

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Karolina Rabik

**Učinak gvanilinskih peptida na signalni sustav
bradikinina u kulturi HEK293 stanica**

Diplomski rad

Zagreb, 2013

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za neurofiziologiju – whole cell patch clamp na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga i Zavodu za fiziologiju na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Zahvale:

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Aleksandri Sinđić, koja je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovala ideju i pomogla mi u izradi ovog diplomskog rada. Srdačno zahvaljujem i Katarini Špiranec koja je nesebično prenosila svoje znanje na mene, te mi svojom strpljivošću olakšala rješavanje svih problema na koje sam naišla tijekom istraživanja. Veliko hvala dugujem i doc.dr.sc. Dinku Mitrečiću koji me primio na institut i usmjerio me k ovom projektu. Želim zahvaliti i svim ostalim djelatnicima Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na razumijevanju, susretljivosti i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji, prijateljima i Renatu na ljubavi i bezuvjetnoj podršci!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK GVANILINSKIH PEPTIDA NA SIGNALNI SUSTAV BRADIKININA U KULTURI HEK293 STANICA

Karolina Rabik

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Okluzija cerebralne arterije dovodi do moždanog udara te posljedično moždanog edema koji pridonosi povećanju ishemijske ozljede. U ovom radu istraživati će se djelovanje gvanilinskih peptida, gvanilina i urogvanilina, agonista gvanilat ciklaze C, na signalni sustav bradikininina kao glavnog uzročnika nastanka moždanog edema nakon moždanog udara. Cilj je razjasniti mehanizam djelovanja gvanilinskih peptida na stanicama HEK293 te njihovo djelovanje na bradikinin, kao što smo nedavno prikazali za agoniste gvanilat ciklaze A, atrijski natriuretski peptid (ANP) i urodilatin. U ovom radu sam koristila metodu priklještenih potencijala (*slow whole cell patch-clamp*) za mjerenje membranskih potencijala HEK293 stanica, kojom smo pokazali da gvanilin i urogvanilin kao i njihov sekundarni glasnik, ciklički GMP, depolariziraju staničnu membranu i inhibiraju djelovanje bradikinininskog signalnog puta preko aktivacije RGS proteina.

Rezultati ovog istraživanja pretpostavljaju moguću zaštitnu ulogu gvanilinskih peptida u smanjenju moždanog edema te posljedično smanjenja veličine ishemijske ozljede mozga.

(37 stranice, 13 slika, 2 tablice, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: natriuretski peptidi, gvanilin, urogvanilin, *patch-clamp*

Voditelj: Dr.sc. Aleksandra Sinđić, Prof. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji: Dr.sc. Zoran Tadić, Doc. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Dr.sc. Inga Marijanović, Doc. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 07.11.2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EFFECTS OF GUANYLIN PEPTIDS ON BRADYKININ SIGNALING PATHWAY IN HEK293 CELL CULTURE

Karolina Rabik

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The occlusion of cerebral arteries leads to a stroke and consequently to a cerebral edema, which contributes to an increase of ischemic injury. In this study we investigate the effect of guanylin peptides, guanylin and uroguanylin and guanylate cyclase C agonist on the signaling system of bradykinin, which is the main contributor to the occurrence of cerebral edema after the stroke. The aim of this study is to clarify the activity mechanism of the guanylin peptides on HEK293 cells and their effect on bradykinin, as we have recently shown on the example of guanylate cyclase agonist A, atrial natriuretic peptide (ANP) and urodilatin. In this experiment we used slow-whole cell patch-clamp technique to measure a membrane potential in HEK293 cells. We showed that guanylin and uroguanylin, just like their secondary messenger cyclic GMP, depolarize a plasma membrane and they inhibit the activity of bradykinin signaling pathway via an activation of RGS protein.

Results of this study suggest a possible protective role of guanylin peptides in a decrease of cerebral edema and also a decrease of an ischemic brain injury.

(37 pages, 13 figures, 2 tables, 77 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: natriuretic peptides, guanylin, uroguanylin, patch-clamp

Supervisor: Dr. Aleksandra Sindić, Associate Professor, Faculty of medicine,
University Zagreb

Reviewers: Dr. Zoran Tadić, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 07.11.2013.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Moždani udar	1
1.1.1. Hipoksija/ishemija	1
1.1.2. Moždani edem.....	2
1.2. Bradikinin	2
1.3. Natriuretski peptidi	6
1.3.1. Gvanilat ciklaza.....	8
1.3.2. Natriuretski peptidi i njihova funkcija	11
1.3.3. Gvanilin i urogvanilin.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Stanična kultura.....	17
3.2. Metoda priklještenih potencijala (<i>Whole cell patch clamp</i>)	18
3.3. Pipete za patch clamp	19
3.4. Statistička obrada rezultata	19
4. REZULTATI	20
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. LITERATURA.....	30

1. UVOD

1.1. Moždani udar

Moždani udar (moždana kap, cerebrovaskularni inzult, CVI, apopleksija mozga) je rapidni gubitak moždane funkcije/funkcija zbog poremećaja dotoka krvi u mozak. Može nastati zbog ishemije (nedostatak protoka krvi) uzrokovane blokadom (tromboza, arterijska embolija) ili zbog krvarenja (istjecanja krvi). Kao rezultat zahvaćeno područje mozga ne može funkcionirati što može rezultirati nemogućnošću osobe da pomakne jedan ili više udova na zahvaćenoj strani, nemogućnošću razumijevanja govora ili formuliranja riječi, te nemogućnošću vida na jednoj strani vidnog polja.

Moždani udar je vodeći uzrok onesposobljenosti u odrasloj dobi u SAD-u, treći je uzrok po smrtnosti u zemljama zapadne Europe, prvi uzrok smrtnosti u Hrvatskoj i prvi uzrok invalidnosti, a drugi vodeći uzrok smrti širom svijeta.

Moždani udar se može klasificirati u dvije velike kategorije: ishemijski i hemoragijski. Ishemijski moždani udar uzrokovan je prekidom u dotoku krvi, dok hemoragijski moždani udar ili moždano krvarenje nastaje zbog puknuća krvne žile ili zbog abnormalne strukture žila. Otprilike 87% moždanih udara uzrokovano je ishemijom, dok ostatak nastaje zbog krvarenja. Neka krvarenja se razvijaju u području ishemije („hemoragijska transformacija“).

1.1.1. Hipoksija/ishemija

Moždano tkivo ima relativno veliku potrebu za kisikom i glukozom i gotovo u potpunosti ovisi o oksidativnoj fosforilaciji kao izvoru energije. Patofiziološki razlikujemo globalnu i fokalnu ishemiju. Globalna ishemija rezultat je smanjenog protoka krvi, ispod 0.5 mL/100 g u minuti. Uzrok tome je najčešće srčani zastoj, nakon nekoliko minuta posljedice hipoksije postaju ireverzibilne. Mnogi životinjski modeli potvrdili su staničnu smrt nekoliko minuta nakon početka globalne ishemije. Kratke epizode ishemije ne moraju odmah dovesti do stanične smrti neurona, ali

selektivno ranjive populacije neurona mogu razviti odgođenu ishemičnu staničnu smrt.

Promjene u mikrocirkulaciji, kakve se pojavljuju kod fokalne ishemije, ne pojavljuju se u globalnoj ishemiji. Takve promjene uzrokuju hipoperfuziju ishemične zone i utječu na sposobnost za život tkiva. To je posebno važno u fazi reperfuzije nakon prolazne ishemije, i objašnjava zašto se promjene u globalnoj ishemiji ne mogu primjeniti na patofiziologiju fokalne ishemije (Waxman 2007).

1.1.2. Moždani edem

Moždani edem nastaje kao posljedica nakupljanja tekućine u moždanom tkivu što povećava intrakranijalni tlak. Nakupljanje tekućine može nastati kao posljedica povećane propusnosti krvnih žila (vazogeni edem), kao posljedica poremećaja stanične regulacije tekućine (citotoksični edem) ili kao posljedica transudacije tekućine kroz komorni sustav kroz oštećeni ependim (intersticijski edem). Najčešći uzrok vazogenog edema je oštećenje krvožilne stijenke na području infarkta ili traume pri čemu se tekućina najviše nakuplja u bijeloj tvari. Citotoksični edem nastaje zbog nakupljanja tekućine unutar stanica pri čemu je najviše pogođena siva tvar, a nastaje kao posljedica ishemije ili intoksikacije. Intersticijski edem nastaje zbog oštećenja ependimskih stanica koje oblažu komorni sustav (Dirnagl i sur. 1999).

1.2. Bradikinin

Danas se vjeruje da je moždani udar bolest koju karakterizira tijekom upalnih procesa, a ne jednostavna akutna neurodegeneracija. Kod animalnih modela, središnja jezgra se ubrzano infektira nakon početka žarišne ishemije, a zatim se koncentrično širi. Ekspresija upalnih medijatora i aktivacija upalnog odgovora ne samo da pridonosi preoksidaciji membranskih lipida u mozgu nakon moždanog udara, nego i pogoršava stupanj tkivne ozljede uzrokovane adherencijom i infiltracijom leukocita, oslobađanjem citotoksičnih produkata kao što su reaktivni kisikovi spojevi i povećana propusnost endotela mozga. Upala mozga nakon

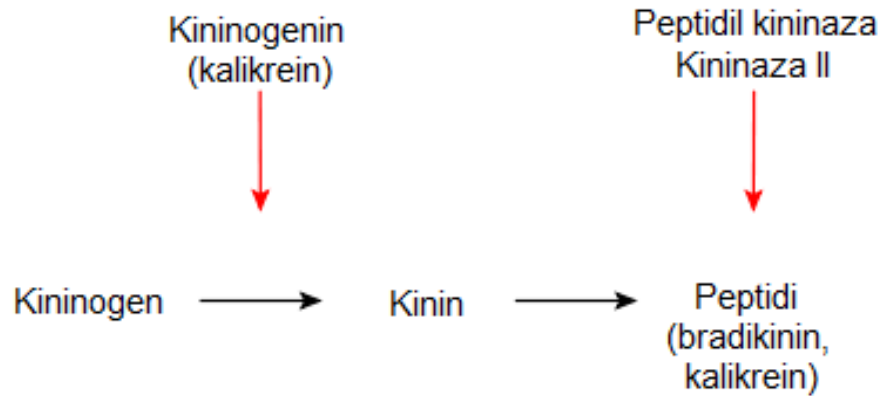
moždanog udara može se smatrati dvostrukom oštricom, s upalnim kaskadama potiču se i štetni i potencijalno korisni putevi. To je, čini se, zbog toga što se vrijeme upale mozga proteže iz nekoliko sati do nekoliko dana/tjedana nakon moždanog udara, uključujući rane ozljede i kasnije procese popravaka. Iako početna upala može doprinijeti stupnju oštećenja mozga nakon ozljede, brojne protuupalne intervencije ograničavaju stupanj oštećenja i interferiraju s živčanom regeneracijom i oporavakom.

Stoga, specifične strategije mogu biti potrebne za ranu intervenciju kod upale mozga kako bi se smanjila ozljeda i neurodegeneracija, različite intervencije mogu biti potrebne i za lakši popravak i regeneraciju nakon ozljede središnjeg živčanog sustava.

Kao sastavni dio upalnog odgovora moždanog tkiva spominje se kininski sustav te posljedično otpuštanje bradikininina (BK). Iako za postojanje ovog sustava znamo odavno, njegovo se proučavanje u kliničkim studijama odvija tek zadnjih nekoliko godina. On se sastoji od substrata (kininogeni) i plazma i tkivnih kalikreina koji su specifični aktivatori ovih supstrata za proizvodnju dvaju vazoaktivnih peptida koji se zovu BK i kalidin (Golias i sur. 2007).

BK se smatra važnim posrednikom upalnog odgovora u perifernom i središnjem živčanom sustavu, i privukao je nedavni interes kao potencijalni mediator kod ozljeda uzrokovanih moždanim udarom. Ovaj peptid nastaje cijepanjem svog prethodnika, kininogena, koji aktivira više mehanizama odgovornih za rane manifestacije upale, uključujući i dilataciju arteriola, povećanu propusnost krvnih žila što rezultira stvaranjem vazogenog edema (Slika 1.).

Sve komponente kalikrein/kinin-a su identificirane u mozgu čovjeka, a tkivni kallikrein/kinin sustav, koji utječe na propusnost krvno-moždane barijere, aktivira se kod ljudi tijekom moždanog udara (Moreau i sur. 2005).

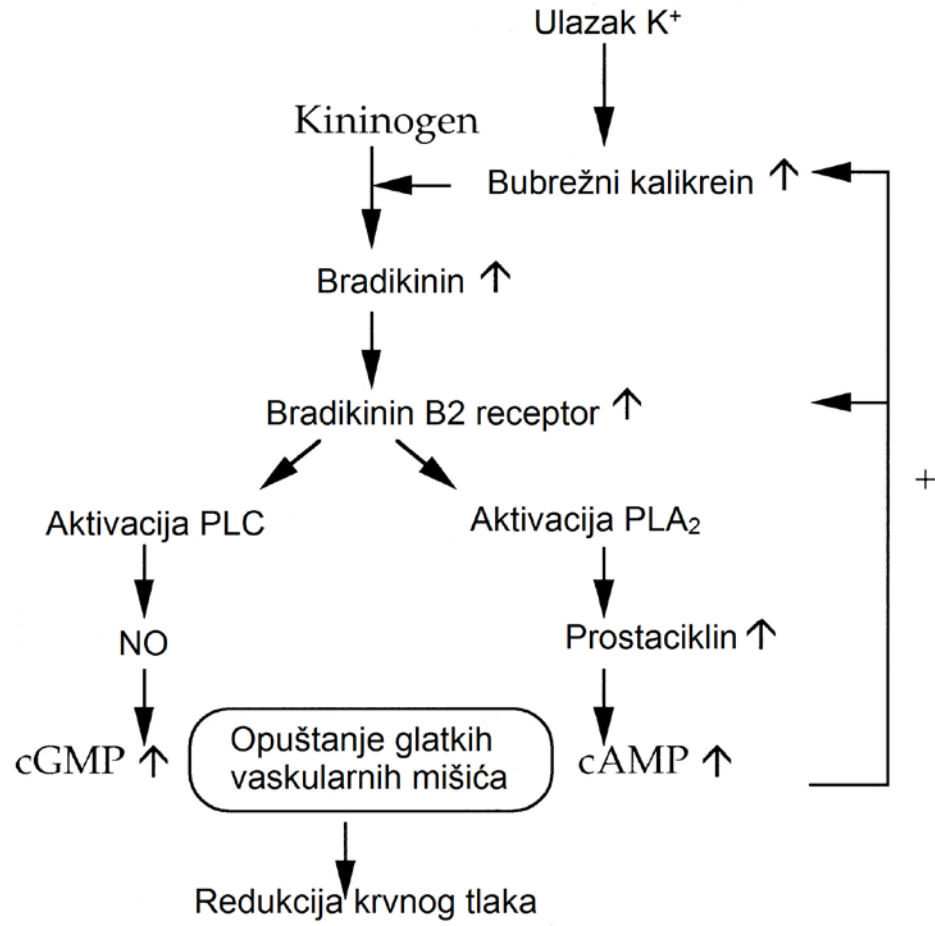


Slika 1. Cijepanje kininogena i nastanak bradikina

Moždani udar rezultira poremećajem krvno-moždane barijere, a ponekad i životno opasnim cerebralnim edemom. Čak i kratka primjena BK pokazala je da uzrokuje produženu dilataciju moždane arteriole i povećanu cerebrovaskularnu propusnost (Dobrivojević i sur. 2012).

Do sada su poznata dva tipa BR receptora: bradikininski receptor tipa 1 (B_1R), koji je inducibilan i konstitutivno eksprimirani bradikininski receptor tipa 2 (B_2R). Oba receptora povezana su s G proteinom Gq_{11} što vodi preko aktivacije fosfolipaze C (PLC) do mobilizacije Ca^{2+} . Aktivacija B_2R na endotelnim stanicama uzrokuje vazodilataciju i povećava permeabilnost žila preko povećanja stanične koncentracije Ca^{2+} i produkcije NO.

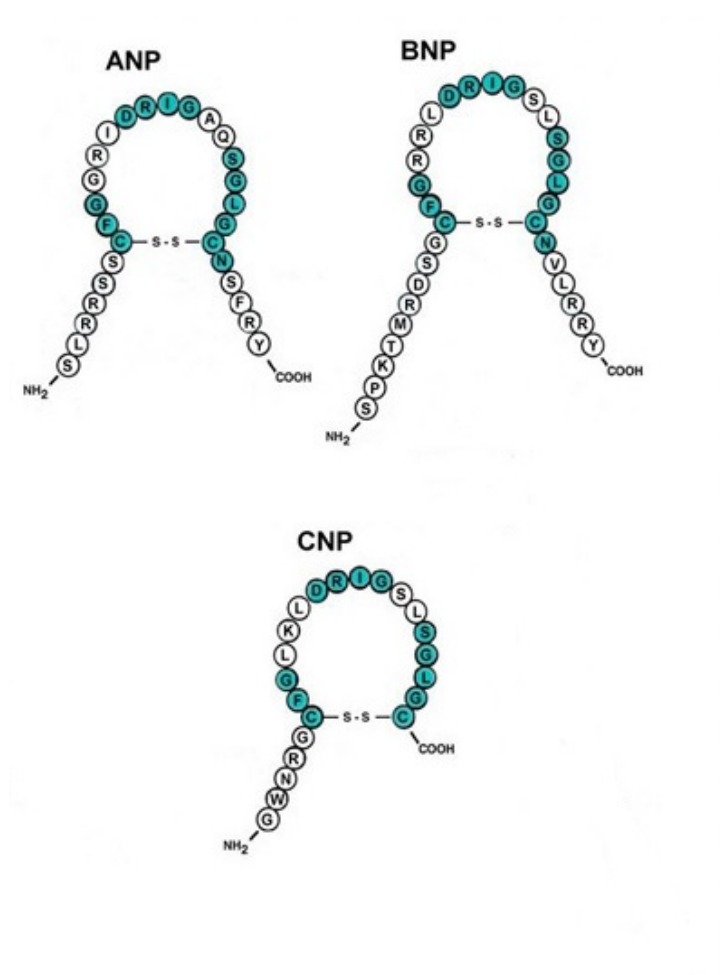
Nadalje, aktivacija B_2R u nekim stanicama dovodi i do otpuštanja arahidonske kiseline i aktivacije ciklo-oksigenaza (COX) enzima, što dovodi do proizvodnje prostanoida. Mehanizam kojim endogeni BK može posredovati u ishemijskoj ozljedi mozga uključuje aktivaciju konstitutivno eksprimiranog B_2 receptora (B_2R). BK također potiče oslobađanje ekscitatornih amino-kiselinskih neurotransmitera, te je jak stimulator ostalih upalnih medijatora poput citokina i djeluje kao leukocitni kemoatraktant (Sobey 2003) (Slika 2.).



Slika 2. Aktivacija bradikininjskih receptora

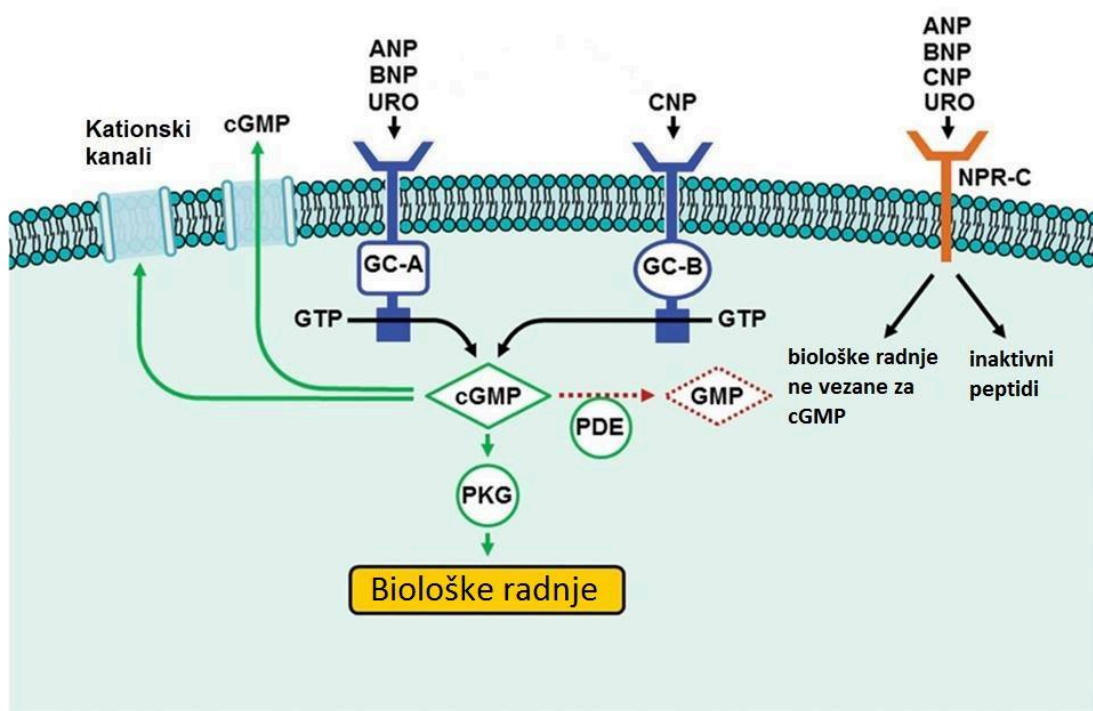
1.3. Natriuretski peptidi

Natriuretski peptidi reguliraju homeostazu soli i vode induciranjem natriureze i diureze u bubregu. Osim srca i krvnih žila ovo ima veliku ulogu u regulaciji krvnog tlaka. U središnjem živčanom sustavu natriuretski peptidi imaju značajnu ulogu u razvoju neurona, sinaptičkom prijenosu i neuroprotekciji. U rastućoj obitelji natriuretskih peptida do sada se najviše zna o njih šest: atrijski natriuretski peptid (ANP), urodilatin (URO) (bubrežna izoforma ANP-a), moždani natriuretski peptidi (BNP) i C-tip natriuretskih peptida (CNP) kao i gvanilin (GN) i urogvanilin (UGN). Svi imaju sličnu peptidnu strukturu. Funkcionalno važno strukturno svojstvo ANP-a, URO, BNP i CNP je prstenasta struktura spojena jednom (Slika 3.) dok GN i UGN (Slika 7.) posjeduju 2 disulfidne veze između cisteinskih ostataka.



Slika 3. Prstenasta struktura natriuretskih peptida: ANP- atrijski natriuretski peptid, BNP- moždani natriuretski peptid, CNP- C tip natriuretskog peptida, URO- urodilatin, bubrežna izoforma natriuretskog peptida (Modificirano prema Kaushik i sur. 2011).

ANP, URO i BNP aktiviraju receptore A za natriuretske peptide (NPR-A ili gvanilat ciklaza A (GC-A)) dok CNP aktivira receptore za natriuretske peptide B (NPR-B ili gvanilat ciklaza B (GC-B)). GN i UGN su poznati kao aktivatori gvanilat ciklaze C (GC-C). NPR-C je receptor koji veže ANP, BNP i CNP i nema gvanilat ciklaznu funkciju. Vezanjem peptida za taj receptor dolazi do endocitoze i posljedično do uklanjanja i razgradnje peptida te aktivacije G-proteina osjetljivog na pertusis-toksin (PT) i inhibicije adenilat ciklaze (*natriuretic peptide receptor-C, Clearance receptor*) (Murthy i Makhlouf 1999) (Slika 4.).



Slika 4. Receptori za natriuretske peptide. Atrijski natriuretski peptid (ANP), moždani natriuretski peptid (BNP) te urodilatin (bubrežna izoforma ANP-a) se vežu za gvanilat ciklazu A (GC-A) te je aktiviraju. C tip natriuretskog peptida (CNP) se veže za gvanilat ciklazu b (GC-B). Kao posljedica aktivacije gvanilat ciklaza dolazi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a koji može aktivirati protein kinazu G (PKG) ili mijenjati aktivnost raznih ionaskih kanala na staničnoj površini. Kao drugi glasnik cGMP se vrlo brzo inaktivira pretvorbom u GMP djelovanjem fosfodiesteraza (PDE). Receptor čistač koji ne posjeduje gvanilat ciklaznu aktivnost služi u inaktiviranju natriuretskih peptida (Modificirano prema <http://circheartfailure.ahajournals.org>).

Svi poznati natriuretski peptidi proizvode intracelularni ciklički GMP (cGMP) aktivacijom specifičnog R-GC. Nakon toga cGMP je u mogućnosti aktivirati protein

kinazu I ili II (PKG I ili II) i/ili direktno regulirati transmembranske proteine kao što su ionski kanali, transporteri i pumpe (Slika 4.).

1.3.1. Gvanilat ciklaza

Velika porodica gvanilat ciklaza sastoji se od citoplazmatske (topljive) gvanilat ciklaze, koja je receptor za NO i CO, te membranskih gvanilat ciklaza od kojih su GC-A, GC-B i GC-C su široko eksprimirani u ljudskom tijelu te sudjeluju u regulaciji elektrolita i vode te krvnog tlaka. Gvanilat ciklaze D, E i F (GC-D, GC-E, GC-F) su smještene u osjetilnim organima, a njihovi ligandi za sada nisu poznati. Gvanilat ciklaza G (GC-G ili GC-1) je također receptor bez poznatog liganda, smješten u poprečno-prugastim mišićima, plućima i probavnom sustavu (Tablica 1.) (Garbers 1999).

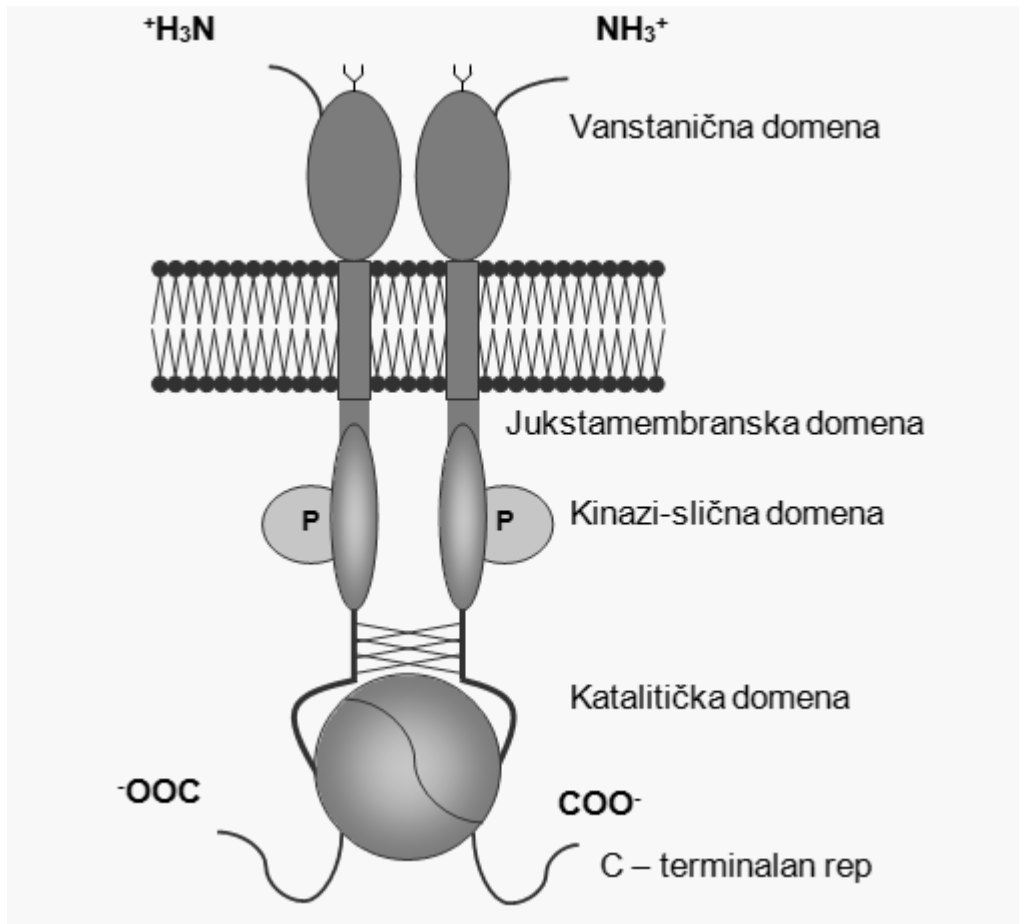
Tablica 1. Ekspresija citoplazmatske i membranskih gvanilat ciklaza

Ciklaza	Tkivna distribucija	Agonisti
Citoplazmatska	Glatki mišići, trombociti, većina tkiva	NO, CO
GC – A	Glatki mišići, bubreg, nadbubrežna žlijezda, srce	ANP, BNP
GC – B	Fibroblasti i druga tkiva	CNP
GC – C	Probavni sustav	ET, GN, UGN
GC – D	Njušni neuroepitel	Nepoznat
GC – E	Retina	Nepoznat
GC – F	Retina	Nepoznat
GC – G	Poprečno-prugasti mišići, pluća, probavni sustav,	Nepoznat

GC-A do G gvanilat ciklaza A do G, NO dušikov monoksid, CO ugljikov monoksid, ANP atrijski natriuretski peptid, BNP moždani natriuretski peptid, CNP C tip natriuretskih peptida, ET termostabilni enterotoksin E. coli, GN gvanilin, UGN urogvanilin

Gvanilinski peptidi su agonisti GC-C. Miševi, kojima nedostaje gen za GC-C (miševi GC-C $-/-$), otporni su na sekrecijske učinke gvanilinskih peptida, ali osim toga ne pokazuju fiziološke razlike u odnosu na divlji tip miševa (WT GC-C). GC-C je jednolančani peptid koji u membrani većinom tvori dimere (Vijayachandra i sur. 2000). mRNA za GC-C se nalazi i u organima koji nisu vezani uz probavni sustav kao na primjer bubrezima, nadbubrežnim žlijezdama, mozgu, jetri, placenti, testisima, dišnim putevima, slezeni, timusu i limfnim čvorovima (Fan i sur. 1997).

Shematski prikaz GC-C kao dimera prikazan je na slici 5. Vežanjem agonista za izvanstaničnu domenu dolazi do prijenosa signala kroz transmembransku domenu do unutarstaničnog dijela receptora. Za ispravnu funkciju receptora (Vaandrager i sur. 1993; Hasegawa i sur. 1999). Jukstamembranska domena smještena je unutarstanično, ali tik uz membranu te je po strukturi slična dijelu receptora za čimbenik rasta sličan inzulinu te epidermalni čimbenik rasta koji je odgovoran za vezanje G-proteina (Gudermann i sur. 1995). Nadalje, kinazi-slična domena po svojoj strukturi podsjeća na katalitičku domenu receptora za trombocitni čimbenik rasta. Pretpostavlja se da ova domena posjeduje tirozin kinaznu aktivnost, dovodeći do autofosforilacije receptora. Možemo pretpostaviti da za punu katalitičku aktivnost GC-C, ova domena mora biti fosforilirana. Specifičnost GC-C u odnosu na druge GC je u postojanju C-terminalnog repa koji sudjeluje u povezivanju GC-C s citoskeletom te je važan u endocitozi kompleksa agonist-receptor (Lucas i sur. 2000).



Slika 5. Gvanilat ciklaza C kao dimer (Sindić 2013)

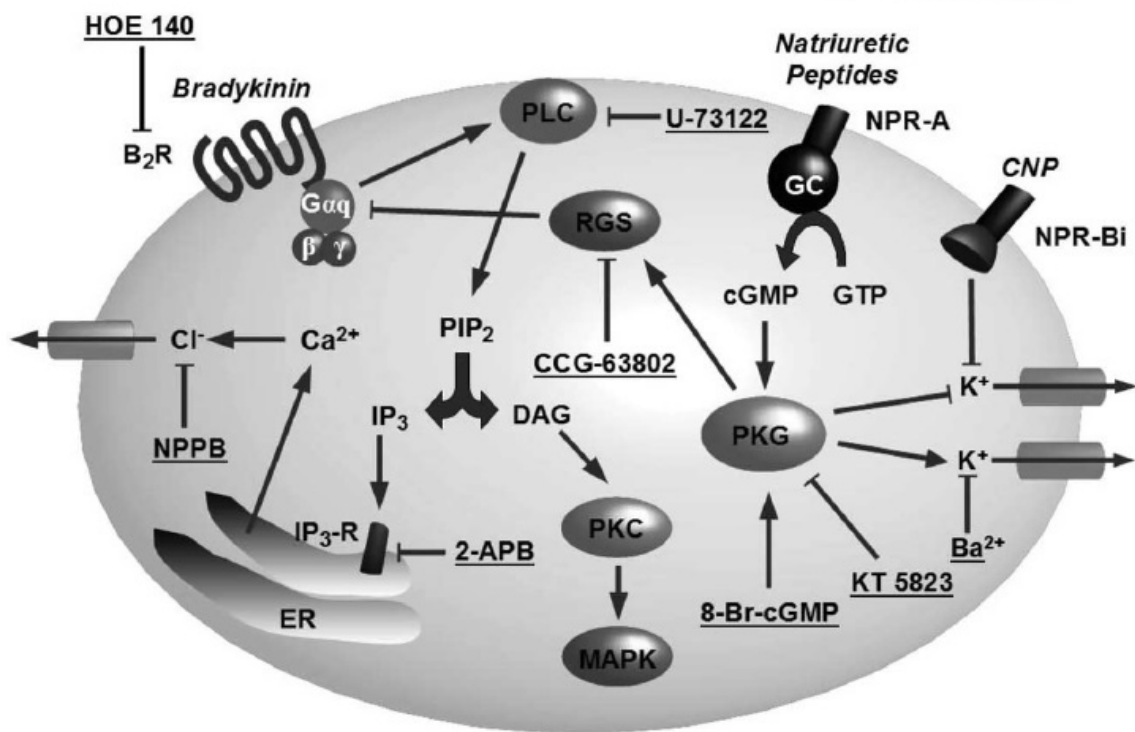
Najistraživaniji regulator aktivnosti GC-C je protein kinaza C (PKC) koja fosforilira C-terminalni rep. PKC dovodi do 70%-tnog povećanja količine cGMP u stanicama nakon aktivacije termostabilnim enterotoksinom *E. coli* (ET) u odnosu na nefosforilirani receptor (Vaandrager i sur. 1993). Aktivnost GC-C je također ovisna o nazočnosti Mg^{2+} -ATP (Bhandari i sur. 1999).

1.3.2. Natriuretski peptidi i njihova funkcija

ANP je trenutno najistraživaniji natriuretski peptid. Regulacija sinteze ANP-a u srčanom atriju direktno ovisi o volumenu, hipoksiji, povećanju intracelularnog pH, povećanju otkucaja srca, rastezljivosti atrija i metaboličkim faktorima. U bubrezima, ANP djeluje na soli (Na^+) i reapsorpciju vode duž nefrona preko inhibicije različitih transportnih sustava kao što je Na^+/H^+ antiporter, Na^+/K^+ -ATPaza, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kontransporter, ne selektivni kationski kanali i akvaporini (AQP) (Schlatter i Schafer 1987). ANP uglavnom djeluje suprotno od renalnog angiotenzin-aldosteron sustava (RAAS) inhibirajući sekreciju renina. Povezano s tim, povećava potrebu za soli i produkciju ADH u hipotalamusu kada se injicira u ventrikularni sustav mozga. Poznato je da ANP ima povoljne učinke na razvoj moždanog edema iako sam ANP povećava propusnost kapilara u mozgu i njegova ekspresija je povećana u glija stanicama koje okružuju ishemičnu jezgru. U našem nedavnom istraživanju pokazali smo da ovaj protektivni učinak ANP-a može nastati inhibicijom BK učinaka u razvoju moždanog edema (Naruse i sur. 1991). Agonisti GC-A (ANP i URO) inhibiraju signalni put BK ovisnog o aktivaciji B_2R u HEK293 stanicama (Slika 6.) dok agonisti GC-B (CNP) nije pokazao inhibicijski učinak (Dobrivojević i sur. 2012).

BNP je otkriven u mozgu i prema tome nazvan, ali se zapravo proizvodi u srcu i njegova glavna funkcija je regulacija kardiovaskularnog sustava. ANP i BNP mogu također služiti kao markeri za Alzheimerovu bolest kao i kod moždanog udara i vjerojatno su povezani sa patofiziološkim mehanizmima ovih bolesti.

CNP je uglavnom eksprimiran u centralnom živčanom sustavu, kostima i krvnim žilama. U hipotalamusu ekspresija CNP-a je 50 puta veća u usporedbi sa ANP-om i BNP-om. Na sličan, ali učinkovitiji način nego ANP, CNP, kada se aplicira intrakranijalno, inhibira produkciju ADH inhibirajući Ca^{2+} kanale L tipa (Sinđić i sur. 2011).



Slika 6. Signalni put bradikininu i natriuretskih peptida u HEK-293 stanicama. Vežanje bradikininu (BK) na receptor tipa 2 (B_2R) dovodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC) te posljedičnog povećanja intracelularne koncentracije Ca^{2+} . Zbog povećanja intracelularnog Ca^{2+} , Ca^{2+} ovisni Cl^- kanali se aktiviraju i uzrokuju depolarizaciju membrane. Natriuretski peptidi (atrijski natriuretski peptid, moždani natriuretski peptid te urodilatin) povećavaju intracelularni cGMP aktivacijom gvanilat ciklaze A (GC-A), stoga se aktivira cGMP ovisna protein kinaza (PKG), koja regulira aktivnost K^+ kanala ovisno o koncentraciji. PKG također aktivira RGS proteine (proteini koji reguliraju G-proteine) koji zatim inhibiraju G protein vezan uz B_2R . CNP inhibira K^+ kanale preko NPR-Bi receptora, varijacije gvanilat ciklaze B (GC-B), koji ne stvara intracelularni cGMP i zbog toga nije uključen u inhibiciju bradikininskog signalnog puta. Inhibitori su: HOE 140 (inhibitor B_2R), Ba^{2+} (blokator K^+ kanala), NPPB (Ca^{2+} ovisni Cl^- kanal blokator), U-73122 (PLC inhibitor), CCG-63802 (inhibitor RGS proteina), 2-aminoetoksifenil borat (2-APB; inozitol 1,4,5-trifosfat receptor blokator (IP_3)), KT 5823 (PKG inhibitor) i aktivator: 8-Br-cGMP (analog od cGMP za permeabilnost membrane). (Modificirano prema Dobrivojević i sur. 2012).

1.3.3. Gvanilin i urogvanilin

Prije skoro pola stoljeća je pokazano da unos soli *per os* dovodi do veće natriureze nego sol unesena i.v. što je omogućilo razvoj istraživanja crijevnih natriuretskih hormona (Lannane i sur. 1997). Regulacija apsorpcije soli i vode iz probavnog sustava kritična je za održavanje volumena tekućine. Kontrola ovih životno

važnih aktivnosti je povezana s hormonima, neurotransmiterima i lokalno djelujućim faktorima (Forte i Currie 1995).

GN i UGN su peptidi koji pripadaju obitelji cikličnog gvanozin 3'-5' monofosfata (cGMP). Otkriće GN-a i UGN-a proizlazi iz istraživanja staničnih mehanizama kod sekretornog oblika proljeva uzrokovanog crijevnim bakterijama. GN i UGN aktiviraju zajednički receptor gvanilat ciklazu (R-GC) koji izaziva veliki porast u crijevnom izlučivanju klorida i bikarbonata preko unutarstaničnog sekundarnog glasnika, cGMP. Ovi peptidi su endogeni peptidni hormoni koji reguliraju R-GC signalizacijske proteine u ciljnim stanicama. Fiziološki uloge ovih peptida uključuju regulaciju ravnoteže epitelnih stanica u probavnom epitelu i modulaciju ravnoteže natrija djelovanjem u bubregu.

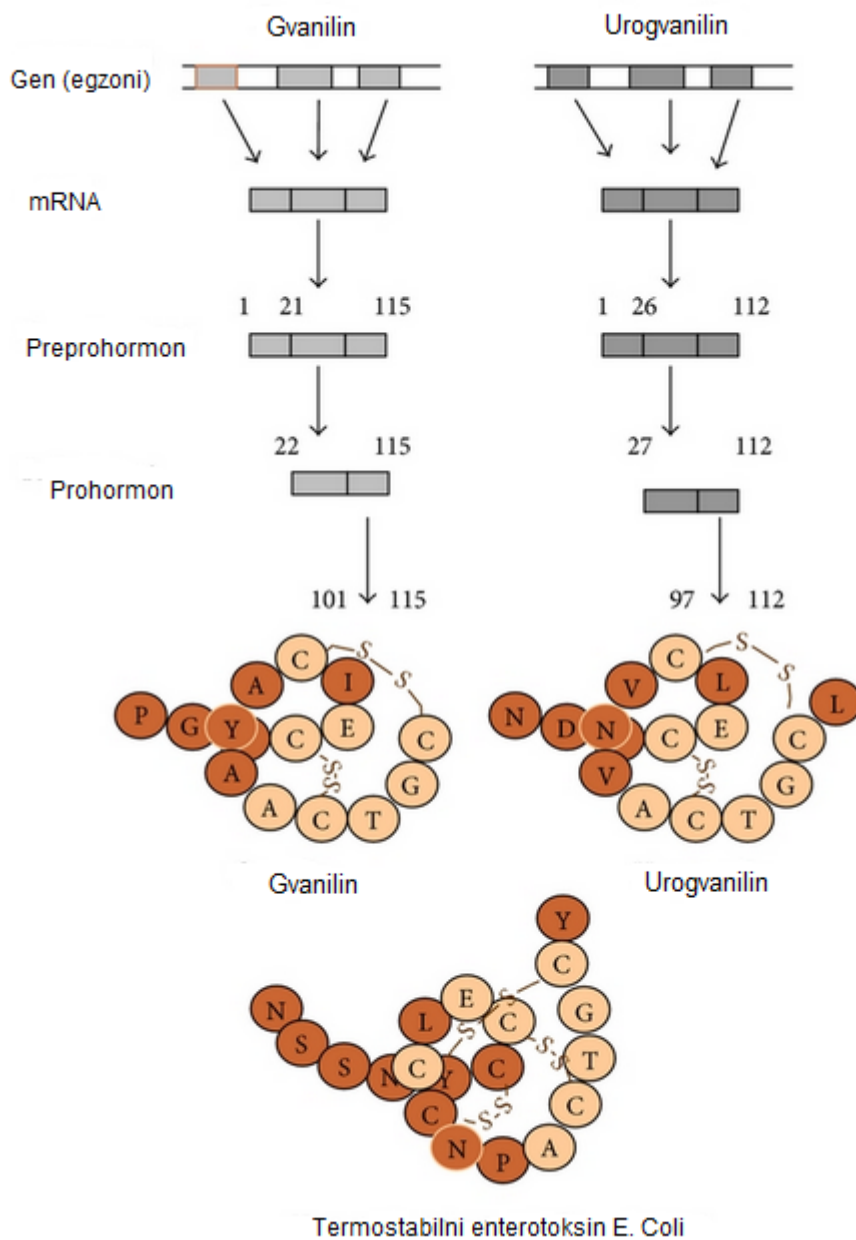
GN i UGN su predloženi kao novi terapijski pristup koji ciljaju na receptore u crijevima, bubrezima i ostalim epitelima. Na primjer, UGN ima anti-tumorsko djelovanje za stanice raka debelog crijeva u ljudi. Ostali primjeri potencijalnih terapijskih primjena gvanilinskih peptida su: sindrom iritabilnog crijeva, oblik visokog krvnog tlaka koji ovisi o solima, regeneracija jetre i bolesti dišnog sustava kao što je astma (Forte i sur. 2004).

Postojanje gvanilinskih peptida vrlo rano u evoluciji i u svim dosad testiranim životinjama (sisavci, ptice, ribe) govori u prilog važnosti ovog sustava u održavanju homeostaze vode i elektrolita u organizmu uz već postojeće sustave, kao što su sustav renin-angiotenzin-aldosteron, antidiuretski hormon i drugi natriuretski peptidi, uključujući ANP, BNP i CNP (Comrie i sur 2001; Krause i sur. 1997).

Gvanilinski peptidi su mali peptidi veličine 15–19 aminokiselina. Lomljenjem dviju disulfidnih veza dolazi do inaktivacije peptida. Egzogeni agonist GC-C, ET ima tri disulfidne veze i pretpostavlja se da je to razlog za snažniju aktivaciju GC-C te posljedični proljev.

Ljudski GN je peptid od 15 aminokiselina. Kao i GN posjeduje dvije disulfidne veze između 4. i 12. te 7. i 15. aminokiseline od N-terminalnog kraja molekule (Slika 7.) (de Sauvage i sur. 1992). GN cirkulacijom putuje do bubrega, gdje se filtrira te djeluje na apikalne (luminalne) strane stanica bubrežnih tubula (Hamra i sur. 1996).

GN često možemo naći u literaturi i pod drugim nazivom, GCAP–1 tj. peptid koji aktivira gvanilat ciklazu - 1 (Guanylat cyclase activating peptide – 1).



Slika 7. Geni koji kodiraju gvanilin urogvanilin i struktura gvanilina, urogvanilina i termostabilnog enterotoksina E. coli (Modificirano prema Sindić 2013.).

Ljudski UGN je peptid od 16 aminokiselina. Kao i GN posjeduje dvije disulfidne veze između 4. i 12. te 7. i 15. aminokiseline od N-terminalnog kraja molekule (Slika

7.) (Kita i sur. 1994). Cirkulirajući oblik UGN, koji se sastoji od 24 aminokiseline, nazivamo još i GCAP-2 (Guanylat cyclase activating peptide – 2) (Hess i sur. 1995).

Na prvom ljudskom kromosomu smješteni su geni koji kodiraju sintezu natriuretskih peptida (ANP, BNP, GN i UGN). Ljudski GN i UGN su kodirani genima koji se sastoje od 3 egzona i 2 introna (Hill O i sur. 1995). Oba peptida se sintetiziraju u formi prepropeptida (Slika 7.). Cijepanjem ljudskog preprogvanilina, koji ima 115 aminokiselina, nastaje progvanilin, koji se sastoji od 94 aminokiseline (de Sauvage 1992). Ljudski prourogvanilin ima 112 aminokiselina, a njegovim cijepanjem nastaje prourogvanilin dužine 86 aminokiselina (Miyazato i sur. 1996).

GN se u plazmi nalazi kao proGN30-40 pM (Kuhn i sur. 1993). Probavni sustav je glavni izvor GN i UGN u plazmi (Kinoshita i sur 1997), iako probavni sustav ne izlučuje gvanilinske peptide samo u krv već i u lumen crijeva, gdje peptidi imaju autokrinu i parakrinu ulogu.

Izlučivanje gvanilinskih peptida u lumen crijeva je regulirano aktivacijom acetilkolinškog receptora karbaholom pa se pretpostavlja da se kontrola izlučivanja vrši putem parasimpatikusa tj. n. vagusa (Martin i sur 1999; Moro i sur 2000). mRNA za GN se također nalazi u nadbubrežnoj žlijezdi, bubregu te reprodukcijском sustavu (Schulz i sur. 1992), a mRNA za UGN, osim u bubregu, nalazi se u plućima i pankreasu (Li i sur. 1992). Pretpostavlja se da sinteza gvanilinskih peptida u ekstraintestinalnom tkivu ima jedino lokalnu parakrino/autokrinu ulogu.

Do sada je pokazano da agonisti GC-A, ali ne i GC-B mogu inhibirati signalni put BK u HEK293 stanica. U ovom radu pokušala sam odgovoriti na pitanje da li i agonisti GC-C, GN i UGN mogu također djelovati na signalni sustav BK te u budućnosti koristiti kao potencijalni lijekovi ne samo za astmu i tumore crijeva već i u prevenciji moždanog edema koji se razvija nakon moždanog udara.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZA: gvanilinski peptidi kao agonisti GC-C inhibiraju signalni sustav BK i time mogu smanjiti posljedice moždanog udara.

U svrhu potvrđivanja hipoteze, određen je niz specifičnih ciljeva:

1. istražiti učinke GN i UGN na HEK293 stanicama
2. odrediti učinke GN i UGN na učinak bradikininina na HEK293 stanicama
3. odrediti mehanizam djelovanja gvanilinskih peptida na signalni sustav BK

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična kultura

Divlji tip stanica HEK-293 (WT HEK-293) nasađen je na stakalca metodom tripsinizacije. Kada su stanice dosegle konfluenciju od oko 80% isprane su s 5 ml otopine Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma Aldrich Chemie GmbH), te nakon toga s 10 ml otopine HBSS bez Mg^{2+} i Ca^{2+} .

Nakon odstranjenja medija, tijekom 1 minute primijenjen je 1 ml otopine 0.25% tripsina (Sigma Aldrich Chemie GmbH) i 0.02% EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH) kako bi se stanice odvojile od podloge posude za staničnu kulturu, nakon čega su centrifugirane 4 minute na 1000 okretaja/min u mediju za prekid tripsinizacije (5 ml HBSS bez Mg^{2+} i Ca^{2+} kojem je dodano 1 ml 10%-tnog seruma goveđeg fetusa (eng. *Fetal Bovine Serum* - FBS; Sigma Aldrich Chemie GmbH)). Supernatant je bačen, a stanice su resuspendirane u 10 ml medija za održavanje Eagle mediju prilagođenom po Dulbeccou (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM; Sigma Aldrich Chemie GmbH) te presađene u nove posude za staničnu kulturu te na pokrovna, prethodno sterilizirana, stakalca smještena u petrijeve posudice veličine 3 cm.

Inicijalna kultura stanica obilježena je kao P0, a svaka slijedeća subkultura (pasaža) obilježena je brojem koji označava broj izloženosti tripsinu (P1, P2, P3, itd.). Stanice su održavane u DMEM mediju koji sadrži 3.7 g/l $NaHCO_3$, uz dodanih 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich Chemie GmbH), 10 ml/l Penicilin/Streptomicina (10000 E/10000 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH) i 10% FBS-a. Stanice su održavane u atmosferi s 5% CO_2 /95% zraka na 37°C (Lehner i sur. 2007).

3.2. Metoda priklještenih potencijala (Whole cell patch clamp)

Metodu *Patch clamp* prvi su koristili Neher i Sakman (1976). Metoda koju su koristili, i naknadne dorade, dovele su do tehnike sa visokom rezolucijom snimanja tijeka električnog naboja na pobuđenim membranama (Neher i Sakman 1976).

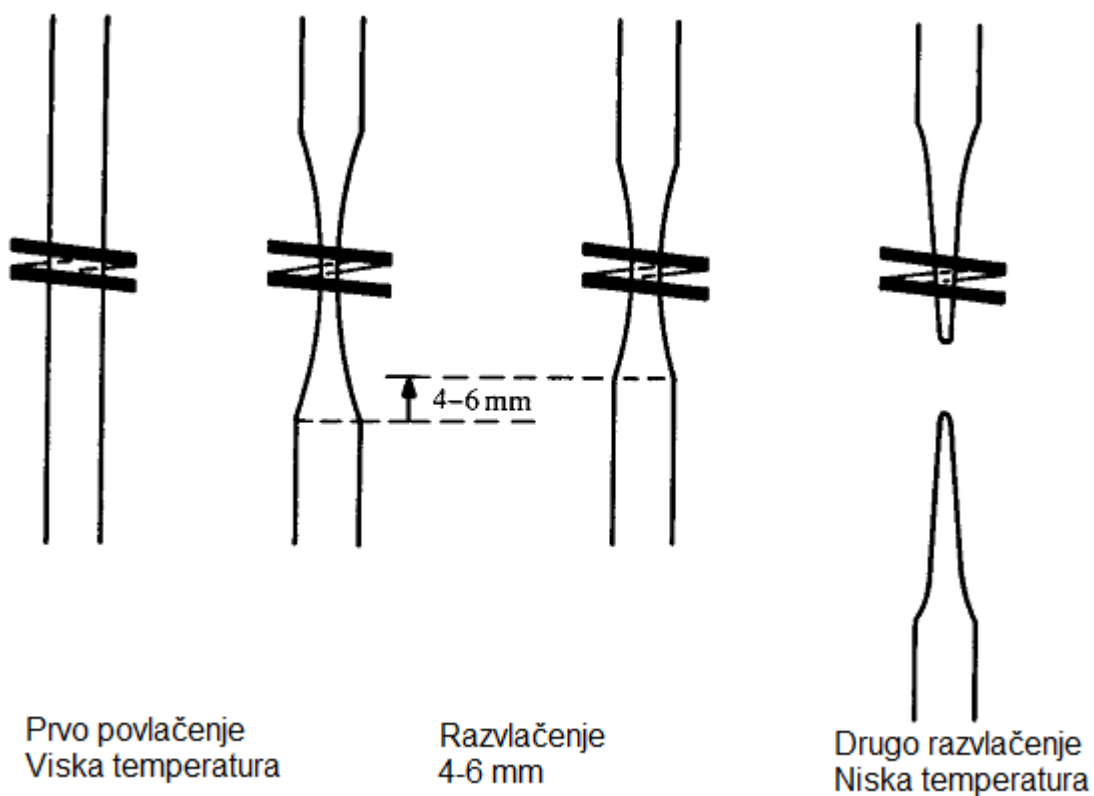
Predmetna stakalca sa stanicama HEK 293, postavljaju se na dno perfuzijske komorice te se smještaju na inverzni mikroskop. Modificirana Ringerova otopina koja sadrži 145 mmol/l NaCl, 1.6 mmol/l K_2HPO_4 , 0.4 mmol/l KH_2PO_4 , 5 mmol/l D-glukoze, 1.03 mmol/l $MgCl_2$ i 1.3 mmol/l kalcij glukonata, pH 7.4 koristi se kao osnovna otopina za izvođenje pokusa. Sve tvari korištene u istraživanju su otopljene u ovoj modificiranoj Ringerovoj otopini. Pokus se provodi na temperaturi od 37 °C sa brzinom protoka Ringerove otopine od 10 ml/min. Patch-clamp pipete pune se otopinom koja sadrži 95 mmol/l kalij glukonata, 30 mmol/l KCl, 4.8 mmol/l Na_2HPO_4 , 1.2 mmol/l NaH_2PO_4 , 5 mmol/l D-glukoze, 0.73 mmol/l kalcij glukonata, 1 mmol/l EGTA, 1.03 mmol/l $MgCl_2$ i 1 mmol/l ATP, pH 7.2. U istu otopinu dodaje se 160 μ mol/l nistatina, kako bi se razgradila membrana i omogućio pristup staničnom citosolu, tada je otopina u pipeti i elektroda u direktnom električnom kontaktu sa citoplazmom. S obzirom da je volumen stanice zanemariv u usporedbi sa onim u pipeti, sastav intracelularne tekućine može se smatrati istim onome u pipeti (Schlatter i Schafer 1987).

Membranski potencijal (V_m) mjeri se pomoću *patch-clamp* pojačala (SEC05-LX npi) i bilježi pomoću HeKa-TIDA računalnog programa. *Patch clamp* pipete imaju početni otpor od 8-12 M Ω .

U konvencionalnoj metodi, pipeta se ručno pomiče ispod optičkog mikroskopa i kada se izabere određena stanica pipeta se postavlja na površinu stanice. Tada nastaje čvrsti spoj nježnim uvlačenjem membrane u pipetu (Walz 2007).

3.3. Pipete za patch clamp

Na posebnom uređaju staklena cjevčica se razvlači u pipete pomoću zagrijavanja na dvije temperature. Gravitacijska sila vuče donji dio cjevčice i razvlači ju u uski vrh (Slika 8.) (Molleman A, 2003).



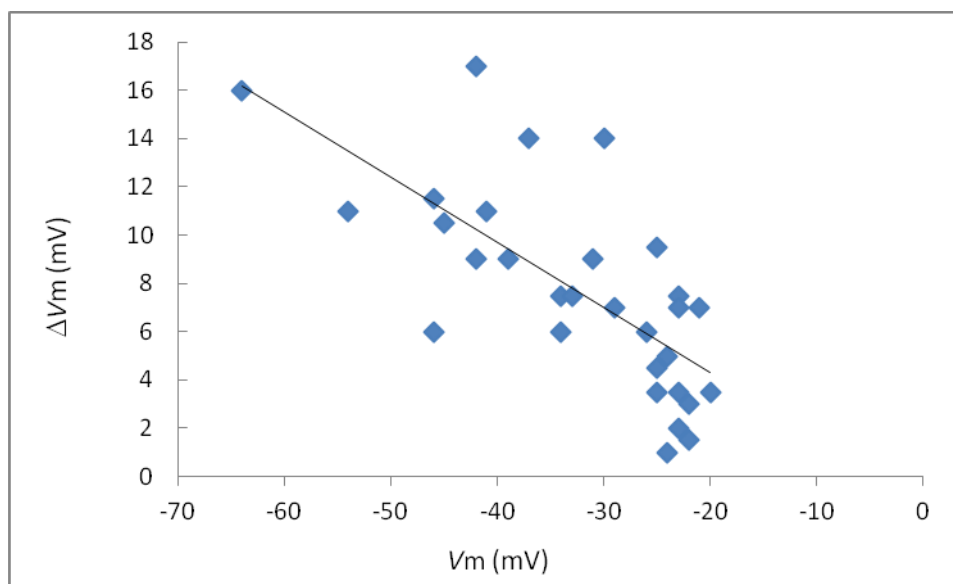
Slika 8. Pravljenje pipeta tehnikom zagrijavanja i povlačenja (Modificirano prema Molleman A, 2003)

3.4. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistička značajnost je određena na razini $p < 0,05$. Sva statistička obrada rezultata provedena je InSTAT kompjuterskim programom.

4. REZULTATI

Da bih istražila interakciju između gvanilinskih peptida i BK koristila sam stanice HEK293. Stanice sam koristila od 231. do 251. Pasaže, te 5-10 dana nakon tripsinacije. Početni V_m je iznosio $-35,9 \pm 1,9$ mV ($n = 44$). Prije svakog pokusa, da bih testirala vijabilnost stanica, testirala sam odgovor na hiperkalijemiju porastom koncentracije K^+ sa 3,6 mM na 18,6 mM što je rezultiralo staničnom depolarizacijom od $11,4 \pm 1,8$ mV ($n = 41$). Kako i početni V_m i odgovor na hiperkalijemiju ovisi o vodljivosti stanične membrane za K^+ postoji korelacija između tih vrijednosti ($r = -0,71$) što je prikazano na slici 9. Osnovne vrijednosti HEK293 stanica te promijene membranskih potencijala pod djelovanjem gvanilinskih peptida prikazani su na tablici 2.



Slika 9. Kalijski odgovor u odnosu na V_m ($r = -0,71$)

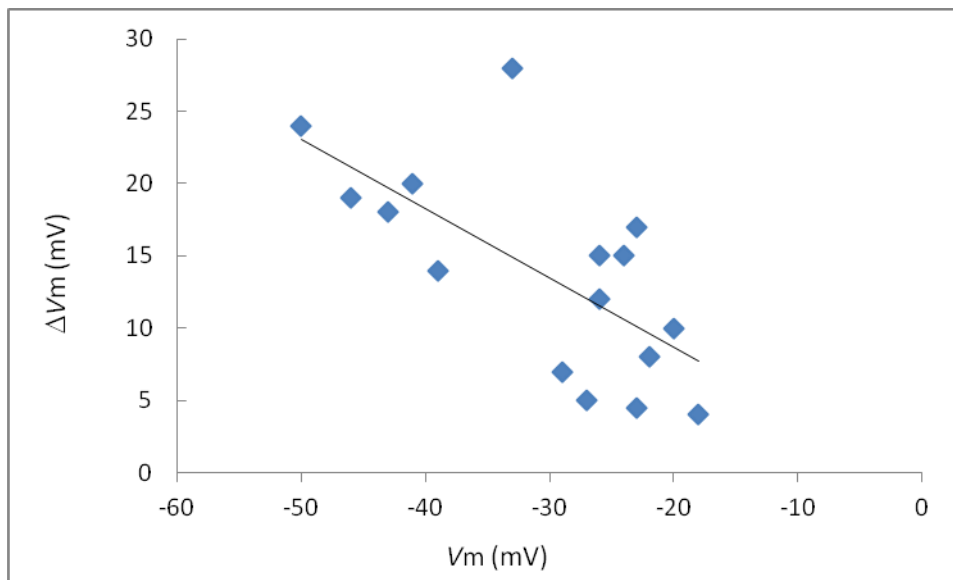
Tablica 2. Karakteristike HEK293 stanica te učinci natriuretskih peptida i bradikina na membranski potencijal (V_m)

	mV	n
V_m	$-35,9 \pm 1,9$	44
ΔK^+ (18.6 mM)	$11,4 \pm 1,8$	41
ΔBa^{2+} (1 mM)	$14,4 \pm 1,8$	15
$\Delta 8$ -bromo-cGMP (100 μ M)	$2,5 \pm 0,6$	5
Δ GN (10 nM)	$1,7 \pm 0,2$	12
Δ UGN (10 nM)	$2,9 \pm 0,5$	9
Δ BK (100 nM)	$2,0 \pm 0,3$	11

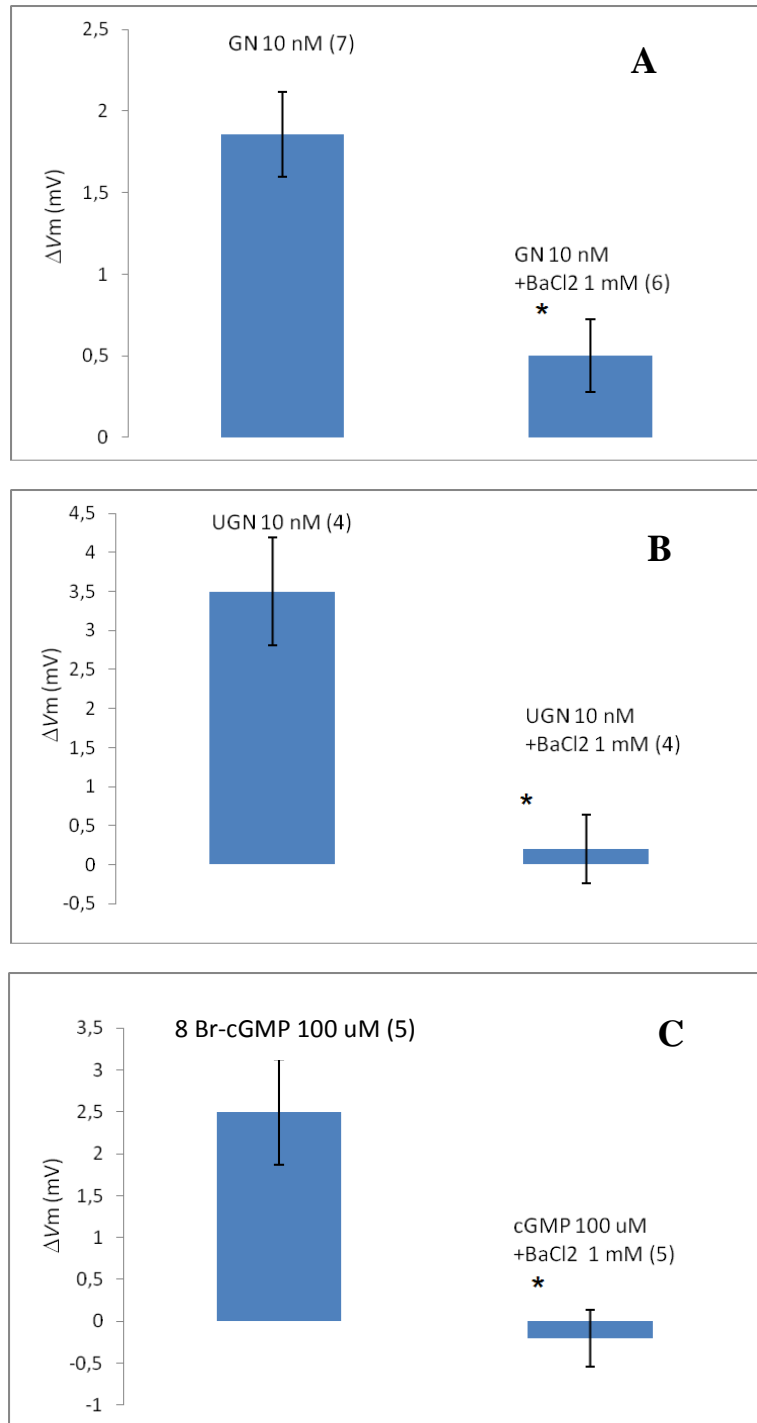
Rezultati znače n = broj eksperimenata, Δ razliku u naponu membrane prije i poslije kontrole, V_m početni V_m , GN gvanilin, UGN urogvanilin, BK bradikinin, $\Delta 8$ -bromo-cGMP – membranski propustan cGMP

Kako je do sada pokazano da depolarizacija stanica HEK293 uzrokovana BK (100 nM) nastaje zbog djelovanja ovog hormona na Ca^{2+} ovisne Cl^- kanale. Da bih otklonila mogućnost da BK i gvanilinski peptidi djeluju na iste ionske kanale odredila sam nastanak depolarizacije GN (Slika 10A) i UGN (Slika 10 B) na stanicama HEK293 te njihovog drugog glasnika cGMP-a (Slika 10C). Kako stanična depolarizacija može nastati promjenom aktivnosti različitih vrsta ionskih kanala, a poznato je da u većini staničnih modela natriuretski peptidi djeluju na K^+ kanale koristila sam nespecifični inhibitor K^+ kanala $BaCl_2$ (1 mM). Inhibicijom svih K^+ kanala $BaCl_2$ (1 mM) snažno depolarizira staničnu membranu (Tablica 2.). Kako i ova depolarizacija ovisi o sveukupnoj vodljivosti membrane za K^+ (što je više K^+ kanala otvoreno to je i učinak inhibicije na V_m veći) kao i početni V_m te odgovor na hiperkalijemiju, stavila sam u odnos početni V_m i depolarizacijski odgovor stanice na $BaCl_2$ (Slika 10.).

Kao što je prikazano (slika 11.) pod djelovanjem inhibitora K^+ kanala depolarizacija nastala djelovanjem GN, UGN te 8-Br cGMP-a u potpunosti nestaje radi čega mogu zaključiti da je ona nastala inhibicijom K^+ kanala djelovanjem ovih tvari.

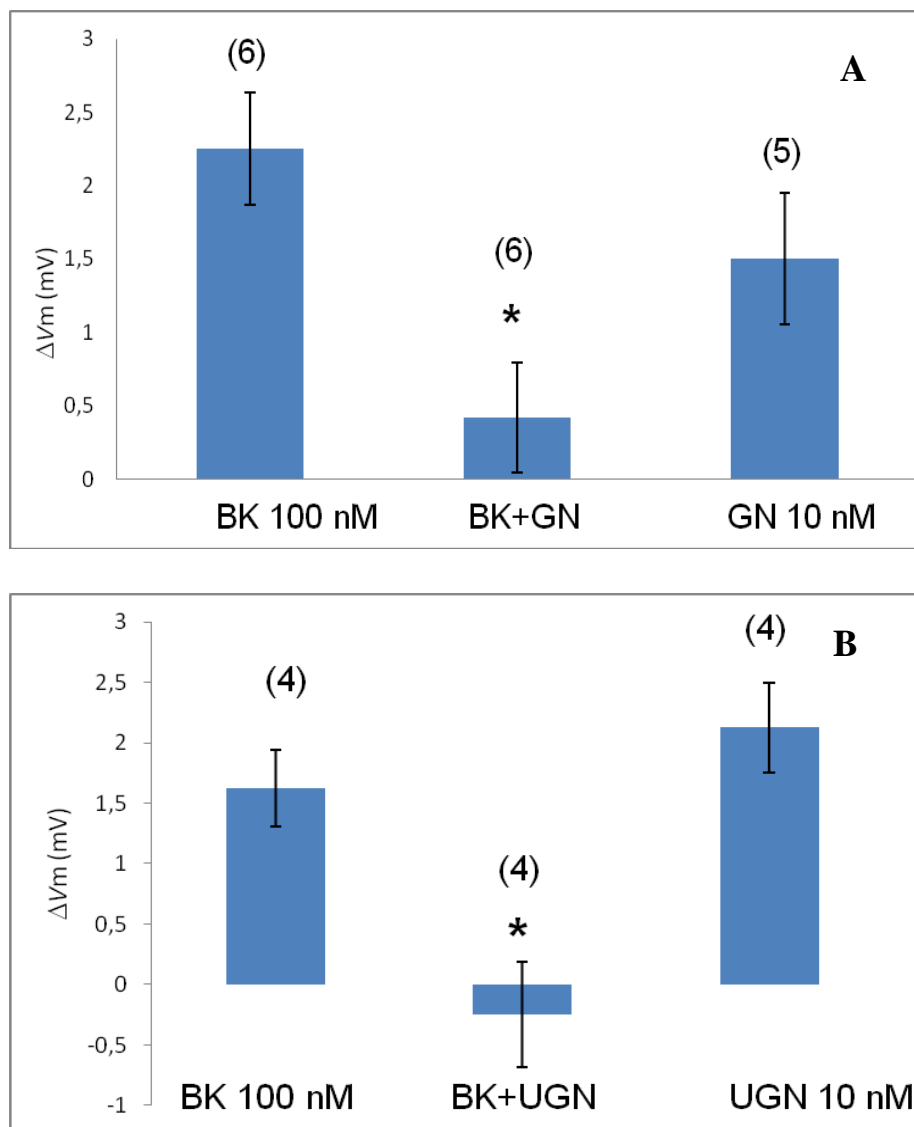


Slika 10. Odnos depolarizacijskog učinka $BaCl_2$ (1 mM) i početnog V_m ($r = -0,68$)



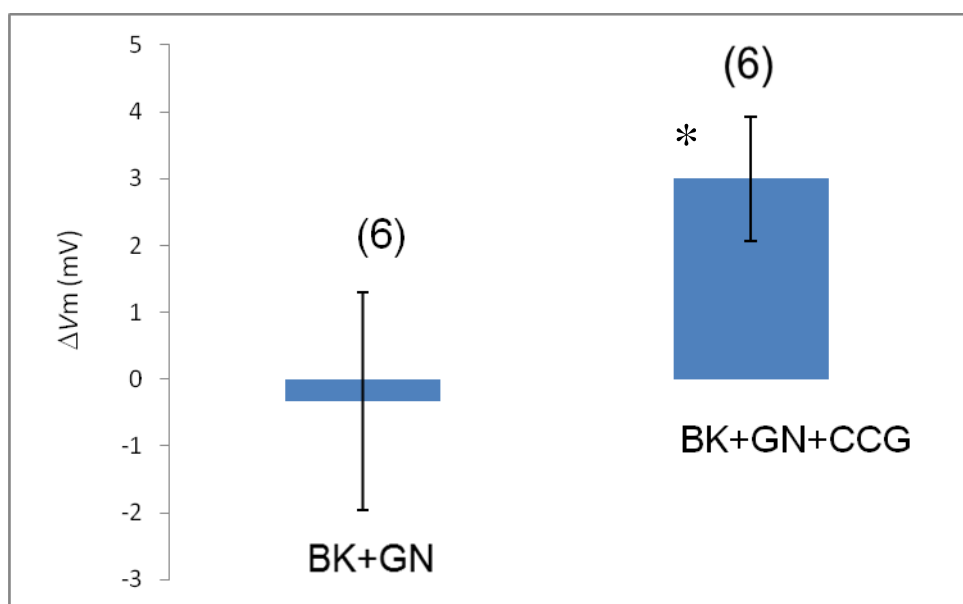
Slika 11. Učinak inhibitora K^+ kanala na depolarizacijski učinak GN (A), UGN (B) te 8-Br cGMP-a (C) na HEK293 stanicama. Depolarizacijski učinak gvanilina (GN), urogvanilina (UGN) te analoga cGMP-a koji prolazi kroz staničnu membranu (8 -Br cGMP) je u potpunosti nestao pod djelovanjem inhibitora K^+ kanala. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Broj izvedenih pokusa je prikazan u zagradi. * označava statističku značajnost na razini $p < 0,05$.

Kada sam ustvrdila da ionski kanali na koje BK te gvanilinski peptidi djeluju mogla sam ispitati da li GN i UGN inhibiraju depolarizacijski učinak BK kao što je ranije prikazano za agoniste GC-A.



Slika 12. Učinak GN (A) i UGN (B) na depolarizacijski učinak BK na HEK293 stanicama. Iako bradikinin (BK 100 nM) kao i gvanilin (GN 10 nM) te urogvanilina (UGN 10 nM) depolariziraju staničnu membranu HEK293 stanica, kada ih apliciramo zajedno depolarizacijski učinak se gubi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj izvedenih pokusa je prikazan u zagradi. * označava statističku značajnost na razini $p < 0,05$.

Agonisti GC-A (ranije publicirani rezultati) aktivacijom PKG te posljedično aktivacijom RGS proteina inhibiraju signalni put BK. U ovom radu sam pretpostavila da i agonisti GC-C, djeluju jednakim mehanizmom. Kao što je prikazano na slici 13. inhibicijski učinak GN je blokiran djelovanjem inhibitora RGS proteina CCG-63802 (vidi sliku 6).



Slika 13. Inhibitor RGS proteina blokira učinak GN na signalni sustav BK. Nakon dodavanja inhibitora RGS proteina (CCG-63802) i u prisutstvu gvanilina (GN 10 nM), bradikinin (BK 100 nM) ponovno pokazuje svoj depolarizacijski učinak na staničnu membranu HEK293 stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Broj izvedenih pokusa je prikazan u zagradi. * označava statističku značajnost na razini $p < 0,05$.

5. RASPRAVA

Moždani udar je danas među tri vodeća uzroka smrtnosti poglavito i radi činjenice što trenutno ne postoji učinkovito terapijsko sredstvo u liječenju ove opake bolesti. Najčešći moždani udar koji se razvija u ljudi je ishemijski moždani udar nastao začepljenjem moždanih arterija. Ishemijski moždani udar dovodi do nastanka edema mozga (Hossmann i sur 1980; Unterberg i sur. 2004) čijim se vodećim uzrokom smatra aktivacija BK (Wahl i sur. 1996; Zausinger i sur. 2002). BK je osim za razvoj edema u ishemijskom moždanom udaru, važan i u razvoju drugih patoloških stanja kao na primjer hereditarnog angio-edema (Bas i sur. 2007) te migraciji stanica raka prostate (Baeki i Daaka 2001). Do sada poznati mehanizam djelovanja BK pri nastanku moždanog udara uključuje aktivaciju njegovog B₂R receptora te posljedičnog povećanja permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilatacije te posljedičnog nastanka edema. S obzirom da uporabom specifičnih inhibitora ovog tipa BK receptora dolazi do smanjenja moždanog edema, veličine oštećenja mozga s posljedičnim poboljšanjem neurološkog ishoda (Relton i sur. 1997; Zausinger i sur. 2003) postoji potreba za istraživanjem terapijskih svojstava inhibitora B₂ receptora.

Iako su sve komponente sustava kalikrein/kinin te BK i oba tipa BK receptora identificirani kako u zdravom tako i u moždanom tkivu nakon ishemijske ozljede (Raidoo i sur. 1996; Wagner i sur. 2002; Kariya i sur. 1985), uloga u patološkim zbivanjima je višestruka, dok uloga u zdravom mozgu još nije do kraja razjašnjena. Tijekom ishemijske ozljede mozga dolazi do stvaranja upalnih čimbenika u astrocitima, aktivacije mikroglije te povećanje permeabilnosti otvarajući krvno-moždanu barijeru (Schwaninger i sur. 1999; Noda i sur. 2003). U životinja kojima nedostaje BK receptor tipa 2 dolazi do smanjenog stvaranje moždanog edema i bržeg oporavka nakon ishemijske ozljede mozga (Groger i sur. 2005).

Također je poznato da su vrijednosti natriuretskih peptida u plazmi povišene u osoba s ishemijskim moždanim udarom te ostaju više od normalnih i do 7 dana nakon oštećenja mozga (Estrada i sur. 1994) te da natriuretski peptidi imaju pozitivan učinak na smanjenje intersticijskog edema još nepoznatim mehanizmom (Rosenberg i Estrada 1995). Nadalje, neadekvatna funkcije ANP-a i njegovog receptora GC-A

nastalog genetskim polimorfizmom dovodi do povećanog rizika od moždanog udara u ljudi (Rubattu i sur. 1999; 2004), što ukazuje na moguću ulogu natriuretskih peptida u ishemijskoj ozljedi mozga. Svi natriuretski peptidi i njihovi receptori su pronađeni u mozgu (Laney i sur. 1992). Iako je uloga gvanilinskih peptida u mozgu nejasna, nedavno istraživanje Gong i sur. 2011.god. ukazuje na moguću važnu ulogu agonista GC-C u nastanku sindroma deficita pažnje/hiperaktivni poremećaj (ADHD) i šizofrenije. Dopaminergički neuroni su uključeni u regulaciju ponašanja te posjeduju GC-C na svojoj staničnoj membrani. Agonisti GC-C su predloženi kao novo moguće terapijsko sredstvo u poremećajima koji uključuju dopaminergičke neurone (Gong i sur. 2011).

U dosadašnjem istraživanju našeg laboratorija (Laboratorij za neurofiziologiju – whole cell patch clamp na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga) dokazan je učinak inhibicije depolarizacijskog učinka BK na HEK293 stanicama te njegovog učinka na porast unutarstanične koncentracije Ca^{2+} ANP-om, BNP-om i URO-om kao agonistima GC-A, ali ne i CNP-om (agonist GC-B) (Dobrivojevic i sur. 2012). U ovom radu pokazala sam da i agonisti GC-C, GN i UGN inhibiraju signalni put BK kao što je pokazano za agoniste GC-A.

Depolarizacijski učinak BK u ovim stanicama nastaje aktivacijom B_2R te posljedičnim porastom unutarstanične koncentracije kalcija koji aktiviraju kalcijski ovisne kloridne kanale. Do depolarizacijskog učinka gvanilinskih peptida dolazi inhibicijom K^+ kanala što sam pokazali nestankom učinka prilikom primijene nespecifičnog inhibitora K^+ kanala $BaCl_2$. Aktivacijom GC-C gvanilinskim peptidima dolazi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a koji također depolarizira staničnu membranu te njegov učinak također nestaje prilikom primijene $BaCl_2$ (u ovom radu sam koristila membranski permeabilni analoga cGMP-a, 8-Br-cGMP). S obzirom da gvanilinski peptidi i BK mijenjaju aktivnost različitih vrsta ionskih kanala pritom dovodeći do depolarizacije HEK293 stanica, međudjelovanje njihovih signalnih putova nije locirano na mjestu ionskog kanala već negdje drugdje duž signalne kaskade.

Poznato je da aktivacija GC dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a, posljedično dovodi do aktivacije PKG-a koja aktivira RGS proteine

(Tokudome i sur. 2008). Koristeći specifični inhibitor proteina RGS (CCG-63802) u našem dosadašnjem istraživanju pokazali smo da je aktivacija RGS proteina agonistima GC-A (Dobrivojevic i sur. 2012) mehanizam njihovog inhibicijskog djelovanja na signalni sustav BK što sam uspješno ponovila i za agoniste GC-C, GN i UGN.

Ovo je prvi rad koji opisuje učinak signalnih mehanizama gvanilinskih peptida na signalni put BK u HEK-293 stanicama. Kao prirodni antagonisti signalnog puta B₂R, mogli bi imati pozitivne učinke u patološkim stanjima u kojima je BK posreduje, poput ishemijskog moždanog udara gdje aktivacijom B₂ receptora inducira povećanje permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilataciju i nastanak moždanog edema. Ovaj rad smješta agoniste GC-C, GN i UGN uz bok atrijskog natrijetskog peptida i urodilatina kao mogućeg prirodnog antagonista BK za vrijeme moždanog udara i razvoja moždanog edema te je još skupina hormona koji mogu poslužiti u razvoju novih metoda liječenja moždanog udara posebice moždanog edema.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu pokazala sam da agonisti GC-C, GN i UGN inhibiraju signalni put BK djelovanjem na RGS proteine kao što je i ranije pokazano za agoniste GC-A.

Na stanicama HEK293

1. GN i UGN kao i njihov drugi glasnik cGMP depolariziraju staničnu membranu inhibicijom K^+ kanala
2. GN i UGN inhibiraju djelovanje bradikininskog signalnog puta inhibirajući depolarizaciju stanica HEK293 nastalih djelovanjem bradikinina te zbog toga možemo pretpostaviti da gvanilinski pepidi mogu smanjiti posljedice moždanog udara
3. ovaj inhibicijski učinak gvanilinskih peptida nastaje aktivacijom proteina RGS proteina koji posljedično inhibira G-protein vezan uz tip 2 bradikininski receptor

7. LITERATURA

1. Baeki-Harrington L, Daaka Y. Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells. *J Urol* 2001;165:2121-25.
2. Bas M, Adams V, Suvorava T, Niheus T, Hoffmann TK, Kojda G. Nonallergic angioedema: role od bradykinin. *Allergy* 2007;62:842-56.
3. Bhandari R, Suguna K, Visweswariah SS. Guanylyl cyclase C receptor: regulation of catalytic activity by ATP. *Bioscience Rep* 1999;19:179-88.
4. Charney AN, Egnor RW, Aleksander-Chacko JT, Zahara V, Mann EA, Giannella RA. Effect of *E. coli* heat-stable enterotoxin on colonic transport in guanylyl cyclase C receptor deficient mice. *Am J Physiol* 2001;280:G216-21.
5. Comrie MM, Cutler CP, Cramb G. Cloning and expression of guanylin from the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1078-85.
6. de Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV. Precursor, structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9089-93.
7. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-397.
8. Dobrivojević M, Sinđić A, Edemir B, Kalweit S, Forssmann WG, Hirsch JR. Interaction between bradykinin and natriuretic peptides via RGS protein activation in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell* 2012;303:C1260-8.
9. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Fernández Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens* 1994;7:1085-9.
10. Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Forte LR. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology* 1997;138:4636-48.

11. Forte LR Jr, Currie MG. Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *The FASEB Journal* 1995;vol.9 no 8 643-650.
12. Forte LR Jr. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther* 2004;104:137-62.
13. Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3571-5.
14. Garbers DL. The guanylyl cyclase receptors. *Methods* 1999;19:477-84.
15. Golias Ch, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. *Hippokratia* 2007;11:124–128.
16. Gong R, Ding C, Hu J, Lu Y, Liu F, Mann E, Xu F, Cohen MB, Luo M. Role for the membrane receptor guanylyl cyclase-C in attention deficiency and hyperactive behavior. *Science* 2011;16;333(6049):1642-6.
17. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, Plesnila N. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:978-89.
18. Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 1995;73:51-63.
19. Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 1992;56:131-190.
20. Hamra FK, Fan X, Krause WJ, Freeman RH, Chin DT, Smith CE, Currie MG, Forte LR. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology* 1966;137:257-65.
21. Hamra FK, Krause WJ, Eber SL, Freeman RH, Smith CE, Currie MG, Forte LR. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. *Am J Physiol* 1996;270:G708-16.

22. Hasegawa M, Hidika Y, Wada A, Hirayama T, Shimonishi Y. The relevance of N-linked glycosylation to the binding of a ligand to guanylate cyclase C. *Eur J Biochem* 1999;263:338-45.
23. Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, Adermann K, Kaever V, Cetin Y, Wolf-Georg F. GVAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett* 1995;374:34-8.
24. Hill O, Kuhn M, Zucht HD, Cetin Y, Kulaksiz H, Adermann K, Klock G, Rechkemmer G, Forssmann WG, Mägert HJ. Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2046-50.
25. Hirsch JR, Meyer M, Forssmann WG. ANP and urodilatin: who is who in the kidney?. *Eur J Med Res* 2006;11:1-8.
26. Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. Pathophysiological observations. *Stroke* 1980;11:583-92.
27. Juilfs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA. The subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3388-95.
28. Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* 1985;44:1892-7.
29. Kaushik P, Mukhopadhyay Pradip, Gosh Sujoy, Subhankar Chowdhury. Natriuretic peptides: Diagnostic and therapeutic use. *Indian J Endocrinol Metab* 2011; 345-353.
30. Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, Hisanaga S, Eto T. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular form in renal diseases. *Kidney Int* 1997;52:1028-34.
31. Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, Kachur JF, Hamra FK, Pidhorodeckyj NV, Forte LR, Currie MG. Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol* 1994;266:F342-8.

32. Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* 1999;19:485-93.
33. Koller K.J., Goeddel D.v., Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors, *Circulation* 1992;86:1081-1088.
34. Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK, Currie MG, Forte LR. Guanylyl cyclase receptors and guanylin-like peptides in reptilian intestine. *Gen Comp Endocrinol* 1997;107:229-39.
35. Kuhn M, Raida M, Adermann K, Schulz-Knappe P, Gerzer R, Heim JM, Forssmann WG. The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett* 1993;318:205-9.
36. Laney DW Jr, Mann EA, Dellon SC, Perkins DR, Giannella RA, Cohen MB. Novel sites for expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am J Physiol* 1992;263:G816-2.
37. Lehner U, Velić A, Schroter R, Schlatter E, Sindić A. Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:181-92.
38. Lennane RJ, Peart WS, Carey R, Shaw J. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med* 1997;49:433-6.
39. Li Z, Perkins AG, Peters MF, Campa JM, Goy MF. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. *Regul Peptides* 1997;68:45-56
40. Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, Lu L, Hurley JB. Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), Ret-GC-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5535-39.
41. Lucas AK, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic cGMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:375-413.

42. Mann EA, Jump L, Wu J, Yee E, Giannella RA. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:463-6.
43. Martin S, Adermann K, Forssmann WG, Kuhn M. Regulated, side-directed secretion of proguanylin from isolated rat colonic mucosa. *Endocrinology* 1999;140:5022-9.
44. Miyazato M, Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Kojima M, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S. Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:644-8.
45. Molleman A. *Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology*. 1. Edition, 2003; England, John Wiley&Sons
46. Moreau ME, Garbacki, Molinaro, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets, *J Pharm Sci* 2005;99:6-38.
47. Moro F, Levenez F, Nemoz-Gaillard E, Pellissier S, Plaisancie P, Cuber JC. Release of guanylin immunoreactivity from the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology* 2000;141:2594-9.
48. Murthy KS, Makhlouf GM. Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). *J Biol Chem* 1999;274:17587-92.
49. Naruse S, Aoki Y, Takei R, Horikawa Y, Ueda S. Effects of atrial natriuretic peptide on ischemic brain edema in rats evaluated by proton magnetic resonance method. *Stroke* 1991;22:61-65.
50. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976;260:799-802.
51. Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 2003;72:1573-81.
52. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD. Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 1996;32:39-47.

53. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1997;28:1430-6.
54. Rosenberg GA, Estrada EY. Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats. *Stroke* 1995;26:874-7.
55. Rubattu S, Ridker PM, Stampfer M, Hennekens CH, Volpe M, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation* 1999;100:1722-6.
56. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke* 2004;35:814-8.
57. Schlatter E, Schafer JA. Electrophysiological studies in principal cell of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membrane Na⁺ conductance. *Pflugers Arch* 1987;409:81-91.
58. Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL. Cloning and expression of guanylin its existence in various mammalian tissues. *J Biol Chem* 1992;267:16019-21.
59. Schulz S, Lopez MJ, Kuhn M, Garbers DL. Distribution of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistance mice. *J Clin Invest* 1997;100:1590-5.
60. Schulz S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in physiological function. *Methods* 1999;19:551-8.
61. Schwaninger M, Sallmann S, Petersen N, Schneider A, Prinz S, Libermann TA, Spranger M. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 1999;73:1461-6.
62. Seebacher T, Beitz E, Kumagami H, Wild K, Ruppertsberg JP, Schultz JE. Expression of membrane-bound and cytosolic guanylyl cyclase in the rat inner ear. *Hearing Res* 1999;127:95-102.
63. Sindić A, Dobrivojević M, Hirsch JH. Natriuretic peptides in brain physiology. *Translational Neuroscience* 2011; 2(3).
64. Sindić A. Current Understanding of guanylin peptides actions. *ISRN Nephrology* 2013;81364.

65. Sobey CG. Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy?. *Br J Pharmacol* 2003;139:1369-1371.
66. Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Arai Y, Schwenke DO, Hino J, Okano I, Kawano Y, Kohno M, Miyatato M, Nakao K, Kangawa K. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation* 2008;117:2329-2339.
67. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129:1021-9.
68. Vaandrager AB, Schulz S, de Jonge HR, Garbers DL. Guanylyl cyclase C is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J Biol Chem* 1993;268:2174-9.
69. Vaandrager AB, von der Wiel E, de Jonge HR. Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. *J Biol Chem* 1993;268:19598-603.
70. Vijayachandra K, Guruprased M, Bhandari R, Munjunath UH, Somesh BP, Srinivasan N, Visweswariah SS. Biochemical characterization of the intracellular domain of the human guanylyl cyclase C receptor provides evidence for a catalitically active homotrimer. *Biochemistry* 2000;39: 16075-83.
71. Wagner S, Kalb P, Lukosava M, Hilgenfeldt U, Schwaninger M. Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke. *Neurol Sci* 2002;202:75-6.
72. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young, AR. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 1996;33:257-263.
73. Walz W. Patch-clamp analysis, advanced techniques. Humana Press 2007; 2nd edition.
74. Waxman SG, Molecular neurology, Section III: Stroke and trauma; Elsevier academic press 2007.
75. Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle H-J. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:602-6.
76. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 MS, a bradykinin B2 receptor antagonist,

on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain res* 2002;950:268-278.

77. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Therapeutical efficacy of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir* 2003;86:205-7.