

# Az 1-es típusú angiotenzin II receptor jelátvitel-szelektív aktivációjának hatása a receptor sorsára

Doktori értekezés

**Dr. Szakadáti Gyöngyi**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár  
Dr. Balla András, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Liliom Károly, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Reményi Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fürst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sipéki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Sperlágh Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest  
2017

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
1. Rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	6
2.1. Az angiotenzin II metabolizmusának jelentősége és szabályozása .....	6
2.1.1. A klasszikus RAAS felépítése és működése .....	7
2.1.2 A RAAS újabb elemei és funkciói .....	9
2.2. Az 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT <sub>1</sub> R) .....	10
2.2.1. Az AT <sub>1</sub> R szerkezete .....	10
2.2.2. Az AT <sub>1</sub> R aktivitása .....	12
2.2.2.1 Az AT <sub>1</sub> R jelátviteli mechanizmusai .....	13
2.2.2.2. $\beta$ -arresztin mediált folyamatok .....	16
2.3. Jelátvitel-szelektív aktiváció .....	18
2.3.1. A GFKR-ek aktiválódásának mechanizmusai .....	18
2.3.2. A funkcionális szelektivitás létrejöttének mechanizmusa .....	21
2.3.3. A GFKR-ek jelátvitel-szelektív agonizmusának jelentősége .....	23
2.3.4. Az AT <sub>1</sub> R jelátvitel-szelektív aktivációja .....	26
2.3.5. Elfogult AT <sub>1</sub> R ligandok mint új terápiás lehetőségek .....	29
2.4. A GFKR-ek deszenzitizációja és internalizációja, a válaszkészség szabályozása .....	31
2.4.1. A GFKR-ek deszenzitizációja és a G-fehérje kapcsolt receptor kinázok .....	31
2.4.2. A GFKR-ek internalizációja .....	33
2.4.2.1. Klatrinmediált endocitózis .....	33
2.4.2.2. Klatrintól független endocitózis .....	35
2.4.3. Az internalizáció szerepe a GFKR-ek szabályozásában .....	37
2.4.4. A Rab kis G-fehérje család szabályozó szerepe a vezikuláris transzportban .....	39
2.5. Membrán foszfoinozitidek .....	41
2.5.1. A foszfoinozitidekről általában .....	41
2.5.2. A PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> képződése és jelentősége .....	43
3. Célkitűzések .....	45
4. Anyagok és módszerek .....	46

4.1. Felhasznált anyagok.....	46
4.2. DNS konstrukciók.....	47
4.3. Sejtkultúra és transzfekció .....	47
4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések.....	48
4.4.1. A BRET technika működési elve .....	48
4.4.1.1. A BRET mérések kivitelezése .....	50
4.5. Western blot kísérletek .....	50
4.6. Citoplazmatikus Ca <sup>2+</sup> mérés sejtszuspenzió.....	51
4.7. Konfokális mikroszkópia.....	52
4.8. Adatok elemzése, statisztikai analízis.....	52
5. Eredmények.....	54
5.1. Az AT <sub>1</sub> R agonista indukált endocitózisának nyomon követése BRET módszerrel .....	54
5.1.1. Jelátvitel-szelektív agonista és mutáns AT <sub>1</sub> R működésének ellenőrzése .....	54
5.1.2. Az AT <sub>1</sub> R Rab5 tartalmú korai endoszómákban való megjelenése .....	57
5.2. A jelátvitel szelektíven aktivált AT <sub>1</sub> R eltérő internalizációjának jellemzése.....	60
5.3. A β-arresztin2-kötés szerepének vizsgálata az AT <sub>1</sub> R internalizációjában.....	65
5.4. G-fehérje aktiváció okozta PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> bontás nyomon követése BRET módszerrel.....	69
5.5. Foszfatidilinozitol kinázok szerepe az AT <sub>1</sub> R agonista indukált endocitózisában	72
5.6. A plazmamembrán PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> depléciójának szerepe az AT <sub>1</sub> R teljes agonista és funkcionálisan szelektív agonista indukált internalizációjában.....	76
5.7. Az AT <sub>1</sub> R sejten belüli további sorsának nyomon követése Rab kis G-fehérjék segítségével.....	80
6. Megbeszélés .....	87
7. Következtetések.....	96
8. Összefoglalás.....	97
9. Summary.....	98
10. Irodalomjegyzék .....	99
11. Saját közlemények jegyzéke.....	121
12. Köszönetnyilvánítás .....	122

## 1. Rövidítések jegyzéke

$\alpha_1$ -AR	$\alpha_1$ -adrenerg receptor
ACE	angiotenzin konvertáló enzim (angiotensin converting enzyme)
ACE2	angiotenzin konvertáló enzim 2
ACEI	angiotenzin konvertáló enzim gátló (angiotensin converting enzyme inhibitor)
AngI	angiotenzin I
AngII	angiotenzin II
AngIV	angiotenzin IV
AP-2	adapter protein-2
AP-180	adapter protein-180
Arf6	ADP-ribozilációs faktor 6
ARB	1-es típusú angiotenzin II receptor blokkoló
AT <sub>1</sub> R	1-es típusú angiotenzin II receptor
AT <sub>2</sub> R	2-es típusú angiotenzin II receptor
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenerg receptor
BAR-domén	Bin-Amfifizin-Rvs domén (Bin-Amphiphysin-Rvs domain)
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
CCP	klatrinburkos gödör (clathrin-coated pit)
CCV	klatrinburkos vezikula (clathrin-coated vesicle)
CIE	klatrintól független endocitózis (clathrin-independent endocytosis)
CME	klatrinmediált endocitózis (clathrin-mediated endocytosis)
DAG	diacilglicerin
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
DN-GRK2	domináns-negatív G-fehérje kapcsolt receptor kináz 2
DRY	aszparaginsav-arginin-tirozin motívum
ECL	extracelluláris hurok (extracellular loop)
EEA1	korai endoszóma antigén-1 (early endosome antigen 1)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)

ER	endoplazmás retikulum
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
FBS	fötális borjúsérum
FCHO	FES-CIP4 homológia domén (FES-CIP4 homology domain only)
GDP	guanozin-difoszfát
GFKR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GRK	G-fehérje kapcsolt receptor kináz
GTP	guanozin-trifoszfát
HB-EGF	heparin-kötő epidermális növekedési faktor
HEK 293	humán embrionális vesesejt (human embrional kidney cell)
HRP	tormaperoxidáz (horseradish-peroxidase)
HSC70	hősokk fehérjével rokon fehérje 70 (heat shock cognate 70)
ICL	intracelluláris hurok (intracellular loop)
Ins(1,4,5) $P_3$	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
K <sub>i</sub>	inhibíciós konstans
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MEK	mitogén aktivált protein kináz kináz (MAPK/ERK kinase)
MLCK	miozin könnyű lánc kináz (myosin light chain kinase)
MLCP	miozin könnyű lánc foszfatáz (myosin light chain phosphatase)
NPXXY	aszparagin-prolin-X-X-tirozin
p90RSK	p90 riboszómális S6 kinázt
PH-domén	plekstrin homológia domén (pleckstrin homology domain)
PDGFR	trombocita eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PI4K	foszfatidilinozitol 4-kináz
PIPK	foszfatidilinozitol-foszfát-kináz
PPIn	foszfoinozítid
PtdIns	foszfatidilinozitol
PtdIns3P	foszfatidilinozitol-3-foszfát
PtdIns4P	foszfatidilinozitol-4-foszfát

PtdIns5P	foszfatidilinozitol-5-foszfát
PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>	foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PLCδ1-PH	a foszfolipáz C δ1 enzim pleksztrin homológia doménje
Pyk2	prolin-gazdag tirozin kináz 2 (proline-rich tyrosine kinase 2)
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldoszteron system)
Rluc	<i>Renilla</i> luciferáz
ROS	reaktív oxigén származék (reactive oxygen species)
SI-AngII	[Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]-AngII
SII-AngII	[Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>4</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]-AngII
Sluc	Super <i>Renilla</i> luciferáz
SR	szarkoplazmatikus retikulum
TGN	<i>transz</i> -Golgi hálózat ( <i>trans</i> -Golgi network)
TM1-7	transzmembrán α-hélix 1-7
TRV3	TRV120023 (Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala-OH)
TRV7	TRV120027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala-OH)
YFP	sárga fluoreszcens fehérje (yellow fluorescent protein)
VSMC	vaszkuláris simaizomsejt (vascular smooth muscle cell)
Wm	wortmannin
μ-OR	μ-opioid receptor

## 2. Bevezetés

### 2.1. Az angiotenzin II metabolizmusának jelentősége és szabályozása

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) létfontosságú szereppel bír a kardiovaszkuláris rendszer, valamint a só- és vízháztartás egyensúlyának szabályozásában. A RAAS tanulmányozásának kiemelkedő fontosságát, a fiziológias és patológias működés megértésén túl, a klinikai gyakorlatban gyakran alkalmazott vérnyomáscsökkentő szerek, az angiotenzin konvertáló enzim gátlók (ACEI) és az 1-es típusú angiotenzin II receptor blokkolók (ARB) számos kardiovaszkuláris betegségben észlelt morbiditást és mortalitást csökkentő hatása jelenti [1].

Ezen rendhagyó endokrin rendszer egyik fő végrehajtó hormonja az angiotenzin II (AngII) [2], mely számos fiziológias és patológias funkcióval rendelkezik. A vérnyomás és a plazmatérfogat szabályozása az értónus növelésén, a vese Na<sup>+</sup> visszaszívásának szabályozásán, az aldoszteronszekréció, valamint a szomjúság, a szívizom-kontraktilitás, a szimpatikus idegrendszeri aktivitás, a vízfelvétel, és a vazopresszin felszabadulás fokozásán keresztül valósul meg [3]. Az AngII további hosszú távú hatásokkal is rendelkezik mint az érfal-simaizmok, illetve a szívizomsejtek hiperpláziája, az extracelluláris mátrix elemek felszaporodása, valamint az érfalsejtek érzékenységének fokozása vazokonstriktor anyagok iránt [4]. Proinflammatorikus anyagként a sejtnövekedés, a fibrózis, illetve a gyulladás mechanizmusának szabályozásán keresztül számos patológias állapot létrejöttében is részt vesz [5], például atherothrombózis, endotél-diszfunkció, vaszkuláris-médiahipertrófia, továbbá balkamra-hipertrófia [6]. Az AngII közvetve vagy közvetlenül, de minden szerv funkciójára befolyással bír, melyek közül legfontosabbak a szív- és érrendszer, a vese, valamint az agy [7].

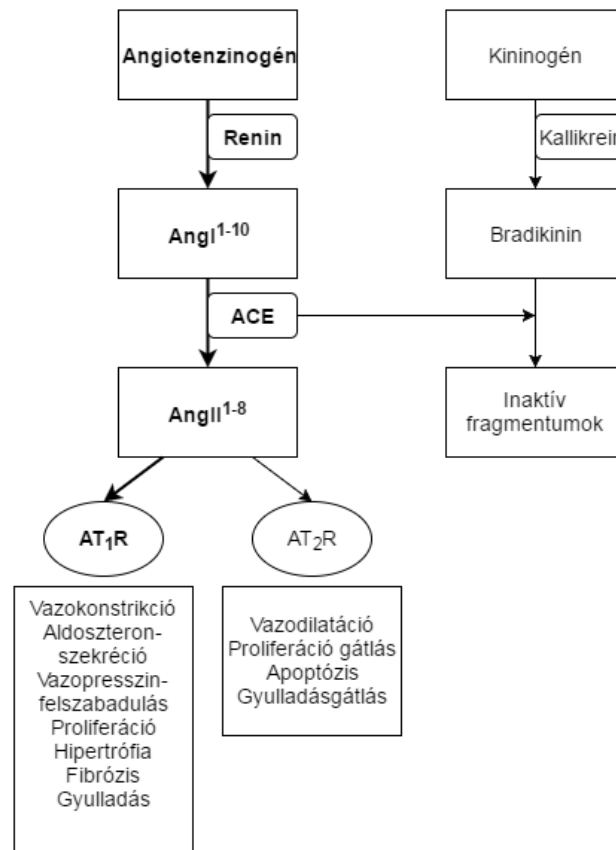
Az AngII rövid és hosszú távú hatásait a sejtek jelátviteli folyamatainak módosításán keresztül valósítja meg [8], az 1-es típusú (AT<sub>1</sub>R) és a 2-es típusú (AT<sub>2</sub>R) angiotenzin II receptorok közvetítésével. Mindkét receptor a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) szupercsaládjába tartozik, szekvenciájuk 32-43%-os homológiát mutat [9], azonban alapvetően ellentétes funkciókkal rendelkeznek. Az AngII előbb felsorolt hatásait az AT<sub>1</sub>R-on keresztül fejt ki [10], mely szinte minden szervben

kimutatható. Az AT<sub>2</sub>R legnagyobb mennyiségben magzati szövetekben, mellékvese medullában és reproduktív szervekben expresszálódik. Az AT<sub>2</sub>R kifejeződése a fejlődés során jelentős, míg felnőtt korban csak nagyon alacsony szinten mutatható ki a szövetekben. Az AT<sub>2</sub>R proapoptotikus, antiproliferatív, antiinflammatorikus hatásokat közvetít, valamint vazodilatációt okoz, de klinikai szerepe még ma sem teljesen tisztázott [11].

### **2.1.1. A klasszikus RAAS felépítése és működése**

Az AngII képződését és lebontását a klasszikus RAAS részeként, egy enzimatikus kaszkád működése szabályozza (*1. ábra*) [12]. A RAAS aktiválódása során első lépésként a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből renin kerül felszabadulásra. A juxtaglomeruláris sejtek szekréciós granulumaiban tárolódó aktív enzim az extracelluláris folyadék mennyiség csökkenésének hatására szabadul fel, melyet a sejtek különböző módokon érzékelhetnek. A vese afferens arterioláiban létrejövő nyomáscsökkenés, a  $\beta_1$ -adrenerg receptoron keresztüli szimpatikus idegrendszeri aktiváció, illetve a macula densa sejtek által észlelt alacsonyabb disztális tubululáris NaCl koncentráció vezethet reninfelszabaduláshoz [13]. A reninszekréció szabályozása kulcsfontosságú a RAAS működésében, mivel ez az enzim katalizálja a sebességmeghatározó lépést az AngII képződés folyamatában. Az elsősorban májban termelődő, inaktív plazmafehérje angiotenzinogén renin általi hasításával angiotenzin I (AngI) keletkezik. Ezt követően az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) hidrolizálja a decapeptid AngI-et, létrehozva ezzel a biológiailag aktív oktapeptid AngII-t [14]. Az ACE membránkötött formája elsősorban az endotélsejtek felszínén található, legnagyobb mennyiségben a tüdő ereiben [15], azonban epitéliális, idegi és gonadális eredetű sejteken is kimutatható. Az ACE hasítja továbbá a vazodilatátor bradikinint is. A plazmában keringő AngII másodperces féléletidővel rendelkezik, az inaktivációját végző peptidázoknak köszönhetően. A keletkező degradációs terméke többek között az AngIII, az Ang(1-7) és az Ang(3-8) is [16].





**1. ábra A klasszikus renin-angiotenzin-aldoszterin rendszer felépítése és működése**

A RAAS fő végrehajtója az angiotenzin II (AngII<sup>1-8</sup>), mely az angiotenzinogénből renin által létrehozott angiotenzin I-ből (AngI<sup>1-10</sup>) keletkezik az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) közreműködésével. Az AngII<sup>1-8</sup> klinikailag jelentős hatásait az 1-es típusú angiotenzin II receptoron (AT<sub>1</sub>R) keresztül fejt ki. A 2-es típusú angiotenzin II receptor (AT<sub>2</sub>R) klinikai szerepe még kérdéses.

Az AngII hatásai közé tartozik, hogy fokozza a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeinek aldoszterontermelését. Az aldoszteron a sejtmagi receptorok családjába tartozó mineralokortikoid receptoron keresztül hatva a vese disztális tubulusaiban és a kortikális gyűjtőcsatorna sejtekben, valamint a vastagbélben, a nyálmirigyben, és a verejtékmirigyben fokozza a Na<sup>+</sup>- és vízviasszívást, illetve a K<sup>+</sup> kiválasztást. Ezen mechanizmusoknak köszönhetően az aldoszteron alapvető szerepet játszik az extracelluláris térfogat, a vérnyomás és a K<sup>+</sup> háztartás szabályozásában [17].

### 2.1.2 A RAAS újabb elemei és funkciói

A RAAS eddig részletezett klasszikus elemein és működésén kívül számos újabb tag került felismerésre az elmúlt évtizedekben [12]. Közéjük tartozik az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) is, mely mind az AngI, mind pedig az AngII hasítására képes. Ezáltal csökkenti a keringő AngII szintjét és növeli a pozitív kardiovaszkuláris hatású degradációs termék, Ang(1-7) mennyiségét [18]. Az Ang(1-7) nemrég felderített receptorán, a Mas receptoron keresztül számos, az AngII-ével ellenkező biológiai hatással rendelkezik, mint a vazodilatáció, a kardioprotekció, a fokozott Na<sup>+</sup> kiválasztás és a csökkent érrendszeri átépülés [16]. Továbbá képes az AT<sub>1</sub>R-hez is kötődni és potenciálisan kardioprotektív jelpályát aktiválni [19].

Az AngII metabolizmusa során aminosavak A hatására AngIII képződik. Az AngIII is aldosteron felszabadulást és érösszehúzódást vált ki, azonban igen rövid félleletidővel rendelkezik. Az Ang III-ból aminosavak N hatására AngIV képződik, mely feltehetően az inzulin regulált aminosavak enzimhez mint receptorhoz kötődik, melyen keresztül szerepe lehet tanulási és memóriafolyamatokban, a vese metabolizmusának regulációjában [20], továbbá alacsonyabb affinitással ugyan, de az AT<sub>1</sub>R-hez is képes kötődni [21].

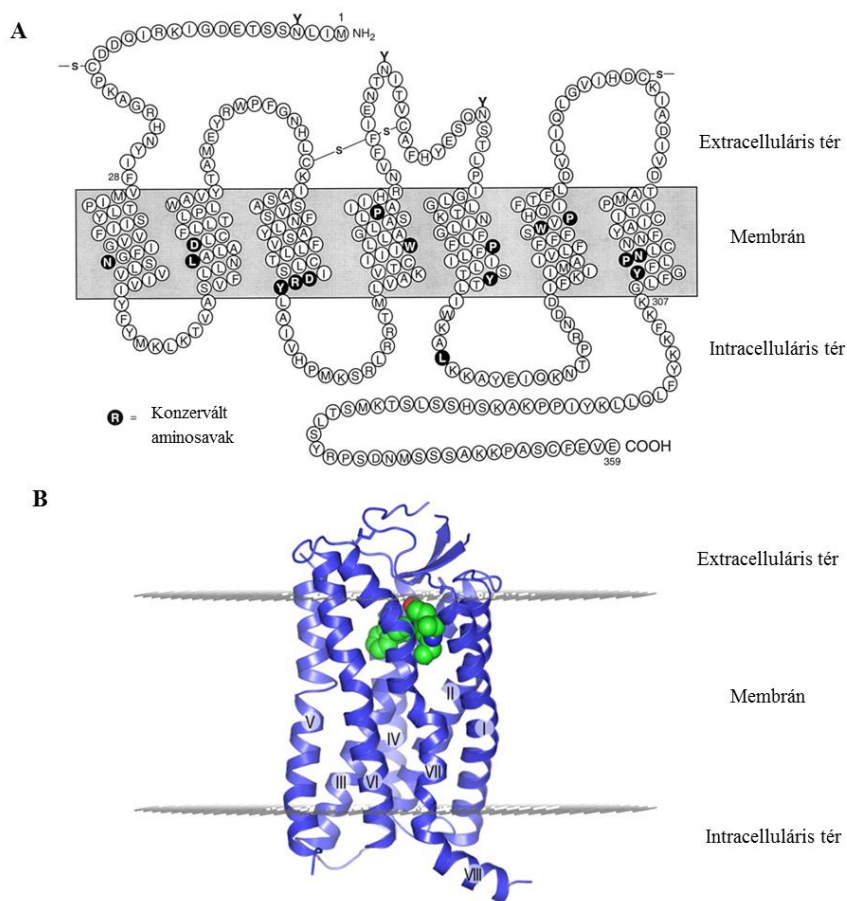
Az utóbbi évek intenzív kutatásai rávilágítottak, hogy az AngII nem csak plazmában keringő hormonként fejti ki hatásait, hanem számos szövetben helyileg termelődve parakrin, autokrin és feltehetően intrakrin funkciókkal is rendelkezik. A „szöveti RAAS” által helyileg termelt AngII igen sokféle folyamat szabályozásában vesz részt többek között az idegrendszerben, a szívben, a vesében, az érrendszerben, a zsírszövetben, a reproduktív szervekben, a bőrben és az emésztőrendszerben is [22-24]. A szöveti RAAS feltehetően hosszabb távú regulátora az egyes szervek helyi homeosztázisának, és a keringő RAAS-al egymást kiegészítve funkcionálnak. Az újabban felismert RAAS ligandok, receptorok és enzimek felfedezésével érthetőbbé vált, hogy a rendszer ellentétes hatások közvetítésével, mint például a növekedés fokozása, illetve gátlása, hogyan járulhat hozzá a szöveti szintű homeosztázis fenntartásához [12]. A következőkben a RAAS egyik kulcselemét, a kutatási témám fő tárgyát képező AT<sub>1</sub>R-t szeretném bemutatni.

## 2.2. Az 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT<sub>1</sub>R)

### 2.2.1. Az AT<sub>1</sub>R szerkezete

Az AT<sub>1</sub>R a GFKR-ek közé tartozik, mely az emberi genom egyik legnépesebb és legváltozatosabb fehérjecsaldja [25]. Közös jellemzőjük, hogy hét transzmembrán  $\alpha$  hélix doménnel rendelkeznek, ezért 7-transzmembrán receptoroknak is nevezik őket. A GFKR család tagjaihoz kötődő ligandok között találhatunk fehérjéket, peptideket nukleotidokat, lipideket, ionokat, melyek kemoattraktánsként, neurotransmitterként vagy hormonként is funkcionálhatnak, de ebbe a családba tartoznak a fény-, szag-, illetve ízérzékelésben részt vevő receptorok is [26]. A GFKR-ek egyik prototípusa az AT<sub>1</sub>R, melynek felépítése és működése évtizedek óta a receptorkutatás egyik központi témája.

Az AT<sub>1</sub>R emlősökben egyetlen polipeptidláncból áll, melynek szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a különböző emlős fajokban. A glikozilált fehérje ~41 kDa tömegű és 359 aminosavat tartalmaz, közöttük GFKR-ekre jellemző igen konzervált aminosavakat is (2. ábra, A) [27]. A GFKR-ek szerkezete a hét hidrofób hélix miatt igen nehezen kristályosítható, azonban a közelmúltban sikerült az AT<sub>1</sub>R kristályszerkezetét megalkotni ZD7155 [28], illetve olmesartan antagonistákhoz kötött formában (2. ábra, B) [29]. A kristályszerkezet eredményei alátámasztották, hogy az AT<sub>1</sub>R extracelluláris N-terminális régióval, hét transzmembrán  $\alpha$ -hélixel (TM1-7), ezek között három extracelluláris hurokkal (ECL1-3) és három intracelluláris hurokkal (ICL1-3), egy amfipatikus VIII. hélixel, illetve egy erősen dezorientált szerkezetű intracelluláris C-terminális régióval rendelkezik. Extracelluláris felszínét két diszulfidkötés stabilizálja. Az N-terminális régió és az ECL3 cisztein oldalláncai közötti kötés a GFKR-ek 92%-ban megtalálható, míg az ECL2 és a TM3 cisztein oldalláncai közötti kötés az AT<sub>1</sub>R egyedi sajátossága [30]. A GFKR-ek aminosav-szekvenciájában található konzervált motívumok, például az aszparagin-prolin-X-X-tirozin (NPXXY) és az aszparaginsav-arginin-tirozin (DRY), kitüntetett szerepet játszanak a receptorok működésében. Igaz ez az AT<sub>1</sub>R esetén is, ahol a TM3-ban található DRY motívum, valamint a TM7 doménban elhelyezkedő NPXXY szekvencia fontos résztvevője a receptor aktivációnak és jelátvitelnek [31, 32].



## 2. ábra Az AT<sub>1</sub>R struktúrája

Az ábra A részén a patkány AT<sub>1</sub>R aminosavszekvenciája és másodlagos szerkezete látható. Feltüntetésre kerültek a konzervált aminosavak, valamint a szerkezetet stabilizáló diszulfid-kötések is. Forrás: [9] alapján módosítva. Az ábra B panelén a humán AT<sub>1</sub>R kristálystruktúrája látható, a zölddel jelzett ZD7155 antagonistát kötött formában. A kék színű transzmembrán  $\alpha$ -hélixek római számozással kerültek feltüntetésre. Forrás: [28] alapján módosítva.

A receptor C-terminális vége számos szerin- és treoningazdag régiót tartalmaz, melyek különböző kinázok által foszforilálódhatnak mint a G-fehérje kapcsolt receptor kinázok (GRK) és a protein kináz C (PKC) [33, 34]. Ezen aminosavak foszforilációja szükséges a szabályozásban részt vevő  $\beta$ -arresztin-kötés éhez és az internalizációhoz [35, 36]. Az AT<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztin molekula közötti interakció létrejöttében a receptor C-terminális farok régiójában, valamint az ICL2-3-ban található domének vesznek részt [37].

Az AT<sub>1</sub>R AngII kötött aktív konformációját még nem sikerült kristályosítani, azonban számos biokémiai megközelítésnek, célzott mutagenezissel végzett kutatásnak és molekuláris dinamikai modellezésnek köszönhetően jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésünkre a receptor ligand kötéséről és aktivációs mechanizmusáról [27, 31]. Ezek alapján az AT<sub>1</sub>R AngII kötő helyének kialakításában elsősorban a TM2-3-4-5-6-7 hélixek, valamint az ECL2 hurok vesz részt [27]. Ligand kötődésekor az AngII és az AT<sub>1</sub>R között számos interakció alakul ki. Közöttük ionos kötés is az AngII Phe<sup>8</sup>- $\alpha$  karboxil-csoportja és az AT<sub>1</sub>R Lys199-as aminosava között, valamint az AngII Arg<sup>2</sup> guanidin-csoportja és a receptorban lévő Asp281 között [38, 39]. Továbbá az AngII terminális karboxil-csoportjának interakciója az AT<sub>1</sub>R TM7 doménjában lévő Phe293-al és Asn294-el szintén szereppel bír a bekötődésben [40]. Mutagenezissel végzett vizsgálatok az ECL2 hurok szerepének fontosságát emelik ki, melyben többek között az AngII Val<sup>3</sup> és az AT<sub>1</sub>R Ile172 közötti, valamint az AngII Asp<sup>1</sup> és az AT<sub>1</sub>R His183 csoportja közötti interakciók is részt vesznek [38, 41]. Összességében az AngII N-terminális régiója az AT<sub>1</sub>R extracelluláris doménjaival kerül interakcióba, míg az AngII C-terminális régiója a TM domének által képzett zsebbe illeszkedik be. Az AngII kötődésének vizsgálatai alapján ez a kötés két lépésben jön létre. A modell szerint első lépésként az AngII C-terminális végével (Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>) az ECL2-höz kötődik. Ezen lépésben a Phe<sup>8</sup>- $\alpha$  karboxil-csoportja, valamint az AT<sub>1</sub>R Lys199-as és His256-os aminosavai közötti és a Tyr<sup>4</sup>-Asn111 közötti ion-ion kölcsönhatások alakulnak ki. Ezen kötődés felelős a receptor részleges, bazális aktivitásáért. Az első lépés hatására az ECL-ok átrendeződése/megnyílása jön létre, mely elősegíti az AngII N-terminális régiójának kötődését az extracelluláris régiókhoz, a molekula meghajlását a Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup> csoportok között és végül a belesüllyedést a TM domének által kialakított ligandkötő zsebbe [42, 43].

### 2.2.2. Az AT<sub>1</sub>R aktivitása

Az AT<sub>1</sub>R aktív konformációja igen sokrétű és szerteágazó jelátviteli hálózatot hoz működésbe, melyet egymásra épülő és egymással párhuzamosan futó útvonalak rendszere alkot [8, 44]. A receptor aktiválódása létrejöhet peptid és nem-peptid ligandok hatására, mechanikai stressz következtében [45], illetve egyes betegségekben

autoantitestek kötődésével is [46, 47]. A GFKR család tagjairól újabban leírták, hogy nem csak monomer formában fordulnak elő a plazmamembránban, hanem magasabban rendezett struktúrákat is képezhetnek: dimereket, sőt oligomereket is [48]. Ez a kapcsolódás létrejöhet két azonos receptor között, ekkor homomerekről beszélünk, illetve különböző receptorok között is, ezeket nevezzük heteromereknek [49]. Az AT<sub>1</sub>R-ről ismert, hogy képes dimerek alkotására mind homomer formában (homodimer) [50, 51], mind pedig heteromer formában (heterodimer). A homodimereket a transzglutamináz aktivitású intracelluláris XIIIa faktor keresztkötheti, mely a receptor fokozott működéséhez vezet [52], a homodimer tagjai továbbá befolyásolhatják egymás ligandkötését,  $\beta$ -arresztin2-kötését, valamint konformációját is [51]. Az AT<sub>2</sub>R, a bradikinin B<sub>2</sub> receptor, a  $\beta_2$ -adrenerg receptor, a Mas-receptor, a dopamin D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-D<sub>5</sub> és endothelin B receptorok pedig a heterodimerek alkotásában vehetnek részt [53-56]. A heterodimer tagjai erősíthetik, illetve gyengíthetik az AT<sub>1</sub>R jelátviteli folyamatait. Az AT<sub>1</sub>R képes továbbá még komplexebb struktúrák, oligomerek alkotására is [57].

#### 2.2.2.1 Az AT<sub>1</sub>R jelátviteli mechanizmusai

A GFKR család tagjaira általában jellemző, hogy aktivációt követően heterotrimerikus guanin-nukleotid kötő, azaz G-fehérjéket aktiválnak. Régóta ismert azonban, hogy a G-fehérjék működésétől független jelpályákat is képesek aktiválni [58]. Egy aktivált GFKR által elindított jelátviteli útvonalak ezért hagyományosan két csoportra oszthatók, klasszikus G-fehérje-függő folyamatokra, illetve a G-fehérjék működésétől független mechanizmusokra. Jelenlegi ismereteink alapján a G-fehérje-független szignalizációban a  $\beta$ -arresztin molekula tölt be központi regulátor szerepet, ezért manapság inkább G-fehérje-függő, illetve  $\beta$ -arresztin-mediált jelátviteli útvonalak felosztás használatos.

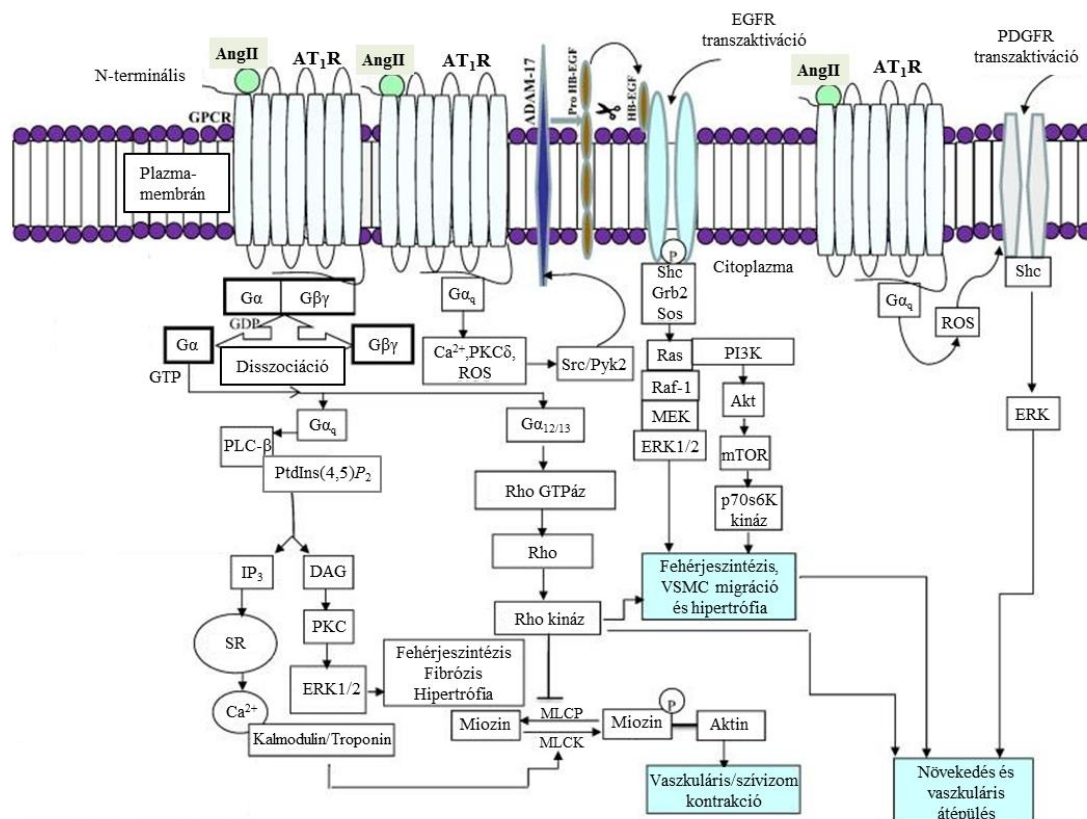
A heterotrimerikus G-fehérjék három alegységből állnak, melyek az  $\alpha$ , a  $\beta$  és a  $\gamma$ . Az  $\alpha$ -alegység guanozin-trifoszfát (GTP) és guanozin-difoszfát (GDP) kötésre képes, valamint GTP-áz aktivitással rendelkezik. A  $\beta$  és  $\gamma$  alegységek a plazmamembránhoz kihorgonyozva, stabil kötésben mindvégig együtt maradnak, ezért  $\beta\gamma$ -alegységről beszélhetünk. Az agonista kötődése aktív konformációban stabilizálja a receptort, a receptor és G-fehérje közötti interakció hatására pedig az  $\alpha$ -alegység a GDP-t GTP-re

cserélve aktiválódik [59]. A G-fehérjék hatásaik többségét az  $\alpha$ -alegységen keresztül hozzák létre [60].

Az AT<sub>1</sub>R stimulációját követően elsősorban a G<sub>q/11</sub> heterotrimerikus fehérjéket aktiválja, de bizonyos sejtekben kimutatták kapcsolatát a G<sub>i/o</sub> és G<sub>12/13</sub> család tagjaival is [9]. Ligandkötődés hatására a G<sub>q</sub>-fehérje  $\alpha$ -alegysége a foszfolipáz C- $\beta$ 1 (PLC $\beta$ 1) enzimet aktiválja, mely hasítja a membránalkotó lipid foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>). Két termék keletkezik: a diacilglicerin (DAG) és az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) (3. ábra) [61]. A DAG a plazmamembránhoz kötve marad és aktiválja a protein kináz C (PKC) enzimet. A szerin/treonin kináz PKC különböző fehérjéket foszforilálva szerteágazó hatásokhoz vezet a sejtben (pl. heterológ deszenzitizáció, az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) transzaktivációja, extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (ERK1/2) aktiváció) (3. ábra) [62-64]. A másik hírvivő molekula, az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> intracelluláris Ca<sup>2+</sup> jelet hoz létre Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptorain keresztül [65], melyek a sejtek endoplazmás retikulumában, illetve izmok esetén a szarkoplazmás retikulumban találhatóak. A felszabaduló Ca<sup>2+</sup> kalmodulinon, illetve más Ca<sup>2+</sup> érzékeny fehérjéken keresztül képes különböző sejtfunkciók szabályozására mint például a simaizomsejtek kontrakciója [66], illetve a PKC [67], a Ca<sup>2+</sup> dependens protein kinázok, mint a prolin-gazdag tirozin kináz 2 (Pyk2), valamint a foszfolipáz A2 aktivációjához is vezethet [68].

Az AT<sub>1</sub>R működése során egyetlen alegységből álló, úgynevezett kis G-fehérjéket is aktiválhat mint a Ras, a Rac, illetve a Rho [69]. Aktiválódásuk létrejöhet heterotrimerikus G-fehérje-függő, illetve független módon is [70]. A Ras kis G-fehérje a Ras/Raf/ mitogén aktivált protein kináz kináz (MEK) / extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (ERK1/2) mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádot is elindítja, mely a sejtnövekedésben, túlélésben és proliferációban fontos szereppel bíró génexpressziós változásokat hoz létre (3. ábra) [71]. Az AT<sub>1</sub>R a G<sub>12/13</sub> heterotrimerikus fehérje családon keresztül fokozza a Rho kis G-fehérje működését, valamint aktiválja a foszfolipáz C, a foszfolipáz D enzimeket, illetve a L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornákat [72-74]. A Rho/Rho kináz útvonal hozzájárul az AT<sub>1</sub>R mediált VSMC-kontrakcióhoz [72]. Továbbá egyes szövetekben mint például a patkány mellékvese, az AT<sub>1</sub>R G<sub>i/o</sub> fehérje közvetítésével gátolni képes az adenilát-cikláz, ezáltal feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>-csatornák működését is módosíthatja [75, 76]. A G-fehérje komplexből leváló  $\beta\gamma$ -alegységről pedig ismert,

hogy a foszfolipáz D enzimet [74], különböző tirozin kinázokon keresztül a foszfatidilinoztitol 3-kináz  $\gamma$ -t (PI3K $\gamma$ ), valamint a G-fehérje kapcsolt receptor kináz 2-t (GRK2) is képes aktiválni.



### 3. ábra Az AT<sub>1</sub>R G $\alpha_q$ és G $\alpha_{12/13}$ fehérjék által mediált szignalizációs útvonalai, illetve a receptor tirozin kinázok transzaktivációja

Rövidítések: daicilglicerin (DAG), EGF receptor (EGFR), extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (ERK1/2), inozitol-1,4,5-triszfoszfát (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), mitogén aktivált protein kináz kináz (MEK), miozin könnyű lánc kináz (MLCK), miozin könnyű lánc foszfatáz (MLCP), trombocita eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR), foszfatidilinoztitol 3-kináz (PI3K), foszfatidilinoztitol-4,5-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>), protein kináz C (PKC), foszfolipázC- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), pro heparin kötő epidermális növekedési faktor (proHB-EGF), prolin-gazdag tirozin kináz2 (Pyk2), szarkoplazmás retikulum (SR). Forrás: [77] alapján módosítva

Az AT<sub>1</sub>R aktivációjának következtében számos citoplazmatikus kináz aktiválódása, valamint tirozin kináz aktivitású növekedési faktor receptorok



transzaktivációja is létrejöhet [78-80]. Ezek segítségével történhet a sejtnövekedés, a sejtosztódás, a sejtváncorlás, az apoptózis, valamint a génátíródás folyamatainak módosítása. A növekedési faktor receptorok közül az AT<sub>1</sub>R képes transzaktiválni az EGFR-t, valamint a trombocita eredetű növekedési faktor receptort (PDGFR) is [81, 82]. Az EGFR transzaktiváció különböző módokon jöhet létre, köztük Ca<sup>2+</sup> jel, aktivált PKC, a reaktív oxigén származékok, illetve a citoszolikus tirozin kinázok (pl. Pyk2, c-Src) közreműködésével is (3. ábra) [83-85]. Számos sejt típusban az EGFR transzaktiváció génexpressziós változásokhoz vezet a korábban említett Ras/Raf/MEK/ERK1/2 útvonalon keresztül, valamint a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) által elindított mechanizmussal is [8]. Az AngII által indukált génexpressziós változások jelentős részéért egyébként a különböző MAPK-ok által mediált folyamatok felelősek, melyek többféle útvonal közvetítésével is aktiválódhatnak [79].

Az AngII képes továbbá a reaktív oxigén származékok, mint a szuperoxid anion (O<sup>2-</sup>) és a hidrogénperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), képződését is fokozni a szívizom, az érrendszer, az agy, illetve a vese mesangiális sejtjeiben [86-88]. A reaktív oxigén származékok az AngII fiziológiás és patológiás folyamataiban, mint például sejt proliferáció, hipertrófia, apoptózis, kardiovaszkuláris betegségek kialakulása és progressziója, egyaránt fontos szerepet játszhatnak [89, 90].

#### 2.2.2.2. *β-arresztin mediált folyamatok*

A G-fehérje-független jelátviteli mechanizmusok közül a β-arresztinekről rendelkezünk a legtöbb információval. Négy tagja ismert a citoszolikus adapter fehérjékből álló arresztin családnak. Közülük az arresztin1 és arresztin4 csak a retinában expresszálódik, az arresztin2 (más néven β-arresztin1) és az arresztin3 (azaz β-arresztin2) pedig a retinán kívül szinte minden sejtben megtalálható [91-93]. A β-arresztinek számos funkciói közül először a β<sub>2</sub>-adrenerg receptor G-fehérjétől való szétkapcsolásában, azaz deszenzitizációjában betöltött szerepét írták le. Innen ered az elnevezés is. Később vált világossá, hogy multifunkcionális adapter fehérjeként szerepet játszanak a legtöbb GFKR deszenzitizációjában, jelátvitelében, internalizációjában, vagy degradációjában, az általuk összekapcsolt fehérjekomplexek segítségével [94-96].

A  $\beta$ -arresztin1 és  $\beta$ -arresztin2 izoformák 78%-os szekvencia azonosságot mutatnak, viszont csak egyes funkcióik ellátásában képesek egymást helyettesíteni receptor-, illetve sejttípus-függő módon [97, 98]. Az AT<sub>1</sub>R esetén a  $\beta$ -arresztin1 és  $\beta$ -arresztin2 génkiütött egerekkel végzett kísérletek arra utalnak, hogy a két izoforma hasonló mértékben, egymás funkciójának helyettesítésével képes a receptort a membránban szekvesztrálni, illetve az internalizációt elindítani [99]. Más kutatások viszont az AT<sub>1</sub>R általi ERK1/2 aktivációban, a két izoforma ellentétes hatását mutatták ki [100]. A  $\beta$ -arresztin molekulák, egyre több interakciós partnerére derült fényt az utóbbi évtizedben, melyek közreműködésével a szignalizációban is részt vesznek [101, 102]. Az AT<sub>1</sub>R által elindított  $\beta$ -arresztin-függő jelátviteli folyamatok többek között izolált szívizomsejtek kontraktilitásának fokozódást [103], RhoA függő citoskeleton átrendeződést és stressz-rost képződést [104], antiapoptotikus hatásokat [105], valamint ERK1/2 általi fehérjeszintézis-fokozódást eredményeznek [106]. Az ERK1/2 MAPK kaszkád aktiválódása mellett a  $\beta$ -arresztin molekula a c-Jun N-terminális kináz3 MAPK-t is képes aktiválni [107, 108].

Mint korábban már említettem, AT<sub>1</sub>R esetén a MAPK-ok aktiválódása létrejöhet G-fehérjék közvetítésével, illetve tőlük függetlenül, többek között  $\beta$ -arresztin által is [109]. Ugyanazon jelátviteli útvonal G-fehérjétől függő, illetve független úton történő aktivációja mindazonáltal nem feltétlenül eredményez azonos hatásokat a sejt működésében. Az AngII által létrehozott G-fehérje-függő gyors MAPK aktiválódás során az ERK1/2 a sejtmagba is áthelyeződik és génexpressziós változásokat hoz létre. Ezzel szemben a  $\beta$ -arresztin-függő MAPK aktiválódás időben késleltetve jelenik meg, és tartósabban fennáll [110]. Ennek során az ERK1/2 nem jut be a sejtmagba, ezáltal feltehetően nem eredményez transzkripciós változásokat sem [35, 111]. Azonban képes a citoplazmában maradva foszforilálni az itt elhelyezkedő célfehérjéit, befolyásolva ezáltal a fehérjeszintézist is [106, 112]. Christensen és munkatársai sikeresen kimutattak ugyan néhány gén expressziójának változását az AT<sub>1</sub>R  $\beta$ -arresztin-függő jelpályáin keresztül, azonban ez a szám messze elmarad az AngII ingerlés során tapasztalt több száz gént érintő expressziós változásokhoz képest [113]. Feltehetően a  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitel kevésbé vezet közvetlen génexpressziós változásokhoz, azonban jelentősen modulálja a G-fehérje-függő genomális hatásokat [114].

A GFKR-ek agonista stimulusát követően a citoszolban található  $\beta$ -arresztinek kihelyeződnek a plazmamembránhoz és konformációs változáson mennek keresztül, mely folyamatokhoz nem szükséges feltétlenül a G-fehérjék aktivációja [109]. A receptor és  $\beta$ -arresztin által létrehozott komplex stabilitását a  $\beta$ -arresztin molekula agonista indukálta ubikvitinációs mintázata [115], valamint a receptor C-terminális régiójában lévő szerin/treonin motívumok foszforilációja is jelentősen befolyásolja [116]. Az  $AT_1R$  tartós, stabil komplexet képez a  $\beta$ -arresztin molekulával, együtt internalizálódnak az endocitotikus vezikulákba [98], miközben a komplex interakcióba kerül a szabályozásban és jelátvitelben részt vevő egyéb fehérjékkel. Az internalizálódott receptor lassabb reciklizáció segítségével kerül vissza a plazmamembránba vagy lizoszómákban degradálódik. Azok a receptorok melyek hasonló módon állnak kapcsolatban a  $\beta$ -arresztinnel, a receptorok „B osztályába” tartoznak, mint a neurotensin 1, a vazopresszin  $V_2$ , és a tireotropin felszabadító hormon receptora is. A GFKR-ek „A osztályába” sorolt receptorok ezzel ellentétben, eltérő foszforilációs mintázatot tartalmaznak citoplazmatikus doménjeiken, és csak átmeneti  $\beta$ -arresztin2 ubikvitinációt eredményeznek. Ennek következtében csak rövidebb életidejű receptor- $\beta$ -arresztin komplex jön létre a plazmamembránál. A  $\beta$ -arresztin molekuláktól függetlenül internalizálódnak [98], és gyors reciklizációval kerülnek vissza a plazmamembránba. Ebbe a csoportba tartoznak az  $\alpha_1$ - és  $\beta_2$ -adrenerg receptorok, a  $\mu$ -opioid, az endothelin A és a dopamin  $D_1$  receptorok is. Számos esetben az internalizáció megindulását követően, az endoszómákban is képződnek másodlagos hírvivők, folytatódik a szignalizáció [117]. Különösen igaz ez a  $\beta$ -arresztin által mediált jelátviteli útvonalakra, melyek aktiválódása egybeesik a receptor endocitózisának kezdetével és stabil receptor-arresztin-kötés esetén órákig is fennállhat [94, 118].

### **2.3. Jelátvitel-szelektív aktiváció**

#### **2.3.1. A GFKR-ek aktiválódásának mechanizmusai**

A dolgozat fő témáját képező jelátvitel-szelektív aktiváció ismertetéséhez szükséges előbb bevezetni a receptorok aktiválódásának lehetséges modelljeit, melyek a GFKR-ekre is érvényesek. A hagyományos elképzelés szerint a receptorok kétféle konformációval rendelkeznek, egy aktívval ( $R^*$ ) és egy inaktívval ( $R$ ). Az agonista

ligandok az  $R^*$  szerkezetet stabilizálva működésbe hozzák a receptort, míg az antagonisták az  $R$  konformációt stabilizálva gátolják a receptor jelátvitelét (4. ábra, A) [119]. Azonban az elmúlt néhány évtized kutatásai eredményei alapján ma már a kétállapotú modellnél összetettebb rendszert feltételezünk. Kiderült ugyanis, hogy egyes receptorok ligand kötődése nélkül is képesek aktív konformációt felvenni és jelátviteli útvonalakat aktiválni. A jelenséget bazális aktivitásnak nevezzük. Egyik elképzelés szerint ligandkötés nélkül a bazális aktivitás mértékét az  $R$  és  $R^*$  állapotban lévő receptorok aránya határozza meg [120]. A receptorok bazális aktivitását más elmélet szerint a receptor részlegesen aktív, köztes konformációja ( $R'$ ) hozza létre, mely az  $R$  és  $R^*$  konformációk között helyezkedik el. Feltehetően ligandkötés esetén is az  $R^*$  állapot ezen részlegesen aktív  $R'$  konformáción keresztül alakul ki az  $R$  állapotból (4. ábra, B) [121]. A rendszer összetettségének köszönhetően azonban még ma sem eldöntött kérdés, hogy milyen konformációkat vehet fel egy receptor nyugalmi helyzetben, illetve, hogy a különböző ligandok hogyan befolyásolják a konformációk közötti egyensúlyt [122].

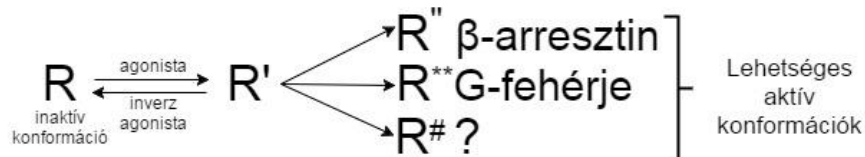
A



B



C



#### 4. ábra G-fehérje kapcsolt receptorok alternatív receptoraktivációs elméletei

A, A hagyományos kétállapotú receptoraktivációs modell. B, A háromállapotú receptoraktivációs modell. C, Kibővített háromállapotú modell.

Rövidítések: inaktív konformáció ( $R$ ), aktív konformáció ( $R^*$ ), köztes állapot ( $R'$ ), egyes agonista ligandok által stabilizált aktív receptorkonformációk ( $R''$ ,  $R^{**}$ ,  $R^\#$ ).

A receptorok megfelelő konformációjának kialakulásában a ligandok tulajdonságai meghatározó szereppel bírnak. Egyik alapvető ligandjellemző a hatékonyság, vagyis a receptoron keresztül a ligand által maximálisan létrehozható válasz nagysága. A ligand hatékonysága megszabja, hogy mennyire képes az R és R\* közötti egyensúlyt eltolni. A teljes agonisták az R\* konformációhoz kötődnek és azt stabilizálják. A részleges agonisták mind az R, mind pedig az R\* konformációhoz kötődnek, ennek megfelelően a teljes agonistákhoz képest kevésbé képesek az aktív állapot felé eltolni az egyensúlyt. Az inverz agonistáknak nevezett ligandok az inaktív R állapotban lévő receptorokhoz kötnek, eltolva ezzel az egyensúlyt az inaktív állapot felé. Az inverz agonisták tehát képesek a bazális aktivitás csökkentésére is (4. ábra, B). A neutrális antagonisták nem befolyásolják a bazális aktivitást, azonban kompetitíven meggátolják más ligandok kötődését, így R' konformációban stabilizálják a receptort [123]. A bazális aktivitás és inverz agonizmus jelenségének leírása óta számos antagonistáról kiderült, hogy valójában inverz agonistaként funkcionálnak, többek között néhány ARB-ról is. Ugyanis az AT<sub>1</sub>R is rendelkezik bazális aktivitással, mely bár alacsony szintű (~5%), de funkcionális jelentőséggel bírhat [124].

Ez a két végállapottal (R és R\*) jellemezhető modell jó magyarázatul szolgál a GFKR-ek funkcionális viselkedésének nagy részére, amikor egy receptor és egy aktiválódó G-fehérjéből álló rendszerben vizsgáljuk különböző ligandok hatékonyságát. A GFKR-ekre azonban jellemző, hogy a G-fehérje család több tagját is képesek lehetnek aktiválni, valamint párhuzamosan, G-fehérjétől független jelpályákat is elindíthatnak. Az elmúlt egy-két évtized intenzív kutatásai fényt derítettek arra a jelenségre, hogy egy receptor nem csak egy aktív konformációban létezhet, hanem különböző aktív konformációkat is felvehet [125]. Ezen információkat alapul véve egy kibővített elmélet szerint minden agonista egy egyedi konformációban stabilizálja a receptort, mely meghatározza, hogy a különböző jelátviteli útvonalak közül melyek és milyen mértékben kerülnek aktiválódásra. A GFKR-ek esetén például, hogy melyik G-fehérjék, kinázok, illetve arresztinek lépnek működésbe (4. ábra, C) [126]. Egy ligand hatékonysága tehát attól függ, hogy melyik jelátviteli folyamat aktiválódásának mértékét vizsgáljuk. Az egyes ligandok által az eltérő receptor konformáció stabilizálásán keresztül, a jelátviteli útvonalak szelektív aktiválását, illetve gátlását,

jelátvitel-szelektív agonizmusnak (angolul biased agonism), vagy funkcionális szelektitásnak nevezzük [127, 128].

### 2.3.2. A funkcionális szelektitás létrejöttének mechanizmusa

A jelátvitel-szelektív agonizmus kapcsán alapvetően két fontos lépést érdemes megvizsgálni, mégpedig a receptorok lehetséges konformációs állapotait, illetve az aktivált receptor interakcióját a különböző szignalizációs partnerekkel. Az elmúlt évtizedekben számos módszertani megközelítéssel, köztük fluoreszcens technikákkal, sikerült kimutatni, hogy a ligandok egyedi konformációkban képesek stabilizálni a GFKR-eket [129, 130]. Intenzív vizsgálatok tárgyát képezik, hogy a receptorok és ligandjaik mely szekvenciarezszelei, illetve általuk létrehozott szerkezeti elemek meghatározók a receptor szerkezetének rögzítésében, és ezáltal a jelátvitel szelektívitasban. Mint azt az AT<sub>1</sub>R szerkezetének bemutatásánál említettem, a GFKR-ek igen nehezen kristályosítható struktúrával rendelkeznek, így szerkezetük hosszú ideig csak közvetve volt vizsgálható. Az utóbbi évtized fejlődésének köszönhetően azonban mára már számos GFKR kristályszerkezetét sikerült megalkotni, melyek nagy előrelépést jelentettek a receptorok szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálatában. Bioinformatikai módszerek, köztük *in silico* homológián alapuló modellezési technikák segítségével, a rendelkezésre álló struktúrák felhasználásával, további távlatok nyíltak meg a jelátvitel-szelektív aktiváció megismerésében és lehetséges új ligandok fejlesztésében [131].

Az egyedi receptorkonformációk feltételezik továbbá, hogy a receptor egyes régiói más-más formában rögzülnek a különböző ligandok esetén. Mivel az interakciós partnerek a GFKR-ek különböző doménjeihez kapcsolódnak várható, hogy a jelátvitel résztvevőinek kötődése is eltérő mértékben fog megváltozni, mely befolyásolja a jelpályák aktivitását. A szignalizációs partnermolekulák az interakció során maguk is konformációs változáson mehetnek keresztül. Erre mutat példát a  $\beta$ -arresztin molekula. Charest és munkatársai az igen nagy felbontással működő biolumineszcencia rezonancia energia transzfer (BRET) technika segítségével vizsgálták meg a  $\beta$ -arresztin molekulán belüli szerkezeti változásokat GFKR ligandok hatására [132]. Az eredmények arra utalnak, hogy a funkcionálisan szelektív, valamint az endogén, általában teljes agonisták

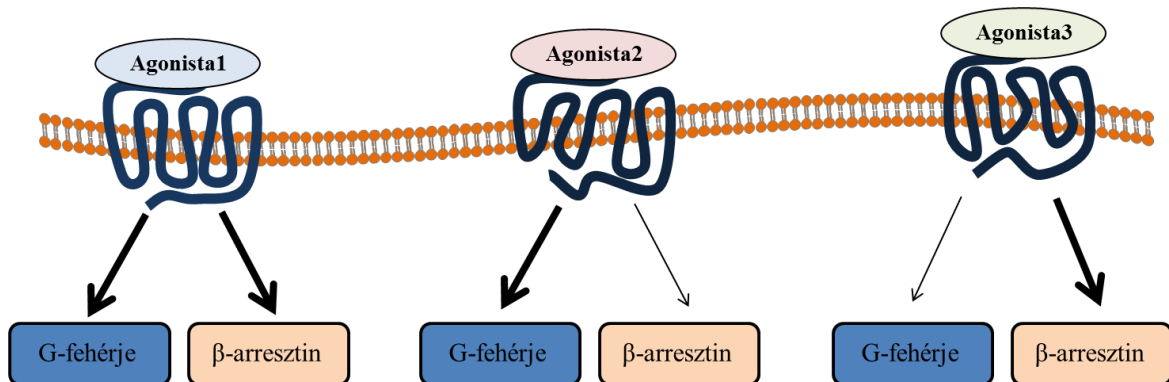
által stabilizált különböző receptorkonformációk eltérő változásokhoz vezetnek a  $\beta$ -arresztin molekula szerkezetében. Egyazon jelátvitelt (pl.  $\beta$ -arresztin-függő jelpályákat) szelektíven aktiváló különböző ligandok hatására azonban nem feltétlenül azonos strukturális módosulások mennek végbe a  $\beta$ -arresztinben [133, 134]. Ezt a feltevést támasztja alá, hogy az azonos csoportba tartozó funkcionálisan szelektív ligandok által kiváltott szignalizáció más vizsgálatokban sem mutatott minden esetben teljes mértékű egyezést. Az ugyanazon jelátvitel irányába elfogult ligandok tehát nem feltétlenül helyettesíthetők egymással. Érdekes továbbá, hogy Rakesh és munkatársai egér szívizomsejtekben az  $AT_1R$  mechanikai stressz általi aktiválódásakor létrejövő  $\beta$ -arresztin konformációs változások vizsgálatokkor úgy találták, hogy a mechanikai ingerre tapasztalt szerkezeti módosulás a  $\beta$ -arresztin jelátvitelre szelektív ligand stimulációja esetén létrejövő  $\beta$ -arresztin konformációs változásaival mutatott hasonlóságot [135]. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az  $AT_1R$  a membrányújítás érzékelését G-fehérje aktiváció nélkül,  $\beta$ -arresztin-függő módon közvetítheti a szívizomsejtek felé.

A  $\beta$ -arresztin molekulák aktiválódását azonban nem csak az aktív receptorkonformáció határozza meg, hanem a GRK-k által létrehozott foszforilációs mintázat is. A GRK család tagjai a receptort foszforilálva elősegítik deszenzitizációját, vagyis szétkapcsolódását a G-fehérjétől, valamint a  $\beta$ -arresztin molekulák kötődését. Az egyes ligandok által stabilizált eltérő receptor konformációk különböző GRK izoformák aktiválódásához vezetnek, melyek eltérő foszforilációs mintázatot, úgynevezett „GRK-vonalkódot” helyeznek el a receptor intracelluláris felszínén. Az egyedi foszforilációs mintázat, ezáltal receptortopológia és töltéseloszlás pedig befolyásolhatja a kötődő  $\beta$ -arresztin konformációját, így az általa elindított jelátviteli pályákat, valamint a receptor mozgását is [136, 137]. Az  $AT_1R$  foszforilációját, deszenzitizációját, illetve a GRK család szerepét később részletesebben is tárgyalom.

Összefoglalva tehát jelenlegi elképzelésünk szerint a jelátvitel-szelektív agonizmus során nemcsak a receptor szerkezete stabilizálódik egyedi aktív konformációban az egyes ligandok esetén, de az eltérő GRK-k általi foszforilációs mintázat, illetve az eltérő  $\beta$ -arresztin konformációs változás is meghatározó a jelenség létrejöttében [134].

### 2.3.3. A GFKR-ek jelátvitel-szelektív agonizmusának jelentősége

A GFKR-ek jelátvitel-szelektív agonizmusára az irodalom forró pontjává vált az elmúlt évtizedekben, hiszen ezen mechanizmus által a receptorok működése sokkal finomabban hangolható, mint korábban gondoltuk. Ennek következtében egyre több információval rendelkezünk a GFKR-ek komplex jelátviteli rendszereiről és ezek szelektív aktivációjáról [138-140]. Mint említettem, a GFKR-ek jelátviteli mechanizmusai alapvetően két csoportba sorolhatók azért, hogy G-fehérje aktiválás hatására, vagy pedig attól függetlenül lépnek működésbe. Ennek megfelelően beszélhetünk a receptorcsalád jelátvitel-szelektív ligandjai közül is G-fehérje-függő jelátvitel irányába elfogult, vagy pedig G-fehérjétől független, azaz  $\beta$ -arresztin jelátvitel irányába elfogult ligandokról (5. ábra).



#### 5. ábra A G-fehérje kapcsolt receptorok jelátvitel-szelektív agonizmusára

Az Agonista1 a klasszikus agonistát jelképezi, mely azonos mértékben segíti elő mind a G-fehérje-függő, mind pedig a  $\beta$ -arresztin-mediált jelátvitel elindulását. Az Agonista2, a G-fehérje jelátvitelt szelektíven aktiváló ligandokra utal, melyek kötődése a receptort G-fehérje kötés és aktivációt preferáló konformációban stabilizálja. A  $\beta$ -arresztin jelátvitel irányába elfogult ligandok esetén a G-fehérje jelátvitel helyett a receptor elsősorban  $\beta$ -arresztin-függő mechanizmusokat indít el (Agonista3).

A párhuzamos jelátvitel eltérő, olykor ellentétes funkciókkal is rendelkezhetnek. Esetenként a  $\beta$ -arresztin által elindított jelátvitel kedvező hatásokat közvetítenek, míg a G-fehérje-függő folyamatok túlzott aktiválódása potenciálisan káros sejtválaszokat,



mellékhatásokat. Ezen jelenségre mutat példát a „béta-blokkolók” közé sorolt carvedilol is. A „béta-blokkolók” nem specifikus  $\beta$ -adrenerg receptor ( $\beta$ -AR) gátlószerek, melyeket széles körben alkalmaznak a miokardiális infarktus terápiájában [141]. Szívelégtelenség kezelésében is használatosak, ahol a csoport egyes tagjai képesek a túlélést javítani, közülük is legkifejezettebben a carvedilol [142]. Későbbi kutatások kiderítették, hogy a carvedilol nem egy klasszikus  $\beta$ -AR antagonist, hanem  $\beta$ -arresztin jelátvitel-szelektív agonista. G-fehérje-független módon képes az EGFR transzaktivációját, valamint ERK1/2 foszforilációt kiváltani [143, 144]. A  $\beta$ -AR-okról ismert, hogy hosszú távú  $G_s$ -fehérje aktivációjuk kardiotoxikus [145], míg az általuk létrehozott EGFR transzaktiváció kardioprotektív hatású [146]. A G-fehérje-függő jelátvitel gátlása, és párhuzamosan a kardioprotektív  $\beta$ -arresztin jelátvitel aktivációja felelős lehet a carvedilol szívelégtelenség kezelésében tapasztalt kedvezőbb klinikai hatásaiért.

Az elmúlt években megkezdődött célzottan jelátvitel-szelektív ligandok/hatóanyagok fejlesztése is. Alkalmazásuk célja a terápiás hatékonyság növelése a kívánt hatásprofil eléréséhez szükséges pályák szelektív aktiválásával, a nem kívánatos mellékhatásokat okozó pályák aktiválása nélkül vagy gátlásával. Ilyen vegyületre példa a G-fehérje jelátvitelre szelektív  $\mu$ -opioid receptor ( $\mu$ -OR) agonista TRV130. A  $\mu$ -OR esetén az analgetikus hatás  $G_i$ -fehérje-mediált folyamat, míg a gasztrointesztinális, a légzésdeprimáló, illetve a toleranciához vezető mellékhatások  $\beta$ -arresztin közvetítésével jönnek létre [147]. Állatkísérletes modellekben a TRV130 a teljes agonista morfinhoz hasonló mértékű analgetikus hatást mutatott, kisebb fokú légzésdeprimáló mellékhatással [148]. A jelenleg is tartó klinikai vizsgálatok megerősítették, hogy a TRV130 a morfinnál jobb analgetikus hatással és egészséges önkéntesek esetén kevesebb mellékhatással rendelkezik. Fázis 2 vizsgálat során viszont már nem sikerült szignifikánsan kisebb légzésdeprimáló hatást kimutatni, de a terápiás hatékonyság így is jobbnak bizonyult, mint morfin esetén [149, 150]. A vegyület jelenleg is további vizsgálatok tárgyát képezi.

A jelátvitel-szelektív ligandok feltérképezése és fejlesztése azonban nemcsak új lehetőségeket, de újabb kihívásokat is rejt magában. Egy vegyület funkcionális szelektivitásának karakterizálásához ugyanis rendkívül sokféle jelpályára gyakorolt hatását kell megvizsgálni. Továbbá a hatás erőssége nagyban függ a sejtípustól és az

alkalmazott megközelítési módszertől is. Olyan módszer esetén mely egy jelpálya erősítés nélküli korai lépését (pl.  $\beta$ -arresztin-kötés ) vizsgálja [151], egy parciális agonista a teljes agonistához képest kisebb maximális jelet mutat [152]. Egy erősítést követő lépést vizsgáló megközelítésben (pl. másodlagos hírvivőképzés mint az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  produkció) viszont a teljes agonistával megegyező maximális választ hozhat létre. Így az egyik vizsgálati rendszerben teljes, míg a másikban részleges hatás elérésével a ligand tévesen jelátvitel-szelektív agonistának lehet kategorizálva. Számos különböző kvalitatív és kvantitatív megközelítési módszer létezik már a jelátvitel-szelektivitás meghatározására, azonban az irodalomban továbbra sincs egységesen elfogadott álláspont a témában [153, 154]. Egyes szerzők a természetes ligandhoz mint referenciához viszonyítva adják meg a vizsgált vegyület jelátvitel-szelektivitásának mértékét. Az így kapott „bias faktor”, vagyis „elfogultsági faktor” a jelpálya szelektivitás mértékének számszerűsített értéke. Természetesen előfordulhat, hogy a természetes ligand sem teljesen „elfogulatlan” a különböző jelpályák irányába. Ezért egy vizsgált ligand funkcionális szelektivitásának mértéke nem tekinthető egy abszolút tulajdonságnak, hanem sokkal inkább az adott rendszerben, az adott viszonyítási ligandhoz képest kifejezett relatív értéknek [153, 155].

Fontos szempont továbbá, hogy a megfigyelhető eltérő intracelluláris jelátvitel milyen mértékben vezet eltérő biológiai válaszhoz. Számos példa ismert már az irodalomban a G-fehérje-függő, illetve a  $\beta$ -arresztin-mediált jelpályák elkülöníthető, akár ellentétes szerepéről *in vivo* fiziológiás és patológias folyamatokban. Erre jelent példát a szívizom-hipertófia, a szívelégtelenség kialakulása, a VSMC-k hipertófiája vagy hiperpláziája, a kemotaxis és az immunválasz létrejötte, a csontanyagcsere, a tumornövekedés, a migráció vagy az anyagcsere-háztartás szabályozása is [94]. Ezen folyamatokban is előnyös lehet G-fehérje-függő, vagy éppen G-fehérje-független ligandok fejlesztése. Az eddigi hatások, biológiai válaszok nagy többsége azonban sejtes rendszereken, illetve állatokon végzett kísérletekből származik. További kihívást jelent az így látott hatások terápiás eredményekbe való átültetése is [156]. A jelátvitel-szelektív agonizmus azonban nem csak farmakológiai szempontból fontos jelenség, hiszen egyre több adat utal arra, hogy léteznek endogén funkcionálisan szelektív ligandok is, melyek szintén számos élettani folyamatra hatással bírhatnak. Erre példa az  $\text{EP}_4$  prosztaglandin receptor [157], a különböző kemokin receptorok [158], vagy a  $\mu$ -OR

endogén jelátvitel-szelektív agonistái [159]. Az AT<sub>1</sub>R esetén pedig egy nemrég megjelent közlemény az Ang(1-7) molekuláról mutatta ki, hogy képes a  $\beta$ -arresztin-függő jelpályákat szelektíven aktiválni [19]. További endogén ligandok felfedezése valószínűleg mindinkább megerősíti majd azt az elképzelést, hogy a jelátvitel-szelektív agonizmus egy elterjedt és az evolúció során konzervált folyamat, melynek segítségével egyazon receptoron keresztül a különböző endogén ligandok eltérő jelátviteli mintázatokat képesek aktiválni és sokszínű biológiai válaszokat létrehozni.

#### **2.3.4. Az AT<sub>1</sub>R jelátvitel-szelektív aktivációja**

A funkcionális szelektivitás témakörében az AT<sub>1</sub>R az egyik legrégebb óta és legintenzívebben vizsgált GFKR. A kutatás fő céljai AT<sub>1</sub>R esetén is a szelektív jelpálya-aktiváció mechanizmusának megismerése, illetve az ezáltal létrehozott biológiai válaszok karakterizálása. A jelenség feltérképezéséhez különböző módszerek, megközelítési lehetőségek állnak rendelkezésünkre, többek között funkcionálisan szelektív tulajdonságokkal bíró ligandok, illetve mutáns receptorok is. Az irodalomban számos mutáns AT<sub>1</sub>R ismert, melyekben a receptorfunkciót jelentősen befolyásoló doménekben történt aminosavcsere. Közéjük tartozik például a konstitutívan aktív, G<sub>q/11</sub> jelpálya irányába elfogult N111G-AT<sub>1</sub>R [160], valamint a  $\beta$ -arresztin jelátvitelt szelektíven aktiváló D74N-AT<sub>1</sub>R és a DRY/AAY mutáns AT<sub>1</sub>R-ok is [161]. Kísérleteinkben a munkacsoportunk által létrehozott DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-t alkalmaztuk [162], ezért ezt a mutánst ismertetném. A G-fehérjét nem aktiváló DRY/AAY mutáns AT<sub>1</sub>R-ben a GFKR-ek rendkívül konzervált aszparaginsav-arginin-tirozin (DRY) motívumában történt aminosavcsere [109, 161, 163, 164]. A motívum a harmadik transzmembrán domén és a második intracelluláris hurok határán található (2. *ábra*, A). Ismert róla, hogy kitüntetett szerepet játszik a receptorok aktivációjában és G-fehérje kötésében, azonban az egyes GFKR-ekben betöltött szerepe nem teljesen egyező [165]. A DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-ben a konzervált domén Asp125 és Arg126 aminosavait alaninnal helyettesítették, melynek következtében G-fehérje kötésre képtelen mutáns jött létre [162]. A receptor  $\beta$ -arresztin<sup>2</sup>-kötésre, internalizációra, valamint ERK1/2 aktivációra továbbra is képes [109, 161], így  $\beta$ -arresztin jelátvitelre szelektív mutáns receptorról

beszélhetünk, mely a vad típusú AT<sub>1</sub>R-hez hasonló mértékű sejtfelszíni expresszióval, valamint AngII iránti affinitással rendelkezik [161].

Szintén mutáns receptorokkal végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy az AT<sub>1</sub>R esetén más domének vesznek részt a MAPK kaszkád, valamint a G<sub>q</sub>-fehérje-függő jelátvitel aktivációjában [166]. Az egyes jelpályák, mint a G-fehérje-függő, illetve -független útvonalak, nemcsak eltérő fehérjeszekvenciát igényelnek, de a receptor eltérő konformációban való rögzülését is [37, 167]. Ismert továbbá, hogy vannak olyan útvonalak, melyek aktiválódása különböző receptorepitópok és -konformációk közvetítésével is létrejöhet. Azonban a különböző módon aktivált jelpálya végül eltérő biológiai válaszokhoz vezethet. Erre példa a korábban részletezett MAPK kaszkád is, mely az elindító jelpályától függően eltérő lokalizációjú és hatású aktivált effektor molekulákat tartalmaz [168].

Az AT<sub>1</sub>R mellett számos tanulmány vizsgálta az endogén ligand AngII szerkezet-aktivitás összefüggését is [169], melynek köszönhetően igen nagyszámú AngII analóg került már leírásra [170]. Ezen vizsgálatok alapján az AngII molekula aminosavszármazékai eltérő mértékben befolyásolják a receptor ligandkötését, jelpályáinak aktivációját, deszenzitizációját vagy internalizációját. Közülük az aromás Tyr<sup>4</sup>, His<sup>6</sup> és Phe<sup>8</sup> aminosavak az AngII kötődése során az AT<sub>1</sub>R számos aminosavával kerülnek kontaktusba, és kitüntetett szereppel bírnak a kötés kialakulásában, illetve a receptor aktiválásában [171]. A nyolcas pozíciójú fenilalanin kiemelten kritikus az AngII agonista aktivitásában. Cseréje gyengíti az agonista aktivitást és agonista-antagonista átmenethez vezet. Az aromás Phe<sup>8</sup> glicinre vagy izoleucinra történő cseréje G-fehérje-aktivációra képtelen, azonban β-arresztin-jelátvitelre képes AngII analógokat eredményez [134]. Erre példa az [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]-AngII (SI-AngII) is, melyet évtizedekig antagonistaként tartották számon az irodalomban. Később kiderült, hogy nem gátolja a receptor minden funkcióját, és egyes jelpályákon parciális agonistaként működik [172]. Legújabb adatok szerint a G<sub>q</sub>-jelpályát egyáltalán nem, a β-arresztin-jelátvitelt részlegesen aktiválva jelátvitel-szelektív agonistaként működik [134], valamint a nem peptid antagonistáktól eltérően képes a receptor internalizációját is elindítani [173]. Az AngII egyes pozíciójában lévő aszpartát cseréje sarcosin [Sar] csoportra pedig fokozza az AngII analógok amino-peptidázokkal szembeni stabilitását, meghosszabbítva ezzel a

féléletidejüket, valamint fokozza mind az agonista, mind pedig az antagonistá analógok hatásosságát is [172].

A 4-es és 8-as pozíciójú tirozin és fenilalanin együttes cseréjével szintén G-fehérje aktivációra képtelen,  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív AngII analógok jönnek létre mint pl. az [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>]-AngII (SII-AngII) [109]. Az SII-AngII oktapeptid AngII analóg volt az egyik legelsőként kifejlesztett jelátvitel-szelektív ligand az irodalomban. Bár az SII-AngII nagyon alacsony affinitással rendelkezik az AT<sub>1</sub>R-hez [169], mégis széles körben alkalmazzák a funkcionális szelektivitás vizsgálatára. Az elfogult AT<sub>1</sub>R ligandok közül az SII-AngII-ról rendelkezünk a legtöbb információval. Kifejlesztése és alkalmazása nagyban elősegítette a terület fejlődését. Az SII-AngII által aktivált AT<sub>1</sub>R G<sub>q/11</sub>-fehérje-kötésre képtelen, azonban egyes, ettől függetlenül működő jelpályákat képes működésbe hozni. Jellemző rá, hogy  $\beta$ -arresztin közvetítésével MAPK aktivációt hoz létre, mely citoplazmatikus fehérjék foszforilációját szabályozza [109]. Fokozza a fehérjetermelést a MAPK interakciós kináz 1, eukarióta iniciációs faktor-4E és ERK1/2 aktivációján keresztül [106]. Az SII-AngII funkcionális hatásokkal is rendelkezik az AngII fiziológiás célsejtjein. Izolált egér szívizomsejteken például pozitív inotróp és luzitrop hatással bír. A folyamathoz GRK6 és  $\beta$ -arresztin2 szükséges, míg a GRK2 izoforma ezzel ellentétesen hat [103]. Ez a jelenség is példa a GRK izoformák specializált, olykor ellentétes szerepére. Primer szívizomsejtek esetén is igaz, hogy az SII-AngII  $\beta$ -arresztin közvetítésével csak a citoplazmában lévő ERK1/2-t, ennek hatására pedig a p90 riboszómális S6 kinázt (p90RSK) aktiválja. Mivel elmarad a G<sub>q/11</sub>-fehérje-függő ERK1/2 sejtmagba áthelyeződés, nem jön létre az Elk1 transzkripciós faktor aktivációja sem. Az SII-AngII ezáltal a szívizomsejtek proliferációját hozza létre, de nem jön létre hipertrófia, mely AngII hatására megfigyelhető [174]. Az AngII másik jelentős célsejtjeiben, a VSMC-kben az SII-AngII szintén  $\beta$ -arresztin-függő módon mitogén és antiapoptotikus hatásokat vált ki, valamint fokozza a migrációjukat. Ezen mechanizmusokban a VSMC-k AT<sub>1</sub>R jelátvitelére igen jellemző, EGFR transzaktiváció játszik szerepet. Az SII-AngII által kiváltott ERK1/2 aktiválódás és proliferáció is az EGFR G-fehérje-független transzaktivációján keresztül jön létre ezekben a sejtekben [175]. Továbbá az ERK1/2-p90RSK, valamint a PI3K/Akt útvonalak szinkron a proapoptotikus BAD nevű fehérje foszforilációjához és lebontásához vezetnek SII-AngII hatására. A folyamat magyarázatául szolgálhat az SII-AngII antiapoptotikus és

citoprotektív hatásaira patkány simaizomsejteken [105]. Az SII-AngII a szintén AngII célszerv mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtek aldosteronszintézisét is képes fokozni  $\beta$ -arresztin-mediált útvonalon, az AngII által indukált  $G_q$ -fehérje-függő aldosterontermelésen túlmenően [176]. A folyamat fokozott aldosterontermeléshez vezethet, mely káros kardiális átépülést és szívelégtelenség-súlyosbodást okozhat. Ezt a jelenséget mindenképpen fontos figyelembe venni  $\beta$ -arresztin jelátvitelre szelektív ligandok fejlesztése és alkalmazása során [170].

Az egyes  $\beta$ -arresztin-szelektív  $AT_1R$  mutánsokra és ligandokra jellemző, hogy nem teljesen azonos konformációs és jelátviteli változásokat hoznak létre. Mint ahogy már említettem, a G-fehérje-aktiváció hiányán, és a  $\beta$ -arresztin aktivációján mint közös jellemzőn túl ugyanis eltérő szerkezetben stabilizálhatják mind a receptort mind pedig a  $\beta$ -arresztint. A számos egyéb párhuzamos útvonalat sem teljesen azonos mintázattal indítják el, melynek következménye, hogy eltérő intracelluláris célfehérjék foszforilálódnak, illetve más-más gének expressziója regulálódik. A jelátvitel ezen szintjein már nem feltétlenül lehet a különböző  $\beta$ -arresztin jelátvitelre szelektív ligandokat egy homogén csoportba sorolni [177].

### 2.3.5. Elfogult $AT_1R$ ligandok mint új terápiás lehetőségek

Az ARB-k és az ACEI-k az első között alkalmazandó gyógyszerek pl. magas vérnyomás, szívizom-hipertrófia vagy krónikus szívelégtelenség kezelésben. Egyes tanulmányok arra utalnak, hogy összevetve a nem szelektíven ható gyógyszerekkel az  $AT_1R$   $G_{\alpha_{q/11}}$ -fehérje-függő útvonalainak szelektív gátlása bizonyos esetekben további jó hatással lehet [178, 179]. Ezen célokat szem előtt tartva néhány éve új, jelátvitel-szelektív  $AT_1R$  peptid agonisták kerültek kifejlesztésre. A TRV120023 (Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala-OH) és TRV120027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala-OH) ligandok sokkal nagyobb affinitással kötődnek az  $AT_1R$ -hoz, mint az SII-AngII, mely fontos szempont a klinikai alkalmazhatóságban. Ezek a TRV peptidek G-fehérje aktiválás nélkül, szelektíven indítják el a  $\beta$ -arresztin-mediált jelátviteli útvonalakat. Képesek az ERK1/2, a c-Jun, a Fokális adhéziós kináz és a Src kinázok foszforilációját valamint aktivációját, továbbá ezen utóbbin keresztül az endotéliális nitrogén monoxid szintáz foszforilációját is kiváltani [180]. Ezenkívül, az SII-AngII-höz hasonlóan,

fokozzák az izolált egér szívizomsejtek kontraktilitását és teljesítményét is [180, 181]. Patkányokon, a klasszikus  $AT_1R$  antagonistáktól eltérően, a vérnyomás csökkentése mellett nem okoznak verőtérfogat-csökkenést, nem rontják a szív pumpafunkcióját, sőt  $\beta$ -arresztin-függő módon képesek a szív kontraktilitását fokozni a miozin könnyű lánc foszforilációjának fokozásán keresztül [182]. Összességében, a vérnyomás csökkentésével csökkentik a szív utóterhelését és oxigénigényét, megkönnyítve ezzel a szív munkáját, továbbá fokozzák a szív kontraktilitását [183]. Ezen hatásprofil kifejezetten előnyös lehet szívelégtelenség kezelésében, ahol egy időben szükséges a vérnyomás csökkentése és a szív kontraktilitásának fokozása. Az ARB-k és ACEI-k, melyek a magas vérnyomás, illetve a krónikus szívelégtelenség kezelés alap terápiás eszközei, nem alkalmazhatók akut szívelégtelenség esetén. Ilyenkor ugyanis hátrányos hatásuk, hogy csökkentik a szív pumpaműködését, és hosszan tartó vérnyomásesést okoznak. Ezért felmerült, hogy a  $\beta$ -arresztin jelátvitel-szelektív  $AT_1R$  ligandok hatásosak lehetnek akut szívelégtelenség kezelésében. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség kutya modelljében a TRV120027 csökkentette a pulmonális kapilláris vérnyomást, mely a nehézlégzés súlyosságára enged következtetni, valamint az artériás középnyomást és a teljes perifériás érellenállást is. Fokozta továbbá a vese perfúzióját és a szív perctérfogátát, vagyis teljesítőképességét is [184]. A TRV120027 előnyös tulajdonságainak köszönhetően további humán vizsgálatok tárgyát képezte mint újabb terápiás lehetőség az akut szívelégtelenség kezelésében [185, 186]. Az egészséges önkénteseken végzett fázis I és stabil pangásos szívelégtelenségben szenvedő betegeken végzett fázis IIa vizsgálatokban is jól tolerálható, rövid féléletidejű farmakokinetikai profilt mutatott. A vizsgált személyek közül az emelkedett reninszinttel rendelkezőkben hatásos vérnyomáscsökkentőnek bizonyult, míg a normál plazma reninszinttel rendelkezőkben nem csökkentette az artériás középnyomást [185, 187]. Ezt követően fázis IIb randomizált, dupla vak vizsgálatban vetették össze hatékonyságát placebóval, illetve hagyományos terápiával akut szívelégtelen betegeken [188]. A vizsgálatokban végül nem sikerült szignifikáns különbséget találni a kitűzött paraméterekben (pl. nehézlégzés súlyossága, szívelégtelenség progressziója, mortalitás).

## 2.4. A GFKR-ek deszenzitizációja és internalizációja, a válaszkészség szabályozása

A GFKR-ekre jellemző, hogy aktiválódás után a receptor foszforilálódik, jelátviteli folyamatai mérséklődnek, majd egy lefűződő membráncsoport segítségével eltávolodik a plazmamembrántól és sejt belsejébe kerül, azaz internalizálódik. Ezen folyamatok összessége a receptor, és ezáltal a sejt érzékenységét és válaszkészségét is meghatározza.

### 2.4.1. A GFKR-ek deszenzitizációja és a G-fehérje kapcsolt receptor kinázok

Az aktiválódott GFKR különböző kinázok által foszforilálódik, melynek hatására jelátvitel csökken. A jelenséget deszenzitizációnak nevezzük, mely létrejöhet homológ, illetve heterológ módon, attól függően, hogy mely kinázok foszforilálják a receptort. Homológ deszenzitizáció esetén a receptoraktiváció következtében aktiválódott kinázok foszforilálják a receptort, és vezetnek ugyanazon receptor deszenzitizációjához [189]. Heterológ deszenzitizációról akkor beszélhetünk, ha a receptor aktiváció nélkül foszforilálódik, más aktiválódott receptorok által működésbe hozott kinázok hatására. A homológ deszenzitizációban elsősorban a GRK-k vesznek részt, míg a heterológ deszenzitizációban a különböző jelpályák által aktivált kinázok, mint a protein kináz C vagy a protein kináz A [190]. A GRK és a protein kináz C, illetve a protein kináz A foszforilációs helyei a receptorokon többnyire csak részleges átfedést mutatnak [189]. Ezen pozíciókban lévő aminosavak foszforilációja meggátolja a receptor további interakcióját a G-fehérjével, leállítva ezzel a G-fehérje-függő jelátvitelt.

A GFKR-ek foszforilációjában és homológ deszenzitizációjában résztvevő GRK család 7 tagból áll (GRK1-GRK7). A tagok alapvetően hasonló amino-terminális régióból, központi katalitikus doménből és különböző karboxil-terminális doménekből épülnek fel. Ez utóbbi domén alapján három csoportba sorolhatjuk a család tagjait. A GRK1 és GRK7 alkotta alcsoportot retinális opszin kinázoknak nevezik, mivel csak a szemben fordulnak elő. A második csoport tagjait  $\beta$ -adrenerg receptor kinázoknak is nevezik, mert először a  $\beta$ -adrenerg receptor tanulmányozása során írtak le őket. Közéjük tartozik a GRK2 és a GRK3. A GRK2 és a GRK3 pleksztrin homológia domént (PH-domén) tartalmaz, mely a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  molekulához képes kötődni. G-fehérje aktiváció



hatására a  $\beta\gamma$ -alegység  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -n keresztül elősegíti a GRK2 aktiválódását és plazmamembránhoz való kötődését az aktivált receptor közelében, végül pedig a ligandkötött receptor foszforilációját. A GRK2 és GRK3 széles körben elterjedt a különböző sejttípusokban. A GRK4-hez hasonló alcsalád tagjai a GRK4, a GRK5 és a GRK6 melyek, ellentétben a többi alcsalád tagjaival, tartósan a plazmamembránhoz kötődve helyezkednek el. A GRK4 és GRK6 transzlációt követően palmitoilálódik, míg a GRK5 karboxil-terminálisán lévő pozitív töltésű aminosavakkal kapcsolódik a membránhoz. A GRK-k ezen csoportjának aktiválódásához nincs szükség az aktivált G-fehérje  $\beta\gamma$ -alegységére [191].

Mint korábban kifejtettem a különböző GRK-k általi receptorfoszforiláció nem egységes, sokkal inkább egyedi és célzott folyamat. Az egyes ligandok által létrehozott eltérő receptorkonformációk más és más GRK-k aktiválódásához vezetnek, melyek eltérő foszforilációs mintázatot helyeznek el a receptor intracelluláris felszínén. Az eltérő foszforilációs mintázatok pedig befolyásolhatják a receptor sorsát, illetve jelátviteli mechanizmusait [136]. Ennek köszönhetően a homológ GRK család tagjai egyes esetekben azonos funkciókkal rendelkeznek, más folyamatokban viszont egymással ellentétes hatásokat hoznak létre. Az  $\text{AT}_1\text{R}$  foszforilációjában a GRK2, a GRK3, a GRK5, a GRK6, valamint a PKC vesz részt [33]. A GRK2 vagy 3 általi foszforiláció a  $\beta$ -arresztin által mediált ERK1/2 jelátvitelt csökkenti, továbbá a GRK2-nek kiemelkedő szerepe van a receptor foszforilációjában. Kim és munkatársai COS7 sejtekben fejeztették ki domináns negatív GRK2-t (GRK2K220M), melynek hatására 40%-kal csökkent az  $\text{AT}_1\text{R}$  foszforilációja. Ezzel szemben a GRK5 és GRK6 általi foszforiláció a  $\beta$ -arresztin által mediált ERK1/2 aktiváció létrejöttéhez nélkülözhetetlennek bizonyult, habár az  $\text{AT}_1\text{R}$  foszforilációjában és  $\beta$ -arresztin-kötésben csak kisebb mértékben tűnt relevánsnak [192]. Feltehetően tehát a GRK2/3 és GRK5/6 fehérjék a G-fehérje-függő, valamint a  $\beta$ -arresztin-mediált útvonalak között kapcsoló szerepet töltenek be az  $\text{AT}_1\text{R}$  esetén.

A GRK-k azonban nemcsak a receptor foszforilációját végzik, hanem kimutatták már interakciójukat a PI3K-al is, valamint klatrin kötőhelyükön keresztül közvetlenül a klatrin molekulával is [193, 194]. Ezek segítségével részt vesznek a receptormediált endocitózis szabályozásában is [195], valamint a megfelelő pozíciójú foszforilációjuk hatására helyeződik ki a citoplazmatikus  $\beta$ -arresztin is a receptorhoz [196], mely

elősegíti a receptor szétkapcsolódását a G-fehérjétől [92, 197]. A  $\beta$ -arresztin molekula karboxil-terminális régiójában klatrin és adapter protein-2 (AP-2) kötő domén is található [198, 199], melyek közreműködésével adapterfehérjeként részt vesz a receptorok deszenzitizációját követő, klatrin-mediált endocitózis elindításában is.

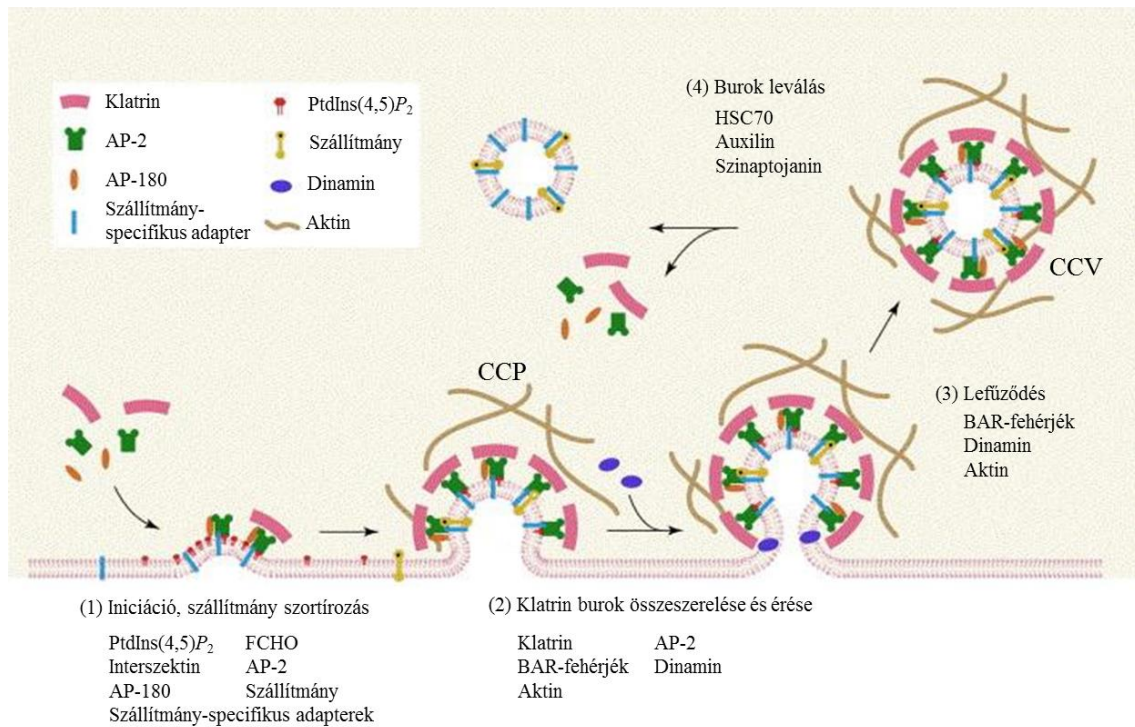
#### **2.4.2. A GFKR-ek internalizációja**

Az internalizáció, más néven endocitózis egy igen összetett, jól szabályozott folyamat, melynek számos párhuzamos útvonalakból álló tagja van. Az endocitózis fontos részét képezi a sejt és környezete közötti információcserének, a plazmamembrán lipid- és fehérje-összetételének, valamint a sejtfelszínről elinduló jelátviteli folyamatok szabályozásának [200]. Az endocitózis számos párhuzamosan futó mechanizmuson keresztül létrejöhethet, melyeket legegyszerűbb csoportosítás szerint klatrinmediált endocitózis (CME), illetve klatrintól független endocitózis (CIE) csoportokra oszthatunk [201]. Az egyes útvonalak egymással részben átfednek, azonos szereplőket is tartalmaznak, például a CME folyamatában eddig több mint 150 fehérje szerepét vetették fel, azonban többségük funkciója még bizonytalan.

##### *2.4.2.1. Klatrinmediált endocitózis*

Az eddigi kutatási eredmények alapján a GFKR-ek elsősorban a CME-n keresztül internalizálódnak. Ez a legintenzívebben kutatott endocitózis útvonal. A folyamat során először bemélyedés alakul ki a plazmamembrán egy  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  gazdag területén, melynek citoplazmatikus oldalán különböző membrán görbületet érzékelő fehérjék jelennek meg, köztük a FES-CIP4 homológia domént tartalmazó fehérje (FCHO) is, melyek különböző adapter proteinek közreműködésével (pl. interszeptinek) létrehozzák az úgynevezett iniciációs komplexet (6. ábra) [202]. A szerepet játszó fehérjék még vita tárgyát képezik, azonban hatásukra a membrán  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  molekuláihoz kötődni képes AP-2 molekula is megjelenik. A következő lépésben az AP-2 adaptermolekula a klatrint is a görbülethez gyűjti. A klatrin háromágú, ún. triszkelion protomereket alkot, melyek a polimerizáció során penta- és

hexagonális struktúrákat építenek fel. Hálószerűen körbeveszi a plazmamembrán-bemélyedést, melyet így már klatrinburkos gödörnek (clathrin-coated pit; CCP) nevezünk. Ezt követi a szállítmány szortírozása, melynek során az internalizációra kerülő receptorok a CCP-be irányítódnak. A szállítmány adapter fehérjéken (pl. AP-2, stonin, Numb) keresztül kötődik a klatrinháléhoz, ezáltal egyben stabilizálja is a CCP-t [203]. A szállítmány irányításában a fehérjék citoplazmatikus szakaszán található különféle irányító szekvenciák, valamint a fehérjék meghatározott aminosavainak foszforilációja vagy ubikvitinációja vesz részt. Ezeket a jelzéseket ismerik fel az adapterfehérjék, és gyűjtik össze a szállítmányt a CCP-kbe [204].



## 6. ábra A klatrinmediált endocitózis lépései és résztvevői

Rövidítések: adapter protein-2 (AP-2), adapter protein-180 (AP-180), Bin-Amfifizin-Rvs domén tartalmú fehérje (BAR-fehérje), klatrinburkos gödör (CCP), klatrinburkos vezikula (CCV), FES-CIP4 homológia domént tartalmazó fehérje (FCHO), hősock fehérjével rokon fehérje 70 (HSC70), foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>),  
 Forrás: [205] alapján módosítva.

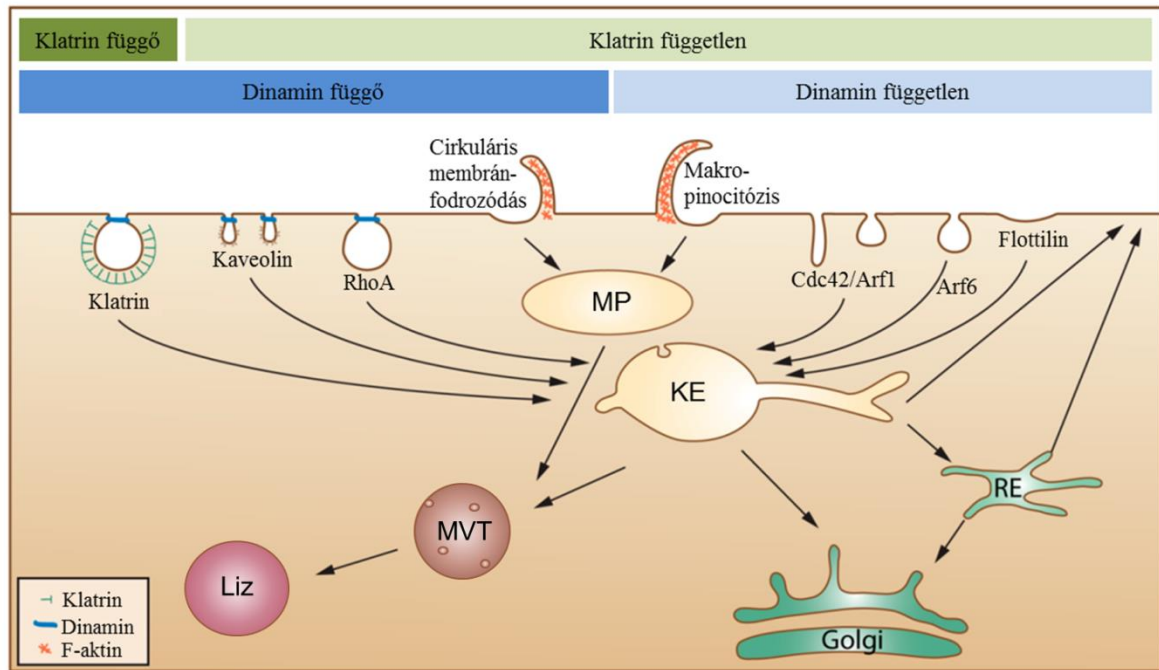
A CCP ezáltal tovább növekedve és érve, egyre inkább kiboltosul a plazmamembránból, mely jellegzetes képet mutat elektronmikroszkópos felvételeken. A lefűződő vezikula plazmamembránból történő leválasztása a dinamin kis G-fehérje által történik. A dinamin GTP hasításából nyert energiával képes elhasítani a klatrinburkos vezikula (chlatrin-coated vesicle; CCV) nyaki részét, melynek következtében a CCV teljesen elválik a plazmamembrántól. A nyak forma kialakításában és a dinamin általi hasítás elősegítésében Bin-Amfifizin-Rvs domén (BAR-domén) tartalmú fehérjék által alkotott polimerek vesznek részt [206]. A dinamin működésében kiemelkedően fontos a molekula PH-doménjának plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  molekuláihoz történő kötődése [207]. A lefűződött CCV-ről ezt követően azonnal megindul a klatrinburok lebontása, az ATP-áz aktivitású hősokk fehérjével rokon fehérje 70 (HSC70) [208] és kofaktora az auxilin közreműködésével. A leválasztott adapterfehérjék ezután visszakerülnek a plazmamembránba, ahol újra felhasználásra kerülnek, a burok nélküli vezikula pedig először a korai endoszómákba irányítódik, ahonnan különböző kompartmentekbe szállítható tovább [209].

#### 2.4.2.2. *Klatrintól független endocitózis*

A CME-től eltérően kevésbé tisztázott a CIE-ben szerepet játszó útvonalak működése, illetve jelentősége. A klatrintól független, azonban dinaminfüggő útvonalak közé tartozik a kaveola függő endocitózis is, mely az egyik legjobban ismert CIE forma. Ennek során jellegzetes palack formájú bemélyedések alakulnak ki a membrán koleszterinben és szfingolipidben gazdag régióiban. Az itt elhelyezkedő, illetve ide irányított receptorok internalizációja az oligomerizálódó kaveolin és kavin molekulák segítségével jön létre, melyek feltehetően a membránlipidek organizációjának módosításával hozzák létre a jellegzetes membránformákat. A kaveolák szerepét az endocitózis mellett kimutatták már a sejtek jelátvitelében, a koleszterin- és lipid-anyagcserében, valamint a membránfeszülés érzékelésében is [210].

A flotilin molekulák a kaveoláktól és klatrintól független membrándoménekben oligomerizálódnak, valamint, a kaveolákhoz hasonlóan, a membránlipidek organizációjának segítségével hoznak létre endocitózisra kerülő vezikulákat. Jelentőségük egyelőre még nem teljesen tisztázott, csakúgy mint egyéb klatrin független

útvonalak fontossága sem a GFKR-ek endocitózisában mint például a Cdc42 kis G-fehérje által regulált glikozil-foszfatidilinozitolhoz horgonyzott fehérjék endocitózisának útvonala, a RhoA függő interleukin-2 receptor  $\beta$  útvonal, a cirkuláris membránfodrozódás, a makropinocitózis vagy az ADP-ribozilációs faktor 6 (Arf6) kis G-fehérje-függő endocitózis szerepe sem (7. ábra) [200].



### 7. ábra Lehetséges endocitotikus útvonalak

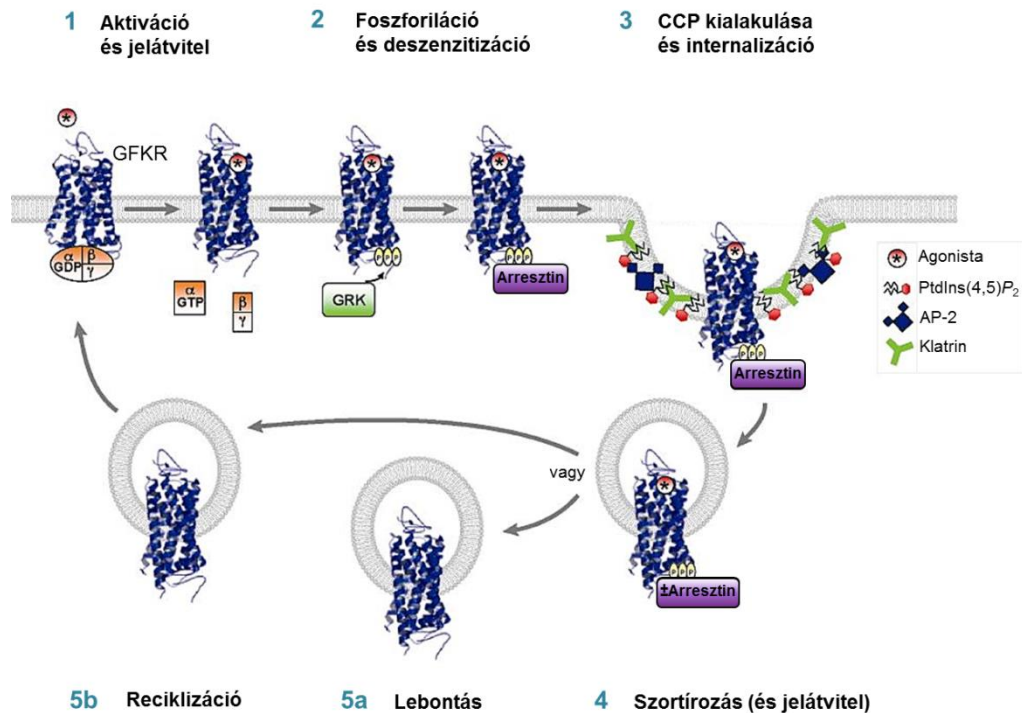
Az ábrán különböző endocitotikus útvonalak kerültek feltüntetésre klatrin-, illetve dinamin függésüknek megfelelően, vagy a keresztül a késői endoszómákba és a irányítódik tovább. Rövidítések: korai endoszóma (KE), lizoszómákba (Liz), makropinoszóma (MP), multivezikuláris test (MVT), reciklizáló endoszóma (RE), Forrás: [211] alapján módosítva.

Lényeges megjegyezni, hogy a CME és CIE útvonalai párhuzamosan működnek, egyes elemeik egymással átfednek, továbbá egy adott receptor egy időben különböző endocitotikus mechanizmussal is bekerülhet a sejt belsejébe. Azonban a más-más módokon elindult endocitotikus vezikulák feltehetően ugyanazon intracelluláris vezikulo-tubuláris rendszerben folytatódnak, melynek első elemei a korai endoszómák.

### 2.4.3. Az internalizáció szerepe a GFKR-ek szabályozásában

Az internalizáció során a foszforilált és deszenzitizált receptor eltávolodik a plazmamembrántól és endoszómális kompartmentek felé irányítódik. Az endoszómák savas környezetének hatására a receptorokról leválik a ligand, és a receptort citoplazmatikus foszfatázok defoszforilálják. A defoszforiláció segítségével a receptor visszanyeri aktiválhatóságát, azaz reszenzitizálódik. A receptor ezt követően vagy a lizoszómákban degradálódik, vagy a reciklizáló endoszómák segítségével visszakerül a plazmamembránba, ahol újra képessé válik ligand kötésére (8. ábra). Az egyes GFKR-ek változó mértékben és ideig jelennek meg a különböző intracelluláris kompartmentekben, endoszómális vezikulákban, mely karakterisztikus az adott receptorra.

Korábban az internalizáció fő funkciójának a deszenzitizációt, vagyis az érzékenységcsökkentést tartották, azonban az újabb irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy sokkal összetettebb szereppel rendelkezik a receptorok szabályozásában, a sejt felszíni receptorszám csökkentése mellett részét képezi a sejten belüli jelátvitelnek valamint, a receptor reciklizációjával, a sejtérzékenység helyreállításának és szabályozásának is [95, 212]. A sejt felszíni receptorszám dinamikus egyensúlyi állapotát a sejt felszínre kerülő és az onnan endocitózissal eltávoluló receptorok mennyisége közötti arány biztosítja [213]. Az endocitózis a sejt felszíni receptorszám csökkentésével, majd a receptorok érzékenységének helyreállításán a reszenzitizáció, valamint a reciklizáció, időbeni és térbeni koordinálásán keresztül képes a sejt válaszkészségét szabályozni az adott receptorra nézve. Továbbá egyre több adat szól amellett, hogy az endocitózis során is folyhat szignalizáció az internalizált receptorról [214], többek között  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitel is elindulhat az endoszómákban elhelyezkedő receptorról [109]. Legfrissebb adatok szerint pedig a „B osztályába” tartozó GFKR-eknél a G-fehérje-aktiváció is előfordulhat sokkal fenntartottabb formában, mint korábban gondoltuk [215].



### 8. ábra A G-fehérje kapcsolt receptorok (GFKR) válaszkészségének szabályozása

Agonistakötődés hatására a GFKR-ek G-fehérjéken keresztül számos jelátviteli útvonalat aktiválnak (1), majd ezt követően G-fehérje kapcsolt receptor kinázok (GRK) által foszforilálódnak és megkötik az arresztin molekulát. Arresztin kötődése a receptorhoz a G-fehérje-függő jelpályák lecsendesedését váltja ki, vagyis a receptor deszenzitizációját (2). A receptor ezt követően a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátban (PtdIns(4,5) $P_2$ ) gazdag klatrinburkos gödrökbe (CCP) irányítódik, ahonnan többek között az adapter fehérje-2 (AP-2) közreműködésével elindul az internalizáció (3). Az internalizált receptor szortírozásra kerül, miközben egyes receptorokról továbbra is elindulnak jelátvitelt folyamatok (4). A receptor ezt követően vagy a lizoszómákba kerülve degradálódik (5a), vagy pedig reszenzitizációt követően reciklizáló kompartmentek segítségével visszakerül a plazmamembránba (5b). Forrás: [195] alapján módosítva.

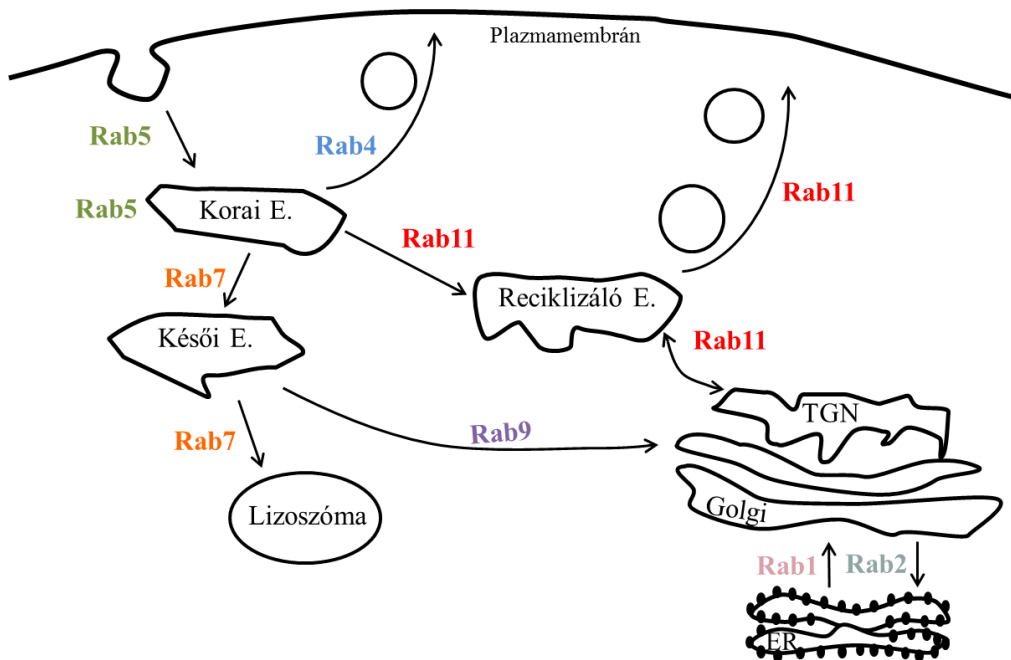
#### 2.4.4. A Rab kis G-fehérje család szabályozó szerepe a vezikuláris transzportban

Az endocitotikus és exocitotikus útvonalak sejtorganelumai jellegzetes térbeli eloszlást mutatnak, és egy szerteágazó intracelluláris vezikulo-tubuláris rendszeren keresztül működnek. A vezikuláris transzportfolyamatok regulációjának jellegzetes molekulái közé tartoznak különböző kis G-fehérje családok, mint a Rab, a Rho, illetve az Arf is. Ezen molekulák mind a CME, mind pedig a CIE útvonalain is megtalálhatók. A Rab kis G-fehérjék egy több mint 60 tagból álló szupercsaládot képeznek, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a vezikuláris transzportmechanizmusok irányításában [216]. A Rab fehérjék szabályozásának alapját az aktív GTP- és az inaktív GDP-kötött állapotok közötti váltás lehetősége adja. A GTP- és GDP-kötött állapotok közötti ciklikus átmenet térben és időben képes szabályozni a membrántranszport-folyamatokat azáltal, hogy a Rab fehérjék mint időzítők játszanak szerepet [217]. A Rab fehérjék működésére jellemző, hogy egy endocitotikus vezikulában egy időben eltérő mennyiségben, de több különböző Rab fehérje is előfordulhat, valamint, hogy egy adott Rab fehérje egymást követő, egymásba átalakuló vezikulákban is jelen lehet (9. ábra) [218].

Az egyik legtöbbet vizsgált Rab fehérje a Rab5, mely a korai/szortírozó endoszómák képződésében és funkciójában játszik szerepet. A Rab5 a korai endoszóma antigénnel (EEA1) az elsődleges endocitotikus vezikulák és a korai endoszómák közötti fúziót szabályozza. A fúzió létrejöttének első lépéseiben fontos szerepet játszik az EEA1 foszfatidilinozitol-3-foszfát (PtdIns-3P) kötése is [219]. A Rab5 molekula funkciója azonban nem merül ki a fúzió létrehozásában, hanem részt vesz az endoszómák mozgatásában is, a mikrotubulus motorfehérjék endoszómához való kapcsolásával. Egyes feltételezések szerint a Rab5 fő funkciója a különböző fehérjekomponensek összegyűjtése lehet, melyek segítségével specifikus membrándoménokat hozhat létre az endoszómákban. A Rab5 a szortírozó endoszómákban is előfordulhat, azonban itt elsősorban a Rab4 molekula játszik fontos szerepet, mely az endocitotikus reciklizáló kompartmenttel is kapcsolatban áll. Úgy tűnik tehát, hogy a Rab4 szerepe a szortírozó endoszómákból a plazmamembránhoz való korai reciklizációban van. A Rab 11 az endocitotikus reciklizáló kompartmentben, valamint a *transz*-Golgi hálózat membránjában fordul elő és elsősorban a



plazmamembránhoz való késői reciklizáció regulációjában vesz részt. A vezikulák érése során a Rab4 és Rab11 együtt is előfordulhatnak a reciklizáló endoszómákon. A Rab7 a vezikuláris transzport következő szereplőinek, a késői endoszómáknak, illetve a lebontásban szerepet játszó lizoszómáknak kulcsfontosságú szabályozója és egyben markere [216]. A késői endoszómákból a Golgi-apparátus irányába folyó transzportban elsősorban a Rab9 fehérje szerepét tartják fontosnak [220], az endoplazmás retikulum (ER) és Golgi-apparátus közötti vezikulaforgalmat a Rab1, míg az ellenkező irányú, Golgiból az ER felé tartó transzportot feltehetően a Rab2 fehérje szabályozza [221].



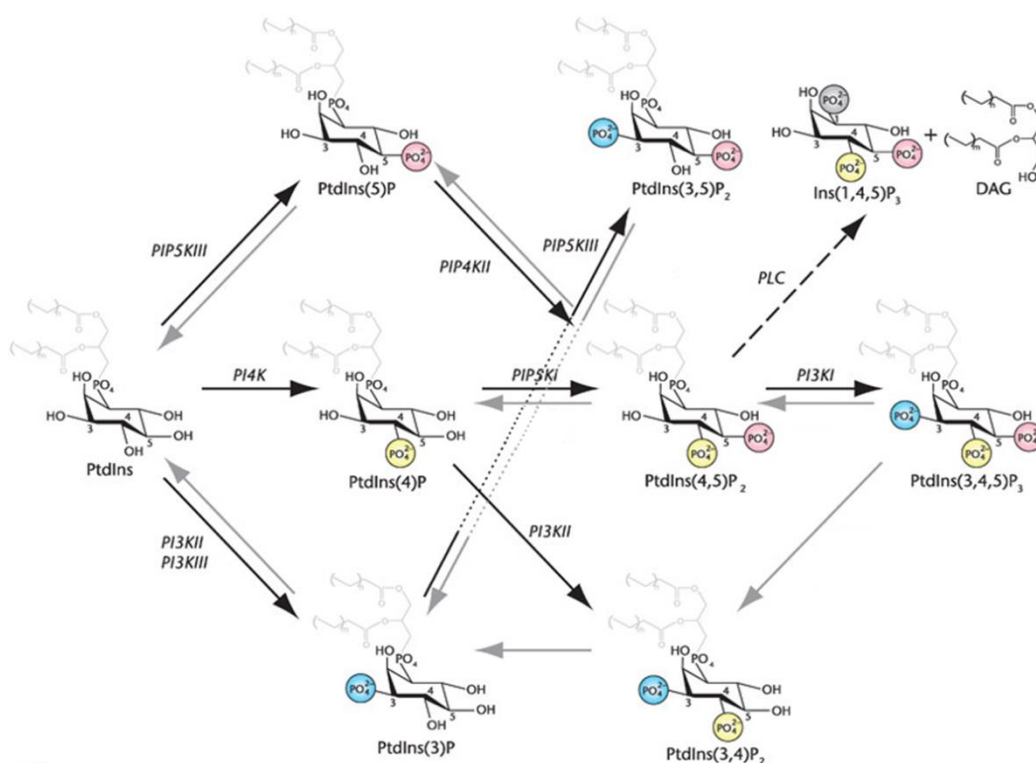
### 9. ábra Rab fehérjék a sejten belüli vezikuláris transzportfolyamatokban

Az ábrán az egyes vezikulatípusokra legjellemzőbb Rab kis G-fehérjék kerültek feltüntetésre. Rövidítések: endoszóma (E.), endoplazmás retikulum (ER), Golgi-apparátus (Golgi), *transz*-Golgi hálózat (TGN).

## 2.5. Membrán foszfoinozítidek

### 2.5.1. A foszfoinozítidekről általában

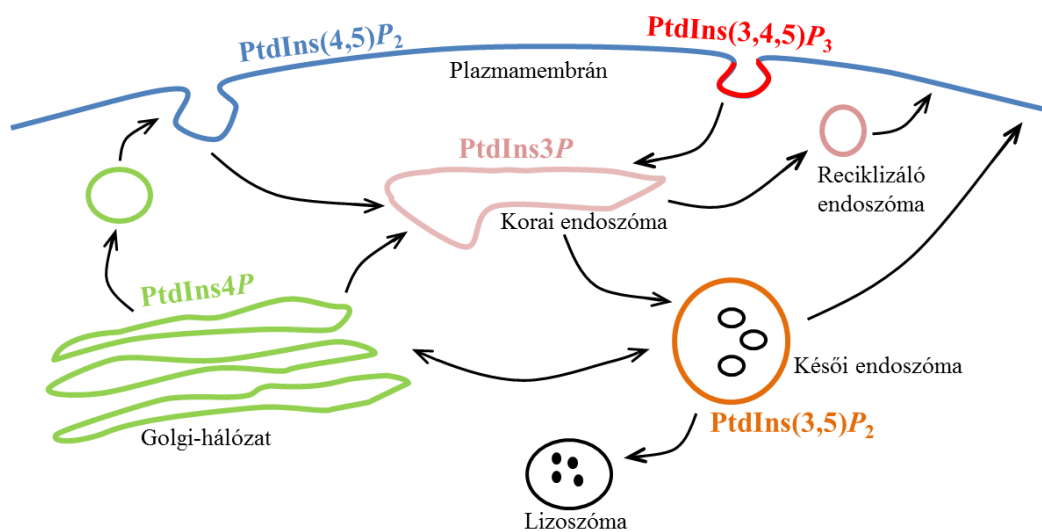
A sejtmembránok felépítésében alapvető fontosságú glicerofoszfolipidek közé tartoznak a foszfatidilinozitol foszforilált származékai a foszfoinozítidek (PPIn). Az inozitol-gyűrű öt szabad hidroxil-csoportjából háromnál lehetséges reverzibilis foszforiláció (3' 4' és 5' pozíciókban), ezáltal összesen 7 különböző PPIn jöhet létre (10. ábra).



### 10. ábra A foszfoinozítidek (PPIn) metabolizmusának lehetséges útvonalai

A foszfatidilinozitol (PtdIns) *myo*-inozitolgyűrű szénatomjainak megfelelő számozás alapján, a 3-as, 4-es és 5-ös pozícióban található hidroxilcsoportok foszforilálódhatnak. Az ábrán a különböző PPIn-ek, valamint az átalakulásukhoz vezető foszforilációs (fekete nyíl), defoszforilációs (szürke nyíl), illetve hasítási (szaggatott nyíl) reakcióik kerültek feltüntetésre. Az átláthatóság kedvéért csak a foszforilációért felelős foszfatidilinozitol-foszfat-kinázokat (PIPK), illetve foszfatidilinozitol-kinázokat (PIK) jelöltem. Rövidítések: diacilglicerin (DAG), foszfolipáz C (PLC), foszfátcsoport (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), inozitol-1,4,5-triszfoszfát (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Forrás: [222] alapján módosítva.

A PPIIn-ek közel 20 átalakulási folyamatának katalizálása nagyszámú kináz, illetve foszfatáz enzim közreműködésével valósul meg [223], egy adott lépést többféle enzim is katalizálhat. Az egyes membránokban elhelyezkedő enzimek működésének szelektív regulációja lehetőséget teremt a különböző PPIIn szintek elkülönült szabályozására a sejtorganeliumokban, vagy akár egy sejtalkotó membrán különböző szegmensein belül is. Ezáltal a PPIIn-ek elhelyezkedése a sejtben nem egyenletes, hanem jellegzetes eloszlást mutat, melynek köszönhetően egyben specifikus markerei is a sejtalkotóknak, amelynek membránjában feldúsulnak (11. ábra).



### 11. ábra Foszfoinozitidek (PPIIn) eloszlása a sejtmembránokban

A plazmamembrán fő PPIIn-je a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), melyből különböző ingerek hatására foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) keletkezhet. A foszfatidilinozitol-4-foszfát (PtdIns4P) elsősorban a Golgi-hálózatban, illetve a plazmamembránban található. A korai endoszómák foszfatidilinozitol-3-foszfátban (PtdIns3P), míg a késői endoszómák elsősorban foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfátban (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) gazdagok.

A fehérjék különféle PPIIn felismerő és kötő doménnel rendelkezhetnek, melyek segítségével a megfelelő sejtalkotóhoz irányíthatók, illetve aktivitásuk befolyásolható. A PPIIn-ek térben és időben szigorúan meghatározott szintézise az egyes kinázok és

foszfatázok által megteremti a lehetőségét, hogy az elkülönült lipidkészletek időben akár eltérő sejtfolyamatokban is szabályozó szerepet tölthessenek be [224].

### 2.5.2. A PtdIns(4,5) $P_2$ képződése és jelentősége

Az állati sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló PPIIn a PtdIns(4,5) $P_2$ , mely elsősorban a plazmamembránban található. Képződése két útvonalon keresztül is létrejöhet, foszfatidilinozitol-foszfat-kinázok (PIPK) közreműködésével (11. ábra). Az I-es típusú PIPK (PIPKI) csoportba tartozó enzimek végzik a foszfatidilinozitol-4-foszfat (PtdIns4P) 5-ös hidroxil-csoportjának foszforilációját, míg a II-es típusba tartozó PIPK-k (PIPKII) a foszfatidilinozitol-5-foszfat (PtdIns5P) molekula inozitol gyűrűjének 4-es hidroxil-csoportját foszforilálják. Az előállításához szükséges PPIIn-ek azonban nem azonos mennyiségben vannak jelen a plazmamembránban. Mivel jelentősen több a PtdIns4P molekula, mint a PtdIns5P, a PIPKI enzimek általi PtdIns4P foszforilációt tekintik meghatározónak a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintézisében [225]. A szubsztrátként szolgáló PtdIns4P molekula elsősorban a Golgi-apparátusban fordul elő, azonban mind a PtdIns4P-ot, mind pedig a képződésében szerepet játszó foszfatidilinozitol-4-kináz (PI4K) jelenlétét is kimutatták már a plazmamembránban. A PI4K enzimek katalizálják a PtdIns molekula inozitol gyűrűjében lévő 4-es hidroxil-csoport foszforilációját. A Golgi-apparátusban lévő PtdIns4P szintéziséért elsősorban a wortmannin (Wm) érzékeny III-as csoportjába tartozó PI4KB enzim a felelős, míg a plazmamembránban keletkező PtdIns4P-ot a III-as típusú, azaz szintén wortmannin-érzékeny, PI4KA szintetizálja [226]. Ahogy korábban már említettem a  $G_q$ -fehérje kapcsolt GFKR aktiváció során a PLC $\beta$  hasítja a PtdIns(4,5) $P_2$ -t a plazmamembránban, ezáltal DAG és Ins(1,4,5) $P_3$  képződik. A PtdIns(4,5) $P_2$  bontást a lipid gyors reszintézise követi, melyben szintén a PI4KA szerepe tűnik meghatározónak [227]. Ezt támasztja alá, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  szintézise és reszintézise során a PIPKI enzimek rendkívül gyorsan foszforilálják a keletkezett PtdIns4P molekulákat, így a folyamat sebességmeghatározó lépése a PI4KA általi PtdIns4P képzés PtdIns-ból [228].

A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  molekulái számos sejtlejtani folyamat szabályozásában játszanak meghatározó szerepet. Mind a GFKR-ek, mind pedig a receptor tirozin kinázok jelátvitelében fontos szerepet játszanak. Fentebb említettem,

hogy a GFKR-ek esetén  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  bontás során a másodlagos hírvívő DAG és  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  keletkezik, így közreműködik többek között a  $\text{Ca}^{2+}$  jel létrejöttében is [8]. A receptor tirozin kinázok aktivációjának hatására  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -ből foszfatidilinozitol 3-kinázok (PI3K) közreműködésével foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát ( $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ ) képződik. A  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ -ot specifikusan felismerő fehérjék jelátviteli rendszerek széles spektrumát aktiválják, befolyásolva ezzel többek között a sejt növekedését, túlélését, citoskeleton átrendeződését, valamint metabolizmusát [229]. A  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  hatással bír továbbá számos ioncsatorna és transzporterfehérje működésére a plazmamembránban [230], valamint az aktinpolimerizációra, a fagocitózis, a kemotaxis, az exocitózis, illetve az endocitózis folyamataira is [224]. A CME kapcsán már érintettem, hogy számos adapter fehérje rendelkezik  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  kötő doménnel, mint például az AP-2, a dinamin, valamint a membrán görbületet érzékelő BAR-doménnel rendelkező fehérjék is [224]. A lipidkötés segítségével kerülnek közös komplexbe az endocitózis résztvevői a plazmamembrán  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  gazdag régióiba. Funkcióinak köszönhetően a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  molekula kapcsolódási pontot jelent a receptor mediált jelátvitel, valamint az endocitózis folyamata között.

### 3. Célkitűzések

Mint láthattuk, számos információval rendelkezünk már a GFKR-ek és köztük az AT<sub>1</sub>R funkcionális szelektív aktivációjának mechanizmusáról és jelátviteli következményeiről. Kevésbé ismert azonban a szelektíven aktivált receptor további sejten belüli sorsa, mely meghatározó szereppel bír a receptorok és általuk a sejtek érzékenységében. Munkánk célja ezért az AT<sub>1</sub>R, mint kiemelkedően fontos funkcionálisan szelektív farmakológiai célpont, intracelluláris sorsának vizsgálata volt jelátvitel-szelektív ligandok hatására.

A PhD-dolgozatomban bemutatásra kerülő kísérletekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változik az AT<sub>1</sub>R internalizációja jelátvitel-szelektív aktivációt követően?
- Milyen mechanizmus játszik meghatározó szerepet az elfogult ligand által aktivált AT<sub>1</sub>R korai endoszómákban való megjelenésében?
- Tapasztalható-e különbség a jelátvitel-szelektív módon aktivált AT<sub>1</sub>R-ek sejten belüli hosszabb távú sorsában, összevetve az AngII stimulált receptorokkal?

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált anyagok

A sejtenyésztéshez használt edényeket és a kísérletekhez használt tálcákat a Greiner Bio-One cégtől (Kremsmünster, Ausztria) vásároltuk. A DMEM (Dulbecco által módosított Eagle médium), a főtális borjúsérum (FBS), a penicillin/streptomycin, az Opti-MEM<sup>®</sup>, valamint a Lipofectamine 2000<sup>™</sup> anyagokat az Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) cégtől rendeltük. A cöleterazin *h*-t az Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), illetve a Regis Technologies (Morton Grove, IL) cégektől vásároltuk. A wortmannint a Calbiochemtől (SanDiego, CA, USA), az A61603 vegyületet és a PIK93 gátlószert a Sigma-Aldrichtől (St. Louis, MO, USA) rendeltük. Az A1 vegyületet Balla Tamás (NICHD, NIH, Bethesda, Maryland, USA) bocsátotta rendelkezésünkre [231]. A [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]-AngII-t (SI-AngII) és a [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>]-AngII-t (SII-AngII) a Bachem AG-től (Bubendorf, Svájc) vásároltuk, a TRV120023 és a TRV120027 peptideket a Proteogenix (Schiltigheim, Franciaország) cégnél szintetizáltattuk, több mint 98%-os tisztasággal. Minden más, külön nem említett vegyületet és reagenst a Sigma-Aldrichtől (St. Louis, MO, USA) szereztünk be. Az 1. táblázatban az általunk alkalmazott AT<sub>1</sub>R ligandok aminosav-összetétele, valamint inhibíciós konstansaik kerültek feltüntetésre.

#### 1. táblázat Az általunk alkalmazott AT<sub>1</sub>R ligandok aminosav összetétele és inhibíciós konstansai (K<sub>i</sub>)

Rövidítések: AngiotenzinII (AngII), AngiotenzinIV (AngIV)

Név	Aminosav összetétel	K <sub>i</sub> (nM)
AngII	Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH	1,15
AngIV	Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OH	1000<
[Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]-AngII	Sar-Arg-Val-Ile-Val-His-Pro-Phe-OH	7
[Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>4</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]-AngII	Sar-Arg-Val-Ile-Val-His-Pro-Ile-OH	213
TRV120023	Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala-OH	10
TRV120027	Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala-OH	16

## 4.2. DNS konstrukciók

A sárga fluoreszcens fehérjével (YFP) jelölt konstrukciók az eYFP-C1 vagy az eYFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, USA) vektorvázba kerültek beillesztésre. Az eYFP-vel jelölt  $\beta$ -arresztin2-t ( $\beta$ -arresztin2-YFP), munkacsoportunk korábban készítette el, hasonlóan a vad típusú és a DRY/AAV mutáns AT<sub>1</sub>R-ok *Renilla* luciferázzal (Rluc) jelölt változatait is (AT<sub>1</sub>R-Rluc és DRY/AAV AT<sub>1</sub>R-Rluc) [162, 232]. A DRY/AAV AT<sub>1</sub>R-ben az Asp125 és Arg126 aminosavakat alaninnal helyettesítettük, mely mutációk G-fehérje kötésére képtelen AT<sub>1</sub>R-t eredményeztek.

Az AT<sub>1</sub>R vezikuláris transzportjának vizsgálataihoz különböző Rab kis G-fehérjéket alkalmaztunk markerként. A BRET méréseink során YFP-vel jelölt konstrukciókat használtunk (YFP-Rab5, YFP-Rab7 és YFP-Rab11). Elkészítésükhöz a munkacsoportunk által már korábban is használt zöld fluoreszcens fehérjét (eGFP) tartalmazó konstrukciókban kicseréltük a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt YFP-re [233]. A PLC $\delta$ 1 enzim PtdIns(4,5) $P_2$ -ot kötő pleksztrin homológia doménnel rendelkezik (PH-domén). Ezen PH-domén YFP-vel jelölt változatát szintén munkacsoportunk hozta létre korábban (PLC $\delta$ 1-PH-YFP), melynek segítségével a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  molekuláit követtük nyomon [234]. A PtdIns(4,5) $P_2$  bontás vizsgálatai során egy másik megközelítésben nem csak energiadonorként, de energiaakzeptorként is a PLC $\delta$ 1-PH-domén szerepelt. Ez a konstrukció a PLC $\delta$ 1-PH-szuper *Renilla* luciferáz (PLC $\delta$ 1-PH-Sluc), melynek készítésénél az PLC $\delta$ 1-PH-YFP plazmid eYFP-t kódoló régiója került kicserélésre a szuper *Renilla* luciferáz (Sluc) szekvenciájára [235]. A K220M domináns negatív mutáns GRK2 (DN-GRK2) expressziós vektort Dr. S. S. G. Ferguson bocsátotta rendelkezésünkre [236]. Az  $\alpha_{1A}$ -adrenerg receptort a Missouri S&T cDNA Resource Centertől vásároltuk (Rolla, MO).

## 4.3. Sejtkultúra és transzfekció

Kísérleteinkhez kétféle sejtvonalat, humán embrionális vesesejteket (HEK 293), valamint az eredeti sejtvonal SV40 vírus T antigénjét is tartalmazó változatát (HEK 293T) használtuk. A sejteket az American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) cégtől vásároltuk. Amennyiben külön nem jelölöm, a HEK 293 sejtvonalat



alkalmaztuk. A HEK 293 sejteket 100 IU/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 10 % hőinaktivált FBS-t tartalmazó DMEM oldatban tartottuk fenn. A tenyésztés 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 95% levegő keverékét tartalmazó termosztátban történt. A kísérletekhez a sejteket 10 cm-es edényekben tenyésztettük, majd a transzfekció előtt tripszinezéssel felszedtük, és Lipofectamine 2000 reagenssel, Opti-MEM<sup>®</sup> médiumban tranziensen transzfektáltuk. A kísérletek során 0,5 µl Lipofectamine 2000-et, 0,25 mg Rluc-ot tartalmazó, valamint 0,0625-0,125 mg jelöletlen vagy YFP-t tartalmazó DNS konstrukciót használtunk lyukanként, 96 lyukú tálca esetén. BRET méréshez a sejteket poli-L-lizinnel (0,001%, 1 óra) előkezelt 96-lyukú fehér tálcán osztottuk szét  $1 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel. 6 órával a transzfekció után a sejteken lévő médiumot 10% FBS tartalmú DMEM-re cseréltük. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> méréshez a HEK 293 sejteket 10 cm-es edényekben tenyésztettük és 24 órával a mérés előtt Lipofectamine 2000 reagenssel tranziensen transzfektáltuk a különböző DNS konstrukciókkal.

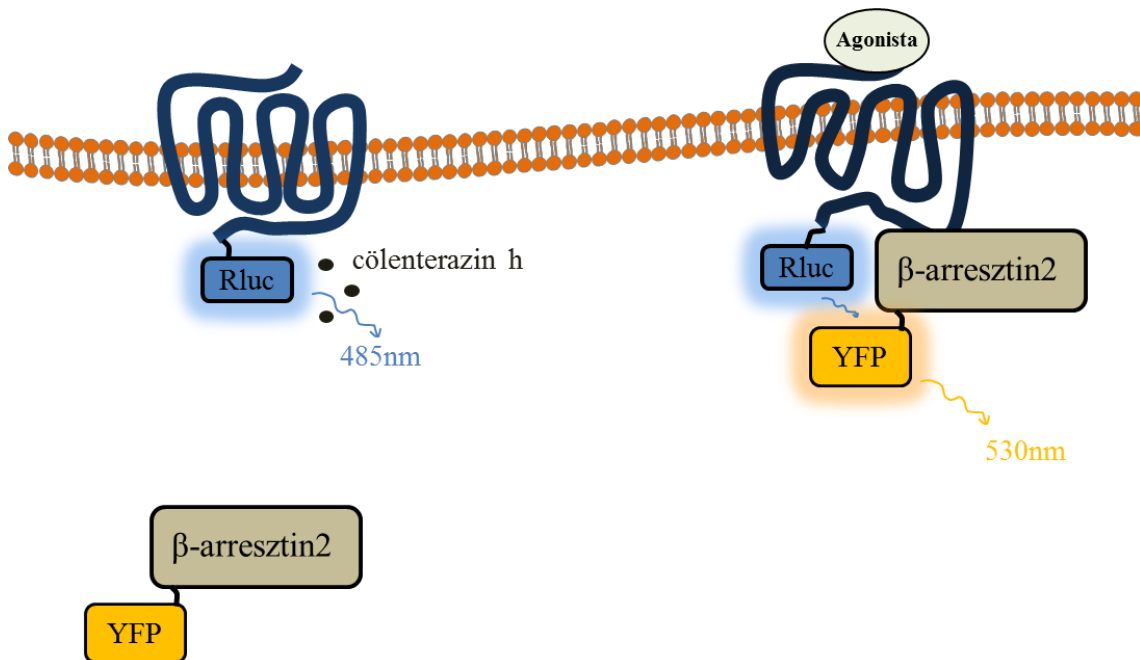
#### 4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) mérések

##### 4.4.1. A BRET technika működési elve

A BRET technika alapja a rezonancia energiáttranszfer jelenség, melynek során az energiadonor és -akceptor fehérjék között energiaátadás jön létre. A fluoreszcens vagy biolumineszcens donor molekula gerjesztés hatására, megfelelő közelség esetén (10 nm >), energiájának egy részét rezonancia útján képes átadni az akceptor molekulának. A gerjesztett akceptor molekula ennek hatására, saját emissziós spektrumán fényt bocsát ki. Az energiáttranszfer létrejöttéhez szükséges a donor molekula emissziós és az akceptor molekula excitációs spektrumának átfedése, a partner molekulák megfelelő fizikai közelsége és orientációja. A módszer igen nagy előnye, hogy lehetőséget ad az élő sejtekben történő fehérje-kölcsönhatások valós idejű vizsgálatára. A rezonancia energiáttranszfer méréseket első leírásuk óta széles körben alkalmazzák az irodalomban [237].

BRET méréseinkhez a vizsgálni kívánt fehérjéket biolumineszcens energiadonor, illetve fluoreszcens energiaakceptor molekulákkal jelöltük meg. Kísérleteinkben az egyik vizsgálandó fehérjéhez az energiadonor *Renilla* luciferázt (Rluc), egyes esetekben szuper *Renilla* luciferázt (Sluc), míg a partnermolekulához az

energiaakceptor sárga fluoreszcens fehérjét (YFP) kötöttük (12. ábra). Az Rluc enzim sejtporomeabilis szubsztrátját (cölenterazin *h*) a sejtekhez adva, a hasítási reakcióból felszabaduló fény maximális intenzitása 485 nm-es hullámhosszon detektálható. Amennyiben a YFP-vel jelzett fehérje megfelelő molekuláris távolságon belül és megfelelő orientációban található, energiáttranszfer jön létre. A sárga fluoreszcens fehérje gerjesztődik és fényt bocsát ki 530 nm körüli fényintenzitás maximummal (12. ábra). Az emissziós maximumokon, 485 és 530 nm-es hullámhosszokon detektált fényintenzitások hányadosát, BRET-jelnek vagy BRET-hányadosnak nevezzük: BRET hányados=  $I_{530}/I_{485}$ . A molekuláris közelség létrejöttét a hányados emelkedése jelzi, míg a távolság növekedésével a hányados csökken [238].



### 12. ábra A Biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) működése

Amennyiben az energiadonor *Renilla* luciferázzal (Rluc) jelölt fehérje megfelelő közelségbe kerül az energiaakceptor sárga fluoreszcens fehérjével (YFP) jelölt partnerfehérjétől energiáttranszfer jön létre, melynek hatására az YFP 530 nm-en fényt bocsát ki. A molekuláris közelség létrejöttére az 530 nm-en, illetve a 485 nm-en detektált fényintenzitások hányadosának, vagyis a BRET-jel növekedése utal.

#### 4.4.1.1. A BRET mérések kivitelezése

A BRET mérések kivitelezése 24 órával a transzfekció után fehér aljú 96-lyukú tálcákon történt. A sejteken lévő 10% FBS tartalmú DMEM médiumot a kísérletek előtt módosított Krebs-Ringer oldatra (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glükóz és 10 mM Na-HEPES, pH 7,4) cseréltük. A BRET méréseket a *Renilla* luciferáz szubsztrátjának (cölaterazin *h*, 5 µM) hozzáadását követően kezdtük meg. A méréseket Berthold Mithras LB 940 (Bad Wildbad, Németország), illetve Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, MA) többcsatornás lemezolvasó készülékekkel végeztük 37 °C-on. A donor (Rluc)-, illetve akceptor (YFP) intenzitásokat 480 és 530 nm-es hullámhosszú szűrők segítségével detektáltuk. A mintavételi idő 0,25-0,5 másodperc volt. Kísérleteinket minden kondíció esetén triplikátumokban végeztük. A BRET-hányadoszt az 530/485 nm hullámhosszokon mért fényintenzitások hányadosaként határoztuk meg. A BRET-eredmények legalább három független kísérlet átlagából kerültek meghatározásra. Az ábrázolt BRET-görbék úgy készültek, hogy először az ingerelt sejteken mért BRET-hányadosokból kivontuk a nem ingerelt, kontroll sejteken mért értékeket, majd ezen eredményből kivontuk az ingerlés előtti értékek átlagát. Ezáltal a görbéken az ingerlésre kapott BRET-jel változásokat a csupán vivőanyagot kapott sejtek eredményeire normalizáltan, a stimulálást megelőző BRET-jelhez képesti különbségként ábrázoltuk. Az idő függvényében ábrázolt eredményeket átlag ± SEM formájában tüntettük fel.

#### 4.5. Western blot kísérletek

Az ERK1/2 MAPK aktivitásának méréséhez 24 órával a kísérlet előtt HEK 293 sejteket transzfektáltunk Rluc, AT<sub>1</sub>R-Rluc vagy DRY/AAV AT<sub>1</sub>R-Rluc konstrukciókkal 6 lyukú tálcákon. A kísérlet előtt 4 órával a sejteken lévő 10% FBS tartalmú DMEM oldatot 1 mg/ml BSA tartalmú szérummentes DMEM-re cseréltük. A sejteket 100 nM AngII-vel vagy 10 µM SII-AngII-vel kezeltük 5 percig 37°C-on, majd jégre helyezve a tálcákat leállítottuk a kísérletet. A sejteket jég hideg 1x PBS-el átmostuk és 100 µl proteáz- és foszfatáz-gátlókat tartalmazó SDS mintapufferben felkapartuk. A PBS oldat összetétele: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . A mintákat rövid ideig szonikáltuk, 5 percig  $100^\circ\text{C}$ -on főztük, majd  $4^\circ\text{C}$ -on 5 percig centrifugáltuk. A felülúszókból egyenlő mennyiségeket futtattunk meg 12%-os SDS poliakrilamid géleken. A fehérjéket polivinilidén-fluorid membránokra blottoltuk át, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% zsírszegény tejpört és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 1x PBS oldatban (PBST). A membránokat 1 órára 1:1000 hígításban elsődleges antitesteket (egérben termeltetett  $\alpha$ -foszfo-ERK1/2 és nyúlban termeltetett  $\alpha$ -totál-ERK1/2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) és 5% zsírszegény tejpört tartalmazó PBST oldatba helyeztük. 3x10 perc mosást követően a membránokat 1 óráig 5% zsírszegény tejpört tartalmazó PBST oldatban oldott másodlagos antitestekkel inkubáltuk (1:10000 arányban hígítva; tormaperoxidázzal (HRP) konjugált  $\alpha$ -egér és  $\alpha$ -nyúl antitest, Cell Signaling, Danvers, MA, USA.). 3x10 perc mosást követően az antitesteket felerősített kemilumineszcencia módszer segítségével, Immobilion Western HRP szubsztrát reagens (Millipore, Billerica, MA, USA) hozzáadásával tettük láthatóvá Fuji Super RX filmekken. A Western blot felvételeket beszkeneltük és Image J szoftverrel analizáltuk.

#### 4.6. Citoplazmatikus $\text{Ca}^{2+}$ mérés sejtszuszpenzió

A HEK 293 sejteket Lipofectamine 2000 reagens segítségével  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc konstrukciókkal (6  $\mu\text{g}$  DNS/10 cm-es edény) transzfektáltuk. 6 órával később a médiumot 10% FBS tartalmú DMEM-re cseréltük. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket enyhe tripszinkezeléssel mobilizáltuk, centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk. A sejtekhez  $\text{Ca}^{2+}$  érzékeny fluoreszcens festéket, 2  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM-et (acetoxi-metilészter) tartalmazó DMEM oldatot adtunk. Az oldat összetétele: 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3,6 mM KCl, 25 mM HEPES mely 1 mg/ml marha szérum albumint tartalmaz, 0,06% pluronsav és 200  $\mu\text{M}$  szulfipirazon. A sejtek Fura-2/AM festékekkel való töltése 45 percig, szobahőmérsékleten és sötétben történt. Az acetoxi-metilészter által membránpermeabilissá vált festék ezalatt felvételre került a sejtekbe, majd a citoplazmatikus észterázok lehasították az AM-csoportokat, ezáltal a festék a sejtekben halmozódott fel. A sejteket ezután azonos összetételű médiummal átmostuk és reszuszpendáltuk, mely azonban nem tartalmazott Fura-2/AM-et. A mérés előtt a sejteket lecentrifugáltuk, majd felsuszpendáltuk őket 3 ml módosított Krebs-Ringer

mérőoldatban (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glukóz, 10 mM Na-Hepes; pH 7,4). A Ca<sup>2+</sup> méréseket szobahőmérsékleten végeztük PTI Deltascan spectrofluorometer (Photon Technology International, Princeton, NJ) használatával. A Ca<sup>2+</sup>-ot kötött, illetve nem kötött Fura-2 abszorpciós spektruma eltérő 380 nm-en, valamint 340 nm-en történő excitációt követően. A kísérleteket ezért 340, illetve 380 nm-en történő excitációval, és 505 nm-en detektált emisszióval végeztük el. Az emittált fénysugarak intenzitásának hányadosából következtethetünk a minta intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációjára. Az adatokat a Felix for Windows 1.42 programmal elemeztük.

#### **4.7. Konfokális mikroszkópia**

A konfokális mikroszkópos felvételek készítéséhez a laborunk által korábban létrehozott zöld fluoreszcens fehérjével jelölt AT<sub>1</sub>R-t (AT<sub>1</sub>R-GFP) stabilan kifejező HEK 293 sejtvonalat használtuk [233]. A sejteket poli-L-lizinnel (0,001%, 1 óra) előkezelt üveg fedőlemezekre szélesztettük, 3x10<sup>5</sup> sejt/ 35 mm-es fedőlemez sűrűségben. A sejtosztást követően 24 órával receptorlokalizációt és -eloszlást vizsgáltunk Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország), 63x-os Plan Aplanachromat immerziós objektívvel, multitrack módban. A GFP fluorofort 488 nm hullámhosszú argon lézerrel gerjesztettük. Az optikai szeletvastagság általában 1 µm volt. A konfokális felvételek elemzését ZEN (Carl Zeiss), illetve MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) szoftverek segítségével végeztük el. Az AT<sub>1</sub>R-GFP internalizációjának kvantifikálásakor a plazmamembrántól egyértelműen elkülöníthető AT<sub>1</sub>R-GFP tartalmú vezikulák arányát ábrázoltuk a maximális internalizáció, illetve az idő függvényében. Az internalizáció maximumának az egyes kísérletek adott kondícióiban egy időben mérhető legmagasabb vezikulaszámot tekintettük.

#### **4.8. Adatok elemzése, statisztikai analízis**

Az adatok elemzéséhez és az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) valamint a Sigmaplot 10.0 programot

használtuk (Systat Software). A BRET dózis-hatás görbék illesztését, valamint a statisztikai analíziseket a GraphPad Prism 4.03 program segítségével végeztük. Statisztikai módszerként a Rab4, Rab5 Rab7, Rab11 endoszómákban való megjelenés, illetve a  $\beta$ -arresztin2-kötés vizsgálatokor egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és Tukey post hoc tesztet, míg a konfokális felvételek kiértékeléséhez és a DN-GRK2 hatékonyságának megítéléséhez kétszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd Bonferroni t-tesztet alkalmaztunk. A 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

## 5. Eredmények

### 5.1. Az AT<sub>1</sub>R agonista indukált endocitózisának nyomon követése BRET módszerrel

Az AT<sub>1</sub>R vezikuláris vándorlásának szabályozásában a Rab4, Rab5, Rab7 és Rab11 fehérjék szerepe ismert az irodalomban [239, 240]. Munkacsoportunk konfokális mikroszkópia segítségével korábban már kimutatta, hogy a fluoreszcensen jelölt AT<sub>1</sub>R AngII stimulus hatására Rab5 tartalmú korai endoszómákba transzlokálódik, majd rövidesen a Rab4 pozitív vezikulákba, melyet a Rab11 molekulákkal való interakció követ a sejtmag közeli kompartmentekben, körülbelül 30 perccel a ligandkötést követően [233]. Kísérletes munkánk során szintén az AT<sub>1</sub>R sorsát szeretnénk volna nyomon követni, azonban nem csak az endogén ligand AngII, hanem funkcionálisan szelektív aktiváció hatására is BRET módszerrel.

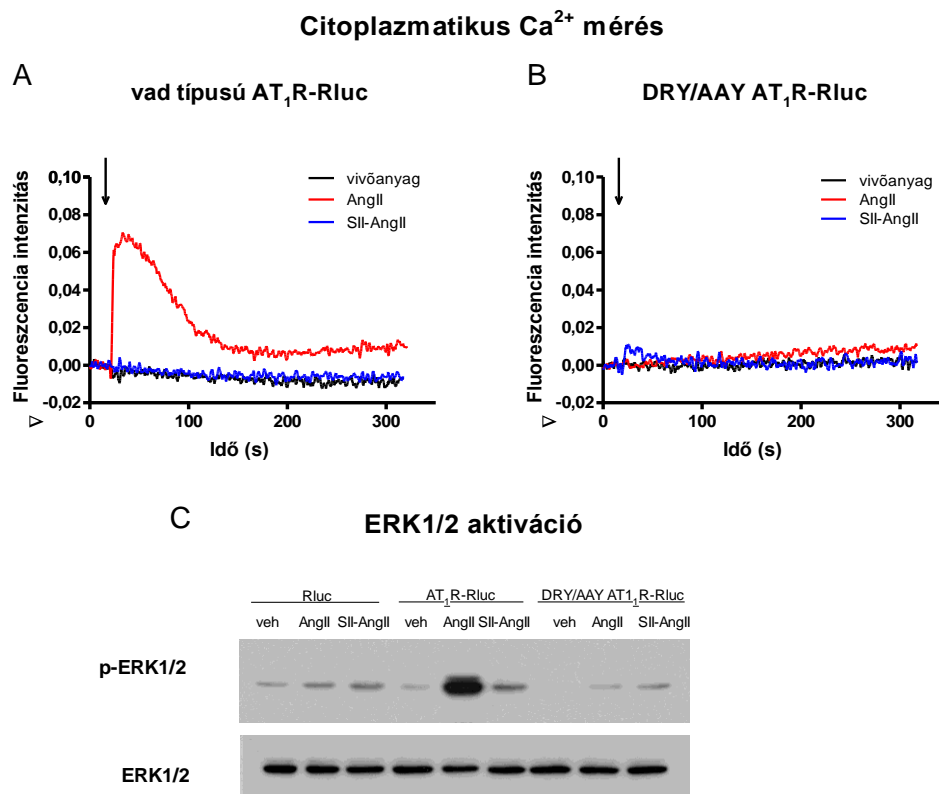
#### 5.1.1. Jelátvitel-szelektív agonista és mutáns AT<sub>1</sub>R működésének ellenőrzése

A jelátvitel-szelektív aktiváció hatásait két megközelítéssel, mégpedig funkcionálisan szelektív mutáns AT<sub>1</sub>R, valamint elfogult agonisták alkalmazásával kívántuk megvizsgálni. Kísérleteinkhez ezért a munkacsoportunk által korábban elkészített DRY/AAY mutáns AT<sub>1</sub>R-t (DRY/AAY AT<sub>1</sub>R) hívtuk segítségül. A DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-ban a konzervatív Asp-Arg-Tyr (DRY) motívumban az Asp125 és Arg126 aminosavakat alaninnal helyettesítettük [162], mely mutációk G-fehérje kötésre képtelen receptort eredményeztek. Alkalmazni kívántuk továbbá, a szintén G-fehérje-független irányban elfogult [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII (SII-AngII) ligandot is, melyről ismert, hogy AT<sub>1</sub>R-hez való kötődésekor G<sub>q/11</sub>-fehérje-függő útvonalak nem indulnak el, azonban a receptor β-arresztin2-kötése, valamint ERK1/2 aktivációja továbbra is létrejön [109, 241].

Első kísérleteinkben ellenőrizni szeretnénk volna, hogy a BRET mérésekhez szükséges *Renilla* luciferáz (Rluc) jelölés nincs-e befolyással a receptorok működésére, azaz, hogy az Rluc jelölt vad típusú AT<sub>1</sub>R (AT<sub>1</sub>R-Rluc), valamint DRY/AAY AT<sub>1</sub>R (DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-Rluc) funkcionális hatásai megegyeznek-e a jelöletlen receptorokról

korábban leírtakkal [110]. Ennek érdekében kontroll kísérleteket végeztünk, melyekben az AT<sub>1</sub>R jelátvitelének két fontos elemét vizsgáltuk meg, citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> mérésével a G<sub>q</sub>-fehérje aktivációjának következtében létrejövő Ca<sup>2+</sup> jelet, valamint Western blot módszerrel az ERK1/2 MAPK foszforilációjának, vagyis aktivációjának mértékét HEK 293 sejteken. A 13. ábrán látható, hogy az AT<sub>1</sub>R-Rluc esetén, a jelöletlen receptornál leírtakhoz hasonlóan [9], AngII stimulus hatására a citoplazmában a Ca<sup>2+</sup> szint emelkedését detektáltuk. A jelátvitel-szelektív agonista SII-AngII általi ingerlés esetén, nem alakult ki Ca<sup>2+</sup> jel a jelölt AT<sub>1</sub>R-on keresztül, mely alátámasztja, hogy ezen ligand hatására nem jön létre G<sub>q</sub>-fehérje aktiváció (13. ábra, A). Az Rluc-al jelölt, szintén funkcionálisan szelektív, DRY/AAY AT<sub>1</sub>R aktivációja is a jelöletlen receptorról korábban leírtakkal megegyezően, nem hozott létre jelentős G<sub>q</sub>-fehérje aktivációt sem AngII, sem pedig SII-AngII hozzáadásának hatására (13. ábra, B) [161]. Az ERK1/2 aktivációjának vizsgálatakor mind az AT<sub>1</sub>R-Rluc, mind pedig a DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-Rluc esetén ERK1/2 foszforiláció volt megfigyelhető 10 perces AngII, illetve SII-AngII kezelés hatására. Eredményeink összhangban állnak a jelöletlen receptorokkal szerzett azon előzetes tapasztalatokkal, hogy SII-AngII, illetve DRY/AAY AT<sub>1</sub>R alkalmazása esetén, jelátvitel-szelektív aktiváció során, kisebb mértékű ERK1/2 aktiváció jön létre, mint a vad típusú AT<sub>1</sub>R AngII ingerlésekor (13. ábra, C) [109, 110]. Ezen kontroll kísérletek alapján tehát megállapítottuk, hogy az Rluc jelölt AT<sub>1</sub>R-ok, a jelöletlen receptorokhoz hasonló módon funkcionálnak, és alkalmasak további BRET kísérletek végzésére.



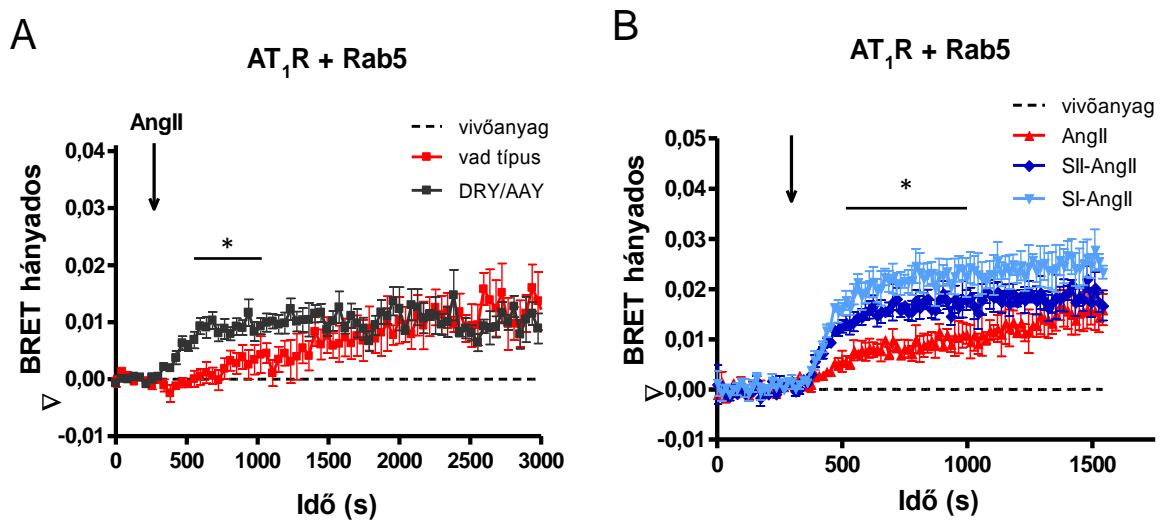


### **13. ábra Renilla-luciferázzal jelölt vad típusú és DRY/AA Y AT<sub>1</sub>R-ok funkcionális vizsgálata**

(A-C) AT<sub>1</sub>R-Rluc, DRY/AA Y AT<sub>1</sub>R-Rluc vagy (C) Rluc plazmidokkal transzfektáltunk HEK 293 sejteket 24 órával a kísérletek előtt. (A, B) A citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> mérések során a sejteket 45 percig Fura-2/AM fluoreszcens festékkel töltöttük, majd 100 nM AngII-vel (piros görbék), 10 μM SII-AngII-vel (kék görbék) vagy vivőanyaggal (fekete görbék) ingereltük. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük PTI Deltascan spektrofluorometer használatával. A 340/380 nm hullámhosszokon történt excitációt követő fluoreszcens emisszió értékek hányadosát ábrázoltuk. Az ábrán három független kísérlet reprezentatív felvételei láthatók. (C) A foszforilált ERK1/2 (p-ERK1/2) és a teljes ERK1/2 fehérjék mennyiségének kimutatása Western blottal Rluc-ot, vad típusú AT<sub>1</sub>R-Rluc-ot, vagy DRY/AA Y AT<sub>1</sub>R Rluc-ot kifejező HEK 293 sejtekben, 5 perces AngII (100 nM), illetve SII-AngII (10 μM) kezelést követően. A Western blot felvételek 3 független kísérletet reprezentálnak.

### 5.1.2. Az AT<sub>1</sub>R Rab5 tartalmú korai endoszómákban való megjelenése

Az ellenőrző vizsgálatokat követően, az AT<sub>1</sub>R korai endoszómákban való megjelenését vizsgáltuk meg BRET módszerrel. Kísérleteinkben *Renilla* luciferázzal jelzett AT<sub>1</sub>R és a YFP-vel jelölt Rab5 fehérje közötti energiatranszfer létrejöttét követtük nyomon. A mérés során AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5-tel transzfektált HEK 293 sejtekhez 100 nM AngII-t adtunk (14. ábra). A BRET hányados emelkedése, vagyis a molekuláris közelség létrejötte, a már korábban ismertett jelenségre, az AT<sub>1</sub>R korai endoszómákban való megjelenésére utal [233].



### 14. ábra Az AT<sub>1</sub>R megjelenése a Rab5 tartalmú endoszómákban jelátvitel-szelektív aktivációt követően

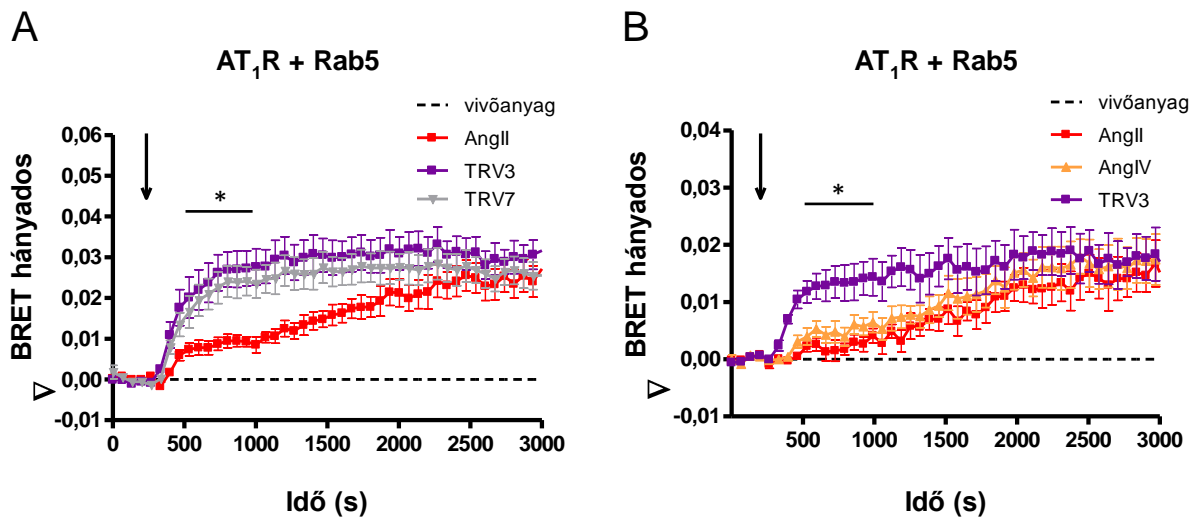
HEK 293 sejteket transzfektáltunk 24 órával a mérés előtt YFP-Rab5 (A-B) és AT<sub>1</sub>R-Rluc (A-B) vagy DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-Rluc (A) plazmidokkal. (A) A jelzett időpontban 100 nM AngII (piros görbe) vagy vehikulum (szaggatott vonal) hozzáadásával stimuláltuk a sejteket. (B) A sejtekhez 100 nM AngII (piros görbe), 10  $\mu$ M SII-AngII (sötétkék görbe), 100 nM SI-AngII (világoskék görbe) vagy vivőanyagként használt médiumot adtunk a jelzett időpontban. A BRET görbék a stimulált és a csak vivőanyagot kapott kontroll sejteken mért értékek különbségét mutatják, az ingerlés előtti értékekre normalizálva (szaggatott vonal). A BRET görbék legalább három független kísérlet eredményei. Átlag  $\pm$  SEM értékeket ábrázoltunk. \*  $p < 0,05$

Ezt követően megvizsgáltuk a jelátvitel szelektív DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-Rluc internalizációját is, mely 100 nM AngII hozzáadás hatására szintén megjelent a YFP-Rab5 tartalmú vezikulákban, azonban a vad típusú receptornál tapasztaltakhoz képest szignifikánsan korábban (14. ábra, A). A kapott internalizációs eltérést más megközelítéssel is megvizsgáltuk, a sejteket a szintén G-fehérje-független irányban elfogult SII-AngII-vel, valamint [Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII-vel (SI-AngII) ingereltük. Mind 10 µM SII-AngII, mind pedig 100 nM SI-AngII hatására az AT<sub>1</sub>R a DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-nál látottakhoz hasonlóan, szignifikánsan gyorsabban jelent meg a korai endoszómákban (14. ábra, B). Az internalizáció kinetikájában látott különbségek kiértékeléséhez egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), majd Tukey post hoc tesztet alkalmaztunk a mérés 500. és 1000. másodperce között mért értékek átlagaira (az ingerlést követő 3. és 12. perc közötti értékek). A statisztikai eredmények alapján szignifikánsan különbözik mind a DRY/AAY mutáns receptor internalizációja összevetve a vad típusú AT<sub>1</sub>R internalizációjával AngII stimulus hatására (p<0,05 DRY/AAY vs. Vad típus), mind pedig a vad típusú AT<sub>1</sub>R korai internalizációja SI-AngII vagy pedig SII-AngII ingerlés esetén, összevetve az AngII ingerléssel (p<0,05 AngII vs. SI-AngII és AngII vs. SII-AngII).

A tapasztalt eltérő korai internalizáció elemzéséhez az eddig alkalmazott ligandokon túl, további jelátvitel-szelektív AngII analógok hatásait is megvizsgáltuk az AT<sub>1</sub>R internalizációjára. Következő kísérleteinkben az újabban felfedezett, nagyobb affinitású, azonban szintén G-fehérje-független jelátviteli útvonalakat szelektíven aktiváló TRV120023 (TRV3) és TRV120027 (TRV7) vegyületeket alkalmaztuk [180]. A 15. ábra A panelén látható, hogy az SII-AngII-nél és SI-AngII-nél tapasztaltakhoz hasonlóan (14. ábra, B), 1 µM TRV3, illetve 1 µM TRV7 hozzáadását követően is szignifikánsan gyorsabban jelent meg az AT<sub>1</sub>R a Rab5 jelzett korai endoszómákban, mint AngII stimulus esetén (p<0,05, AngII vs. TRV3 és AngII vs. TRV7, a 14. ábránál leírt statisztikai megközelítéssel).

Az eddig vizsgált jelátvitel-szelektív agonisták (SI-AngII, SII-AngII, TRV3 és TRV7) eltérő mértékben ugyan, de mind kisebb affinitással kötődnek az AT<sub>1</sub>R-hoz, mint az AngII. Megvizsgáltuk ezért, hogy a tapasztalt felgyorsult korai internalizáció nem az eltérő affinitás következtében jön-e létre. Ehhez a szintén kisebb affinitással rendelkező, parciális agonista hexapeptid angiotenzin IV-et (AngIV) alkalmaztuk, mely

azonban mind G-fehérje aktivációt, mind pedig  $\beta$ -arresztin2-kötést képes létrehozni, így nem elfogult AT<sub>1</sub>R ligandnak tekinthető [21]. A funkcionálisan szelektív ligandoktól eltérően 10  $\mu$ M AngIV az AngII-nél tapasztaltaktól szignifikánsan nem eltérő ( $p > 0,05$ , AngII vs. AngIV, a 14. ábránál alkalmazott statisztikai megközelítéssel), lassabb kinetikájú BRET interakcióhoz vezetett AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 között (15. ábra, B).

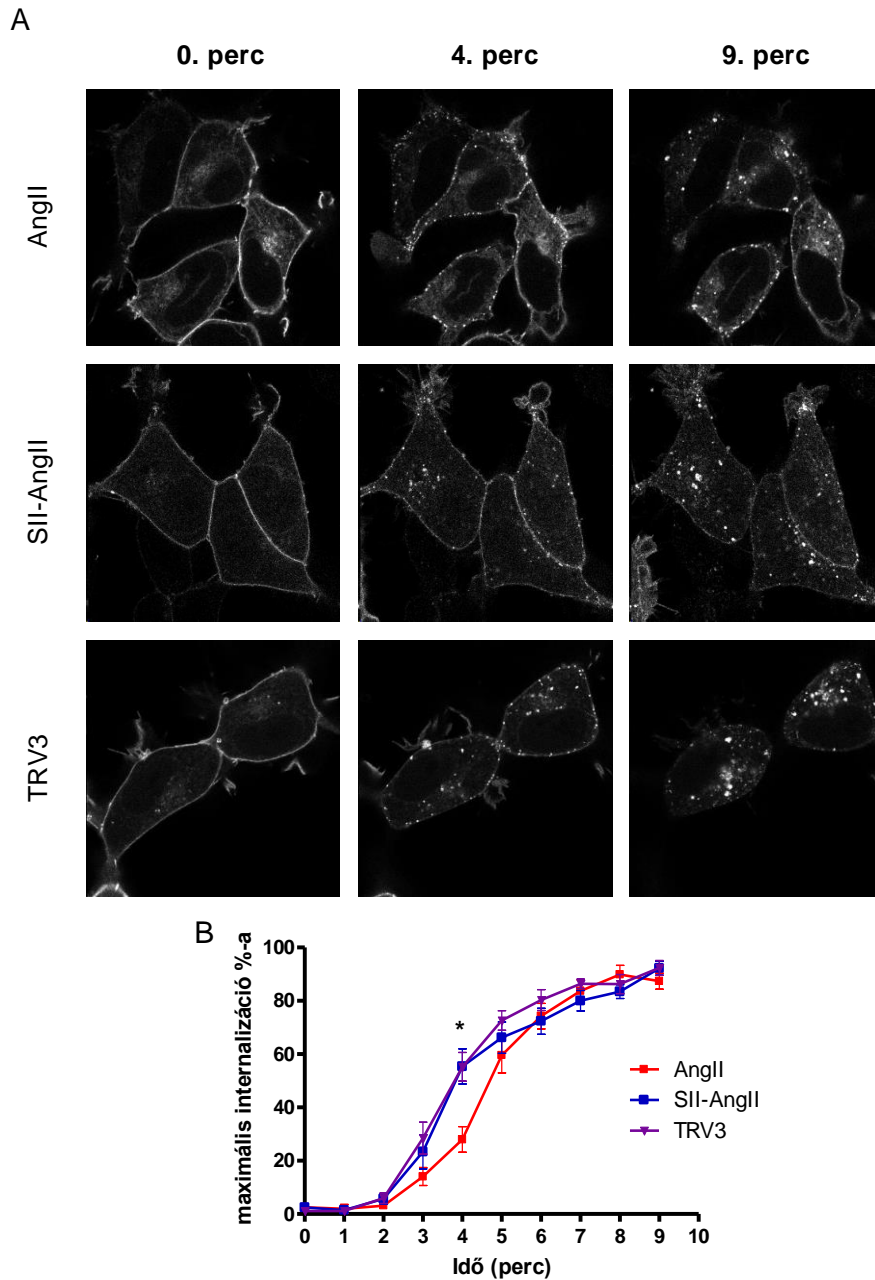


### 15. ábra AT<sub>1</sub>R-Rluc internalizációjának vizsgálata különböző agonisták hatására

HEK 293 sejteket transzfektáltunk 24 órával a mérés előtt YFP-Rab5 és AT<sub>1</sub>R-Rluc plazmidokkal. A jelzett időpontokban 100 nM AngII (A-B, piros görbe), 1  $\mu$ M TRV3 (A-B, lila görbe), 1  $\mu$ M TRV7 (A, szürke görbe), 10  $\mu$ M AngIV (B, sárga görbe) vagy vehikulum (A-B, szaggatott vonal) hozzáadásával stimuláltuk a sejteket. A BRET görbék a stimulált és a csak vivőanyagot kapott, kontroll sejteken mért értékek különbségét mutatják, az ingerlés előtti értékekre normalizálva. Legalább öt független kísérlet átlagának  $\pm$  SEM értékeit ábrázoltuk. \*  $p < 0,05$

## 5.2. A jelátvitel szelektíven aktivált AT<sub>1</sub>R eltérő internalizációjának jellemzése

A következőkben konfokális mikroszkópiával is szeretnénk vizsgálni az AT<sub>1</sub>R agonista indukált internalizációját. Kísérleteinkhez a munkacsoportunk által korábban létrehozott zöld fluoreszcens fehérjével jelölt AT<sub>1</sub>R-t (AT<sub>1</sub>R-GFP) stabilan kifejező HEK 293 sejteket használtuk [233]. A 16. ábra A panelének mikroszkópos felvételein látható, hogy nyugalomban (0. perc) az AT<sub>1</sub>R-GFP homogénen helyezkedik el a plazmamembránban. Agonista hozzáadásának hatására a receptor először kisebb csoportokba rendeződik a sejt felszínén, majd az internalizáció előrehaladtával megjelenik sejten belüli vezikulákban. Mind SII-AngII, mind pedig TRV3 stimulus hatására azt tapasztaltuk, hogy 4 perc elteltével szignifikánsan több AT<sub>1</sub>R található sejten belüli vezikulákban, mint AngII ingerlés esetén (16. ábra). AngII stimulust követően, az endocitózis kezdetén a receptorok hosszabb ideig maradnak összecsoportosulva a plazmamembránban, mint funkcionálisan szelektív aktiváció esetén. A 16. ábra B panelén az enyhén felgyorsult korai internalizáció számszerűsítése látható. A plazmamembrántól egyértelműen elkülöníthető AT<sub>1</sub>R-GFP tartalmú vezikulák arányát ábrázoltuk a maximális internalizáció, illetve az idő függvényében. Az internalizáció maximumának az egyes kísérletek egyes kondícióiban egy időben mérhető legmagasabb vezikulaszámát tekintettük. Kétszemponos varianciával (ANOVA) és Bonferroni post hoc teszttel elemeztük az eredményeket, ahol az egyik szempont az alkalmazott ligand, a másik az idő volt. A 4. percen kapott értékeknél szignifikáns különbség adódott mind az SII-AngII, mind pedig TRV3 esetén az AngII-vel összevetve ( $p < 0,05$  AngII vs. SII-AngII és AngII vs. TRV3). Továbbá az interakció is szignifikánsan különbözőnek adódott AngII ingerlés esetén összevetve a másik két vizsgált liganddal.



**16. ábra Agonista stimuláció hatása az AT<sub>1</sub>R-GFP eloszlására HEK 293 sejtekben konfokális mikroszkópos felvételeken**

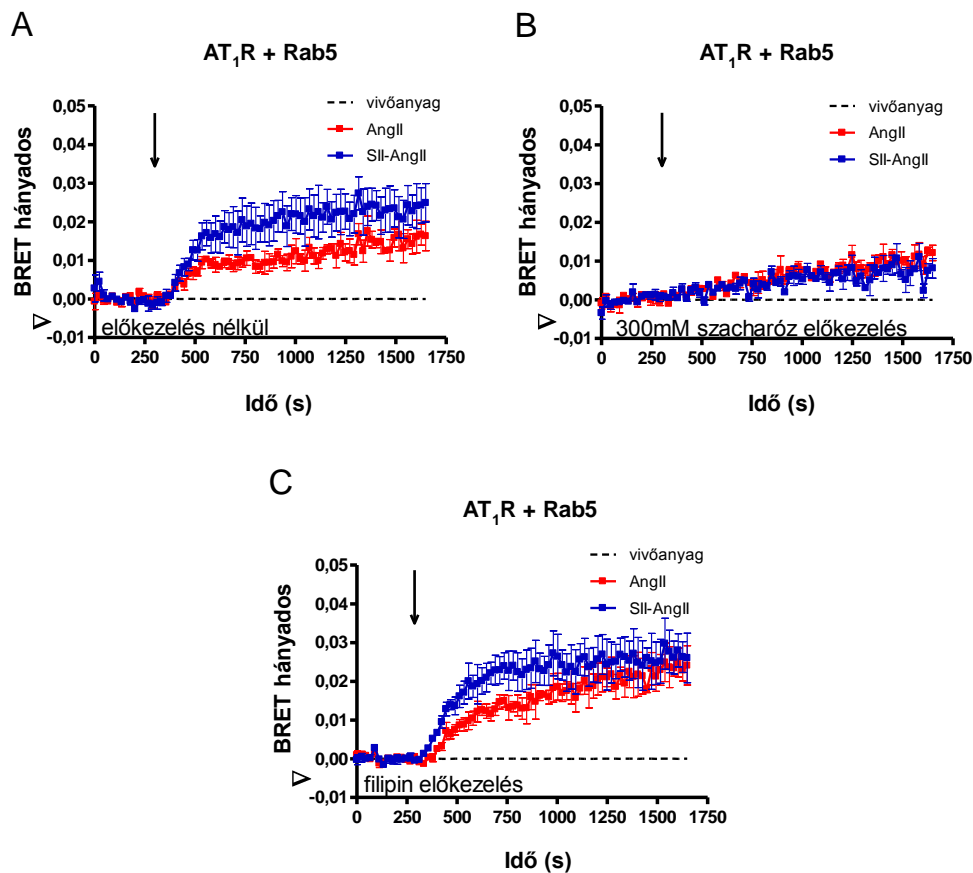
(A) AT<sub>1</sub>R-GFP-t stabilan kifejező HEK 293 sejtekről készült reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek az AT<sub>1</sub>R sejten belüli eloszlásáról. A felvételek 100 nM AngII (felső sor felvételei), 10 μM SII (középső sor felvételei) vagy 1 μM TRV3 (alsó sor felvételei) hozzáadása előtt közvetlenül (0. perc), illetve a hozzáadást követően 4 és 9 perccel készültek. A GFP fluoreszcencia mérése Zeiss LSM 710 konfokális

mikroszkóppal történt. Az ábrán 7 független kísérlet reprezentatív felvételei láthatók. (B) Az AT<sub>1</sub>R-GFP internalizációjának kvantifikálása MetaMorph szoftver morfolometriai elemzésével készült. Az ábrán 7 független kísérlet átlaga ± SEM értékei láthatók.

\* p<0,05

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen mechanizmussal vezethet a jelátvitel-szelektív aktiváció felgyorsult korai internalizációhoz. Megvizsgáltuk a lehetőségét, hogy az SII-AngII által aktivált AT<sub>1</sub>R esetleg egy másik endocitotikus útvonal használatával kerül a sejt belsejébe, mint az AngII-vel ingerelt receptor. Első megközelítésként szacharózzal kezeltük elő a sejteket, mivel ismert volt az irodalomban, hogy nagy dózisú szacharóz kezeléssel a klatrin mediált endocitózis gátolható [242]. Az általunk alkalmazott magas koncentrációban (300 mM) a szacharóz szinte teljesen meggátolta az AT<sub>1</sub>R és YFP-Rab5 közötti interakciót mind AngII, mind SII-AngII stimulálást követően (*17. ábra, B*).

Megvizsgáltuk továbbá a klatrinfüggetlen, kaveolamediált útvonal gátlószereként számon tartott filipin hatását is [243]. Ehhez ismét AngII-vel, illetve SII-AngII-vel stimuláltunk AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 konsztraktokat kifejező HEK 293 sejteket. A 30 perces filipin (5 µg/ml) előkezelés azonban nem változtatta meg a receptor AngII vagy SII-AngII hatására létrejövő korai endoszómákban való megjelenését (*17. ábra, C*). Ebből arra következtethetünk, hogy mindkét vizsgált ligand elsősorban klatrinmediált endocitotikus útvonalon, és nem különböző internalizációs mechanizmusokon keresztül indítja el az aktivált AT<sub>1</sub>R-t a sejt belseje felé.



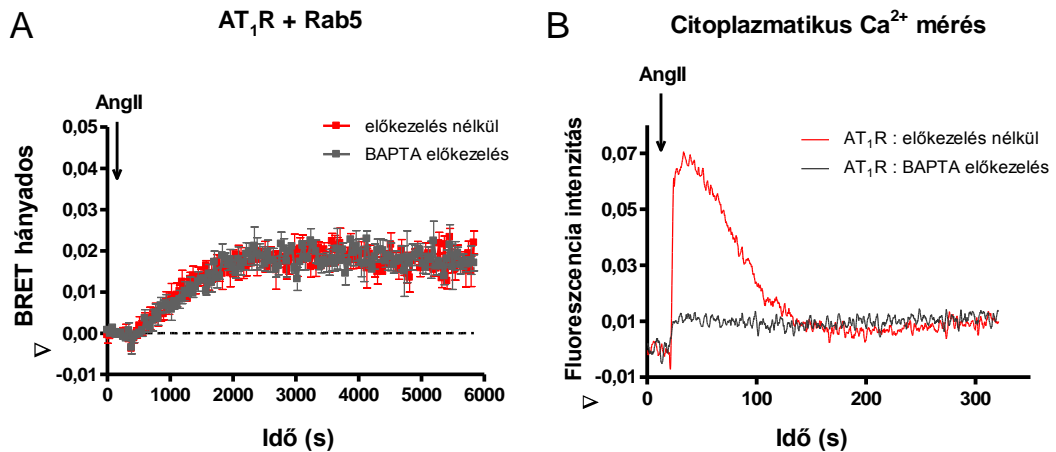
### 17. ábra SII-AngII és AngII által aktivált AT<sub>1</sub>R-ok endocitotikus útvonalainak vizsgálata BRET módszerrel

24 órával a BRET mérés előtt AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 konstrukciókkal transzfektáltunk HEK 293 sejteket. 30 perces előkezelést alkalmaztunk (A) vívőanyagként használt médiummal, (B) a klatrinmediált endocitózis gátlószereként 300 mM szukrózzal, vagy (C) a kaveolamediált endocitózis gátlószereként 5 µg/ml filipinnel. Az előkezelés után a sejteket vívőanyaggal (szaggatott vonal), 100 nM AngII-vel (A-C, piros görbe) vagy 10 µM SII-AngII-vel (A-C, kék görbe) ingereltük a jelzett időpontban. A BRET görbéken három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók. Átlag ± SEM értékeket ábrázoltunk.

A következőkben annak szeretnénk volna utánajárni, hogy szerepet játszik-e az eltérő gyorsaságú internalizációban az AT<sub>1</sub>R β-arresztin jelátvitelre szelektív aktiválódása esetén elmaradó G-fehérje-aktiváció, és a következményes Ca<sup>2+</sup> jel hiánya.



Ennek vizsgálatához a sejtp permeábilis  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor BAPTA-AM-el alkalmazásával gátoltuk a receptor aktiváció kiváltotta  $\text{Ca}^{2+}$  jelet BRET kísérleteinkben. A 18. ábra A panelén látható, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  jel blokkolása 30 perces BAPTA-AM előkezeléssel nem befolyásolta az  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc YFP-Rab5-el jelzett endoszómákban való megjelenését AngII ingerlés esetén.



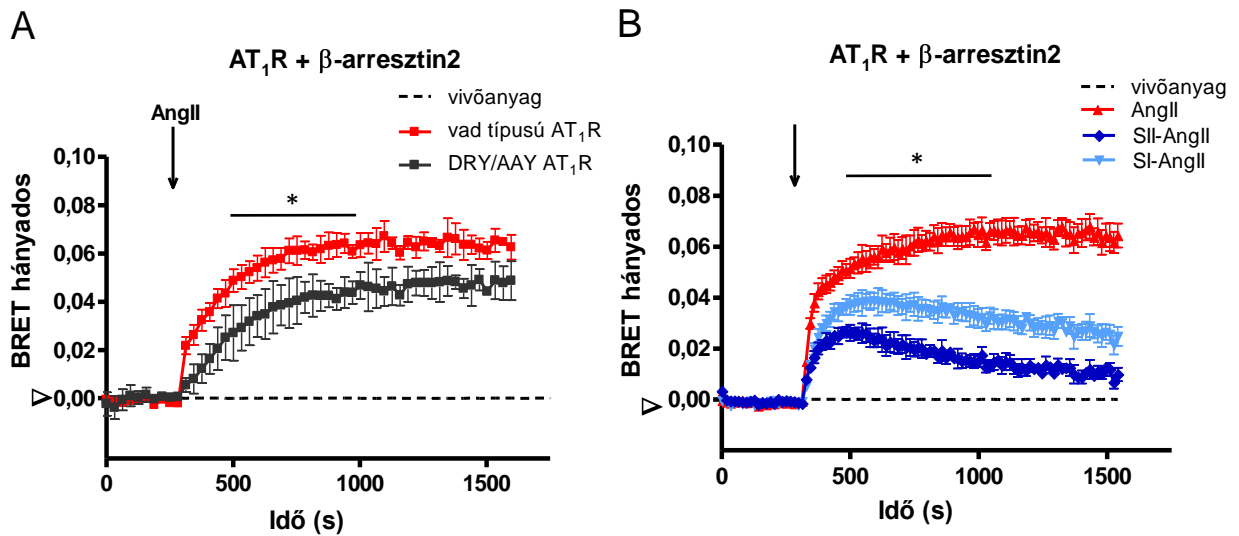
### 18. ábra Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ keláció hatása az $\text{AT}_1\text{R}$ AngII által indukált internalizációjára

(A) BRET kísérleteinkhez HEK 293 sejteket transzfektáltunk 24 órával a mérés előtt YFP-Rab5 és  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc plazmidokkal. 30 percig előkezeltük a sejteket vívóanyaggal (piros görbe) vagy a  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor BAPTA-AM-mel ( $10 \mu\text{M}$ , szürke görbe). Ezt követően a jelzett időpontban vehikulummal (szaggatott vonal) vagy  $100 \text{ nM}$  AngII-vel ingereltük a sejteket. Három független, triplikátumokban mért kísérlet eredményeit átlag  $\pm$  SEM formátumban ábrázoltuk. (B) BAPTA-AM kezelés hatékonyságának bizonyítására HEK 293 sejteket transzfektáltunk  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc konstrukcióval 24 órával a mérés előtt. A kísérlet előtt a sejteket 45 percig Fura-2/AM fluoreszcens festékkel töltöttük, közben 30 percig vívóanyaggal (piros görbe), vagy  $10 \mu\text{M}$  BAPTA-AM-mel (szürke görbe) kezeltük elő. A jelzett időpontban  $100 \text{ nM}$  AngII-t adtunk a sejtekhez. A 340/380 nm hullámhosszokon történt excitációt követő fluoreszcens emisszió értékek hányadosát ábrázoltuk. Az ábrán három független kísérlet reprezentatív felvételei láthatók.

A BAPTA-AM hatékonyságának ellenőrzésére intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  méréseket végeztünk PTI Deltascan segítségével. Amint az a 18. ábra B panelén látható, kontroll esetben az AngII hatására intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedése detektálható. A sejtek BAPTA-AM előkezelése azonban teljesen kivédte az Ang II hatására létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  jelet, jelezve ezzel a 30 perces BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$ ) előkezelés hatékonyságát.

### 5.3. A $\beta$ -arresztin2-kötés szerepének vizsgálata az $\text{AT}_1\text{R}$ internalizációjában

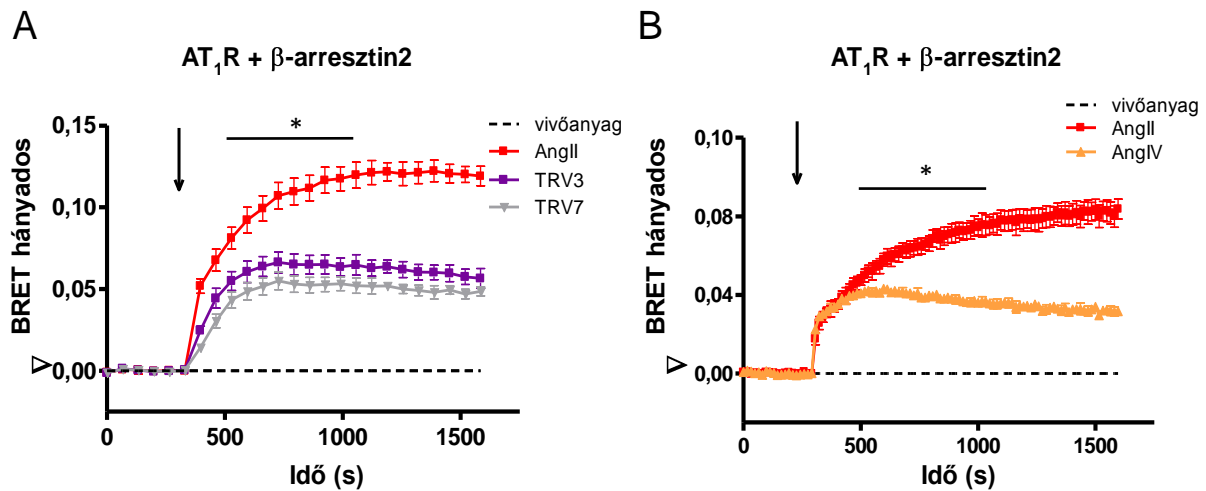
Következő kísérleteinkben a jelátvitel-szelektív aktiváció kiváltotta eltérő internalizáció okaként a receptor stimulációját követő egyik korai lépést, az  $\text{AT}_1\text{R}$  és  $\beta$ -arresztin2 között létrejövő kötést is megvizsgáltuk. A  $\beta$ -arresztin molekulák ugyanis, mint már említettem, fontos szerepet töltenek be a GFKR-ek deszenzitizációjában és endocitózisában is. BRET méréseinkhez HEK 293 sejteket tranziensen transzfektáltunk  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc-al és sárga fluoreszcens fehérjével jelölt  $\beta$ -arresztin2-vel ( $\beta$ -arresztin2-YFP). 100 nM AngII hozzáadásának hatására jelentős BRET hányados emelkedést kaptunk (19. ábra, A), mely a már ismert jelenséget, a  $\beta$ -arresztin2 molekulák kihelyeződését tükrözi az aktivált  $\text{AT}_1\text{R}$ -hez [232, 244]. Ezután összehasonlítottuk a G-fehérje aktivációra képtelen DRY/AAY mutáns  $\text{AT}_1\text{R}$   $\beta$ -arresztin2-kötését a vad típusú  $\text{AT}_1\text{R}$ -el, AngII ingerlés hatására. A 19. ábra A panelén látható, hogy a DRY/AAY  $\text{AT}_1\text{R}$  szignifikánsan kisebb mértékű ( $p < 0,05$ , egyszempontos ANOVA analízis, és Tukey post hoc teszt a mérés 500. és 1000. másodperce között mért értékek átlagaira), azonban a vad típusú receptor AngII általi aktivációjánál tapasztaltakhoz hasonló kinetikájú BRET interakciót mutatott. Következő lépésként a jelátvitel-szelektív ligand SII-AngII hatására létrejövő  $\beta$ -arresztin2-kötést vizsgáltuk meg. A 19. ábra B panelén látható BRET hányados emelkedés jelzi, hogy sikerült reprodukálnunk az  $\text{AT}_1\text{R}$  és  $\beta$ -arresztin2 közötti molekuláris interakciót SII-AngII hatására [161]. Az SII-AngII-nél tapasztaltakhoz hasonlóan, a másik vizsgált ligand, SI-AngII ingerlést követően is kötődött a  $\beta$ -arresztin2 az aktivált  $\text{AT}_1\text{R}$ -hoz, melyet egy frissen megjelent közleményben is leírtak [245]. A 19. ábra B panelén az AngII ingerlésnél tapasztaltakhoz képest szignifikánsan kisebb mértékű ( $p < 0,05$ , AngII vs. SI-AngII és AngII vs. SII-AngII a 19. ábra A panelén alkalmazott statisztikai megközelítéssel), és kevésbé fenntartott BRET-jel-emelkedés látható mindkét vizsgált ligand esetén.



### 19. ábra Az AT<sub>1</sub>R β-arresztin2-kötésének vizsgálata jelátvitel-szelektív aktiváció hatására

Az ábrán a β-arresztin2-YFP (A-B), valamint a vad típusú AT<sub>1</sub>R-Rluc (A-B) vagy a DRY/AAY AT<sub>1</sub>R-Rluc (A) molekulák közötti BRET mérési eredmények láthatók. (A) A jelzett időpontban 100 nM AngII-vel (piros és szürke görbék) vagy vehikulummal (szaggatott vonal) stimuláltuk a különböző AT<sub>1</sub>R-okat kifejező HEK293 sejteket. (B) A sejtekhez 100 nM AngII (piros görbe), 10 μM SII-AngII (sötét kék görbe), 100 nM SI-AngII (világoskék görbe), vagy vivőanyagként használt médium (szaggatott vonal) a jelzett időpontban. A BRET görbék a stimulált és a vivőanyagot kapott, kontroll sejteken mért értékek különbségét mutatják az ingerlés előtti értékekre normalizálva (szaggatott vonal). A BRET görbék három független kísérlet eredményei. Átlag ± SEM értékeket ábrázoltunk. \* p<0,05.

Az SI-AngII és SII-AngII hatására létrejövő kötődés mellett, a szintén G-fehérje-független jelátvitelre szelektív TRV3 és TRV7 vegyületekkel történő stimulációval létrejövő receptor-β-arresztin2 interakciót is megvizsgáltuk. Ezen elfogult ligandok is képesek voltak a β-arresztin2 molekula kihelyeződését kiváltani az aktivált receptorhoz, azonban a kötés mértéke ezen ligandok esetén is szignifikánsan kisebbnek bizonyult (p<0,05, AngII vs. TRV3 és AngII vs. TRV7, a 19. ábránál alkalmazott statisztikai megközelítéssel), mint AngII stimuláció esetén (20. ábra, A).

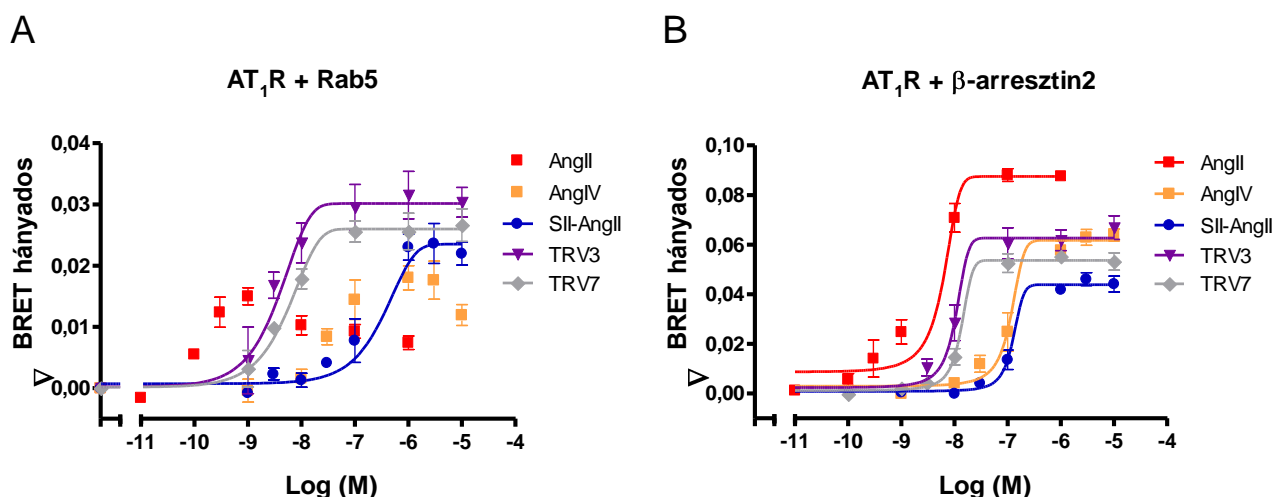


**20. ábra** Az AT<sub>1</sub>R β-arresztin2-kötésének vizsgálata különböző, alacsony affinitású ligandok hatására

AT<sub>1</sub>R-Rluc és β-arresztin2-YFP plazmidokat kifejező HEK 293 sejteken történt BRET mérések láthatók. A jelzett időpontban a sejtekhez 100 nM AngII (A-B, piros görbe), 1 μM TRV3 (A, lila görbe), 1 μM TRV7 (A, szürke görbe), 10 μM AngIV (B, sárga görbe) vagy vivőanyag (szaggatott vonal) került hozzáadásra. A BRET hányados emelkedése a β-arresztin2 molekula AT<sub>1</sub>R-hez való kötődésére utal. A görbéken három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók, átlag ± SEM érték formátumban. \* p<0,05.

Megvizsgáltuk továbbá a jelátvitel-szelektív ligandokhoz hasonlóan alacsony affinitással rendelkező, azonban nem elfogult AngIV ligand által kiváltott AT<sub>1</sub>R-β-arresztin2-kötést is (20. ábra, B). Érdekes módon azonban a BRET hányados változása a funkcionálisan szelektív ligandokéhoz hasonlóan kisebb mértékűnek, és kevésbé fenntartottnak bizonyult, mint AngII ingerlés esetén (p<0,05, AngII vs. AngIV, a 19. ábránál alkalmazott statisztikai megközelítéssel).

Kísérleteinkben az irodalomban leírt, receptorkötési vizsgálatok alapján meghatározott, úgynevezett telítő ligandkoncentrációkat alkalmaztunk. Annak ellenőrzése céljából, hogy az általunk alkalmazott dózisok valóban képesek maximális hatást kiváltani a vizsgált BRET interakciókban, és a látott internalizációs és β-arresztin2-kötésbeli különbségek nem csak az elégtelen/szubmaximális dózisoknak köszönhetőek, dózishatás-görbéket vettünk fel (21. ábra).



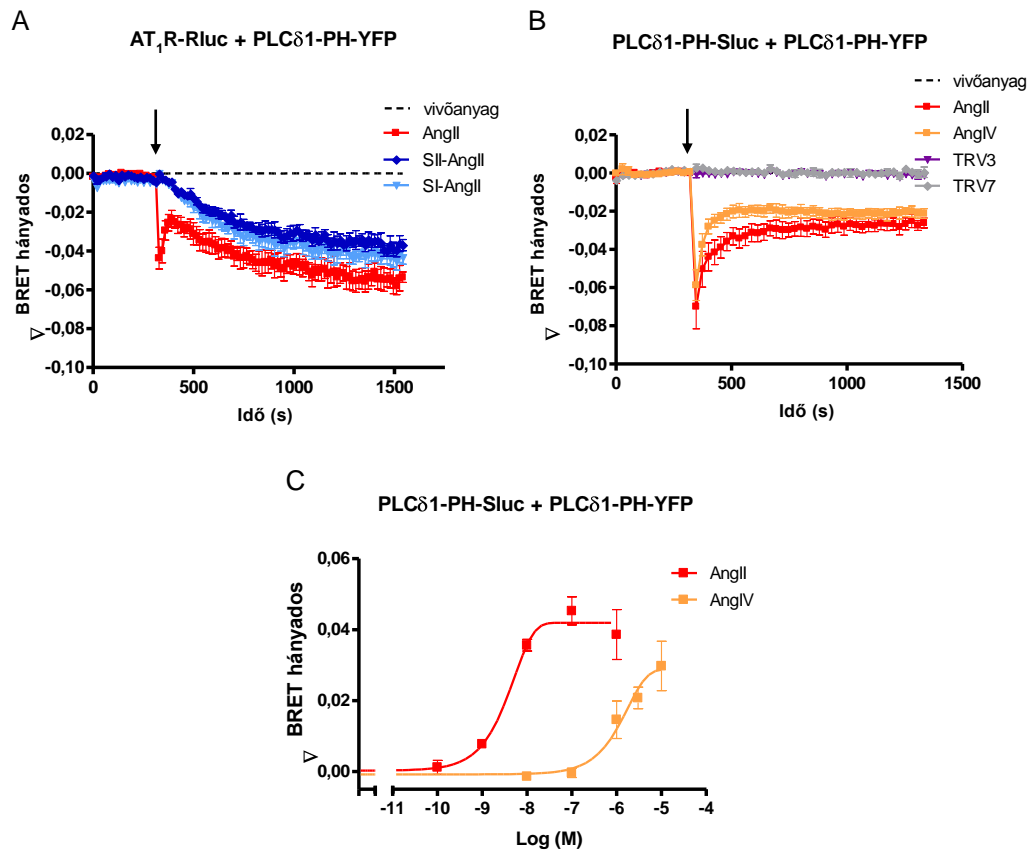
## 21. ábra A vizsgált ligandok különböző BRET interakciókban felvett dózis-hatás görbéi

(A) Különböző ligandok 10 perces stimulusával felvett dózis hatás görbék az AT<sub>1</sub>R korai endoszómákban történő megjelenésére, AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 közötti BRET interakció detektálásával HEK 293 sejtekben. (B) Dózis-hatás görbék, melyek a β-arresztin2-YFP AT<sub>1</sub>R-Rluc molekulához való kötődését mutatja HEK 293 sejtekben különböző ligandokkal stimulált körülmények között. A legalább három független kísérletről származó adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk.

Ezen kontroll kísérletek eredményeiből látható, hogy az általunk alkalmazott 10 perces 100 nM AngII ingerlés közel maximális Rab5-el detektálható internalizációt (21. ábra, A), valamint maximális β-arresztin2-kötést képes létrehozni (21. ábra, B). Hasonlóképpen, a 10 μM AngIV is maximálisához közeli hatékonyságot mutatott mind a Rab5-tel jelzett endoszómákban való megjelenést (21. ábra, A), mind pedig a β-arresztin2-kötést vizsgáló megközelítéseinkben (21. ábra, B). A kísérleteinkben használt 10 μM SII-AngII, valamint 1 μM TRV3 és 1 μM TRV7 is maximális mértékű korai endoszómákban való megjelenést (21. ábra, A) és maximális β-arresztin2 kötődést váltott ki az AT<sub>1</sub>R-hez (21. ábra, B).

#### 5.4. G-fehérje aktiváció okozta PtdIns(4,5) $P_2$ bontás nyomon követése BRET módszerrel

A következő lépésben kontroll kísérletekben megbizonyosodtunk a funkcionálisan szelektív ligandok G-fehérjét aktiváló képességének hiányáról. Az AT<sub>1</sub>R AngII ingerlés hatására G<sub>q/11</sub>-fehérjét aktivál, mely PLC enzim általi PtdIns(4,5) $P_2$  bontáshoz vezet a plazmamembránban. A G-fehérje aktivációjának mértékét közvetetten, a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének változásai révén követtük nyomon BRET módszerrel. A PLC $\delta$ 1 enzim PH doménjét használtuk fel kísérleteinkhez, mely a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  molekuláihoz képes kötődni [234]. HEK 293 sejtekben AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-vel jelzett PLC $\delta$ 1-PH domén (PLC $\delta$ 1-PH-YFP) tartalmú konstrukciókat fejeztettünk ki (22. ábra, A). Az AngII hatására létrejövő kezdeti BRET-jel-csökkenés a receptor aktivációját követő PtdIns(4,5) $P_2$  lebontást, ezáltal a PtdIns(4,5) $P_2$ -hoz kapcsolódó PLC $\delta$ 1-PH-YFP szenzor eltávolodását jelzi a plazmamembrántól. A hányados ezt követően gyorsan emelkedik, ami a PtdIns(4,5) $P_2$  reszintézisének következménye. Ekkor a PLC $\delta$ 1-PH-YFP molekulák nagy része újra a plazmamembránhoz köt. Ezt a BRET-jel-emelkedést egy lassú -csökkenés követi, mely az AT<sub>1</sub>R-Rluc és PLC $\delta$ 1-PH-YFP ismételt eltávolodására utal, mivel a receptor internalizálódik és a sejt belsejébe kerül a plazmamembránról, ahol a PLC $\delta$ 1-PH domének jelentős része található. Ettől eltérően az SI-AngII és az SII-AngII hozzáadásakor a BRET hányados lassú csökkenését tapasztaltuk kezdeti gyors disszociáció nélkül. Ez összhangban áll azzal, hogy sem az SI-AngII, sem az SII-AngII nem hoz létre G-fehérje aktivációt, ezáltal az AT<sub>1</sub>R aktiváció nem eredményez PtdIns(4,5) $P_2$  szint csökkenést a plazmamembránban. Viszont a receptor mindkét ligand általi aktivációt követően internalizálódik, mely lassú BRET-jel-csökkenést eredmény (22. ábra, A).



## 22. ábra A plazmamembrán $PtdIns(4,5)P_2$ bontásának vizsgálata különböző ligandok hatására

24 órával a mérés előtt (A) HEK 293 sejteket  $AT_1R-Rluc$  és  $PLC\delta 1-PH-YFP$ , illetve (B-C) HEK 293T sejteket  $AT_1R$ ,  $PLC\delta 1-PH-Sluc$  és  $PLC\delta 1-PH-YFP$  konstrukciókkal transzfektáltunk. Az A és B panelen a BRET mérésekben a jelzett időpontban 100 nM AngII (A-B), 10  $\mu$ M SII-AngII (A), 100 nM SI-AngII (A), 10  $\mu$ M AngIV (B), 1  $\mu$ M TRV3 (B), 1  $\mu$ M TRV7 (B) vagy vivőanyagként használt médium (A és B, szaggatott vonal) hozzáadásával ingereltük a sejteket. Az ábra C részén az AngII és AngIV által kiváltott  $PtdIns(4,5)P_2$  depléció mértékének BRET mérésben felvett dózis-hatás görbéi láthatók. Az ábrák a stimulált és a kontroll sejteken mért BRET hányadosok különbségét mutatják, az ingerlés előtti értékekre normalizálva. Legalább három független kísérlet átlagának  $\pm$  SEM értékeit ábrázoltuk.

Az általunk alkalmazott G-fehérje aktivációt vizsgáló kísérleti felállásban az internalizáció jelensége zavaró körülményként jelenik meg, mely bonyolítja a kapott változás értékelését. Ezért a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  szint egyértelműbb nyomon követéséhez, az internalizáció figyelmen kívül hagyásának érdekében, a sejteket ezután a PLC $\delta$ 1-PH domén YFP-vel és szuper *Renilla* luciferázzal jelölt (PLC $\delta$ 1-PH-YFP és PLC $\delta$ 1-PH-Sluc) konstrukcióival transzfektáltuk (22. ábra, B). Nyugalomban mindkét  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  érzékelő szenzor a plazmamembránban található, molekuláris közelségben egymástól, ezért nagy BRET-jel detektálható. A 100 nM AngII hatására létrejövő  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  depléció következtében a szenzorok a citoplazmába kerülnek, eltávolodva a plazmamembrántól és ezáltal egymástól. Ekkor BRET-hányados-csökkenést tapasztalunk. Ezt követően a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  reszintézisének hatására a szenzorok ismét megjelennek a plazmamembránban, így BRET-jel-emelkedést láthatunk (22. ábra, B). Mivel ezt követően mindkét szenzor a plazmamembránhoz kötve marad, nem figyelhető meg lassú BRET-jel-csökkenés az internalizáció hatására. Ezen újabb BRET megközelítésben vizsgáltuk meg az AngIV, a TRV3 és a TRV7  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  bontó képességét. 10  $\mu\text{M}$  AngIV hozzáadásának hatására az AngII ingerlésnél tapasztaltakhoz hasonlóan, kezdeti BRET-hányados-csökkenést, majd pedig emelkedést kaptunk. A G-fehérje-aktivációt elindítani képtelen TRV3 és TRV7 agonisták esetén viszont nem látható BRET-jel-változás, nem jön létre  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  depléció a plazmamembránban (22. ábra, B). Ezen eredmények alapján a vizsgált  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív ligandok valóban nem képesek  $G_q$  fehérjét aktiválni, és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  bontást létrehozni a plazmamembránban.

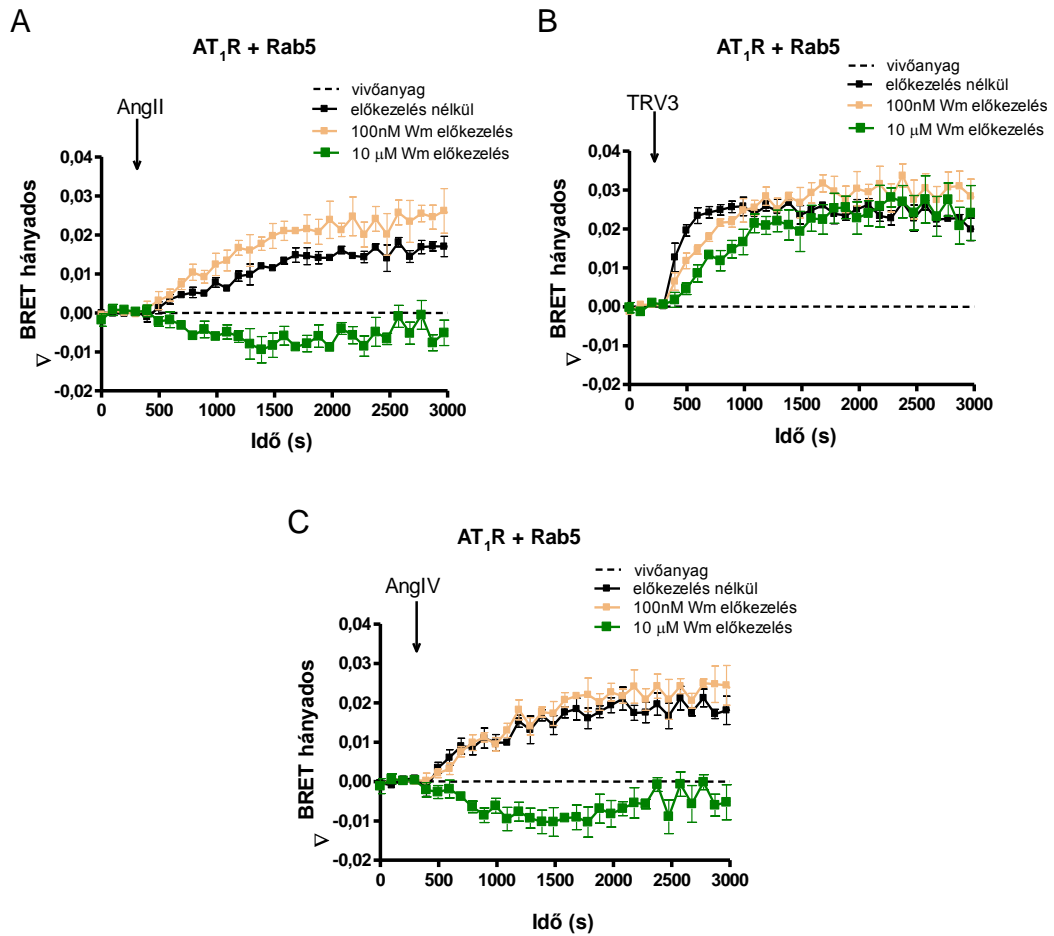
A  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  depléció vizsgálati során alkalmazott dózisok elégséges voltának megítéléséhez AngII és AngIV esetén dózis-hatás görbéket is felvettünk. A 22. ábra C panelén látható, hogy az általunk alkalmazott 100 nM AngII, valamint 10  $\mu\text{M}$  AngIV az általuk elérhető maximális  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  depléciót hozta létre BRET rendszerünkben



### 5.5. Foszfatidilinozitol kinázok szerepe az AT<sub>1</sub>R agonista indukált endocitózisában

Következő lépésben a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének szerepét szeretnénk volna tisztázni az AT<sub>1</sub>R korai internalizációjában, hiszen mint láthattuk a  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív aktivációt követően nem jön létre PtdIns(4,5) $P_2$  bontás a plazmamembránban. A PtdIns(4,5) $P_2$  a plazmamembrán belső lipidrétegének alkotóeleme, és kitüntetett szerepet játszik mind különböző jelátviteli folyamatokban, mind pedig sejtfelszíni receptorok, többek között GFKR-ek endocitózisának koordinálásában [246]. Ezért felmerült a lehetőség, hogy a jelátvitel-szelektív aktivációt követő eltérő lokális plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szint befolyással lehet az AT<sub>1</sub>R korai internalizációjára.

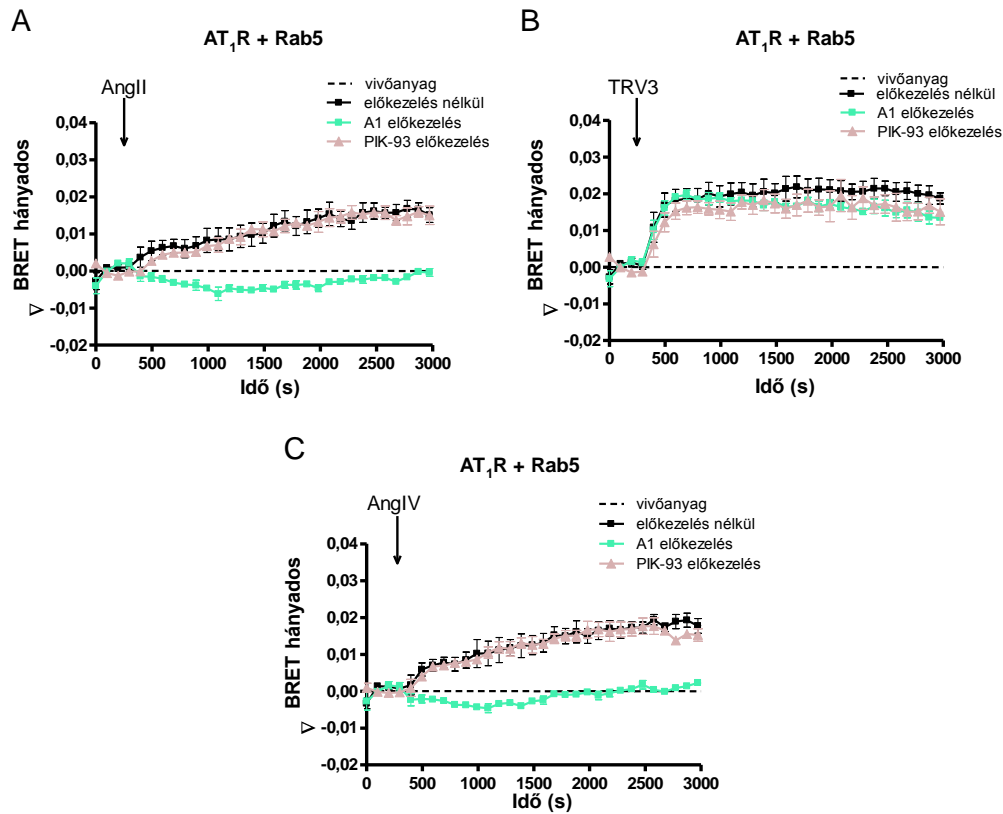
Méréseinkben kis és nagy dóziszú Wm előkezeléseket alkalmaztunk, melyeket követően megvizsgáltuk az AT<sub>1</sub>R Rab5 tartalmú korai endoszómákban való megjelenését AngII, TRV3, továbbá AngIV hatására. A 23. ábrán látható, hogy a kis dóziszú (100 nM), csak a PI3K-okat gátló Wm előkezelés nem volt hatással az AT<sub>1</sub>R agonista indukálta endocitózisára, egyik vizsgált ligand esetén sem. Ezzel szemben, a nagy dóziszú (10  $\mu$ M) Wm előkezelés, mely a PI4K-ok aktivitását gátolja [224], nagy mértékben csökkentette az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 közötti interakciót AngII és AngIV hozzáadását követően (23. ábra, A és C). A jelátvitel-szelektív ligand TRV3 vizsgálatakor azonban nem tapasztalható különbség a BRET görbék lefutásában sem az alacsony, sem a magas dóziszú Wm előkezelés esetén, sem a kontroll görbéhez viszonyítva (23. ábra).



### 23. ábra Wortmannin hatása az $AT_1R$ agonista indukált endocitózisára

HEK 293 sejteken végzett BRET mérési eredmények, 24 órával az  $AT_1R$ -Rluc és YFP-Rab5 konstrukciókkal történt transzfekció után. A mérés előtt 10 perccel vivőanyagként használt médiummal (fekete görbe), alacsony dózissú (100 nM) wortmanninal (krémszínű görbe), mely elsősorban a PI3K-at gátolja, vagy pedig nagy dózissú (10  $\mu$ M) wortmanninal (zöld görbe), mely a PI4K családot képes gátolni, kezeltük elő a sejteket. A jelzett időpontokban vehikulumot (A-C, szaggatott vonal), 100 nM AngII-t (A, mindhárom folytonos vonal), 1  $\mu$ M TRV3-at (B, mindhárom folytonos vonal) vagy 10  $\mu$ M AngIV-et (C, mindhárom folytonos vonal) adtunk a sejtekhez. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban.

A nagy dózisú Wm hatékonysága a kisebb dózisú Wm előkezeléssel szemben a PI4K-ok szerepét valószínűsíti a PI3K helyett az internalizáció általunk vizsgált korai szakaszában. A PI4K-ok további részletesebb vizsgálatához két, az egyes PI4K izoformákra specifikus gátlószert hívtunk segítségül. A PIK-93 vegyület a Golgiban létrejövő PtdIns4P képződésért felelős PI4KB gátlószere, azonban sokkal kisebb mértékben a PI4KA izoformát is képes gátolni [227]. Az A1 vegyület ezzel szemben sokkal hatékonyabban gátolja a plazmamembrán PtdIns4P szintéziséért felelős PI4KA enzimet, mint a PI4KB-t [231]. A 24. ábrán látható, hogy a PI4KA-t gátló A1 hatására AngII és AngIV stimulust követően, nem jön létre az AT<sub>1</sub>R Rab5 jelzett endoszómákban való megjelenése (24. ábra, A és C). Ettől eltérően a PI4KA gátlása A1 vegyülettel, nem befolyásolta a funkcionálisan szelektív ligand TRV3 hatására elinduló endocitózist (24. ábra, B). A szelektív PI4KB gátlószert PIK93 nem változtatta meg az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 közötti molekuláris interakciót egyetlen vizsgált ligand esetén sem BRET méréseinkben (24. ábra, A-C). Adataink szerint tehát a PI4KA izoforma felelős az endocitózis szabályozásában részt vevő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> készlet fenntartásáért a plazmamembránban, és nem a PI4KB.



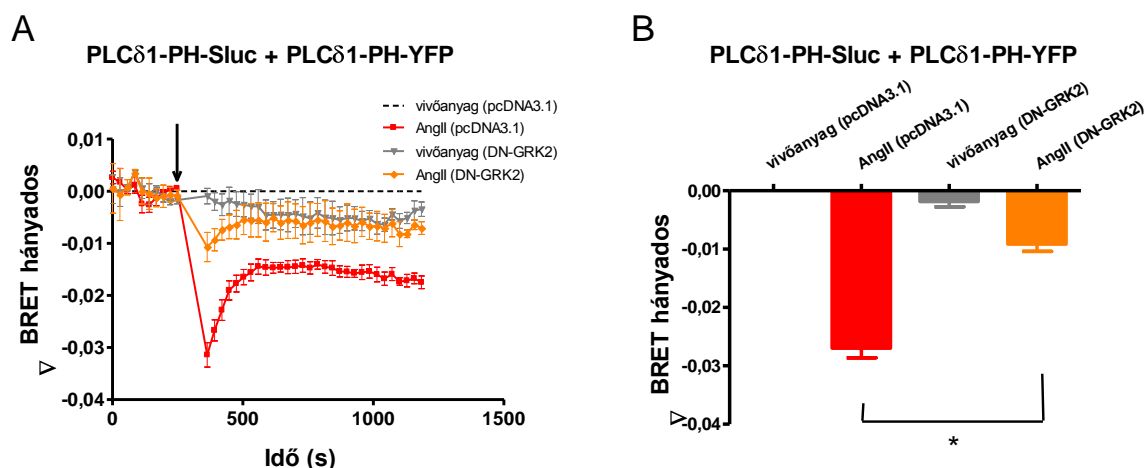
**24. ábra A1 és PIK93 gátlószerek hatása az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 közötti BRET interakcióra.**

(A-C) A különböző agonisták által aktivált AT<sub>1</sub>R korai internalizációját BRET mérésben követtük nyomon HEK 293 sejteken, 24 órával az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 transzfekció után. A mérés előtt a sejteket 10 percig előkezeltük médiummal (A-C, fekete görbe), PIK4A specifikus gátlószerként 10 nM A1-el (A-C, világos zöld görbe) vagy a PIK4B enzimeket specifikusan gátló PIK-93-al, 250 nM-os koncentrációban (A-C, világos barna görbe). A jelzett időpontokban vehikulumot (A-C, szaggatott vonal), 100 nM AngII-t (A, mindhárom folytonos vonal), 1  $\mu$ M TRV3-at (B, mindhárom folytonos vonal) vagy 10  $\mu$ M AngIV-et (C, mindhárom folytonos vonal) adtunk a sejtekhez. Az ábrákon négy független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban.

## 5.6. A plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ depléciójának szerepe az AT<sub>1</sub>R teljes agonista és funkcionálisan szelektív agonista indukált internalizációjában

A PtdIns(4,5) $P_2$  szintézis/reszintézis jelentőségének vizsgálata után következő lépésként, a PtdIns(4,5) $P_2$  bontás szerepét tanulmányoztuk, az AT<sub>1</sub>R Rab5 tartalmú vezikulákban való megjelenésére. Ehhez a G<sub>q</sub>-fehérje aktivációt követő, PLC $\beta$  enzim által létrejövő plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  bontást gátoltuk meg, domináns-negatív G-fehérje kapcsolt receptor kináz 2 (DN-GRK2) konstrukció alkalmazásával, mely a GRK2 enzim funkciójának gátlása mellett képes szignifikánsan csökkenteni a receptor-aktiváció indukálta G<sub>q</sub>-fehérje aktivitást is [247, 248].

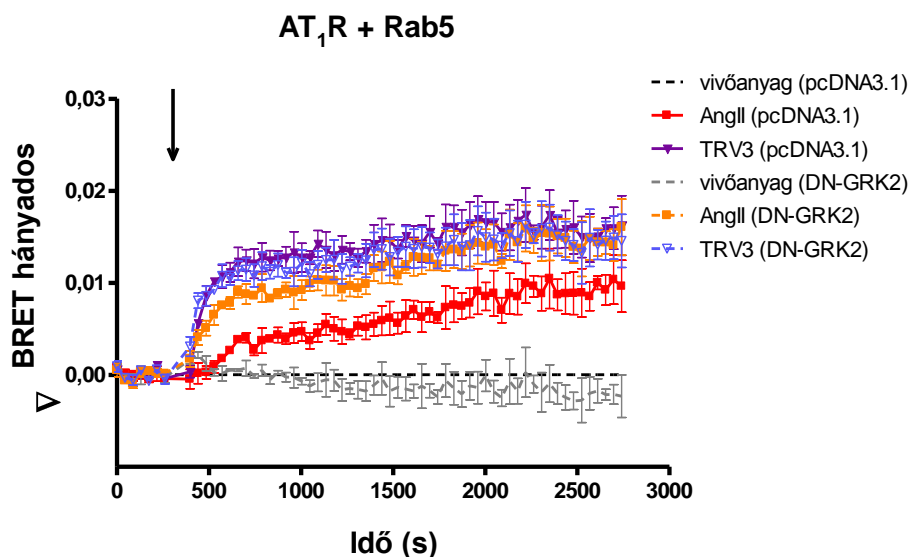
A DN-GRK2 (GRK2-K220M mutáns) G<sub>q</sub>-fehérje- és ezáltal PtdIns(4,5) $P_2$  depléció gátlóképességét a 22. *ábra* B és C panelénél ismertetett módon, a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének PLC $\delta$ 1-PH doménnel történő nyomon követésével ellenőriztük. A két PtdIns(4,5) $P_2$ -t kötő PH domén marker egymástól való eltávolodása, a BRET-jel csökkenése, a PtdIns(4,5) $P_2$  szint csökkenését jelzi a plazmamembránban. A 25. *ábrán* látható, hogy DN-GRK2-t kifejező HEK 293 sejtekben, szignifikánsan csökkent a 100 nM AngII hatására létrejövő PtdIns(4,5) $P_2$  depléció mértéke a kontroll, pcDNA3.1 konstrukcióval transzfektált sejtekhez viszonyítva. A 25. *ábra* B panelén a 6. percben mért BRET hányadosok oszlopos megjelenítése látható. Kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA) és Bonferroni post hoc teszttel vizsgálva szignifikáns különbség adódott a pcDNA3.1 és a DN-GRK2 konstrukciókkal transzfektált sejtek AngII-re adott válaszaik között, valamint az interakcióban is.



## 25. ábra DN-GRK2 hatása az $AT_1R$ AngII által kiváltotta $PtdIns(4,5)P_2$ hidrolízisre

HEK 293 sejteket transzfektáltunk 24 órával a BRET mérés előtt minden kondíció esetén  $AT_1R$ , PLC $\delta$ 1-PH-YFP és PLC $\delta$ 1-PH-Sluc plazmidokkal, továbbá pcDNA3.1 üres vektorral (A panel szürke és sárga görbe, B panel sárga és szürke csíkos oszlopok), vagy GRK2-K220M domináns-negatív GRK2 mutánssal (A panel: fekete és piros görbék, B panel: fekete és piros oszlopok), mely képes a  $G_q$ -fehérje aktivitását gátolni. Az A panelen a BRET mérések görbéi látszanak, melynek során a jelzett időpontban a sejtekhez 100 nM AngII-t (piros és sárga görbék) vagy pedig vivőanyagot (fekete és szürke görbék) adtunk. A B panelen a BRET mérések 6. percében kapott értékek oszlopdiaagram formájában kerültek feltüntetésre. Az eredmények három független kísérlet, triplikátumokban mért eredményeinek átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják. \* $p < 0,05$

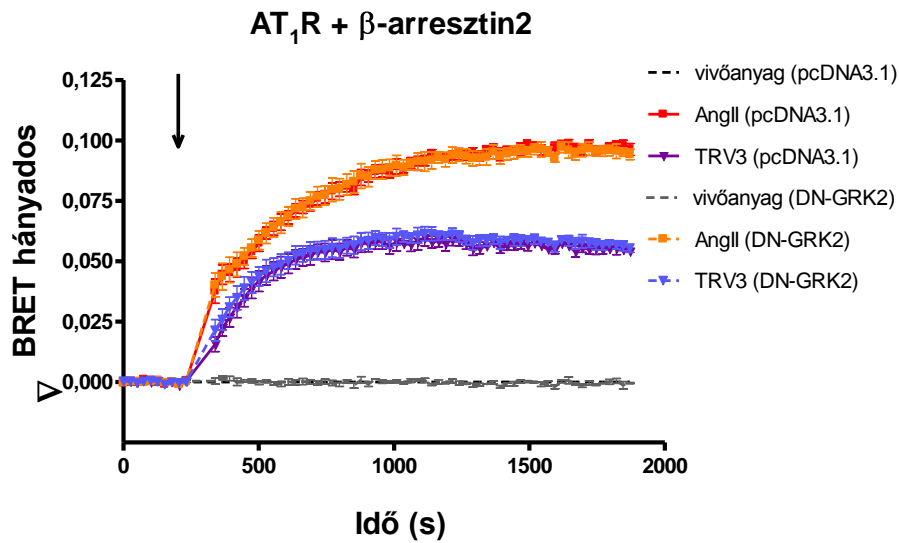
A DN-GRK2 hatékonyságának bizonyítása után megvizsgáltuk a DN-GRK2-vel létrehozott  $PtdIns(4,5)P_2$  depléció gátló hatását az  $AT_1R$ -Rluc és YFP-Rab5 közötti interakció létrejöttére. A DN-GRK2 kifejeztetés hatására az TRV3 ingerléshez hasonló felgyorsult korai internalizációt tapasztaltuk 100 nM AngII ingerlést követően (26. ábra, sárga görbe), összevetve a pcDNA3.1 kontroll vektorral transzfektált sejtek AngII ingerlésével (26. ábra, piros görbe). DN-GRK2 expressziója esetén azonos kinetikájú BRET interakció jött létre az  $AT_1R$  és a Rab5 fehérje között TRV3 hatására (26. ábra, kék szaggatott görbe), mint a kontroll pcDNA3.1-el transzfektált sejtek TRV3 ingerlésekor (26. ábra, lila görbe).



**26. ábra PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hidrolízis gátlásának hatása az AT<sub>1</sub>R és Rab5 közötti interakcióra BRET mérésben**

AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5, valamint pcDNA3.1 (pcDNA3.1 jelzés esetén) vagy DN-GRK2 plazmidokkal (DN-GRK2 jelzés esetén) transzfektáltunk HEK 293 sejteket. 24 óra múlva, BRET mérés során a sejteket vehikulummal (fekete és szürke szaggatott vonal), 100 nM AngII-vel (piros és sárga görbék) vagy 1 μM TRV3-al (lila és kék görbék) kezeltük. A BRET-jel emelkedése az AT<sub>1</sub>R Rab5 tartalmú vezikulákban való megjelenésére utal. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag ± SEM érték formátumban.

Megvizsgáltuk továbbá az általunk alkalmazott DN-GRK2 hatását az AT<sub>1</sub>R β-arresztin2-kötésére is. A DN-GRK2 mutáns kifejeztetése HEK 293 sejtekben, az internalizációra kifejtett hatásától eltérően, nem változtatta meg az AT<sub>1</sub>R β-arresztin2 közötti interakciót sem AngII, sem pedig TRV3 hatására (27. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az AT<sub>1</sub>R és a β-arresztin2 közötti kapcsolódást nem befolyásolja a plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintjének változtatása. Továbbá a GRK2 funkciójának gátlása arra is utalhat, hogy a GRK2 mellett más GRK izoformák is, mint GRK3/5/6, fontos szerepet játszhatnak az AT<sub>1</sub>R foszforilációjában és következményes β-arresztin2-kötésében [192].

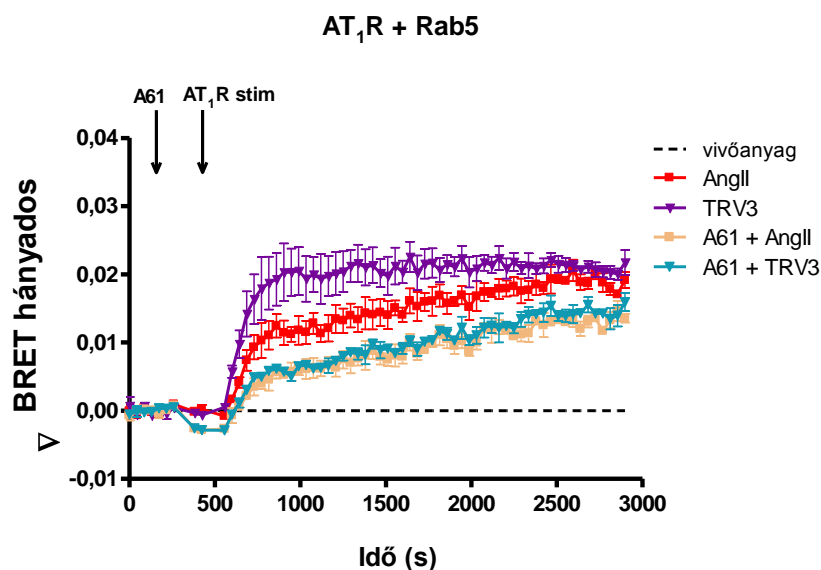


### 27. ábra DN-GRK2 hatása az AT<sub>1</sub>R $\beta$ -arresztin2-kötésére

BRET mérésben HEK 293 sejtekben AT<sub>1</sub>R-Rluc,  $\beta$ -arresztin2-YFP és a jelzéseknek megfelelő esetekben pcDNA3.1-et vagy DN-GRK2-t fejeztünk ki. A tranziens transzfekciót követően 24 órával végeztük el a BRET méréseket. A jelzett időpontban vehikulumot (fekete és szürke szaggatott vonalak), 100 nM AngII-t (piros és sárga görbe) vagy 1  $\mu$ M TRV3-at (lila és kék görbék) adtunk a sejtekhez. A BRET-hányados emelkedése az AT<sub>1</sub>R és  $\beta$ -arresztin2 közötti interakció létrejöttét jelzi, mely nem változott meg DN-GRK2 kifejeztetésekor a pcDNA3.1 transzfektált kontroll esetekhez képest. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban.

Ezt követően annak szeretnénk volna utánajárni, hogy befolyással lehet-e egy másik G<sub>q</sub>-fehérje kapcsolt receptor aktiválódása következtében létrejövő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bontás az AT<sub>1</sub>R internalizációjára. Ehhez a HEK 293 sejteket az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab5 konstrukciók mellett  $\alpha_{1A}$ -adrenerg receptorral ( $\alpha_{1A}$ -AR) is transzfektáltuk, mely szintén képes G<sub>q</sub>-fehérjét aktiválni. A kísérlet során a mérés kezdetét követően 5 perccel 1  $\mu$ M A61603 (A61) agonistával ingereltük az  $\alpha_{1A}$ -AR-t [249], majd további 5 perc elteltével 100 nM AngII-vel vagy 1  $\mu$ M TRV3-al stimuláltuk az AT<sub>1</sub>R-eket. A 28. ábrán látható, hogy az előzetes  $\alpha_{1A}$ -AR aktiváció hatására lassabban jelent meg az AT<sub>1</sub>R a Rab5 tartalmú korai endoszómákban mind AngII, mind pedig TRV3 stimulus esetén.





**28. ábra Az  $\alpha_1$ -AR aktiválódás következtében létrejövő PtdIns(4,5) $P_2$  depléció hatása az AT<sub>1</sub>R internalizációjára**

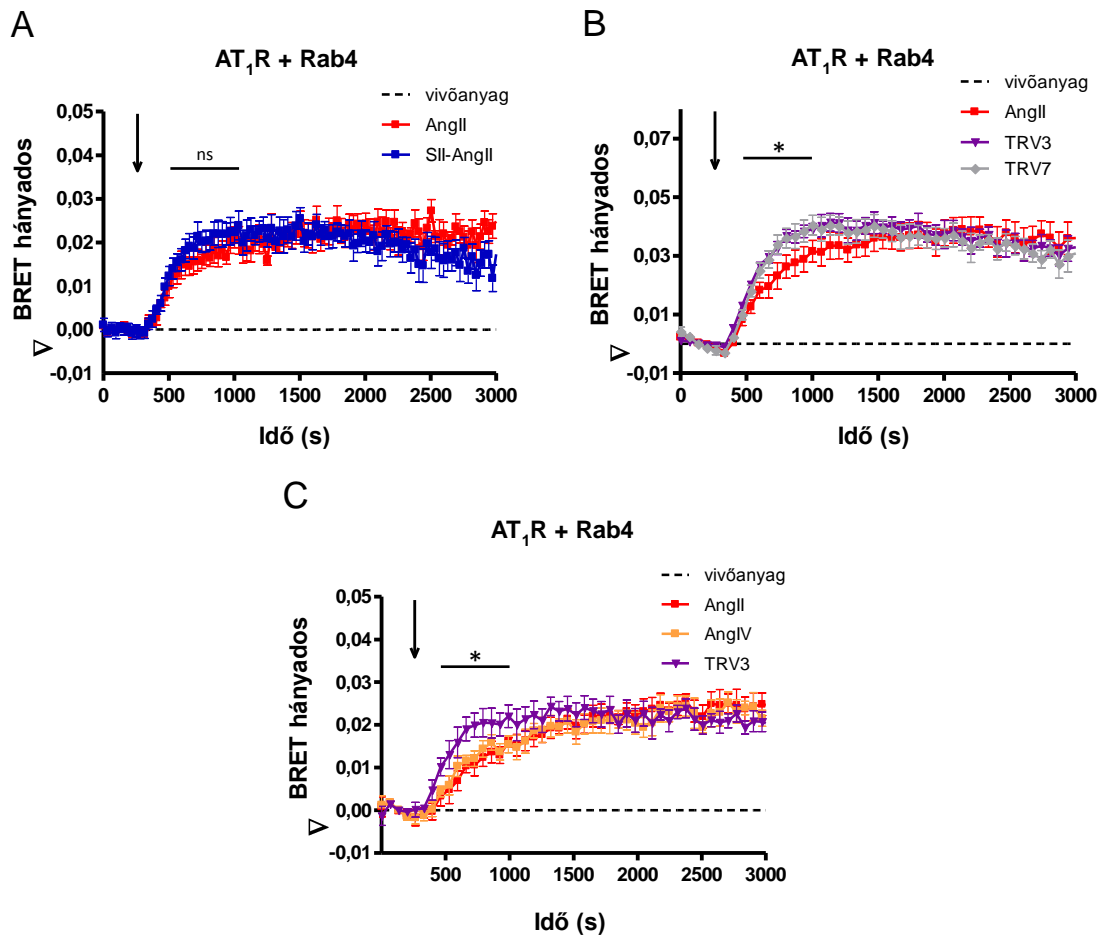
24 órával a BRET mérés kezdete előtt a sejteket AT<sub>1</sub>R-Rluc, YFP-Rab5 és  $\alpha_{1A}$ -AR konstrukciókkal transzfektáltuk. A kísérlet során a jelzett időpontban 1  $\mu$ M A61603 (A61)  $\alpha_{1A}$ -AR agonistát (sárga és zöld görbék), majd pedig az AT<sub>1</sub>R stimulálásához 1  $\mu$ M TRV3-at (lila és zöld görbék), AngII-t (piros és sárga görbék), vagy pedig vivőanyagot adtunk (szaggattott vonal) a sejtekhez. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban.

**5.7. Az AT<sub>1</sub>R sejten belüli további sorsának nyomon követése Rab kis G-fehérjék segítségével**

A továbbiakban az AT<sub>1</sub>R jelátvitel-szelektív aktivációjának hatásait szeretnénk volna megvizsgálni a receptor hosszabb távú sejten belüli eloszlására. A Rab5 jelzett endoszómákban való gyorsult megjelenés ugyanis felvetette a lehetőségét, hogy az AT<sub>1</sub>R jelátvitel-szelektív aktivációja esetleg eltérő késői receptorsorshoz is vezethet.

Azért, hogy ezt a elképzelést megvizsgálhassuk, elemeztük a receptor interakcióját más Rab fehérjékkel is, melyeket az internalizált receptorok endocitotikus/reciklizációs útvonalainak markereiként tartanak számon [216]. Munkacsoportunk korábbi tanulmányában konfokális mikroszkópia segítségével már kimutatta, hogy az AT<sub>1</sub>R internalizációját követően megjelenik nem csak a Rab5 tartalmú korai endoszómákban, de a Rab4 tartalmú korai, majd pedig a Rab11 tartalmú késői reciklizáló endoszómákban is [233].

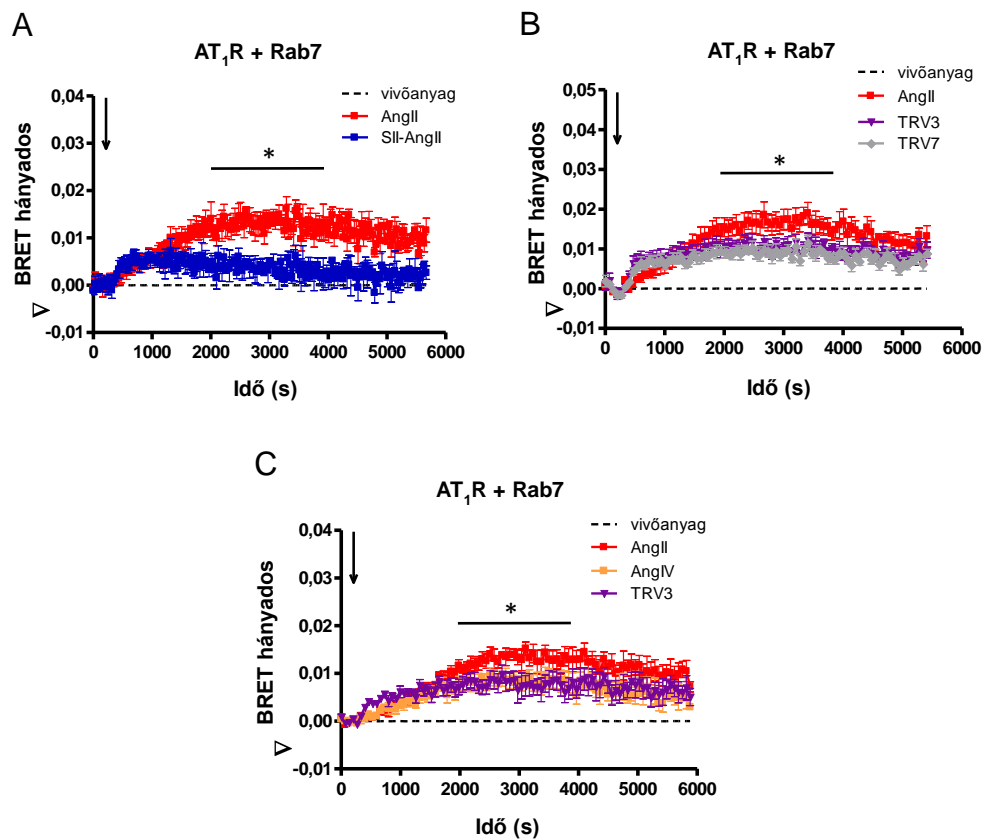
További BRET-es kísérleteinkhez a munkacsoportunk által korábban használt GFP-vel jelzett Rab4, Rab7 és Rab11 konstrukciókban a GFP fehérjét YFP-re cseréltük. Ezt követően elsőként az AT<sub>1</sub>R-Rluc és a YFP-vel jelölt Rab4 közötti interakciót vizsgáltuk meg. A 29. ábrán a BRET-hányados emelkedése látható AngII hozzáadásának hatására, mely jelzi, hogy sikerült BRET módszerrel reprodukálnunk az AT<sub>1</sub>R Rab4 tartalmú endoszómákban való megjelenését. Az AT<sub>1</sub>R G-fehérje-független jelátvitelre szelektív aktivációjakor (SII-AngII, TRV3 és TRV7 ligandok) a Rab5-nél látottakhoz hasonlóan (14. és 15. ábra), Rab4 esetén is gyorsabb internalizációs tendencia figyelhető meg (29. ábra), mely TRV3 és TRV7 esetén szignifikánsnak adódott ( $p > 0,05$  AngII vs. SII-AngII,  $p < 0,05$  AngII vs. TRV3 és AngII vs TRV7, egyszempontos ANOVA analízis és Tukey post hoc teszt a mérés 500. és 1000. másodperce közötti értékek átlagaira). A nem elfogult ligand AngIV alkalmazásakor pedig az AngII-nél tapasztaltaktól szignifikánsan nem eltérő interakció volt detektálható Rab4 vizsgálatokor éppen úgy, mint korábban Rab5 esetén ( $p > 0,05$ , AngII vs AngIV, az előbb ismertett módon számítva).



**29. ábra** Az AT<sub>1</sub>R és Rab4 fehérje közötti interakció nyomon követése agonista ingerlés hatására

AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab4 fehérjéket kifejező HEK 293 sejteket, 24 órával a tranziens transzfekció után a jelzett időpontban: vehikulummal (A-C szaggatott vonal), 100 nM AngII-vel (A-C, piros görbe), 10 μM SII-AngII-vel (A, kék görbe), 1 μM TRV3-al (B-C, lila görbe), 1 μM TRV7-el (B, szürke görbe) vagy 10 μM AngIV-el (C, sárga görbe) ingereltünk. A BRET-hányados emelkedése az AT<sub>1</sub>R Rab4 tartalmú endoszómákban való megjelenésére utal. n=3 Az adatokat átlag ± SEM formátumban ábráztuk. ns= nem szignifikáns, \* p<0,05.

Következő lépésként annak szeretnénk volna utánajárni, hogy tapasztalható-e különbség az AT<sub>1</sub>R Rab7 tartalmú késői endoszómákban, illetve lizoszómákban való megjelenésében is az általunk alkalmazott elfogult, illetve elfogulatlan ligandok hatására. Méréseinkben a BRET-hányados emelkedését, azaz molekuláris közelség létrejöttét detektáltuk az AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab7 között nemcsak AngII hanem a többi vizsgált ligand (SII-AngII, TRV3, TRV7 és AngIV) alkalmazása esetén is (30. ábra, A-C).

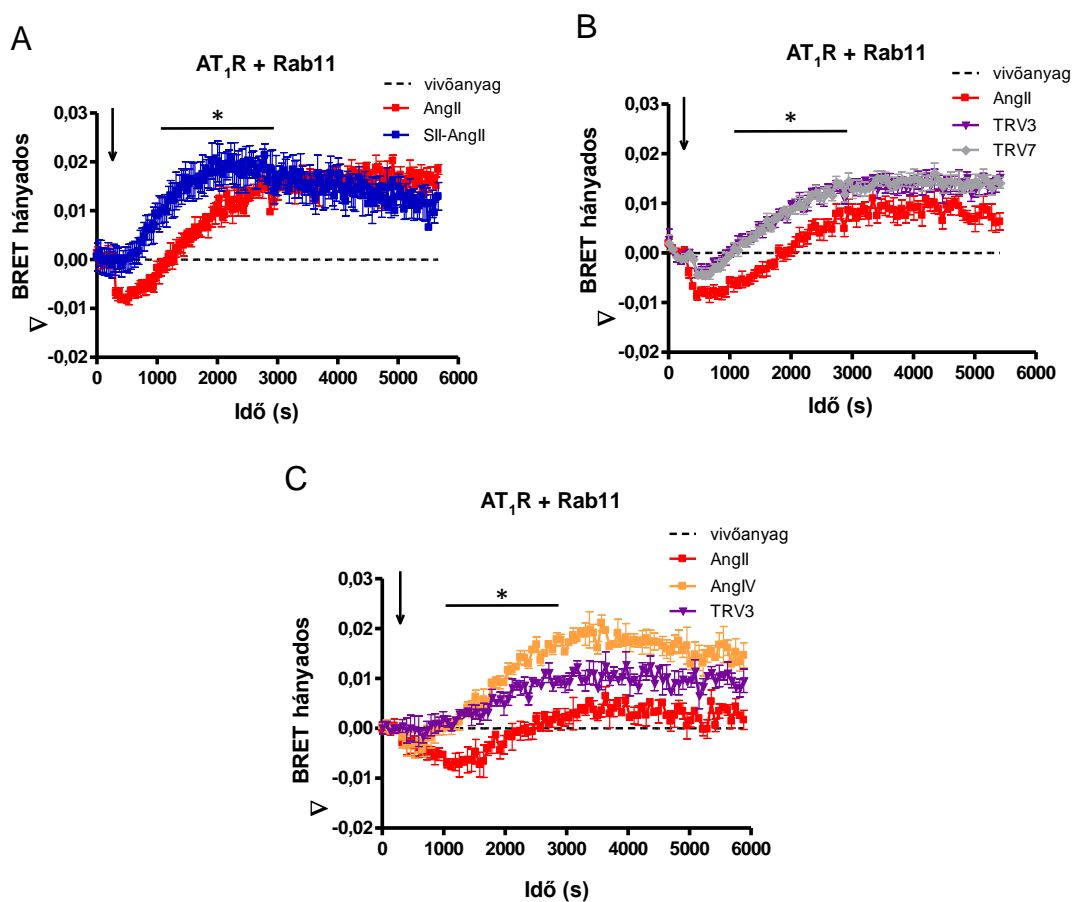


### 30. ábra Az AT<sub>1</sub>R Rab7 tartalmú késői endoszómákban való megjelenése

AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab7 fehérjéket kifejező HEK 293 sejteket 24 órával a tranzienst transzfekció után, a jelzett időpontban ingereltük: vehikulummal (A-C, szaggatott vonal), 100 nM AngII-vel (A-C, piros görbe), 10  $\mu$ M SII-AngII-vel (A, kék görbe), 1  $\mu$ M TRV3-al (B-C, lila görbe), 1  $\mu$ M TRV7-el (B, szürke görbe) vagy 10  $\mu$ M AngIV-el (C, sárga görbe). Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban. \*  $p < 0,05$ .

A Rab5-nél tapasztaltakhoz hasonlóan (14. és 15. ábra), jelátvitel-szelektív aktivációt követően, azaz SII-AngII, TRV3 és TRV7 hatására gyorsabban jelent meg az AT<sub>1</sub>R a Rab7 tartalmú endoszómákban, mint AngII vagy AngIV alkalmazásakor. Továbbá megfigyelhető, hogy az AngII-től eltérően, az összes többi általunk vizsgált ligand esetén (SII-AngII, TRV3, TRV7 és AngIV), az interakció szignifikánsan kisebb mértékűnek bizonyult, mint AngII alkalmazásakor (30. ábra, A-C,  $p < 0,05$  AngII vs SII-AngII, AngII vs TRV3, AngII vs TRV7, AngII vs AngIV, egyszempontos ANOVA analízis és Tukey post hoc teszt a mérés 2000. és 4000. másodperce közötti értékek átlagaira, vagyis az ingerlést követő 28. és 62. perc közötti értékekre).

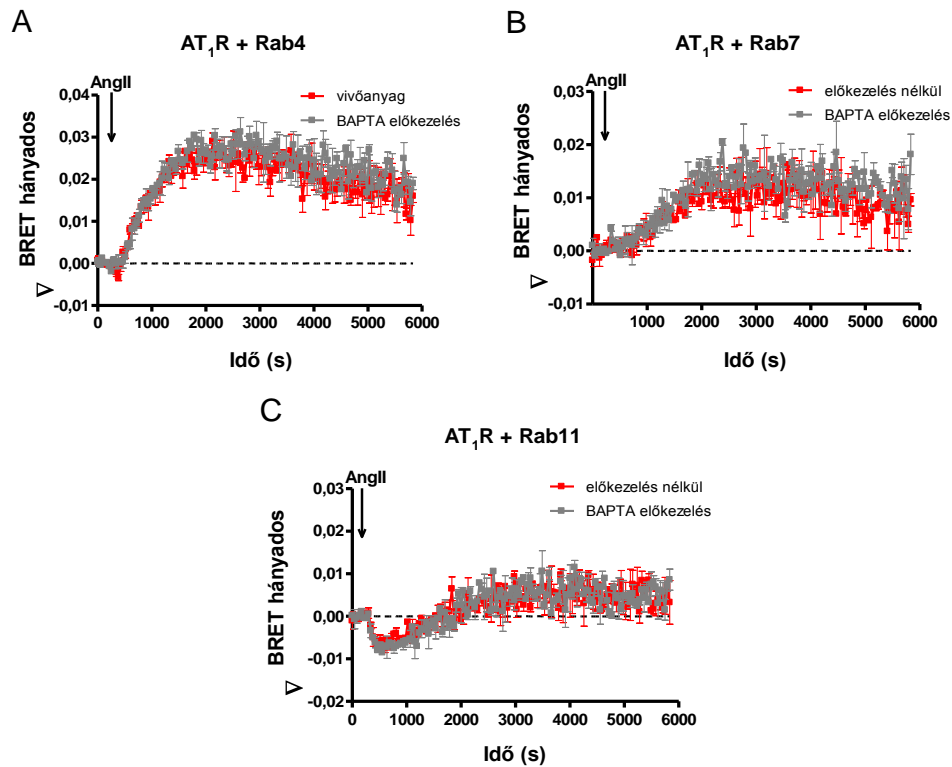
Hasonló kísérleteket végeztünk a *transz*-Golgi hálózat, illetve a késői reciklizáló endoszómák markereként számon tartott Rab11 kis G-fehérjével is. AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab11 transzfektált sejteken végzett méréseinkben 100 nM AngII hozzáadását követően először egy BRET-hányados-csökkenést tapasztaltunk, melyet körülbelül 15 perccel később egy BRET-jel-emelkedés követett (31. ábra, A-C). Az alacsony affinitású ligandok alkalmazása esetén (SII-AngII, TRV3, TRV7 és AngIV), az ingerlést követően elmaradt a BRET-hányados kezdeti csökkenése, fokozatos BRET-jel-emelkedést tapasztaltunk az ingerlést követő első 10 perc elteltével, mely az AngII-nél tapasztaltakhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékűnek adódott (31. ábra, A-C,  $p < 0,05$  AngII vs SII-AngII, AngII vs TRV3, AngII vs TRV7, AngII vs AngIV, egyszempontos ANOVA analízis és Tukey post hoc teszt a mérés 1000. és 3000. másodperce közötti értékek átlagaira, vagyis az ingerlést követő 12. és 45. perc közötti értékekre).



### 31. ábra AT<sub>1</sub>R megjelenése a Rab11 tartalmú endoszómákban

BRET kísérleteinkben AT<sub>1</sub>R-Rluc és YFP-Rab11 konstrukciókkal tranziensen transzfektáltunk HEK 293 sejteket 24 órával a mérés előtt. A jelzett időpontban a sejteket vivőanyaggal (A-C, szaggatott vonal), 100 nM AngII-vel (A-C, piros görbe), 10  $\mu$ M SII-AngII-vel (A, kék görbe), 1  $\mu$ M TRV3-al (B-C, lila görbe), 1  $\mu$ M TRV7-el (B, szürke görbe) vagy 10  $\mu$ M AIV-el (C, sárga görbe) ingereltük. A BRET-hányados-  
változások az AT<sub>1</sub>R és a Rab11 fehérje közötti molekuláris távolság növekedésére, illetve csökkenésére utalnak. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban. \* p<0,05.

Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen szerepet játszik a G-fehérje aktivációt követő Ca<sup>2+</sup> jel, az AT<sub>1</sub>R sejten belüli további sorsának szabályozásában. Méréseinkben a 18. ábránál ismertetett Ca<sup>2+</sup> kelátor, BAPTA-AM előkezelést alkalmaztuk. A 32. ábrán látható, hogy a 30 perces BAPTA-AM előkezelés a Rab5-nél tapasztaltakhoz hasonlóan (18. ábra, A), nem változtatta meg az AT<sub>1</sub>R kapcsolatát sem a Rab4, sem a Rab7, sem pedig a Rab11 fehérjékkel AngII ingerlést követően.



**32. ábra BAPTA-AM előkezeléssel végzett  $\text{Ca}^{2+}$  keláció hatásának vizsgálata az  $\text{AT}_1\text{R}$  Rab4, Rab7 és Rab11 tartalmú vezikulákban való megjelenésére**

HEK 293 sejteket tranziensen transzfektáltunk 24 órával a mérés előtt  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc (A-C) és YFP-Rab4 (A), YFP-Rab7 (B) vagy YFP-Rab11 (C) plazmidokkal. A BRET mérés során vivőanyaggal (A-C, piros görbék) vagy pedig  $10 \mu\text{M}$  BAPTA-AM  $\text{Ca}^{2+}$  kelátorral (A-C, szürke görbék) kezeltük elő a sejteket 30 percig, majd a mérés indítását követően a jelzett időpontban  $100 \text{ nM}$  AngII-vel (A-C, piros és szürke görbék) vagy médiummal (A-C, szaggatott vonal) ingereltük a sejteket. Az ábrán feltüntetett BRET-hányadoskülönbségek értékét mind a BAPTA-AM előkezelt, mind pedig az előkezelést nem kapott minták esetén úgy kaptuk, hogy az AngII stimulált adatokból kivontuk a mérés során csak vivőanyaggal ingerelt sejteken mért értékeket. Az ábrákon három független kísérlet triplikátumokban mért eredményei láthatók átlag  $\pm$  SEM érték formátumban.

## 6. Megbeszélés

Kísérleteinkben a  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív DRY/AAV mutáns  $AT_1R$ -t, valamint ugyancsak  $\beta$ -arresztin-jelátvitel irányában elfogult ligandokat (SI-AngII, SII-AngII, TRV120023, TRV120027) alkalmaztunk. Ezen receptormutáns és elfogult ligandok általi aktiváció esetén G-fehérje irányú aktiváció nem jön létre, azonban G-fehérjétől független mechanizmusok (pl.  $\beta$ -arresztin funkciói) megtartottak [109, 162, 180], mely felveti a lehetőségét, hogy a receptor sorsa eltérő lehet ilyen típusú ingerlés esetén. Az irodalmi adatok tükrében ugyanis kétség sem férhet a  $\beta$ -arresztin jelentőségéhez számos GFKR, köztük az  $AT_1R$ , klatrinmediált endocitózisában [195]. Azonban léteznek  $\beta$ -arresztintől független endocitotikus útvonalak is, akár egyazon receptor esetén is [201, 250]. Az internalizáció jelensége különböző sejtes rendszerekkel és receptorokkal végzett kísérletek alapján a jelátviteltől (pl. G-fehérje-aktiváció) függetlenül is létrejöhet [169, 251], azonban a jelátviteli útvonalak működése moduláló szereppel bírhat a receptor endocitózisában [252].

Kísérleteinkben először a jelátvitel-szelektív aktiváció hatását vizsgáltuk meg az  $AT_1R$  Rab5 fehérje tartalmú korai endoszómákban való megjelenésére. A korábbi konfokális mikroszkópos eredményeknek megfelelően [233, 240], BRET kísérleteinkben is néhány perccel az AngII stimulust követően, megjelent az  $AT_1R$  a korai endoszómális kompartmentekben. A jelátvitel-szelektív aktiváció hatását először a DRY/AAV  $AT_1R$  G-fehérje aktivációra képtelen, azonban internalizációra képes mutáns receptor [162], Rab5 jelzett endoszómákban való megjelenésével elemeztük. Az internalizáció kinetikája a mutáns receptor esetén szignifikánsan gyorsabbnak bizonyult, mint a vad típusú  $AT_1R$  alkalmazásakor. Ezen eredményeket különböző, szintén  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív ligandok hatásaival vetettük össze. Az SI-AngII és az SII-AngII elfogult ligandok esetén is molekuláris közelség alakult ki az  $AT_1R$  és a Rab5 kis G-fehérje között, azonban szintén az AngII által tapasztalhatónál gyorsabb kinetikával. Az SI-AngII és az SII-AngII esetén is már ismert volt az irodalomban, hogy képes a receptor internalizációját kiváltani [169, 173], azonban korábbi kutatások nem vizsgálták a receptor internalizáció kinetikáját az AngII stimulushoz viszonyítva. A felgyorsult korai internalizáció mechanizmusának részletesebb elemzéséhez újabb jelátvitel-szelektív ligandokat, a TRV120023-at (TRV3) és a TRV120027-et (TRV7) is kipróbáltunk. Ezen agonisták is képesek a receptor internalizációjának elindítására



[180], mely kísérleteinkben szintén gyorsabbnak bizonyult, mint az AngII alkalmazása esetén. Ebből arra következtethetünk, hogy a receptor internalizáció ezen korai lépése hamarabb jön létre funkcionálisan szelektív aktiváció során, mint a vad típusú receptor AngII stimulusa esetén.

Ezt követően annak szeretnénk volna utána járni, hogy mi lehet a tapasztalt felgyorsult internalizáció oka. Mivel felmerült a jelenség magyarázataként a jelátvitel-szelektív ligandok AngII-nél alacsonyabb affinitása (*I. táblázat*,  $K_i$ AngII: 1,15 nM;  $K_i$ SI-AngII: 7 nM;  $K_i$ SII-AngII: 213 nM [134];  $K_i$ TRV3: 10 nM;  $K_i$ TRV7: 16 nM [180, 181]), megvizsgáltuk az elfogulatlan, azonban szintén alacsonyabb affinitással rendelkező AngIV által létrehozott internalizációt is (*I. táblázat*,  $K_i$ AngIV: >1000 nM [21]). AngIV hatására azonban az AngII-ével egyező módon kissé lassabb, és nem az elfogult ligandokéra emlékeztető kinetikát kaptunk. A gyorsabb megjelenés tehát feltehetően nem az affinitásbeli különbségekből adódik.

A továbbiakban a funkcionálisan szelektív ligandok által kiváltott endocitózis mechanizmusát térképeztük fel az AngII ingerlésnél tapasztaltak tükrében. Ehhez először is megvizsgáltuk különböző endocitotikus útvonalak szerepét az elfogult, illetve elfogulatlan ligandok internalizációjában. Az  $AT_1R$  alacsonyabb AngII koncentráció (pl. 0,2 nM) elsősorban klatrin mediált endocitózissal kerül a sejt belsejébe, azonban nagyobb koncentrációknál (pl. 30 nM) megfigyelhető  $\beta$ -arresztin-független internalizáció is [250, 253]. Kísérleteinkben azonban mind AngII, mind pedig a jelátvitel-szelektív ligand SII-AngII által létrehozott  $AT_1R$  internalizáció azonos módon reagált az endocitotikus útvonalak gátlására. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy mind jelátvitel-szelektív aktivációt (SII-AngII), mind pedig az elfogulatlan agonista (AngII) simulust követően elsősorban klatrinmediált endocitózissal kerül az  $AT_1R$  a sejt belsejébe.

Mivel az általunk vizsgált jelátvitel-szelektív agonisták nem képesek a G-fehérje-függő jelpályák elindítására,  $G_q$ -aktiváció hiányában  $Ca^{2+}$  jel sem jön létre. A  $Ca^{2+}$  ion számos sejtfunkciót képes befolyásolni, köztük a citoszkeleton átrendeződését és az intracelluláris vezikulák fúzióját is [254, 255]. Megvizsgáltuk ezért a receptoraktivációt követő  $Ca^{2+}$  jel szerepét az  $AT_1R$  Rab5 tartalmú endoszómákban való megjelenésére. Kísérleteinkben a  $Ca^{2+}$  kelátor BAPTA-AM előkezelés nem változtatta meg az AngII internalizációs kinetikáját. Ez arra enged arra következtetni, hogy nem a

$\text{Ca}^{2+}$  jel hiánya felelős az eltérő internalizációért a  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív aktiváció esetén.

Ezt követően felmerült a receptor aktivációt követő igen korai lépés, az  $\text{AT}_1\text{R}$   $\beta$ -arresztin2-kötésének szerepe az eltérő internalizációban elfogult jelátvitel esetén. Az irodalomban ismert, hogy nem csak az AngII, de mind az SI-AngII, mind pedig az SII-AngII hatására a receptorhoz  $\beta$ -arresztin kötődik [134]. Ennek megfelelően emelkedő BRET-hányadost tapasztaltunk mind AngII, mind pedig a két elfogult ligand alkalmazása esetén az  $\text{AT}_1\text{R}$ -Rluc és  $\beta$ -arresztin2-YFP között. Azonban a hányados emelkedése SI-AngII és SII-AngII esetén is kisebb mértékűnek és kevésbé fenntartottnak bizonyult, mint AngII általi ingerléskor. Ez arra utalhat, hogy ezen jelátvitel-szelektív ligandok általi aktiváció esetén a receptorhoz kisebb mértékben kötődik a  $\beta$ -arresztin2 molekula. A  $\beta$ -arresztin2-kötés létrejöttéhez és stabilitásához szükséges a receptor megfelelő konformációban való stabilizálása, illetve a C-terminális régió kitüntetett szerin és treonin aminosavainak foszforilációja [256, 257]. Mind SI-AngII, mind pedig SII-AngII esetén ismert, hogy kisebb affinitással kötődnek az  $\text{AT}_1\text{R}$ -hez [134], valamint, hogy alkalmazásukkor az AngII stimulushoz képest csökkent a receptor összfoszforilációja [169]. Mindkét mechanizmus szerepet játszhat a gyengébb interakció létrejöttében, mivel a kisebb affinitással kötő ligandok eltérő konformációban stabilizálják a receptort, mely megváltozott GRK-kötődést, és így receptor-foszforilációs mintázatot eredményezhet [134, 192]. További lehetséges magyarázatot jelent az a megfigyelés, mely szerint az  $\text{AT}_1\text{R}$  G-fehérje aktivációja fokozza a receptor  $\beta$ -arresztin-kötését, többek között a  $\beta\gamma$ -alegység által szabályozott GRK2/3 általi foszforiláció közvetítésével, így G-fehérje aktiváció hiánya csökkent  $\beta$ -arresztin-kötést eredményezhet [161].

A kérdés megválaszolásához az újabb  $\text{AT}_1\text{R}$  ligandok  $\beta$ -arresztin-kötésének vizsgálatát is elvégeztük. Az SII-AngII-vel megegyezően, TRV3 és TRV7 hatására is sikerült kimutatnunk az  $\text{AT}_1\text{R}$   $\beta$ -arresztin-kötését [180, 181], mely a többi jelátvitel-szelektív ligandnál tapasztaltakhoz hasonlóan, kisebb mértékűnek adódott, mint AngII stimulus esetén. Ezenkívül a DRY/AAY jelátvitel-szelektív mutáns receptor esetén is létrejött a  $\beta$ -arresztin-kötés az általunk alkalmazott BRET rendszerben, a korábban leírtaknak megfelelően [161], mely a funkcionálisan szelektív ligandokhoz hasonlóan, csökkentebb mértékűnek adódott. Ezek alapján a G-fehérje aktiváció hiánya, majd pedig

a csökkent  $\beta$ -arresztin-kötés lehetne felelős az eltérő internalizációért. A  $\beta$ -arresztin-kötés meghatározó szerepét a felgyorsult korai internalizációban viszont cáfolja az AngIV általi ingerléssel kapott  $\beta$ -arresztin-kötési eredmények, ugyanis a nem elfogult agonista AngIV a jelátvitel-szelektív ligandokhoz hasonlóan gyengébb erősségű  $\beta$ -arresztin-kötést mutatott. Azonban korábban láthattuk, hogy az AngIV korai internalizációs hatásai az AngII-ével egyeznek meg. Az AngIV-el kapott eredmények inkább a ligandok affinitásának szerepét vetik fel a receptor  $\beta$ -arresztin-kötésének erősségében. Megfigyelhető ugyanis, hogy az általunk vizsgált jelátvitel-szelektív ligandok, valamint a mutáns receptor  $\beta$ -arresztin-kötése korrelál a ligandok AT<sub>1</sub>R, illetve a DRY/AA<sub>Y</sub> AT<sub>1</sub>R AngII affinitásával. A DRY/AA<sub>Y</sub> AT<sub>1</sub>R a vad típusú receptoréhoz nagyon hasonló affinitással rendelkezik az AngII iránt [161], és  $\beta$ -arresztin-kötésének erőssége is a legközelebb áll a vad típusú AT<sub>1</sub>R AngII által kiváltott  $\beta$ -arresztin-kötéséhez. Az SII-AngII a TRV vegyületeknél egy nagyságrenddel kisebb affinitású ligand, és  $\beta$ -arresztin-kötése is elmarad a TRV vegyületeknél tapasztaltaktól. A ligandaffinitás szerepének tisztázásához a  $\beta$ -arresztin-kötés erősségében azonban további kísérletek szükségesek. Feltehetően tehát több mechanizmus (pl. ligandaffinitás, G-fehérje aktiváció) is szerepet játszhat a  $\beta$ -arresztin-kötésének erősségében, azonban a  $\beta$ -arresztin-receptor interakció mértéke nem tehető felelőssé a felgyorsult korai internalizációért.

Bár a jelátvitel-szelektív ligandok kisebb affinitással kötődnek az AT<sub>1</sub>R-hoz, azonban dózis-hatás görbéink alapján az általunk alkalmazott dózisokban már minden vizsgált ligand létrehozza maximális biológiai válaszát. A tapasztalt internalizációs különbség ennek következtében nem a kisebb affinitású ligandok túl alacsony koncentrációinak köszönhető.

Mivel az AngII és AngIV-től eltérően sem a  $\beta$ -arresztin jelátvitel-szelektív ligandok, sem pedig a DRY/AA<sub>Y</sub> AT<sub>1</sub>R nem képes G<sub>q</sub>-fehérjét aktiválni, ezáltal PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> bontást létrehozni [256], szeretnénk volna utánajárni, hogy az eltérő plazmamembrán PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> szint összefüggésbe hozható-e, az általunk vizsgált internalizációs jelenséggel. A sejtorganellum-membránok foszfoinozítidjeiről ismert, hogy számos sejtfunkció szabályozásának kulcsmolekulái, többek között a vezikuláris-transzport-folyamatok regulálásának is [224]. A plazmamembrán foszfoinozítidjei, közülük is elsősorban a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> alapvető szerepe a CME folyamatában széles

körben elfogadott az irodalomban. Mint a bevezetésben említettem, számos endocitózisban szerepet játszó fehérje rendelkezik PtdIns(4,5) $P_2$  kötő doménnel [258]. Korábbi, elsősorban transzferrin-receptoron végzett kutatások igazolták a PtdIns(4,5) $P_2$  szint csökkentésének gátló hatását a klatrinburkos vezikulák kialakulására, valamint a receptormediált endocitózisra [259, 260]. Újabb eredmények pedig kimutatták, hogy a PtdIns(4,5) $P_2$  szint csökkentésének gátló hatása az endocitózisra a GFKR-ek esetén is megfigyelhető [246]. Méréseink során a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének fenntartásában kulcsfontosságú PI4KA enzim gátlása nagy dózisú wortmanninnal (10  $\mu$ M) vagy a specifikus A1 gátlószerrel (10 nM) megakadályozta az AngII, illetve az AngIV hatására létrejövő endocitózist. Ez összhangban áll korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint a plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$ -készletének szintézisében és reszintézisében a PI4KA enzimek kiemelkedő szerepet játszanak [231]. Jelen elképzelésünk szerint a PI4KA gátlás következtében az AngII, illetve az AngIV ingerlésre létrejövő PtdIns(4,5) $P_2$  bontást nem követte teljesen a plazmamembrán PtdIns4P, majd ebből PtdIns(4,5) $P_2$  reszintézise. A PtdIns(4,5) $P_2$  molekula lokális hiánya pedig gátolta a receptor endocitózisát. A G-fehérjét nem aktiváló TRV3 esetén azonban PI4KA enzim gátlásakor nem figyelhető meg változás az endocitózisban. Ebben az esetben ugyanis nem jön létre  $G_q$ -fehérje általi plazmamembrán PtdIns(4,5) $P_2$  depléción, így a PtdIns4P majd PtdIns(4,5) $P_2$  reszintézis sem szükséges az endocitózis biztosításához. Ezt az elképzelést támasztja alá a  $G_q$ -fehérje, DN-GRK2 általi gátlásakor kapott eredményünk is. A  $G_q$ -fehérje és ezáltal a PtdIns(4,5) $P_2$  depléción gátlása ugyanis, felgyorsult korai internalizációhoz vezetett AngII stimulus esetén, melynek kinetikája a funkcionálisan szelektív ligandoknál tapasztaltakhoz hasonló. Az AngII által létrehozott  $\beta$ -arresztin-kötésben azonban nem találtunk eltérést DN-GRK2-vel történő  $G_q$ -fehérje gátlása esetén. Ez összhangban áll a korábbi eredményeinkkel, hogy a  $\beta$ -arresztin-kötés mértéke nem meghatározó a gyorsult korai internalizációban. Hasonló eredményre jutottak Tóth és társai is egy másik korábbi közleményében, ők sem találtak eltérést PtdIns(4,5) $P_2$  depléción indukció esetén az AngII által kiváltott  $\beta$ -arresztin2-kötés mértékében és kinetikájában [246]. Ezek alapján továbbra is feltételezhetjük, hogy a gyorsult korai internalizáció az elmaradó PtdIns(4,5) $P_2$  depléción következtében jön létre G-fehérjét nem aktiváló elfogult ligandok esetén.

Előzetes irodalmi adatok, illetve munkacsoportunk korábbi eredményei továbbá arra is utaltak, hogy egy  $G_q$ -fehérje kapcsolt receptor aktivációja által létrejött  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  bontás gátló hatást fejthet ki egy másik GFKR internalizációjára is [261]. Megvizsgáltuk ezt az elképzelést funkcionálisan szelektív  $AT_1R$  ligand alkalmazásával is,  $\alpha_{1A}$ -AR és  $AT_1R$  egyidejű transzferkciója segítségével. Az előzetes  $\alpha_{1A}$ -AR aktiválás hatására, feltehetően a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  szint csökkenés következtében, gátlás volt megfigyelhető az  $AT_1R$  korai endoszómákban való megjelenésében mind elfogulatlan, mind pedig elfogult  $AT_1R$  ligand későbbi hozzáadását követően. Az internalizáció ilyen módú gátlása következtében megszűnt a korábban látott kinetikai különbség az AngII, illetve a TRV3 ligand hatásai között, feltehetően mivel ebben az esetben nemcsak a TRV3, hanem már az AngII sem tudott  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  depléciót létrehozni.

A megváltozott Rab5 tartalmú korai endoszómában való megjelenés felvetette a lehetőségét, hogy jelátvitel-szelektív ligand általi aktiváció esetén esetleg a vezikuláris transzport folyamatok későbbi lépéseiben is eltérések fordulhatnak elő. Következő kísérleteinkben ezen hipotézisnek jártunk utána. Számos tanulmány vizsgálta már a különböző Rab kis G-fehérjék, köztük a Rab4, Rab5, Rab7 és Rab11 szerepét az  $AT_1R$  sejten belüli vezikuláris-transzport-folyamataiban [217, 233, 240, 262]. Munkánkban kiterjesztettük az eddig ismert adatokat, mivel nem kizárólag a vad típusú  $AT_1R$  és AngII stimulusát vizsgáltuk, hanem jelátvitel-szelektív agonistákat is alkalmaztunk. Korábbi tanulmányok, illetve saját munkák értelmezése során fontos kiemelni, hogy egy adott sejten belüli vezikula nem csak egy, hanem számos Rab izoformát is tartalmazhat, valamint egy vezikulatípusban többféle Rab fehérje is jelen lehet egyszerre. Például léteznek csak Rab5-öt, Rab4-et és Rab5-öt, valamint Rab4-et és Rab11-et egyszerre tartalmazó endoszómák, míg például a Rab7 a késői endoszómákban és a lizoszómákban is egyaránt előfordulhat [218, 263].

Először az  $AT_1R$  Rab4 tartalmú, elsősorban korai reciklizáló vezikulákban való megjelenését elemeztük, melynek során nagyon hasonló kinetikát, és funkcionálisan szelektív ligandok esetén kissé gyorsabb internalizációt tapasztaltunk, hasonlóan mint a Rab5 bioszenzorral végzett méréseinkben. Ez arra utal, hogy jelen kísérleti körülmények között a Rab4 elsősorban Rab4/5 pozitív endoszómákban lokalizálódik. Megvizsgáltuk továbbá az  $AT_1R$  Rab7 fehérjével történő interakciót is, mely fontos szabályozó szerepet játszik a GFKR-ek sejten belüli jelfeldolgozásában, mivel a korai

endoszómákból a késői endoszómákba, illetve a lizoszómális kompartmentekbe vezeti a receptorokat. Úgy tűnik, hogy a funkcionálisan szelektíven indukált receptorok (SII-AngII, TRV3, illetve TRV7 által) nem preferálják olyan mértékben az asszociációt a Rab7 kompartmentekkel, mint az AngII stimuláció esetén. A nem elfogult ligand AngIV ingerlésekor a receptor szintén kevésbé jelent meg a lizoszómális lebontás útvonalán, mint AngII hatására, viszont az AngII-vel egyidőben. A Rab7 tartalmú vezikulákban való megjelenés, ezáltal a degradációra kerülés mértéke, jó korrelációt mutat a ligandok által indukált receptor  $\beta$ -arresztin-kötésének erősségével. Lehetséges magyarázat, hogy az elfogult ligandok, valamint az AngIV által kiváltott gyengébb  $\beta$ -arresztin-receptor interakció hatására, a receptor kevésbé köteleződik el a lizoszómális lebontás irányába. Ezt a feltevést támasztja alá az az irodalmi megfigyelés, hogy az „A osztályba” sorolható GFKR, melyekre gyengébb  $\beta$ -arresztin-kötés és gyorsabb ledisszociáció jellemző, elsősorban a reciklizáció útvonalán jelennek meg. Ezzel ellentétben a  $\beta$ -arresztint stabilan kötő receptorok („B osztály”), gyakrabban kerülnek a lizoszómális lebontás útjára [98]. Az egyik, illetve a másik osztályba sorolható receptorok C-terminális régióinak felcserélésével a receptorok foszforilációjának,  $\beta$ -arresztin-kötésének és internalizációjának jellemzői teljesen felcserélődnek, a receptorok a másik osztályba sorolódnak [264]. Feltételezhetjük tehát, hogy jelátvitel-szelektív aktiváció során az eltérő receptorkonformáció, foszforiláció és  $\beta$ -arresztin-kötés következtében változik meg a receptor eloszlása a Rab7 tartalmú vezikulákban.

Megvizsgáltuk továbbá az AT<sub>1</sub>R Rab11 fehérjével jelzett perinukleráris, illetve késői reciklizáló endoszómákban való eloszlását is. Korábban mind konfokális [233], mind pedig FRET mikroszkóppal kimutatásra került [265], hogy a Rab4 és Rab11 fehérjék együtt koordinálják az AT<sub>1</sub>R reciklizációját; a korai reciklizáció során a receptor elsősorban a Rab4-hez kapcsolódik, míg késői fázisú reciklizáció esetén főként a Rab11-hez. Ez összhangban áll az általunk kapott eredményekkel, melyek szerint az AT<sub>1</sub>R és a Rab11 kapcsolódása a stimulust követő későbbi esemény. Érdekes módon a Rab11-el történő asszociáció nagyon eltér az AngII-nél tapasztaltaktól, mind jelátvitel-szelektív (SII-AngII, TRV3, TRV7), mind pedig AngIV általi stimulus esetén. A kapcsolódás ezen ligandok hatására az ingerlést követően korábban kezdődik és nagyobb mértékű. Megfigyelhető továbbá, hogy AngII ingerlést követően először a BRET-hányados csökkenése következik be, melyet kb. 15 perc elteltével követ a

molekuláris közelség létrejötte. Ismert, hogy a Rab11 molekula fontos szerepet játszik a reciklizáló endocitotikus kompartmentek és a bioszintetikus reciklizáló vezikulák irányításában [266], valamint az exocitózis mechanizmusának regulációjában is [267]. A jelenség magyarázatául szolgálhat, hogy a rendszerünkben nagy mennyiségben kifejezett AT<sub>1</sub>R-ok egy része már nyugalomban is a Rab11 tartalmú vezikulákban található. AngII ingerlés hatására pedig átkerülnek egy másik vezikuláris kompartmentbe, mely csökkenti a BRET-hányados mértékét. Ezen externalizációs jelenség pontos mechanizmusa, azonban még kérdéses.

Mivel a  $\beta$ -arresztin az AT<sub>1</sub>R-hez tartósan kötve marad az endocitózist során [232], lehetséges, hogy nem csak a lizoszómákban való megjelenés, de az AT<sub>1</sub>R késői reciklizációjának mértéke is függ az aktivált receptor  $\beta$ -arresztin iránti affinitásától. Már korábban felmerült az irodalomban, hogy a receptor és  $\beta$ -arresztin közötti interakció stabilitása meghatározó jelentőségű lehet a receptor reciklizáció/reszenzitizáció mértékében, a  $\beta$ -arresztinnel tartósabban kötődő receptor ugyanis sokkal lassabban reciklizálódik [264]. Mindazonáltal a  $\beta$ -arresztin és AT<sub>1</sub>R szétválása önmagában nem elegendő a receptor defoszforilációjának elindításához [268]. A  $\beta$ -arresztin molekula szerepét a Rab11 jelzett késői endoszómákban való reciklizációban megerősíti, hogy a  $\beta$ -arresztin1 és a  $\beta$ -arresztin2 molekula is bazális interakciót mutat a Gaf-1 fehérjével, a Rab11 családdal reagáló fehérjecsoport tagjával, mely a vezikuláris transzport folyamatok egyik állványfehérjéje [269]. A  $\beta$ -arresztin2 molekula AT<sub>1</sub>R stimulust követően is interakcióban marad a Gaf-1 fehérjével [101], ezáltal feltehetően hozzákapcsolja a receptort a Rab11 által mediált, plazmamembrán felé irányuló vezikula transzporthoz. Ez a jelenség is megerősíti a  $\beta$ -arresztin2 molekula, ezáltal a  $\beta$ -arresztin2-kötés erősségének szerepét az AT<sub>1</sub>R reciklizációjában. A megváltozott sejten belüli vándorlás lehetséges okaként megvizsgáltuk a Ca<sup>2+</sup>-jel szerepét, azonban BAPTA-AM előkezelés nem változtatta meg a receptor sejten belüli mozgásának mintázatát.

Végül fontos figyelembe venni, hogy az AT<sub>1</sub>R esetén is képes mind a Rab4, a Rab5, a Rab7 és a Rab11 kis G-fehérje a receptor karboxil-terminális végén lévő kötőhelyhez kötődni, valamint a kötőhelyért egymással versengeni [239]. Ennek fényében nem tudjuk kizárni annak a lehetőségét, hogy az általunk detektált BRET-hányados-változások nem az AT<sub>1</sub>R-ok és Rab fehérjék közötti direkt kapcsolódás

eredményei-e. Lehetséges tehát, hogy a jelátvitel-szelektíven aktivált receptor konformációk közvetlenül képesek befolyásolni a receptor különböző intracelluláris kompartmentekbe történő irányítását, a Rab fehérjék kötésén és regulációján keresztül. Erre utalhat a közelmúltban felismerést jelenség, hogy a GFKR-ek képesek a Rab asszociált regulátor fehérjék működését befolyásolni, melyek befolyással bírnak a Rab fehérjék elhelyezkedésére és működésére [270].

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy munkánkban megvizsgáltuk a jelátvitel-szelektív aktiváció hatását az AT<sub>1</sub>R endocitózisára. Különböző Rab kis G-fehérjék YFP-vel jelölt konstrukcióit, mint a vezikuláris transzport rendszer markereit alkalmazva kimutattuk, hogy az AT<sub>1</sub>R korai, illetve késői sejten belüli sorsa is különbözik  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív aktivációt követően, mely meghatározó jelentőségű lehet a sejt felszíni receptorszám, valamint a receptor válaszkészségének szabályozásában. Ezen eredmények újabb farmakoterápiás lehetőségeket vetnek fel a GFKR-ek finomabb szabályozásában funkcionálisan szelektív ligandok alkalmazásával, melyekről immár feltételezhetjük, hogy nemcsak a receptorról elinduló jelátviteli pályákat képesek egyedi mintázat alapján aktiválni, de a receptor válaszkészségét, sejt felszíni megjelenését is képesek befolyásolni.



## 7. Következtetések

Kísérleteinkben a jelátvitel-szelektív aktiváció hatását vizsgáltuk az AT<sub>1</sub>R endocitózisának korai, illetve későbbi folyamataira BRET-módszerrel élő sejteken. Eredményeink alapján a következő következtetések vonhatók le:

Az AT<sub>1</sub>R korábban jelenik meg a Rab5 tartalmú korai endoszómákban  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre szelektív aktivációt követően, mint AngII stimulus hatására.

A megváltozott korai internalizáció nem különböző endocitotikus útvonalakon keresztül jön létre, valamint sem az eltérő  $\beta$ -arresztin-kötés erősség, sem pedig a Ca<sup>2+</sup> jel hiánya nem játszik szerepet a folyamatban. A G-fehérje aktivációja következtében létrejövő PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bontás, majd pedig reszintézis viszont meghatározó az AngII által kiváltott lassabb internalizációban. Ezáltal feltételezhetjük, hogy a G-fehérje aktiváció és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> depléciónak hiánya tehető felelőssé a gyorsabb korai internalizációért,  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre elfogult ligandok esetén.

Továbbá az AT<sub>1</sub>R Rab4, Rab7, illetve Rab11 tartalmú endoszómákban való megjelenése is eltérő funkcionálisan szelektív aktivációt követően. A receptor korábban jelenik meg ezen fehérjékkel jelzett kompartmentekben elfogult ligand általi aktiváció esetén, mint a nem szelektív AngII vagy pedig AngIV alkalmazásakor. A receptor késői intracelluláris sorsát nem befolyásolja a Ca<sup>2+</sup> jel hiánya, azonban a  $\beta$ -arresztin-kötés erőssége jól korrelál a folyamattal. A gyengébb  $\beta$ -arresztin-kötéssel rendelkező ligandok hatására gyengébb interakció mutatható ki az AT<sub>1</sub>R és a Rab7 fehérje között, mely a késői endoszómák, illetve a lizoszómák markere, viszont fokozottabban jelenik meg az AT<sub>1</sub>R a késői reciklizáló endoszómákban, melyet a Rab11-el létrejövő nagyobb mértékű interakció jelez.

## 8. Összefoglalás

Kísérletes munkám során az irodalomban elsőként vizsgáltuk meg a jelátvitel-szelektív aktiváció hatását egy GFKR endocitózisára. Eredményeink alapján a vad típusú és a DRY/AAY mutáns AT<sub>1</sub>R-ok, valamint az AngII, illetve a jelátvitel-szelektív agonisták által stimulált receptorok sejten belüli kompartmentek közötti eloszlása különböző.  $\beta$ -arresztin-jelátvitelre elfogult ligandok hatására felgyorsul az AT<sub>1</sub>R Rab5 tartalmú korai endoszómákban való megjelenése. Adataink arra utalnak, hogy nem az eltérő internalizációs útvonalak vagy másodlagos hírvivő termékek (pl. Ca<sup>2+</sup> jel), hanem a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bontása és reszintézise felelős az AT<sub>1</sub>R korai endocitózisának eltérő mértékéért és kinetikájáért AngII, illetve jelátvitel-szelektív aktivációt követően. Továbbá az AT<sub>1</sub>R késői vezikuláris transzportja is különböző funkcionálisan szelektív aktiváció esetén, minthogy a receptor kevésbé jelenik meg a lizoszómális lebontást jelző Rab7 tartalmú vezikulákban, viszont kifejezettebb interakciót mutat a késői reciklizációban szerepet játszó Rab11 molekulákkal. Feltehetően az AT<sub>1</sub>R sejten belüli későbbi sorsának legfontosabb meghatározója a stimulált receptorhoz való  $\beta$ -arresztin kötődés módja és erőssége.

A szövetek és sejtek hormon-érzékenységét meghatározó sejtfelszíni receptorsűrűség dinamikusan változó állapot, mely az externalizációs (a receptorokat a sejten belüli kompartmentekből a plazmamembrán felé szállító folyamatok) és internalizációs útvonalak (melyek endocitózissal eltávolítják a receptorokat a plazmamembránból) közötti egyensúly által szabályozott. Nagyon ígéretes, hogy a receptor externalizáció és internalizáció közötti finom egyensúly jelátvitel-szelektív agonistákkal befolyásolható, mely lehetőséget jelenthet a jelátvitel-szelektív ligandok klinikai alkalmazására különböző betegségekben, ahol a sejtek érzékenységének módosítása terápiás célként szerepelhet.

## 9. Summary

We investigated and analysed the effect of biased agonism on the endocytosis of a GPCR in our experimental work. Our results suggest that the wild type and the biased DRY/AAY mutant AT<sub>1</sub>Rs and also the AngII or biased agonist stimulated receptors differ in their sorting between intracellular compartments. An accelerated colocalisation was detected between the Rab5 containing early endosomes and the AT<sub>1</sub>Rs activated by  $\beta$ -arrestin biased agonists. We found that neither fundamentally different internalization routes, nor second messengers like the calcium signal but rather the transient depletion of the plasma membrane PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> pool is responsible for the reduced rate of AngII-induced AT<sub>1</sub>R endocytosis compared with the biased agonist-induced responses. Furthermore, we managed to demonstrate a different late vesicular trafficking of AT<sub>1</sub>R during functional selective activation, such as the biased activated receptor showed a weaker interaction with Rab7 proteins, markers of the late endosomes and lysosomes, as well as a pronounced appearance in the late recycling endosomes, which contain Rab11 protein. We found that the later fate of the AT<sub>1</sub>R within the cells mostly depends on the course of the  $\beta$ -arrestin binding to the stimulated receptor.

The hormonal responsiveness of tissues and cells depends on the number of cell surface receptors which is determined by a dynamic balance between externalization (delivery mechanisms which transport the receptors from the intracellular compartments to the plasma membrane) and internalization pathways (endocytosis mechanisms which remove the receptor from the plasma membrane) of the receptors. It is very promising that the delicate balance between receptor resensitization/externalization and desensitization/internalization can be modified by biased agonists, which raises the possibility of applying biased ligands in diseases where intracellular receptor processing should be changed.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov*, 1: 621-636.
- [2] Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. (1940) The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology*, 98: 283-298.
- [3] Morgan T. (2003) Renin, angiotensin, sodium and organ damage. *Hypertens Res*, 26: 349-354.
- [4] Harris RC, Martinez-Maldonado M. (1995) Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrolyte Metab*, 21: 328-335.
- [5] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10: 321-329.
- [6] Mehta PK, Griendling KK. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C82-97.
- [7] Kim S, Iwao H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*, 52: 11-34.
- [8] Hunyady L, Catt KJ. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20: 953-970.
- [9] de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52: 415-472.
- [10] Akazawa H, Yano M, Yabumoto C, Kudo-Sakamoto Y, Komuro I. (2013) Angiotensin II type 1 and type 2 receptor-induced cell signaling. *Curr Pharm Des*, 19: 2988-2995.
- [11] Savoia C, D'Agostino M, Lauri F, Volpe M. (2011) Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 20: 125-132.
- [12] Fyhrquist F, Saijonmaa O. (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*, 264: 224-236.
- [13] Skott O, Jensen BL. (1993) Cellular and intrarenal control of renin secretion. *Clin Sci (Lond)*, 84: 1-10.
- [14] Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. (1993) Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87: 1816-1828.

- [15] Rogerson FM, Chai SY, Schlawe I, Murray WK, Marley PD, Mendelsohn FA. (1992) Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J Hypertens*, 10: 615-620.
- [16] Carey RM, Siragy HM. (2003) Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 24: 261-271.
- [17] Stowasser M, Gordon RD. (2016) Primary Aldosteronism: Changing Definitions and New Concepts of Physiology and Pathophysiology Both Inside and Outside the Kidney. *Physiol Rev*, 96: 1327-1384.
- [18] Ferrario CM, Chappell MC. (2004) Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2720-2727.
- [19] Galandrin S, Denis C, Boullaran C, Marie J, M'Kadmi C, Pilette C, Dubroca C, Nicaise Y, Seguelas M-H, N'Guyen D, Banères J-L, Pathak A, Sénard J-M, Galés C. (2016) Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertension*, 68: 1365-1374.
- [20] Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. (2004) The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2728-2737.
- [21] Le MT, Vanderheyden PM, Szaszak M, Hunyady L, Vauquelin G. (2002) Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation. *J Biol Chem*, 277: 23107-23110.
- [22] Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. (2006) Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*, 86: 747.
- [23] Bader M, Ganten D. (2008) Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*, 86: 615-621.
- [24] Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. (2006) The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15: 8-13.
- [25] Fredriksson R, Schiöth HB. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*, 67: 1414-1425.
- [26] Bockaert J, Pin JP. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18: 1723-1729.
- [27] Baleanu-Gogonea C, Karnik S. (2006) Model of the whole rat AT1 receptor and the ligand-binding site. *J Mol Model*, 12: 325-337.
- [28] Zhang H, Unal H, Gati C, Han GW, Liu W, Zatssepin NA, James D, Wang D, Nelson G, Weierstall U, Sawaya MR, Xu Q, Messerschmidt M, Williams GJ, Boutet S, Yefanov OM, White TA, Wang C, Ishchenko A, Tirupula KC, Desnoyer R, Coe J, Conrad CE, Fromme P, Stevens RC, Katritch V, Karnik SS, Cherezov V. (2015)

Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell*, 161: 833-844.

[29] Zhang H, Unal H, Desnoyer R, Han GW, Patel N, Katritch V, Karnik SS, Cherezov V, Stevens RC. (2015) Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. *J Biol Chem*, 290: 29127-29139.

[30] Ohyama K, Yamano Y, Sano T, Nakagomi Y, Hamakubo T, Morishima I, Inagami T. (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regul Pept*, 57: 141-147.

[31] Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva AC. (2007) The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. *Physiol Rev*, 87: 565-592.

[32] Hunyady L, Bor M, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ. (1995) A Conserved NPLFY Sequence Contributes to Agonist Binding and Signal Transduction but Is Not an Internalization Signal for the Type 1 Angiotensin II Receptor. *J Biol Chem*, 270: 16602-16609.

[33] Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*, 271: 13266-13272.

[34] Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y, Inagami T. (1998) Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res*, 82: 523-531.

[35] Wei H, Ahn S, Barnes WG, Lefkowitz RJ. (2004) Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem*, 279: 48255-48261.

[36] Qian HW, Pipolo L, Thomas WG. (2001) Association of beta-arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus correlates with receptor internalization. *Mol Endocrinol*, 15: 1706-1719.

[37] Balakumar P, Jagadeesh G. (2014) Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. *J Mol Endocrinol*, 53: R71-92.

[38] Feng YH, Noda K, Saad Y, Liu XP, Husain A, Karnik SS. (1995) The docking of Arg2 of angiotensin II with Asp281 of AT1 receptor is essential for full agonism. *J Biol Chem*, 270: 12846-12850.

[39] Noda K, Saad Y, Karnik SS. (1995) Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. *J Biol Chem*, 270: 28511-28514.

- [40] Perodin J, Deraet M, Auger-Messier M, Boucard AA, Rihakova L, Beaulieu ME, Lavigne P, Parent JL, Guillemette G, Leduc R, Escher E. (2002) Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor. *Biochemistry*, 41: 14348-14356.
- [41] Boucard AA, Wilkes BC, Laporte SA, Escher E, Guillemette G, Leduc R. (2000) Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry*, 39: 9662-9670.
- [42] Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y, Takezako T. (2003) Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 431-437.
- [43] Fillion D, Cabana J, Guillemette G, Leduc R, Lavigne P, Escher E. (2013) Structure of the human angiotensin II type 1 (AT1) receptor bound to angiotensin II from multiple chemoselective photoprobe contacts reveals a unique peptide binding mode. *J Biol Chem*, 288: 8187-8197.
- [44] Touyz RM, Schiffrin EL. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 52: 639-672.
- [45] Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*, 6: 499-506.
- [46] Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. (1999) Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*, 103: 945-952.
- [47] Xia Y, Kellems RE. (2013) Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. *Circ Res*, 113: 78-87.
- [48] Ward RJ, Xu T-R, Milligan G. Chapter Four - GPCR Oligomerization and Receptor Trafficking, in: P.M. Conn (Ed.) *Methods Enzymol*, Academic Press, 2013: 69-90.
- [49] Rozenfeld R, Devi LA. (2011) Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. *Biochem J*, 433: 11-18.
- [50] Rondeau JJ, McNicoll N, Escher E, Meloche S, Ong H, De Léan A. (1990) Hydrodynamic properties of the angiotensin II receptor from bovine adrenal zona glomerulosa. *Biochem J*, 268: 443.
- [51] Szalai B, Barkai L, Turu G, Szidonya L, Várnai P, Hunyady L. (2012) Allosteric interactions within the AT1 angiotensin receptor homodimer: Role of the conserved DRY motif. *Biochem Pharmacol*, 84: 477-485.

- [52] AbdAlla S, Lothar H, Langer A, el Faramawy Y, Quitterer U. (2004) Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, 119: 343-354.
- [53] Lyngso C, Erikstrup N, Hansen JL. (2009) Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk? *Mol Cell Endocrinol*, 302: 203-212.
- [54] AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. (2001) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 276: 39721-39726.
- [55] Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA. (2003) Dual Inhibition of  $\beta$ -Adrenergic and Angiotensin II Receptors by a Single Antagonist. *Circulation*, 108: 1611.
- [56] AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, 407: 94-98.
- [57] Hansen JL, Theilade J, Haunso S, Sheikh SP. (2004) Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation. *J Biol Chem*, 279: 24108-24115.
- [58] Heuss C, Gerber U. (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*, 23: 469-475.
- [59] Oldham WM, Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 60-71.
- [60] Downes GB, Gautam N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics*, 62: 544-552.
- [61] Griendling KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone MA, Jr., Alexander RW. (1986) Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 261: 5901-5906.
- [62] Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P, Ball SG. (1997) Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br J Pharmacol*, 122: 1469-1477.
- [63] Oriji GK, Keiser HR. (1997) Protein kinase C mediates angiotensin II-induced contractions and the release of endothelin and prostacyclin in rat aortic rings. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57: 135-141.
- [64] Leserer M, Gschwind A, Ullrich A. (2000) Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life*, 49: 405-409.
- [65] Yoshida Y, Imai S. (1997) Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn J Pharmacol*, 74: 125-137.



- [66] Dostal DE, Murahashi T, Peach MJ. (1990) Regulation of cytosolic calcium by angiotensins in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 15: 815-822.
- [67] Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*, 29: 366-373.
- [68] Bonventre JV. (1992) Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol*, 3: 128-150.
- [69] Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Dhobale S, Frank GD, Motley ED, Eguchi S. (2006) Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 48: 534-540.
- [70] Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. (2007) Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*, 112: 417-428.
- [71] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22: 153-183.
- [72] Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. (2008) G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*, 14: 64-68.
- [73] Macrez N, Morel JL, Kalkbrenner F, Viard P, Schultz G, Mironneau J. (1997) A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat portal vein myocytes. *J Biol Chem*, 272: 23180-23185.
- [74] Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. (1999) Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 55: 142-149.
- [75] Maturana AD, Casal AJ, Demarex N, Vallotton MB, Capponi AM, Rossier MF. (1999) Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem*, 274: 19943-19948.
- [76] Spat A, Hunyady L. (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev*, 84: 489-539.
- [77] Balakumar P, Jagadeesh G. (2014) A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular pathophysiology. *Cell Signal*, 26: 2147-2160.
- [78] Yin G, Yan C, Berk BC. (2003) Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 35: 780-783.

- [79] Touyz RM, Berry C. (2002) Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*, 35: 1001-1015.
- [80] Berk BC, Corson MA. (1997) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res*, 80: 607-616.
- [81] Suzuki H, Eguchi S. (2006) Growth factor receptor transactivation in mediating end organ damage by angiotensin II. *Hypertension*, 47: 339-340.
- [82] Saito Y, Berk BC. (2001) Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 3-7.
- [83] Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 273: 8890-8896.
- [84] Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y. (1999) Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 33: 201-206.
- [85] Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC. (2000) Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem*, 275: 15926-15932.
- [86] Wang G, Anrather J, Glass MJ, Tarsitano MJ, Zhou P, Frys KA, Pickel VM, Iadecola C. (2006) Nox2, Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C play a role in angiotensin II-induced free radical production in nucleus tractus solitarius. *Hypertension*, 48: 482-489.
- [87] Garrido AM, Griendling KK. (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 302: 148-158.
- [88] Block K, Eid A, Griendling KK, Lee DY, Wittrant Y, Gorin Y. (2008) Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem*, 283: 24061-24076.
- [89] Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A. (2007) Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol*, 22: 311-315.
- [90] Touyz RM. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*, 37: 1263-1273.
- [91] Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1992)  $\beta$ -arrestin2, a novel member of the arrestin/ $\beta$ -arrestin gene family. *J Biol Chem*, 267: 17882-17890.

- [92] Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248: 1547.
- [93] Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL. (1993) Polypeptide variants of  $\beta$ -arrestin and arrestin3. *J Biol Chem*, 268: 15640-15648.
- [94] Luttrell LM, Gesty-Palmer D. (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev*, 62: 305-330.
- [95] Ferguson SSG. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53: 1-24.
- [96] Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. (2006) New Roles for  $\beta$ -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Mol Cell*, 24: 643-652.
- [97] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69: 483-510.
- [98] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, 275: 17201-17210.
- [99] Kohout TA, Lin FT, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ. (2001) beta-arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 1601-1606.
- [100] Ahn S, Wei H, Garrison TR, Lefkowitz RJ. (2004) Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem*, 279: 7807-7811.
- [101] Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, 3rd, Lefkowitz RJ. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 12011-12016.
- [102] Kendall RT, Strungs EG, Rachidi SM, Lee MH, El-Shewy HM, Luttrell DK, Janech MG, Luttrell LM. (2011) The beta-arrestin pathway-selective type 1A angiotensin receptor (AT1A) agonist [Sar1,Ile4,Ile8]angiotensin II regulates a robust G protein-independent signaling network. *J Biol Chem*, 286: 19880-19891.
- [103] Rajagopal K, Whalen EJ, Violin JD, Stiber JA, Rosenberg PB, Premont RT, Coffman TM, Rockman HA, Lefkowitz RJ. (2006)  $\beta$ -arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A in receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 16284-16289.
- [104] Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren XR, Milligan G, Lefkowitz RJ. (2005) beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem*, 280: 8041-8050.

- [105] Ahn S, Kim J, Hara MR, Ren XR, Lefkowitz RJ. (2009)  $\beta$ -Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J Biol Chem*, 284: 8855-8865.
- [106] DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ. (2008) Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem*, 283: 10611-10620.
- [107] Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 2449-2454.
- [108] McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, Lefkowitz RJ. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, 290: 1574-1577.
- [109] Wei HJ, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10782-10787.
- [110] Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ. (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem*, 279: 35518-35525.
- [111] Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem*, 277: 9429-9436.
- [112] Kendall RT, Lee MH, Pleasant DL, Robinson K, Kuppuswamy D, McDermott PJ, Luttrell LM. (2014) Arrestin-dependent angiotensin AT1 receptor signaling regulates Akt and mTor-mediated protein synthesis. *J Biol Chem*, 289: 26155-26166.
- [113] Christensen GL, Knudsen S, Schneider M, Aplin M, Gammeltoft S, Sheikh SP, Hansen JL. (2011) AT(1) receptor Galphaq protein-independent signalling transcriptionally activates only a few genes directly, but robustly potentiates gene regulation from the beta2-adrenergic receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 331: 49-56.
- [114] Lee M-H, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM. (2008) Role of  $\beta$ -Arrestin-mediated Desensitization and Signaling in the Control of Angiotensin AT1a Receptor-stimulated Transcription. *J Biol Chem*, 283: 2088-2097.
- [115] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem*, 278: 14498-14506.
- [116] Qian HW, Pipolo L, Thomas WG. (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT(1A)) receptor. *Biochem J*, 343: 637-644.

- [117] Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SGF, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, von Zastrow M. (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, 495: 534-538.
- [118] Pflieger KDG, Dromey JR, Dalrymple MB, Lim EML, Thomas WG, Eidne KA. (2006) Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein–protein interactions in live cells. *Cell Signal*, 18: 1664-1670.
- [119] De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 255: 7108-7117.
- [120] Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, 268: 4625-4636.
- [121] Miura S, Saku K, Karnik SS. (2003) Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res*, 26: 937-943.
- [122] Bouvier M. (2013) Unraveling the structural basis of GPCR activation and inactivation. *Nat Struct Mol Biol*, 20: 539-541.
- [123] Kobilka BK. (2007) G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim Biophys Acta*, 1768: 794-807.
- [124] Unal H, Karnik SS. (2014) Constitutive activity in the angiotensin II type 1 receptor: discovery and applications. *Adv Pharmacol*, 70: 155-174.
- [125] Kenakin T. (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J*, 15: 598-611.
- [126] Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K, Filipek S. (2012) G protein-coupled receptors--recent advances. *Acta Biochim Pol*, 59: 515-529.
- [127] Kenakin T. (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*, 72: 1393-1401.
- [128] Flordellis CS. (2012) Editorial: From structural plasticity to functional diversity of 7TMRs: biased agonism and beyond. *Curr Pharm Des*, 18: 119-120.
- [129] Swaminath G, Xiang Y, Lee TW, Steenhuis J, Parnot C, Kobilka BK. (2004) Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem*, 279: 686-691.
- [130] Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL. (2001) The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem*, 276: 34853-34861.

- [131] Kooistra AJ, Roumen L, Leurs R, de Esch IJ, de Graaf C. (2013) From heptahelical bundle to hits from the Haystack: structure-based virtual screening for GPCR ligands. *Methods Enzymol*, 522: 279-336.
- [132] Charest PG, Terrillon S, Bouvier M. (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep*, 6: 334-340.
- [133] Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2008) Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9988-9993.
- [134] Zimmerman B, Beautrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, Bouvier M, Laporte SA. (2012) Differential  $\beta$ -Arrestin-Dependent Conformational Signaling and Cellular Responses Revealed by Angiotensin Analogs. *Science Signaling*, 5: ra33.
- [135] Rakesh K, Yoo B, Kim IM, Salazar N, Kim KS, Rockman HA. (2010) beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal*, 3: ra46.
- [136] Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, Tobin AB. (2011) Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem*, 286: 11506-11518.
- [137] Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ. (2011) Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal*, 4: ra51.
- [138] Godin CM, Ferguson SS. (2012) Biased agonism of the angiotensin II type 1 receptor. *Mini Rev Med Chem*, 12: 812-816.
- [139] Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ. Molecular Mechanism of beta-Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors, in: P.A. Insel, S.G. Amara, T.F. Blaschke (Eds.) *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 52, 2012: 179-197.
- [140] Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM. (2016) Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 26: 241-250.
- [141] Kopecky SL. (2006) Effect of Beta Blockers, Particularly Carvedilol, on Reducing the Risk of Events After Acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Cardiology*, 98: 1115-1119.
- [142] Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JGF, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A. (2003) Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): Randomised controlled trial. *Lancet*, 362: 7-13.

- [143] Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2007) A unique mechanism of  $\beta$ -blocker action: Carvedilol stimulates  $\beta$ -arrestin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 16657-16662.
- [144] Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, Rockman HA. (2008) Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 14555-14560.
- [145] Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*, 93: 896-906.
- [146] Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, Rockman HA. (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest*, 117: 2445-2458.
- [147] Raehal KM, Walker JKL, Bohn LM. (2005) Morphine Side Effects in  $\beta$ -Arrestin 2 Knockout Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 314: 1195.
- [148] DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen XT, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblish M, Lark MW, Violin JD. (2013) A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 344: 708-717.
- [149] Soergel DG, Ann Subach R, Sadler B, Connell J, Marion AS, Cowan CL, Violin JD, Lark MW. (2014) First clinical experience with TRV130: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 54: 351-357.
- [150] Viscusi ER, Webster L, Kuss M, Daniels S, Bolognese JA, Zuckerman S, Soergel DG, Subach RA, Cook E, Skobieranda F. (2016) A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the mu-opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain. *Pain*, 157: 264-272.
- [151] Eglén RM, Bosse R, Reisine T. (2007) Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 5: 425-451.
- [152] Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 373-386.
- [153] Kenakin T, Christopoulos A. (2013) Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 483-483.
- [154] Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, DeWire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ. (2011) Quantifying Ligand Bias at Seven-Transmembrane Receptors. *Mol Pharmacol*, 80: 367.

- [155] Griffin MT, Figueroa KW, Liller S, Ehlert FJ. (2007) Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o, Gs, and G15. *J Pharmacol Exp Ther*, 321: 1193-1207.
- [156] Luttrell LM, Maudsley S, Bohn LM. (2015) Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol*, 88: 579-588.
- [157] Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, Heveker N. (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 331: 297-307.
- [158] Rajagopal S, Bassoni DL, Campbell JJ, Gerard NP, Gerard C, Wehrman TS. (2013) Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *J Biol Chem*, 288: 35039-35048.
- [159] Thompson GL, Lane JR, Coudrat T, Sexton PM, Christopoulos A, Canals M. (2015) Biased Agonism of Endogenous Opioid Peptides at the mu-Opioid Receptor. *Mol Pharmacol*, 88: 335-346.
- [160] Lee C, Hwang SA, Jang SH, Chung HS, Bhat MB, Karnik SS. (2007) Manifold active-state conformations in GPCRs: agonist-activated constitutively active mutant AT1 receptor preferentially couples to Gq compared to the wild-type AT1 receptor. *FEBS Lett*, 581: 2517-2522.
- [161] Bonde MM, Hansen JT, Sanni SJ, Haunso S, Gammeltoft S, Lyngso C, Hansen JL. (2010) Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms. *PLoS One*, 5: e14135.
- [162] Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spat A, Catt KJ, Hunyady L. (2003) The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT(1) angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology*, 144: 2220-2228.
- [163] Hansen JL, Aplin M, Hansen JT, Christensen GL, Bonde MM, Schneider M, Haunso S, Schiffer HH, Burstein ES, Weiner DM, Sheikh SP. (2008) The human angiotensin AT(1) receptor supports G protein-independent extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and cellular proliferation. *Eur J Pharmacol*, 590: 255-263.
- [164] Szidonya L, Süpeki K, Karip E, Turu G, Várnai P, Clark AJL, Hunyady L. (2007) AT1 receptor blocker-insensitive mutant AT1A angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells. *Biochem Pharmacol*, 73: 1582-1592.
- [165] Rovati GE, Capra V, Neubig RR. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, 71: 959-964.
- [166] Hines J, Fluharty SJ, Yee DK. (2003) Structural determinants for the activation mechanism of the angiotensin II type 1 receptor differ for phosphoinositide hydrolysis and mitogen-activated protein kinase pathways. *Biochem Pharmacol*, 66: 251-262.



- [167] Cabana J, Holleran B, Leduc R, Escher E, Guillemette G, Lavigne P. (2015) Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the beta-Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. *J Biol Chem*, 290: 15835-15854.
- [168] Haendeler J, Ishida M, Hunyady L, Berk BC. (2000) The Third Cytoplasmic Loop of the Angiotensin II Type 1 Receptor Exerts Differential Effects on Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK1/ERK2) and Apoptosis via Ras- and Rap1-Dependent Pathways. *Circ Res*, 86: 729.
- [169] Holloway AC, Qian H, Pipolo L, Ziogas J, Miura S, Karnik S, Southwell BR, Lew MJ, Thomas WG. (2002) Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol Pharmacol*, 61: 768-777.
- [170] Valero TR, Sturchler E, Jafferjee M, Rengo G, Magafa V, Cordopatis P, McDonald P, Koch WJ, Lymperopoulos A. (2016) Structure-activity relationship study of angiotensin II analogs in terms of  $\beta$ -arrestin-dependent signaling to aldosterone production. *Pharmacol Res Perspect*, 4: e00226.
- [171] Miura S, Feng YH, Husain A, Karnik SS. (1999) Role of aromaticity of agonist switches of angiotensin II in the activation of the AT1 receptor. *J Biol Chem*, 274: 7103-7110.
- [172] Aumelas A, Sakarellos C, Lintner K, Femandjian S, Khosla MC, Smeby RR, Bumpus FM. (1985) Studies on angiotensin II and analogs: impact of substitution in position 8 on conformation and activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 1881-1885.
- [173] Conchon S, Monnot C, Teutsch B, Corvol P, Clauser E. (1994) Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements. *FEBS Lett*, 349: 365-370.
- [174] Aplin M, Christensen GL, Schneider M, Heydorn A, Gammeltoft S, Kjolbye AL, Sheikh SP, Hansen JL. (2007) Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 100: 296-301.
- [175] Miura S, Zhang J, Matsuo Y, Saku K, Karnik SS. (2004) Activation of extracellular signal-activated kinase by angiotensin II-induced Gq-independent epidermal growth factor receptor transactivation. *Hypertens Res*, 27: 765-770.
- [176] Lymperopoulos A, Rengo G, Zincarelli C, Kim J, Soltys S, Koch WJ. (2009) An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5825-5830.
- [177] Santos G, Duarte D, Parreiras-e-Silva L, Teixeira F, Silva-Rocha R, Oliveira E, Bouvier M, Costa-Neto C. (2015) Comparative analyses of downstream signal transduction targets modulated after activation of the AT1 receptor by two  $\beta$ -arrestin-biased agonists. *Front Pharmacol*, 6: 131.

[178] Aplin M, Christensen GL, Hansen JL. (2008) Pharmacologic perspectives of functional selectivity by the angiotensin II type 1 receptor. *Trends Cardiovasc Med*, 18: 305-312.

[179] Tilley DG. (2011) Functional relevance of biased signaling at the angiotensin II type 1 receptor. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 11: 99-111.

[180] Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. (2010) Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 572-579.

[181] Kim KS, Abraham D, Williams B, Violin JD, Mao L, Rockman HA. (2012) beta-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303: H1001-1010.

[182] Tarigopula M, Davis RT, 3rd, Mungai PT, Ryba DM, Wieczorek DF, Cowan CL, Violin JD, Wolska BM, Solaro RJ. (2015) Cardiac myosin light chain phosphorylation and inotropic effects of a biased ligand, TRV120023, in a dilated cardiomyopathy model. *Cardiovasc Res*, 107: 226-234.

[183] Monasky MM, Taglieri DM, Henze M, Warren CM, Utter MS, Soergel DG, Violin JD, Solaro RJ. (2013) The beta-arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305: H856-866.

[184] Boerrigter G, Lark MW, Whalen EJ, Soergel DG, Violin JD, Burnett JC, Jr. (2011) Cardiorenal actions of TRV120027, a novel ss-arrestin-biased ligand at the angiotensin II type I receptor, in healthy and heart failure canines: a novel therapeutic strategy for acute heart failure. *Circ Heart Fail*, 4: 770-778.

[185] Soergel DG, Subach RA, Cowan CL, Violin JD, Lark MW. (2013) First clinical experience with TRV027: pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 53: 892-899.

[186] Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 308-316.

[187] Soergel D, Subach RA, James IE, Cowan CL, Gowen M, Lark M. (2013) TRV027, a beta-arrestin biased ligand at the angiotensin 2 type 1 receptor, produces rapid, reversible changes in hemodynamics in patients with stable systolic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 61: E683.

[188] Felker GM, Butler J, Collins SP, Cotter G, Davison BA, Ezekowitz JA, Filippatos G, Levy PD, Metra M, Ponikowski P, Soergel DG, Teerlink JR, Violin JD, Voors AA, Pang PS. (2015) Heart failure therapeutics on the basis of a biased ligand of the angiotensin-2 type 1 receptor. Rationale and design of the BLAST-AHF study (Biased Ligand of the Angiotensin Receptor Study in Acute Heart Failure). *JACC Heart Fail*, 3: 193-201.

- [189] Kelly E, Bailey CP, Henderson G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol*, 153: S379-S388.
- [190] Clark RB, Kunkel MW, Friedman J, Goka TJ, Johnson JA. (1988) Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 1442-1446.
- [191] Premont RT, Gainetdinov RR. (2007) Physiological Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69: 511-534.
- [192] Kim J, Ahn S, Ren X-R, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ. (2005) Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for  $\beta$ -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 1442-1447.
- [193] Shiina T, Arai K, Tanabe S, Yoshida N, Haga T, Nagao T, Kurose H. (2001) Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*, 276: 33019-33026.
- [194] Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA. (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol*, 158: 563-575.
- [195] Moore CA, Milano SK, Benovic JL. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69: 451-482.
- [196] Krupnick JG, Benovic JL. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38: 289-319.
- [197] Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 8879-8882.
- [198] Krupnick JG, Goodman OB, Jr., Keen JH, Benovic JL. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem*, 272: 15011-15016.
- [199] Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG. (2002) beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem*, 277: 9247-9254.
- [200] Doherty GJ, McMahon HT. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78: 857-902.
- [201] Kumari S, Mg S, Mayor S. (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*, 20: 256-275.
- [202] Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT. (2010) FCHo Proteins are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 328: 1281-1284.

- [203] McMahon HT, Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 517-533.
- [204] Traub LM. (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 583-596.
- [205] Takei K, Haucke V. (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*, 11: 385-391.
- [206] Ferguson SM, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, Destaing O, Ko G, Takasaki J, Cremona O, E OT, De Camilli P. (2009) Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, 17: 811-822.
- [207] Vallis Y, Wigge P, Marks B, Evans PR, McMahon HT. (1999) Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*, 9: 257-260.
- [208] Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA, Rothman JE. (1984) An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol*, 99: 723-733.
- [209] Maxfield FR, McGraw TE. (2004) Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 121-132.
- [210] Bastiani M, Parton RG. (2010) Caveolae at a glance. *J Cell Sci*, 123: 3831.
- [211] Skotland T, Iversen TG, Torgersen ML, Sandvig K. (2015) Cell-penetrating peptides: possibilities and challenges for drug delivery in vitro and in vivo. *Molecules*, 20: 13313-13323.
- [212] Hunyady L, Catt KJ, Clark AJL, Gaborik Z. (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept*, 91: 29-44.
- [213] Tsao P, Cao T, von Zastrow M. (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 91-96.
- [214] Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. (2010) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 31: 221-228.
- [215] Thomsen AR, Plouffe B, Cahill TJ, 3rd, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, Kahsai AW, Strachan RT, Pani B, Mahoney JP, Huang L, Breton B, Heydenreich FM, Sunahara RK, Skiniotis G, Bouvier M, Lefkowitz RJ. (2016) GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*, 166: 907-919.
- [216] Zerial M, McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 107-117.
- [217] Seachrist JL, Ferguson SS. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci*, 74: 225-235.

- [218] Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, 149: 901-914.
- [219] Lawe DC, Chawla A, Merithew E, Dumas J, Carrington W, Fogarty K, Lifshitz L, Tuft R, Lambright D, Corvera S. (2002) Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem*, 277: 8611-8617.
- [220] Díaz E, Schimmöller F, Pfeffer SR. (1997) A Novel Rab9 Effector Required for Endosome-to-TGN Transport. *The Journal of Cell Biology*, 138: 283.
- [221] Hutagalung AH, Novick PJ. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*, 91: 119-149.
- [222] Lietha D. *Phosphoinositides – The Seven Species: Conversion and Cellular Roles*, eLS, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [223] Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res*, 48: 307-343.
- [224] Balla T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*, 93: 1019-1137.
- [225] van den Bout I, Divecha N. (2009) PIP5K-driven PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci*, 122: 3837.
- [226] Balla A, Tuymetova G, Tsiomenko A, Várnai P, Balla T. (2005) A Plasma Membrane Pool of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Generated by Phosphatidylinositol 4-Kinase Type-III Alpha: Studies with the PH Domains of the Oxysterol Binding Protein and FAPP1. *Mol Biol Cell*, 16: 1282-1295.
- [227] Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T. (2008) Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell*, 19: 711-721.
- [228] Falkenburger BH, Jensen JB, Hille B. (2010) Kinetics of PIP(2) metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *The Journal of General Physiology*, 135: 99-114.
- [229] Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 195-203.
- [230] Gamper N, Shapiro MS. (2007) Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat Rev Neurosci*, 8: 921-934.
- [231] Bojjireddy N, Botyanszki J, Hammond G, Creech D, Peterson R, Kemp DC, Snead M, Brown R, Morrison A, Wilson S, Harrison S, Moore C, Balla T. (2014) Pharmacological and genetic targeting of the PI4KA enzyme reveals its important role

in maintaining plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *J Biol Chem*, 289: 6120-6132.

[232] Turu G, Szidonya L, Gaborik Z, Buday L, Spat A, Clark AJL, Hunyady L. (2006) Differential beta-arrestin binding of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors. *FEBS Lett*, 580: 41-45.

[233] Hunyady L, Baukal AJ, Gaborik Z, Olivares-Reyes JA, Bor M, Szaszak M, Lodge R, Catt KJ, Balla T. (2002) Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT(1) angiotensin receptor. *J Cell Biol*, 157: 1211-1222.

[234] Varnai P, Balla T. (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: Calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo- H-3 inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol*, 143: 501-510.

[235] Woo J, von Arnim AG. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Plant Methods*, 4.

[236] Ferguson SSG, Ménard L, Barak LS, Koch WJ, Colapietro A-M, Caron MG. (1995) Role of Phosphorylation in Agonist-promoted  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Sequestration: Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by  $\beta$ ARK1. *J Biol Chem*, 270: 24782-24789.

[237] Xu Y, Piston DW, Johnson CH. (1999) A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 151-156.

[238] Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC. (2002) Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab*, 13: 415-421.

[239] Esseltine JL, Dale LB, Ferguson SS. (2011) Rab GTPases bind at a common site within the angiotensin II type I receptor carboxyl-terminal tail: evidence that Rab4 regulates receptor phosphorylation, desensitization, and resensitization. *Mol Pharmacol*, 79: 175-184.

[240] Dale LB, Seachrist JL, Babwah AV, Ferguson SS. (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *J Biol Chem*, 279: 13110-13118.

[241] Noda K, Feng YH, Liu XP, Saad Y, Husain A, Karnik SS. (1996) The active state of the AT(1) angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry*, 35: 16435-16442.

[242] Heuser JE, Anderson RG. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol*, 108: 389-400.

[243] Orlandi PA, Fishman PH. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*, 141: 905-915.

- [244] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308: 512-517.
- [245] Domazet I, Holleran BJ, Richard A, Vandenberghe C, Lavigne P, Escher E, Leduc R, Guillemette G. (2015) Characterization of Angiotensin II Molecular Determinants Involved in AT1 Receptor Functional Selectivity. *Mol Pharmacol*, 87: 982-995.
- [246] Toth DJ, Toth JT, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Varnai P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 125: 2185-2197.
- [247] Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T. (1999) Selective regulation of G $\alpha$ (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem*, 274: 34483-34492.
- [248] Sallèse M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L, De Blasi A. (2000) Selective regulation of G $\alpha$  signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated G $\alpha$ . *Mol Pharmacol*, 57: 826-831.
- [249] Knepper SM, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD, Hancock AA. (1995) A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther*, 274: 97-103.
- [250] Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, Clark AJ, Hunyady L. (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol*, 59: 239-247.
- [251] Thomas WG, Qian H, Chang C-S, Karnik S. (2000) Agonist-induced Phosphorylation of the Angiotensin II (AT1A) Receptor Requires Generation of a Conformation That Is Distinct from the Inositol Phosphate-signaling State. *J Biol Chem*, 275: 2893-2900.
- [252] Clague MJ, Urbé S. (2001) The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci*, 114: 3075.
- [253] Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Ménard L, Caron MG. (1996) Dynamin and  $\beta$ -Arrestin Reveal Distinct Mechanisms for G Protein-coupled Receptor Internalization. *J Biol Chem*, 271: 18302-18305.
- [254] Hay JC. (2007) Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO Reports*, 8: 236-240.
- [255] Šamaj J, Baluška F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D. (2004) Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling. *Plant Physiol*, 135: 1150-1161.
- [256] Balla A, Toth DJ, Soltesz-Katona E, Szakadati G, Erdelyi LS, Varnai P, Hunyady L. (2012) Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane

microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *J Biol Chem*, 287: 9090-9099.

[257] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276: 19452-19460.

[258] Krauss M, Haucke V. (2007) Phosphoinositides: regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett*, 581: 2105-2111.

[259] Kim S, Kim H, Chang B, Ahn N, Hwang S, Di Paolo G, Chang S. (2006) Regulation of transferrin recycling kinetics by PtdIns[4,5]P<sub>2</sub> availability. *FASEB J*, 20: 2399-2401.

[260] Zoncu R, Perera RM, Sebastian R, Nakatsu F, Chen H, Balla T, Ayala G, Toomre D, De Camilli PV. (2007) Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3793-3798.

[261] Sorensen SD, Linseman DA, McEwen EL, Heacock AM, Fisher SK. (1999) Inhibition of beta(2)-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor endocytosis after depletion of phosphatidylinositol bisphosphate. *J Pharmacol Exp Ther*, 290: 603-610.

[262] Seachrist JL, Laporte SA, Dale LB, Babwah AV, Caron MG, Anborgh PH, Ferguson SS. (2002) Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J Biol Chem*, 277: 679-685.

[263] Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, 11: 467-480.

[264] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*, 274: 32248-32257.

[265] Li H, Li HF, Felder RA, Periasamy A, Jose PA. (2008) Rab4 and Rab11 coordinately regulate the recycling of angiotensin II type I receptor as demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biomed Opt*, 13: 031206.

[266] Saraste J, Goud B. (2007) Functional symmetry of endomembranes. *Mol Biol Cell*, 18: 1430-1436.

[267] Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin HW, Katoh Y, Nakayama K. (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 125: 4049-4057.

[268] Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SSG. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta(2)-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol*, 14: 2040-2053.



[269] Tani K, Shibata M, Kawase K, Kawashima H, Hatsuzawa K, Nagahama M, Tagaya M. (2003) Mapping of functional domains of gamma-SNAP. *J Biol Chem*, 278: 13531-13538.

[270] Lachance V, Angers S, Parent J-L. (2014) New insights in the regulation of Rab GTPases by G protein-coupled receptors. *Small GTPases*, 5: e29039.

## 11. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Szakadati G**, Toth AD, Olah I, Erdelyi LS, Balla T, Varnai P, Hunyady L, Balla A. (2015) Investigation of the Fate of Type I Angiotensin Receptor after Biased Activation. Mol Pharmacol, 87: 972. **IF:3,931**

Balla A, Toth DJ, Soltesz-Katona E, **Szakadati G**, Erdelyi LS, Varnai P, Hunyady L. (2012) Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. J Biol Chem, 287: 9090-9099. **IF:4,651**

## 12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Prof. Hunyady Lászlónak szeretnék köszönetet mondani, aki élettan, illetve kísérletes sejtélettan előadásaival felkeltette érdeklődésemet a tárgy és a molekuláris endokrinológiai kutatás iránt, valamint TDK, majd pedig doktorandusz hallgatóként laborjába fogadott. Azóta is folyamatosan figyelemmel kísérte munkámat, és támogató ötleteivel mindig segítségemre volt. Hálás köszönettel tartozom másik témavezetőmnek Dr. Balla Andrásnak, akitől TDK-hallgató koromtól kezdve tanulhattam a kutatáshoz használatos technikákat, az igényes kísérlettervezés és kiértékelés lépéseit. Köszönöm, hogy végigkísérte és támogatta egész élettan kutatói munkásságomat. Köszönöm Prof. Ligeti Erzsébetnek, hogy programvezetőként figyelemmel kísérte doktoranduszi munkámat. Köszönöm Prof. Várnai Péternek, hogy az évek során kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá. Köszönöm a labor korábbi és jelenlegi dolgozóinak, egyben barátaimnak Soltész-Katona Eszternek, Matuska Ritának, Porkoláb Editnek, Dr. Turu Gábornak, Dr. Gulyás Gergőnek, Dr. Szalai Bencének, Dr. Gyombolai Pálnak, Dr. Tóth Józsefnek, Dr. Erdélyi Lászlónak és Dr. Tóth Dánielnek, hogy az együtt töltött évek során társaságukkal inspiráló és otthonos munkahelyet teremtettek, ahova öröm volt dolgozni. Külön köszönöm Dr. Tóth Andrásnak, a kísérletes munkámhoz és dolgozatom készítéséhez nyújtott elengedhetetlen kritikai megjegyzéseit és segítségét. Köszönöm a munkámhoz nyújtott hozzájárulását a laborban dolgozó asszisztenseknek, elsősorban Oláh Ilonának, valamint Halász Eszternek és Szabolcsi Katának. Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának, hogy magas színvonalú szakmai támogatásukra bármikor számíthattam. Köszönöm TDK hallgatóimnak, Csepregi Annának, Nagy Attilának és Bozsaki Ákosnak, hogy munkájukkal és kérdéseikkel hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához.

Legfőképpen pedig szeretném megköszönni szüleimnek, tesvéremnek, barátaimnak és páromnak, hogy kitartó szeretetükkel, türelmükkel és támogatásukkal biztos háttérrel teremtettek számomra a kutatómunkámhoz és a dolgozat megírásához. Köszönöm, hogy bármikor fordulhatam hozzájuk és számíthattam segítségükre.