

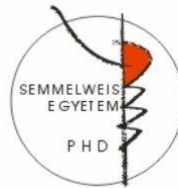
# G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálata eukarióta sejtekben

Doktori tézisek

**Dr. Szalai Bence**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Herényi Levente, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szakács Gergely, Ph.D., tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Gyires Klára, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sperlágth Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2016

## Bevezetés

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok („G Protein-coupled Receptor”, GPCR) a plazmamembrán receptorok egyik legnépesebb családját alkotják. Jelentőségüket mutatja, hogy gyakorlatilag minden eukarióta élőlényben megtalálhatóak, a humán genomban több mint 1000 gén kódol GPCR-t. Számos fontos fiziológiás mechanizmus, mint például a szenzoros működések, a neurotranszmisszió, a hormonális szabályozás és az immunreguláció közvetítésében is alapvető szerepet játszanak. Ligandjaik között eltérő kémiai természetű molekulák fordulnak elő, kezdve az ionoktól, a lipideken, nukleotidokon, biogén aminokon keresztül a peptidekig és glikoproteinekig, de a fény észlelése is GPCR-okon keresztül történik. Orvosbiológiai jelentőségüket alátámasztja, hogy a jelenleg használt gyógyszerek közel fele GPCR-okon keresztül fejti ki hatását.

Az elmúlt két évtized eredményei arra utalnak, hogy a GPCR-ok képesek dimereket vagy magasabb rendű oligomereket képezni. Dimer létrejöhet két azonos receptor között (homodimerizáció), illetve különböző receptorok között is (heterodimerizáció). A dimerizáció befolyásolhatja a receptorok ligandkötését, konformációját, interakcióját a különféle effektor fehérjékkel (heterotrimer G-fehérjék, arresztinek), ezáltal a receptorok jelátvitelét és internalizációját, vagyis a receptorműködés gyakorlatilag teljes spektrumát. A megváltozott jelátvitel fontos élettani és kórélettani jelentőséggel bírhat, a szövetspecifikus receptor heterodimerek szelektív farmakológiai befolyásolása pedig kedvezőbb hatás-mellékhatás profilú gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethet.

A GPCR-ok dimerizációjával foglalkozó kutatások alapvetően két csoportba oszthatóak: egyrészt a dimerizációnak, mint közvetlen protein-

protein interakciónak a kimutatását célzó, másrészt a dimerizáció funkcionális, a jelátvitelre gyakorolt következményeit vizsgáló munkákra. Fontos megjegyezni, hogy mindkét esetben számos probléma nehezíti meg a dimerizáció megbízható kimutatását. A közvetlen, fizikai interakció kimutatásánál a valódi dimerizációnak az aspecifikus kapcsolatoktól való elkülönítése okoz nehézséget. A jelátvitelre gyakorolt hatások vizsgálatánál pedig annak eldöntése problémás sok esetben, hogy azok valóban a dimerizáció következményei, vagy csak a receptorok jelátvitelében létrejövő átbeszélés („crosstalk”) hatására jönnek létre.

Bár a GPCR-ok dimerizációjának ténye mára általánosan elfogadott, még számos nyitott kérdés található a területen. Sem a dimerizáció strukturális hátteréről, sem a dimeren belüli kölcsönhatások mechanizmusáról nem alakult még ki egységes kép az irodalomban. Emellett a különböző receptor heterodimerek megbízható kimutatása is alapvető fontosságú kérdésnek tekinthető, hiszen ezek a későbbiek során új típusú gyógyszer-célpontokat jelenthetnek.

## Célkitűzések

Ph.D. munkám során a laboratóriumunkban vizsgált GPCR-ok dimerizációjának kimutatásával és a dimerizáció funkcionális következményeinek vizsgálatával foglalkoztam. Kísérletes munkám főbb célkitűzései a következők voltak:

- Az 1-es típusú angiotenzin receptor ( $AT_1R$ ) homodimerizációjának kimutatása kvantitatív BRET módszerrel
- Az  $AT_1$  receptorban létrejövő konformációváltozások közvetlen vizsgálatát lehetővé tevő BRET alapú receptor-bioszenzor létrehozása
- Az  $AT_1$  receptor homodimerizációjának a  $\beta$ -arresztin2 kötésre, a receptorkonformációra és a ligandkötésre gyakorolt hatásainak vizsgálata
- Az  $AT_1$  receptor homodimeren belüli interakciók molekuláris mechanizmusának vizsgálata
- Olyan kvantitatív BRET alapú módszer beállítása, mellyel a klasszikus módszernél nagyobb biztonsággal detektálható a különféle GPCR-ok dimerizációja

## Módszerek

### Plazmid konstrukciók

A BRET kísérleteinkben használt GPCR-ok C-terminális végéhez *Renilla* luciferáz enzim, illetve különböző fluoreszcens fehérjék (sárga fluoreszcens fehérje – YFP, Venus) voltak fuzionálva. A receptorkonformációra érzékeny AT<sub>1</sub>R-BS szenzor elkészítéséhez az AT<sub>1</sub>R 3as intracelluláris hurok régiójába YFP molekulát építettünk be, míg a C-terminálishoz *Renilla* luciferázt kapcsoltunk. A mutáns (DRY/AAY és TSTS/A) AT<sub>1</sub> receptorokat irányított mutagenézis segítségével készítettük el.

A receptorok arresztin kötését C-terminálisan *Renilla* luciferázzal jelölt  $\beta$ -arresztin2 segítségével vizsgáltuk. A plazmamembránhoz irányított fluoreszcens és lumineszcens fehérjék esetén a Lyn kináz N-terminális szekvenciáját és a kRas fehérje CAAX doménjét használtuk irányítószekvenciaként. Az indukálható heterodimerizációs rendszerben az FRB és FKBP fehérjedoméneket kapcsoltuk a plazmamembránhoz targetált fluoreszcens/lumineszcens fehérjékhez.

### Sejttenyészetek fenntartása és transzfektálása

Kísérleteinkben CHO („chinese hamster ovarium”) és HEK293 („human embryonic kidney”) emlős sejt vonalakat használtunk. A sejt vonalakat 10%-os magzati borjúsérumot valamint penicillint és streptomycint tartalmazó Ham’s F12 (CHO), illetve DMEM (HEK293) médiumban tartottuk fenn.

A CHO sejteket a kísérletek előtt két nappal 6 lyukú szövettenyésztő lemezekre osztottuk  $5 \cdot 10^5$  sejt/lyuk sűrűségben, majd a

kísérletet megelőző napon Opti-MEM médiumban Lipofectamin2000 transzfekciós reagens segítségével transzfektáltuk. A HEK293 sejteket a kísérleteket megelőző napon felszedtük, majd Opti-MEM médiumban, Lipofectamin200 segítségével transzfektáltuk és 96 lyukú fehér szövettenyésztő lemezekre helyeztük 75000 sejt/lyuk sűrűségben. A transzfektálást 6 órával követően a médiumot minden esetben a sejteknek megfelelő komplett médiumra cseréltük.

### **Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések**

Kísérleteink során a receptorkonformáció megváltozását, az AT<sub>1</sub> receptor  $\beta$ -arresztin2 kötését, valamint a különböző GPCR-ok közti interakciókat a biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) módszerével vizsgáltuk. A BRET egy energiatranszfer módszer, lényege egy biolumineszcens donor, és egy fluoreszcens akceptor molekula közti közvetlen, fénykibocsátás nélküli energia átadás, melynek feltétele a donor- és az akceptormolekulák megfelelő közelsége (<10 nm). Kísérleteinkben a donormolekula a *Renilla* luciferáz (Rluc) volt, mely szubsztrátját a cölenterazint oxidálja, ami 485 nm emissziós maximumon fénykibocsátáshoz vezet. Az akceptormolekula kísérleteinkben egy sárga fluoreszcens fehérje (YFP vagy Venus) volt. Amennyiben az akceptor és a donor megfelelő közelségben vannak, létrejön az energiatranszfer, amit akceptor emissziós maximumán (530 nm-en) fokozódó fénykibocsátás jelez. A

$$BRET_{\text{hányados}} = \frac{Emisszió_{530 \text{ nm}}}{Emisszió_{485 \text{ nm}}}$$

képlet alapján számolható BRET hányados jól jelzi a donor és az akceptor molekuláris közelségét.

BRET kísérleteinket 24 órával a transzfekciót követően végeztük 37°C-on, Mithras LB940 (Berthold), illetve Varioskan Multimode Reader (Thermo Scientific) készülékekkel.

### **Liganddisszociáció mérése**

A  $^{125}\text{I}$  radioizotóppal jelölt angiotenzin II disszociációját 24 órával a transzfekció után vizsgáltuk, 4°C-on, hogy gátoljuk a receptorok jelátvitelét és internalizációját. A CHO sejtek médiumát 0,5 ml HEPES-sel pufferelt Ham's F-12 médiumra cseréltük, mely 0,01 nM végkoncentrációban tartalmazta a jelölt ligandot. 2 óra inkubáció után a sejteket kétszer 1 ml PBS oldattal mostuk, így a receptorhoz nem kötött radioaktív ligandot eltávolítottuk. A liganddisszociációt kontroll körülmények között, illetve 1  $\mu\text{M}$  jelöletlen angiotenzin II jelenlétében mértük. A megfelelő idő elteltével a sejteket ismét 2x1 ml PBS oldattal mostuk, a disszociált radioligand eltávolítása céljából, majd 0,5 M NaOH és 0.05% SDS keverékével szolubilizáltuk. A kötött radioaktivitást  $\gamma$ -spektrometriával (Wallac 1470 WIZARD) detektáltuk.

### **Monte Carlo szimulációk**

A szimulációkat egy kétdimenziós, 100x100-as, hatszögekből álló membránon végeztük. A donor és akceptor molekulákat monomerként, véletlenszerűen helyeztük el a membrán üres hatszögein. A teljes donor+akceptor számot 200 és 2000 között változtattuk az egyes szimulációkban. A molekulák minden szimulációs lépésben mozoghattak, illetve egymással dimert képezhettek. A mozgás során a periodikus határfeltétel koncepcióját alkalmaztuk, azaz a membránt az egyik szélén elhagyó molekula az átelles oldalán visszaérkezett. A mozgás során az egyes molekulák a szomszédos 6 hatszög egyikére léphettek,

véletlenszerűen. Amennyiben a kiválasztott pozícióban egy másik molekula tartózkodott, a lépést elvetettük, és nem ismételtük meg újra. A dimerek mozgása során feltétel volt, hogy mindkét molekula szabad hatszögre érkezzon, illetve a mozgási lépés során a dimerek nem eshettek szét. A dimerek ezáltal egy irányba mozdíthatnak, és/vagy foroghatnak egymás körül. A mozgás mellett a molekulák dimert képezhetnek, illetve a dimerek monomerekre eshettek szét az egyes iterációs lépésekben. A monomer molekulák szomszédos monomerekkel képezhetnek dimert, egy bizonyos  $p_{\text{asszociáció}}$  valószínűséggel, mely függött a molekulák típusától (donor-donor, donor-akceptor, akceptor-akceptor pár). A dimerek az őket alkotó alegységek típusától függő  $p_{\text{disszociáció}}$  valószínűséggel eshettek szét az egyes lépések során. A szimulációt 1000 lépésen keresztül futtattuk, majd a szomszédos donor-akceptor párok száma alapján kiszámoltuk a szimulált BRET hányadost. A szimulációk során a specifikus és nem-specifikus kapcsolatot a  $p_{\text{asszociáció}}$  és a  $p_{\text{disszociáció}}$  változtatásával modelleztük. A szimulációkat Python 2.7 programnyelvben írtuk.

### **Az adatok kiértékelése és statisztikai analízise**

Az adatok kiértékelését és az ábrák készítését GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software) segítségével végeztük. A csoportok közti különbségeket két szempontos varianciaanalízissel, majd Bonferroni féle post-hoc teszttel vizsgáltuk. A statisztikai analízis során a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.



## Eredmények

Doktori ösztöndíjasként a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatásával, illetve a dimerizáció funkcionális következményeinek vizsgálatával foglalkoztam.

Kísérleteinkben az I-es típusú angiotenzin receptor ( $AT_1R$ ) homodimerben, mint modellrendszerben vizsgáltuk az alegységek közötti interakciók következményét, illetve az ezek háttérében álló molekuláris mechanizmusokat. Egy antagonistá rezisztens  $AT_1$  receptort alkalmazva létrehoztunk egy olyan rendszert, mely segítségével szelektíven tudtuk stimulálni az  $AT_1R$  homodimer egyik alegységet, majd vizsgálni a másik alegység aktiváltsági állapotát. A nem-stimulált alegység aktiváltsági állapotát a receptor  $\beta$ -arresztin2 kötésén keresztül, illetve egy konformáció szenzitív receptor-bioszenzor ( $AT_1R$ -BS) segítségével, BRET alapú módszerekkel vizsgáltuk.

Eredményeink alapján az  $AT_1R$  homodimer egyik alegységének stimulálása a másik alegység megváltozott konformációjához, és  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez vezet. A különböző  $AT_1R$  mutánsokkal végzett kísérleteink alapján ezen hatások létrejöttéhez szükséges a stimulált receptor konzervált DRY régiójának épsége.

A dimeren belüli interakciókat liganddisszociációs kísérletekkel is vizsgáltuk. Kísérleteinkben a  $^{125}I$  izotóppal jelölt angiotenzin II disszociációját fokozta a nagy koncentrációban adott jelöletlen angiotenzin II. Ennek az úgynevezett negatív kooperatív ligandkötésnek a háttérében a legelfogadottabb magyarázatok szerint a dimeren belüli allosztérikus interakciók állnak. Amennyiben kísérleteinket DRY/AAY mutáns receptorokat expresszáló sejtekkel végeztük el, nem tapasztaltunk negatív

kooperatív agonistakötést, ami korábbi kísérleteinkkel összhangban arra utal, hogy a dimeren belüli interakciókhoz szükséges a DRY szekvencia megléte.

További kísérleteinkben a  $V_2$  vazopresszin receptor egyéb GPCR-okkal való dimerizációját vizsgáltuk a dimerizáció kimutatására az irodalomban leggyakrabban használt kvantitatív BRET (kBRET) módszerrel. E módszer lehetőséget ad a valódi, specifikus dimerizációnak a nem-specifikus, csak a vizsgált receptorok véletlenszerű mozgásából származó interakciótól történő elkülönítésére. A kBRET kísérletek során állandó mennyiségű energia donorral jelölt receptort mellett az akceptorral jelölt receptor mennyiségét növelik, majd a BRET hányadost az akceptormennyiség/donormennyiség hányados függvényében ábrázolják. Nem-specifikus interakció esetén ez az ábrázolási mód lineáris összefüggéshez, míg specifikus interakció (dimerizáció) esetén telítési görbéhez vezet.

A  $V_2$  receptor dimerizációját vizsgálva  $AT_1$ ,  $\beta_2$  adrenerg ( $\beta_2$ AdR) és CB1 cannabinoid ( $CB_1R$ ) és  $V_2$  receptorokkal telítési kBRET görbét tapasztaltunk, mely a receptorok dimerizációjára utal. Megállapítottuk viszont, hogy az alkalmazott kísérleti felállással a donormennyiség nem volt állandóan tartható.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a donormennyiség megváltozása milyen hatással lehet a kBRET görbék lefutására. Monte Carlo szimulációkkal, valamint egy indukálható dimerizációs rendszer segítségével kísérletesen is igazoltuk, hogy a donormennyiség változásai nem-specifikus interakció esetén is telítési kBRET görbékhez vezethetnek. Beállítottunk egy módosított kBRET módszert, mely segítségével változó donor expresszió esetén és megbízhatóan elkülöníthetők egymástól a specifikus és a nem-specifikus interakciók. E módszer segítségével

megerősítettük a  $V_2$  és a kalcium érzékelő receptor (CaSR) homodimerizációját, valamint a  $V_2$  és a  $V_{1a}$  vazopresszin receptorok heterodimerizációját, illetve kimutattuk, hogy a  $V_2$  és a kalcium érzékelő receptorok nem képeznek dimert egymással, illetve a vizsgált  $AT_1$ , II-es típusú angiotenzin ( $AT_2R$ ),  $\beta_2$  adrenerg, és  $CB_1$  receptorokkal. Ereményeink arra utalnak, hogy a (vizsgált) G-fehérjéhez kapcsolt receptorokra általánosan jellemző a homodimerizáció, illetve megerősítik a dimerizáció specifikus jellegét, hiszen a vizsgált 13 receptor-receptor interakció közül csak három bizonyult valódi dimerizációnak.

## Következtetések

Ph.D. munkám során különféle GPCR-ok dimerizációjának kimutatásával, és a dimerizáció funkcionális következményeinek vizsgálatával foglalkoztam. A kísérleti eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

- Kvantitatív BRET mérésekkel megerősítettük, hogy az AT<sub>1</sub> angiotenzin receptor homodimereket alkot.
- Létrehoztunk egy olyan BRET alapú bioszenzort, mely segítségével közvetlenül tudtuk detektálni az AT<sub>1</sub> receptor konformációjának megváltozását.
- Igazoltuk, hogy az AT<sub>1</sub>R homodimer egyik alegységének stimulálása a másik alegység csökkent agonista kötési affinitásához, megváltozott konformációjához és  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez vezet
- Eredményeink alapján megállapítható, hogy az AT<sub>1</sub> receptor homodimeren belüli interakciók létrejöttéhez szükséges a stimulált alegység konzervált DRY motívumának épsége.
- Szimulációs illetve kísérletes módszerekkel igazoltuk, hogy a GPCR-ok dimerizációjának vizsgálatában leggyakrabban alkalmazott kvantitatív BRET módszer téves eredményekhez vezethet, amennyiben az energia donorral jelölt receptor expresszióját nem sikerül szigorúan állandó szinten tartani.
- Beállítottunk egy olyan, módosított kvantitatív BRET módszert, mely segítségével pontosabban elkülöníthető a receptorok dimerizációja a nem-specifikus interakcióktól.

- Az általunk beállított módszer segítségével megerősítettük a  $V_2$  vazopresszin és a CaSR kalcium érzékelő receptor homodimerizációját, valamint a  $V_2$  és  $V_{1a}$  vazopresszin receptor heterodimerizációját. Eredményeink alapján a receptorok dimerizációja specifikus folyamat, hiszen a  $V_2R$  és a CaSR receptorok nem dimerizáltak a vizsgált  $AT_1R$ ,  $AT_2R$ ,  $\beta_2AdR$  és  $CB_1R$  receptorokkal.

## **Saját publikációk jegyzéke**

### **Az tézisek alapjául szolgáló közlemények:**

Szalai B, Barkai L, Turu G, Szidonya L, Várnai P, Hunyady L. Allosteric interactions within the AT1 angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 84(4): 477-485  
IF: 4,576

Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, Erdélyi L, Várnai P, Hunyady L. Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e109503  
IF: 3,234

Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, Erdélyi L, Várnai P, Hunyady L. Correction: Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e156824

### **Egyéb közlemény:**

Szekeres M, Turu G, Orient A, Szalai B, Süpeki K, Cserző M, Várnai P, Hunyady L. Mechanisms of angiotensin II-mediated regulation of aldosterone synthase expression in H295R human adrenocortical and rat adrenal glomerulosa cell. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 302(2): 244-253  
IF: 3,503