

A β -arresztinek szerepe a CB₁ kannabinoid receptor működésének szabályozásában

Doktori tézisek

Dr. Gyombolai Pál

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Homolya László, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Sóti Csaba, az MTA doktora, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gyires Klára, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sperlágh Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015

BEVEZETÉS

A 7-transzmembrán receptorok (7TMR-ok)

A 7TMR-ok a plazmamembrán receptorok legnépesebb csoportját alkotják. Élettani jelentőségük is kiemelkedő, szinte nem is lehet olyan szervezeti szabályozó folyamatot említeni, amelyben ne lenne szerepe 7TMR-oknak.

Működésük során a 7TMR-ok heterotrimer G-fehérjéket aktiválnak, és ezen keresztül számtalan sejten belüli jelátviteli útvonalat indíthatnak el. Az utóbbi évtizedben ismertté váltak ezen kívül a 7TMR-ok egyéb, G-fehérjétől független jelátviteli útvonalai is.

A 7TMR-ok G-fehérje aktivációban résztvevő szerkezeti elemei közül központi jelentőségűnek tekintik a receptor citoplazmatikus oldalán, a 3. transzmembrán hélix és a 2. intracelluláris hurok határán elhelyezkedő, konzervált Asp-Arg-Tyr aminosavtripleitet, az ún. DRY motívumot. Ugyanakkor a különböző 7TMR-okkal elvégzett tanulmányok arra is rávilágítottak, hogy a DRY motívum szerepe az egyes receptorok működésében eltérő lehet, így működésének meghatározása egy adott receptor esetében feltétlenül közvetlen vizsgálatokat igényel.

A sejtek, illetve szövetek változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodásának kulcsfontosságú eleme, hogy a külső ingerekre vonatkozó érzékenységüket aktívan befolyásolni tudják. Ezt elsősorban receptoraik válaszkészségének befolyásolásával érhetik el. A 7TMR-ok válaszkészségének szabályozása három szintet foglal magába: a receptorok termelésének szabályozása (downreguláció-upreguláció), a sejtfelszíni receptorszám módosítása (internalizáció-reciklizáció), illetve a receptorok érzékenységének változtatása (deszenzitizáció-reszenzitizáció).

A 7TMR-ok internalizációja leggyakrabban az ún. klatrin-mediált útvonalon jön létre. Ennek során az aktiválódott receptort a G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK-k) foszforilálják, az aktivált és foszforilált receptorhoz β -arresztinek kötődnek, amelyek a klatrin-burkos gödröcskéhez irányítják a receptort. A receptor a gödröcskével együtt lefűződik a membránról, majd a vezikulum lehasítását követően a sejt belsejébe kerül. Az internalizálódott receptor sorsa a sejten belüli „szortírozás” („sorting”) folyamán dől el, melynek eredménye lehet a receptor lebontása, vagy a plazmamembránra való visszahelyezése (reciklizációja) is.

A β -arresztin fehérjék

A β -arresztinek citoplazmatikus szabályozó fehérjék, melyek kulcsszerepet játszanak a 7TMR-ok deszenzitizációjában és internalizációjában. Emellett, amint az az utóbbi tíz-tizenöt évben kiderült, a β -arresztinek önálló, G-fehérjétől független jelátviteli útvonalak elindítására is képesek. Ennek kapcsán napjainkban is jelentős figyelem összpontosul a velük kapcsolatos élettani és gyógyszeres kutatásokra. A fentiek alapján ugyanis lehetséges ugyanazon 7TMR G-fehérje-, ill. β -arresztin-függő útvonalainak egymástól elkülönült serkentése, az ún. elfogult jelátvitel. Ez áttörést jelenthet a 7TMR-okat célzó gyógyszerek hatás-mellékhatás profiljának optimalizálásában.

A β -arresztinek két általánosan kifejeződő izoformája a β -arresztin1 (β -arr1) és a β -arresztin2 (β -arr2). A 7TMR-ok és a β -arresztinek közötti kapcsolat részletes vizsgálata alapján a 7TMR-ok két nagy csoportra oszthatók: az „A” osztályú receptorok elsősorban a β -arr2-t kötik, a kötés pedig átmeneti, csak a plazmamembránál, illetve annak közvetlen közelében jön létre. A „B” osztályú 7TMR-okra az jellemző, hogy a β -arr1-et és β -arr2-t nagyjából hasonló affinitással kötik, a kötés pedig tartós, vagyis az internalizációt követően, sejten belül is fennmarad. Ezeknek a különbségeknek a sejtek jelátvitelében jelentkező hatásait is igazolták.

A CB₁ kannabinoid receptor (CB₁R)

A CB₁R a 7TMR-ok családjába tartozik. A receptor az endokannabinoid rendszer egyik központi fehérvéje, az ismert kannabinoid hatások legnagyobb részének közvetítője (a másik, elsősorban immunsejtekben kifejeződő kannabinoid receptor, a CB₂R mellett). A CB₁R jelen van a központi idegrendszerben (ahol sok egyéb hatás mellett a tanulás, emlékezés, érzelmek, ill. étvágy szabályozás folyamatait befolyásolja), a keringési rendszerben (ahol az értónus és a szívműködés szabályozásában vesz részt), a máj- és zsírszövetben (ahol a szervezeti metabolikus folyamatokat regulálja), illetve számos egyéb szövetben is leírták jelenlétét és szabályozó szerepét.

Jelátvitelének legfőbb jellemzője, hogy elsősorban G_{i/o}-fehérvéket aktivál, ennek megfelelően a cAMP-szint csökkentése, K⁺-csatornák aktiválása, Ca²⁺-csatornák gátlása, valamint MAP-kináz kaszkádok aktivációja tartozik legjellemzőbb jelátviteli hatásai közé.

A CB₁R internalizációja

Ismert, hogy a CB₁R – a legtöbb 7TMR-hoz hasonlóan – agonista-kezelést követően internalizációra kerül. Ezt a jelenséget tumoros sejtvonalakon, illetve a receptort endogéne kifejező sejtekben is leírták, mechanizmusát azonban csak részben tisztázták.

A CB₁R emellett konstitutív (azaz alapállapotú, agonista hiányában létrejövő) internalizációt is mutat, ezt szintén számos sejttípusban igazolták, azonban a jelenség élettani magyarázata egyelőre nem teljesen tisztázott. Keveset tudunk arról is, hogy az agonista-indukált, illetve konstitutív CB₁R internalizáció mechanizmusa megegyezik-e, vagy eltérően szabályozott folyamatokról van szó.

A CB₁R és a β -arresztinek kapcsolata

Munkánk kezdetekor már ismert volt, hogy a CB₁R agonista-serkentést követően β -arr2-t köt. Azt is leírták korábban, hogy a β -arr2-nek szerepe van a CB₁R deszenzitizációjában, azaz a receptor G-fehérje függő hatásainak lecsengésében. Arról azonban nem közöltek közvetlen adatokat, hogy a β -arr2 szerepet játszik-e a CB₁R agonista-indukált internalizációjában. Igen keveset vizsgálták továbbá a CB₁R és a β -arr1 közötti kapcsolatot, ill. a két izoforma iránti affinitások viszonyát. Továbbá a CB₁R konstitutív internalizációjában sem vizsgálták a β -arresztinek szerepét, így nem állt rendelkezésre adat azzal kapcsolatban, hogy mechanizmusát tekintve különbözik-e valójában ez a két internalizációs forma.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a CB₁R és a β -arresztinek közötti kapcsolat eddig feltáratlan részleteit vizsgáltuk, középpontba helyezve a receptor β -arresztinek iránti affinitását, a β -arresztineknek a CB₁R internalizációjában betöltött szerepét, illetve a receptor β -arresztin kötésért felelős újabb szabályozó régióinak azonosítását. Így a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan jellemezhető a CB₁R és a β -arr1 közötti kötés? Van-e különbség a CB₁R és a két β -arresztin izoforma (β -arr1, ill. β -arr2) közötti kapcsolat affinitásában?

2. Milyen szerepet játszik a β -arr2 a CB₁R agonista-indukált, ill. konstitutív internalizációjában? Különbözik-e valójában ez a két folyamat egymástól?

3. Mi a szerepe a konzervált DRY motívumnak a CB₁R β -arresztin kötésében és G-fehérje aktiválásában?

MÓDSZEREK

Plazmid konstrukciók és irányított mutagenézis

A CB₁R vizsgálatához a receptor jelöletlen vagy C-terminálisan mVenus-szal, mCherry-vel, ill. Sluc-cal jelölt konstrukcióit használtuk. A receptor internalizációjának követéséhez a receptorhoz N-terminálisan fúzionáltuk a HaloTag fehérjét. A β -arr1, ill. -2 vizsgálatokor jelöletlen vagy C-terminálisan Rluc-cal, GFP-vel vagy RFP-vel jelölt konstrukciókat alkalmaztunk. A G-fehérje BRET mérésekhez Rluc-cal jelölt α_0 alegységet, YFP-vel jelölt β_1 alegységet, valamint jelöletlen γ_{11} alegységet használtunk. Az internalizációs BRET esetén C-terminálisan eYFP-vel jelölt ICAM-1 konstrukciót vagy plazmamembránhoz irányított mVenus vagy Sluc konstrukciókat alkalmaztunk. A cAMP szintet egy EPAC-alapú intramolekuláris BRET-szenzor konstrukció segítségével követtük. A V54D pontmutációt a különböző β -arr2 konstrukciókba, valamint a különböző mutációkat a CB₁R és a CB₁R-mVenus DRY motívumába a QuikChange® irányított mutagenézis kit segítségével illesztettük be. Valamennyi konstrukció szekvenciáját automatizált DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük.

Sejtkultúrák és transzfekció

A CB₁R β -arr1 kötésének részletesebb vizsgálatát, valamint a CB₁R internalizáció vizsgálatát HeLa, ill. Neuro-2a sejteken végeztük. A CB₁R-DRY mutánsok vizsgálatához CHO-K1 sejteket használtunk. A sejteket 6-lyukú tálcákon (a konfokális mikroszkópos mérések esetén üveg fedőlemezen) transzfektáltuk, Lipofectamine 2000 reagenssel, a gyártó utasításait követve.

Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

A CB₁R G_o-fehérje aktiválását mérő BRET beállítás esetén a sejteket Rluc-cal jelölt α_o alegységgel, YFP-vel jelölt β_1 alegységgel, valamint γ_{11} alegységgel, illetve a (jelöletlen) receptorral transzfektáltuk. A méréseket sejtszuspenzióban végeztük, 96-lyukú tálcán, a sejt-permeábilis szubsztrát coelenterazin h hozzáadását követően. A fluoreszcencia és biolumineszcencia intenzitásokat Mithras LB 940 típusú leolvasóval rögzítettük.

A vad típusú CB₁R β -arr1 és β -arr2 kötését vizsgáló kísérletekben az mVenus-szal jelölt receptor és az Rluc-cal jelölt β -arresztinek között mértünk BRET-et, a fent leírt körülmények között. A receptorok és a β -arresztinek közötti kapcsolat affinitását vizsgáló BRET titrációs mérések során a fenti konstrukciókkal transzfektáltuk a sejteket, változtatva a donor, ill. az akceptor BRET partnerek transzferenciós arányát. Meghatároztuk az mVenus/Rluc emissziós

hányadosot, és ennek a hányadosnak a függvényében ábrázoltuk az átlagos BRET jel változást az agonista stimulust követően. A különböző DRY mutáns CB₁R-ok β -arr1 és β -arr2 kötésének vizsgálatakor a BRET-et a plazmamembránhoz irányított mVenus, valamint a β -arr1-, ill. β -arr2-Rluc között mértük, a jelöletlen receptor együttes transzfekeciója mellett, a fent leírt módon. A CB₁R variánsok plazmamembránon való elhelyezkedésének vizsgálatakor a BRET-et a plazmamembránhoz irányított Sluc, valamint az mVenus-szal jelölt receptor között mértük, a sejtek nem-stimulált állapotában. A CB₁R internalizációjának követésére az Sluc-cal jelölt CB₁R és az eYFP-vel jelölt ICAM-1 plazmamembrán-fehérje között mértünk BRET-et. A különböző CB₁R variánsok hatását a forskolin-indukált cAMP emelkedésre egy intramolekuláris BRET szenzor, az EPAC-BRET segítségével követtük.

Konfokális lézermikroszkópia

A konfokális mikroszkópos mérésekhez a sejteket a receptorok és a β -arr1 vagy -2 megfelelően jelzett konstrukcióival, ill. siRNS-sel transzfekeáltuk. A méréseket Zeiss LSM 510 és Zeiss LSM 710 lézer konfokális mikroszkóppal végeztük. Az eGFP-t (ill. a Halo-Alexa488-at) 488 nm-es, az mVenus-t 514 nm-es, az mCherry-t (ill. az RFP-t) pedig 543 nm-es hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük.

Halo-jelölési protokollok

A receptorok agonista-indukált internalizációjának méréséhez a Halo-CB₁R-ral transzfektált sejteket 15 perc Halo-Alexa488-cal történő festést követően DMSO-val, WIN55-tel vagy WIN55 + AM251-gyel kezeltük 30 percig. A sejteket 4%-os formaldehiddel fixáltuk, majd konfokális mikroszkóppal elemeztük.

A receptorok konstitutív internalizációjának méréséhez a sejteket 15 perc a Halo-Alexa488-festést követően 5 óra 45 percig inkubáltuk, további kezelés nélkül, illetve DMSO, WIN55 vagy AM251 jelenlétében. A 6 órás periódus végén a sejteket fixáltuk, majd konfokális mikroszkóppal elemeztük.

Western blot mérések

A β -arr2, ill. a klatrin nehézlánc Western blot analíziséhez a fehérjéket SDS poliakrilamid gélen futtattuk, és PVDF membránokra blottoltuk. A membránokat blokkoltuk, majd elsődleges (anti- β -arr2 vagy anti-klatrin nehézlánc), ill. másodlagos (HRP-konjugált) antitesttel inkubáltuk. A teljes fehérjemennyiségeket anti- β -aktin elsődleges antitest segítségével kontrolláltuk. A pERK1/2 Western blot mérésekhez a sejteket 2 órás szérummegvonásnak vetettük alá, majd WIN55-tel kezeltük 0, 5 vagy 20 percig. A továbbiakban a

mérést a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük, anti-pERK1/2 vagy anti-ERK1/2 elsődleges antitestekkel, illetve HRP-konjugált másodlagos antitestekkel. Az antitesteket kemilumineszcens szubsztrát segítségével tettük láthatóvá. A Western blot felvételeket beszkeneltük, és az ImageJ program segítségével kvantifikáltuk.

Az adatok elemzése és statisztikai kiértékelés

Az adatokat kétszemponos variancia-analízissel (Holm-Sidak-féle post-hoc teszttel kombinálva) értékeltük. A G-fehérje és β -arresztin BRET dózis-hatás görbék illesztését és statisztikai összehasonlítását a GraphPad Prism program beépített algoritmusainak segítségével végeztük. A szignifikanciaküszöböt $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. Az elfogult jelátvitel értékeléséhez használt ekvimoláris összehasonlítást a G-fehérje és a β -arr2 BRET dózis-hatás görbék azonos koncentrációkhoz tartozó pontjainak felhasználásával készítettük, melyeket egymás függvényében ábrázoltunk, ugyanazon receptor esetében. Az ekviaktív összehasonlítást úgy végeztük, hogy meghatároztunk egy „elfogultsági együtthatót”, a G-fehérje és a β -arresztin BRET dózis-hatás görbékből származó E_{max} és EC_{50} értékek felhasználásával, a vad típusú CB_1R -t referencia-receptorként használva.

EREDMÉNYEK

A CB₁R és a β -arr1 közötti kapcsolat jellemzése

A CB₁R és a β -arr1 közötti kapcsolatot először konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Ennek során mCherry-vel jelölt CB₁R-t és GFP-vel jelölt β -arr1-et vagy β -arr2-et fejeztünk ki a sejtekben, és a β -arresztinek serkentést követő átrendeződését követtük. Megfigyeltük, hogy a szintetikus CB₁R agonista WIN55 hozzáadását követően a kezdetben diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutató β -arr2-GFP a plazmamembránhoz helyeződik át, és ott pontszerű struktúrákba rendeződik. A citoplazma belsőbb régióiban ilyen β -arr2-GFP pontokat nem észleltünk. A β -arr1-GFP esetén WIN55-serkentés hatására nem tudtunk átrendeződést detektálni, sem a plazmamembránnál, sem pedig a citoplazmában.

A CB₁R és a β -arr1 közötti kapcsolatot az alapvetően érzékenyebbnek mondható BRET módszerrel is vizsgáltuk: az mVenus-szal jelölt CB₁R és az Rluc-cal jelölt β -arr1 vagy β -arr2 között mértünk BRET-et. Ezekben a mérésekben a β -arr2-Rluc esetén a BRET jel emelkedését tapasztaltuk WIN55-serkentést követően, míg a β -arr1-Rluc esetén ez az emelkedés elmaradt. A két fehérje közötti kapcsolódást a fehérjék közötti affinitás pontosabb vizsgálatára alkalmas BRET titrációs mérések segítségével is elemeztük, ami szintén azt mutatta, hogy a CB₁R és a β -arr2 közötti

kapcsolat létrejön, míg β -arr1-el való kapcsolódást ezekben a mérésekben sem tudtunk detektálni.

A CB₁R agonista-indukált és konstitutív internalizációjának részletes vizsgálata

Elsőként a β -arr2 szerepét vizsgáltuk a CB₁R agonista-indukált internalizációjában. A CB₁R internalizációjának mikroszkóppal történő követésekor az ún. Halo-jelölési technikát alkalmaztuk, melynek segítségével a plazmamembránban elhelyezkedő CB₁R-okat szelektíven tudtuk megjelölni, és így internalizációjuk jól követhetővé vált.

Domináns-negatív β -arr2 (β -arr2-V54D) mutáns kifejezése esetén a Halo-CB₁R agonista-indukált internalizációja jelentősen csökkent a vad típusú β -arr2-t kifejező sejtekhez képest. Amennyiben a sejteket β -arr2-specifikus siRNS-sel transzfektáltuk, az agonista-serkentést követő CB₁R internalizáció szintén gátlódott a kontroll siRNS-sel kezelt sejtekhez képest. A fenti jelenséget BRET módszer segítségével is megvizsgáltuk, ahol a szuper Rluc-cal (Sluc-cal) jelölt CB₁R plazmamembrántól való eltávolodását követtük serkentést követően (a plazmamembrán jelölésére a YFP-vel jelölt ICAM-1 fehérjét alkalmaztuk). Ezen mérések alapján is csökkent az internalizáció mértéke mind β -arr2-V54D kifejezése, mind pedig β -arr2-specifikus siRNS transzfekciója esetén.

A CB₁R konstitutív internalizációját úgy vizsgáltuk, hogy a Halo-CB₁R-t expresszáló sejteket a Halo-festést követően 6 órán keresztül magukra hagytuk. Az ezalatt lezajló konstitutív CB₁R internalizáció a CB₁R inverz agonista AM251 folyamatos jelenléte esetén sem gátlódott, továbbá sem a β -arr2-V54D jelenléte, sem pedig β -arr2-specifikus siRNS kezelés nem csökkentette a mértékét. Az siRNS-sel végzett kísérleteket megismételtük a CB₁R-okat endogéneen kifejező Neuro-2a egér neuroblasztóma sejtvonalon is. Ezekben a kísérletekben is azt láttuk, hogy a β -arr2 kifejeződésének gátlása nincs hatással a konstitutívan zajló CB₁R internalizációra. A továbbiakban klatrin nehézlánc-specifikus siRNS segítségével vizsgáltuk az agonista-indukált, ill. konstitutív CB₁R internalizáció klatrin-függését, és azt találtuk, hogy az internalizáció mindkét formája gátlódott a klatrin nehézlánc fehérje szintjének csökkentése esetén.

A konzervált DRY motívum szerepének vizsgálata a CB₁R működésében

A konzervált DRY régió szerepét a CB₁R működésében úgy vizsgáltuk, hogy a három érintett aminosavat irányított mutagenézis segítségével egyes, kettes, ill. hármas kombinációkban alaninra cseréltük, így hoztuk létre a CB₁R-ARY, CB₁R-DAY, CB₁R-DRA, CB₁R-DAA, CB₁R-ARA, CB₁R-AAY és CB₁R-AAA mutánsokat.

A mutánsok plazmamembránon (PM-on) való kifejeződését vizsgálva azt találtuk, hogy a CB₁R-DAY, CB₁R-DRA és CB₁R-DAA mutánsok PM-kifejeződése csökkent mértékű, de megtartott, a CB₁R-ARY és CB₁R-ARA mutánsok PM-ra való kijutása viszont gyakorlatilag teljesen megszűnt.

A mutánsok G-fehérje aktivációját a G_o-fehérje alegységeinek szétválását követő BRET módszerrel, a β -arr2 kötést pedig konfokális mikroszkóppal, illetve a β -arr2 PM-hoz való kihelyeződését érzékelő BRET méréssel vizsgáltuk. Minden esetben a WIN55 (szintetikus CB₁R agonista), illetve a 2-AG (endokannabinoid) hatásait is elemeztük.

A CB₁R-DAY mutánssal végzett kísérleteink azt mutatták, hogy ennek a mutánsnak a G-fehérje aktivációs képessége csökkent, de nem szűnt meg teljesen. A β -arr2 kötést vizsgálva azt láttuk, hogy a receptornál megjelenik egy bazális β -arr2 kötés, az agonista-serkentést követő β -arr2 kötés azonban elmarad a vad típushoz képest. A CB₁R-DRA mutáns esetén azt találtuk, hogy a bazális G-fehérje kötés a vad típusú receptorhoz képest megnőtt, miközben a serkentést követő G-fehérje aktiváció enyhén csökkent. A β -arr2 kötés a CB₁R-DAY-hoz hasonló volt, azaz a bazális β -arr2 kötés megjelenése mellett az agonista-indukált β -arr2 kötés csökkenését tapasztaltuk. A CB₁R-AAY-t vizsgálva azt láttuk, hogy ennek a mutánsnak jelentősen csökkent a G-fehérje aktivációja, mind bazális, mind serkentett körülmények között. A CB₁R-AAY (bazális és

serkentést követő) β -arr2 kötése ugyanakkor érdekes módon jelentős mértékben fokozódott. A CB₁R-DAA mutáns G-fehérje aktivációja kísérleteink alapján károsodott, de nem szűnt meg. Ugyanakkor, bár a bazális β -arr2 kötés erre a mutánsra is jellemző volt, az agonista-indukált β -arr2 kihelyeződés teljes megszűnését tapasztaltuk.

A receptorok β -arr1 kötését BRET mérések segítségével vizsgálva azt találtuk, hogy a vad típusú receptor WIN55 hatására nem hoz létre kimutatható β -arr1 kihelyeződést, míg 2-AG hatására a változás statisztikailag is jelentős mértékű volt. Ugyanakkor a CB₁R-AAY mutáns mindkét agonista hatására jelentősen megemelkedett mértékben kötötte a β -arr1-et. A többi mutáns nem volt jelentős hatással a β -arr1 elrendeződésére.

A CB₁R-AAY és a CB₁R-DAA mutánsok G-fehérje aktiválási, ill. β -arr2 kötési adatainak részletes elemzése (ún. „ekvimoláris” és „ekviaktív” analízise) kimutatta, hogy a CB₁R-AAY egy β -arr2 kötés irányába elfogult mutáns, míg a CB₁R-DAA egy G-fehérje szelektív mutánsnak tekinthető. A fenti két mutánsal végzett cAMP-gátlási, ill. ERK1/2-foszforilációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a CB₁R-AAY cAMP szintet csökkentő hatása szinte teljesen eltűnt, míg ERK1/2 aktivációs képessége megtartott volt, a CB₁R-DAA esetén pedig a cAMP-re kifejtett gátló hatás volt megtartott, míg az ERK1/2-foszforiláció mutatkozott jelentősen csökkent mértékűnek.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a CB₁R a β -arr1 izoformát jelentősen kisebb affinitással köti, mint a β -arr2-t, a kötés pedig csak a plazmamembránnál, illetve annak közvetlen közelében figyelhető meg, azaz átmeneti jellegű. Ez alapján megerősítettük, hogy a CB₁R a 7TMR-ok „A” osztályába sorolható.

Kimutattuk, hogy a β -arr2 szerepet játszik a CB₁R agonista-indukált internalizációjában, ugyanakkor a receptor konstitutív internalizációja β -arr2-től független folyamat. Igazoltuk, hogy mindkét internalizációs forma klatrin-mediált útvonalon jön létre.

Megállapítottuk, hogy a konzervált R3.50 aminosav nem játszik kizárólagos szerepet a CB₁R G-fehérje kapcsolódásában, illetve, hogy az R3.50 oldallánc hiánya bazális β -arr2 kötés kialakulásához vezet. Kimutattuk, hogy a CB₁R-AA1 egy β -arresztin-szelektív mutáns, hiszen β -arr1 és β -arr2 kötése jelentősen fokozott, míg G-fehérje aktivációja csökkent. Ezzel szemben a CB₁R-DAA mutáns a G-fehérjék irányába elfogult, hiszen agonista-indukált β -arresztin kötése gyakorlatilag megszűnt, míg G-fehérje aktivációja csökkent mértékben ugyan, de továbbra is jelen volt. Eredményeink alapján a CB₁R konzervált DRY motívuma nem csak a G-fehérje aktiválásában, hanem a receptor és a β -arresztinek közötti kapcsolódásban is fontos szerepet játszik.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gyombolai P, Tóth AD, Tímár D, Turu G, Hunyady L. (2015) Mutations in the 'DRY' motif of the CB₁ cannabinoid receptor result in biased receptor variants. *J Mol Endocrinol*, 54:(1) 75-89. **IF: 3,621**

Gyombolai P, Boros E, Hunyady L, Turu G. (2013) Differential β -arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB₁ cannabinoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 372:(1-2) 116-127. **IF: 4,241**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. (2012) Regulation of endocannabinoid release by G proteins: A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Mol Cell Endocrinol*, 353:(1-2) 29-36. **IF: 4,039** (Összefoglaló közlemény)

Turu G, Várnai P, **Gyombolai P**, Szidonya L, Offertáler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L. (2009) Paracrine transactivation of the CB₁

cannabinoid receptor by AT₁ angiotensin and other G_{q/11} protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 284:(25) 16914-16921. **IF: 5,328**

Turu G, Simon A, **Gyombolai P**, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L. (2007) The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT₁ receptor-stimulated cannabinoid CB₁ receptor activity. *J Biol Chem*, 282:(11) 7753-7757. **IF: 5,581**