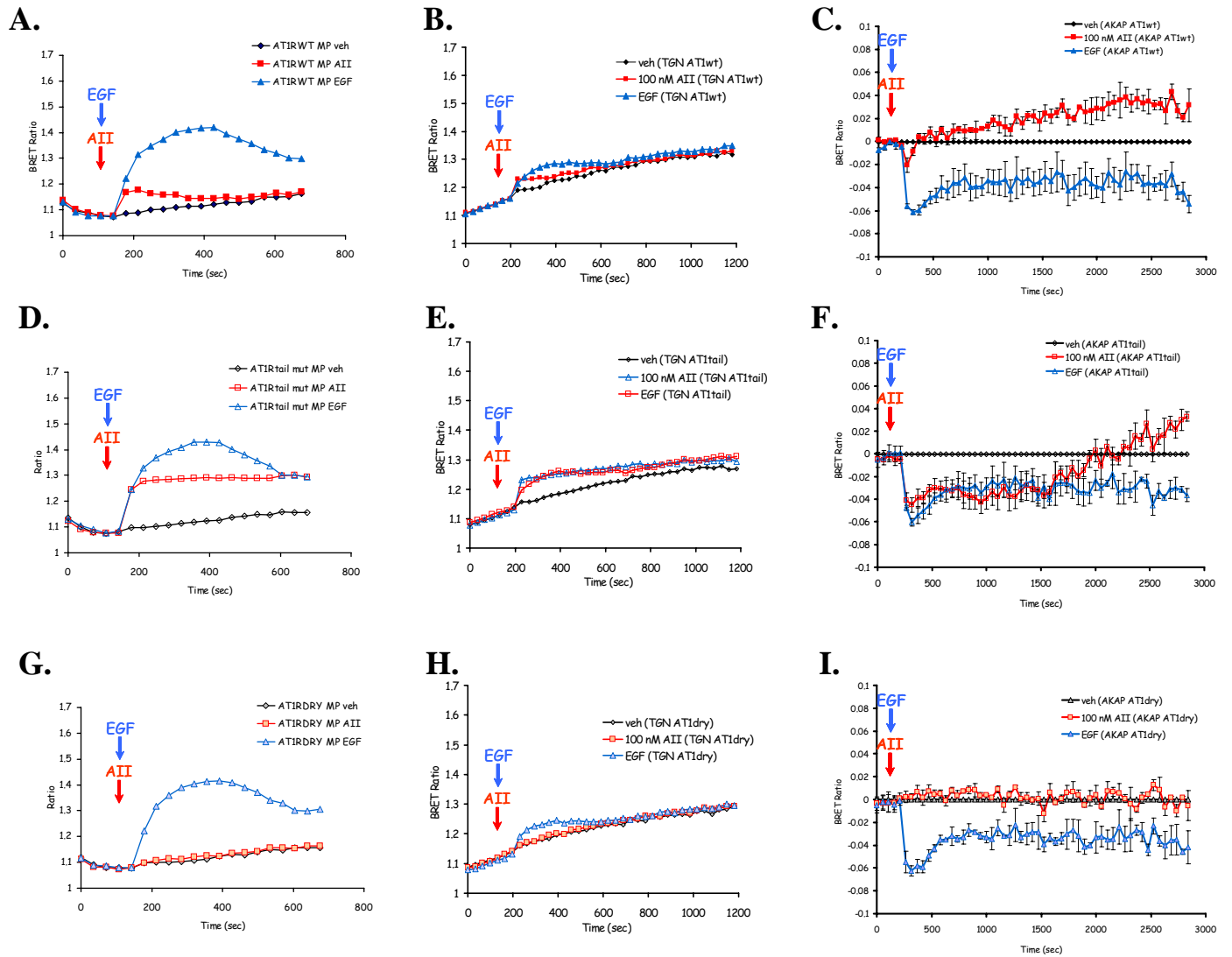
4. ábra. BRET-jelek változása stimulus (300 nM AngII) hatására HEK293 sejtekben. DRY/AAY AT_{1A}R mutáns megakadályozza a heterotrimer G-fehérjén keresztüli kis G-fehérje aktivációt, míg a plazmamembránban ragadó mutáns receptor (deszenzitizációra és internalizációra nem képes ún. fark-mutáns) sokkal nagyobb mértékű és időben elhúzódó aktivációt eredményez.

A vad-, valamint az internalizációra nem képes mutánsal kapott eredményeket összevetve adataink arra utalnak, hogy a Golgin és endoplazmatikus retikulumon kapott aktiválódás a plazmamembránnal áll kapcsolatban, míg a mitokondriumok esetében az internalizált receptorok okozzák a kis G-fehérje aktiválódást (5.ábra).

A BRET mérésekkel kapott eredményeinket FRET mérésekkel is igazolni kívántuk. Bár a BRET mérés sokkal érzékenyebb és pontosabb méréseket tesz lehetővé, ám képkötő eljárással (FRET imaging) is demonstrálni kívántuk, hogy valóban történik kis G-fehérje aktiváció a mitokondriumok külső membránján. Ezen kísérletek kivitelezéséhez a bioszenzorainkban a renilla luciferázt kódoló génszakaszt CFP-re cseréltük. A FRET-es kísérletekben a HEK293 sejteket mindig úgy transzfektáltuk az adott konstrukciókkal, hogy a YFP-t tartalmazó részt targetáltuk membránokba, míg a CFP-t tartalmazó konstrukció a citoplazmába került. Mind a plazmamembránra (MP-RasFRET), mind a mitokondrium külső membránjára (AKAP-RasFRET) targetált szondákkal kimutattuk az adott membránban kis G-fehérje aktivációt (a „movie” file-okat nem mutatjuk), mely a BRET méréseinkkel megegyező kinetikával rendelkezik.

Eredményeink szerint ezen bioszenzorok alkalmasak növekedési faktorok, citokinek, hormonok szignalizációjának vizsgálatára, illetve különböző vegyületek ezen szignalizációs jelpályákra történő farmakológiai hatásának tesztelésére élő sejtekben, valamint a szondák targetálásával különböző intracelluláris kompartmentekben vizsgálhatjuk kis G-fehérje jelpályák működését és különböző farmakonok hatását specifikus sejtkompartimentekben.

A 2008-as munkánk eredményeit bemutattuk egy nemzetközi konferencián (Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009). A kis G-fehérje aktiválódás Ang II hatásmechanizmusának vizsgálata során kapott eredményeinket egy kéziratba foglalva tervezzük munkánk publikálását nemzetközi, endokrinológiai folyóiratban. Az OTKA PF63893 pályázatot két darab elsőszerzős közleményben tüntettük fel.



5. ábra. BRET-jelek változása stimulus (50 ng/ml EGF vagy 100 nM AngII) hatására HEK293 sejtekben. Plazmamembrán raft-mikrodoménjébe (A., D., G.) a transz-Golgiba (B., E., H.), illetve a mitokondrium külső membránjába targetált szondákkal kapott BRET változások különböző AT₁ receptort expresszáló sejtekben (A-C: vad típusú; D-F: nem internalizálódó; G-I: G fehérje kötésre képtelen AT₁ receptor koexpressziója a szondák mellett).