

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 orvosbiológia 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-terminálisához 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 -arrestinek 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 transzfekció

HEK 293T és COS-7 sejtvonalak kultúráit 100 IU/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomicinnel 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 transzfektáltuk 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-fosfo-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 β_2 AR- β -arresztin2 kötés a két fehérje közötti stabilabb interakció következménye. Megvizsgáltuk, hogy a heterodimerizáció befolyásolja-e a β_2 AR aktiváció hatására kialakuló cAMP jelet. ISO és AngII vagy TRV120023 kostimuláció hatására elnyújtottabb cAMP jelet tapasztaltunk, mutatva, hogy az AT_1 R aktiváció a β_2 AR-t nemcsak β -arresztin kötésében, hanem cAMP szignalizációjában is befolyásolja.

Az inaktív AT_1 R 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_1 R esetében

a PKC és a GRK foszforilációs helyek átfednek egymással, megvizsgáltuk, hogy a PKC foszforiláció előidéz-e AT₁R- β -arresztin interakciót a receptor stimulációjának hiányában is. Ennek megfelelően specifikus PKC-aktivátor forbol-észter (PMA) hatására koprecipitálni tudtuk NeutrAvidin gyöngyökkel a biotinizált AT₁R-YFP-BAP fehérjét β -arresztin2-Ceruleannal. A heterológ β -arresztin2 kötést valós időben is vizsgáltuk Rluc8-jelölt AT₁R 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 (α_{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 AT₁R 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**