

„Dimeryzacja receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminergicznym D2 oraz wpływ oddziaływań pomiędzy nimi na wybrane funkcje komórek śródbłonka”

Receptor bradykininy typu 2 (B2R) oraz receptor dopaminergiczny typu 2 (D2R) są przedstawicielami rodzin receptorów błonowych związanych z białkiem G (GPCR), w obrębie których udokumentowano tworzenie różnych kompleksów oligomerycznych. Dotychczas wykazano, iż zarówno B2R jak i D2R mogą dimeryzować z innymi GPCR i w ten sposób regulować ważne funkcje komórkowe. Jednak jak dotąd nie zbadano, czy receptory te mogą bezpośrednio oddziaływać ze sobą. Wiedza ta może być szczególnie istotna, bowiem B2R i D2R są obecne w wielu komórkach, gdzie warunkują szereg wspólnych procesów. Odgrywają one ważną rolę w śródbłonku naczyń krwionośnych, w którym zaangażowane są między innymi w regulację adhezji leukocytów oraz w kontrolę odpowiedzi komórek śródbłonka na czynniki prozapalne.

Podstawowym celem pierwszego etapu pracy było zbadanie dimeryzacji receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminergicznym D2 i konsekwencji tego oddziaływania - modulacji odpowiedzi komórkowej związanej z wewnątrzkomórkowymi jonami Ca^{2+} oraz cyklicznym AMP (cAMP). W oparciu o technikę Overlap extension polymerase chain reaction zaprojektowano plazmidy, zawierające sekwencję kodującą białka fuzyjne receptora bradykininy B2 sprzężonego z zielonym (Citrine) lub czerwonym (mCherry) białkiem fluorescencyjnym. Analiza obrazu uzyskanego przy użyciu mikroskopu konfokalnego pozwoliła ocenić odpowiednią lokalizację tych receptorów w błonie komórek HEK293, transfekowanych tymi plazmidami. Natomiast konkurencyjny test wiązania bradykininy (BK), wyznakowanej radioizotopowo oraz pomiar stężenia jonów Ca^{2+} potwierdziły prawidłową funkcjonalność uzyskanych receptorów. W dalszych badaniach wykazano konstytutywną kolokalizację receptorów w błonach komórkowych komórek HEK293, kotransfekowanych plazmidami kodującymi B2R oraz D2R, sprzężone z Citrine lub mCherry. Ponadto stwierdzono, iż owa kolokalizacja ulegała istotnemu wzmocnieniu po 5 minutach działania BK lub sumanirolu (SUM), specyficznych agonistów odpowiednio dla B2R i D2R, podczas gdy jednoczesna aktywacja obu receptorów nie miała wpływu na ten parametr. W oparciu o technikę mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji w połączeniu z rezonansowym przeniesieniem energii fluorescencji stwierdzono tworzenie dimerów pomiędzy receptorem bradykininy i receptorem dopaminergicznym. Oddziaływanie to wzmacniało się pod wpływem

agonistów B2R i D2R. Analiza zmian stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP oraz jonów Ca^{2+} wykazała, iż równoczesna stymulacja receptorów prowadziła do zniesienia odpowiedzi charakterystycznej dla D2R oraz B2R po stymulacji komórek swoistymi agonistami.

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ BK i SUM na wybrane funkcje ludzkiej linii komórek śródbłonna pochodzącej z żyły krwi pępowinowej, w których stwierdzono endogenną obecność B2R i D2R. Wykazano, iż jednoczesna aktywacja obu receptorów moduluje adhezję granulocytów do komórek śródbłonna. Bradykinina znacząco wzmacniała adhezję komórek, podczas gdy inkubacja razem z SUM prowadziła do odwrócenia zmian indukowanych przez BK. Efekty te były zależne od czasu inkubacji z agonistami, wykazując przeciwną tendencję po długotrwałej stymulacji. Ponadto w komórkach HUV-EC-C uprzednio aktywowanych czynnikiem martwicy nowotworów α (TNF- α) i kostymulowanych oboma agonistami również stwierdzono zniesienie adhezji granulocytów do komórek śródbłonna. W oparciu o techniki cytometrii przepływowej oraz Western blotting wykazano znaczące zmiany produkcji białek adhezyjnych komórek śródbłonna, takich jak E-selektyna oraz międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1. Dodatkowo w komórkach preinkubowanych z TNF- α i równocześnie aktywowanych oboma agonistami receptorów, obserwowano zmniejszoną syntezę interleukin 6 i 8 oraz endoteliny 1. Zmianom tym towarzyszyła zwiększona fosforylacja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, prowadząca do wzrostu stężenia NO. Analiza produkcji reaktywnych form tlenu wykazała, iż SUM hamuje efekt indukowany przez BK. Stwierdzono także modyfikacje aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa oraz katalaza. Równoczesna stymulacja komórek śródbłonna agonistami B2R i D2R wzmocniła syntezę białek antyapoptotycznych - Bcl-xL i Bcl-2, w stosunku do białka proapoptotycznego Bax oraz obniżała aktywność kaspaz 3 i 7. W oparciu o uzyskane wyniki można postulować, iż modulacja procesów zapalnych oraz oksydacyjno-redukcyjnych w komórkach śródbłonna po równoczesnej aktywacji B2R i D2R może odbywać się za pośrednictwem ścieżek sygnalizacyjnych zależnych od fosforylacji przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3 oraz kinazy białkowej B i kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p44/42.

Podsumowując, w toku niniejszej pracy udało się po raz pierwszy wykazać powstawanie funkcjonalnego dimeru B2R i D2R w błonie komórek HEK293, którego tworzenie jest regulowane przez specyficznych agonistów tych receptorów. Ponadto obserwowane zmiany w stężeniu wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz cAMP potwierdziły wpływ oddziaływania pomiędzy B2R i D2R na modulację tych szlaków sygnalizacyjnych. W badaniach przeprowadzonych w komórkach śródbłonna wykazano, iż agonista D2R może kontrolować

aktywność B2R, prowadząc do zmian w adhezji granulocytów do śródbłonka oraz przeciwdziałając prozapalnym i prooksydacyjnym efektom indukowanym przez BK. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat oddziaływań receptorów B2R i D2R i mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patologii naczyniowych, szczególnie związanych z zaburzeniami zapalnymi, takimi jak miażdżyca.

Anno uemanoite - senio

