

Új mechanizmusok az angiotenzin II élettani hatásainak szabályozásában

Az AT1 angiotenzin receptor (AT1R) egy Gq-fehérjéhez kapcsolt receptor, melynek angiotenzin II-vel (AngII) történő aktiválása során a sejtekben Ca^{2+} -jel jön létre. Az elmúlt években egyre több adat jelezte, hogy az AT1R aktiválódásának hatására egy összetett jelátviteli folyamat indul el, melyben a Ca^{2+} -jel kialakulása mellett G-fehérjétől független, illetve a jelátviteli folyamat során felszabaduló hírvivők által közvetített folyamatok is beindulnak. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az AT1R serkentése 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1R) aktiválódást hozhat létre, ha a két receptort azonos sejtekben expresszáljuk. A két receptor a szervezetben gyakran egymás mellett található sejteken expresszálódik, ezért felmerült a kérdés, vajon a transzaktiváció létrejöhet-e parakrin mechanizmussal. A CB1R aktivációjának nyomon követésére Renilla luciferázhoz, illetve sárga fluoreszcens fehérjéhez (YFP) kapcsolt Go-fehérje alegységek disszociációját mértük biolumineszcencia rezonancia energia transzfer (BRET) módszerrel, valamint fluoreszcensen jelzett β -arresztin fehérjék transzlokációját vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal. Méréseink azt mutatták, hogy AT1R serkentése CB1R közvetített Go fehérjeaktivációt hozott létre CHO sejtekben. AT1R aktiválását követően a környező CB1R-t expresszáló sejtekben β -arresztin membránhoz való transzlokációját is megfigyeltük. A CB1R parakrin transzaktivációjának lehetőségét más Gq-fehérjét aktiváló receptorok esetében is vizsgáltuk. Az M1, M3, M5 muszkarinerg acetyl-kolin receptorok, a bradikinin B2 receptor és az $\alpha 1$ adrenerg receptor aktiválását követően is létrejött a Go-fehérjék CB1R-mediált parakrin transzaktivációja. Kúnos György (USA) munkacsoportjával együttműködésben azt is kimutattuk, hogy az AT1R aktiválását követően a sejtekben növekszik az egyik legfontosabb endokannabinoid, a 2-arachidonoilglicerin (2-AG) szintje (Turu és mtsai., J. Biol. Chem. 2009).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e az endokannabinoid-felszabadulás az AngII vazokonstriktor hatásának szabályozásában. Kísérleteinkben patkány gracilis arteriolákat izoláltunk és nyomás szervokontroll rendszerbe helyeztünk. Az érátmérő változásait regisztráltuk AngII, szintén kalcium-felszabadítás útján ható noradrenalin; valamint CB1R agonista WIN55212 hatására. CB1R-ok gátlása (O2050) fokozta az agonisták vazokonstriktor hatását, és gátolta a WIN55212 hatására létrejövő vazodilatációt. A CB1R-ok gátlásának kontrakció fokozó hatása CB1R génhiányos egerek ereiben elmaradt. DAG-lipáz gátlása fokozta az AngII vazokonstriktor hatását, ami alátámasztja azt a hipotézisünket, hogy a CHO sejtekben leírt modellhez hasonlóan érfal simaizomsejtekben az AngII jelátvitelénél keletkező DAG-ból 2-AG képződik, mely modulálja az AngII vazokonstriktor hatását. Szintén összhangban van ezzel a következtetéssel, hogy nitrogén-monoxid (NO)-szintáz gátlása nem befolyásolta az Ang II által kiváltott vazokonstriktort és a WIN55212 vazodilatátor hatását ezekben az erekben. Takáts Zoltán (Simmelweis Egyetem, I. Gyermekgyógyászati Klinika) munkacsoportjával együttműködésben azt is kimutattuk, hogy aorta vaszkuláris simaizomsejtekben AngII hatására növekszik a 2-AG szintje. E megfigyeléseink alapján megállapítható, hogy az AngII hatására az érfal simaizomsejtjeiben keletkező 2-AG jelentősen modulálja (csökkenti) az AngII vazokonstriktor hatását. E mechanizmus élettani jelentősége abban állhat, hogy az értónus komplex szabályozási rendszerében a lokálisan keletkező endokannabinoidok vazodilatátor védő hatása állandóan jelen van. Eredményeinket előadásokon prezentáltuk (Szekeres és mtsai., Acta Physiol. Hung. 2010; Hunyady és mtsai. 2011), illetve közlésre benyújtottuk.

Szintén megvizsgáltuk, hogy szerepe van-e az AngII hatására keletkező endokannabinoidoknak a mellékvesekéreg glomerulosa sejtek működésének szabályozásában. Ismeretes, hogy magas K^+ -koncentrációval glomerulosa sejtekben feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon keresztül kalcium beáramlást vált ki, és ez a válasz AngII kezeléssel gátolható.

Megvizsgáltuk vajon a CB1R antagonistá AM251 befolyásolja-e az AngII-nek ezt a hatását. Kísérleteinkben patkány mellékveséből preparált glomerulosa sejteken az extracelluláris K^+ -koncentráció 18 mM-ra emelésével kalcium jelet váltottunk ki, amit Fura2 segítségével detektáltunk DeltaScan fluoreszcens spektrofotométerrel. A kiváltott kalcium jelet AngII adása 20 s alatt kontroll szintre csökkentette. CB1R antagonistá AM251 (10 μ M), illetve DAG-lipáz gátló THL (1 μ M) előkezelés nem befolyásolta ezt a gátlást. CB1R agonista 2-AG (26 μ M) és WIN55,212-2 (1 μ M) kezelés sem befolyásolta a K^+ által létrehozott Ca^{2+} -jelet. Eredményeink arra utalnak, hogy a K^+ által létrehozott Ca^{2+} -jel AngII hatására létrejövő gátlása glomerulosa sejtekben nem kannabinoid receptorokon keresztül jön létre.

Két modellben vizsgáltuk az endokannabinoid-felszabadulás szerepét az AngII centrális hatásainak létrehozásában. Gyires Klára (Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet) munkacsoportjával együttműködésben azt találtuk, hogy intracerebroventrikulárisan adott AngII (12,5-200 ng) szignifikánsan gátolta az alkohol-indukált gyomorfekély-képződést. Az AngII gyomorvédő hatását AT1R gátló (candesartan), CB1R gátló (SR141716A) és DAG-lipáz gátló (tetrahidrolipstatin) gátolta, ami arra utal, hogy ezt a folyamatot is az AngII hatására felszabaduló 2-AG közvetíti. CB1R-KO egérben az AngII gyomorvédő hatása csökkent volt, ami megerősíti az endokannabinoidok szerepét ebben a folyamatban. E kísérletek eredményeit előadásban ismertettük (Zádori és mtsai, 2011), illetve az adatok közlemény formájában történő benyújtása előkészítés alatt áll. Bagdy György (Semmelweis Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani Intézet) munkacsoportjával együttműködésben azt is kimutattuk, hogy a nucleus paraventricularis-ba adott Ang II perifériás vérnyomásemelő hatását CB1R gátló (AM251) kivédi. Eredményeink arra utalnak, hogy az AT1R aktiválódás hatására kialakuló endokannabinoid képződés ebben a folyamatban is szerepet játszik (Gyombolai és mtsai., Mol. Cell. Endocrinol. 2012).

Az AngII mellékvesekéreg sejtekre gyakorolt génszintű hatásainak megismerésére humán adrenokortikális sejtvonalon (H295R) az Ang II-indukálta gének expresszióját génchip (HG U133 plus 2.0 Affymetrix mikrochip) analízissel vizsgáltuk Buday Lászlóval (Semmelweis Egyetem) és Adrian J. L. Clark (London) munkacsoportjával együttműködésben. 2 óra Ang II kezelés mintegy 150 gén expressziójának legalább kétszeres növekedését eredményezte. Ezen gének között számos transzkripciós faktor, onkogén, néhány citokin és növekedési faktor is szerepel, melyek aktivációja szerepet játszhat az Ang II növekedést, sejtproliferációt aktiváló és gyulladáskeltő hatásában is. Az egyik Ang II-indukált gén a neurotrofinok családjába tartozó agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) volt. Az Ang II hatását a BDNF expresszióra RT-PCR vizsgálattal, és a fehérje kimutatásával is megerősítettük. A BDNF funkciójának azonosítása a mellékvesekéregben további vizsgálatokat igényel. Szerepe lehet a lokális idegek fejlődésében, valamint a szteroidogénus sejtek növekedésében, működésében és az angiogenezisben is (Szekeres és mtsai., Endocrinology 2010).

A génexpresszió szabályozásában szerepet játszó szekvenciák azonosítására bioinformatikai megközelítést is alkalmaztunk. Statisztikai megközelítéssel alulreprezentált szekvenciákat kerestünk a genomban, és így 20-25 bázisból álló szekvenciákat azonosítottunk, melyek a transzkripció iniciáció környékén halmozottan fordulnak elő. Bár e szekvenciák funkcionális szerepe még nem ismert, jelentőségüket alátámasztja, hogy előfordulásuk a humán és az egér genomban jelentősen (75%) konzervált (Cserző és mtsai., Biol. Direct 2010).

Az AT1R jelátviteli folyamatának fontos eleme a Ras és más kis G-fehérjék aktiválása. Ennek vizsgálatára olyan bioszenzorokat hoztunk létre, melyek segítségével BRET módszerrel élő sejtekben lehet nyomon követni e jelátviteli mechanizmust. E bioszenzorok segítségével nem csak a plazmamembránban, hanem a transz-Golgi hálózatban és az

endoplazmatikus retikulumban is sikerült Ras aktiválódást kimutatni. Mutáns és vad típusú AT1R-ok felhasználásával megállapítottuk, hogy az AngII hatására létrejövő intracelluláris Ras aktiválódás HEK293 sejtekben nem az internalizálódott receptorokról elinduló jelátvitel vagy az EGF receptor transzaktivációjának eredménye, hanem G-fehérjétől függő jelpályákon keresztül jön létre (Balla és mtsai., J. Biol. Chem. 2011).

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az AT₁-R aktiválódása során megváltozik-e a receptor lokalizációja a plazmamembrán különböző mikrodoménjeiben, mielőtt a receptor internalizálódik. Sárga fluoreszcens fehérjével (YFP) jelölt, membrán mikrodoméneket jelző fluoreszcens bioszenzorokat hoztunk létre, és BRET mérésekkel élő sejtekben követtük nyomon Renilla luciferázzal jelölt receptorok eloszlását. Kimutattuk, hogy az AT1R serkentését követően a receptor eloszlása a plazmamembrán fénymikroszkóppal fel nem oldható mikrodoménjeiben megváltozik: a mirisztoil és palmitoil (MyrPalmYFP) csoporttal kihorganyzott bioszenzor jelentős BRET interakciót mutatott az AT1R-ral nyugvó sejtekben, mely interakció AngII hatására csökkent. Ez arra utal, hogy az AT1R AngII hatására a koleszterin- és szfingolipid-gazdag lipid mikrodoménékből („lipid-raft”) más kompartmentekbe helyeződik át mielőtt receptor-mediált endocitózissal a sejt belsejébe kerülne. Ezt az áthelyeződést igazoltuk olyan plazmamembrán bioszenzor segítségével (KR-YFP), mely a plazmamembrán rendezetlen („disordered” vagy „non-raft”) mikrodoménjében helyezkedik el, mivel a KR-YFP és AT1R-luciferáz jelentősen emelkedett BRET interakciót mutatnak AngII hatására az internalizáció előtt (Balla és mtsai. J. Biol. Chem. 2012).

Az AngII hatásmechanizmusában fontos szerepet játszik a mitokondriumok Ca²⁺ felvétele, mely fokozza az ATP termelést, és befolyásolja a citoszol Ca²⁺-jel alakulását. A mitokondriális Ca²⁺-felvétel sebessége a mitokondriális membránpotenciál és a perimitokondriális Ca²⁺-koncentráció függvénye. Kísérleteinkben a Ca²⁺-felvétel eddig nem ismert szabályozó tényezőit azonosítottuk. Kimutattuk, hogy az endoplazmás retikulumtól (ER) távoli mitokondriumok a közeliéhez képest hiperpolarizáltak. AngII hatására a Ca²⁺-felvétel az ER és mitokondrium között létrejövő magas Ca²⁺ koncentrációjú mikrodoménékből történik. Ezzel ellentétben a plazmamembránon keresztül történő fiziológiás mértékű (feszültség-aktivált) Ca²⁺-belépés alatt a mitokondriális Ca²⁺-felvétel térbelileg nem korlátozott és a citoszol szubmikromoláris Ca²⁺-koncentrációja esetén is létrejöhethet [Spät és mtsai. Acta Physiol. (Oxf.) 2009]. AngII-vel serkentett H295R adrenokortikális sejtben a p38MAPK és egy u.n. új típusú (novel) protein-kináz C izoforma egyidejű aktiválása (utóbbi a protein-kináz D aktiválásán keresztül) gátolja a mitokondrium Ca²⁺ felvételét. E gátlásnak szerepe lehet a mitokondrium Ca²⁺-túlterhelésének, és így a sejthalál kivédésében (Koncz és mtsai., Cell Calcium 2009).

Ca²⁺-mobilizáló agonistával serkentett HEK293T sejtekben a Ca²⁺-válasszal egyidejű Mg²⁺-jelet figyeltünk meg. A Mg²⁺-jelet részben az okozza, hogy a Ca²⁺ a citoplazmatikus kötőhelyekről a Mg²⁺-ot leszorítja. Emellett az IP₃ hatására belső raktárakból is szabadul fel Mg²⁺. Az intracelluláris ATP-bomlás nem bizonyult jelentős Mg²⁺-forrásnak. Permeabilizált HEK293T sejtekben a Mg²⁺ a fiziológiás [Mg²⁺] tartományban koncentrációfüggően gátolja a mitokondrium Ca²⁺-felvételét, de az ionleadásra nincs hatással (Szanda és mtsai., Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 2009). A mitokondrium Ca²⁺-felvételének szelektált növelésével (*p38 MAPK* vagy *OPAI* csendesítés) vagy csökkentésével (mt-S100G heterológ expressziójával) megerősítettük azokat a korábbi megfigyeléseinket, melyek szerint a mitokondrium matrix [Ca²⁺] emelkedés és nagy valószínűséggel a következményes mitokondriális NADPH képződés potenciózza a citoszol Ca²⁺-jel aldosteron-termelést serkentő hatását (Spät és mtsai. Cell Calcium 2012).

Tekintettel a renin-angiotenzin rendszer gátlásának terápiás jelentőségére az elvégzett munka eredményei támpontul szolgálnak az AT1R blokkolók és az angiotenzin konvertáló enzim gátlók hatásainak és mellékhatásainak jobb megértéséhez. Az eredmények gyakorlati

hasznosítása szempontjából az is lényeges, hogy a jelátviteli folyamatok nyomon követésére kifejlesztett rezonancia energiatranszferen alapuló módszerek továbbfejleszthetők nagy számú vegyület hatásának „high-throughput” vizsgálatára. A pályázat megvalósítása során több összefoglaló közleményt közzeltünk, melyekben eredményeink gyakorlati vonatkozásait, illetve klinikummal való kapcsolatát is igyekeztünk feltárni. Bagdy György munkacsoportjával együttműködésben felvetettük a genetikai háttér jelentőségét az endokannabinoid rendszerben rejlő terápiás lehetőségek kihasználásában. A közleményben felvetett genetikai mintázatok vizsgálata alapján egyénre szabott módon lehetőség nyílt a CB1R gátlók alkalmazására egyes betegcsoportokban (Lazáry és mtsai., Trends Pharmacol. Sci. 2011). Összefoglaló közleményben ismertettük a CB1R eddig megismert jelátviteli folyamatait (Turu és mtsai., J. Mol. Endocrinol. 2010), valamint Ligeti Erzsébet munkacsoportjával együttműködésben elemeztük a jelátviteli folyamatok leállításának mechanizmusait, illetve azok élettani jelentőségét [Ligeti és mtsai. Acta Physiol. (Oxf.) 2012].