

AZ EDG-típusú lizofoszfolipid receptorok szerepe az értónus szabályozásában

Doktori tézisek

Dr. Dancs Péter Tibor

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok
Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Benyó Zoltán, DSc egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Balogh Balázs, PhD egyetemi adjunktus
Dr. habil. Kaszaki József, PhD egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Kellermayer Miklós, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Fekete Andrea, PhD egyetemi adjunktus
Dr. Csekő Csongor, PhD

Budapest
2019

1. Bevezetés

A lizofoszfolipidek családját két alcsoport, a glicerofoszfolipidek, valamint a szfingolipidek alkotják. A két csoport legalaposabban kutatott tagjai a lizofoszfatidsav (LPA), valamint a szfingozin 1-foszfát (S1P).

Az első LPA-val kapcsolatos tanulmány 1957-ben látott napvilágot, amikor Vogt egy lipid keveréket izolált, mely kontrakciót váltott ki nyúlbélben. A pontos vegyület és ennek szerkezete ekkor azonban még ismeretlen volt. Akira Tokumura és csoportja 1978-ban szójabab lecitinből izolálta és azonosította az LPA-t, mint egy új lipid mediátort, mely vérnyomás-emelkedést okozott patkányban és egyéb speciosekben. A 90-es évek elején Tigyi és Miledi írta le az albuminhoz kötött LPA endogén regulátor szerepét a sejtfunkciókban, és feltételezték, hogy a hatásokat membránreceptorok közvetítik.

Azóta az LPA-val kapcsolatos közlemények száma megsokszorozódott. Mindazonáltal az LPA molekuláris célpontját homály fedte egészen 1996-ig, amikor Chun és munkatársai azonosították az LPA első G protein-kapcsolt receptorát (GPCR) az LPA₁-et. Az azóta eltelt idő alatt további 5 LPA receptor került leírásra (LPA₂₋₆). Továbbá 2003-ban fény derült rá, hogy az LPA intracelluláris célponton is hat.

Az első S1P-vel kapcsolatos tanulmányok a 90-es évek elejéről valók, melyek az S1P sejtproliferációra, növekedésre és túlélésre kifejtett hatásait írják le. Bár Timothy Hla és munkacsoportja már 1990-ben felfedezte az első S1P receptor fehérjét, további nyolc év telt el, amíg tisztázódott, hogy a receptor ligandja az S1P. Ez a receptor S1P₁ néven került leírásra 1998-ban. Az azóta

eltelt 20 évben további 4 S1P receptor kerül leírásra (S1P₂₋₅).

Érdekes módon az ismert LPA receptorok közül három (LPA₁₋₃) és az összes S1P receptor egy családba, az endotheliális differenciációs gén (EDG) receptor családba tartozik, melyek tagjai sok hasonlóságot hordoznak mind szerkezeti mind pedig funkcionális szempontból. Emberi köldökzsinórvéna endothelsejteken (HUVEC) folytatott kísérletek folyamán kiderült, hogy a forbol-12-mirisztát-13-acetát, mely az endothelsejtek differenciációját okozza, serkenti e gének transzkripcióját, innen ered a receptorcsalád neve is. A későbbiekben leírták, hogy a kódolt fehérjék nagyfokú hasonlóságot mutatnak a GPCR-okkal.

A kezdeti tanulmányok után e kutatási terület gyorsan fejlődött. A genetikailag módosított kísérleti állatok megjelenése pedig új lendületet adott a kutatásoknak, melyek során az LPA és az S1P szerepe számos élettani és kórélettani folyamatban beigazolódott.

Munkacsoportunk közel egy évtizede vizsgálja mindkét mediátor érszabályozásban betöltött szerepét. Érdekes módon az irodalom mindkét esetben ellentmondásos. Az LPA esetében egy kettős, Janus-arcú hatást írtunk le izolált erekben, mely az endothelium jelenlététől függ. Az S1P esetében, melynek önmagában alkalmazva elhanyagolható hatása volt az értónusra, egy potenciózó hatást tapasztaltunk, amennyiben más konstriktor is jelen volt.

Kutatásunk során ezeket a jelenségeket vizsgáltuk farmakológiai és genetikai módszerekkel, hogy felderítsük mely lizofoszfolipid receptor és milyen jelátviteli úton szabályozza az adott folyamatot.

2. Célkitűzések

Mind az LPA, mind az S1P számos szereppel bír a kardiovaszkuláris rendszerben. Ami az értónus szabályozását illeti, mindkét mediátor szerepe széles körben kutatott. Konstriktor és dilatátor hatások is leírásra kerültek mind a két mediátor esetében. Mindazonáltal ezen eredmények és különösképpen a hatások receptor-függősége tisztázatlan és gyakran következtelen.

Ennek megfelelően kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Van-e az EDG-típusú LPA receptorok aktiválódásának vazoaktív hatása?
2. Amennyiben igen, akkor ezek endothelium-függők, vagy attól függetlenek?
3. Mely receptorok és szignáltranszdukciós útvonalak játszanak szerepet az adott folyamatokban?
4. Van-e az S1P receptorok aktiválódásának vazoaktív hatása?
5. Amennyiben igen, akkor ezek endothelium-függők, vagy attól függetlenek?
6. Mely receptorok és downstream jelátviteli mechanizmusok játszanak szerepet az adott hatásokban?

3. Anyagok és módszerek

Minden beavatkozás és kísérlet a Semmelweis Egyetem állatvédelmi szabályzatainak megfelelően és érvényes állatkísérletes engedélyek birtokában történt.

3.1. Kísérleti állatok

A C57BL/6 és az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) deficiens (KO) egereket a Charles River Laboratories-tól vásároltuk. A C57BL/6 egerek a későbbiekben vad típusként (WT) kerülnek említésre. Minden transzgenikus egértörzs tenyészése C57BL/6 alapon történt. Az LPA₁ és LPA₂ receptor deficiens állatok (LPA₁ KO és LPA₂ KO) előállítását a korábban leírt módon történt. A ciklooxygenáz-1 KO (COX1 KO) egereket Dr. Ingvar Bjarnason bocsátotta rendelkezésünkre. A thromboxán receptor deficiens (TP KO) állatokat Dr. Shuh Narumiya biztosította. A simaizom specifikus G $\alpha_{q/11}$ és G $\alpha_{12/13}$ deficiens egerek (G $\alpha_{q/11}$ KO és G $\alpha_{12/13}$ KO) és megfelelő kontrolljaik (G $\alpha_{q/11}$ CTRL és G $\alpha_{12/13}$ CTRL) a korábban leírt módon lettek előállítva. Az S1P₂- and S1P₃ hiányos egereket (S1P₂ KO, S1P₃ KO) és megfelelő kontrolljaikat Dr. Richard L. Proia bocsátotta rendelkezésünkre. Az LPA₁ KO, LPA₂ KO és COX1 KO törzsekkel végzett kísérleteinkben, az adott törzsből származó vad típusú állatok szolgáltak kontrollként és LPA₁ CTRL, LPA₂ CTRL and COX1 CTRL, jelöléssel kerültek említésre. Mivel a TP KO egértörzset KO tenyészetben tartjuk fent, ezekben a kísérletekben C57BL/6 egerek szolgáltak kontrollként és TP CTRL-ként kerültek említésre. A pertussis toxinnal (PTX) végzett kísérleteinkben az állatok 5 napig kapták a toxint 50 μ g/kg dózisban intraperitoneálisan alkalmazva.

3.2. Érpreparátumok előkészítése

Éterrel mélyaltatott állatokat transzkardiálisan 10 ml heparinizált (10 IE/ml) Krebs oldattal perfundáltunk. Az aortát mikroszkóp alatt megtisztítottuk a zsírtól és kötőszövettől. Ezután a következő összetevőket tartalmazó, karbogén gázzal átbuborékolgatott (95% O₂, 5% CO₂) szobahőmérsékletű Krebs oldatba helyeztük: 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂·H₂O, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 0,03 mM EDTA és 10 mM glükóz, pH=7,4. Az erekből kb. 3 mm hosszúságú szegmenteket preparáltunk és konvencionális miográf rendszer értartó tüire (d=200 μm) helyeztük. Kísérleteink döntő többségében az endotheliumot mechanikusan eltávolítottuk a szegmentek értartó gyűrűn való forgatásával, valamint sebési fonállal. Bizonyos kísérletekben az endotheliumot megőriztük. Az endothelium funkcionális integritását vagy hiányát az acetil-cholin (ACh) indukálta vazorelaxáció jelenléte, illetve elmaradása jelezte. A thoracalis aorták egy részét intakt endotheliummal szegmentekre vágtuk és thromboxán B₂ ELISA esszének vetettük alá, amint az a továbbiakban részletesen tárgyalásra kerül.

3.3. Miográfós kísérletek

A miográfok kádjait 6 ml, karbogénnel (95% O₂-5% CO₂) átbuborékolgatott Krebs oldattal töltöttük fel. Az ereket 30 percig pihentettük, ami alatt az oldat hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük, a passzív érfezülést pedig abdominalis aorta esetében 10 mN-ra, thoracalis szegmentek esetében 15 mN-ra állítottuk, mely egy korábbi tanulmányunkban optimálisnak bizonyult. Ezt követően az oldatot 1 percig 124 mM K⁺-t tartalmazó

Krebs oldatra cseréltük, melyet többszöri normál Krebs oldattal történő kimosás következett. Ezután 10 μM koncentrációjú fenilefrin (PE), majd közvetlen 0,1 μM ACh adása következett, mellyel a simaizom és az endothelium reaktivitását teszteltük. Többszöri kimosás és az alaptónus visszaállása után az ereket ismét 124 mM K^+ -ot tartalmazó Krebs oldatnak tettük ki, most 3 percig, amivel egy referencia kontrakciót váltottunk ki, mely a későbbi kontrakciók viszonyítási alapjául szolgált. Újabb 30 perces pihenőidő után PE-t és ACh-t adtunk emelkedő koncentrációkban (PE 1 nM-10 μM , valamint ACh 1 nM-10 μM), hogy meghatározzuk az ér reaktivitását, és hogy igazoljuk az endothelium funkcionális integritását, vagy endothel-irtás esetén a hiányát. Ezután ismét egy 30 perces pihenő periódus következett, majd ezt követően az adott kísérlet célja szerint három különböző protokollt követtünk.

3.3.1. Kísérleti protokoll vazoaktív hatások vizsgálatához előfeszített erekben

A különböző genetikai hátterű thoracalis aorta szegmenteket a referencia kontrakció 70-90%-ának mértékében előfeszítettük megfelelő dózisú PE adagolásával, majd egy stabil plateau elérése után következett 10 μM LPA_{1-3} agonista VPC31143, vagy bizonyos kísérletekben 5 μM S1P adása. Az értónus változásának értékét vazokonstriktió esetében a 124 mM K^+ kiváltotta koncentráció, míg vazodilatáció esetében az előfeszítés %-os arányában adtuk meg.

3.3.2. Kísérleti protokoll vazóaktív hatások vizsgálatához alaptónusú erekben

Ezen protokoll esetében 10 μM VPC31143-at, vagy különböző koncentrációjú LPA_3 agonista T13-at, vagy 5 μM S1P-t adtunk az erek szervfürdőibe előfeszítés nélkül, alaptónusú feszülés mellett. Bizonyos kísérletekben az $\text{LPA}_{1/3}$ antagonistá Ki16425-t, illetve a szelektív LPA_3 antagonistá diacilglicerol pirofoszfátot (DGPP) alkalmaztunk 10 μM koncentrációban 30 perccel a VPC31143 adagolása előtt. A vazokonstriktiók értékét a 124 mM K^+ okozta referencia kontrakció %-os értékében tüntettük fel.

3.3.3. Kísérleti protokoll az S1P tartós vazóaktív hatásainak vizsgálatához

Ezekben a kísérletekben az S1P potencírozó hatását vizsgáltuk α_1 agonisták által kiváltott kontrakció esetében. Vazokonstriktiókat váltottunk ki 20 percenkénti PE-adással. Az első három kontrakció átlagértéke szolgált referenciaként és ezt vettük 100%-nak. A harmadik PE-adás után 20 percig inkubáltuk az ereket 5 μM S1P-vel vagy a vehikulum 0,3 N-os nátrium hidroxiddal (NaOH). Ezután 20 percenkénti PE-adás következett. A vazokonstriktiók mértéke az első három (inkubáció előtti) kontrakció átlagértékének százalékos arányában kerül jelölésre.

3.4. A vaszkuláris thromboxán A_2 -felszabadulás mérése

Thoracalis Aortákat 5 szegmentre vágunk és 2 óráig pihentettük őket. Némely kísérletben 3 $\mu\text{g/ml}$ PTX-t alkalmaztunk 2 órán át, hogy gátoljuk a G_i fehérjét.

Ezután az ereket 200 μ l Krebs oldatban inkubáltuk 37°C-on 2 percig, hogy megállapítsuk az alap TXA₂ termelést. Az inkubációt követően a felülúszót kicseréltük 200 μ l 10 μ M VPC31143-at tartalmazó Krebs oldatra, és ezzel inkubáltuk az ereket 2 percig. Az alapvonalit és stimulált felülúszókat gyorsfagyasztottuk és -80°C-on tároltuk a thromboxán-szint mérésig. A felülúszókból meghatároztuk a thromboxán B₂ (TXB₂), a TXA₂ egy nem enzimikus úton termelődő stabil metabolitja, koncentrációját a Cayman Chemical Co TXB₂ EIA kitjének segítségével. A TXB₂ termelés pg/min-re lett átszámolva. Az erek melyek esetében az alapvonal meghaladta a 20 pg/min-t preaktiváció miatt kizárásra kerültek a kísérletből

3.5. AZ LPA és S1P receptorok expressziójának vizsgálata vaszkuláris simaizomban

Endothél-írott thoracalis és abdominalis aortákat izoláltunk, majd óvatosan eltávolítottuk az adventitiát mikroszkóp alatt. Ezután az ereket gyorsfagyasztottuk és -80°C-on tároltuk a PCR analízisig. Az RNS-t az RNeasy Micro kit (Qiagen) segítségével izoláltuk, a mennyiségét pedig Nanodorp-pal (Thermo Fischer Scientific) határoztuk meg. 500 ng teljes RNS került átírásra cDNS-sé a SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) alkalmazásával. Az mRNS expressziót kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg 20 ng RNS-nek megfelelő cDNS templát használatával. A PCR reakciók triplikátumokban kerültek elvégzésre 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix-ben (Thermo Fischer Scientific), 300 nmol-lal mindegyik primerből 25 μ l végtérfogatban. Ciklusparaméterek: 1 lépés 95°C-on 10 percig, majd 40 ciklus 94°C-on 15 másodpercig, ezután 60°C-on 60 másodpercig

StepOnePlus real-time PCR rendszerrel (Applied Biosystems). A vizsgált gének relatív expresszióját dCt módszerrel határoztuk meg, normalizáló génként GAPDH-t használtunk.

3.6. Reagensek

AZ LPA-t (18:1) és a VPC31143-t az Avanti Polar Lipids-től szereztük be és fiziológiás sóoldatban oldottuk fel közvetlenül az alkalmazás előtt. A DGPP szintén az Avantitól került beszerzésre és metanolban oldottuk. A Ki16425 a Cayman Chemical Company-tól volt és DMSO-ban került feloldásra, amivel 100-szor töményebb törzsoldatot készítettünk. Ezekben a kísérletekben az oldószer szolgált kontrollként. A PTX-t a List Biological Laboratoriestól vettük és glicerolban oldottuk. A T13 szintézisét egy korábbi tanulmány tartalmazza, oldása 0,1 % zsírsavmentes borjú szérum albumin tartalmú PBS-ben történt. Az S1P a Cayman-tól került beszerzésre és 0,3 N-os NaOH-ban került feloldásra az alkalmazás előtt. Minden egyéb anyagot és reagenst a Sigma-Aldrich-től szereztünk be. A miográfus kísérletekben a megadott koncentrációk a miográf szervfürdőjében lévő végső koncentrációnak felel meg.

3.7. Statisztikai elemzés

Az értónus változásainak rögzítéséhez és az eredmények kiértékeléséhez Biopac MP100 rendszert és AcqKnowledge 3.72 szoftvert használtunk. Az adatok átlag \pm standard hiba formátumban vannak feltüntetve, n jelöli a tesztelt érszakaszok számát a miográfus és a tesztelt állatok számát a TXB₂ és qPCR kísérletekben. A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism v.6.07 szoftvert használtunk. Két csoport összehasonlítása esetén Student

féle párosítatlan t tesztet, több csoport esetén ANOVA-t használtunk a megfelelő post hoc teszttel. A különbséget $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Az EDG-típusú LPA receptorok aktiválódása endothelium-függő és attól független értónusváltozásokat eredményez

Annak érdekében, hogy elemezni tudjuk az EDG-típusú LPA receptorok potenciális vazóaktív hatásait, az LPA₁₋₃ agonista VPC31143-at alkalmaztuk WT erekben PE-nel történő előfeszítés után. A VPC31143 kifejezett vazodilatációt idézett elő. Az vazodilatáció dózis-függőnek bizonyult, melynek EC₅₀ értéke 15 nM, E_{max} értéke pedig a prekontrakció 51,9 %-a volt.

A dilatáció háttérében lévő folyamatok közül elsőként az endothel-eredetű dilatátor mediátorok szerepét vizsgáltuk. Ennek érdekében WT típusú ereken végeztünk mechanikus endothel irtást, melyekben a VPC31143-okozta relaxáció nem csak eltűnt, de helyette kontrakció lépett fel, mint egy jelezve a z endothel-eredetű mediátorok szerepét a folyamatban. A továbbiakban szerettük volna azonosítani a szóban forgó vegyületet. Ennek tisztázására COX1 KO és eNOS KO egerek ereit vizsgáltuk. Kísérleteink során a COX1 KO állatok erei által adott válaszok nem különböztek a WT erekétől, míg eNOS KO erek esetében, hasonlóan az endothel-irtott WT erekhez, a vazodilatáció elmaradt és kontrakció lépett fel. Ezen eredmények alapján az EDG-típusú LPA receptorok által kiváltott vazodilatáció háttérében endotheliális no-felszabadulás áll, és COX1 aktivitás eredményeként létrejövő prosztanoid mediátorok nem játszanak szerepet a folyamatban.

Kísérleteink következő fázisában a VPC31143-okozta vazokonstriktációt vizsgáltuk behatóan. A hatás potenciális aortán belüli regionális különbségeinek felderítése

érdekében WT thoracalis és abdominalis aorta szegmenteket (TA, valamint AA) vizsgáltunk, alaptónusra adott agonistával. Intakt endothelium esetén a VPC31143 10 μM -os koncentrációban kismértékű vazokonstriktiót okozott a referencia, 124 mM K^+ -által kiváltott kontrakcióhoz viszonyítva.

Endothelium hiánya esetén azonban megjelent a VPC31143 kifejezett konstriktor hatása, AA esetében mintegy háromszorosa az ép endothelium esetén tapasztaltnak. A vazokonstriktió dózis-függő volt, az EC_{50} értéke 4,1 μM , az E_{max} pedig a referencia kontrakció 87,4 %-a.

4.2. A VPC31143-okozta vazokonstriktiót mediáló LPA receptor(ok) azonosítása

Mivel az endothelium eltávolítása felerősített a VPC31143 vazokonstriktor hatását, így figyelmünk a vaszkuláris simaizomban kifejeződő LPA receptorok felé fordult. Először is meghatároztuk, mely LPA receptorok fejeződnek ki izolált TA és AA tunica mediájában. Az LPA_1 , LPA_2 , LPA_4 és LPA_6 mRNS volt a legnagyobb mennyiségben detektálható, az LPA_4 és LPA_6 esetében a szint magasabb volt AA-ban mint TA-ban. Az LPA_3 mRNS szintje volt a legalacsonyabb, bár ez a transzkriptum TA-ban nagyobb mennyiségben volt jelen, mint AA-ban. Adatainkat összegezve az LPA_1 és LPA_2 szerepe tűnik valószínűnek az általunk vizsgált vazokonstriktióban.

A továbbiakban farmakológiai és genetikai módszereket alkalmaztunk annak érdekében, hogy tisztázzuk, melyik LPA receptor felelős a vizsgált vazokonstriktióért. Míg WT AA erekben az $\text{LPA}_{1/3}$ antagonistá Ki16425 gátolta a 10 μM VPC31143 által kiváltott vazokonstriktiót, a szelektív LPA_3 gátlószer DGPP-nek nem volt rá hatása.

A VPC31143 okozta vazokonstrikció elmaradt LPA₁ KO állatok ereiben, míg az LPA₂ KO egerek aortája a WT-akéhoz hasonló választ mutatott. Ez arra enged következtetni, hogy a vazokonstrikcióért az LPA₁ receptor felelős.

Az LPA₃ szerepét részletesebben vizsgálva teszteltük a T13 vegyületet, mely 10 nM nagyságú dózisban szelektív LPA₃ agonista, nagyobb koncentrációk azonban más LPA receptorokat is aktiválnak. A T13 10 nM koncentrációban alkalmazva nem váltott ki kontrakciót LPA₁ CTRL állatok AA szegmentjeiben, nagyobb koncentrációk alkalmazása azonban dózis-függő vazokonstrikciót eredményezett. Ez a hatás nem volt jelen LPA₁ KO erekben, mely alátámasztja hipotézisünket, mely szerint a vazokonstrikciót egyedül az LPA₁ receptor szabályozza.

4.3. Az LPA₁-függő vazokonstrikció jelátvitelének azonosítása

Az irodalomból ismert, hogy az LPA jelátvitel kapcsolatosan állhat a prosztanoid rendszerrel. A korábban leírt COX1-függő LPA hatások, valamint a megfigyelés alapján, hogy a tengeri malac ileum longitudinális simaizmaiban kiváltott LPA-függő kontrakció indometacinnal gátolható volt, állítottuk fel hipotézisünket, mely szerint a potens vazokonstriktor prosztanoid TXA₂ szerepet játszhat az LPA₁-függő vazokonstrikcióban. Ennek tesztelésére WT, COX1 KO és TP KO egerek erein alkalmaztuk a VPC31143-at 10 µM-os koncentrációban. A COX1 és a TP hiánya szignifikánsan lecsökkentette a VPC31143-ozokta kontrakciót, alátámasztva, hogy a COX1 által termelt TXA₂, hatva receptorán, a TP-n, lehet felelős (legalábbis részben) a vizsgált vazokonstrikcióért.

Annak érdekében, hogy a konstriktor mediátor TXA₂ jelenlétét igazoljuk, 2 percig VPC31143-mal inkubált erek felülúszóiban mértünk a TXB₂, a TXA₂ egy hosszabb felezési idejű metabolitjának, a koncentrációját. A VPC31143 kezelés WT erekben több mint kétszeresére emelte a TXB₂ termelést, mely hatás hasonlóan LPA₂ KO állatok esetében is jelen volt. LPA₁ KO egerek ereiben azonban az agonista nem változtatta meg az alap TXB₂ termelést.

COX1 KO állatok aortáiban alacsonyabb volt az alap TXB₂ termelés és ez nem emelkedett tovább a VPC31143 alkalmazásával sem. A TP receptor hiányának azonban nem volt hatása sem az alap, sem a VPC31143 által stimulált TXB₂ termelésre. A fenti eredmények egybe vágnak hipotézisünkkel, mely szerint az LPA₁-függő COX1 aktiváció TXA₂ termelődéséhez vezet, mely a TP receptoron hatva a vaszkuláris simaizom összehúzóását idézi elő.

Az irodalomból ismert, hogy az LPA₁ gyakran aktiválja a Gα_{i/o} fehérjét, valamint, hogy a Gα_{i/o} aktiválhatja a PLA₂-t és TXA₂ termelést idézhet elő. A következőkben ennek a jelenségnek a lehetséges szerepét vizsgáltuk az LPA₁-indukálta vazokonstriktióban. Hipotézisünknek megfelelően WT erek PTX-nal való előkezelése csökkentette a VPC31143-által kiváltott TXB₂ termelés növekedését. Továbbá, a PTX előkezelés csökkentette WT állatok ereiben a VPC31143 által kiváltott vazokonstriktiót.

Ezen kívül megvizsgáltuk, hogy simaizom-kontrakció két, az irodalomban jól ismert regulátora, a Gα_{q/11}, és a Gα_{12/13}, bírnak-e valamilyen szereppel Simaizom specifikus Gα_{q/11} KO és Gα_{12/13} KO állatok ereiben lecsökkent a VPC31143 okozta kontrakció azonban nem tűnt el teljesen.

4.4. Az S1P vazoaktív hatása más konstriktorok jelenlététől függ

Kísérleteink következő szakaszában a másik széles körben kutatott lipid mediátor S1P vazoaktív hatásait vizsgáltuk. Ha az S1P-t alaptónusra alkalmaztuk WT állatokban a hatás elhanyagolható nagyságú volt mind thoracalis mind abdominalis aortaszegmentek esetében. Az endothelium eltávolítása nem befolyásolta a hatást. Azonban PE-előfeszítést követően endothel-irtott szegmentekben az S1P markáns vazokonstriktiót okozott. Bár az S1P önmagában nem befolyásolta az értónust, egy másik konstriktor jelenlétében azonban vazokonstriktiót okozott. Figyelembe véve, hogy fiziológiás körülmények között a vérkeringésben számtalan mediátor (konstriktor és dilatátor) van jelen, melyek az értónust szabályozzák, a fent említett jelenségnek in vivo szerepe lehet kardiovaszkuláris szabályzó-mechanizmusokban.

Figyelembe véve az S1P egyedüli alkalmazásának elhanyagolható nagyságú hatását, megvizsgáltuk, hogy az S1P hatással van-e más vazokonstriktorok által kiváltott kontrakcióra. E célból az α_1 adrenerg agonista PE által 100 nM koncentrációban kiváltott kontrakciókat vizsgáltuk intakt endotheliummal rendelkező WT TA érszakaszokban S1P alkalmazása előtt és után.

Húsz perces inkubáció 5 μ M koncentrációjú S1P-vel 40 perc elteltével közel másfélszeresére emelte a PE által kiváltott kontrakciók nagyságát és ez a hatás 180 percig fennmaradt. Ezzel ellentétben az oldószerként funkcionáló, 0,3 N-os NaOH-val való inkubációnak nem volt hatása a PE által kiváltott vazokonstriktióra.

4.5. Az S1P potencírozó hatásáért felelős receptor azonosítása

Ezután szeretnénk volna azonosítani a receptort mely a PE indukálta kontrakció S1P-függő erősödéséért felelős. Először is meghatároztuk mely S1P receptorok fejeződnek ki egér TA simaizomsejtjeiben. WT mintákban az S1P₁, S1P₂, S1P₃ és S1P₄ receptorok mRNS-e volt detektálható és ezek közül az S1P₁ a legnagyobb mennyiségben.

Ezután genetikai módszerekkel vizsgáltuk a különböző receptorok szerepét. Teszteltük S1P₂ KO és S1P₃ KO állatok ereit, ahol is azt tapasztaltuk, hogy az S1P₃ hiánya nem volt befolyással az S1P okozta potencírozó hatásra, azonban az S1P₂ KO egerek ereiben a 20 perces S1P-vel való inkubáció utáni PE okozta kontrakció-erősödés elmaradt.

5. Következtetések

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy az EDG-típusú lizofoszfolipid receptorok hatással vannak-e az értónusra. Eredményeink alapján a következő főbb következtetéseket vonhatjuk le:

- Az EDG-típusú lizofoszfatsav (LPA) receptorok aktiválódása dózis-függő vazorelaxációt okoz intakt egér aortában, ami endothelium-függő de nem proszتانoid mediátorok által közvetített.
- Endothelium hiányában az EDG-típusú LPA receptor agonista VPC31143 dózis-függő vazokonstriktációt okozott, ami kifejezettebb volt az abdominalis aortában. A hatást a simaizomsejtekben viszonylag nagy mennyiségben expresszálandó LPA_1 receptor közvetíti. A VPC31143 hatása G_i és COX1 aktivációhoz kötött TXA_2 felszabadulással jár, mely receptorán (TP) hatva okoz vazokonstriktációt. A $G_{\alpha_{q/11}}$ és $G_{\alpha_{12/13}}$ fehérjék szintén szerepet játszanak folyamatban, valószínűleg a TP-től downstream.
- Szingozin 1-foszfáttal (S1P) való expozíció az α_1 adrenoreceptorok által közvetített vazokonstriktor hatás tartós fokozódását okozza egér aortában, mely hatást a simaizomban expresszálandó EDG-típusú $S1P_2$ receptor közvetíti.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények listája

Ruisanchez, E., **Dancs, P.**, Kerek, M., Nemeth, T., Farago, B., Balogh, A., Patil, R., Jennings, B. L., Liliom, K., Malik, K. U., Smrcka, A. V., Tigyi, G., and Benyo, Z.: Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J.* 2014 Feb; 28(2): 880-90 (**IF: 5,043**)

Dancs, P. T., Ruisanchez, E., Balogh, A., Panta, C. R., Miklos, Z., Nusing, R. M., Aoki, J., Chun, J., Offermanns, S., Tigyi, G., and Benyo, Z.: LPA1 receptor-mediated thromboxane A2 release is responsible for lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle contraction. *FASEB J.* 2017 Apr; 31(4): 1547-1555 (**IF: 5,595**)

6.2. A disszertációtól független közlemények listája

Iring, A., Jin, Y.-J., Albarrán-Juárez, J., Siragusa, M., Wang, S., **Dancs, P. T.**, Nakayama, A., Tonack, S., Chen, M., Künne, C., Sokol, A. M., Günther, S., Martínez, A., Fleming, I., Wettschurek, N., Graumann, J., Weinstein, L. S., and Offermanns, S.: Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest.* 2019 Jun; 129(7): 2775-2791 (**IF: 12,282**)

