

KARAKTERIZACIJA MORFOLOŠKIH SPREMEMB CELIC HEK-293 TRANSFECIRANIH Z MUTANTNIMI OBLIKAMI RECEPTORJA ZA GRELIN (GHS-R1a) Z OSLABLJENO SPOSOBNOSTJO VEZAVE LIGANDA ALI AKTIVACIJO SEKUNDARNEGA SPOROČILNEGA SISTEMA

Špela Vidrih, Valentina Kubale Dvojmoč*

Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

valentina.kubaledvojmoc@vf.uni-lj.si

Eden izmed tarčnih kandidatov za razvoj zdravila, ki bi vplivalo na zmanjšanje apetita je sedemtransmembranski receptor (7TM-R) za grelin (GHS-R1a). V raziskavi smo proučili vpliv posameznih aminokislinskih ostankov v tretjem in šestem transmembranskem območju receptorja, ki imajo vpliv na aktivacijo sekundarnega sporočilnega sistema v celici ali pa na sposobnost vezave liganda. Ugotavljali smo vpliv spremenjenih lastnosti receptorjev na obliko, velikost celic, razporeditev ter prerazporeditev citoskeleta ter vlogo posameznih G-proteinov pri preoblikovanju citoskeleta. Uporabili smo divjo in mutantne oblike GHS-R1a, ki smo jih kotransfecirali z dominantno negativnimi oblikami G-proteinov, ter prikazali s pomočjo konfokalne mikroskopije. Ugotovili smo, da imajo podenote α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ vlogo v prerazporeditvi aktinskega citoskeleta in mikrotubulov. Pri mutantni obliki GHS-R1a s povečano konstitutivno aktivnostjo je bila vloga obeh G-proteinov izrazitejša. Pri mutantni obliki receptorja s spremembo v ohranjenem motivu DRY smo opazili razlike pri polimerizaciji mikrotubulov. Pri celicah z soizraženimi mutantami GHS-R1a z okvarjeno funkcijo vezave liganda ali funkcijo prenosa signala v celico smo opazili podobno morfologijo celic, razporeditev mikrotubulov ter aktinskega citoskeleta kot pri celicah z izraženo divjo obliko receptorja.

Ključne besede: receptor za grelin; mutageneza; regulacija apetita; celice HEK-293

Uvod

Epidemična razsežnost debelosti je postala izhodišče za zanimanje farmacevtske industrije za razvoj zdravila, ki bi vplivalo na zmanjšanje apetita. Hormonski sistem in mehanizmi, ki urejajo vnos energije vključujejo hormon grelin ter receptor za grelin (GHS-R1a) so zelo kompleksni in jih je potrebno podrobneje proučiti. GHS-R1a uvrščamo v razred A superdružine sedem transmembranskih (TM) receptorjev. Peptidni hormon grelin se veže na receptor in sproži znotrajcelični prenos signala večinoma preko $G\alpha_{q/11}$ podenote proteina G, kar se kaže v akumulaciji inositol fosfata in sproščanju kalcija. Grelin poveča izločanje rastnega hormona iz hipofize in s tem pomembno vpliva na kratkoročno in dolgoročno uravnavanje telesne teže (1,2). Pomembna je tudi njegova visoka konstitutivna aktivnost. Članom skupine A je skupnih več ohranjenih zaporedij, kot so cisteinski aminokislinski ostanki na vrhu TM-III in 2. zunajcelične zanke, ki tvorijo disulfidni mostiček,

ki zanko razdeli v dva dela, prolina v TM-V (ProV:16 oz. V:50), TM-VI (ProVI:15 oz. VI:50, ProVII:17 oz. VII:50), motiv E/DRY na meji TM-III in 2. znotrajcelično zanko, polarni TM aminokislinski ostanki na več mestih v receptorju in več potencialnih mest za post-translacijske modifikacije kot so npr. možna glikozilacijska mesta v N-terminalnem koncu receptorja. Za GHS-R1a so poleg zgoraj naštetih ohranjenih mest pomembni še motiv NPXXY na koncu TM-VII, ki ima pomembno vlogo pri aktivaciji receptorja, interakciji s proteini G ter internalizaciji. Za aktivacijo so pomembna tudi t.i. mikrostikala v TM:III (ArgIII:26) (3, 4). V študiji smo testirali več mutantnih oblik grelinskega receptorja in sicer GluIII:09Gln (R141A), pri kateri je bil bazični arginin v motivu DRY zamenjan z nepolarnim alaninom, kar se je kazalo v zmanjšanem prenosu signala v celico, GluIII:09Gln (E124Q), pri katerem je zamenjana kislota glutaminska kislina z nenabitim polarnim glutaminom zmanjšala zmožnost prenosa znotrajceličnega signala preko GHS-R1a ter TrpVI:13Ala (W276A), kjer je prišlo do zamenjave triptofana, ki ima aromatično stransko verigo z nepolarno metilno stransko verigo v alanin, kar povzroči zmanjšan prenos signala. Zanimal nas je celični odziv pri konstitutivno aktivnem receptorju GHS-R1a na organizacijo aktinskega citoskeleta in mikrotubulov v celici, vpliv aktivacije GHS-R1a na citoskelet ter vpliv mutantnih oblik receptorja, ki imajo okvarjeno funkcijo vezave liganda ali prenos signala v celico, na razporeditev in prerazporeditev citoskeleta v celici. Proučevali smo tudi vlogo podenot α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ pri preoblikovanju citoskeleta.

Material in metode

Za naše delo smo uporabili rekombinantni plazmidni vektor pcDNA3+, divjo obliko grelinskega receptorja (WT GHS-R1a) in konstrukte mutantnih oblik grelinskega receptorja (ArgIII:26Ala, GluIII:09Gln in TrpVI:13Ala), ki smo jih okarakterizirali s predhodno opravljenim testom ELISA. Pri delu smo uporabljali trajno celično linijo primarnih humanih embrionalnih ledvičnih celic - HEK-293 (Evropska zbirka živalskih celičnih kultur - European Collection of Animal Cell Culture), ki smo jih gojili *in vitro* in nato prehodno transfecirali z DNA z različnih oblik receptorjev in proteinov G - DN mutante podenote α G-proteina $G\alpha_{12}$ (Q231L/D299N) in $G\alpha_{13}$ pa Q226L/D294N (UMR cDNA®). Celice smo nato fiksirali, aktinske filamente smo označili z rodamin faloidinom, divjo in mutantne oblike receptorja ter mikrotubule pa smo prikazali imunohistokemijsko ter jih pripravili za konfokalno mikroskopijo, s katero smo opazovali celično lokalizacijo receptorjev in morfologijo citoskeleta. Za receptorje smo uporabili primarna podganja protitelesa proti epitopu FLAG (Sigma Aldrich) ter sekundarnima kozja protipodganja protitelesa Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), za mikrotubule pa primarna mišja protitelesa proti α -tubulinu ter sekundarna kozja protimišja protitelesa Alexa 488. S pomočjo konstruktov smo proučili vpliv posameznih aminokislin v TM-III in TM-VI, ki imajo vpliv bodisi na aktivacijo sekundarnega sporočilnega sistema v celici ali pa na spodobnost vezave liganda v smislu njihove internalizacije, ravni konstitutivne aktivnosti ter vpliva na morfologijo in prerazporeditev aktinskih filamentov in mikrotubulov. Opravili smo tudi morfometrično analizo celic z računalniškim programom Image J (National Institute of Health). Izmerili smo površine celic, ki so izražale divjo ali mutantne oblike GHS-R1a.

Rezultati

S konfokalno mikroskopijo smo opazovali lokalizacijo receptorja v celici in potrdili funkcionalnost divje in mutantnih oblik GHS-R1a. Pri mutantni ArgIII:26Ala je prišlo do

povečanja znotrajceličnega signala mutantne oblike GHSR1a, vendar brez sprememb na površini celic. Pri mutantni obliki TrpVI:13Ala je bilo opaziti več signala mutantne oblike GHSR1a na površini celic. Pri aktivaciji divje oblike in mutante receptorja GluIII:09Gln z agonistom je prišlo do prerazporeditve signala mutantne oblike GHSR1a v notranjost celice in povečanja celične površine. Izstopajoče povečanje površine celice pri GluIII:09Gln so potrdili tudi rezultati morfometrične analize celic. Povečana konstitutivna aktivnost GluIII:09Gln se je kazala tudi v izraziti prerazporeditvi aktinskega citoskeleta v celici in je imela vpliv na reorganizacijo aktinskega citoskeleta preko podenot α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$, kar smo zavrli z dodatkom dominantno negativnih oblik proteinov G. Na formacijo mikrotubulov pa podenote α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ ter večja konstitutivna aktivnost receptorja niso imele vpliva pri divji obliki receptorja in mutanti GluIII:09Gln. Nasprotno pa je pri mutanti ArgIII:26Ala prišlo do povečane polimerizacije mikrotubulov od dodatku DN oblik podenot $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ (Tabela 1).

Razprava

Divja oblika GHS-R1a je konstitutivno aktivna (6). Za mutantno obliko GluIII:09Gln je značilna povišana konstitutivna aktivnost, ki bi lahko bila razlog za povečano velikost celic in spremembe v aktinskem citoskeletu. Konstitutivna aktivnost ter še dodatna aktivacija z agonistom grelinom privede do aktivacije drugotne sporočilne poti v celici v največji meri preko podenote proteina $G\alpha_q$ in posledično nastanka fosfoinozitolov in povečane koncentracije Ca^{2+} v celici (6). Glede na očitne spremembe v celični morfologiji transfeciranih celic z mutantno obliko receptorja GluIII:09Gln, smo pokazali, da podenote α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ igrajo vlogo pri prerazporeditvi aktinskega citoskeleta, predvsem nastanku stresnih filamentov, ki v manjši meri nastanejo tudi pri divji obliki receptorja. Obliki podenot α G-proteinov $G\alpha_{12}$ in $G\alpha_{13}$ ne kažeta vpliva na nastanek mikrotubulov pri divji in mutantni obliki receptorja GHS-R1a s povišano konstitutivno aktivnostjo receptorja. Povišana polimerizacija mikrotubulov je vidna pri mutantni obliki receptorja s spremembo v motivu DRY. V celicah s soizraženima mutantama GHS-R1a – GluIII:09Gln in ArgIII:26Ala, ki imata bodisi okvarjeno funkcijo vezave liganda bodisi funkcijo prenosa signala v celico, smo opazili podobno morfologijo celic, razporeditev in prerazporeditev mikrotubulov in aktinskega citoskeleta kot pri celicah, kjer je bil izražen divji tip receptorja. To nakazuje na možnost homodimerizacije receptorja GHS-R1a. Novejše raziskave so potrdile, da je GHS-R1a sposoben dimerizacije v obliki homo- ali heterodimerov (7-12). Delovanje receptorja v obliki heterodimerov bi lahko bil vzrok za delovanje grelina pri stresno pogojenem prehranjevanju in motnjah hranjenja. Heterodimerizacija receptorja omogoča veliko natančnejše mehanizme pozitivne in negativne regulacije učinka grelina in predstavlja novo možnost terapevtske intervencije. Poleg prikazanih rezultatov smo z našo študijo odprli še mnogo novih vprašanj, ki bi se jim v prihodnosti želeli posvetiti.

Reference

1. Kubale V. Appetite regulation and obesity: emphasis on ghrelin and ghrelin receptor. *Slo Vet Res* 2011; 48:69–81.
2. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 993–6.
3. Mokrosinski J, Frimurer TM, Sivertsen B, Schwartz TW, Holst B. Modulation of constitutive activity and signaling bias of the ghrelin receptor by conformational constraint in the second extracellular loop. *J Biol Chem* 2012; 287: 33488–502.

	aktin	mikrotubuli (MT)	aktin	mikrotubuli (MT)
WT GHS-R1a + aktin	mreža nitk v kortikalnem področju, lamelopodiji, stresni filamenti, nekaj razpršenega signala v citoplazmi	polimerizirani MT, ki tvorijo obsežne strukture na periferiji in žarkaste strukture, ki segajo v notranjost celice	dodatni stresni filamenti, izrazitejši kortikalni signal in lamelopodiji	prerazporeditev MT, bolj žarkasto razporejanje iz področja jedra celice navzven
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{12DN}	več lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a	večje celice, več lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{13DN}	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	podobno kot pri WT GHS-R1a
GluIII:09Gln (E124Q) + aktin	izrazitejši kortikalni signal, več stresnih filamentov, lamelopodijev, mikroskopskih, nekaj signala v citoplazmi	periferna oblika kortikalnih MT, žarkasta struktura MT v notranjosti	zelo izraziti stresni filamenti in mikroskopski	podobno kot pri GluIII:09Gln, samo da izraziteje
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{12DN}	bolj izraziti lamelopodiji, manj izrazita stresna vlakna, nekaj signala v citoplazmi, večje celice	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost	še povečanje celice, manj lamelopodijev, manj stresnih filamentov, manj mikroskopskih	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{13DN}	podobno kot dodatku Gα _{12DN} , vendar manj izrazito	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost	podobno kot dodatku Gα _{12DN} , vendar manj izrazito	podobno kot pri GluIII:09Gln, manjša razporeditev v notranjost
ArgIII:26Ala (R141A) + aktin	kortikalno področje, manj razpršenega signala v citoplazmi, stresni filamenti, lamelopodiji	obsežnejša žarkasta struktura MT v celici	podobno kot brez dodatka agonista	še obsežnejša žarkasta struktura MT v celici
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{12DN}	kortikalno področje, malo v citoplazmi, manj lamelopodijev in stresnih filamentov	žarkasta struktura MT	podobno kot brez dodatka agonista	žarkasta struktura MT
+ aktin + mikrotubuli + Gα _{13DN}	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	žarkasta struktura MT	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	žarkasta struktura MT

	Brez dodatka agonista		Dodatek agonista grelina (10 μ m, 5 min, 37 °C)	
	receptor	aktin	receptor	aktin
WT GHS-R1a + aktin	na membrani, nekaj v notranjosti celice	mreža nitk v kortikalnem področju, lamelopodiji, stresni filamenti, nekaj razpršenega signala v citoplazmi	prerazporeditev v citoplazmo, manj na membrani celice	dodatni stresni filament, izrazitejši kortikalni signal in lamelopodiji
+ aktin + G α_{12DN}	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	več lamelopodijev	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	večje celice, več lamelopodijev
+ aktin + G α_{13DN}	nekaj receptorja na membrani, nekaj v notranjosti	manj stresnih filamentov in lamelopodijev	prerazporeditev v citoplazmo, manj na membrani celice	manj stresnih filamentov in lamelopodijev
GluIII:09Gln (E124Q) + aktin	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	izrazitejši kortikalni signal, več stresnih filamentov, lamelopodijev, mikroskopskih, nekaj signala v citoplazmi	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	zelo izraziti stresni filament in mikroskopski
+ aktin + G α_{12DN}	prerazporeditev v notranjost, nekaj na membrani	bolj izraziti lamelopodiji, manj izrazita stresna vlakna, nekaj signala v citoplazmi, večje celice	prerazporeditev v notranjost	še povečanje celice, manj lamelopodijev, manj stresnih filamentov, manj mikroskopskih
+ aktin + G α_{13DN}	Podobno kot dodatku G α_{12DN} , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G α_{12DN} , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G α_{12DN} , vendar manj izrazito	podobno kot dodatku G α_{12DN} , vendar manj izrazito
ArgIII:26Ala (R141A) + aktin	Notranjost celice, zelo malo na površini	kortikalno področje, manj razpršenega signala v citoplazmi, stresni filament, lamelopodiji	še več signala v notranjosti celice	podobno kot brez dodatka agonista
+ aktin + G α_{12DN}	na membrani in v notranjosti celice	kortikalno področje, malo v citoplazmi, manj lamelopodijev in stresnih filamentov	podobno kot brez dodatka agonista	podobno kot brez dodatka agonista
+ aktin + G α_{13DN}	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G	podobno kot pri ArgIII:26Ala brez dodatka proteinov G

4. Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 249–59.
5. Post GR, Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J* 1996; 10: 741–9.
6. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17:2201–10.
7. Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz T. Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2400–11.
8. Chow KB, Leung PK, Cheng CH, Cheung WT, Wise H. The constitutive activity of ghrelin receptors is decreased by co-expression with vasoactive prostanoid receptors when over-expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2627–37.
9. Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 19003–8.
10. Rediger A, Piechowski C, Yi CX, et al. Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* 2011; 286: 39623–31.
11. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front Neurosci* 2013; 7: e148 (18 str.) <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2013.00148/full> (11. nov. 2014)
12. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1772–85.

Characterization of morphological alterations in HEK-293 cells, transfected with mutants of ghrelin receptor (GHS-R1a), impaired in ligand binding or signaling

One of the drug target candidates to decrease appetite is a seven transmembrane (7TM) ghrelin receptor (GHS-R1a). We have defined the impact of individual amino acids in the third and sixth transmembrane region that have an impact on the activation of the second messenger systems or on the ability of ligand binding. The effect of changes in the mutated receptors on the shape, size of the cells and redistribution of cell actin filaments and microtubules and the role of G-proteins in the cytoskeleton redistribution was determined. Wild type and mutants of the GHS-R1a were cotransfected with dominant negative mutants of G-proteins, expressed in HEK-293 cells and shown by the confocal microscopy. We have demonstrated that α subunits of G proteins $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ had role in the rearrangement of the actin cytoskeleton and microtubules. In highly constitutive GHS-R1a mutant even more pronounced changes were observed. In receptor mutated in conserved DRY motif differences in polymerization of microtubules were observed. Similar cell morphology phenotype and the rearrangement of cytoskeleton were observed in the cells co-expressing mutants of GHS-R1a with disabled ligand or signal transduction function in comparison to GHS-R1a.

Key words: ghrelin receptor; mutagenesis; appetite regulation; HEK-293 cells