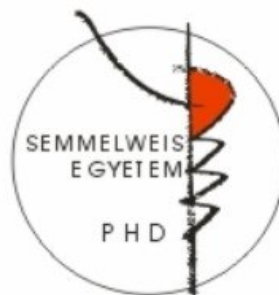


A plazmamembrán receptorok közötti interakciók szerepe a β -arresztin aktiváció szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Tóth András Dávid

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Bógel Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Vas Virág, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Füst Zsuzsanna, az MTA doktora, professor emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Sperlách Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	7
2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok	7
2.1.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok struktúrája.....	8
2.2. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok interakciós partnerei.....	11
2.2.1. A heterotrimer G-fehérjék	11
2.2.2. G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok	16
2.2.3. Az arresztinek	20
2.3. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok és más plazmamembrán receptorok közötti kölcsönhatások.....	40
2.3.1. Interakciók a ligandum mennyiségének megváltozásán keresztül	41
2.3.2. Jelátviteli utakon keresztüli heterológ aktiváció és gátlás.....	42
2.3.3. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok magasabb rendű szerveződése.....	43
2.4. Új perspektívák a GFKR-eket célzó farmakológiai beavatkozásokban	51
3. Célkitűzés.....	59
4. Módszerek.....	60
4.1. A kísérletekben használt anyagok.....	60
4.2. Plazmid konstrukciók	60
4.3. Sejtkultúra és transzfekció	62
4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer mérések.....	63
4.4.1. A BRET-alapú mérések elve	63
4.4.2. A BRET mérések kivitelezése.....	64
4.5. Konfokális mikroszkópia és képanalízis.....	66
4.6. Koprecipitációs kísérletek.....	67
4.7. Western blot.....	67
4.8. Statisztikai analízis	68
5. Eredmények.....	69
5.1. Az AT ₁ R és a β ₂ AR közötti kölcsönhatások vizsgálata.....	69
5.1.1. Az AT ₁ R és a β ₂ AR heterodimerizációjának verifikálása.....	69

5.1.2.	Az AT ₁ R befolyásolja a β ₂ AR β-arresztin kötését	70
5.1.3.	Az AT ₁ R-ről induló jelpályák nem szükségesek a β ₂ AR β-arresztin2 kötésének modulációjához	73
5.1.4.	A β ₂ AR β-arresztin2 kötése függ az AT ₁ R expressziótól.....	75
5.1.5.	Az AT ₁ R aktivációja jelátvitel-szelektív agonistával növeli a β ₂ AR-β-arresztin2 interakciót.....	76
5.1.6.	Az AT ₁ R és β ₂ AR koaktiváció meghosszabbítja a β ₂ AR asszociált β-arresztin2 klaszterek élettartamát.....	77
5.1.7.	A β ₂ AR által kiváltott cAMP jel tartósabbá válik szimultán AT ₁ R aktiváció esetén	79
5.2.	Az inaktív AT ₁ R heterológ, β-arresztinen keresztüli szabályozásának vizsgálata	82
5.2.1.	PKC aktiváció hatására a β-arresztin2 kötődik az AT ₁ R-hez.....	82
5.2.2.	A β-arresztin a stabilitási kapcsolón keresztül köt az inaktív AT ₁ R-hez .	88
5.2.3.	A β-arresztin2 konformációját meghatározza az AT ₁ R-hez való kapcsolódásának módja.....	91
5.2.4.	A homológ és heterológ módon aktiválódó β-arresztin2 eltérően befolyásolja a receptor sorsát	97
5.2.5.	Az inaktív receptor-kötött β-arresztin2 képes receptor-β-arresztin-MAPK komplexek kialakítására.....	99
6.	Megbeszélés	102
6.1.	Az AT ₁ R-β ₂ AR heterodimer funkcionális vizsgálata	102
6.2.	Az AT ₁ R PKC foszforiláción és β-arresztin kötésén keresztüli szabályozásának vizsgálata	106
7.	Következtetések	111
8.	Összefoglalás.....	112
9.	Summary	113
10.	Irodalomjegyzék	114
11.	Saját publikációk jegyzéke	147
12.	Köszönetnyilvánítás	148
13.	Függelék	150

1. Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonil-glicerin
5HT	szerotonin
5HT _{2C} R	szerotonin 2C receptor
α_{1A} AR	α_{1A} adrenerg receptor
AngII	angiotenzin II (Asp-Arg-Val-Lys-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)
AP-2	adapter-protein 2
ASK1	apoptózis szignál által regulált kináz 1
AT ₁ R	AT ₁ angiotenzin receptor
AT ₁ R-DRY/AAV	D125A, R126A mutáns AT ₁ R
AT ₁ R-TSTS/A	T332A, S335A, T336A, S338A mutáns AT ₁ R
AT ₁ R- Δ 319	a 319. aminosava után (C-terminális) deletált AT ₁ R
ATP	adenozin-trifoszfát
β_2 AR	β_2 adrenerg receptor
BAP	biotin akceptor peptid
β arr	β -arresztin
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
BRET-HIT	BRET heteromer identifikációs technológia
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
Cmpd101	compound 101 (GRK2/3 gátlószer)
c-Src	celluláris szarkóma kináz
CXCR ₄	4-es típusú C-X-C kemokin receptor
DMSO	dimetil-szulfoxid
E	effektor
ECL	extracelluláris hurok (<i>intracellular loop</i>)
EDT	etán-ditiol
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EPAC	cAMP-által közvetlen aktivált kicserélő faktor (<i>exchange factor directly activated by cAMP</i>)
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz

F139 szenzor	a β -arresztin2 139. aminosava után CCPGCC aminosavmotívumot, N-terminálisan Rluc8-at tartalmazó bioszenzor
FIAsH	<i>fluorescein arsenical hairpin binder</i>
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GABA _B receptor	B-típusú γ -amino-ajsav receptor
GAP	GTP-áz aktiváló protein
GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFKR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (<i>green fluorescent protein</i>)
GNP	guanozin nukleotid
GRK	G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz
GSK3 β	glikogén szintetáz kináz 3 β
GTP	guanozin-trifoszfát
ICL	intracelluláris hurok (<i>intracellular loop</i>)
IP ₃	inozitol-triszfoszfát
ISO	izoproterenol (<i>isoproterenol</i>)
JAK	Janus-arcú kináz
JNK	c-Jun N-terminális kináz
K2A- β arresztin2	β arresztin2-K11,12A
KO	<i>knock-out</i>
L	ligandum
IgEC ₅₀	félmaximális effektív koncentráció tízes alapú logaritmusa
M ₃ AChR	M ₃ muszkarinerg acetilkolin receptor (M ₃ AChR)
MAP	mitogén aktivált protein
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MAPKK	mitogén aktivált protein kináz kináz
MAPKKK	mitogén aktivált protein kináz kináz kináz
MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
MEK	MAPK/ERK kináz

MKK	mitogén aktivált protein kináz kináz
MMP	mátrix metalloproteináz
mRFP	monomer piros fluoreszcens fehérje (<i>monomer red fluorescent protein</i>)
mTOR	emlős rapamicin célpont fehérje (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
n.s.	nem szignifikáns
NES	nukleáris export szignál
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS oldat
PCR	polimeráz láncreakció (<i>polymerase chain reaction</i>)
PH domén	pleksztrin homológia doménü
PIP ₂	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC β	foszfolipáz C β
PM	plazmamembrán
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PP2A	protein foszfatáz 2A
R	inaktív állapotú receptor
R*	aktív konformációjú receptor
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
RET	rezonancia energiatranszfer
RGS	<i>regulatory of G protein signaling</i>
RH domén	<i>regulatory of G protein signaling (RGS) homology domén</i>
Rluc	<i>Renilla</i> luciferáz
Rluc8	„8-as” <i>Renilla</i> luciferáz mutáns
S.E.	a középérték standard hibája (<i>standard error of mean</i>)
Sar	szarkozin
siRNS	kis interferáló (<i>short interfering</i>) RNS
Sluc	szuper <i>Renilla</i> luciferáz
Src	szarkóma kináz

T1R	1-es típusú ízérzékelő receptor
TIRF	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia (<i>total internal reflection fluorescence</i>)
TG	tapszigargin
TM	transzmembrán
TRV120023 / TRV023	Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala-OH
TRV120027	Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala-OH
USP33	ubikvitin-specifikus proteáz 33
V ₂ R	V ₂ vazopresszin receptor
WT	vad típus
YFP	sárga fluoreszcens fehérje (<i>yellow fluorescent protein</i>)

2. Bevezetés

Sejtjeink működését extracelluláris mediátorok sokasága szabályozza, melyek hatásait a legtöbb esetben plazmamembránban elhelyezkedő receptorok, mint például a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok közvetítik. Sokat tudunk arról, hogy az egyes receptorok milyen sejten belüli jelátviteli útvonalak beindítására képesek, de arról viszonylag behatároltak az ismereteink, hogy egy receptor aktivitása hogyan befolyásolhatja a másik receptorról induló jelátvitelt. Ezen jelátviteli kölcsönhatások ismerete kiemelt orvosbiológiai jelentőséggel bír, hiszen hatással lehetnek a plazmamembrán receptorokat támadó gyógyszerek aktivitására, így akár váratlan gyógyszerinterakciók okaként is szolgálhatnak. A dolgozat bevezetésében bemutatom a jelenlegi ismereteinket a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokról, azok legfontosabb effektorainak működéséről és a receptorok közötti interakciókról, továbbá szót ejtek ezen fehérjéket célzó újfajta gyógyszeres terápiás lehetőségekről is.

2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) alkotják a plazmamembrán receptorok legnépesebb családját, szerepük a külső térből érkező ingerek érzékelése és azok hatására létrejövő sejten belüli válasz beindítása. Több mint 800 különböző GFKR található meg az emberi szervezetben, mely fehérjékben szerkezetileg közös, hogy 7 transzmembrán (TM) α -hélixszel rendelkeznek [1]. A GFKR-ek első felosztása a szekvencia homológia alapján történt, amelynek segítségével 6 különböző osztályt különítettek el (1. táblázat) [2]. Ezek közül a legnagyobb, a GFKR-ek közel 90%-át tartalmazó osztály a rodopszin-szerű receptoroké, míg a D és E osztály tagjai csak gerinctelenekben fordulnak elő. A gerinces GFKR-ek osztályozása céljából jött létre az előbbivel átfedő „GRAFS” besorolás, melyben a **G**lutamát család (C-osztály), **R**odopszin család (A-osztály), **A**dhéziós GFKR család (B-osztályhoz tartoznak), „**F**rizzled” család (F-osztály) és a **S**zekretin család (B-osztály) került megkülönböztetésre [3]. A GFRK-ok az ingerek széles spektrumára képesek válaszolni, mint például fény, szaginglek, membránfeszülés, aminosavak, biogén aminok, anorganikus ionok, peptidek, lipidek, nukleotidok, szénhidrátok vagy fehérjék. Az emberi GFKR-ek több mint fele (~450) szerepel a szenzoros (látó, szagló, ízéző) működésekben, a maradék közel 350 pedig neurotranszmitterek, hormonok, parakrin és autokrin felszabaduló molekulák

érzékelésével a legkülönbözőbb funkciók szabályozásában vesz részt [2]. A nemszenzoros GFKR-ek körülbelül harmadáról nem ismert, hogy mely endogén anyag kötésére képes (ún. árva receptorok).

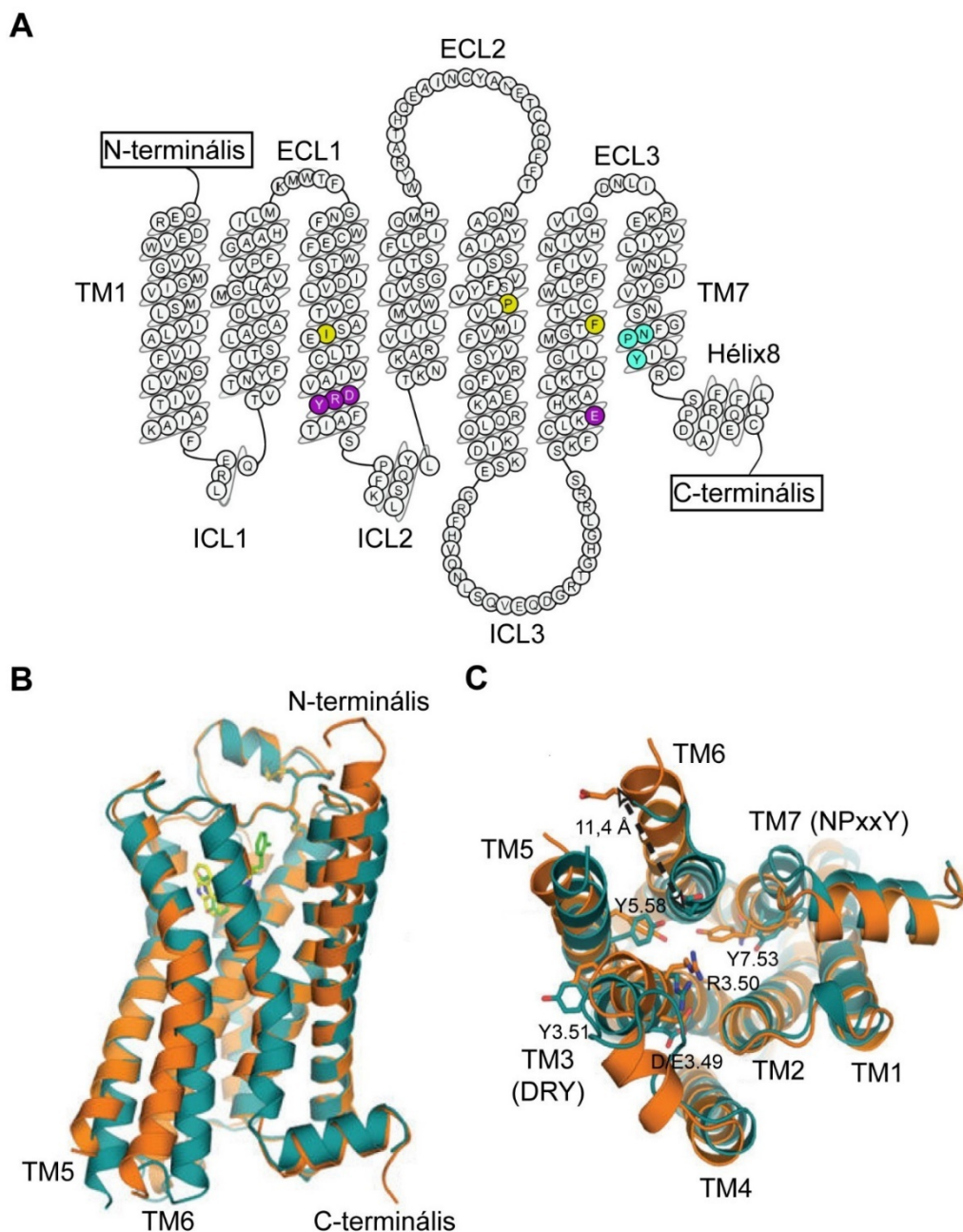
1. táblázat A GFKR-ek klasszikus, szekvencia homológia alapján történő osztályozása. Zárójelben az osztályok alternatíván használt, a prototípusos képviselők alapján keletkezett neveik láthatóak.

A GFKR-ek osztályai a szekvencia homológia alapján
A-osztály (rodopszin-szerű)
B-osztály (szekretin receptor-szerű)
C-osztály (metabotrop glutamát receptor-szerű)
D-osztály (gomba feromon receptorok)
E-osztály (ciklikus AMP receptorok)
F-osztály (frizzled/smoothened receptorok)

2.1.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok struktúrája

A GFKR-ek aktiváltsági állapotát a külső tétből érkező molekula (ligandum) receptorhoz történő kötődése határozza meg. A ligandumkötés hatására a receptor szerkezete átrendeződik, azaz konformációváltáson megy keresztül [4]. Ha a ligandumkötés egy biológiai választ elindító, azaz aktív receptorkonformációt idéz elő, akkor a ligandumot agonistának nevezzük, ezzel szemben az antagonistá vegyületek az inaktív konformációt stabilizálják. A receptor aktív konformációja képes citoszolikus effektor fehérjék, mint például a heterotrimer G-fehérjék vagy β -arresztinek aktiválására, melyeken keresztül különböző intracelluláris jelátviteli kaszkádok indulnak be a megfelelő sejtválasz létrehozásához.

A GFKR fehérjék szerkezetileg tartalmaznak egy N- és egy C-terminális szakaszt, 7 db, főleg hidrofób aminosavakból álló transzmembrán (TM1-TM7) hélixet, melyeket 3-3 intracelluláris és extracelluláris hurok (ICL1-3 ill. ECL1-3) köt össze (1. ábra, A) [4]. A legtöbb esetben az N-terminális kifelé, míg a C-terminális fark a sejt belseje felé mutat. Utóbbinak az eleje gyakran szintén egy hélixet képez (hélix 8). Mivel a munkám során vizsgált receptorok mindegyike a rodopszin-szerű (A-osztályú) receptorok közé tartozik, így a továbbiakban ezek szerkezetének ismertetése kerül részletezésre.



1. ábra A β_2 adrenerg receptor aminosavszerkezetje és kristálystruktúrája. **A**, A β_2 adrenerg receptor (β_2 AR) (prototípusos GPCR) aminosavszerkezetje. A sematikus ábra az aminosavakat a másodlagos szerveződésnek megfelelően ábrázolja, megfigyelhetőek a transzmembrán régiók és az extra- ill. intracelluláris hurkok. Az N-terminális a sejt külseje felé, míg a C-terminális az intracelluláris oldal felé mutat. Színesen láthatóak a receptoraktiváció szabályozásában szerepet játszó legfontosabb konzervált motívumok. Lila: DRY motívum és az ún. ionos zár ($R^{3.50}$ és $E^{6.30}$ közötti sóhíd az inaktív konformációban), sárga: a G-fehérje aktivációban jelentős PIF motívum ($P^{5.50}$, $I^{3.40}$, $F^{6.44}$), cian: NPxxY motívum. A kép a www.gpcrdb.org oldalról származik. **B** és **C**, A β_2 AR inaktív és aktív kristálystruktúrája. Kékeszölddel jelölt az inaktív, antagonistát kötő szerkezet, míg narancssárgával látható az aktív (agonistával és nanotesttel stabilizált) struktúra. **B**, oldalnézet, **C**, alulnézet (intracelluláris oldal felől). Többek között megfigyelhető a TM6 kifelé irányuló mozgása az aktiváció hatására, emellett látható a konzervált DRY és NPxxY motívumok helyzete. Megjegyzendő, hogy az inaktív GPCR struktúrák gyakran kötnek Na^+ -iont (az ábrán nincs jelölve). Forrás: [5, 6].

A GFKR-ek szerkezetéről sokáig behatároltak voltak ismereteink, ami a membránreceptorok kikristályosításának technikai nehézségeiből adódnak. Ezen tudásanyag azonban az utóbbi években robbanásszerű növekedést mutatott többek között Brian K. Kobilka munkájának köszönhetően, akit 2012-ben kémiai Nobel-díjjal jutalmaztak korábbi mentorával, Robert J. Lefkowitz-cal egyetemben. Az utóbbi kutatónak a GFKR-ek működésének megismerésében volt kiemelkedő érdeme.

Elsőként a rodopszin receptor kristályszerkezete vált ismertté [7], majd közel egy évtizedet kellett várni az antagonistakötött β_2 adrenerg receptor (β_2 AR) struktúrájának megismerésére [5]. Az igazi nagy áttörést az agonistakötött β_2 AR szerkezetének feltérképezése jelentette [6], melyhez szükséges volt a Kobilka munkacsoport által kifejlesztett egyszálú, láma-eredetű antitestek (nanotestek) alkalmazása. A nanotestek segítségével sikerült stabilizálniuk az egyébként igen instabil aktív konformációját a receptornak. Azóta ismertté vált a β_2 AR G-fehérjével alkotott komplexének struktúrája [8] és több mint 30 további GFKR kristályszerkezete inaktív vagy aktív konformációban [9].

Ezen tanulmányok meglepő következtetése, hogy az alacsony szekvenciahomológia ellenére a hét transzmembrán α -hélix harmadlagos szerkezete nagyfokú egyezést mutat különböző receptorok inaktív konformációiban, ráadásul az aktiváció hatására létrejövő transzmembrán régió mozgások is nagyon hasonlóak [9]. Minden eddig feltárt aktív receptor struktúrában a TM6 kifelé (a 7 TM által határolt receptormagtól elfelé) irányú elmozdulása mutatta a legnagyobb mértékű kitérést az intracelluláris oldalon, emellett megfigyelhető volt a TM5 kifelé, ill. a TM3 és TM7 befelé irányuló mozgása (1. ábra, B). A TM régiók elmozdulásának legfontosabb következménye a receptor magi régiójának kinyílása a citoszolikus oldalon, ami a továbbiakban kötőhelyként szolgál intracelluláris effektor fehérjék számára. Az aktív struktúrákban szinte teljesen identikus elhelyezkedést mutatott három konzervált aminosav, a Ballesteros-Weinstein számozás [10] szerinti Y^{5.58}, az Y^{7.53} az NPxxY motívumból és az R^{3.50} az E/DRY motívumból, mely aminosavak kiemelt jelentőségét mutatták mutagenézis vizsgálatok a GFKR-ek G-fehérje ill. β -arresztin aktivációjában [4, 9]. Ezen adatok mutatják, hogy a G-fehérje és a β -arresztin aktiváció strukturális alapjai evolúciósan nagymértékben konzerváltak. Ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy a több

száz különböző receptor hogyan képes ugyanazon kevés számú effektor fehérjén keresztül szignalizálni.

Fontos megjegyezni, hogy egy receptor nemcsak egy, hanem akár több inaktív és aktív konformációval is rendelkezhet, emellett ismertek a receptorok intermedier állapotai is. Ennek jelentőségét a későbbi fejezetekben részletezem.

2.2. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok interakciós partnerei

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok legismertebb interakciós partnerei a heterotrimer G-fehérjék, de mellettük a GFKR-ek potenciálisan további több száz fehérjével léphetnek közvetlen kapcsolatba [11]. Ezek lehetnek integráns membránfehérjék (pl. ioncsatornák, transzporterek, más GFKR-ek), citoszolikus fehérjék (többek között G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok, egyéb szerin-treonin protein kinázok, arresztin, Src-homológia 2 és 3 vagy PDZ-domén tartalmú fehérjék, citoskeletális fehérjék, kis G-fehérjék), de az N-terminálison és az ECL régiókon keresztül extracelluláris fehérjékhez is kötődhetnek (pl. integrinek, az adhézión GFKR-ek esetében az extracelluláris mátrix elemei) [11]. Ezen interakciók jó része a receptor inaktív konformációjában is fennáll, míg egyesek csak az aktív konformációjú receptor jellemzői. Jelen dolgozatom kereteit nagyban meghaladná, ha minden interakciót részletesen tárgyalnék, itt ezért csak az aktív receptorok legfontosabb és legáltalánosabb effektor fehérjéit, a heterotrimer G-fehérjéket, a G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázokat és az arresztintek mutatom be részletesen, egy későbbi fejezetben pedig a GFKR-ek magasabb rendű szerveződéseinek allosztérikus szabályozó funkcióját taglalom.

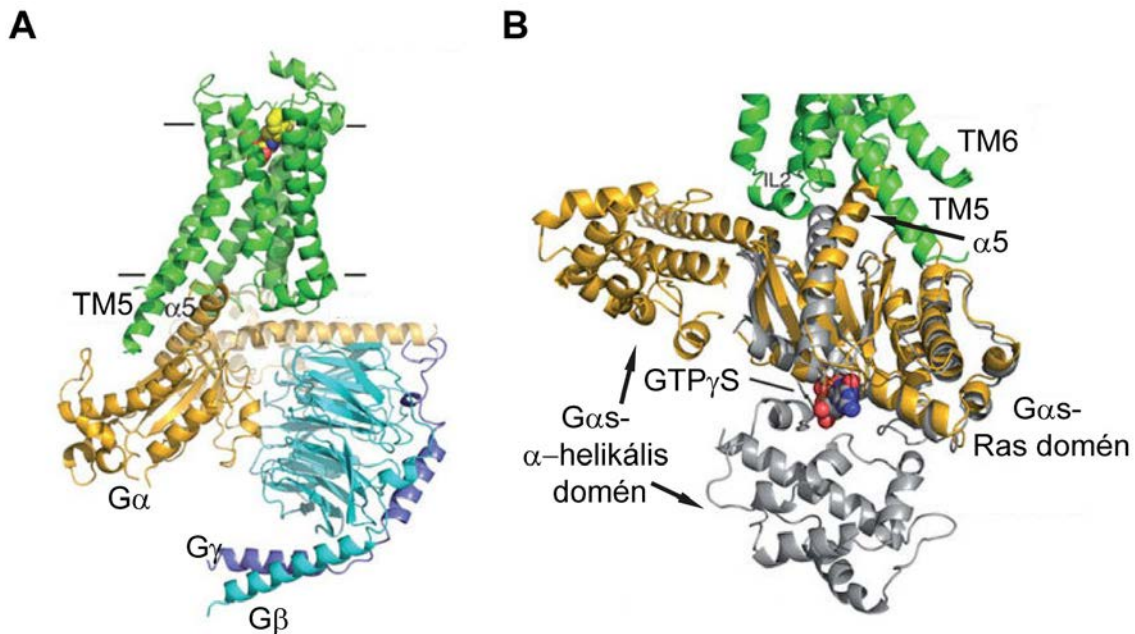
2.2.1. A heterotrimer G-fehérjék

A GFKR-ek legfontosabb tulajdonsága, hogy képesek heterotrimer G-fehérjék aktiválására. A heterotrimer G-fehérjék leírása Alfred G. Gilman és Martin Rodbell nevéhez köthető, mely felfedezésért 1994-ben orvosi és élettani Nobel-díjat kaptak. A kis és heterotrimer G-fehérjék közös jellemzője, hogy guanozin nukleotidok (GNP) kötésére képesek [12]. A GNP kötés határozza meg a G-fehérje aktivációs állapotát: a guanozin-trifoszfát (GTP) kötés hatására aktiválódik, ezzel szemben a guanozin-difoszfát (GDP)-kötött forma inaktív. A G-fehérjék GNP kötését guanin nukleotid kicserélő faktorok (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) és GTP-áz aktiváló proteinek (GAP)

szabályozzák. GEF hatásra az inaktív, az addig GDP-t kötő G-fehérje elengedi a GDP nukleotidot. Az üres kötőzsebbe GTP kötődik vissza, mivel annak citoplazmatikus koncentrációja egy nagyságrenddel meghaladja a GDP-jét. A GTP-kötött G-fehérje már aktív, és további effektor fehérjéket képes aktiválni vagy gátolni. A G-fehérje közvetítette jel terminálásáért a G-fehérje saját, GTP-hasítására képes GTP-áz doménje felelős, melynek hatására a GTP-ből GDP keletkezik. Ez az inaktivációs mechanizmus gyakran önmagában lassú, viszont a GTP-áz katalitikus aktivitását a GAP-ok fokozhatják [12].

A heterotrimer G-fehérjék három (α , β , γ) alegységből tevődnek össze, membránhoz történő rögzítésükért lipidhorgonyok a felelősek: az α -alegység mirisztoilálódik vagy palmitoilálódik, a γ -alegység prenilálódik, a β -alegység pedig a γ -alegységhez kötődik szorosán [12]. Az α -alegység tartalmazza a GNP-kötőzsebet és a GTP-áz domént. Hasonlóan a többi G-fehérjéhez, az inaktív heterotrimer G-fehérje GDP-t köt, ekkor a három alegység egy trimerikus komplexet képez. Receptoraktiváció esetén az α -alegység C-terminális $\alpha 5$ -hélice benyomul és bekötődik a receptor citoszolikus oldalán lévő nyitott magi régióba (2. ábra), mely interakcióban a receptor részéről az ICL2, az ICL3 ill. a TM3, a TM5, a TM6 és a TM7 citoplazmatikus végei szerepelhetnek (függően az adott receptortól) [9]. A létrejött kötés mind a receptorban, mind az α -alegységben konformációváltozást idéz elő. Egyrészt stabilizálódik a receptor kifelé elmozdult TM6 régiójának helyzete és ezzel együtt a receptor aktív konformációja [8]. Emellett a konformációváltozás a receptor agonista iránti affinitásának növekedését [13], így a ligandum lassabb disszociációját eredményezi, ami szintén növeli az aktív konformáció életidejét [14]. Ezen folyamatok nagy valószínűséggel szükségesek a receptor hatékony G-fehérje aktiválásához. A receptorkötés hatására létrejövő strukturális változások a $G\alpha$ -alegységben még jelentősebbek, ugyanis ezek az α -alegység GDP elengedését eredményezik, azaz az aktív GFKR-ek a heterotrimer G-fehérjék GEF fehérjéiként viselkednek. A nukleotidot nem kötő α -alegységhez ezek után GTP köt, aminek hatására az α -alegység disszociál mind a receptorról, mind a $\beta\gamma$ -komplexről [12]. Az aktivált α -alegység és a szabad $\beta\gamma$ -komplex különböző effektor fehérjékkel lépnek kapcsolatba, így közvetítik a receptorról induló jelátvitelt. A jel leállításáért az α -alegység GTP-áz doménje felelős a GTP hasítása által, mely folyamatot a heterotrimer G-fehérjék GAP-jai, az RGS (*regulatory of G protein signaling*) fehérjék facilitálhatják [12]. Az

immár újra GDP-kötött α -alegység inaktiválódik és visszakötődik a $\beta\gamma$ -komplexhez. Ez a ciklus folyamatosan ismétlődhet a receptoraktiváció ideje alatt.



2. ábra Az aktív β_2 AR heterotrimer G-fehérjével alkotott komplexe. **A**, Az agonista kötött β_2 AR-G α_s - $\beta\gamma$ kristálystruktúra oldalnézetből. A receptorkötés hatására a G α_s elengedi a GDP nukleotidot. **B**, A G α_s -alegységben létrejövő konformációváltozások az aktiváció során. Narancssárga: nukleotidmentes, receptorkötött G α_s , szürke: GTP γ S-kötött G α_s . Látható az α -helikális domén nagymértékű elmozdulása a nukleotidmentes állapotban. Forrás: [8].

A heterotrimer G-fehérjéket az α -alegységük alapján különböztethetjük meg, melyekből emberben 16-féle altípus található, és működésük alapján 4 családba sorolhatók be (2. táblázat) [15]. A G α_s család feladata a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) előállítását végző adenilát cikláz enzimek aktiválása. A cAMP felelős a protein kináz A (PKA), számos ciklikus nukleotid-vezérelt csatorna és a cAMP-által közvetlen aktivált kicserélő faktor (*exchange factor directly activated by cAMP*, EPAC) aktiválásáért. A G $\alpha_{i/o}$ -fehérjék a G α_s -ével ellentétes hatást közvetítenek az adenilát ciklázok gátlásán keresztül. A G $\alpha_{q/11}$ -család a foszfolipáz C β (PLC β) aktiválását hozza létre, amely enzim hasítja a plazmamembránban található foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP $_2$) molekulát diacil-glicerinné (DAG) és inozitol-triszfoszfáttá (IP $_3$). Az előbbi plazmamembránbeli feldúsulása a protein kináz C (PKC) membránhoz történő áthelyeződését és aktiválását váltja ki. A hidrofil IP $_3$ pedig diffúzió útján eljut az endoplazmás retikulum membránjában található ligandum-vezérelt ioncsatorna receptorához, melynek nyitása az endoplazmás retikulumból a citoplazmába történő Ca $^{2+}$ -

kiáramlást idéz elő. A kialakuló Ca^{2+} jel sejten belüli folyamatok széles tárházat szabályozza, melyeket a Ca^{2+} közvetlenül vagy kalmodulinnal komplexet képezve is végez. Ezek mellett a Ca^{2+} részt vesz a PKC klasszikus izoformáinak aktiválásában is. A $G\alpha$ -alegységek 4. családjának tagjai, a $G\alpha_{12}$ és a $G\alpha_{13}$, a RhoA kis G-fehérje aktiválását indukálják RhoGEF-ek aktiválásán keresztül [15].

2. táblázat A G-fehérje családok és α -alegység altípusok jellegzetes effektorfehérjéikkel.

Család	α -altípus	Effektorok
G_s	$G\alpha_s$	Adenilát-cikláz↑
	$G\alpha_{olf}$	
$G_{i/o}$	$G\alpha_o$	Adenilát-cikláz↓
	$G\alpha_{i1}$	Ca^{2+} -csatornák↓
	$G\alpha_{i2}$	K^+ -csatornák↑
	$G\alpha_{i3}$	
	$G\alpha_z$	
	$G\alpha_{t1}$ és $G\alpha_{t2}$	cGMP-foszfodiészteráz↑
	$G\alpha_{gust}$	cAMP-foszfodiészteráz↑
$G_{q/11}$	$G\alpha_q$	Foszfolipáz $C\beta$ ↑
	$G\alpha_{11}$	
	$G\alpha_{14}$	
	$G\alpha_{15}$ vagy $G\alpha_{16}$	
$G_{12/13}$	$G\alpha_{12}$	RhoGEF↑ (p115RhoGEF, leukémia-asszociált RhoGEF, PDZ-RhoGEF, Lbc-RhoGEF)
	$G\alpha_{13}$	

A G-fehérje β -alegységének 5, míg a γ -alegységnek 12 izoformája létezik emberben [15]. Mind a mai napig keveset tudunk arról, hogy miben különbözik az egyes izoformák működése. A heterotrimer G-fehérje aktivációs ciklus során felszabaduló $\beta\gamma$ -komplex is számos effektor funkcióval bír, leírták róla többek között feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlását ill. háttér K^+ -csatornák, foszfatidilinozitol-3-kináz és protein kináz D aktiválását is [15].

Kevésbé ismert, hogy a különböző α , β és γ alegységek milyen összetételben állhatnak össze. Ennek a kérdésnek az átfogó tanulmányozása során azt találták, hogy az alegységek egymásfelé legfeljebb csak kis mértékű szelektivitást mutatnak [16]. Az, hogy pontosan melyik kombináció jön létre, valószínűleg a sejten belüli expressziós viszonyoktól függ.

A GFKR-ek különböző G-fehérje aktiválási repertoárral rendelkeznek. Egyes receptorok szelektívek, csak bizonyos $G\alpha$ -alegységet képesek aktiválni, míg mások „promiszkusok”, azaz párhuzamosan többféle G-fehérje aktivitását is fokozzák [17]. Például a CB_2 kannabinoid receptor csak $G_{i/o}$ -, míg a β_2AR G_s - és $G_{i/o}$ -fehérjéket is aktivál [18, 19]. Mindeztidáig 3 teljes hosszúságú receptor-G-fehérje komplex struktúrát határoztak meg, minden esetben G_s -fehérje szerepelt a komplexben [8, 20, 21]. Ezekben a közös motívumok, mint például a $G\alpha_s$ $\alpha 5$ -hélixének kritikus szerepe mellett meglepően sok különbség is mutatkozott, mely eltérések főleg a receptorok oldaláról származtak. Sokáig nem sikerült azt sem megfejtetni, hogy melyek lehetnek azok a strukturális motívumok, melyek a receptorok G-fehérje specificitását meghatározzák, azaz mitől függ, hogy a receptor melyik G-fehérje altípust aktiválja. Ezekre a kérdésekre a közelmúltban megjelent GFKR- $G\alpha$ -fehérje interakciós felszín evolúciójának bioinformatikai elemzése adott elsőként válaszokat [17]. A $G\alpha$ -altípusok α -hélix5 régiójában számos aminosav konzervált, ami valószínűsíti, hogy ezek jelenléte a receptorhoz történő kötődés minimumfeltételei. Ezek mellett meg lehetett határozni az altípus specificitást mutató aminosavakat is, tehát azt a mintázatot vagy „vonalkódot”, amely az adott $G\alpha$ -altípusra jellemző. A konzervált $G\alpha$ -alegységekkel szemben a GFKR-ek sokkal szélesebb filogenetikai fával rendelkeznek, azaz fejlődésük számos független evolúciós útvonalon ment végbe. Ráadásul evolúciójuk során meglehetősen sokszor változott a receptorok G-fehérje specificitása [17]. Ez azt eredményezte, hogy egyrészt az evolúció során fennmaradtak azok a konzervált mechanizmusok, melyek a G-fehérje kötés létrejöttének elengedhetetlen feltételei (mint például az E/DRY motívum jelenléte a TM3-ban). Másrészt a független evolúciós fejlődési utak közben a receptorokban más-más mechanizmusok alakultak ki a $G\alpha$ -vonalkód leolvasására. Ez magyarázza a receptorok eltérő G-fehérje interakciós felszínét, és hogy miért ilyen sokszínű a receptorok G-fehérje aktivációs profilja [17]. A G-fehérje specificitás kérdését szemléltethetjük a kulcs-zár analógia segítségével is, melyben a kulcsok a receptorokat

jelentik, a záruk pedig a G-fehérjéket. Egyes kulcsok csak bizonyos zárukba illeszkednek (szelektív receptorok), míg egy mesterkulcs (promiszkuus receptor) több zárat is képes egyszerre kinyitni.

Megjegyzendő, hogy egyes receptorok esetében a $\beta\gamma$ -komplexszel is létrejöhet interakció, amit közvetlenül mutat a glukagonszerű peptid-1 receptor-G-fehérje komplexben létrejövő hélix8- β alegység közötti kötés [21]. Emellett a $\beta\gamma$ -komplexnek közvetítő szerepe lehet receptordimerizáció okozta G-fehérje aktivációs profil megváltozásában (lásd később).

2.2.2. G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok

A G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK-k) legfontosabb feladata az aktív GFKR-ek foszforilációja, ami meghatározó jelentőséggel bír a GFKR további működésében. A GRK enzimcsalád 7 taggal rendelkezik, melyeket 3 alcsaládba sorolhatunk (3. ábra) [22]. A GRK1 (vizuális) alcsaládba tartozik a GRK1 és GRK7, melyek a rodopszin ill. a csap opszin kinázai, a GRK2 alcsaládot a GRK2 és GRK3 enzimek alkotják, míg a GRK4, a GRK5 és a GRK6 a GRK4 alcsalád tagjai. A GRK-k szerin-treonin protein kináz enzimek, és az aktív konformációjú GFKR-eket képesek foszforilálni [22], bár egyes izoformák esetében leírtak affinitást az agonistával nem kezelt receptorokhoz is [23]. Minden GRK izoforma tartalmaz katalitikus domént, RH (*regulatory of G protein signaling (RGS) homology*) domént, N-terminálisan egy szabályozó szereppel bíró α -hélix struktúrát, a C-terminális pedig a plazmamembrán lokalizációért felelős szerkezeti elemet tartalmazza [22]. A GRK1 és GRK4 alcsalád tagjai konstitutív membrán elhelyezkedést mutatnak. A GRK1, GRK4, GRK6 és GRK7 lipidhorgonnyal, a GRK5 pedig számos bázikus és hidrofób aminosavon keresztül kötődik a PIP₂-tartalmú membránhoz. Ezzel szemben a GRK2 alcsalád enzimek aktiváció hiányában citoplazmatikusan találhatóak. Ezen enzimek receptorstimuláció hatására helyeződnek ki a plazmamembránhoz, amiért az aktivált heterotrimer G-fehérjék $\beta\gamma$ -alegységével történő, pleksztrin homológia (PH) doménon keresztüli interakció a felelős. A G_q-fehérje α -alegysége képes a GRK2 RH-doménjéhez kötődni, ami egyrészt stabilizálja a GRK2-G $\beta\gamma$ komplexet [24], másrésztől ezáltal a G α_q nem képes további PLC β aktiválásra, így ez egy fontos negatív visszacsatolási kört jelenthet a G α_q -kapcsolt receptorok deszenzitizációjában [25].

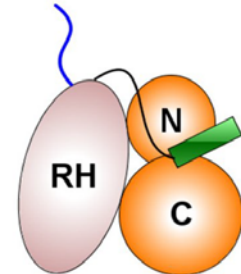
GRK1 (vizuális) alcsalád



GRK2 alcsalád



GRK4 alcsalád

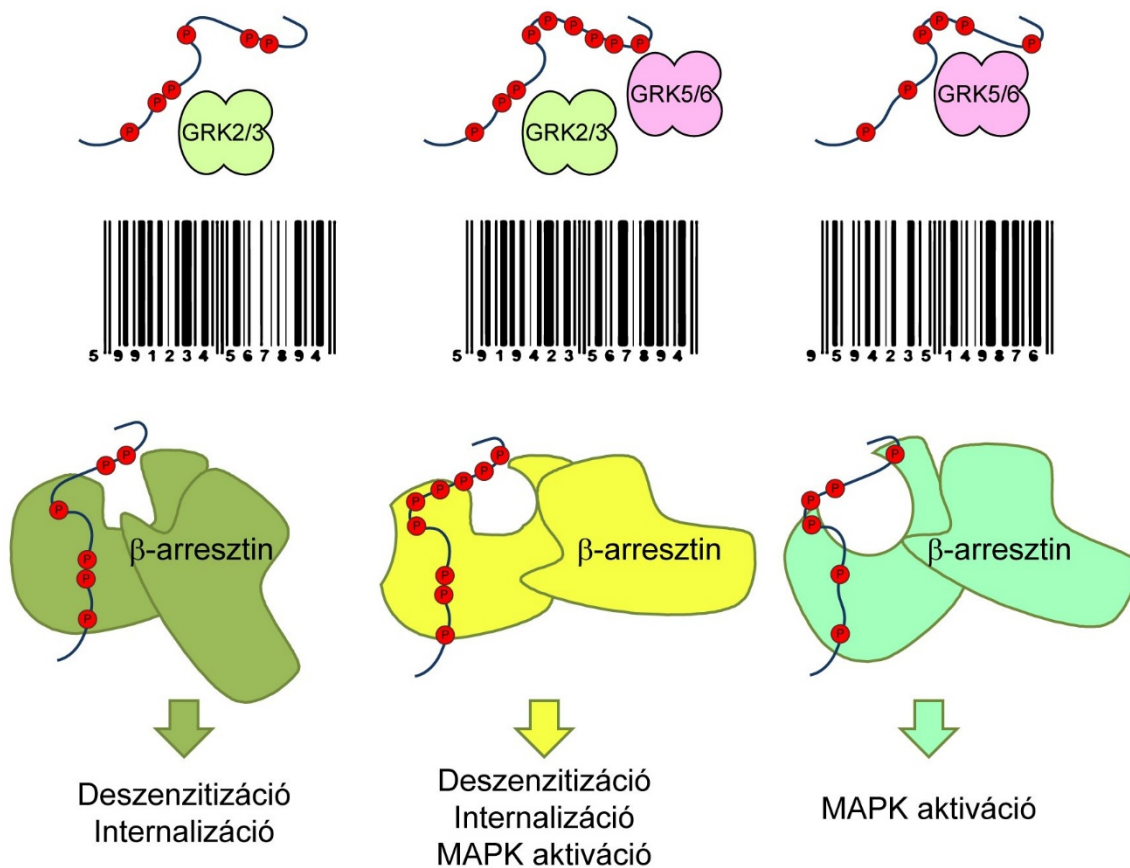


3. ábra A GRK enzimek szerkezete. Az ábrán látható a katalitikus és szabályozó domének egymáshoz képesti elhelyezkedése a fehérjélcson belül. Jobb oldalt: a GRK5 harmadlagos szerkezetének sematikus oldalnézete. Forrás: [22].

A GRK-k aktivációjának mechanizmusát a közelmúltban sikerült feltárni a β_2 AR-GRK5 komplex vizsgálatával [26]. Ezen adatok azt mutatják, hogy a receptor GRK5 interakciós felszíne a receptor inaktív állapotában fedve van, aminek felszabadulásához a receptor TM6 régiójának kifelé történő elmozdulása szükséges, hasonlóan a G-fehérje (és későbbiekben az arresztin) aktiváció esetén látottakhoz. A receptoraktiváció hatására egy, a transzmembrán hélixek által határolt gödör alakul ki a receptor citoplazmatikus felszínén, amihez képes a GRK az RH-doménjével és az N-terminális α -hélix-szel dokkolni. A kötés hatására a GRK aktivációja is létrejön: megszűnnek a poláros kötések az RH és a kináz domén között, melyek addig az enzimet inaktív állapotban tartották.

A GRK foszforilációs helyek a legtöbb receptor esetében a GFKR C-terminálisán találhatóak. Egyes GFKR-ek, mint például a szagló vagy a muszkarinerg receptorok viszont csak nagyon rövid C-terminálissal rendelkeznek, ezen receptorok esetében a farokrégió helyett az ICL3 régióban találhatóak a GRK-k célpontjául szolgáló szerin és treonin aminosavak [22].

Mivel több mint 800 humán GFKR létezik, de csak 5 nem-vizuális GRK, ebből következik, hogy egy GRK-nak képesnek kell lennie több receptort is foszforilálni [27]. Arról viszont nagyon keveset tudunk, hogy létezik-e valamilyen szintű receptorspecifititás vagy -preferencia a különböző izoformák között. Hasonlóan kevés információval rendelkezünk arról, hogy mik a GRK-k konszenzus foszforilációs szekvenciái, melyek ráadásul nagy valószínűséggel GRK izoenzim-specifititást is mutatnak. Ismert, hogy HEK 293 sejtekben a GRK2 és a GRK6 felelősek az aktivált β_2 AR C-terminálisának foszforilációjáért, és ezt a feladatot a két enzim más-más pozíciókban végzi el [28]. Emellett ligandum-függőnek mutatkozott, hogy mely GRK izoenzimek aktiválódnak receptorstimuláció után. A β_2 AR agonista izoproterenol hatására a GRK2 és a GRK6 aktivációja is létrejön, ezzel szemben a G-fehérjét nem, de β -arresztint aktiváló karvedilol (ún. jelátvitel-szelektív ligandum, lásd később) csak a GRK6 általi foszforilációt idézi elő, hiszen a GRK2 aktivációjához szükséges a G-fehérje aktivitás [28]. Mivel a két enzim különböző helyeken foszforilál, így izoproterenol és karvedilol hatására különböző foszforilációs mintázat jön létre a receptoron. A foszforilációs mintázat pedig meghatározhatja, hogy a foszfátcsoportkötésen keresztül aktiválódó effektor fehérjék (mint például az arresztinek) milyen módon és konformációban tudnak kötődni a receptorhoz, aminek eltérő működésbeli következményei lehetnek. Ezt nevezzük vonalkód-teóriának, amely valószínűsíthetően fontos szabályozó funkcióval bír (4. ábra) [28–31].



4. ábra A vonalkód hipotézis. A különböző GRK izoformák más-más helyen képesek foszforilálni a receptor C-terminálist. A receptorhoz kapcsolt foszfát csoportok így különböző mintázatokat alkothatnak, melyek ezáltal egy „vonalkódot” képeznek. A különböző vonalkódokhoz a β -arresztinek eltérő konformációkban kapcsolódhatnak, melyek eltérő funkcióval bírhatnak.

Fontos megjegyezni, hogy a receptorfoszforiláció nemcsak a GRK-k által jöhet létre. Régóta ismert, hogy a PKA és a PKC is képesek GFKR-t foszforilálni, ha az adott receptor rendelkezik a kináz konszenzus foszforilációs szekvenciájával [32]. Ezek mellett leírták az Akt, a kazein kináz II és számos más szerin-treonin protein kináz mellett tirozin kinázok szerepét is a GFKR-foszforilációban [30]. Míg a GRK-k főként az aktív konformációjú GFKR-eket szabályozzák [32], az előbbi enzimek az inaktív receptorokat is hatékonyan képesek foszforilálni, ami nagy jelentőséggel bír a heterológ deszenzitizáció folyamatában (lásd később).

A GRK-k rendelkeznek számos nem-GFKR szubsztráttal is, melyek között vannak membránreceptorok, nem-receptor membránfehérjék, jelátvitelben szereplő citoszolikus fehérjék, citoskeletális fehérjék és transzkripciós faktorok [27]. Ezért

felmerül annak lehetősége, hogy a GRK-k fontos szereplői a GFKR-ekről induló jelátviteli folyamatoknak is.

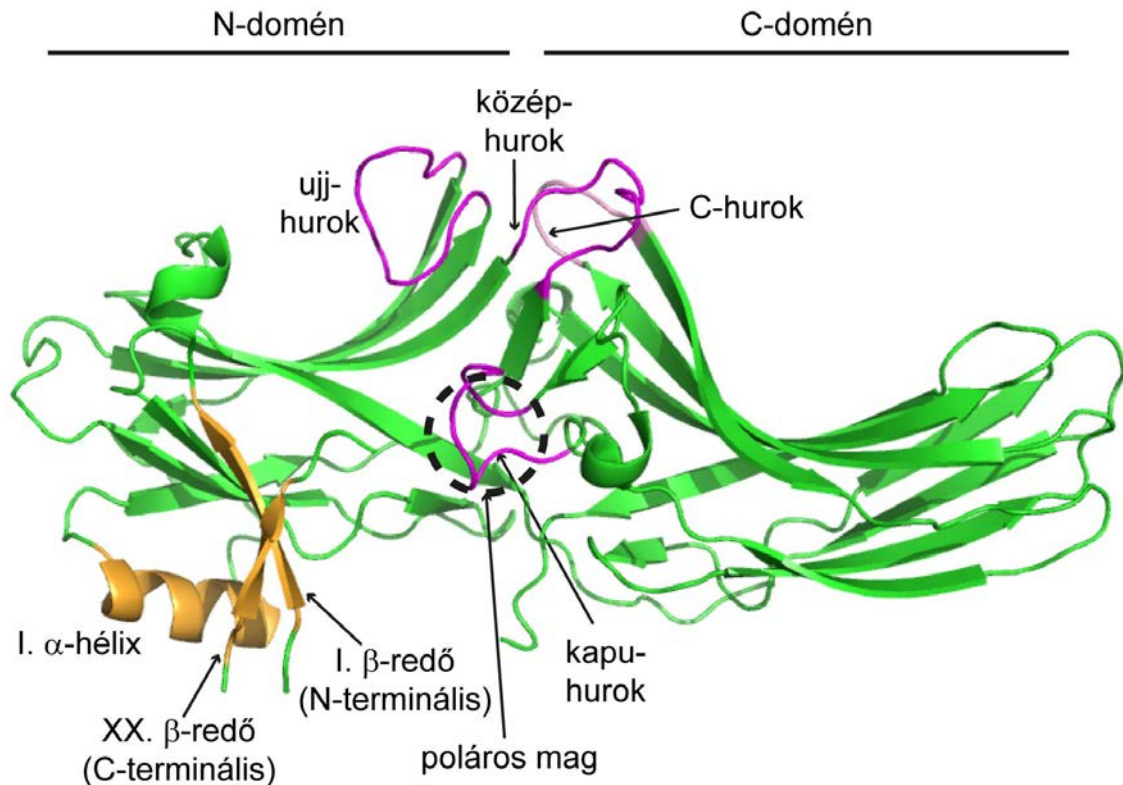
2.2.3. Az arresztinek

Az arresztin fehérjék a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok legfontosabb interakciós partnerei a G-fehérjék után. Emlős sejtekben az arresztineknek 4 izoformája létezik [29]. Elsőként az arresztin-1 (vizuális vagy pálcika arresztin) azonosítása történt meg, mely fehérjét S-antigénnek is neveznek, mert elsőként uveitis-ben termelődő autoantitestek célpontjaként azonosították [33]. Csak ezután vált ismertté az arresztin-1 biológiai funkciója, miszerint képes kötödni a fényel aktivált rodopszinhhoz [34]. Nem sokkal utána az is kiderült, hogy a receptor aktivációja mellett annak foszforilációja is fontos az arresztin magas affinitású kötődéséhez [35], ami a rodopszintról induló jelátvitel leállítását okozza [36]. Az arresztin-2 felfedezése az arresztin-1-gyel lévő nagyfokú szekvencia homológia alapján történt [37]. A szekvencia mellett a funkcióban is hasonlóság mutatkozott: az arresztin-2 a β_2 adrenerg receptor G-fehérje-függő jelátvitelének leállítását okozta, mely folyamat szintén receptoraktiváció és -foszforiláció-függőnek mutatkozott, de az arresztin-2 a rodopszin működését nem befolyásolta. Mivel a fehérje képes a β_2 adrenerg receptort szabályozására, innen ered a másik, gyakran használt elnevezése: β -arresztin1. Nemsokkal ezután azonosították az arresztin-3 (β -arresztin2 vagy hTHY-ARRX) [38, 39], majd az arresztin-4 (csap arresztin vagy X-arresztin) izoformákat [40]. Sajnos az arresztin izoformák nevezéktana mind a mai napig nem egységes, a különböző elnevezések sokszor zavart okozhatnak az olvasóban. Például a csapokban a „pálcika arresztin” a „csap arresztinnél” jóval nagyobb mértékben fordul elő [41], így megkérdőjelezhető a „csap arresztin” név létjogosultsága. Mivel az arresztin-1 mellett az arresztin-4 szintén megtalálható a szemben [40], így az előbbinek a „vizuális arresztin” elnevezése adhat konfúzióra okot. Ráadásul az is ismertté vált, hogy a β -arresztinek nemcsak a β_2 adrenerg receptor, hanem számos más receptor kötésére is képesek [42], így a „ β -” elnevezés hat pontatlannak. Bár leglogikusabbnak a felfedezés időrendisége alapján keletkezett (arresztin-1-4) nevezéktan tűnik, de mivel az arresztin-2 és -3 esetében a β -arresztin1 és β -arresztin2 elnevezés jóval szélesebb körben terjedt el, így a dolgozatban ezen izoformák esetében én is a β -arresztin neveket használok a továbbiakban.

Az arresztin-1 és az arresztin-4 kizárólag a retinában expresszálódnak, míg a β -arresztin1 és a β -arresztin2 széles szöveti expressziót mutatnak [29]. A legtöbb sejtben a β -arresztin1 a legelterjedtebb izoforma, a felnőtt agyban 10-20-szoros mennyiségben fordul elő a β -arresztin2-höz képest [43]. Míg az arresztin-1 és -4 csak a pálcika és a csap opszinokat szabályozzák, a két β -arresztin felelős a szervezet több száz G-fehérjéhez kapcsolt receptorának regulációjáért [29]

2.2.3.1. Az arresztinek szerkezete

Az arresztinek 48-50 kDa nagyságú (~400 aminosavat tartalmazó) fehérjék, melyek nagyfokú szekvencia és szerkezeti homológiát mutatnak [44–47]. Az arresztinek két csészealakú (N- és C-) doménből tevődnek össze, melyeket egy rövid „pánt” („*hinge region*”) köt össze (5. ábra). Mindkét domén tulajdonképpen egy-egy β -szendvics, azaz számos β -redő struktúra, melyek között összekötő hurokrégiók találhatóak. A két csészealakú domén összetalálkozásánál található a fehérje taréj-szerűen kiboltosuló központi gerince, melyben az aktív receptor kötéséért felelős hurkok lelhetőek fel. Ezek az ujj-hurok („*finger loop*”, G65-S75), a közép-hurok („*middle loop*”, Q131-A140), C-hurok („*C-loop*”, C244-A249) és a kapu-hurok („*gate loop*”, D292-N301) (az itt és a későbbiekben megjelölt aminosav pozíciók a patkány β -arresztin2-re, a kísérletes munkám során kiemelten vizsgált izoformára vonatkoznak). A központi gerinc belsejében található a poláros mag, mely struktúra kiemelkedő fontosságú az arresztinek inaktív konformációjának stabilizációjában [48]. A poláros mag összetartja az N- és C-doméneket egy központi sóhíd (170-es pozíciójú arginin és 292-es pozíciójú aszpartát között) és egy kiterjedt (D27, D299 és R394 aminosavak közötti) hidrogénkötés-hálózat segítségével. Az arresztin C-terminális farka az N-doménhez rögzül az arresztin bazális konformációjában egy ún. 3-elemű interakció segítségével, mely az N-domén I. β -redője (R8-S13), I. α -hélice (P98-L109) és a C-terminális XX. β -redője (D386-E390) között alakul ki poláros és hidrofób kötésekén keresztül. Ezáltal a C-terminális fark elfedi az N-domén felszínén található bázikus aminosavakat, melyeknek majd a foszforilált receptor C-terminálishoz történő kötődésben lesz fontos szerepük. Számos adat szól amellett, hogy az inaktív arresztinek egy része dimert képez, mely jelenségnek a fiziológia jelentősége még nem tisztázott [49, 50].



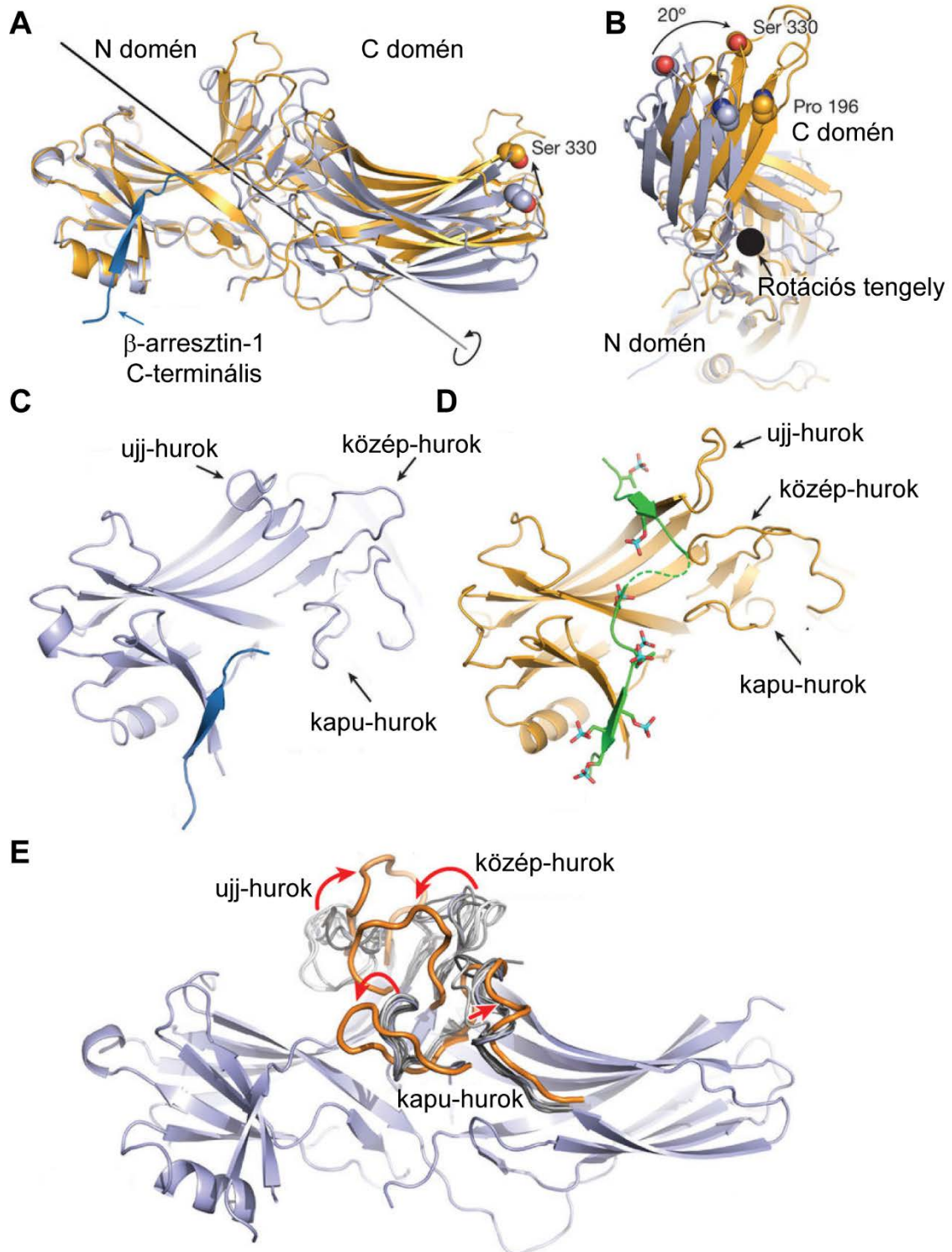
5. ábra A β -arresztin2 bazális konformációja. A szarvasmarha β -arresztin2 bazális konformációjának kristálystruktúrája (Protein Data Bank leltári szám: 3P2D [47]) látható. Magentával és rózsaszínnel jelöltek az aktív receptor kötéséért felelős hurkok, világos narancssárgával pedig a három-elemű interakciót alkotó elemek. Szaggatott vonallal a poláros magot karikáztuk be. A kiemelések PyMol programmal történtek.

Az arresztinek a receptorkötés folyamán konformációváltáson mennek keresztül, azaz aktiválódnak [29]. Az aktív konformációról az ismereteink mind a mai napig behatároltak. A membránfehérjék kristályosítása nagyfokú technikai kihívást jelent, ez különösen igaz, ha fehérjekomplexek struktúrájának meghatározása a cél. Ezért nem meglepő, hogy eddig csak egyetlen receptor-arresztin komplex szerkezetét sikerült feltárni [51, 52].

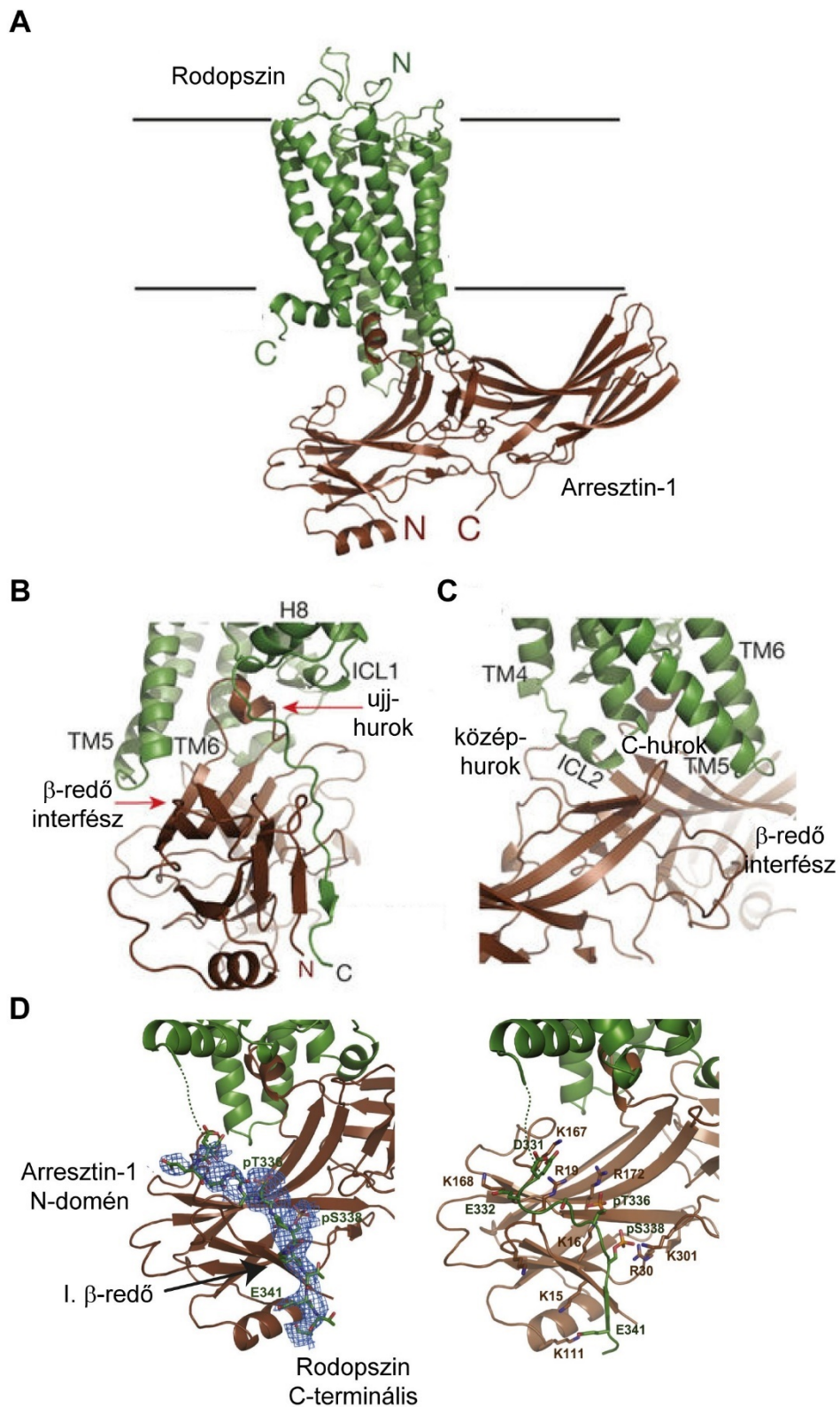
Legtöbb információval az arresztin-1 aktív szerkezetéről rendelkezünk. Az eddigi β -arresztinekkal kapcsolatos tanulmányok az arresztin-1-éhez nagyon hasonló konformációs változásokról számoltak be, így az aktivációs mechanizmus valószínűleg általánosítható. Már a korai tanulmányok leírták, hogy az arresztin receptorkötés folyamán más konformációt vesz fel, amire az Arrhenius aktivációs energia meghatározásából következtettek [53]. Ezen munkákból az is kiderült, hogy mind a receptor aktivációja (valószínűleg annak aktív konformációja révén), mind a receptor foszforilációja szükséges az arresztin nagy affinitású kötődéséhez. Magáról az aktív

konformációról az első ismereteinket „előaktivált” arresztinek segítségével nyertük. Az előaktivációt olyan mutációkkal hozták létre, melyek vagy a 3-elemű interakciót akadályozták meg, vagy a poláros mag sóhídját szüntették meg [51, 54–56]. Az előaktiváció hatására az arresztin képes receptorfoszforilációtól függetlenül is aktív GFKR-t kötni [48], és konformációs változások jönnek létre az arresztinen belül már receptorkötés-hiányában is. Az előaktivált arresztin-1 struktúrákból megtudtuk, hogy az aktív arresztinben az arresztin C-terminálisa diszlokálódik, emellett a poláros magban a központi sóhíd és a hidrogénhíd-hálózat megszűnik, a C-domén pedig elfordul az N-doménhez képest. Érdekes módon a C-terminális diszlokációja létrehozza a poláros mag felbomlását, de önmagában az utóbbi is képes az előbbi elváltozás kiváltására. Valószínűsíthetően aktiváció során a két folyamat egymást segíti, hogy a teljes konformációváltozás létrejöhessen. Sokáig azt gondolták, hogy a poláros mag sóhídjának felbomlásáért közvetlenül a receptorhoz kapcsolt foszfátcsoportok felelősek, ezért a poláros magot az arresztin „foszfátszenzor” régiójának hitték [48]. A későbbiekben azonban bebizonyosodott, hogy közvetlen kapcsolat a poláros mag és a foszfát csoportok között nem jön létre, az arresztin foszfátkötő aminosavai a kapu-hurokban és az N-doménben találhatóak [51, 52, 55]. Ezeket a megfigyeléseket támogatta a foszforilált V_2 vazopresszin receptor (V_2R) C-terminálissal aktivált és nanotesttel stabilizált β -arresztin-1 kristálystruktúrája is (6. ábra) [57]. Érdeemes megjegyezni, hogy hasonló konformációváltozások voltak megfigyelhetők az inozitol-hexakiszfát által aktivált β -arresztin2 struktúrájában, mely struktúra egyébként egyedülálló módon trimerikus szerkezetet mutat, és a receptor-független arresztin szignalizációban lehet szerepe [58].

Az eddigi egyetlen receptorral komplexben lévő arresztin struktúrát egy olyan fúziós fehérje kikristályosítása révén sikerült előállítani, amely konstitutívan aktív mutáns rodopszin és előaktivált arresztin-1-et tartalmaz (7. ábra) [51]. Ezen és a korábbi előaktivált arresztin struktúrák alapján keletkezett az arresztinek aktivációjának ma érvényben lévő modellje. Mivel a kristálystruktúra a változások időrendiségéről nem ad információt, így pár esetben a felvázolt kronológiai sorrend pusztán spekulatív.



6. ábra A β-arresztin1 konformációváltozása foszforilált V₂R C-terminális peptid hatására. Szürkével jelölt a bazális konformáció, arany: foszfopeptid-kötött konformáció, zöld: foszforilált V₂R C-terminális peptid. **A-B**, az N- és C-domén egymáshoz viszonyított 21°-os elcsavarodása. **A**, Előnézet **B**, nézet a rotációs tengely irányából. **C-D**, A C-terminális csere. A bazális konformációban a β-arresztin1 a saját C-terminálisát köti, míg az aktívban a foszforilált receptor C-terminálisát. **E**, Az ujj-, közép- és kapu-hurok diszlokációja az aktiváció hatására. Forrás: [57].



7. ábra A rodopszin és arresztin-1 komplexének kristálystruktúrája. A, Zölddel a transz-retinált kötő egér rodopszin, barnával az egér arresztin-1 látható, oldalnézet. B-D, A rodopszin-arresztin interakciós pontok. B, Az ujj-hurok és az azt követő β -redő, C, a közép- és C-hurok által kialakított kötések a receptormaggal, D, a foszforilált receptor C-terminális és az arresztin-1 N-domén között létrejövő elektrosztatikus kapcsolatok. Források: [51, 52].

Az arresztinek GFKR-ekhez történő kötődése kétlépcsős folyamat. Elsőként az arresztin az N-doménjével kötődik a receptor C-terminálisához kapcsolt foszfátcsoporthoz. A receptor C-terminálishoz való kötéshez először az N-doménnek el kell engednie az arresztin saját C-terminálisát, mely folyamatot C-terminális cserének nevezzük. Ennek során a receptor-kapcsolt foszfát csoportok megbontják az N-domén bázikus aminosavai (R8, K11, K12, R26, K108), és az arresztin C-terminális negatív töltésű aminosavai (E390, D391) közötti kötéseket, így az arresztin C-terminális diszlokálódik. Ennek beindításában valószínűsíthetően a kapu-hurok egy konzervált lizinének (K300) foszfátkötése bír kiemelkedő jelentőséggel. A kapu-hurok hidrogénkötések révén részt vesz a poláros mag stabilizálásában az arresztin inaktív konformációjában. A foszfátkötés hatására azonban a kapu-hurok elmozdul, ami a poláros mag hidrogénhíd-hálózatának megbomlásán keresztül a poláros mag destabilizációját és sóhídjának megszűnését is okozza. A poláros mag felbomlásának hatására az arresztin C-terminális diszlokálódik, emellett egy a fehérjén belüli rotáció is létrejön: a C- és N-domén közötti pánton keresztül a C-domén 21° -kal elcsavarodik az N-doménhez képest. Az előbbieken felül a kapu-hurok mozgása a molekulán belül további konformációváltozásokat is előidéz. Az ujj-hurok kiegyenesedik, a közép- és C-hurok elmozdulása pedig egy új, receptorhurok befogadására képes hasadékot képez, így kialakul a receptort magas-affinitással kötő konformáció. Az aktivációs folyamat második lépcsőjében az arresztin kötődik az aktív receptor hét transzmembrán régiója és a közöttük feszülő intracelluláris hurok által képzett „receptor maghoz”, mely konformációs változások az előbbi fejezetben kerültek ismertetésre. A „magi” kötés további három interakciós felszín hoz létre a rodopszin-arresztin-1 komplex esetében. 1. Az ujj-hurok a receptor ICL1, ICL2, TM7 és hélix 8 régióival kapcsolódik. Az ujj-hurok a receptor olyan konzervált motívumaival lép így kapcsolatba, mint az E/DRY és az NPxxY. Érdekes módon az ujj-hurok másodlagos szerkezete megváltozik a kötés hatására és α -hélix struktúrát vesz fel, ami nagyon hasonló a transzducin G-fehérje α -alegységének C-terminális, receptort kötő régiójának struktúrájához. 2. Az arresztin közép- és C-hurkai által képzett hasadékba illeszkedik a receptor ICL2 hurokja. 3. Az arresztin ujj-hurkot követő β -redője a TM5, TM6 és ICL3 receptor régiókkal lép kapcsolatba. Látható, hogy a magi kötésben résztvevő receptorstruktúrák egy része kritikus fontosságú a G-fehérje kötés szempontjából is, ami magyarázatul szolgál az arresztinek és a G-fehérjék közötti

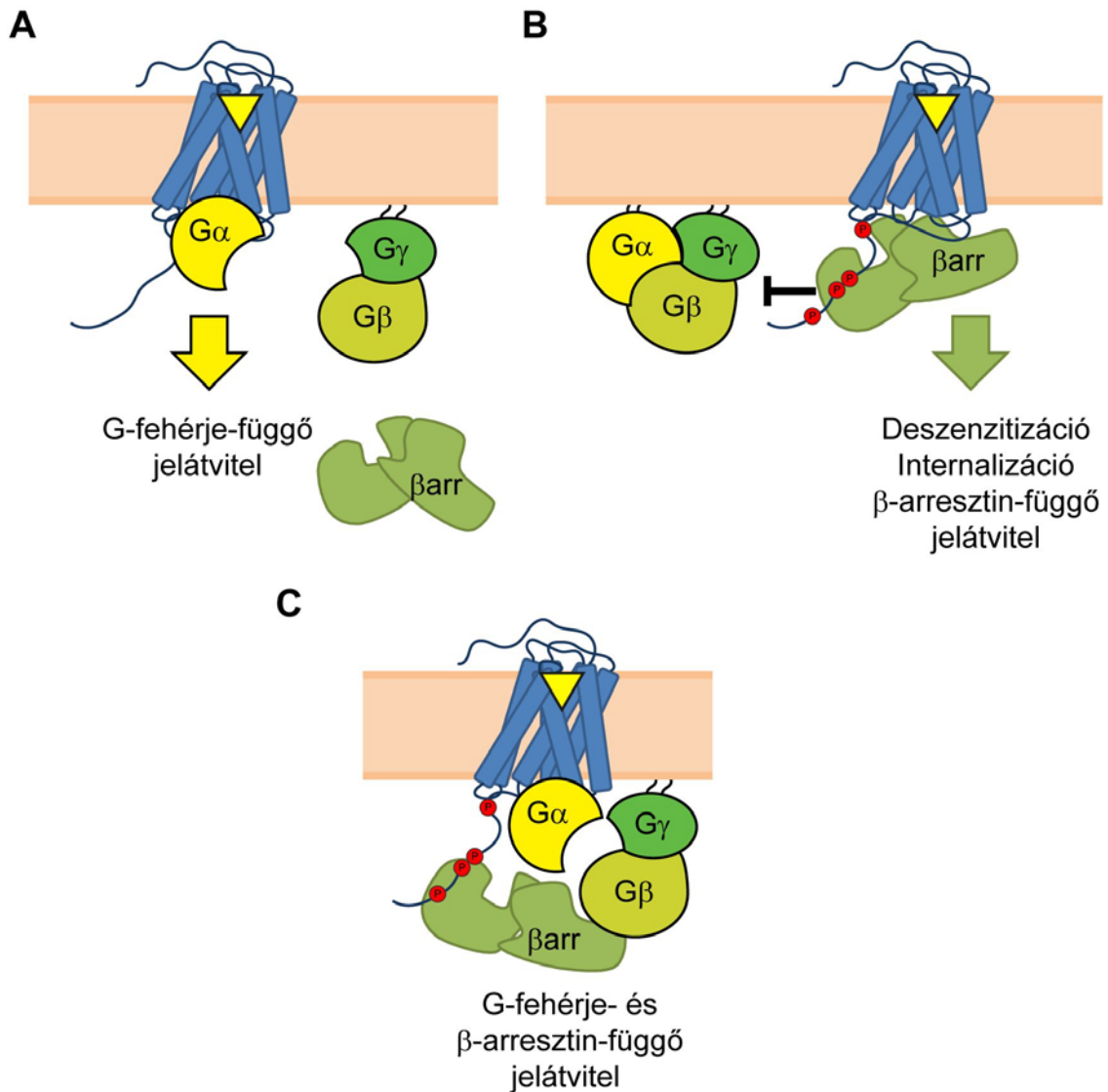
kompetícióra a receptorkötésért [51]. Hasonló kétlépcsős aktivációs mechanizmust találtak a β_2 AR-V₂R C-terminális kiméra receptor β -arresztin1 kötésének hidrogén/deutérium csere tömegspektrometriával történő vizsgálatakor [59]. Ezen eredmények érdekessége, hogy a csak receptor C-terminálist kötő állapotban („csak C-terminális interakció”) az arresztin „lefele lóg” a receptorról, és majd a magi kötéssel alakul csak ki a szoros kapcsolat. Ezáltal a csak C-terminális interakció esetén a receptor G-fehérje aktiválásának lehetősége továbbra is fennáll [60]. Mikor viszont a magi kötés létrejön, az arresztin sztérikusan gátolja a további G-fehérje aktivációt. Ennek jelentőségét a későbbiekben részletezem.

Feltűnő, hogy míg a két fehérje hasonló magassággal bír, az arresztin szélességben közel háromszor meghaladja a receptort. Így fennáll annak a lehetősége, hogy egy arresztin a dimert alkotó receptorok mindkét tagjával kapcsolatba lépjen más interakciós felszíneken, mint például a C-domén szélén (C-élen) keresztül [61]. A C-él számos hidrofób aminosavat tartalmaz, ami megteremti az arresztinek plazmamembránhoz történő horgonyzásának feltételeit [62]. Emellett a β -arresztinek C-doménjében PIP₂-t kötő bázikus aminosavak is találhatóak, melyek tovább segíthetik a membránnal való interakciót [63]. A β -arresztin2, a β -arresztin1-gyel szemben tartalmaz a C-terminális régiójában egy leucinban gazdag nukleáris export szignált, így a sejtmagban csak a β -arresztin1 izoforma fordul elő [64].

A β -arresztin2 konformációjának élő sejtben történő rezonancia energiatranszfer alapú vizsgálatai érdekes felfedezésekre vezettek a közelmúltban [65, 66]. A β -arresztin2 aktív konformációja nagyban függött attól, hogy mely receptorhoz kapcsolódott [65, 66]. Ez bizonyítékul szolgált arra a régebbi sejtszerepekre, hogy nemcsak egy, hanem számos különböző aktív β -arresztin konformáció létezik [29]. Az eltérő konformációk megváltozott β -arresztin funkcióval is párosultak, mutatva a különböző aktív β -arresztin konformációk sejtelettani jelentőséget. A receptorkötés és az arresztinen belüli konformációváltozás kinetikájának összehasonlítása pedig azt mutatta, hogy az arresztin a receptorról való disszociáció után pár másodpercig még megőrzi az aktív konformációját [66]. Ezen adatok felvetik, hogy az arresztinek egy katalitikus aktivációs cikluson mennek keresztül a G-fehérjéknél látottakhoz hasonlóan.

2.2.3.2. A β -arresztinek funkciói

A β -arresztinek a GFKR-ek szabályozásában kiemelt jelentőségű fehérjék. A β -arresztinek három legfontosabb szerepe a GFKR-ek deszenzitizálása, a receptorinternalizáció indukálása és β -arresztin-függő jelátviteli utak elindítása (8. ábra).



8. ábra A β -arresztinek fő funkciói. **A**, A GFKR-ek aktív konformációja fokozza a heterotrimer G-fehérjék aktivitását. **B**, Ez a hatás azonban megszűnik a β -arresztin receptormaghoz történő kötődése után annak szterikus gátló hatása miatt (deszenzitizáció), emellett a β -arresztinek kiváltják a receptorok endocitózist, ráadásul β -arresztin-függő jelátviteli pályák elindítása is megtörténhet. **C**, Ha a β -arresztin csak a foszforilált C-terminálshoz (a receptormaghoz viszont nem) kötődik, akkor létrejöhetnek receptor-G-fehérje- β -arresztin komplexek, melyek a klasszikus deszenzitizáló hatástól eltérően a fenntartott másodlagos hírvivő keletkezésért lehetnek felelősek.

2.2.3.2.1. Deszenzitizáció

Az élettani folyamatokban a biológiai választ elindító hatások mellett legalább olyan fontosak azok a mechanizmusok, melyek a jel leállításáért felelősek. Ezek együttese teremti meg a finomszabályozás lehetőségét.

Definíció szerint deszenzitizációnak nevezzük a receptorok ligandum iránti érzékenységének csökkenését előidéző folyamatokat [32]. Bár tágabb értelemben válaszkészség-csökkenéssel jár a teljes és/vagy sejtfelszíni receptorszám csökkenése (receptor „down-reguláció” ill. endocitózis által) vagy a jelátviteli apparátus mennyiségi összetételének változása is, de deszenzitizáció alatt csak azokat a folyamatokat értjük, melyek a plazmamembránban elhelyezkedő receptorok jelátviteli képességét közvetlenül csökkentik. Ezen folyamatok elkülönítése azért szükséges, mert mind kinetikában, mind mechanizmusban nagyban eltérnek egymástól.

Homológ deszenzitizációról akkor beszélünk, mikor egy receptor ismételt agonista kezelést követően kevésbé képes jelátvitelének megindítására. A homológ deszenzitizáció gyorsan, másodpercek-percek alatt kialakul, és legfontosabb effektorai a GRK kinázok és a β -arresztinek [32]. Az agonista-stimulált receptor a G-fehérje aktiválást követően GRK-k által foszforilálódik, majd a foszforilált és aktív konformációjú receptorhoz képes a β -arresztin kötődni nagy affinitással. Mivel a G-fehérjék és a β -arresztinek kötésében részt vevő receptorrégiók átfednek [9], így a bekötődött β -arresztin kompetitíven gátolja a receptor további G-fehérje kötését és aktivációját, ezzel létrejön a receptor G-fehérje-függő jelátvitelének deszenzitizációja [67]. A G-fehérje kötés teljes gátlásához mindenképp szükséges a β -arresztin ujj-hurok régiójának bekötődése a receptor magi régiójához, amit bizonyít, hogy ujj-hurok-deletált mutáns β -arresztin, amely csak C-terminális kötésre képes, nem hoz létre deszenzitizáló hatást [68].

A homológ deszenzitizációtól elkülönítendő a heterológ deszenzitizáció folyamata. Ebben az esetben egy receptor jelátvitelének aktiválása egy másik, agonistát még nem kötött receptor deszenzitizációját okozza [32]. Ezáltal az inaktív receptorok válaszkészsége is csökken. A heterológ deszenzitizációban a nem-GRK receptorkinázok, mint például a PKA és a PKC játszanak kiemelt szerepet a nem-stimulált receptorok foszforilációja által. Nem tisztázott, hogy a heterológ útvonal milyen módon hozza létre a deszenzitizáló hatást. Valószínűsíthető, hogy önmagában már a receptor foszforilációja

is gátló vagy moduláló hatással bír a G-fehérje aktiválásra [19, 32], de eddig a heterológ deszenzitizációt alapvetően a β -arresztinektől független folyamatnak gondolták.

A β -arresztinek a G-fehérje kötés gátlása mellett a G-fehérje-függő jel elcsendesítésében is fontos szerepet játszanak azáltal, hogy megkötnék és aktiválnak másodlagos hírvivők lebontásában szereplő enzimeket, mint például a foszfodiészteráz 4D-t vagy a diacil-glicerol kinázt [69, 70].

2.2.3.2.2. Receptorendocitózis

Az internalizáció folyamata során a receptorok a plazmamembránból intracelluláris vezikulákba helyeződnek át [71]. Hasonlóan a deszenzitizációhoz, a receptorinternalizáció szintén részt vesz a receptorok válaszkészségének mérséklésében a jelátvitel megindítására képes sejt felszíni receptorpopuláció mennyiségének csökkentésén keresztül. Az utóbbi években kiderült, hogy az internalizálódó receptor nem mindig „csendesül el”, hanem épp ellenkezőleg, az internalizáció a receptor jelátvitelének új útvonalait is elindíthatja. Ennek részletei a következő fejezetekben találhatóak.

Egyes receptorok, mint például a CB₁ kannabinoid receptor, konstitutívan, agonista hiányában is endocitózisra kerülnek [72], viszont a legtöbb receptor alapvetően agonista hatást követően internalizálódik [71]. A receptorendocitózisnak számos különböző mechanizmusa létezik. Egyes receptorok a plazmamembrán kaveolinban és koleszterinben gazdag invaginációin keresztül jutnak a sejt belsejébe, de a receptorok leggyakrabban klatrin-függő módon internalizálódnak [71]. A klatrin egy jellegzetes penta- és hexagoniális struktúrát alkotó fehérjehálózat a plazmamembrán belső felszínén (ill. a lefűződött vezikula felszínén), melynek alapegysége a háromágú, három-három nehéz és könnyű klatrin láncból összetevődő triszkelion [73]. Ahhoz, hogy a receptorinternalizáció létrejöhessen, a receptornak át kell helyeződnie a plazmamembrán klatrinnal fedett struktúráiba, az ún. klatrinburkos gödröcskébe [67]. Ennek mediálásában az adapter protein-2 (AP-2) fehérjekomplexnek van kiemelt szerepe, mely komplex 4 alegységből tevődik össze (α , β 2, μ 2, σ 2). Az AP-2 a β -arresztineken keresztül lép kapcsolatba a receptorral [74, 75]. A β -arresztinek C-terminálisa tartalmaz egy AP-2-kötő szekvenciát (³⁸³DDDIVFEDFARLRKLG⁴⁰⁰) [75, 76], mely a β -arresztin inaktív konformációjában fedve van: ekkor ez a régió a β -arresztin N-doménjéhez rögzül a 3-elemű interakción keresztül (ugyanis az AP-2-t kötő szekvencia tartalmazza az interakció

kialakításában szereplő XX. β -redőt), és részt vesz a poláros mag stabilizálásában (az R394 által). Az aktív, receptor-kötött β -arresztinben az arresztin C-terminális felszabadul [77, 78], így az képes kapcsolódni az AP-2 β 2-alegységéhez. Ez az interakció és az arresztin nagy-affinitású PIP₂ kötése váltja ki a receptor-arresztin komplex áthelyeződését preformált klatrinburkos gödröcskébe [63, 75]. A β -arresztin maga is közvetlenül kapcsolódik a klatrin nehéz láncához a C-terminálisán keresztül [79–81]; a fő klatrin-kötő motívum (³⁷³LIEFD³⁷⁹) az AP-2-kötő szekvencia mellett található [82]. A β -arresztin1 továbbá tartalmaz egy hurkot a 18. és a 19. β -redő között, ami nem található meg a β -arresztin2-ben (és a β -arresztin1 egy rövid variánsában sem), és szintén részt vesz a β -arresztin1 klatrin nehéz lánc kötésében [81]. A kialakult komplexhez számos további, az endocitózis megindításában fontos fehérje kapcsolódik [67, 73], melyek hatására a membrán mélyebb betüremkedése és lipidtartalmának megváltozása (többek között a foszfatidilinozitol-3,4-biszfósfát mennyiségének növekedése) jön létre [83, 84]. A teljes lefűződésért a GTP-áz-aktivitású dinamín fehérje a felelős, amely a klatrinburkos vezikulát annak nyakán keresztül lehasítja a plazmamembránról [73]. A β -arresztinek részt vesznek az endocitózis szabályozásában is internalizációt elősegítő fehérjék, mint az N-etilmaleimid-szenzitív fúziós fehérje, a kis G-fehérje adenozin-difoszfát-ribozilációs faktor 6 és a foszfatidilinozitol-4-foszfát-5-kináz megkötése által [85–87].

Az internalizálódott receptor- β -arresztin komplex féléletideje eltérő lehet a különböző receptorok esetében, amire zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*, GFP)-jelölt β -arresztinek sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata mutatott rá [88, 89]. Ezen tanulmányok szerint a receptorok két nagy (A- és B-) osztályba sorolhatóak a receptor- β -arresztin kötés tartóssága alapján. (Bár az osztályok nevei hasonlóak, ez a besorolás független a GFKR-ek homológia alapján történő osztályozásától. A továbbiakban, ha másként nem jelölöm, az A- és B-osztályú receptor elnevezések ezen klasszifikációra vonatkoznak.). Az „A-osztályú” receptorok csak tranziensen kötnek β -arresztint, a receptorendocitózist követően rövid időn belül megszűnik a két fehérje közötti kapcsolat, így a receptor- β -arresztin komplex csak a plazmamembrán közelében detektálható. Emellett az A-osztályú receptorok nagyobb affinitással kötik a β -arresztin2, mint a β -arresztin1 izoformát. A „B-osztályú” receptorok β -arresztin kötése ezzel szemben tartós, a β -arresztin együtt internalizálódik a receptorral, amit a GFP-jelölt β -arresztin korai endoszómákban történő megjelenése mutat. A B-osztályú receptorok

hasonló mértékben kötik a β -arresztin1 és β -arresztin2 fehérjéket. A két osztály eltérő kötéstabilitásában a receptorok foszforilációs vonalkódjának szerepét feltételezik [90]. Az A- és B-osztályú receptorok összehasonlító jellemzését a 3. táblázat tartalmazza. A B-osztályú receptorok általában több szerin-treonin csoportosulást tartalmaznak a C-terminális farkukon, melyeknek valószínűsíthetően megfelelő mintázatba kell rendeződniük, hogy a stabil kötés létrejöhessen [52, 90]. A megjelölt lehetséges mintázatok a P_xP_{xx}P/E/D és P_{xx}P_{xx}P/E/D, ahol a P foszforilált szerint, treonint (esetleg tirozint) jelöl, az utolsó pozícióban negatív töltésű aminosav (D vagy E) is szerepelhet [52].

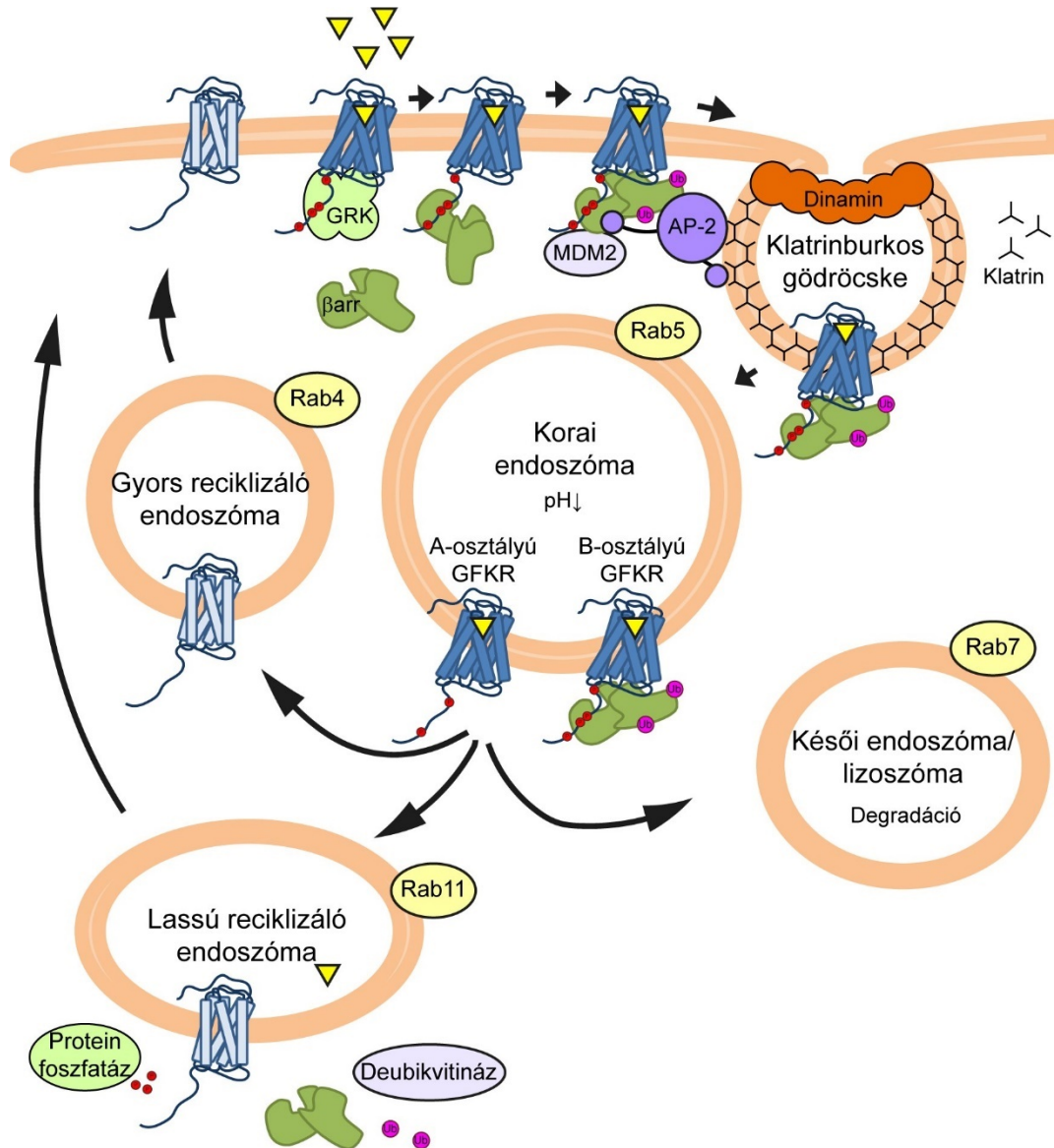
3. táblázat A β -arresztin kötésük alapján A- és B-osztályú GFKR-ek összehasonlítása.

	A-osztályú receptor	B-osztályú receptor
S-T klaszterek a receptor C-terminálisán	- / +	++
β -arresztin kötés erőssége	gyenge, tranziens	erős, stabil
β -arresztin izoformák iránti affinitás	β -arresztin2 >> β -arresztin1	β -arresztin2 ~ β -arresztin1
β -arresztin kötés kimutatható helye	plazmamembrán	plazmamembrán, endoszóma
β -arresztin ubikvitináció	tranziens	fenntartott, tartós
β -arresztin-függő ERK aktiváció	tranziens	fenntartott, tartós
Receptor sejten belüli sorsa	inkább gyors reciklizáció	inkább lassú reciklizáció vagy degradáció
Példák	β_2 adrenerg receptor, μ -ópioid receptor, A-típusú endotelin receptor, D _{1A} dopamin receptor	AT ₁ angiotenzin receptor, V ₂ vazopresszin receptor, tireotropin-felszabadító hormon receptor, P-anyag receptor

A receptor sorsa alapvetően két irányú lehet (9. ábra) [71]. Egyrészt a receptor a késői endoszómákon keresztül lizoszómákba kerülhet, ahol a receptor lebontásra kerül, ami a teljes receptorszám csökkenését okozza („down-reguláció”). Másrészt a receptor vissza is juthat a plazmamembránba reciklizáló endoszómák segítségével. Az endoszómákban alacsonyab pH található, ami elősegíti a ligandum disszociációját a receptorról az affinitás csökkentésén keresztül [91]. A β -arresztin elengedése után pedig protein foszfatázok (elsősorban a protein foszfatáz 1 és 2) lehasítják a foszfát csoportokat a receptorról, ami meggátolja az arresztin visszakötődését [91]. Így a reciklizálódó receptor visszanyeri érzékenységét: ezt reszenzitizációnak nevezzük. Bár az internalizáció nem létszükséges a GFKR-ek érzékenységének visszaállításában, hiszen a foszfatázok már a plazmamembránban is képesek defoszforilálni a receptort [91], de ezek az adatok jól mutatják, hogy az internalizáció fontos szerepét a GFKR-ek válaszkészségének szabályozásában.

A β -arresztinekről kimutatták, hogy befolyásolják a receptor intracelluláris sorsát is [92, 93]. Tranziens β -arresztin kötés esetén kifejezettebb a receptor gyors reciklizációja, ezzel szemben a β -arresztint tartósan kötő B osztályú receptorok inkább a lassú reciklizáció és a késői endoszóma-lizoszóma útvonalra terelődnek [94].

A sejten belüli vezikulamozgás és -fúzió szabályozásáért a Rab kis G-fehérjék felelősek, melyek izoformái jellegzetes eloszlást mutatnak. A Rab5 a korai endoszómákon található, a Rab4 a korai endoszómák mellett a korai reciklizáló endoszómákban fordul elő, a Rab11 a késői reciklizáló endoszómák jellegzetes Rab fehérjéje, míg a Rab7 a késői endoszómák és lizoszómák szabályozója [95]. A Rab fehérjéket ezért gyakran használják intracelluláris endoszóma markerként [96–99].



9. ábra A β -arresztinek szerepe a GFKR-ek endocitózisában. Az agonistát kötő receptor GRK enzimek által foszforilálódik, aminek hatására β -arresztin fehérjék kötődnek a receptorhoz két lépcsőben (először a C-terminális, majd a magi kötés jön létre). A receptor-kötött β -arresztin ubiquitinálódhat ubiquitin-ligáz (MDM2) hatására. A receptor- β -arresztin komplexet az AP-2 adapter fehérje transzlokálja preformált klatrinburkos gödröcskébe, így megindítja annak internalizációját: a receptort tartalmazó klatrinburkos gödröcske mélyül, majd dinamin fehérjék segítségével lefűződik a plazmamembránból, így klatrinburkos vezikulák alakulnak ki. Az intracelluláris vezikulák érése folyamán folyamatosan csökken a pH érték, ami elősegíti a ligand disszociációját a receptorról. A foszforilált receptor C-terminálisról protein foszfatázok lehasítják a foszfát csoportokat, a β -arresztin leválik és deubikvitinálódik (deubikvitinázok hatására). A receptor- β -arresztin kötés stabilitása alapján a receptorokat két nagy osztályba sorolhatjuk: az A-osztályú receptorok tranziensen, csak a plazmamembránban kötnek arresztint, míg a B-osztályú receptorokat a β -arresztinek követik a korai endoszómákba is. A korai endoszóma után a receptorok sorsa különböző lehet: egyrészt degradálódnak a késői endoszóma/lizoszóma útvonalon, míg más részük reciklizálódik a plazmamembránba. A vezikulamozgások szabályozásában Rab fehérjék vesznek részt, a korai endoszómák Rab5 tartalmúak, a késői endoszómák/lizoszómák jellegzetes markere a Rab7, míg a Rab4 a korai reciklizáló, a Rab11 pedig a késői reciklizáló vezikulákban található meg.

2.2.3.2.3. β -arresztin-függő jelátvitel

A β -arresztinek receptorkötésének felfedezése után röviddel kiderült, hogy a β -arresztineknek számos más nem receptor partnere is lehet, melyek között jelentős mennyiségben található jelátviteli fehérje [64, 100, 101]. A β -arresztinek a sejten belül három formában fordulnak elő: szabadon, mikrotubulushoz kötve vagy receptor-kötött, aktív állapotban [102]. Ezen formák különböző konformációval rendelkeznek, és eltérő affinitással bírhatnak a β -arresztin interakciós partnerei felé. Ennek eredményeképp a β -arresztin receptorkötése után egyes fehérjéket elenged, míg másokat odaköt a receptor- β -arresztin komplexhez. Az aktív, receptor-kötött β -arresztin mint egy vázfehérje képes szignalizációs komplexek létrehozására, melyekben a jelátviteli kaszkád komponenseinek térben egymáshoz közeli elhelyezkedése lehetővé teszi azok aktivációját [64]. Másrészt az effektorfehérjék szekvesztrálása gátolhatja azok mozgását, ezáltal célfehérjék elérését, ami az effektor funkciójának gátlását idézi elő [64]. Ezen példák jól mutatják, hogy a β -arresztinek a jelátviteli utak fontos szabályozói faktoraiként szolgálnak.

Elsőként a celluláris szarkóma kináz (c-Src) és a mitogén-aktivált protein (MAP) kinázok (MAPK) β -arresztin-függő aktivációját írták le [103–105]. Az emlős sejtek számos különböző MAP kinázt expresszálnak, melyeket 3 csoportba oszthatunk: extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) kaszkád, c-Jun N-terminális kináz (JNK) kaszkád és a p38 MAP kináz kaszkád [64]. A MAP kinázok háromelemű kaszkádokat alkotnak, melyekben egy MAP kináz kináz kináz (MAPKKK, például a *rapidly accelerating fibrosarcoma kinase 1* (Raf1)) foszforilál egy MAP kináz kinázt (MAPKK, például MAPK/ERK kináz (MEK) 1 és 2), ami egy MAP kináz (MAPK, például ERK1 és ERK2) aktivitását hozza létre szintén foszforiláció útján. Nem meglepő módon a MAP kináz kaszkád szabályozásában gyakran szerepelnek vázfehérjék a szignalizációs komplex (szignálszóma) összeállításának segítségével [106]. A β -arresztinek képesek mindhárom MAP kináz szignálszóma (ERK: Raf1-MEK1-ERK1/2; JNK: apoptózis szignál által regulált kináz 1 (ASK1)-mitogén aktivált protein kináz kináz (MKK) 4/7-JNK1/2/3; p38: ASK1-MKK3-p38) kialakítására, de ez a képesség függ a β -arresztin konformációjától [107]. A JNK-k hasonló affinitással kötődnek a szabad és receptor-kötött β -arresztinekhez, ezzel szemben az ERK2 csak az aktív és a mikrotubulus-asszociált formákkal lép interakcióba [64, 106, 107]. Ráadásul a β -arresztin2 különböző

GFKR-ekhez más-más aktív konformációban kötődik, mely konformációk eltérnek az ERK aktiváló képességükben [65].

Az aktív β -arresztin2 ERK2 kötése régóta ismert, mely kötésről a korai vizsgálatok azt mutatták, hogy fontos szereppel bír az ERK aktivációban [105, 108]. Az AT₁ angiotenzin receptor (AT₁R) angiotenzin II hatására egy elnyújtott kinetikájú ERK foszforilációt hoz létre, melyből a korai komponens G_q-aktiváció- és PKC-függő, míg kis interferáló RNS-sel (siRNS-sel) történő géncsendesítés alapján a β -arresztin2 bizonyult szükségesnek a késői ERK válasz létrejöttéhez [108, 109]. A késői komponenst olyan ligandumok és mutáns receptorok is kiváltották, melyek G_q-fehérje aktivációt nem, de β -arresztin kötést indukálnak [108]. Innen eredt a β -arresztin-függő jelátviteli utak (bár helytelenül) szinonimaként használt „G-fehérje-független jelátvitel” elnevezése. SiRNS-alapú géncsendesítéssel számos más receptor, mint például a β_2 AR vagy a V₂R esetében is kimutatták β -arresztin-mediált ERK választ [110, 111]. A közelmúlt egy nagy vihart kavart tanulmánya viszont azt találta, hogy a β -arresztinek nem szükségesek az ERK válasz létrejöttéhez sem a β_2 AR, sem a V₂R esetében, amit a β -arresztin gének CRISPR és TALEN technikákkal történő kiütésével bizonyítottak [112]. Ezek az ellentmondásos adatok kétségessé tették a β -arresztinek ERK válasz indukálásában betöltött szerepét. Mindenesetre az biztosnak tűnik, hogy a kialakult aktivált ERK- β -arresztin komplex hatással van az ERK effektorfunkciójára: a β -arresztin megakadályozza az ERK magba történő transzlokációját, így kivédi az ERK sejtproliferációt és -hipertrófiát indukáló hatását [105, 113]. Ezzel szemben a foszforilált ERK citoplazmatikus fehérjékkal léphet kapcsolatba, aminek fontos szerepe van a vezikuláris transzport, a citoskeletális átrendeződés és a fehérjeszintézis szabályozásában [64]. Utóbbi az MNK1 és az eukarióta transzláció iniciációs faktor 4E foszforilációján keresztül létre [114].

A β -arresztinek képesek a fehérjeszintézist más módon is fokozni. Az arresztin komplexet képez a protein foszfatáz 2A (PP2A), AKT és a glikogén szintetáz kináz 3 β (GSK3 β) fehérjékkal [115, 116], ami növeli az emlős rapamicin célpont fehérje (*mammalian target of rapamycin*, mTOR) útvonalon keresztüli proteinszintézist [117].

Érdekes módon az AT₁R aktivációját nemcsak ligandumkötés, hanem membránfeszülés hatására is kimutatták [118]. A feszülés hatására aktiválódott receptornak a β -arresztin iránti megnövekedett affinitását találták [119], ráadásul egy közelmúltban megjelent tanulmányban az AT₁R és a β -arresztinek központi szerepét

mutatták ki a szív kontraktilitásának heterometriás (Frank-Starling) szabályozásában [120].

A β -arresztinek szerepe a sejtproliferációban receptor, sejt- és kontextusfüggő. Egyrészt a β -arresztinek számos módon fejtenek ki gátló hatást a sejtproliferációt serkentő jelátviteli utakra: deszenzitizálják a receptort és kivédik a MAP kinázok sejtmagba történő transzlokációját. Ennek megfelelően β -arresztin2 hiányos (*knock-out*, KO) egerekből származó primer oszteoblasztok gyorsabb növekedést mutattak a vad típusúakhoz képest [121]. Másrészt a β -arresztin2-KO érsimaizomsejtek proliferációja és migrációja elmaradt [122], ami a β -arresztin2 proliferációt elősegítő funkcióját sugallja. Ezt a hatást valószínűleg az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor transzaktivációján keresztül jöhet létre [123]. A β -arresztin-PP2A-Akt-GSK3 β komplex fokozza a túlélési jelpályák aktivitását is [124]. Ennek ellenére a β -arresztinek sejttúlélés szabályozásában betöltött szerepe nem egyértelmű, bizonyos körülmények között akár ellentétes hatásokkal is bírhatnak. A β -arresztin csökkenti a p53 ubikvitinációját és degradációját az Mdm2 ubikvitin-ligáz szekvesztrálásán keresztül, ami elősegíti az apoptózis létrejöttét [125]. A β -arresztinek a sejtmigráció és a kemotaxis folyamatainak is kiemelt jelentőségű szabályozói [64]. Egyrészt a kemoattraktánsok gradiensének érzékeléséhez szükséges a β -arresztinek deszenzitizáló hatása [64]. Másrészt a citoskeletális átrendeződés vezérlésében leírtak a β -arresztin-függő módon aktivált ERK, p38 MAPK, RhoA vagy a RalA kis G-fehérjék szerepét is [126–129]. Ezen jelpályák fontosak lehetnek a metasztázis képződésben is [130, 131].

Sokáig azt gondoltuk, hogy a G-fehérjék és a β -arresztinek a receptorkötésért történő kompetíció miatt kötelezően antagonistikus hatással bírnak egymásra. Ennek a dogmának az elmúlt évek olyan megfigyelései mondtak ellen, miszerint egyes G_s -fehérje kapcsolt receptorok, mint például a parathormon receptor, internalizációt követően is indukálnak cAMP-termelést [60, 132–135]. Ráadásul ez a mechanizmus β -arresztin-függőnek is mutatkozott, ami teljesen ellentmondott a β -arresztinek deszenzitizáló hatásáról alkotott nézeteinknek. Ennek a paradoxonnak a feloldása a GFKR- G_s -fehérje- β -arresztin szuperkomplex közelmúltban történő azonosításával sikerült [60]. Ebben a komplexben a receptor magi kötőhelyéhez a $G\alpha_s$ -alegység kötődik, míg a β -arresztin a GFKR-hoz csak a foszforilált receptor C-termináláson keresztül kapcsolódik, továbbá a komplex stabilizálásában részt vesz a β -arresztin $G\beta\gamma$ -alegységhez történő interakciója is

(8. ábra, C). Ezt a szuperkomplexet főleg β -arresztint stabilan kötő (B-osztályú) receptorok esetében sikerült kimutatni. Ezen eredmények felvetik, hogy a β -arresztinek receptorszabályozó funkciója kompartmentfüggést mutat: a plazmamembránban elsősorban a deszenzitizáló hatásuk érvényesül [133], míg intracellulárisan részt vesznek a G-fehérje-függő jelátvitel mediálásában [60, 134], azaz bizonyos szignalizációs útvonalak egyszerre igénylik mindkét effektor aktivitását.

Az előbbieken felsoroltak csak egy kis szeletét képezik a β -arresztinek által szabályozott mechanizmusok körének. Egy korábbi proteomikai vizsgálat azt találta, hogy a β -arresztinek több száz különböző fehérjével képesek kötést létesíteni, mely interakciók jelentős része csak receptorstimuláció hatására jön létre [136]. Továbbá az AT₁R β -arresztin-függő jelátvitel szintén több száz fehérje foszforilációs állapotát befolyásolja [137]. Nem meglepő módon, a β -arresztinek számos komplex élettani folyamat fontos regulátorainak bizonyultak, mint például a természetes és adaptív immunválasz, az embrionális fejlődés, a lokomotor aktivitás vagy a tanulás és memória [64]. Ezen folyamatok esetében gyakran nehéz megmondani, hogy a β -arresztinek mely hatásai erednek a GFKR-ek deszenzitizálásából vagy a β -arresztin-függő jelátvitelből. Utóbbiak elválasztása azért fontos, mert különleges jelentőségű terápiás célpontként szolgálhatnak (lásd később).

Fontos megjegyezni, hogy léteznek β -arresztin izoforma-specifikus hatások [138]. A két β -arresztin képes egymást helyettesíteni a β -arresztinek legtöbb funkcióiban, mivel míg a mindkét izoformára génhányos egerek neonatális életkorban elpusztulnak, addig a csak β -arresztin1- vagy csak β -arresztin2-KO állatok nem rendelkeznek kirívó fenotípusos eltéréssel normál körülmények között [139]. Számos példa mutatja viszont, hogy a két izoforma különböző szabályozó funkcióval bír egyes mechanizmusokban. Az AT₁R stimulációja által létrehozott ERK válaszban csak a β -arresztin2 szerepel, ezzel szemben a β -arresztin1 gátlóan hat az ERK foszforilációra [140]. A CB₁ kannabinoid receptor esetében viszont az ERK válasz β -arresztin1-függőnek bizonyult [141], és a β -arresztin2 felelős elsősorban a receptor deszenzitizációjáért és internalizációjáért [72, 141]. A CB₁ kannabinoid receptor (és minden más β -arresztin kötés alapján A-osztályú receptor) iránt a β -arresztin2 nagyobb affinitással bír, mint a β -arresztin1 [72, 89]. A β -arresztin2 deszenzitizálja és internalizálja a szintén A-osztályú β_2 adrenerg receptort

[142], de a krónikus β_2 AR aktiváció által kiváltott DNS-károsodásban a β -arresztin szerepét mutatták ki [125].

2.2.3.3. A β -arresztinek poszttranszlációs szabályozása

A β -arresztinek működésének szabályozásában a foszforiláció, ubikvitináció és az S-nitroziláció szerepét is leírták [67]. Számos kináz képes β -arresztint foszforilálni, mint például a MEK1/2, ERK1/2, GRK5 vagy a kazein kináz II [143–149]. Érdekes módon a β -arresztinek foszforilációs mintázata a β -arresztin aktivitásától és receptorpartnerétől függően változhat [143–145]. Az első tanulmányok azt mutatták, hogy inaktív állapotban jóval magasabb az arresztinek foszforiláltsága, ami receptorkötés hatására lecsökken protein foszfatázok aktiválásán keresztül [144, 145]. A defoszforilált forma magasabb affinitással bír a klatrin felé, ezzel elősegíti a receptor endocitózisát [145, 146]. Ellenben a 383-as pozícióban található treonin foszforilációjának növekedését találták, ha a β -arresztin2 a szerotonin 2C receptorhoz kapcsolódott [143]. Ugyanezt nem lehetett megfigyelni szerotonin 4 receptorok esetében [143]. Ráadásul ez a foszforiláció, amely MEK-en keresztül jön létre, szükségesnek mutatkozott a β -arresztin-függő ERK válasz kiváltásához. A β -arresztin2 egy foszforiláció-függő aktiváló mechanizmusát is leírták. A szerzők az S14 és a T276 aminosavak ERK1/2 általi foszforilációját találták, amely foszforiláció előidézi a 4-es típusú C-X-C kemokin (CXCR₄) és más receptorok internalizációját [147].

A β -arresztinek ubikvitinációja szintén jelentős allosztérikus szabályozó funkciót képvisel [67]. Az ubikvitinációért az MDM2 (*mouse double minute 2*) ubikvitin ligáz, míg annak lehasításáért az ubikvitin-specifikus proteáz 33 (USP33) a felelős [150]. Az ubikvitináció receptorkötés hatására jön létre, melynek mértéke, helye és kinetikája receptorfüggést mutat. Az A- és B-osztályú receptorok nemcsak különböző β -arresztin kötés stabilitással rendelkeznek, hanem eltérő tartósságú β -arresztin ubikvitinációt is indukálnak [150–152]. Emellett a szerzők azt találták, hogyha a β -arresztin ubikvitinációjának mértékét megváltoztatják (MDM2 és USP33 géncsendesítésével vagy overexpressziójával), az módosíthatja a receptor β -arresztin kötés alapján történő osztálybesorolását [150]. Ez azt sugallta, hogy az A és B osztályú receptorok eltérő foszforilációs vonalkódjához a β -arresztinek különböző konformációban képesek kötődni, mely konformációk eltérő affinitással kapcsolódnak ubikvitin ligáz és

deubikvitináz enzimekkel. Ezáltal különböző „ubikvitinációs kódok” jöhetnek létre a β -arresztinek felszínén, mely kódok meghatározzák a receptor- β -arresztin kötés stabilitását, ezzel pedig a β -arresztin-függő ERK válasz tartósságát [93]. Az ubikvitináció emellett elősegíti a receptor internalizációját is a megnövekedett affinitású β -arresztin-klatrin kötésen keresztül [93].

A nitrogén-oxid is reakcióba léphet a β -arresztin² cisztein oldalláncaival, mely folyamatot S-nitrozilációnak nevezünk. Az S-nitroziláció szerepét szintén a receptor internalizáció előmozdításában mutatták ki [153].

2.3. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok és más plazmamembrán receptorok közötti kölcsönhatások

Az eddig felsoroltak jól mutatják, hogy a GFKR-ek működését számos mechanizmus finomhangolja. Ezen adatok azonban jórészt olyan kísérletes felállásokból származnak, ahol csak egy bizonyos receptor funkcióját vizsgálták annak szelektív stimulációjával. A biológia rendszerekben viszont receptorok sokasága működik párhuzamosan, melyek szintén befolyással lehetnek egymás funkcióira. A receptorok együttműködésének jelentőségét kiválóan illusztrálja a különböző ionotróp glutamát receptorok együttes aktivációjának szükségessége a hosszútávú potenciózás jelenségének létrejöttéhez. A receptorinterakciók lehetséges száma oly nagy, hogy mindegyik ismertetése meghaladná a dolgozat kereteit. Ezért csak a GFKR-ek egymással és más plazmamembrán receptorokkal történő kölcsönhatásait mutatom be, és azok közül is főként az akut (nem gén- és fehérjeexpresszió befolyásoláson keresztüli) hatásokra fókuszálok.

A receptorinterakciók számos módja elképzelhető és ismert. Ezek hatása lehet gátló, additív vagy akár szinergista is. A kölcsönhatás támadáspontja alapján legalább 4-féle típusú interakciót különböztethetünk meg a teoretikus, egyazon sejten fellelhető „X” és „Y” receptorok között: I., X receptor befolyásolhatja az Y receptorhoz kötődni képes ligandum mennyiségét; II., X receptor közvetetten (például jelátviteli utak aktiválásán keresztül) hatással van az Y fehérje működésére; III., X receptor stimulációjának hatására megváltozik az Y receptor effektorainak funkciója; IV., X és Y receptor közvetlen kapcsolatba lépnek egymással és allosztérikusan szabályozzák egymást.

2.3.1. Interakciók a ligandum mennyiségének megváltozásán keresztül

Számos élettani példa létezik a ligandummennyiség befolyásolásán keresztüli interakcióra. Ezek közül az egyik legrégebben ismert jelenség a kalcium jel arachidonsav metabolitok keletkezését indukáló hatása [154]. A trombociták aktivációjának egyik fontos lépése a citoszolikus Ca^{2+} jel kialakulása, amelyet többek között $\text{G}_{q/11}$ -kapcsolt receptorok stimulációja vált ki. A $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedése foszfolipáz A_2 és ciklooxygenáz enzimeken keresztül a tromboxán A_2 termelődését eredményezi, mely mediátor a vazokonstriktor és trombocita-aktivátor hatását szintén GFKR-on keresztül hozza létre [154]. $\text{G}_{q/11}$ -kapcsolt receptorok aktivációjakor egy másik lipid, a 2-arachidonil-glicerin (2-AG) is keletkezhet [155, 156]. A $\text{PLC}\beta$ aktiváció eredményeként felszabaduló DAG-ot a DAG-lipáz tovább hasítja, melyből az endokannabinod 2-AG jön létre. A 2-AG autokrin és parakrin módon CB_1 receptort aktiválhat, ami csökkenti a vazokonstriktor anyagok érösszehúzó hatását [157, 158].

Ezen kölcsönhatás típusnál nem mindig jön létre új ligandummolekula, elég, ha csupán a ligandum elérhetősége változik meg. Szintén trombocitaaktivációkor figyelhető meg, hogy a kiváltott Ca^{2+} jel hatására preformált szekréción vezikulák exocitózisra kerülnek, így a felszabaduló adrenalin és szerotonin bekötődhet a trombocitán található GFKR receptorukhoz [154]. Nemcsak GFKR ligandumok szabadulhatnak fel receptoraktiváció hatására. GFKR és más típusú plazmamembrán receptor közötti legismertebb kölcsönhatás az EGF receptor (EGFR) transzaktivációja, aminek nagy jelentőséget tulajdonítanak például az hipertóniás érfalelváltozások kialakulásában, a tumornövekedésben és a metasztázisképzésben [159]. A ligandum-függő EGFR transzaktiváció mátrix metalloproteináz (MMP) enzimek aktivációján keresztül jön létre, melyek EGFR ligandumokat (EGF-et, a transzformáló növekedési faktor α -t vagy amfiregulint) szabadítanak fel membránfehérjék hasításán keresztül [159]. Az MMP-k aktiválásában számos különböző, GFKR-ról induló jelátviteli útvonal szerepelhet, leírták többek között a kalcium jel, a szarkóma kináz (Src), a PKC, reaktív oxigéngyökök és a β -arresztinek részvételét is [159].

A ligandum mennyisége nemcsak nőhet, hanem akár csökkenhet is egy másik mediátor hatására, ha az a képzésért felelős enzimek gátlását vagy a lebontó enzimek

aktiválódását hozza létre. Erre példa a neuregulin-1 2-AG-lebontást növelő hatása a hippokampális gátló interneuronokban [160].

2.3.2. Jelátviteli utakon keresztüli heterológ aktiváció és gátlás

A jelátviteli hálózatok komplexitása miatt sokszor megjósolhatatlan, hogy a különböző jelátvitellel rendelkező receptorok párhuzamos aktivációja milyen biológiai választ eredményez. Ez ráadásul még sejtspecificitást is mutat. Jól ismert, hogy míg a simaizomsejtben a $G_{q/11}$ - és G_s -kapcsolt receptorok szimultán aktivációja antagonisztikus a kontrakcióra kifejtett hatásukban [161], addig például a gyomor fedősejtjeiben a Ca^{2+} és a cAMP jel szinergista hatással bír a sósavszekréció serkentésére [162]. Ezen kölcsönhatások jó része az intracelluláris effektorok befolyásolásán keresztül történik, de általános érvényű leírás nem adható róluk. Ebben a fejezetben a jelátvitelnek csak a receptorműködést közvetlenül befolyásoló hatásait mutatom be, melyek szintén kiemelt biológiai és farmakológiai jelentőséggel bírnak.

A jelátvitel legismertebb receptorfunkciót befolyásoló hatása a heterológ deszenzitizáció [32]. A heterológ deszenzitizáció (lásd 2.2.3.2.1. fejezet) egy olyan receptorérzékenység csökkenést kiváltó mechanizmus, ami a receptor foszforilációján keresztül jön létre, és egy másik receptor stimulációja váltja ki. Nagyon gyakran azonos jelátvitellel rendelkező receptorok gátolják ezúton egymás funkcióját, így a heterológ deszenzitizáció a jelátvitel szintjén létrejövő túlaktiváció elleni védekezés egyik fontos biológiai mechanizmusaként szolgál.

Bizonyos receptorok esetében megfigyelhető azok endocitózisa heterológ aktivációt követően is [32]. Általában ez a mechanizmus β -arresztin-függetlennek mutatkozott [32, 163], de egyes esetekben domináns negatív β -arresztin expresszálatása által kivédhető volt ez a jelenség [164–166]. Ennek mechanizmusa nem tisztázott, egy kanadai munkacsoport az ERK által foszforilált β -arresztin2 szerepét mutatta ki a CXCR₄ kemokin és számos más receptor heterológ internalizációjában [147].

A heterológ gátlás egyik formája lehet az ugyanazon effektorért történő kompetíció is. Ennek feltétele, hogy az effektor mennyisége a receptorokéhoz képest limitált legyen. β_2AR -t és V_2R -t koexpresszááló HEK 293 sejtekben a V_2R elszívja az endogén β -arresztint a β_2AR elől, így az utóbbinak elmarad az endocitózisa, de ez a gátlás feloldható β -arresztin koexpresszálatásával [167]. Hasonlót eddig csak overexpressziós

rendszerben sikerült kimutatni [168], ahol a receptor expressziója jelentősen meghaladja a β -arresztinét, ezért ezen mechanizmusok fiziológiai jelentősége kérdéses. A $G_{q/11}$ -kapcsolt receptorok gátolhatják más receptorok internalizációját a plazmamembrán PIP_2 -szint befolyásolásán keresztül, mivel a $PLC\beta$ aktiváció által lecsökken az endocitózis szabályozásában fontos PIP_2 mennyisége [169, 170].

Az EGFR transzaktivációja létrejöhet EGFR ligandumtól függetlenül is [159], mivel a tirozin kináz Src szintén képes az EGFR foszforilációjára. Ezáltal tirozin foszforilációt felismerő adapter- és effektorfehérjék kapcsolódnak az EGFR-hez, és közvetítik annak jelátvitelét. Az Src aktiváció több különböző módon is létrejöhet GFKR-ek által, leírtak β -arresztin- és G-fehérje függő útvonalait is [123, 159, 171]. Az EGFR mellett ismert más receptor tirozin kinázok (például trombocita-eredetű növekedési faktor receptor) heterológ aktivációja is [172].

Egyes GFKR-ek egy különleges heterológ szabályozási mechanizmussal is bírnak. Számos purinerg, dopaminerg, katekolaminerg és kolinerg receptorról mutatták ki, hogy működésük függ az intra- és extracelluláris oldal közötti feszültségkülönbségtől [173]. Így felmerül az is, hogy az ionsatorna receptorok is aktiválhatják vagy gátolhatják a GFKR-ek működését a membránpotenciál befolyásolásán keresztül.

2.3.3. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok magasabb rendű szerveződése

A GFKR-ek dimer vagy oligomer képzésének lehetősége a receptorműködés finomszabályozásának egyik legérdekesebb és legvitatottabb területe [174–177]. A homodimerek két azonos protomerből állnak, míg egy heterodimert két különböző receptor alkot. A szerkezeti homológia alapján C-osztályú (metabotróp glutamát-szerű) receptorokról egyértelműen bizonyított, hogy működésükhöz szükséges a dimerizáció kialakulása az N- és C-terminálisaik közötti interakciók és kovalens kötésék által [178]. Ennek megfelelően a C-osztályú γ -amino-vaajsav B ($GABA_B$) receptor is két alegységből ($GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$) tevődik össze. A $GABA_{B2}$ felelős a G-fehérje kötésért és a heterodimer plazmamembránba történő kihelyeződéséért, de nem tartalmaz ligandum kötőhelyet. A $GABA_{B1}$ képes a ligandum kötésére, viszont tartalmaz egy endoplazmás retikulum retenciós szignált, ami miatt nem jut ki a plazmamembránba. Sem a $GABA_{B1}$, sem a $GABA_{B2}$ nem képes önállóan vagy homodimerként betölteni a receptor funkcióját. Heterodimerizáció hatására azonban a $GABA_{B2}$ elfedi a $GABA_{B1}$ endoplazmás retikulum

retenciós szignálját, ezáltal a GABA_{B1} is megjelenik a sejtfelszínen [179–181]. Az ízérezékelésben szereplő 1-es típusú ízérezékelő receptorok (T1R) is heterodimereket képeznek. A T1R1 és T1R3 komplexe felelős az umami íz érzékeléséért, míg a T1R2-T1R3 dimer az édes íz felismerésében szerepel [178].

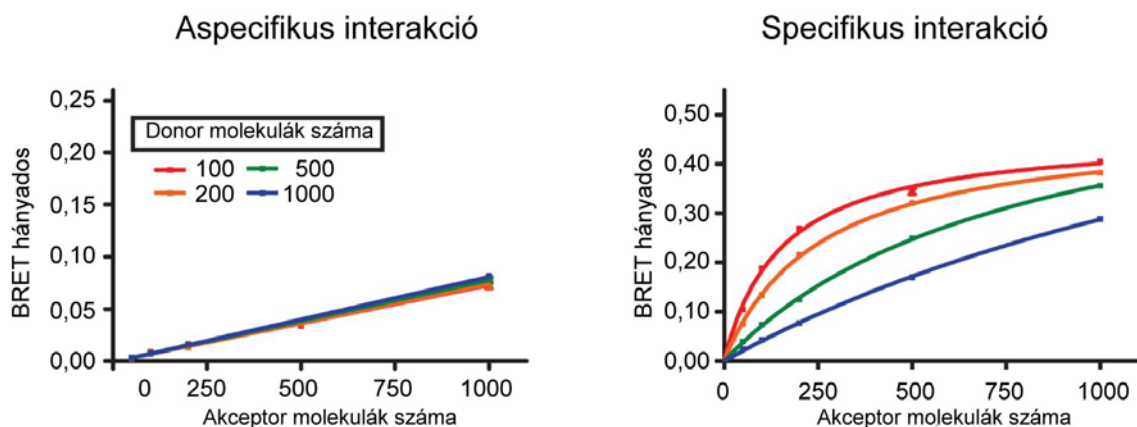
Az utóbbi évtizedekben számos adat keletkezett amellett, hogy a rodopszin-szerű (szerkezet alapján A-osztályú) GFKR-ek is képesek magasabb rendű szerveződésekre, dimerekbe és oligomerekbe tömörülni. Ennek ellenére még mind a mai napig vitatott a rodopszin-szerű receptorok oligomerizációjának létezése és fiziológia jelentősége, ami abból ered, hogy a dimerizáció vizsgálatára kifejlesztett eddigi módszerek korlátozott megbízhatósággal rendelkeznek [174].

2.3.3.1. A GFKR dimer tagjai közötti fizikai kapcsolat

A dimerizáció tényének legfontosabb bizonyítéka a protomerek közötti direkt fizikális interakció kimutatása. Az első ilyen célból alkalmazott módszerek a western blot és koimmunprecipitáció technikák voltak [174]. Ezen módszerek azon alapulnak, hogy gélelektroforézissel történő fehérje szeparáció után a dimer magasabb molekulatömegű fehérjecsíkot ad a monomerhez képest, továbbá a fizikai kapcsolat miatt a dimer egyik tagjának precipitációjával lehúzható a másik protomer. Gyorsan bebizonyosodott, hogy ezen módszerek számos műterméket és fals konklúziót eredményeztek. Egyrészt nem lehet egzaktan megállapítani a monomer fehérje molekulatömegét, mivel a GFKR-ek erősen glikozilálódnak. Másrészt, a koimmunprecipitáció eredményét nagymértékben meghatározhatja a detergensből használt mennyiség. A túl sok detergens megszüntetheti a dimer tagok közötti interakciót a lipiddkörnyezet megváltoztatása miatt, a nem elegendő szolubilizáció viszont a receptorok membránfoltokban maradását eredményezheti, így a receptorok direkt interakció nélkül is együtt precipitálódhatnak. Emellett a fehérjeminta kezelése során is létrejöhetnek aggregátumok az addig nem kapcsolódó fehérjék között [174]. A fizikai interakció legelfogadottabb vizsgálómódszereivé a rezonancia energiáttranszfer (RET) alapú technikák váltak [182]. A RET jelensége egy fényt emittáló donor és egy gerjeszthető akceptor molekula között jön létre, ami az akceptor gerjesztődését és fényemisszióját eredményezi. Mivel a RET csak akkor alakul ki, ha a donor és az akceptor molekuláris szintű közelségben (<10 nm) helyezkednek el, a RET alapú rendszerek kiválóan alkalmasak fehérje-fehérje interakciók kimutatására akár élő

sejtekben is. Az utóbbi években azonban kiderült, hogy az ezen technikákkal nyert eredmények kiértékelése is nagy óvatosságot és megfelelő kontrollokat igényel [183, 184]. A fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer (FRET) és biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) módszerek alkalmazásához szükséges általában a (rendszerint valamilyen módon megjelölt) receptorok bizonyos fokú overexpresszáltatása [182]. Ennek hatására azonban a membránban sokkal több receptor található meg, mint fiziológias körülmények között, így a receptorok közötti gyenge asszociáció jelentősége túlértékelődhet [174]. Másrészt a RET a két molekula közötti távolságról (és/vagy orientációról) ad információt, és nem közvetlenül a fizikai kötődést mutatja ki. Aspecifikus RET alakulhat ki két véletlenszerűen ütköző molekula között is, amelynek mértéke egyenesen arányos az akceptor mennyiségével [183]. A specifikus és aspecifikus jelek elkülönítésére korábban kvantitatív BRET mérések elvégzését javasolták. Ezen mérések során a sejtekben az akceptor-jelölt receptor mennyiségét fokozatosan növelik a donor-jelölt receptor mennyiségének állandóan tartása mellett, és a keletkezett BRET jelet az akceptor és donor mennyiség hányadosának függvényében ábrázolják [185]. Aspecifikus interakció esetén a függvény pontjai egy lineáris görbére illeszkednek, míg specifikus kötés esetén egy telítési görbét kapunk. Munkacsoportunk azonban nemrég kimutatta, hogy a donor mennyiségének állandóan tartása az expressziós rendszerekben általában kivitelezhetetlen, ami megakadályozza ezen görbék korrekt kiértékelését [183]. Nagyon hasonló következtetésre jutott egy másik munkacsoport is [184].

Az előbb részletezett limitációkon felülkerekedhetünk, ha a BRET mértékét változó donor és változó akceptor mennyiség mellett is meghatározzuk, és a BRET jelet az akceptor mennyiségének függvényében ábrázoljuk (10. ábra) [183]. Aspecifikus kapcsolat esetén a BRET jel csak az akceptor mennyiségétől függ, minden pont egyazon egyenesre illeszkedik. Specifikus interakció esetén viszont a BRET jelet meghatározza a donorexpresszió mértéke is: az alacsony ill. magas donorexpresszió mellett meghatározott mérési pontokra eltérő meredekségű egyeneseket illeszthetünk [183]. Ezen szigorú kritériumok mentén végzett vizsgálatok megkérdőjelezték számos korábban leírt receptordimer létezését, viszont egyes dimerek esetében megerősítették a korábbi eredményeket [183, 184].

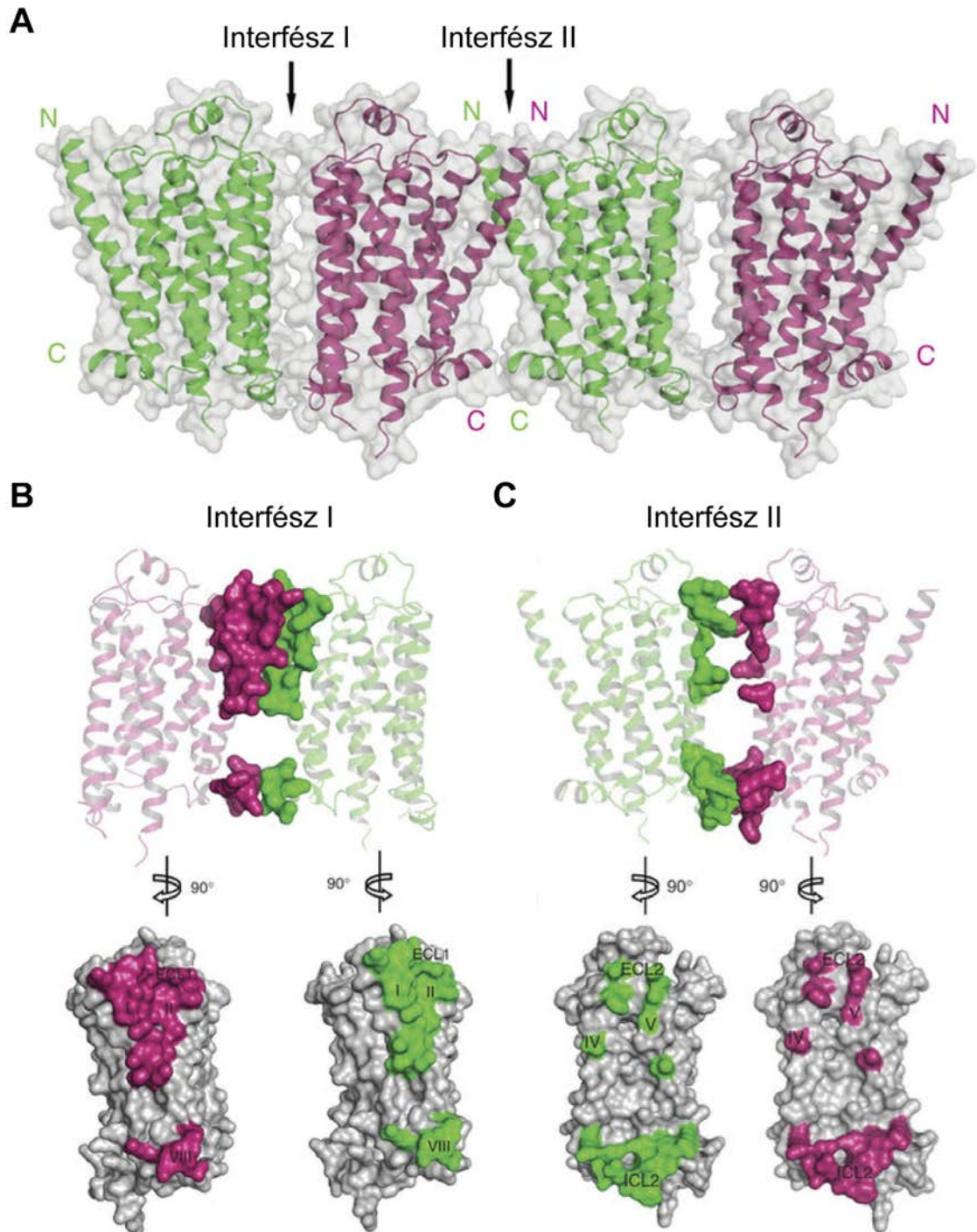


10. ábra A BRET hányados akceptor- és donormennyiség függése aspecifikus és specifikus fehérjeinterakciók esetén. A munkacsoport Monte-Carlo szimulációkat végzett annak vizsgálatára, hogy a BRET jel hogyan változik különböző mennyiségű donor-jelölt és akceptor-jelölt fehérjék között, ha a két fehérje között nincs (bal panel) vagy van (jobb panel) specifikus kapcsolat [183]. A BRET hányados mértéke független a donor molekulák számától specifikus interakció hiányában, azt csak az akceptorok száma határozza meg. Specifikus interakció esetén azonban mind a donor, mind az akceptor molekulák száma befolyásolja a BRET hányados nagyságát. Forrás: [183]

A receptordimerizáció egyik legkézzelfoghatóbb bizonyítéka az, hogy egyes rodopszin-szerű GFKR-eket (a CXCR₄, a μ -ópioid, a κ -ópioid és a β_1 adrenerg receptorokat) homodimer vagy homotetramer formában sikerült kikristályosítani (11. ábra) [186–189]. Ezen struktúrák információval szolgáltattak a dimerizációban résztvevő szerkezeti elemekről (a „dimer interfészről”) is. A C-osztályú receptoroktól eltérően a rodopszin-szerű receptorok között nem alakulnak ki kovalens kötések, a protomerek transzmembrán hélicei csak elektrosztatikus, hidrofób és hidrogénhid kötésekkel keresztül asszociálnak egymással. Érdekes módon a dimer interfész receptorfüggőnek mutatkozott. A dimer interfészekben azonban több elem is közös volt, mint például a TM5-TM6 kapcsolat, a TM3 és TM4 citoplazmatikus végeinek kötődése, vagy a TM1-TM2-hélix 8 interfész, de más régiók is szerepelnek a komplexek kialakításában. Fontos megjegyezni, hogy a kikristályosítás műtermékek képződését is előidézheti, így fenntartással kell kezelnünk ezen eredményeket is, de ezek egy részét keresztkötési kísérletek is megerősítették [177].

Az egyedi molekula érzékenységgel vizsgálatok a dimerek meglepően transziens voltát találták, élettartamuk a néhány 10 milliszekundum és a pár másodperc között változott [190–192], ami szintén kérdésessé tette a rodopszin-szerű receptorok dimerizációjának élettani jelentőségét. Megjegyzendő azonban, hogy ezek az adatok arról

nem adnak információt, hogy a dimer az effektorral komplexben mennyire stabilan marad fenn. Ez jelentősen különbözhet, hisz az effektorok a receptorok fontos allosztérikus szabályozói [13].



11. ábra A β_1 AR homotetramer kristályszerkezete. A pulyka β_1 AR krisztallizációja során oligomerképződés volt megfigyelhető (A), a protomerek között két különböző dimerizációs interfésszel. Az első interfészben az ECL1, TM1, TM2 és hélix 8 vesz részt (A), míg a második interfész az ECL2, TM4, TM5 és ICL2 között (B) alakul ki. Forrás: [189].

2.3.3.2. A GFKR dimerizáció funkcionális hatásai

A dimerizáció fiziológiai és farmakológiai jelentősége mellett az indirekt vizsgálati módszerekkel kapott eredmények szólnak [193, 194].

Egyes elképzelések szerint a dimerizáció már a receptorok szintézisének és érésének korai lépéseiben, az endoplazmás retikulumban és a Golgi-apparátusban kialakulhat [195]. A korai dimerizáció valószínűleg részt vesz a receptorok megfelelő érésében, ugyanis a tekeredésükben zavart, endoplazmás retikulum retenciós mutáns receptorok gátolhatják a vad típusú receptor plazmamembránba történő kihelyeződését [196, 197]. A dimerizáció azonban segíthet is a megfelelő tekeredés létrejöttésben, amit jól mutat a fejezet elején bemutatott GABA_{B1}-GABA_{B2} dimer.

A dimerizáció egyik leggyakrabban leírt következménye a negatív kooperativitás jelensége a ligandumkötésben [177]. Röviden ez annyit jelent, hogy az egyik protomer agonistakötése gátolja a másik alegység agonistakötését. Ezáltal a dimerizáció gyakran negatív allosztérikus szabályozószerreppel bír. Megjegyzendő, hogy a negatív kooperativitás jelensége overexpressziós műtermék is lehet, ha a receptorok mennyisége az effektorokénál jóval magasabb [198]. Ugyanis az effektorok, például a G-fehérjének a kötése megnöveli a receptorok agonistaaffinitását [13], és a receptorok effektorért történő kompetíciója a negatív kooperációhoz hasonló ligandumkötési görbét eredményezhet [198]. Negatív kooperációt azonban sikerült már natív szövetben is kimutatni fluoreszcens ligandumok segítségével időfelbontásos FRET vizsgálatokban [199], ami megerősíti annak farmakológiai jelentőségét.

A dimeren belüli kölcsönhatások a protomerek konformációjára is hatással lehetnek. BRET- és FRET-alapú receptorkonformáció szenzorokkal több ízben is sikerült kimutatni, hogy a dimer egyik tagjának stimulációja konformációváltozást hoz létre a másik, agonistát nem kötő alegységben [200–203]. Ezek az adatok támogatják azt az elképzelést, miszerint a dimer két alegysége közötti intradimerikus kommunikáció allosztérikus szabályozó funkcióval bír, ami magyarázatul szolgálhat a ligandumkötésben megfigyelhető negatív kooperativitásra és a dimerizáció egyéb működésbeli következményeire.

Akár a ligandumkötés, akár a G-fehérje aktiválás képességének megszűnése a receptor működésének súlyos zavarát okozza, a dimerizáció azonban „megmentheti” a funkciójában károsodott receptorokat. A luteinizáló hormon receptor esetében ezt *in vitro*

és *in vivo* is sikerült kimutatni: egy ligandumot nem kötő mutáns receptor és egy G-fehérjét nem aktiváló mutáns sejten belüli együttes kifejezése feltehetőleg dimerizáció útján helyreállította azok szignalizációját és biológiai funkcióját [204–206].

Több adat is bizonyítja, hogy a GFKR-ek monomer formái elegendőek a G-fehérje és β -arresztin aktiváció létrehozására [8, 59, 207, 208]. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a dimerizáció befolyással bírhat az effektorok aktivációjára [194, 209]. Az elmúlt években számos ezt támogató adat keletkezett, de fontos megjegyezni, hogy a G-fehérje és a β -arresztin kötést intracelluláris (mint például RGS vagy GRK) fehérjék aktivitásának változása is befolyásolhatja, így a következőkben hozott példák nem szolgálnak a dimerizáció minden kétséget kizáró bizonyítékaiként.

Gyakran megfigyelt jelenség, hogy az egyik protomer ligandumkötése megváltoztathatja a másik protomer G-fehérje kötésének hatékonyságát. Egy leleményes kísérletsorozatban azt találták, hogy a D_2 dopamin receptor homodimernek akkor a legerősebb a G-fehérje aktiválása, ha az egyik alegység agonistát, míg a másik inverz agonistát köt [210]. Mindkét alegység agonista kötése viszont csökkenti a dimer G-fehérje aktiválási képességét. Ezzel szemben az AT_1R - β_2AR heterodimer esetében keresztgátlást figyeltek meg: a dimer egyik tagjának antagonisták kötése gátolta a másik tag G-fehérje aktiválását [211]. Munkacsoportunk hasonló jelenséget figyelt meg az AT_1R homodimerrel kapcsolatban [212], továbbá az AT_1R homodimer egyik alegységének agonistával történő stimulálása kiváltotta a másik alegység β -arresztin kötését [183]. Hasonló eredményekről számoltak be a C-X-C kemokin receptor $2-\alpha_{1A}$ adrenerg receptor heterodimer esetében is [213]. Az alegységek közötti erősebb fizikai interakció akár a receptorok együttes sejten belüli mozgását is eredményezheti. Például a V_{1A} - V_2 vazopresszin receptor heterodimer bármely tagjának internalizációja beviszi magával a másik alegységet is intracelluláris vezikulákba [214]. Hasonló tulajdonsággal bír a β_2AR homodimer is [215]. A dimerizáció a G-fehérje kötést nemcsak mennyiségileg, hanem minőségileg is megváltoztathatja. A D_1 - D_2 dopamin receptor heterodimer G_q -fehérje aktivációra képes, míg a D_1 és D_2 dopamin receptorok önmagukban G_s - ill. $G_{i/o}$ -kapcsoltak [216]. A megváltozott jelátvitelű heterodimer szerepe felmerült a major depresszió patogenezisében is [217]. Eltérő G-fehérje aktivációs mintázat vetődött fel az AT_1R - CB_1 kannabinoid receptor heterodimerrel kapcsolatban is [218]. A dimerizáció hatására a β -arresztin kötés tulajdonságai is megváltozhatnak: például az A-osztályú V_{1A}

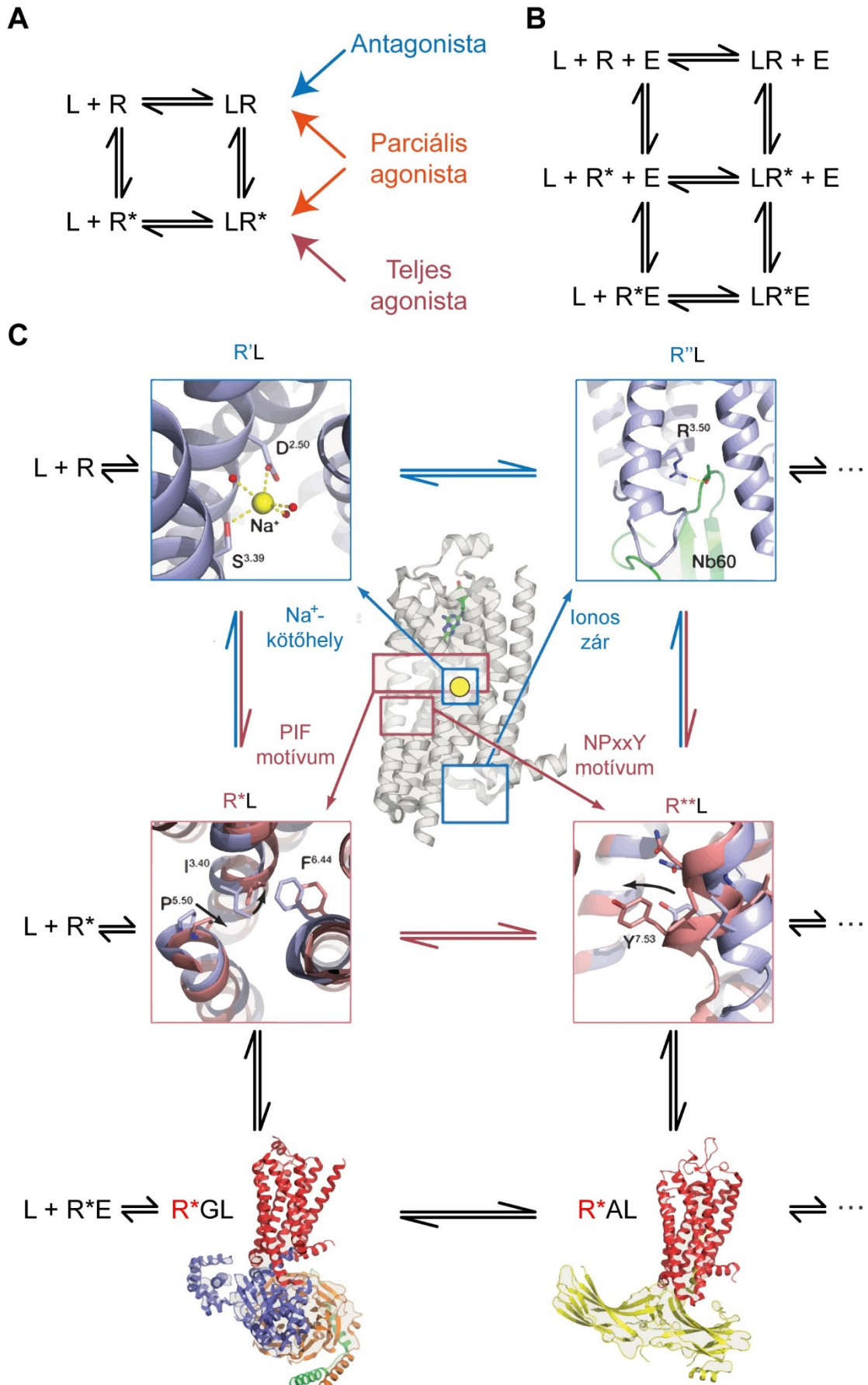
receptor a V_2 receptorral történő heterodimerizációjakor B-osztályúvá válik [214]. A μ - és δ -ópioid receptorok heterodimere pedig csökkent G-fehérje aktiválást és fokozott β -arresztin kötést mutat [219]. A μ - δ heterodimer mennyiségének növekedésére utaló adatokat mutattak ki krónikus fájdalomban, ami hozzájárulhat az ópiát típusú fájdalomcsillapítók iránt kialakuló toleranciában [220]. Érdeemes megjegyezni, hogy mind a G-fehérjék, mind a β -arresztinek a monomer receptoroknál jóval szélesebb molekulák, ezért felmerült, hogy a dimerizáció nemcsak allosztérikus szabályozással, hanem új kötőhely kialakításán keresztül is befolyásolhatja az effektorok kötését [177]. Ebben a felállásban a dimer két tagja egyszerre kötné ugyanazon effektor molekulát, melyhez mindkét protomer aktivációjának szükségességét feltételezik [177, 221]. A G-fehérjék esetében a $\beta\gamma$ -alegység közvetítő szerepe merült fel [8, 177], míg a β -arresztin az egyik protomert az N-, a másikat a C-doménjén keresztül kötheti [61, 177]. Ennek lehetőségét támogatja az a megfigyelés, hogy a pálcika külső szegmentumából preparált membránokban a rodopszin-arresztin kötési sztöchiometria az aktivált receptorok mennyiségétől függően 1:1 és 2:1 között változott [61].

Az itt felsorolt példák jól mutatják, hogy a receptor oligomerek új funkcionális egységeket képezhetnek, melyek különleges jelátviteli és szabályozási tulajdonságokkal bírhatnak. Ezáltal a dimerizációnak fontos szerepe lehet az élettani folyamatok finomhangolásában, ami felveti, hogy a heterodimerek célzott gyógyszeres támadásával új, specifikusabb és szelektívebb terápiás lehetőségekhez juthatunk (lásd alább).

2.4. Új perspektívák a GFKR-eket célzó farmakológiai beavatkozásokban

Számos betegség hátterében megtalálható valamely GFKR rendellenes működése, melynek gyógyszeres megváltoztatása rengeteg esetben bizonyult jótékony hatásúnak [222]. A GFKR-ek kiemelt gyógyszeres jelentőségét jól mutatja az a tény, hogy a ma forgalomban lévő gyógyszerek körülbelül harmada rendelkezik GFKR támadásponttal [222]. Ezért nem meglepő, hogy a GFKR-ek új ligandumjainak felfedezésére irányuló vizsgálatok mind a mai napig kiemelt kutatási területet jelentenek.

Régóta ismert, hogy az agonisták különbözhetnek a receptorról induló biológiai jel kiváltásának képességében: a teljes agonisták teljes választ, míg a parciális agonisták csak részleges aktivációt idéznek elő [223]. Az antagonisták ezzel szemben nem hoznak létre aktivitást, és kivédik az agonisták hatását. Egyes receptorok rendelkeznek ligandum hiányában is valamilyen mértékű jelátvitellel, melyet a különböző antagonisták eltérő módon változtathatnak. Az inverz agonisták megszüntetik a konstitutív aktivitást, míg a neutrális agonisták nem befolyásolják azt. Arra a kérdésre, hogy mi az oka a parciális és teljes agonisták eltérő effektivitásának, több magyarázó modell is keletkezett. Az első modellek abból indultak ki, hogy az inaktív (R) és az aktív (R*) receptorállapotok között egyensúly áll fenn, mely reakció ($R \rightleftharpoons R^*$) stimuláció nélkül erősen eltolta az inaktív állapot irányába (12. ábra, A). Teljes agonista hatásra minden receptor R* állapotba kerül, míg antagonistá (konstitutívan aktív receptor esetén inverz agonista) kötés után csak az R állapot fordul elő. Ezekkel szemben a parciális agonisták mindkét konformációt stabilizálják, így egy köztes állapotot idéznek elő. Ez a modell későbbiekben számos kiegészítésre szorult, mint például a receptorok effektor kötésének ligandumaffinitást növelő tulajdonságának tényével („ternary complex”) vagy a konstitutív aktivitás jelenségével (12. ábra, B) [13, 224]. Továbbá az is világossá vált, hogy az agonista nem szimplán válogat az aktív és inaktív receptorkonformációk között, hanem a kötés aktívan hozzájárulhat az aktív konformáció kialakulásához [225, 226].

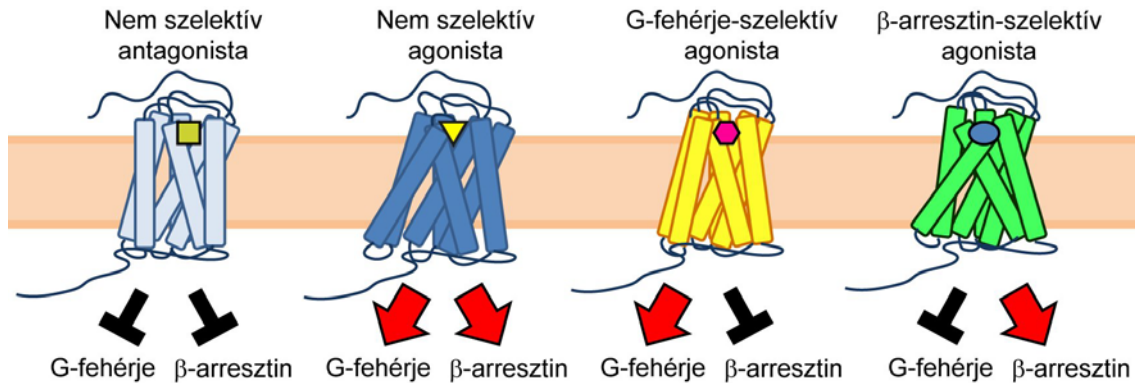


12. ábra A ligandum-receptor interakciót leíró matematikai modellek. A, A konformációs szelekciós modell. Ligandumkötés hiányában a receptor inaktív (R) és aktív (R*) állapota közötti reakció erősen eltolódott az inaktív állapot felé. Ha egy ligandum (L) teljes agonista, akkor annak kötődése az aktív állapotot stabilizálja, míg az antagonistá az inaktív konformációhoz kötődik (LR: ligandum-kötött receptor). A parciális agonista affinis mindkét állapot felé, így egy köztes állapot jön létre. **B,** A kibővített „ternary complex” modell. Az előbbihez képest ez a modell az effektor (E) allosztérikus szabályozó szerepét is számításba veszi, ugyanis ismert, hogy az effektor (G-fehérje (G) vagy arresztin (A)) kötődésének hatására megváltozik (megnő) az agonista affinitása a receptor felé. A modell fontos alapfeltevése, hogy csak az R* állapot képes effektorra kötni. Bizonyos receptorok esetében agonistakötés nélkül is jelentős mennyiségű receptor van R* állapotban, az ilyen receptorokat konstitutívan aktívnak hívjuk. **C,** A funkcionális szelektivitás leírására alkalmas ternary complex modell. Ebben a modellben megjelenik az az információ is, hogy a receptor különböző aktív konformációkat (R* és R**) vehet fel, melyek különböző affinitással rendelkeznek a legfontosabb effektorok (G-fehérjék ill. β -arresztinek) felé. A funkcionálisan szelektív ligandumok előnyben részesítik bizonyos konformációk stabilizációját. Az ábrán jelölve vannak a receptor aktivációért és funkcionális szelektivitásért felelős legfontosabb strukturális motívumok (lásd 1. ábra). Forrás: [227].

Az előbbieket mellett arra is fény derült, hogy a receptorok nem csak egyetlen aktív és inaktív konformációval rendelkezhetnek [9]. Az A_{2A} adenosin receptort az aktív mellett intermedier konformációban is sikerült kikristályosítani [228, 229]. ¹⁹F-mágneses magrezonancia spektroszkópia vizsgálatok pedig kimutatták, hogy a β_2 AR agonisták különböző aktív konformációkat képesek stabilizálni [230], továbbá inaktív konformációból is legalább kettő van [231]. Ráadásul az eltérő aktív konformációk különböző affinitással rendelkezhetnek a receptor effektorai felé (12. ábra, C) [1]. Az ehhez kapcsolódó első felismerések még a 1980-as évekből származnak, mikor is kiderült, hogy egy receptor több különböző G-fehérjéhez is kapcsolódhat [232]. Bizonyos ligandumok viszont „válogattak” a G-fehérje altípusok között, a ligandum „elfogult” volt az egyik jelátvitel irányába, azaz nem egyenlő mértékben aktiválta őket [232]. Az ilyen tulajdonságú molekulákat jelátvitel-szelektív agonistáknak nevezték el, de elterjedt a funkcionálisan szelektív és elfogult agonista kifejezések használata is [1, 233]. Az előbbiekből következik, hogy a receptorokat nem lehet szimplán egy egyszerű kapcsoló berendezésnek elképzelni, amely a van/nincs jelátvitel két állapota között válogathat, hanem azok a sejtek precíz szabályozó berendezései, melyeket finomhangolni lehet különböző ligandumok segítségével.

A jelátvitel-szelektivitással foglalkozó kutatások talán egyik legfontosabb mérföldkövét jelentette, mikor kiderült, hogy el lehet választani egymástól a β -arresztin és a G-fehérje aktiválást is receptorligandumok segítségével, tehát lehetséges szelektíven csak az egyik jelátviteli utat farmakológiailag aktiválni (13. ábra) [108, 234]. Ez azért

volt nagyon lényeges, mert a későbbiekben kiderült, hogy számos esetben a gyógyszerek hatásait az egyik effektor, míg a mellékhatásait a másik közvetíti [233].



13. ábra A funkcionális szelektivitás egyszerűsített sémája. A hagyományos, nem szelektív antagonisták gátolják a receptor minden jelátvivő funkcióját, míg a nem szelektív agonisták beindítják az összes jelátviteli utat. Ezzel szemben a funkcionális szelektivitással rendelkező ligandumok „válogatnak” az effektorok között: a G-fehérje- és a β -arresztin-szelektív agonisták vagy csak a G-fehérje ill. vagy csak a β -arresztin aktiválódását hozzák létre.

Az első ilyen tulajdonságú ligandumokat az AT_1R esetében fedezték fel [108, 234]. Az AT_1R endogén agonistája az angiotenzin II (AngII), ami egy oktapeptid (Asp-Arg-Val-Lys-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), és a vérnyomás és só-vízháztartás szabályozásában kitüntetett szerepet játszó renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválódása esetén képződik [235]. Az AngII hatására a $G_{q/11}$ -fehérjék és a β -arresztinek aktiválódása is létrejön. Az AngII G-fehérje-mediált hatásai többek között az érösszehúzódás fokozása, az aldoszteron szekréció növelése, a sóretenció és az arginin-vazopresszin termelésének emelése, melyek fontos tényezők a hipertenzió és a krónikus szívelégtelenség kialakulásában [235, 236]. Ellenben állatkísérletes adatok alapján az AT_1R -nek β -arresztineken keresztül léteznek terápiás szempontból jótékony hatásai is: a szív munkaizomzatban az inotrópiót fokozza és növeli a vese perfúzióját [237, 238]. Így elméletileg előnyös gyógyszerhatásprofilal rendelkezhet egy olyan jelátvitel-szelektív AT_1R agonista, amely a G-fehérje aktiválás szempontjából antagonistaként, míg a β -arresztin kötés esetében agonistaként viselkedik [236]. Az AngII oktapeptid 8-as pozíciójában található Phe aminosav nem aromásra cserélésének hatására a peptid közel teljesen elveszti a G-fehérje aktiváló képességét, míg a receptor β -arresztin kötése és internalizációja megmarad [108, 234, 239]. A peptid további módosításaival elérhetővé vált, hogy a peptid által stabilizált konformáció egyáltalán ne aktiváljon G-fehérjét. Ilyen

peptidek többek között a [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-AngII (Sar=szarkozin) vagy a Treneva gyógyszercég által kifejlesztett TRV120023 ([Sar¹,Lys⁵,Ala⁸-OH]-AngII) és TRV120027 ([Sar¹,D-Ala⁸-OH]-AngII) [234, 240]. A jelátvitel-szelektív peptidek hatására megváltozott receptorkonformációs profilt intramolekuláris BRET konformációs szenzorok segítségével is igazolták [241]. Ezek a peptidek a hagyományos AT₁R antagonistákhoz hasonlóan vérnyomáscsökkentő hatással bírnak, viszont fokozzák a szív kontrakcióját, kedvezően hatnak a szívimomsejtek túlélésére és növelik a vese vérátáramlását [238, 242, 243]. Ezért a TRV120027 molekulát el is kezdték az akut szívelégtelenség gyógyítására alkalmas gyógyszerként vizsgálni. Az ígéretes állatkísérletes adatok ellenére a fázis IIB vizsgálatban a gyógyszer nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket [244]. Ez azonban nem zárja ki, hogy más betegségek terápiájában a jelátvitel-szelektív (főleg a nem peptid természetű) AT₁R agonisták hasznosak lehetnek. Egy további érdekes kérdés, hogy a jelátvitel-szelektív ligandumok hogyan befolyásolják a receptor heterodimerek működését. A [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-AngII másképp hat az AT₁R-B₂ bradikinin receptor heterodimer funkciójára, mint a hagyományos AT₁R antagonistá lozartán [245]. Bár az AT₁R-B₂ bradikinin receptor heterodimer létezésének ténye a terület egy erősen vitatott kérdése [246, 247], de ez az eredmény felveti, hogy a jelátvitel-szelektív ligandumok egyes hatásait a receptordimerek is közvetítik. Érdemes megjegyezni, hogy az angiotenzin II metabolit angiotenzin-(1-7) a Mas receptor mellett az AT₁R-hez is képes kötődni nagyon alacsony affinitással [235, 248]. Hasonló jelátvitel-szelektív tulajdonsággal rendelkezik, mint az előbb említett peptidek, amit valószínűleg a Phe⁸ hiánya magyaráz [249]. Ez a példa mutatja, hogy endogén anyagok is rendelkezhetnek funkcionális szelektivitással.

A katekolamin receptorok a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerhez hasonlóan kiemelt fontosságú terápiás célpontok. Például a β_2 AR agonisták az asthma bronchiale terápiájának fontos hörgőtágító hatású szereik, viszont alkalmazásukkor gyakran megfigyelhető a gyógyszer iránti tolerancia kifejlődése, azaz ismételt adagolás esetén a nagyobb dózis szükségessége az ugyanolyan mértékű hatás eléréséhez [233]. Mivel a β -arresztin központi szereplője a receptor érzéketlenítésének, így felmerül, hogy csökkent mértékű toleranciát mutathatnak a G-fehérje-felé jelátvitel-szelektív β_2 AR agonisták. Ezt az elképzelést támogatja az a megfigyelés, hogy β -arresztin2-KO egerekben erőteljesebb légúti simaizomrelaxáció jön létre β_2 AR agonista hatásra [250].

Leírtak β -arresztin irányában elfogult, jelátvitel-szelektív β adrenerg receptor agonistákat is. Például a G-fehérje kötés szempontjából nem szelektív α_1 és β adrenerg receptor antagonistá karvedilolról kimutatták, hogy kiváltja a β_1 és a β_2 adrenerg receptorok GRK-általi foszforilációját és β -arresztin függő-jelátvitelét is [28, 251, 252]. Ezek a mechanizmusok hozzájárulhatnak a karvedilol kedvező hatásaihoz a krónikus szívelégtelenség terápiájában [233].

Az ópoidok a ma elérhető leghatékonyabb fájdalomcsillapító szerek közé tartoznak, viszont veszélyes légzésdeprimáló mellékhatásuk behatárolja alkalmazási lehetőségüket [236]. Kiderült, hogy a μ -ópoid receptor a terápiás szempontból kedvező analgetikus hatást és a nemkívánatos mellékhatásokat (légzésdeprimáció, székrekedés) különböző jelpályákon hozza létre. Morfium adagolása esetén β -arresztin2-KO állatokban nem alakul ki légzésdepresszió és kevésbé fejlődik ki székrekedés, míg a fájdalomcsökkentő hatás fokozott [253, 254]. Emellett a β -arresztin deszenzitizáló hatásának hiányában a tolerancia is kisebb mértékben alakult ki [255]. Az előbbieknél megfelelő hatásokat tapasztaltak G-fehérje-felé jelátvitel-szelektív μ -ópoid receptor agonisták alkalmazása esetén is, így ezen ligandumok a jövő kedvezőbb mellékhatásprofilú fájdalomcsillapító gyógyszerei lehetnek [256, 257].

Megjegyzendő, hogy a jelátvitel-szelektív agonizmus leggyakrabban csak bizonyos fokú elfogultságban jelenik meg valamelyik jelátviteli út irányában, melynek jellemzésében segít az „elfogultsági faktor” vagy a „transzdukciós koeficiens” meghatározása [258, 259]. (Ezek részletes bemutatása meghaladná a dolgozat kereteit, ezért ettől eltekintek). Számos további receptor esetében merült fel, hogy kedvező lehet támadásuk jelátvitel-szelektív agonisták segítségével specifikusabb gyógyszeres terápia alkalmazásának céljából, így a jelátvitel-szelektív agonizmus egy új érat nyitott a farmakológiai kutatásokban [1, 233, 236].

Hasonlóan intenzív kutatás tárgyát képezik az allosztérikus ligandumok [260]. Az allosztérikus ligandumok az ortosztérikus ligandumoktól eltérő helyen kötődnek, viszont pozitív vagy negatív irányú befolyással lehetnek azok hatásaira, ami akár jelátvitel szelektivitásban is megnyilvánulhat. Ráadásul az allosztérikus ligandumok kötőhelyének elérhetősége függ a receptor környezetétől, így az gyakran szövet- és sejtfüggést mutat, ezáltal az allosztérikus ligandumok a célzott terápia új alternatíváit nyújthatják [260].

A receptor heterodimerizáció szerepét felvetették számos kórkép patomechanizmusában [261], a 4. táblázatban felsoroltam néhány példát a teljesség igénye nélkül.

4. táblázat **Betegségek háttérében leírt receptor heterodimerek.** Forrás: [261].

Kórállapot	A heterodimert képző receptorok
Parkinson-kór	<ul style="list-style-type: none"> • A₁ adenzin – D₁ dopamin • A_{2A} adenzin – 5-ös típusú metabotróp glutamát • A_{2A} adenzin – D₂ dopamin-5-ös típusú metabotróp glutamát
Szkizofrénia	<ul style="list-style-type: none"> • A₁ adenzin – 1-es típusú metabotróp • A_{2A} adenzin – D₂ dopamin • A_{2A} adenzin – D₂ dopamin-5-ös típusú metabotróp glutamát • D₂ dopamin – szerotonin 2A • D₂ dopamin – neurotenzin 1
Depresszió	<ul style="list-style-type: none"> • D₁ dopamin – D₂ dopamin
Addikció	<ul style="list-style-type: none"> • A_{2A} adenzin – D₂ dopamin • CB₁ kannabinoid – D₂ dopamin
Krónikus fájdalom	<ul style="list-style-type: none"> • μ-ópioid – δ-ópioid • δ-ópioid – κ-ópioid • μ-ópioid – 5-ös típusú metabotróp glutamát

A receptor heterodimer specifikus támadása lehetséges ún. bivalens ligandumok segítségével [261]. Ezek létrehozásakor általában a dimer két alegységére specifikus ligandumot kapcsolnak össze egy rövidebb-hosszabb összekötő szakasszal, így a bivalens ligandum egyszerre tud kötődni a két protomerhez nagy affinitással. Ezen molekulák száma folyamatosan növekszik, például krónikus fájdalom kezelésére előállítottak δ - és κ -ópioid receptorok bivalens ligandumát [262], míg a szkizofrénia terápiájában a D₂

dopamin-neurotenzin 1 receptordimert célzó bivalens molekula lehet esetleg a későbbiekben hasznos [263].

Mindezek alapján elmondható, hogy az új hatásmechanizmusú ligandumok felfedezése forradalmasította az elmúlt évtized GFKR kutatásait. Egyelőre azonban sajnos még csak ígéretes próbálkozásokról beszélhetünk, az áttörő eredmények a humán vizsgálatokban még váratnak magukra. Csalódást keltő volt a jelátvitel-szelektív AT₁R ligandum kudarca az akut szívelégtelenség kezelésére irányuló vizsgálatban. Ezek alapján felmerül, hogy a jelátvitel-szelektív ligandumok nem pontosan úgy működnek, mint ahogy eddig feltételeztük, és akár más mechanizmusok útján is kifejthetik hatásaikat. Nagyon keveset tudunk például arról, hogy a jelátvitel-szelektív ligandumok befolyásolják-e más receptorok jelátvitelét, amin keresztül akár váratlan új hatásokat vagy mellékhatásokat válthatnak ki. Ezek felderítése segíthet humán felhasználásra alkalmas jelátvitel-szelektív ligandumok kifejlesztésében.

3. Célkitűzés

Ph.D. munkám során az AT₁ angiotenzin és más receptorok közötti kölcsönhatások szerepét kutattam a β-arresztin kötés szabályozásában.

Vizsgálataim első felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

- igazolható-e az AT₁R-β₂AR heterodimer létezése a munkacsoport által kifejlesztett megbízhatóbb metodikai módszerrel;
- mi a szerepe az AT₁R-β₂AR heterodimerizációnak a β-arresztin kötésben;
- mi a hatása a jelátvitel-szelektív AT₁R aktivációnak az AT₁R-β₂AR heterodimer működésére?

Munkám második részében az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- képes-e az AT₁R heterológ foszforilációt követően β-arresztin kötésre;
- amennyiben az AT₁R köt heterológ útvonalon β-arresztint, különbözik-e a β-arresztin konformációja és funkciója?

4. Módszerek

4.1. A kísérletekben használt anyagok

A molekuláris biológiai reagenseket és a magas kapacitású NeutrAvidin agaróz rezint a Thermo Scientific-től (Waltham, MA, USA) vásároltuk. A sejtkultúra fenntartásához szükséges anyagok az Invitrogen-től (Carlsbad, CA, USA) származtak. A műanyag edényeket és tenyésztőlemezeket a Greinertől (Kremsmunster, Ausztria) vettük. A HEK 293T (ATCC CRL-3216) és a COS-7 (ATCC CRL-1651) sejtvonalak az American Type Culture Collection cégtől származtak. A cöclenterazin *h*-t a Regis Technologies-től (Morton Grove, IL, USA) szereztük be. A FIAsh-EDT₂ reagenst (*fluorescein arsenical hairpin binder* (FIAsh) /arzen tartalmú fluoesczeint kötő hajtú/-etánditiol (EDT)₂ a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) cégtől rendeltük. A biotint a SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Németország) bocsájtotta rendelkezésünkre. A kandezartán (*candesartan*) a Tocris-től (Bristol, Egyesült Királyság) származik. A TRV120023 (Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala-OH) peptidet a Proteogenix (Schiltigheim, Franciaország) szintetizálta. Az antitesteket a Cell Signaling Technologies-től (Danvers, MA, USA) vásároltuk. A proteáz inhibitor koktél (cOmplete) a Roche-től (Basel, Svájc) származik. Az Immobilon western kemilumineszcens tormaperoxidáz szubsztrátot a Millipore-től (Billerica, MA, USA) vettük. Minden további felhasznált anyagot és reagenst a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO) szereztük be.

4.2. Plazmid konstrukciók

A következő, fúziós- vagy jelöletlen fehérjét kódoló plazmid konstrukciók elkészítését a munkacsoportunk már korábbi közleményeiben ismertette: patkány AT₁R (5' és 3' nem transzlálódó régiót tartalmaz), AT₁R-DRY/AAV (D125A, R126A) [264], AT₁R-Δ319 (a C-terminális trunkált a 319. aminosav után) [265], jelöletlen α_{1A} adrenerg receptor (α_{1A}AR) [157], nem jelölt VGV (I156V, N158G, I160V) típusú szerotonin 2C receptor (5HT_{2C}R), a szuper *Renilla* luciferázzal (Sluc) fuzionáltatott 5HT_{2C}R (5HT_{2C}R-Sluc), β₂AR, β₂AR-Sluc, PM-mRFP (a Lyn fehérje plazmamembrán (PM) irányítószekvenciájához fuzionált monomer piros fluoesczcens fehérje (*monomer red fluorescent protein*, mRFP)), β-arresztin2-Cerulean, monomer Venus fluoesczcens fehérjével N-terminálisan jelölt Rab5 (Venus-Rab5) [266], PM-Venus (az Lck fehérje plazmamembrán irányítószekvenciájához kapcsolt Venus) [267], a humanizált *Renilla*

luciferázzal (Rluc) kapcsolt AT₁R (AT₁R-Rluc) [97], AT₁R-Venus, β -arresztin1-Venus, β -arresztin2-Venus, β_2 AR-Venus, β_2 AR-Cerulean [72], β -arresztin2-Rluc [268], Cameleon D3 Ca²⁺ BRET szenzor [269], EPAC cAMP BRET szenzor [270].

A *Renilla* luciferáz variáns Rluc8-at kódoló plazmidot Dr. Sanjiv Gambhir bocsájtotta rendelkezésünkre [271]. A C-terminálisan GFP-vel jelölt β -arresztin2 (β -arresztin2-GFP) és a jelöletlen β -arresztin2 konstrukciókat Dr. Marc G. Caron és Dr. Stephen S. G. Ferguson bocsájtotta rendelkezésünkre [272, 273]. Az ERK2-Venus és Venus-MEK1 konstrukciókat Dr. Reményi Attilától kaptuk.

A C-terminálisan Venus-szal jelölt 5HT_{2c}R (5HT_{2c}R-Venus) plazmid konstrukciót az 5HT_{2c}R-Sluc konstrukció Sluc jelölésének Venus-ra történő kicserélésével hoztuk létre *AgeI/NotI* restrikciós vágás segítségével. N-terminálisan sárga fluoreszcens fehérjével (*yellow fluorescent protein*, YFP) jelölt β -arresztin2 konstrukció elkészítéséhez a patkány β -arresztin2 cDNS-ét polimeráz láncreakcióval (*polymerase chain reaction*, PCR) felsokszoroztuk, és Clontech pEYFP-N1 vektorba helyeztük az *AgeI* és a *KpnI* restrikciós helyek közé. A pRluc8-C1 és a pRluc8-N1 plazmidok megalkotásához az Rluc8 kódoló szekvenciáját PCR amplifikáltuk, majd a YFP helyére helyeztük a Clontech pEYFP-C1 és pEYFP-N1 vektorokba az *AgeI/BglII* és az *AgeI/NotI* restrikciós emésztőenzimek használatával. A nukleáris export szignált (NES) tartalmazó biotin ligáz (NES-BirA) konstrukció elkészítéséhez először a BirA-t a pcDNA3.1 MCS-BirA(R118G)-HA (Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság)) konstrukcióból pEYFP-N1 vektorba helyeztük PCR amplifikáció és *AgeI/NotI* restrikciós vágás segítségével, majd a 118G-t visszamutáltuk R-ré precíz génfúziós PCR használatával [274]. Az AT₁R-Cerulean, az AT₁R-Rluc8, az AT₁R-TSTS/A-Rluc8 (TSTS/A=T332A, S335A, T336A, S338A) és az AT₁R-TSTS/A-Cerulean konstrukciókat az AT₁R-Rluc és az AT₁R-TSTS/A-Rluc [275] konstrukciók Rluc-jának Ceruleanra vagy Rluc8-ra történő cserélésével alkottuk meg. Az AT₁R-YFP-BAP előállításához először PCR-rel felsokszoroztuk a YFP kódoló szekvenciáját a biotin akceptor peptid (BAP: MSGLNDIFEAQKIEWHE) szekvenciájával fúzióban, majd az Rluc helyére helyeztük az AT₁R-Rluc konstrukcióban. A jelölést és a nem transzlálódó régiókat nem tartalmazó AT₁R konstrukció létrehozásához a patkány AT_{1A} receptor kódoló szekvenciáját helyeztük be a YFP helyére a pEYFP-C1 vektorba. Hasonlóan jártunk el a jelöletlen AT₁R-TSTS/A megalkotásánál. Az α_{1A} AR-mRFP konstrukció gyártásához α_{1A} AR-t a

GGGDPVVAT összekötő szekvenciával együtt a pmRFP-N1 vektorba, az mRFP elé helyeztük. A Venus-Rab4, Venus-Rab7 ill. Venus-Rab11 a YFP Venus-ra történő kicserélésével készültek a YFP-Rab4, YFP-Rab7 és YFP-Rab11 konstrukciókból [97] kiindulva. Az Rluc8- β -arresztin2 elkészítéséhez a β -arresztin2 szekvenciáját egy rövid linkerrel (RSRAQACTR) a pRluc8-C1 plazmidba helyeztük az Rluc8 után. Rluc8- β -arresztin2-FlAsH szenzorok (F139, F154, F225, F263, F410) esetében a CCPGCC aminosavmotívumot a β -arresztin2 139., a 154., a 225., a 263. vagy a 410. aminosavai mögé helyeztük be precíz génfüziós PCR segítségével. A jelölés pozícióit korábban közölt szenzorok alapján választottuk ki [65, 66]. A K2A- β -arresztin2 mutáns a szarvasmarha K2A- β -arrestin2 mintájára készült el [276], a K11A and K12A mutációkat precíz génfüziós PCR-rel hoztuk létre a patkány β -arresztin2-ben, hogy megalkossuk a K2A- β -arresztin2-Venus és az Rluc8-K2A- β -arresztin2 konstrukciókat. A K2A mutációt bevittük az F139, F154, F225, F263, F410 szenzorokba is az Rluc8 és a β -arresztin2 elejének az Rluc8-K2A- β -arresztin2 identikus szakaszára történő kicserélésével az *AgeI/PstI* restrikciós enzimek használatával.

Mindegyik konstrukció ellenőrzése megtörtént automatizált DNS szekvenálással.

4.3. Sejtkultúra és transzfekció

HEK 293T és COS-7 sejtvonalak kultúráit 100 IU/ml penicillinnel, 100 μ g/ml sztreptomocinnal és 10% főtális borjúsérummal kiegészített DMEM médiumban tartottuk fent 37 °C-on 5% CO₂-tartalom mellett. A BRET kísérletekhez a sejteket szuszpenzióban transzfektáltuk OptiMEM médiumban Lipofectamine 2000 használatával a gyártó instrukcióinak megfelelően, majd a sejteket fehér, poli-L-lizinnel előkezelt 96-lyukú lemezekre helyeztük el. A méréseket 24 óra (HEK 293T sejtek) ill. 48 óra (COS-7 sejtek) elteltével végeztük el. A koprecipitációs kísérletekhez szintén szuszpenzióban transzfektáltunk, és a sejteket poli-L-lizinnel előkezelt 10 cm-es tenyésztőedényekre tettük le. Konfokális mikroszkópos felvételek készítéséhez a HEK 293T sejteket poli-L-lizinnel előkezelt üveg fedőlemezekre szélesztettük 6-lyukú tenyésztőedényekben. Másnap a transzfekciót adherens sejteken hajtottuk végre szintén Lipofectamine 2000 segítségével, a kísérleteket harmadnap végeztük el.

4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer mérések

4.4.1. A BRET-alapú mérések elve

A BRET a fehérje-fehérje interakciók (intermolekuláris BRET) és a fehérjén belüli konformációs változások (intramolekuláris BRET) követésére alkalmas módszer. A BRET mérésekben donorként valamilyen biolumineszkáló molekula szerepel, míg akzeptorként bármilyen fluoreszcens anyag megfelel, ha annak excitációs spektruma átfed a biolumineszcenciából eredő fény emissziós spektrumával [182]. Donorként leggyakrabban a *Renilla reniformis* virágállatokból származó luciferáz enzimet alkalmazzák, de más, méretében és/vagy spektrális tulajdonságaiban eltérő luciferázt is sikerrel használtak már [277, 278]. A *Renilla* luciferáz a cöleterazin *h* szubsztrátot hasítja cöleteramiddá, amely reakció ~480 nm emissziós maximummal rendelkező fény emisszióját idézi elő. Ideális BRET akceptor a sárga fluoreszcens fehérje (YFP) vagy annak fényesebb és monomer természetű változata, a Venus, melyek gerjesztés hatására ~530 nm emissziós maximumú fényt bocsátanak ki. A BRET jelensége csak akkor lép fel, ha a BRET donor és akceptor molekuláris szintű közelségben helyezkednek el [182]. A BRET mértéke függ a donor és az akceptor közötti távolságtól és az orientációtól, a BRET a távolság változására kifejezetten érzékeny, mértéke fordítottan arányos a távolság negyedik hatványával. A fehérje-fehérje interakciók BRET módszerrel való követéséhez általában luciferázzal és fluoreszcens fehérjével fuzionáltatott proteineket fejeztetnek ki sejtekben, és a létrejövő BRET alapján következtetnek a megjelölt proteinek közötti interakcióban bekövetkezett változásokra. A megjelölt fehérjék közötti molekuláris kapcsolat esetén nagyfokú BRET jön létre, míg interakció hiányában a BRET lecsökken [182].

Az *Aequorea victoria* GFP-eredetű fluoreszcens fehérjék nagy hátránya a viszonylag nagy méretük (~29 kDa) [182]. A jelölni kívánt fehérjék gyakran jól tolerálják, ha N- vagy C-terminálisukhoz fuzionáltatják őket, viszont a fehérjén belüli jelölés nagyon sokszor kivitelezhetetlen a funkció sérülése nélkül. Ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki a FIAsh jelölést [279]. A FIAsh-EDT₂ molekula egy fluoreszcens festéket (fluoresceint) és ahhoz egy-egy arzénen keresztül kapcsolódó etán-ditiol (EDT) csoportot tartalmaz. A FIAsh-EDT₂ utóbbiak segítségével képes 4 egymáshoz közel található cisztein tiol-tartalmú oldalláncjaihoz kapcsolódni. Ezáltal, ha egy meghatározott rövid aminosavmotívumot (például CCPGCC) építünk be egy fehérjébe, képesek

vagyunk azt a FAsH-EDT₂ segítségével fluoreszcensen megjelölni. Így a teljes jelölés mérete mindösszesen ~1,2 kDa, ami valószínűsíthetően kevésbé módosítja az akceptorral megjelölt protein működését. A módszer további előnye, hogy a FAsH-EDT₂ molekula csak a peptidhez történő kötődés után válik fluoreszcenssé [280]. Ha az akceptorral megjelölt protein egy luciferáz enzimet is tartalmaz, akkor információt kaphatunk a molekulán belüli strukturális átrendeződésekről (konformációváltozásokról) a BRET követésén keresztül.

Mint ahogy a 2.3.3.1. fejezetben már említettem, a BRET nemcsak specifikus kötődésből, hanem két molekula véletlenszerű ütközéséből is létrejöhet. Utóbbit aspecifikus BRET-nek vagy „bystander BRET”-nek nevezzük. Munkacsoportunk Monte-Carlo szimulációk segítségével és kísérletesen is kimutatta, hogy a bystander BRET mértéke (ugyanazon membránon elhelyezkedő donor és akceptor esetén) csak az akceptor mennyiségétől függ, míg specifikus interakció esetén a BRET nagyságát az akceptor és a donor mennyisége is meghatározza [183].

A bystander BRET sokszor megnehezíti a specifikus és nem specifikus interakciók elkülönítését, ezért a megfelelő kontrollok elengedhetetlenek az eredmények körültekintő kiértékeléséhez. A bystander BRET jelenségét azonban ki is használhatjuk egy fehérje sejten belüli kompartmentváltásának követésére. Például a bystander BRET mértékének mérésével követhetjük a receptorstimuláció hatására létrejövő β -arresztin transzlokációt a plazmamembránhoz [281, 282]. Ehhez a plazmamembránt akceptorral, a β -arresztint pedig donorral jelöljük meg, és ezek mellett a sejtekben nagymennyiségű jelöletlen receptort is expresszáltatunk. A receptorkötés hatására az addig diffúzan citoplazmatikusan elhelyezkedő β -arresztin feldúsul a plazmamembrán mentén, így megnő a bystander BRET a donor-jelölt β -arresztin és az akceptor-jelölt plazmamembrán között.

4.4.2. A BRET mérések kivitelezése

Valamennyi BRET mérést 37 °C-on és letapadt sejteken végeztük. A sejtek médiumát egy mosási lépést követően módosított Ringer oldatra (120 mM NaCl, 10 mM glukóz, 10 mM Na-HEPES, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,7 mM MgSO₄, pH 7,4) cseréltük. Intermolekuláris BRET-et (vagy intramolekuláris BRET-et EPAC és Cameleon D3 Ca²⁺ BRET szenzorok esetében) *Renilla* luciferáz (Rluc, Sluc vagy Rluc8)

és YFP- vagy Venus-jelölt fehérjék között mértünk. Minden mérést a fluoreszcens fehérje expressziójának meghatározásával kezdtük, amire a fluoreszcencia mértékéből következettünk. A fluoreszcenciát 535 nm-es hullámhosszon mértük 510 nm-es excitáció mellett Thermo Scientific Varioskan Flash multimode plate reader készülékkel. A BRET követéséhez mértük a fényintenzitást 530 és 480 nm-es filterek segítségével a luciferáz szubsztrát cöclenterazin *h* (5 μ M) adása után, a BRET titrációs kísérletek és a mutáns donor-jelölt konstrukciók expressziójának vizsgálata során meghatároztuk a teljes lumineszcenciát is filter használata nélkül. Minden kísérletet duplikátumban vagy triplikátumban végeztünk el.

Mivel a biolumineszcencia lecsengő tendenciát mutat (a luciferáz szubsztráthatasításából adódó „öngyilkos” inaktivációjának következtében [283]), ezért a BRET követésére a BRET hányadost képeztük, ami az akceptor emissziós maximumán mért fényintenzitás osztva a donor emissziós maximumán mért fényintenzitással ($I_{530\text{nm}}/I_{480\text{nm}}$). Tekintettel arra, hogy a kiindulási BRET hányados függ a BRET partnerek expressziójának mértékétől, sokszor informatívabb volt a BRET hányados stimulus hatására létrejövő változásának (Δ BRET jel) meghatározása.

Az Rluc8- β -arresztin2-FlAsH szenzorok intramolekuláris BRET jelének követéséhez egy korábban leírt jelölési protokollt alkalmaztunk 96-lyukú tenyésztőlemezes mérésekhez [280]. Elsőként 1 mM FlAsH-EDT₂-t szobahőn inkubáltunk 12,5 mM EDT-vel 5 percig, hogy minden FlAsH molekula FlAsH-EDT₂ formában legyen. A sejteket kétszer mostuk módosított Ringer oldattal. Ezután a sejteket 500 nM FlAsH-EDT₂-vel jelöltük 12,5 μ M EDT és 0,1% dimetil-szulfoxid (DMSO) jelenlétében (módosított Ringer oldatban) 1 óráig szobahőn. Ezután a felesleges és aspecifikusan kötődő FlAsH festék eltávolításához a médiumot 250 μ M EDT tartalmú Ringer oldatra cseréltük 10 percig, majd a sejteket háromszor mostuk módosított Ringer oldattal. Ezután ugyanazt a mérési protokollt követtük, mint az intermolekuláris BRET kísérletek esetében. Az intramolekuláris BRET-et a szenzor Rluc8 és FlAsH jelölése között mértük.

Mivel az intramolekuláris β -arresztin2 BRET szenzorok jelváltozásának nagysága függ attól, hogy a szenzormolekulák mekkora hányada aktiválódik (köt receptort), ezért relatív FlAsH jelet határoztunk meg: az intramolekuláris BRET hányados változását az

intermolekuláris BRET hányados változására normalizáltuk. Az intermolekuláris BRET-et az Rluc8-jelölt szenzor és Venus-jelölt receptor között mértük párhuzamos kísérletben.

4.5. Konfokális mikroszkópia és képanalízis

A sejtek médiumát módosított Ringer oldatra cseréltük. A plazmamembrán mentén található β -arresztin klaszterek életidejének meghatározásához idősorozatos felvételeket készítettünk a sejtek aljáról 10 másodpercenként 190 másodpercig Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal 63 \times objektív használatával 37 °C-on. A képek 79,38 \times 79,38 μ m nagyságú területről készültek 1024 \times 1024 felbontással.

A felvételek analíziséhez ImageJ szoftvert, majd gépi tanulási módszert (machine learning) használtunk. Az analízist témavezetóm, Dr. Turu Gábor végezte. A gépi tanulás során a számítógépnek nem konkrét szabályokat adunk meg, ami alapján egy-egy felvételt elemez, hanem a felismerendő struktúráról példákat mutatunk az algoritmusnak. A példák alapján a program saját maga tanulja meg milyen szabályok alapján lehet elkülöníteni két különböző elemet, mint pl. esetünkben egy adott pozícióban a képen azt eldönteni, hogy ott egy arresztin pötty található vagy sem. A módszer előnye a kézi elemzéshez képest, hogy a számítógép nagyszámú felvételt képes rövid idő alatt pontosan és elfogulatlanul elemezni. Az analízisünkhöz több felvételtől szemkontroll mellett választottuk ki a pöttyöket és a körülötte levő 20 \times 20 pixeles területet kivágtuk. Ezeket a mintákat használtuk a továbbiakban pozitív példaként a tanulási algoritmushoz. Negatív mintaként olyan területeket vágunk ki sejtek aljáról, amelyekben nem található arresztin pötty. Tanulási algoritmusként egy neurális hálózatot alkalmaztunk, amelyet python programozási nyelvben szerkesztettünk meg Keras és sklearn könyvtárak segítségével. A tanítás során felhasznált 2809 negatív and 664 pozitív mintát véletlenszerűen szétosztottuk betanítási (2326) és kereszt-validációs (1147) csoportokba. A neurális hálózat betanítása után keresztvalidációval ellenőriztük a program pontosságát, amely során a program által addig nem látott pozitív és negatív mintákat elemeztettük. A keresztvalidáció 98%-os pontosságot mutatott. A pöttyök életidejének meghatározásához a 10. képen található (legalább 5 pixel nagyságú) pöttyöket követtük trackpy könyvtár segítségével (<https://github.com/soft-matter/trackpy>) a korábbi és későbbi felvételeken. A módszerrel a különböző felvételek közötti pöttymozgásokat, illetve megjelenést, vagy eltűnést tudunk vizsgálni. A pöttyöket életidejük alapján két alcsoportba osztottuk.

A β -arresztin kötés osztálytípusának meghatározásához a felvételeket a sejtek közepének keresztmetszetéről készítettük stimulálás után 20-40 perccel 37 °C-on.

4.6. Koprecipitációs kísérletek

HEK 293T sejteket NES-BirA (biotin ligáz), β -arresztin2-Cerulean és/vagy AT₁R-YFP-BAP konstrukciókkal transzfektáltuk. 24 óra elteltével 150 μ M biotint adtunk hozzájuk 20-24 óráig, hogy az AT₁R-YFP-BAP jelentős mértékben biotinilálódhasson. Ezután a médiumot szérum- és biotinmentes, 1% borjúsérum albumint és antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumra cseréltük 2-4 óráig, majd a sejteket 20 percig stimuláltuk 37 °C-on. A reakciókat jégre helyezéssel és jéghideg foszfát pufferelt sóoldattal (*phosphate buffered saline*, PBS) történő mosással állítottuk le. A mosási lépést ötször ismételtük. A sejteket RIPA oldattal (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-100, 0,1% SDS, 0,25% nátrium-dezoxikolat, 1 mM EDTA) lizáltuk, amit kiegészítettünk cOmplete proteáz inhibitor koktéllal (Roche) és foszfatáz inhibitor koktél 3-mal (Sigma). A lizátumot összegyűjtöttük, 15 percig alacsony sebességgel forgattuk, majd 20800 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót ezután 30 μ l magas kapacitású NeutrAvidin agaróz rezinnel inkubáltuk 30 percig, majd a gyöngyöket kiegészített RIPA oldattal háromszor, PBS oldattal egyszer mostuk. A gyöngyöket PBS-ben szuszpendáltuk fel. A YFP és Cerulean fluoreszcenciát 510 nm-en ill. 435 nm-en történő excitációval és 535 nm-en ill. 480 nm-en történő emisszióval határoztuk meg Thermo Scientific Varioskan Flash multimode plate reader készülék segítségével. Fluoreszcens felvételeket is készítettünk a NeutrAvidin gyöngyökről Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal 20x objektív használatával.

4.7. Western blot

A reakciókat a tenyésztőlemezek jégre helyezéssel és jéghideg PBS-sel történő mosásával állítottuk le. A sejteket SDS mintapufferben felkapartuk, a mintákat röviden szonikáltuk, főztük 15 percig 95 °C-on, 4 °C-on 20800 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót SDS poliakrilamid gélelektroforézissel megfuttattuk, majd polivinilidén-fluorid membránokra blottoltuk át. A membránokat 5% zsírszegény tejport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (PBST) 1 óráig szobahőn blokkoltuk, majd az elsődleges antitesttel (5% tejport tartalmazó PBST-ben 1:1000-ben hígítva) inkubáltuk 4

°C-on egész éjszakán keresztül. A membránokat háromszor mostuk PBST-vel 10 percig, tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesttel (kecske anti-egér vagy kecske anti-nyúl, 5% tejport tartalmazó PBST oldatban 1:5000-ben hígítva) 1 óráig szobahőn inkubáltuk, majd mostuk újra háromszor. Az antitesteket kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá. A membránokat először egér anti-foszfo-p44/42 MAPK (T202, Y204) elsődleges antitesttel (#9101, Cell Signaling) inkubáltuk és hívtuk elő. Ezután az antitesteket guanidin HCl-alapú oldat segítségével távolítottuk el [284]. A teljes ERK1/2 mennyiséget nyúl anti-p44/42 MAPK (#9102, Cell Signaling) antitest segítségével határoztuk meg.

4.8. Statisztikai analízis

A minta méret (n) az ábraleírásokban az elvégzett független kísérleteket (biológiai replikátumokat) jelölik. GraphPad Prism szoftvert alkalmaztunk a görbék létrehozásához, a statisztikai analízishez és a görbeillesztéshez. Ha máshogy nem jelölöm, az adatokat átlag + a középérték standard hibája (*standard error of mean*, S.E.) formájában adom meg. A stimulus által létrehozott hatás statisztikai vizsgálatához páros kétmintás t-próbát vagy Bonferroni post-hoc teszttel támogatott ismételt méréses egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk. A heterodimerizációt vizsgáló BRET titrációs kísérletekben a BRET hányados lumineszcenciától való függését kovariancia analízissel vizsgáltuk. A gátlószerek hatása és stimulus által kiváltott jel közötti interakciót kétszempontos varianciaanalízissel és Bonferroni post-hoc teszttel analizáltuk. A különböző ligandumok közötti interakciót ugyanezen teszttel vizsgáltuk. A β -arresztin2 pöttyök életidejének eloszlásait Fischer-féle egzakt teszttel analizáltuk. A β -arresztin2 bioszenzorok AT₁R-Venus kötését egyszempontos varianciaanalízis és Bonferroni post hoc-teszt segítségével hasonlítottuk össze. A K2A mutációnak a bioszenzorok bazális intramolekuláris BRET-jére kifejtett hatását ismételt méréses egyszempontos varianciaanalízis és Bonferroni post hoc-test felhasználásával analizáltuk. A relatív, interakcióra normalizált FIAsh jeleket egymintás t-próbával vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatot minden esetben elvégeztük mind a nyers, mind a normalizált adatsoron.

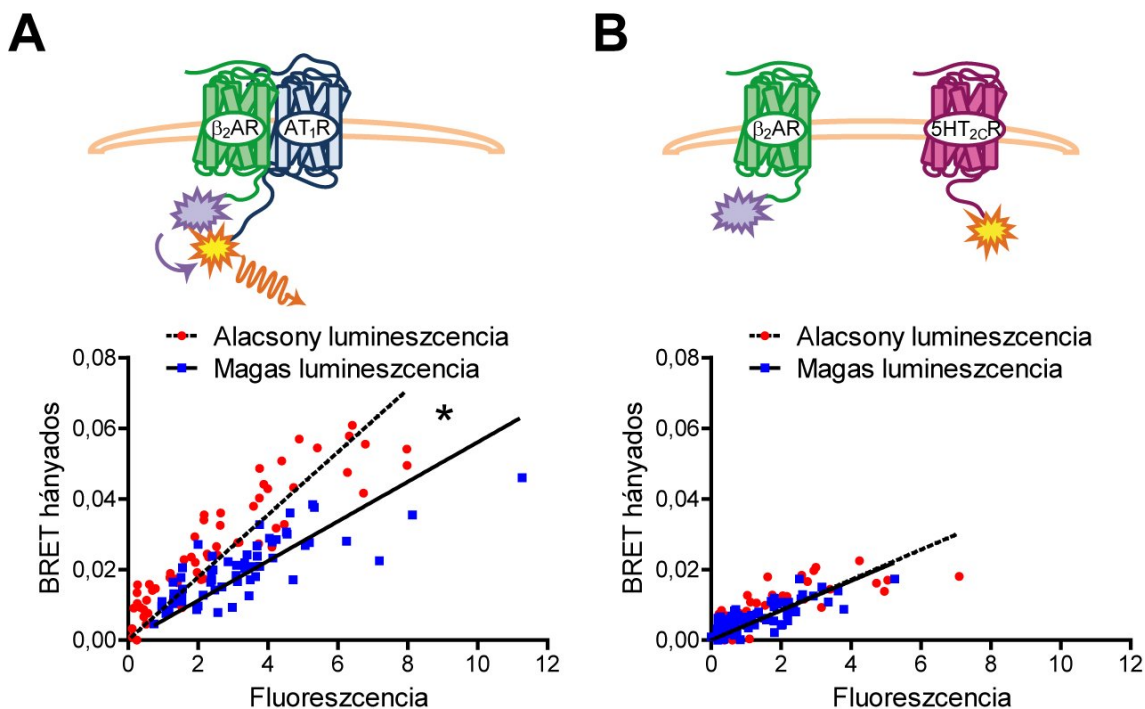
5. Eredmények

5.1. Az AT₁R és a β₂AR közötti kölcsönhatások vizsgálata

Korábbi irodalmi adatok azt mutatták, hogy az AT₁ angiotenzin és a β₂ adrenerg receptorok képesek egymással fizikai kölcsönhatást kialakítani [211]. Továbbá a két receptor közötti dimerizációnak fontos funkcionális következményei lehetnek, hatást gyakorolhat többek között a két receptor G-fehérje kötésére. Nem volt ismert azonban, hogy van-e az AT₁R-β₂AR heterodimerizációnak befolyása a másik kiemelt jelentőségű effektor, a β-arresztin kötésének tulajdonságaira.

5.1.1. Az AT₁R és a β₂AR heterodimerizációjának verifikálása

Elsőként szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a munkacsoport által kifejlesztett módszerrel igazolható-e a heterodimer létezése. A két receptor közötti fizikai interakció vizsgálatához Sluc (donor)-jelölt β₂AR-t és Venus (akceptor)-jelölt AT₁R-t expresszáltattunk tranziensen HEK 293T sejtekben, és módosított kvantitatív BRET vizsgálatokat végeztünk. Munkacsoportunk korábban azt találta, hogy a receptor heterodimerek kimutatására alkalmazott kvantitatív BRET kísérletek megbízhatóságát nagymértékben növeli, ha a BRET hányados mértéket változó donor és változó akceptor mennyiség mellett is megvizsgáljuk [183]. Két membránfehérje aspecifikus interakciója esetén a BRET hányados egyenesen arányos az akceptor mennyiségével, viszont független a donor expressziójának mértékétől. Ezzel szemben specifikus kölcsönhatást mutató fehérjék esetén mind a donor, mind az akceptor expressziójának nagysága befolyásolja a BRET hányados nagyságát. A kiértékeléshez a BRET hányadost a fluoreszcencia (az akceptor mennyiségének) függvényében ábrázoltuk, és a mérési pontokat lumineszcenciaértékük (donor expresszió) alapján két (magas és alacsony), azonos nagyságú csoportba osztottuk. A specifikus interakciónak megfelelően lumineszcenciafüggést találtunk a β₂AR-Sluc és az AT₁R-Venus között fellépő BRET hányadosban: a magas és alacsony lumineszcenciájú pontokra eltérő meredekségű egyenest tudtunk illeszteni (14. ábra, A). Ezzel szemben β₂AR-Sluc és 5HT_{2c}R-Venus koexpresszáltatása esetén ugyanolyan meredekségű egyenest tudtunk illeszteni a magas és alacsony lumineszcenciájú pontokra, ami a két fehérje közötti specifikus kölcsönhatás hiányára utal (14. ábra, B). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a β₂AR és az AT₁R heterodimert képez, de nem jön létre dimerizáció a β₂AR és az 5HT_{2c}R között.



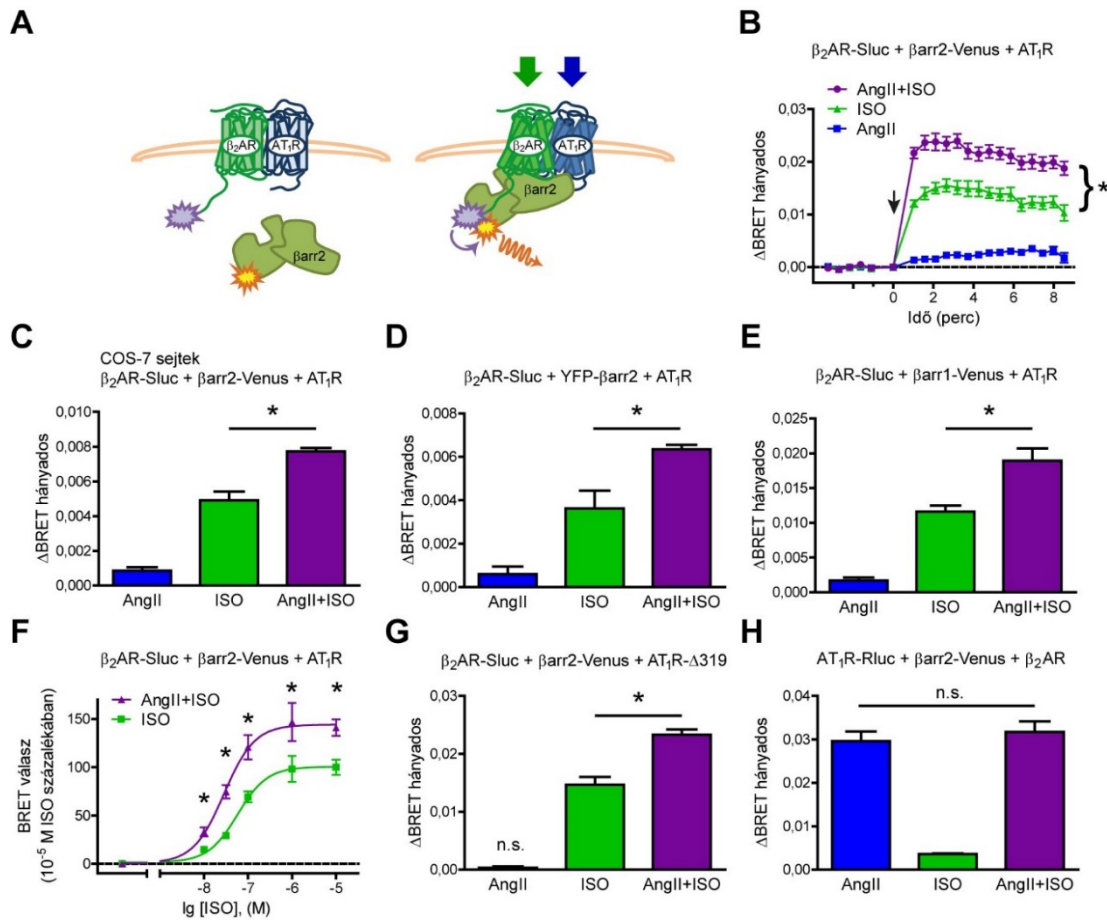
14. ábra A β_2 AR heterodimert képez az AT_1R -rel. A laborunk által kifejlesztett kvantitatív BRET titrációs méréseket végeztünk HEK 293T sejteken. Növekvő mennyiségű β_2 AR-Sluc-ot és növekvő mennyiségű AT_1R -Venus-t (A) vagy $5HT_{2C}R$ -Venus-t (B) kódoló plazmidokkal transzfektáltuk a sejteket, miközben a DNS mennyiséget állandóan tartottuk üres vektor pcDNA3.1 hozzáadásával. A regisztrált BRET hányadosokból kivontuk az akceptort nem tartalmazó sejtek BRET értékét, majd az így kapott BRET hányadost a fluoreszcencia (akceptor mennyiség) függvényében ábrázoltuk. A mérési pontokat két egyenlő nagyságú csoportba osztottuk, megkülönböztettünk alacsony és magas lumineszcenciájú sejteket. Az AT_1R -Venus tartalmú sejtek (A) esetében a BRET hányados függött a mért lumineszcenciától, ami specifikus interakcióra utal. Ezzel szemben az $5HT_{2C}R$ -Venus-t koexpresszáló sejtekben a BRET hányados független volt a lumineszcencia nagyságától, ami a specifikus interakció hiányát mutatja a két receptor között. A BRET hányados lumineszcencia függését kovariancia analízissel vizsgáltuk (*, $P < 0.05$, $n=3$).

5.1.2. Az AT_1R befolyásolja a β_2 AR β -arresztin kötését

Ezután megvizsgáltuk, hogy a heterodimerizáció befolyásolja-e a dimer alegységek β -arresztin (β_{arr}) kötési képességét. Ehhez egy BRET alapú kísérleti felállást állítottunk be (15. ábra, A). A sejtekben Sluc-jelölt β_2 AR-t, C-terminálisan Venus-jelölt β -arresztin2-t és jelöletlen AT_1R -t koexpresszáltattunk. Így képesek voltunk szelektíven követni a β_2 AR β -arresztin2 kötését, és megfigyelni az AT_1R stimuláció hatását a β_2 AR- β -arresztin2 interakcióra. A β_2 AR agonista izoproterenol (*isoproterenol*, ISO, 10 μ M) hatására a BRET jel növekedését tapasztaltuk, ami a β -arresztin2 β_2 AR-hez történő kötődését jelzi (15. ábra, B). Az AT_1R agonista AngII (100 nM) önmagában csak egy kis mértékű BRET hányados emelkedést hozott létre. Meglepő módon a két receptor

szimultán aktivációja potencírozta a β_2 AR és a β -arresztin2 közötti asszociációt, amit a szignifikánsan emelkedett BRET jel mutat. Hasonló eredményeket kaptunk COS-7 sejteken történő mérésekben is (15. ábra, C) Mivel a BRET nemcsak a donor és az akceptor távolságától, hanem azok orientációjától is függhet, ezért vizsgálatainkat N-terminálisan YFP-vel jelölt β -arresztin2-vel is elvégeztük (15. ábra, D). Az előbbiekhöz hasonló hatást tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a BRET jel változása nem eltérő konformációból ered, hanem a megnövekedett interakciót tükrözi. A β_2 AR β -arresztin1 (a másik általánosan expresszált izoforma) kötésében szintén hasonló jelenséget tapasztaltunk (15. ábra, E). Megvizsgáltuk a tapasztalt potencírozás ISO dózistól való függését is (15. ábra, F). Az AngII már alacsony ISO koncentrációk esetén is képes volt megemelni a β_2 AR- β -arresztin2 kötést, ráadásul a dózis-hatás görbét még enyhén balra is toltta (a félmaximális effektív koncentráció logaritmus (lgEC₅₀, M): ISO -7,193 ± 0,033 vs. AngII+ISO -7,531 ± 0,061 n=4, átlag ± S.E., p<0,05). Mivel az AT₁R szintén köt β -arresztin2-t, felmerül, hogy az AT₁R-kötött β -arresztin2-Venus plazmamembrán menti feldúsulása hozza létre a jel növekedését az aspecifikus bystander BRET emelkedésén keresztül (lásd 4.4.1. fejezet). Hogy ezt kizárjuk, kísérleteinket megismételtük C-terminálisan trunkált AT₁R-rel (AT₁R- Δ 319) is (15. ábra, G), mely receptor nem tartalmazza a β -arresztin kötés szempontjából kritikus foszforilációs helyeket [275, 285]. A korábban látott önálló AngII stimuláció utáni enyhe BRET jel emelkedés eltűnt ebben a felállásban, viszont a kostimuláció okozta potencírozás megmaradt. Ez arra utal, hogy az önálló AngII kezelés valószínűleg csak a bystander BRET mértékét befolyásolja, kostimuláció esetén viszont ténylegesen a β_2 AR és β -arresztin2 közötti kötés fokozódása jött létre.

A továbbiakban megnéztük, hogy a β_2 AR szintén képes-e növelni az AT₁R és a β -arresztin2 közötti interakciót. Ezekben a kísérletekben az AT₁R-t jelöltük donorral (Rluc), és a β_2 AR volt jelöletlen (15. ábra, H). Érdekes módon a β_2 AR aktivációja nem befolyásolta szignifikánsan az AT₁R AngII-indukált β -arresztin2 kötését. Ez egyrészt magyarázható azzal, hogy ellenkező irányban nem működik az allosztérikus szabályozás a β -arresztin kötésre. Márészt az is felmerül, hogy az AT₁R egyébként is nagyon erős β -arresztin2 kötését nem lehet tovább fokozni ezen az úton.



15. ábra Az AT_1R aktivációja megváltoztatja a $\beta_2\text{AR}$ β -arresztin kötésének tulajdonságait.

A, A BRET-alapú rendszerünk sematikus rajza. A sejtek Sluc-jelölt $\beta_2\text{AR}$ -t, jelöletlen AT_1R és akceptor (YFP vagy Venus)-jelölt β -arresztint tartalmaznak. $\beta_2\text{AR}$ aktiváció hatására a β -arresztin transzlokálódik a $\beta_2\text{AR}$ -hez, ami rezonancia energiáttranszfer létrejöttét eredményezi. Az AT_1R koexpressziójával annak hatásait is vizsgálhatjuk párhuzamosan. **B**, HEK 293T sejteket (70 000/tenyésztőlemez lyuk) a következő plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk lyukanként: 25 ng $\beta_2\text{AR-Sluc}$, 100 ng AT_1R és 100 ng β -arresztin2-Venus. A mérések során a BRET hányados változását követtük 100 nM AngII, 10 μM ISO vagy mindkettővel történő stimuláció után. Az AngII szignifikánsan potenciozta az ISO hatást. **C**, COS-7 sejteket transzfektáltunk ugyanazon plazmidokkal, mint a **B** panel esetében. Az átlagos stimulus-indukált BRET hányados változást (görbe alatti terület a stimulus hozzáadásától az első 8,5 percben) ábrázoltuk. **D-G**, HEK 293T sejteket transzfektáltunk 25 ng $\beta_2\text{AR-Sluc}$, 100 ng vad típusú (**D-F**) vagy C-terminálisan deletált (**G**) AT_1R és 100 ng akceptor jelölt arresztin konstrukcióval az ábrafeliratnak megfelelően. Minden esetben szignifikáns interakciót tapasztaltunk az ISO és AngII stimulusok között kétszemponos varianciaanalízis statisztikai vizsgálattal. Az önálló AngII stimuláció hatására létrejövő kismértékű BRET jel emelkedés megszűnt az $\text{AT}_1\text{R-}\Delta 319$ mutáns esetében (n.s.=nem szignifikáns, kétoldalas kétmintás *t*-próbával történt analízis alapján). **F**, 100 nM angiotenzin II hatása az ISO $\beta_2\text{AR}$ - β -arresztin2 dózis-hatásgörbéjére. A 10 μM ISO hatást vettük 100%-nak. Ahhoz, hogy az AngII hatását az ISO válasza jobban szemléltessük, az AngII+ISO kezelés pontjaiból kivontuk az önálló AngII kezelés hatására létrejövő BRET változást. A jel amplitúdójának növekedése mellett a görbe balatolódását tapasztaltuk ($\lg\text{EC}_{50}$ (M) -7,48 ill. 7,17) AngII hatásra. **H**, $\text{AT}_1\text{R-Rluc}$, jelöletlen $\beta_2\text{AR}$ és β -arresztin2-Venus-t koexpresszáló sejtekben az AngII és ISO kezelések között nem volt potenciozó hatás megfigyelhető, ami a dimeren belüli aszimmetrikus kapcsolatra utal. Az adatokat átlag \pm az átlag standard hibája (S.E.) formában ábrázoltuk, $n=3-6$. A statisztikai analízishez minden esetben az első 8,5 percben mért

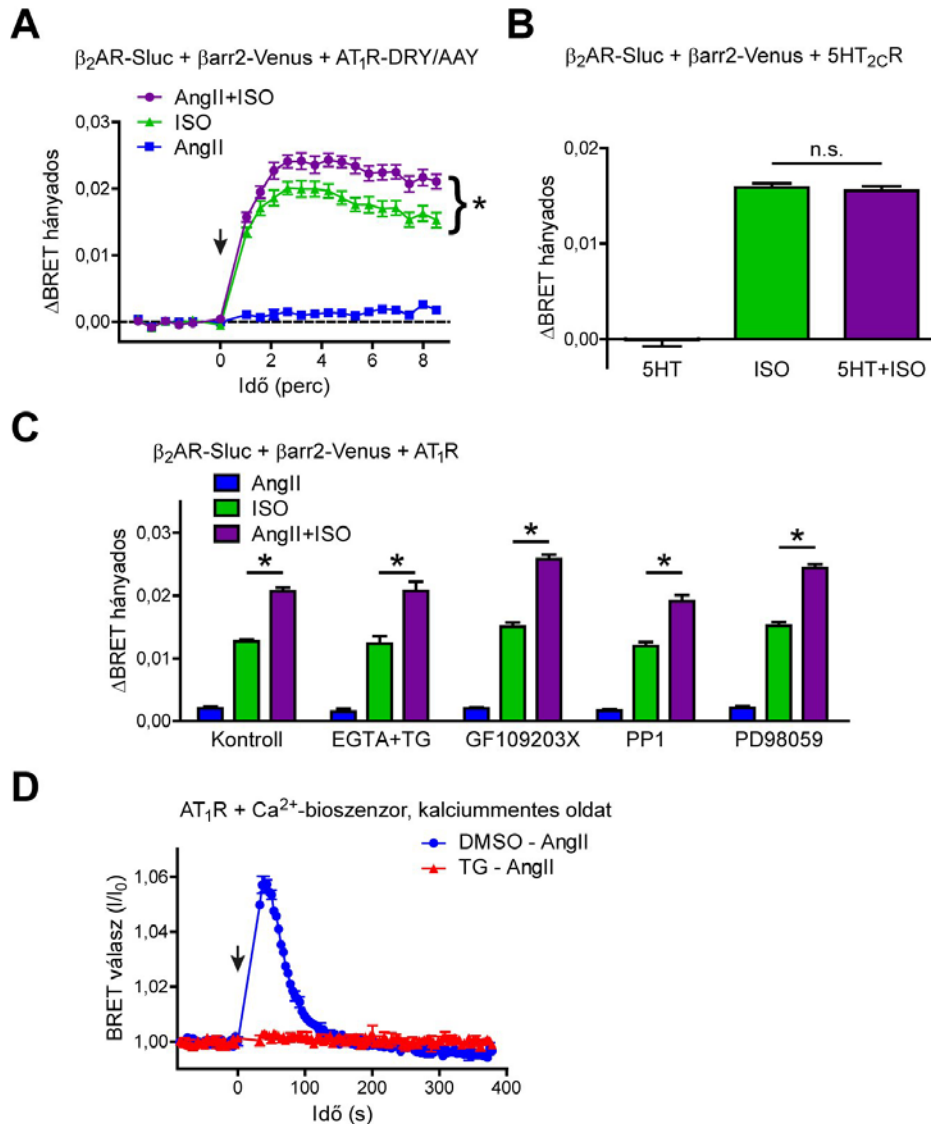
átlagos BRET jel változásokat hasonlítottuk össze kétszemponos varianciaanalízis segítségével, *, $P < 0,05$, szignifikáns interakciót jelent a két kezelés között.

5.1.3. Az AT₁R-ről induló jelpályák nem szükségesek a β₂AR β-arresztin2 kötésének modulációjához

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az előbbiekben feltárt jelenség létrejöttéhez szükségesek-e az AT₁R főbb jelátviteli útvonalai. Ehhez elsőként egy G-fehérjét nem aktiváló AT₁R mutánst (AT₁R-DRY/AAY) alkalmaztunk (16. ábra, A). Ennek a mutánsnak a stimulációja szintén képes volt kiváltani a β₂AR-β-arresztin2 interakció potencírozását, azonban lassabb kinetikával. Az AT₁R-hez hasonló jelátvitellel rendelkező (G_{q/11}-kapcsolt) [275], de a β₂AR-rel nem heterodimerizáló 5HT_{2c}R aktivációja viszont nem volt képes létrehozni ezt a hatást (16. ábra, B). A G_{q/11}-fehérje aktiválódása DAG képződésen keresztül PKC aktivációhoz vezet, míg az IP₃ Ca²⁺ felszabadulást idéz elő a raktárakból. Ezek szerepének kizárásához legátoltuk a PKC-t specifikus inhibitorral (2 μM GF109203X), ill. kiürítettük a sejtek kalcium raktárjait (200 nM tapszigargin (TG) előkezeléssel) Ca²⁺ keláció (100 μM EGTA) mellett kalciummentes oldatban vad típusú AT₁R-t koexpresszáló sejtekben (16. ábra, C). A Ca²⁺ depléciónak sikerességét BRET-alapú Ca²⁺ bioszenzor segítségével ellenőriztük (16. ábra, D) [269]. Egyik gátlószeres kezelés sem védte ki azonban az AT₁R potencírozó hatását a β₂AR-β-arresztin2 kötésben. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a G_{q/11}-fehérje aktiváció nem szükséges a vizsgált hatás létrejöttéhez.

Az AT₁R G-fehérje aktiváció hiányában is képes szignalizálni, többek között MAP és Src kinázok szerepét mutatták ki ezekben a folyamatokban [235]. Az Src (1 μM PP1) és MEK1/2 (20 μM PD98059) gátlószeres szintén nem befolyásolták az AT₁R β₂AR-re kifejtett hatását (16. ábra, E). Ezek az eredmények összhangban vannak a β-arresztint nem kötő AT₁R-Δ319 mutánssal kapott adatokkal, miszerint a β-arresztin-függő jelátvitel sem szükséges a megfigyelt jelenség kialakulásához.

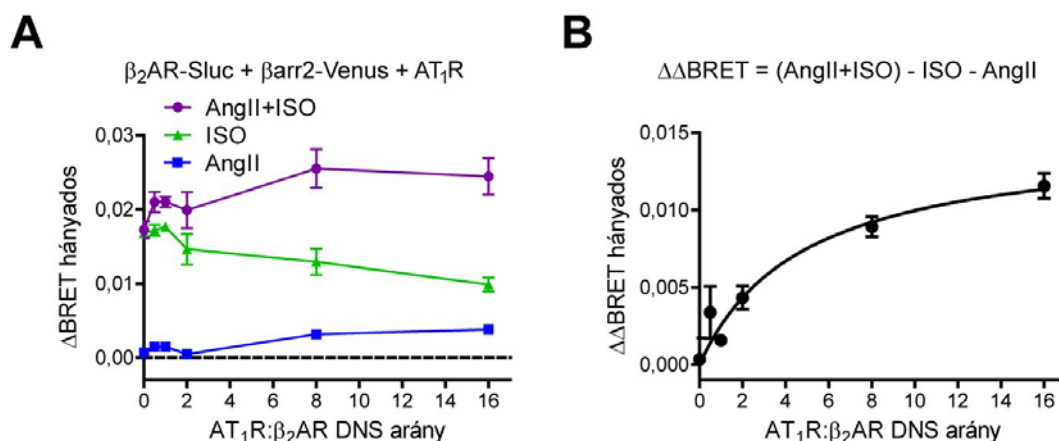
Mivel az AT₁R β₂AR-β-arresztin2 interakciót növelő hatása független volt minden vizsgált jelátviteli útvonaltól, ezért arra következtettünk, hogy a jelenség háttérében közvetlen interakció, feltehetőleg heterodimerizáció áll.



16. ábra Az AT_1R $\beta_2\text{AR}$ - β -arresztin kötést potenciózó hatásához nem szükséges az intracelluláris jelátvitel. **A**, $\beta_2\text{AR-Sluc}$, G-fehérjét nem aktiváló DRY/AAV AT_1R mutáns és β -arresztin2-Venus konstrukciókat koexpresszáló HEK 293T sejteken mértünk BRET-et. Az AngII potenciózó hatása továbbra is megfigyelhető, de annak kinetikája eltérő a vad típus AT_1R esetében látottól (lásd 15. ábra B) **B**, A sejteket $\beta_2\text{AR-Sluc}$, $5\text{HT}_{2c}\text{R}$ és β -arresztin2-Venus konstrukciókkal transzfektáltuk. $10\ \mu\text{M}$ ISO és $20\ \mu\text{M}$ szerotonin (5HT) stimulusokat alkalmaztunk. **C**, A sejteket $\beta_2\text{AR-Sluc}$, AT_1R és β -arresztin2-Venus konstrukciókat kódoló plazmidokkal transzfektáltuk. A kalciumdeplécióhoz a médiumot kalciummentes módosított Ringer oldatra cseréltük, amit $100\ \mu\text{M}$ kalciumkelátor EGTA-val is kiegészítettünk. Az intracelluláris raktárak kiürítéséhez 5 perces $200\ \text{nM}$ tapszigargin (TG) előkezelést alkalmaztunk. A protein kinázok gátlásához 30 perces előkezeléseket végeztünk kinázinhibitorokkal: $2\ \mu\text{M}$ GF109203X (PKC inhibitor), $1\ \mu\text{M}$ PP1 (Src gátlószer), $20\ \mu\text{M}$ PD98059 (MEK1/2 inhibitor) vagy DMSO (vehikulum kontroll). Az adatokat átlag+S.E. formában ábrázoltuk, a statisztikai analízishez kétszemponos varianciaanalízist alkalmaztunk, $n=3-10$, *, $P<0,05$, szignifikáns interakciót jelöl a két agonista között. **D**, A kalciumdepléció hatékonyságának ellenőrzése AT_1R -t és BRET alapú Cameleon D3 Ca^{2+} -bioszenzort koexpresszáló HEK 293T sejteken. A sejtek médiumát kalciummentes, $100\ \mu\text{M}$ EGTA tartalmú oldatra cseréltük. A $100\ \text{nM}$ AngII stimulus hatására létrejövő BRET jel emelkedés eltűnik a raktárak tapszigarginnal történő kiürítése után. A BRET jelet a stimulus előtti bazális jelre normalizáltuk (I/I_0).

5.1.4. A β_2 AR β -arresztin2 kötése függ az AT₁R expressziótól

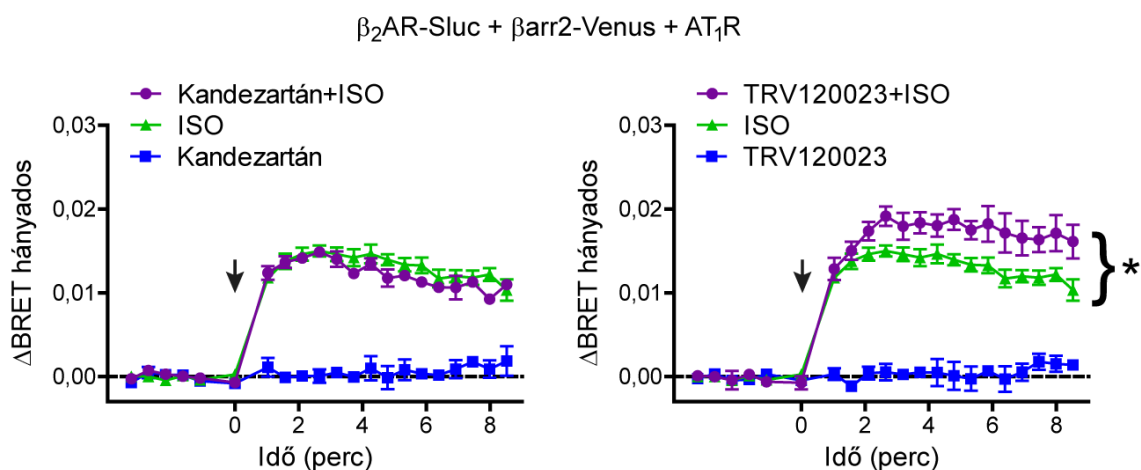
Mivel a β_2 AR monomer és dimer állapotban is előfordulhat a sejtekben [185], ezért a β_2 AR-oknak csak egy része képez heterodimert az AT₁R-rel. Amennyiben a heterodimerizáció áll a β -arresztin kötés potencírozásának háttérében, feltételezhető, hogy a jel nagyságát befolyásolja a heterodimerizált β_2 AR-ok száma a sejtekben. A tömeghatás törvényéből következően a AT₁R- β_2 AR heterodimer mennyiségének arányosnak kell lennie az AT₁R: β_2 AR expressziós aránnyal. Annak érdekében, hogy növelni tudjuk a heterodimerok számát, a transzfekciók során állandóan tartottuk a β_2 AR-Sluc-ot kódoló plazmidok mennyiségét, míg a jelöletlen AT₁R cDNS mennyiségét folyamatosan növeltük. A 17. ábra A paneljén látható, hogy AT₁R hiányában az AngII-nek nem volt hatása. Az AT₁R: β_2 AR cDNS arányának növelésével viszont a potencírozó hatás (a kostimuláció és az önálló ISO hatás közötti különbség) fokozatosan növekedett (17. ábra, B). Ezt a növekedést nem okozhatta a β_2 AR-Sluc nagyobb plazmamembrán expressziója, hisz az önálló ISO kezelés mellett enyhén csökkenő BRET jelet detektáltunk. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a β_2 AR β -arresztin2 kötésének mértéke függ a relatív AT₁R: β_2 AR expressziós aránytól, ami támogatja a következtetésünket a heterodimerizáció oki szerepéről.



17. ábra **A β_2 AR- β -arresztin2 kötése függ az AT₁R expressziótól.** HEK 293T sejteket 25 ng β_2 AR-Sluc, 100 ng β -arresztin2-Venus és változó mennyiségű (0; 12,5; 25; 50; 200 ill. 400 ng) jelöletlen AT₁R konstrukciókkal, miközben a DNS mennyiségét állandóan tartottuk üres vektor pcDNA3.1 hozzáadásával. 100 nM AngII és 10 μ M ISO stimulusokat alkalmaztunk, az adatok átlag \pm S.E., $n=3$. **A**, Az átlagos BRET hányados változásokat a transzfektált AT₁R: β_2 AR-Sluc DNS arányának függvényében ábrázoltuk. **B**, Az AngII általi potencírozás nagyságának jobb szemléltetéséhez kivontuk az AngII+ISO kezelés BRET jeléből az ISO kezelés jelét. Kivontuk továbbá az önálló AngII stimulusra létrejövő BRET jelet is, mivel az az AT₁R β -arresztin2 kötését mutatja (specifikus, „bystander” BRET). Egy-kötőhelyes telítési görbét illesztettünk a pontokra GraphPad szoftver segítségével ($r^2=0,9$).

5.1.5. Az AT₁R aktivációja jelátvitel-szelektív agonistával növeli a β₂AR-β-arresztin2 interakciót

A korábbi AT₁R-β₂AR heterodimert vizsgáló közleményben a szerzők azt mutatták, hogy a hagyományos AT₁R antagonistá lozartán keresztül hozott létre a β₂AR G-fehérje aktivációjában is [211]. Ezért megvizsgáltuk, hogy az AT₁R aktivitását különböző módon befolyásoló ligandumok miként hatnak a heterodimer működésére. A jelátvitel-szelektív AT₁R agonista TRV120023 (TRV023) nem aktivál G-fehérjét, de kiváltja az AT₁R β-arresztin kötését, a hagyományos AT₁R antagonistá (inverz agonista) kandezartán viszont mindkét effektor kötését gátolja [202, 240]. Ha ISO mellett 1 μM TRV120023-mal is stimuláltunk, az AngII hatáshoz hasonlóan emelkedett β₂AR-β-arresztin2 kötést tapasztaltunk, viszont a potencírozás kinetikája lassabb volt (18. ábra, bal panel). Ugyanezt tapasztaltuk más jelátvitel-szelektív AT₁R ligandumok (TRV120027, [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-AngII) alkalmazásakor is (erről dolgozatomban nem mutatok adatot). Ezzel szemben a 10 μM kandezartánnal történő kezelés egyáltalán nem befolyásolta a β₂AR-β-arresztin2 interakciót (18. ábra, jobb panel). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a G-fehérje kötés szempontjából antagonistá tulajdonságú ligandumok (azaz jelátvitel-szelektív ligandumok és hagyományos antagonisták) különböző módon hatnak az AT₁R-β₂AR heterodimer működésére.



18. ábra Az AT₁R-β₂AR heterodimer működését eltérő módon befolyásolja a nem szelektív AT₁R antagonistá és a β-arresztin-szelektív AT₁R agonista. BRET-et mértünk β₂AR-Sluc, AT₁R és β-arresztin2-Venus konstrukciókat koexpresszáló HEK 293T sejteken 10 μM ISO és 10 μM kandezartán vagy 1 μM TRV120023 stimulusok után. Az adatok átlag ± S.E., *n*=3, a * szignifikáns interakciót jelöl a két kezelés között (*P*<0,05, kétszemponos varianciaanalízis). A 15. ábra B. 16. ábra A és 18. ábra jobb paneljének kinetikai elemzéséhez és összevetéséhez a görbék meredekségét vizsgáltuk, amit a kostimuláció utáni 1. és 4. mérési pontok hányadosával

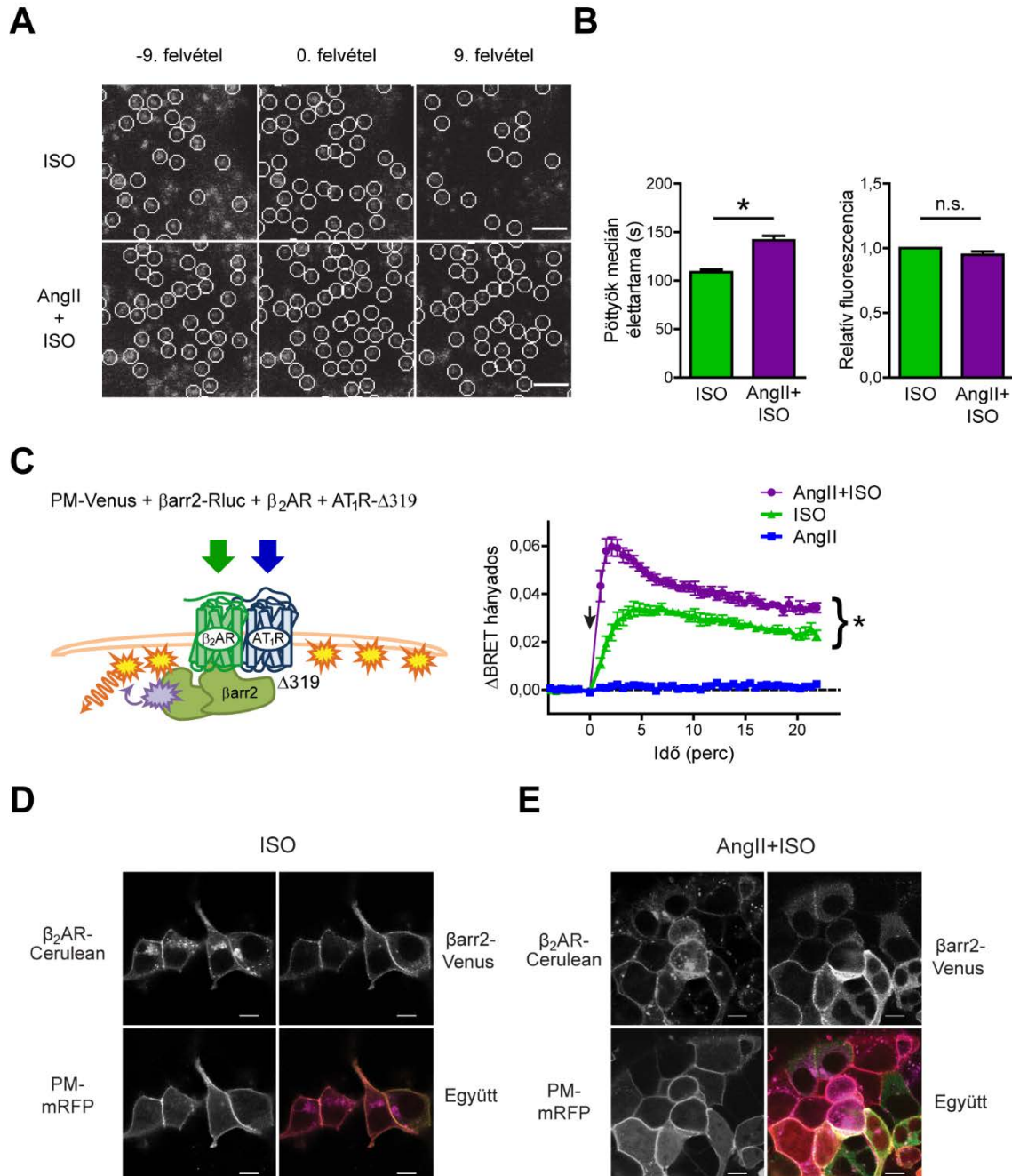
jellemeztünk minden kísérletben. Ez a hányados szignifikánsan alacsonyabb volt a DRY-mutáns koaktivációja és a TRV120023 kostimulus eseteiben a vad típusú receptor AngII kostimulációjánál látotthoz képest (egyszempontos variancia-analízis, Bonferroni post-hoc teszt, $p < 0,05$, $n = 3-10$, átlag \pm S.E.)

5.1.6. Az AT₁R és β_2 AR koaktiváció meghosszabbítja a β_2 AR asszociált β -arresztin2 klaszterek élettartamát

A β_2 AR aktiváció hatására a β -arresztin2 először a plazmamembránhoz transzlokálódik, majd az AP2-vel való interakció hatására klasztereket képez a klatrinburkos gödröcskékből [74, 75]. Hogy pontosabb képet kaphassunk a fokozott β -arresztin2 kötés háttérében álló mechanizmusról, megmértük a plazmamembrán β -arresztin2 klaszterek életidejét β_2 AR-Cerulean, AT₁R- Δ 319 és β -arresztin2-Venus-t koexpresszáló sejtekben konfokális mikroszkópia segítségével. Felvételeket készítettünk 10 másodpercenként a sejtek aljáról, és meghatároztuk az egyes β -arresztin pöttyök élettartamát (19. ábra, A és B). Az így detektált β -arresztin2-Venus pötty élettartamok hasonló tartományban mozogtak, mint korábbi, teljes belső visszaverődés fluoreszcencia (*total internal reflection fluorescence*, TIRF) mikroszkópiával történt vizsgálatokban [286]. Az AngII kezelés önmagában nem vezetett detektálható β -arresztin2 pöttyképződéshez (az adatot nem mutatjuk), mivel az alkalmazott AT₁R- Δ 319 receptor nem tartalmazza a β -arresztin kötéshez kritikus C-terminális régiót. AngII és ISO kostimuláció hatására azonban szignifikánsan megnőtt a β -arresztin2 pöttyök élettartama az önálló ISO kezeléshez képest, míg a pöttyök átlagos fluoreszcencia intenzitása között nem tapasztaltunk különbséget (19. ábra, B). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a heterodimerizáció miatt megemelkedett β_2 AR- β -arresztin2 kötés a két fehérje közötti stabilabb interakció következménye. A β -arresztin2 megnövekedett plazmamembrán kihelyeződését találtuk BRET mérésekben is (19. ábra, C). Ezekben a kísérletekben plazmamembránhoz irányított Venus és β -arresztin2-Rluc közötti bystander BRET-et mértünk, melynek növekedése a β -arresztin2 fokozott plazmamembrán menti dúsulását jelzi.

A β_2 AR A-osztályú receptorként klasszifikálható, azaz endocitózisa során gyorsan elengedi a β -arresztint. Megvizsgáltuk, hogy a stabilabb interakció következményeként létrejön-e a receptor és a β -arresztin korai endoszómákba történő kointernalizációja. A konfokális felvételeken látható, hogy mind az önálló ISO kezelés, mind a kostimuláció hatására az addig diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutató β -arresztin2-Venus

transzlokálódik a plazmamembránhoz, de a β -arresztin2 egyik esetben sem követi a β_2 AR-t intracelluláris vezikulákba (19. ábra, D és E). Ez azt mutatja, hogy a heterodimerizáció hatására kialakuló erősebb kapcsolat AT₁R stimuláció mellett sem elég stabil, hogy a kötés B-osztályúvá váljon.

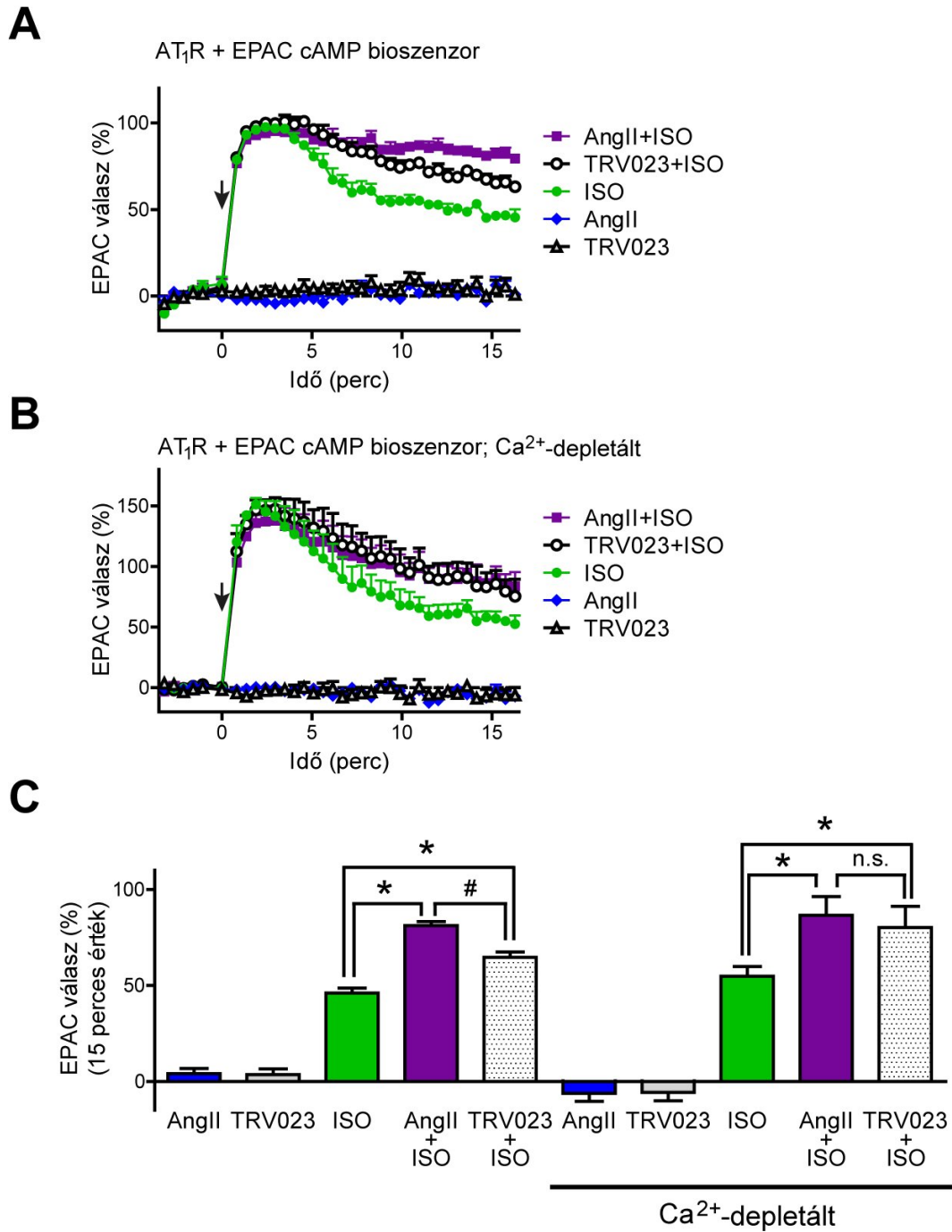


19. ábra Az AT₁R és a β_2 AR kostimulációja megnöveli a β -arresztin2 klaszterek életidejét. **A**, Reprerentatív konfokális mikroszkóp felvételek a β -arresztin2 klaszterekről β_2 AR-Cerulean, AT₁R- Δ 319 és β -arresztin2-Venus fehérjéket koexpresszáló sejtekről (Venus csatorna). 5-15 perccel stimuláció (ISO vagy AngII+ISO kezelés) után 20 felvételt készítettünk a sejtek aljáról

10 másodpercenként, az első (-9. felvétel), tizedik (0. felvétel) és a 19. kép (9. felvétel) látható az ábrákon. A β -arresztin2 klasztereket a 10. képen (0. felvétel) azonosítottuk neurális háló algoritmussal, majd követtük őket minden felvételen. A karikák a 0. felvételen azonosított pöttyöket jelölik, és az azoknak megfelelő pöttyöket a -9. és a 9. felvételen. Csak néhány pötty volt jelen minden képen ISO kezelés után. AngII+ISO kostimuláció után viszont a pöttyöknek egy nagy frakciója minden felvételen megmaradt, ami a β -arresztin2 klaszterek megnövekedett életidejére utal. A lépték 2 μ m. **B**, Bal panel: a neurális háló segítségével azonosított minden pötty medián életideje ISO és AngII+ISO kezelések után (7222 pötty 40 sejtből, ill. 6003 35 sejtből, 3 független kísérlet). Jobb panel: a pöttyök fluoreszcenciájának átlagos intenzitása (az ISO kezelés után detektált intenzitásokra normalizáltunk). *, $P < 0,0001$, páros kétoldalas kétmintás t -próba. **C**, HEK 293T sejteket plazmamembrán irányított Venus (PM-Venus), β -arresztin2-Rluc, jelöletlen β_2 AR és AT₁R- Δ 319 konstrukciókkal kotranszfektáltunk, majd mértük a β -arresztin2 plazmamembrán menti dúsulását az aspecifikus (bystander) BRET követésével, a BRET jel növekedése a β -arresztin2 transzlokációját jelzi a plazmamembrán-elhelyezkedésű β_2 AR-hez. Az átlagos BRET jel változásban szignifikáns interakciót találtuk a két kezelés között kétszemponos varianciaanalízis segítségével (*, $P < 0,05$, $n=3$). Az adatok átlag \pm S.E. **D-E**, A heterodimert képző β_2 AR β -arresztin kötési fenotípusa A-osztályú. Konfokális felvételek plazmamembrán irányított RFP (PM-RFP), β -arresztin2-Venus, β_2 AR-Cerulean és AT₁R- Δ 319 konstrukciókkal kotranszfektált sejtek középső keresztmetszetéről 20 perc ISO (**D**) vagy AngII+ISO (**E**) kezelése után. Stimuláció után a β_2 AR-Cerulean a plazmamembránban és intracelluláris vezikulákban is megtalálható, míg a β -arresztin2-Venus csak a plazmamembrán mentén detektálható. Reprezentatív felvételek három független kísérletből, a lépték 10 μ m.

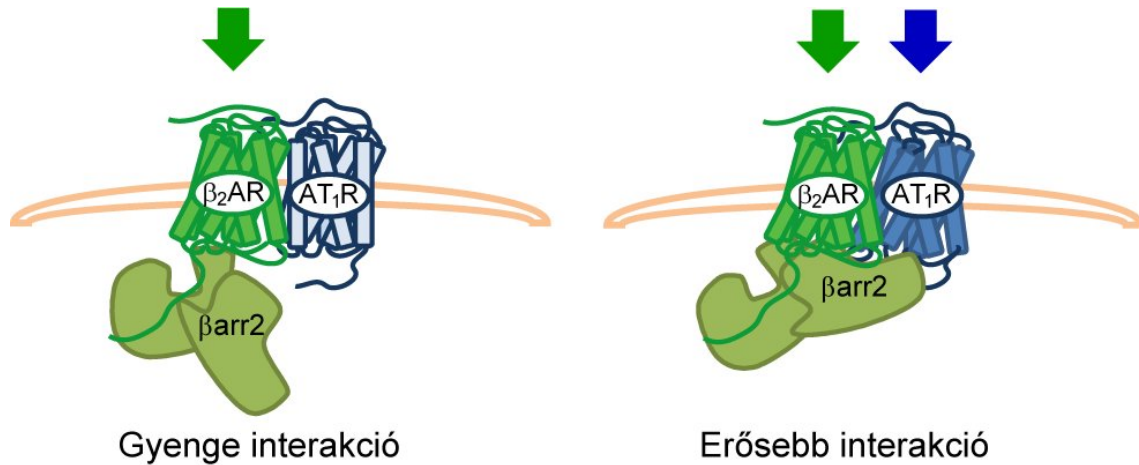
5.1.7. A β_2 AR által kiváltott cAMP jel tartósabbá válik szimultán AT₁R aktiváció esetén

A β -arresztinnek egyik legismertebb funkciója a G-fehérje aktiváció gátlása. Az elmúlt években azonban több tanulmány is kimutatta, hogy a hagyományos elképzelésektől eltérően cAMP jel akár receptor- β -arresztin-G-fehérje komplexek képződésén keresztül is kialakulhat [60, 132, 134, 135]. Az ilyen módon létrejövő cAMP jel mértéke összefüggést mutatott a receptor- β -arresztin interakció stabilitásával [60]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a tartósabb β -arresztin kötés mellé társul-e fenntartottabb cAMP jel. HEK 293T sejtekben koexpresszáltattunk AT₁R-t és BRET-alapú EPAC cAMP bioszenzort, és az endogén β_2 AR cAMP jelét követtük (20. ábra, A és C). Önálló AngII vagy TRV120023 kezelés nem indukált cAMP jelet. Ugyanakkor ISO és AngII vagy TRV120023 kostimuláció hatására elnyújtottabb cAMP jelet tapasztaltunk. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a Ca²⁺-függő jelátviteli utak képesek a cAMP jel potencírozására [287]. A kostimuláció utáni tartósabb cAMP jel azonban megfigyelhető volt kalcium depletált sejtekben is (20. ábra, B és C), mutatva, hogy a cAMP jel Ca²⁺-független útvonalon is szabályozódik. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az AT₁R aktiváció a β_2 AR-t nemcsak β -arresztin kötésében, hanem cAMP szignalizációjában is befolyásolja.



20. ábra Az AT₁R aktiváció elnyújtja az endogén β_2 AR cAMP jelét. A sejteket AT₁R és EPAC (BRET-alapú) cAMP bioszenzor konstrukciókkal kotranszfektáltuk, majd mértük a BRET hányadost az indikált stimulusokkal módon módosított Ringer oldatban (A) vagy Ca²⁺-depletált (kalciummentes, 100 μ M EGTA-val és 5 μ M TG-vel kiegészített) Ringer oldatban (B). A BRET változásokat a legnagyobb, ISO-indukált, módosított Ringer oldatban mért BRET-változás (100%-os EPAC válasz) százalékában fejeztük ki minden panelen. C, Az EPAC válaszok 15 perces értékeit ábrázoltuk oszlopdiagramon. Az adatok átlag + S.E., $n=3$, * szignifikáns interakciót jelöl az AngII és ISO kezelések között (kétszemponos varianciaanalízis), # szignifikáns különbséget mutat AngII+ISO és TRV023+ISO kezelések között (egyszemponos varianciaanalízis Bonferroni post hoc teszttel), $P<0,05$.

Eddigi eredményeink összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy az AT_1R és a β_2AR közötti kölcsönhatás jelentős hatással bírhat a sejten belüli jelátviteli folyamatokra (21. ábra).



21. ábra A β_2AR - AT_1R heterodimer működésének feltételezett modellje. A β_2AR stimulációja önmagában gyenge interakciót hoz létre a β_2AR és a β -arresztin között. AT_1R kostimulációja ezt az interakciót megerősíti, ami feltehetőleg a β_2AR allosztérikus szabályozásán és esetleg új β -arresztin kötőhely kialakításán keresztül jön létre.

5.2. Az inaktív AT₁R heterológ, β -arresztinen keresztüli szabályozásának vizsgálata

Ahogy korábban írtam, a β -arresztin a receptorhoz annak C-terminálisán és a magi régióján keresztül kötődhet [59]. Egy nemrég megjelent tanulmány azt találta, hogy az állapot, mikor a β -arresztin kizárólag a receptor C-terminális farkához kapcsolódik, sokkal kifejezettebb a B-osztályú receptorok esetében [60]. Ennek hátterében valószínűsíthetően a sokkal stabilabb C-terminális kötés állhat. Habár az általános elképzelés szerint az aktív receptor állapot a β -arresztin kötés elengedhetetlen feltétele [288], az előbbi eredmény azt sugallja, hogy a β -arresztinek akár az inaktív receptorokhoz is képesek lehetnek kapcsolódni, ha fennáll a β -arresztin és a receptor foszforilált C-terminálisa közötti stabil interakció strukturális alapja. Nevezetesen, a receptor C-terminális megfelelő helyein történő foszforilációja esetleg elegendő lehet ahhoz, hogy a β -arresztin az N-doménjével kötődhessen a receptorhoz. A GRK-k elsősorban az aktív receptorokat foszforilálják, ezzel szemben más kinázok, mint például a PKC, a receptort annak aktiváltságától függetlenül képesek foszforilálni [32]. Ha csak foszforiláció útján is létrejöhet stabil receptor- β -arresztin kötés, az a β -arresztin aktiváció egy új élettani mechanizmusát jelenthetné. Bár egyes receptorok esetében felmerült a β -arresztin szerepe a heterológ internalizáció folyamatában [164–166, 289], eddig mindössze csak az α_{1B} adrenerg receptor esetében mutattak ki β -arresztinnel közvetlen interakciót PKC foszforiláció után [289]. Az AT₁R esetében a heterológ deszenzitizációt β -arresztinektől független folyamatnak gondolták [290].

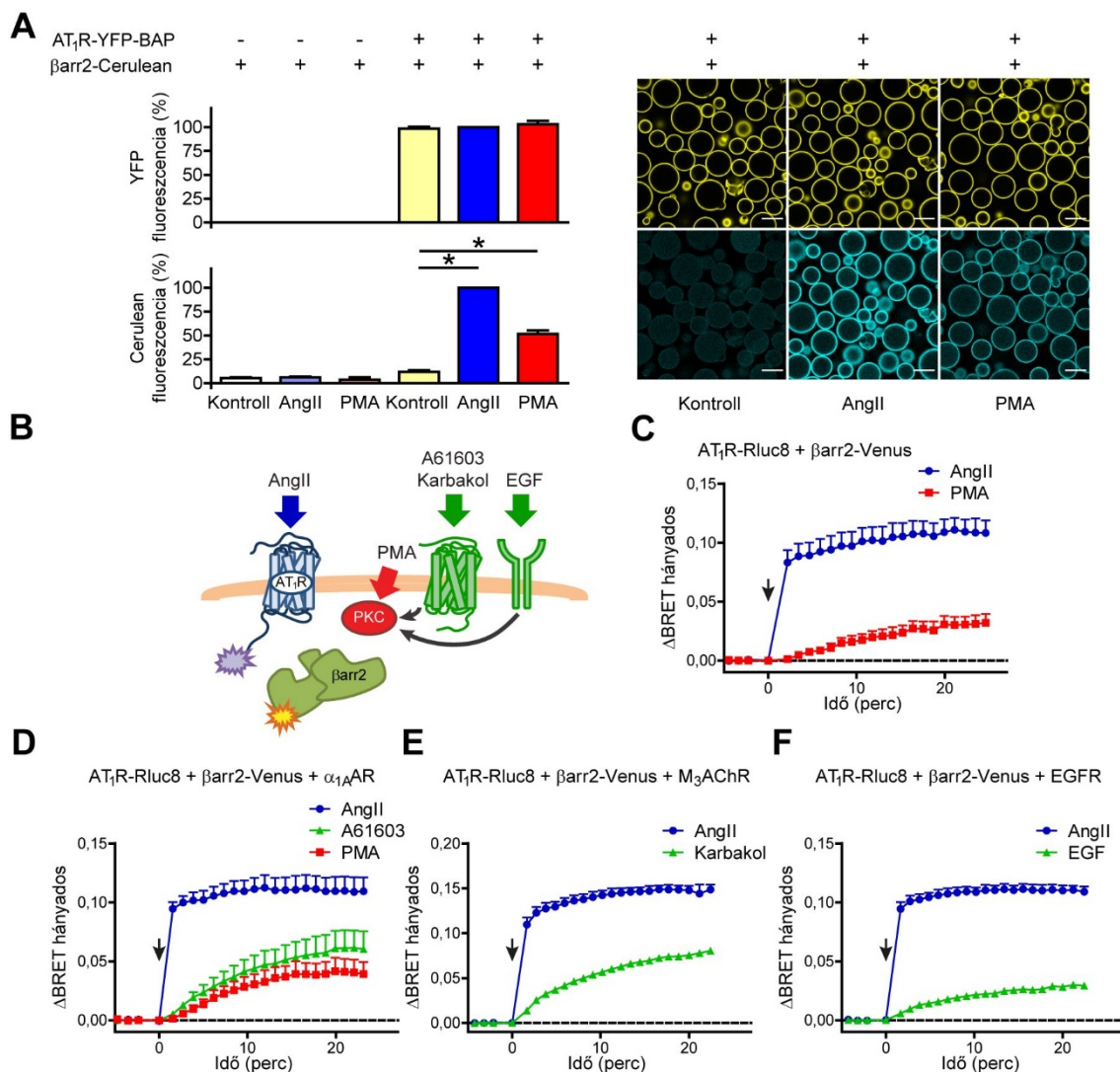
5.2.1. PKC aktiváció hatására a β -arresztin2 kötődik az AT₁R-hez

Mivel az AT₁R esetében a PKC és a GRK foszforilációs helyek átfednek egymással [285, 291, 292], megvizsgáltuk, hogy a PKC foszforiláció előidézi-e AT₁R- β -arresztin interakciót a receptor stimulációjának hiányában is. Az AT₁R és a β -arresztin2 közötti kötés vizsgálatához első menetben koprecipitációs kísérleteket végeztünk. HEK 293T sejtekben koexpresszáltattunk YFP- és biotin akceptor peptid-jelölt AT₁R-t (AT₁R-YFP-BAP), β -arresztin2-Ceruleant és BirA biotin ligázt. A sejteket 100 nM AngII-vel vagy 100 nM specifikus PKC-aktivátor forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) stimuláltuk 20 percig, majd koprecipitáltuk a β -arresztin2-Ceruleant a biotin-jelölt receptorral NeutrAvidin gyöngyök használatával (22. ábra, A). Meglepő módon azt

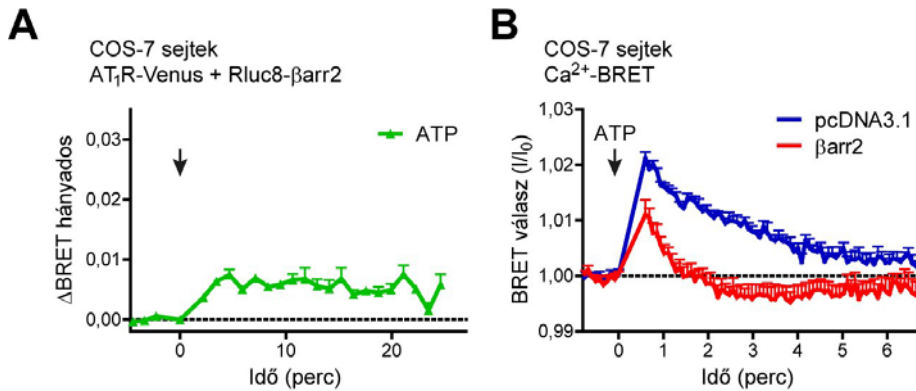
tapasztaltuk, hogy az AngII mellett a PMA is kiváltotta az AT₁R β -arresztin2 kötését. A heterológ β -arresztin2 kötés kinetikájának valós időben történő vizsgálatához BRET-et mértünk Rluc8-jelölt AT₁R és β -arresztin2-Venus között (22. ábra, B). Ezzel a méréssel is interakciót találtunk a két fehérje között PMA hatásra, azonban a kötés lassabb kinetikával jött létre, mint az AngII stimuláció esetében (22. ábra, C). Ez arra utal, hogy a β -arresztin2 lassabban asszociál az inaktív, mint az aktív receptorhoz, ami megfelel annak az elképzelésnek, hogy az aktív receptorkonformáció növeli a β -arresztin kötés affinitását. Identikus eredményeket kaptunk a β -arresztin1 esetében is (adatot nem mutatunk).

PKC aktivációhoz fiziológiásan G_{q/11}-fehérje kapcsolt és növekedési faktor receptorok (például EGFR) stimulációja vezethet [235]. Annak vizsgálatához, hogy G_{q/11}-kapcsolt receptor aktivációja esetén is létrejön-e a tapasztalt hatás, a BRET partnerek mellett jelöletlen α_{1A} adrenerg receptort is koexpresszáltattunk, mely receptor önmagában nem köt β -arresztint [213]. Az α_{1A} AR specifikus agonista A61603 (1 μ M) a PMA-hoz hasonló kinetikájú és mértékű AT₁R- β -arresztin2 kötést hozott létre (22. ábra, D). Hasonló eredményeket kaptunk a szintén G_{q/11}-kapcsolt M₃ muszkarinerg acetilkolin receptor (M₃AChR) és az EGFR stimulációja esetén (22. ábra, E és F), mutatva, hogy ez a mechanizmus nem receptor specifikus.

Ismert, hogy az overexpresszált receptorok stimulációja, ill. PMA hatására fiziológiásnál nagyobb mértékű PKC aktiváció jön létre. A továbbiakban ezért megvizsgáltuk, hogy endogén G_{q/11}-fehérje-kapcsolt receptorok stimulációja is létrehozza-e a megfigyelt jelenséget. Mivel HEK sejtjeinkben az endogén GPCR-ek stimulációja instabil és alacsony mértékű Ca²⁺ jelet váltott ki (adatot nem mutatunk), ezért kísérleteinket COS-7 sejteken végeztük el endogén purinerg receptorok aktiválásával. 50 μ M adenzin-trifoszfát (ATP) kezelés hatására az AT₁R-Venus és Rluc8- β -arresztin2 közötti BRET jel kismértékű, de szignifikáns nagyságú emelkedést tapasztaltuk (23. ábra, A). A jel kisebb amplitúdója és korábban létrejövő maximuma várható volt, mivel a β -arresztin2 overexpressziója deszenzitizálja az endogén purinerg receptorokat, amit mutatnak a BRET-alapú Ca²⁺ bioszenzorral történt mérések is (23. ábra, B).



22. ábra A β-arresztin2 kötődik a nem aktivált AT₁R-hez PKC általi foszforiláció hatására. **A**, A PKC aktiváció a β-arresztin2 AT₁R-hez történő kötődését váltja ki. HEK 293T sejteket kotranszfektáltunk NES-BirA (biotin ligáz), β-arresztin2-Cerulean ± AT₁R-YFP-BAP konstrukciókkal a jelölésnek megfelelően. 20 perces 100 nM AngII vagy 100 nM PMA stimuláció után a sejteket lizáltuk és a biotinnal jelölt AT₁R-t lehúztuk NeutrAvidin gyöngyök segítségével. Bal panel: YFP- és Cerulean fluoreszcenciája a koprecipitált fehérjéknek. Az értékeket a gyöngyök autofluoreszcenciájára normalizáltuk. $n=3$, $*, P<0,05$, egyszempontos varianciaanalízis (ismételt mérések, a kontroll AT₁R-YFP-BAP-ot tartalmazó mintákhoz viszonyítva) Bonferroni post hoc teszttel. Jobb panel: reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek a lehúzott fehérjék YFP (felül) és Cerulean (alul) fluoreszcenciájáról, a fehérjéket a gyöngyök felszínéhez kötve láthatjuk. A lépték 100 μm. **B**, Az alkalmazott BRET felállítás sematikus rajza. **C-F**, A PKC aktiváció hatására létrejövő AT₁R-β-arresztin2 kötés kinetikája. Intermolekuláris BRET-et mértünk AngII (**C-F**), PMA (**C, D**), α_{1A}AR specifikus agonista A61603 (1 μM, **D**), M₃AChR agonista karbakol (*carbachol*, 10 μM, **E**) vagy 100 ng/ml EGF (**F**) stimulusk után 70 másodpercenként a jelzett konstrukciókat koexpresszáló sejtekben. A ΔBRET hányados képzéséhez a vehikulummal kezelt kontroll sejtek BRET hányadosát kivontuk a stimulus hatására létrejövő BRET hányadosból. Az adatok átlag + S.E., $n=6$ (**C**) vagy $n=3$ (**D-F**).



23. ábra Endogén $G_{q/11}$ -kapcsolt receptorok aktivációja kiváltja az AT_1R β -arresztin2 kötését. **A**, COS-7 sejteket AT_1R -Venus és Rluc8- β -arresztin2 konstrukciókkal kotranszfektáltunk, majd a BRET méréseket 48 órával a transzfektáció után végeztük. 50 μ M ATP-t alkalmaztunk az endogén purinerg receptorok stimulációjára. Az ATP szignifikánsan növelte a BRET jelet (az átlag BRET jelet hasonlítottuk össze a nem stimulált kontroll sejtekével páros, kétmintás, kétoldalas *t*-próba segítségével, $P < 0,05$). **B**, A β -arresztin2 overexpressziója növeli az endogén purinerg receptorok deszenzitizációját. A Ca^{2+} -jelet BRET-alapú Ca^{2+} bioszenzor segítségével követtük Cameleon D3 Ca^{2+} BRET bioszenzorral és β -arresztin2-vel vagy üres vektor pcDNA3.1-gyel kotranszfektált COS-7 sejtekben. A Ca^{2+} -jel kisebb mértékű és rövidebb időtartamú volt a β -arresztin2 koexpressziója esetén.

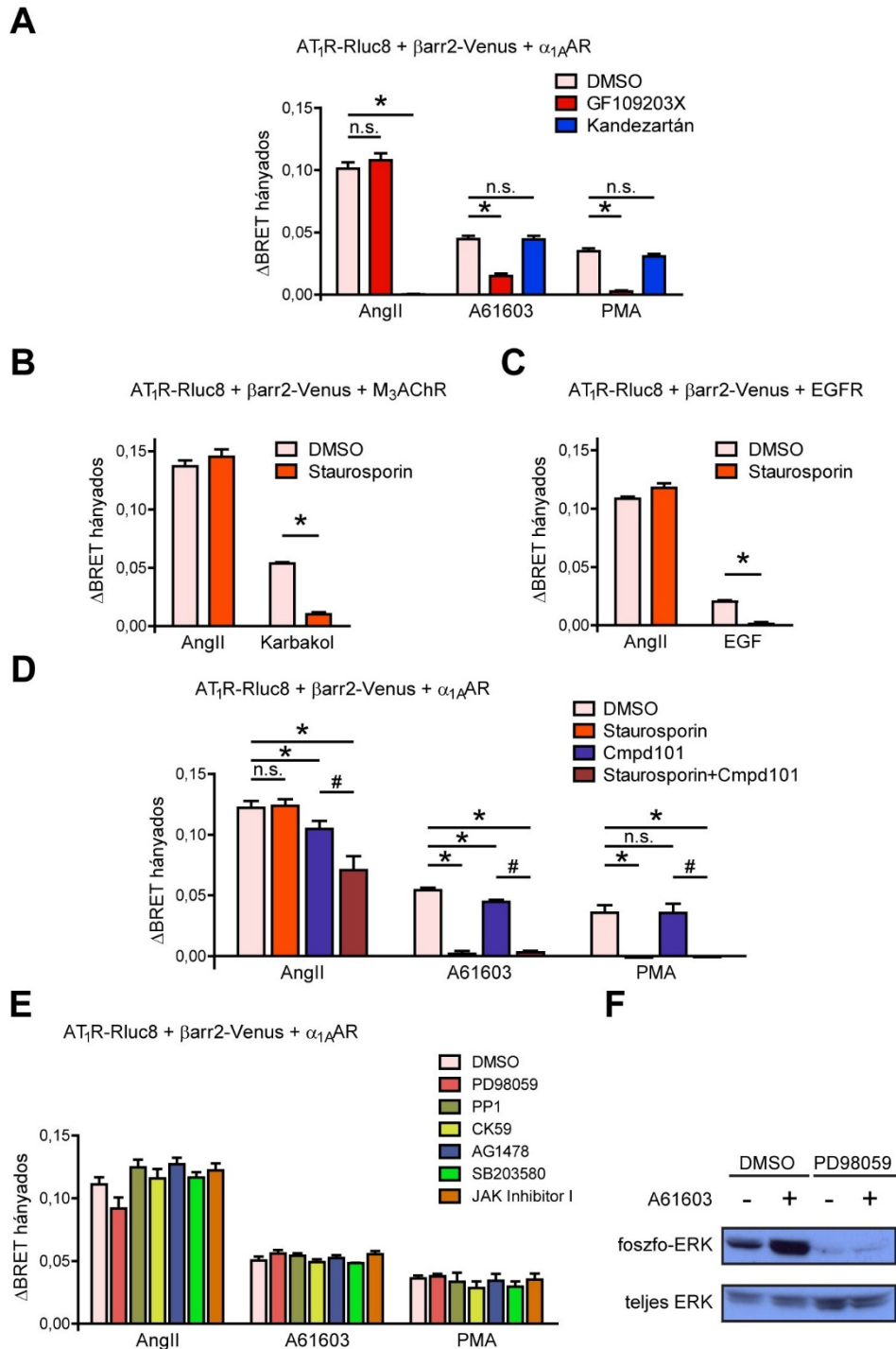
A PKC szerepének bizonyításához előkezeléseket végeztünk specifikus PKC gátlószerekkel GF109203X-szel (2 μ M) és széles spektrumú protein kináz inhibitor staurosporinnal (500 nM, mely koncentrációban nem hat jelentős mértékben a GRK aktivitásra [293]) AT_1R -Rluc8, β -arresztin2-Venus és $\alpha_{1A}AR$ konstrukciókat koexpresszáló HEK 293T sejteken (24. ábra, A és D). Mindkét előkezelés kivédte a PMA és az $\alpha_{1A}AR$ agonista hatását a BRET-es rendszerünkben. Az M_3AChR és az EGFR indukált AT_1R - β -arresztin2 kötés szintén érzékeny volt a PKC gátlásra (24. ábra, B és C).

Habár ismert, hogy az AT_1R C-terminálisa tartalmaz 3 konszenzus PKC foszforilációs helyet [265, 292], felmerül, hogy a PKC közvetlen, más kinázok aktivációján keresztül is kifejtheti hatását. Korábban leírták, hogy a PKC képes fokozni a GRK2 aktivitását [294], de gátolja a GRK5-öt [295]. Megvizsgáltuk ezért, hogy a PKC esetleg GRK2-n keresztül hozza-e létre az AT_1R - β -arresztin2 kötést. A GRK2/3 gátlószerek compound 101 (Cmpd101, 30 μ M) azonban nem befolyásolta a PMA hatást, és az $\alpha_{1A}AR$ agonista hatását is csak kismértékben csökkentette (24. ábra, D). Megvizsgáltuk számos további, a heterológ folyamatban esetlegesen résztvevő kináz szerepét is kináz gátlószerek (Src-kináz inhibitor PPI (1 μ M), Ca^{2+} -kalmodulin függő protein kináz II inhibitor CK-59 (20 μ M), EGFR tirozin kináz gátló AG1478 (10 μ M), p38 MAPK inhibitor SB203580 (20 μ M), a Janus-arcú kinázokat (JAK) gátló JAK-Inhibitor I (1 μ M))

alkalmazásával (24. ábra, E). Egyik sem befolyásolta azonban a heterológ β -arresztin2 kötést. Nemrégiben igazolták az ERK1/2 szerepét a CXCR₄ heterológ deszenzitizációjában [147], ezért megvizsgáltuk az ERK kaszkád esetleges szerepét a folyamatban. A MEK1/2 inhibitor PD98059 (100 μ M) bár megszüntette az ERK1/2 aktivációt, de szintén nem gátolta a β -arresztin2 kötést (24. ábra, E és F). Ezek az eredmények támogatják azt az elképzelést, hogy a PKC hatások alapvetően közvetlenek.

Érdekes módon a Cmpd101 vegyület a homológ (AngII-indukált) kötést csak enyhén gátolta, mely gátlást a széles spektrumú PKC gátlószer staurosporin szignifikánsan potenciózta (24. ábra, D). Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a PKC és a GRK foszforilációs helyek átfednek egymással, ezért bármelyik kináz aktivitása elegendő az AT₁R β -arresztin2 interakció létrejöttéhez. A maradék β -arresztin kötésért további GRK-k általi foszforiláció lehet a felelős.

A heterológ β -arresztin2 kötésnek az AT₁R konstitutív aktivitásától való függését inverz agonista előkezeléssel zártuk ki (24. ábra, A). A kandezartán teljesen meggátolta az AngII hatását, viszont nem befolyásolta a PMA-indukált kötést, bizonyítva, hogy a heterológ β -arresztin2 aktiváció független a receptor aktiváltsági állapotától. Továbbá ez azt is mutatja, hogy nem áll valamilyen a sejtekből autokrin módon felszabaduló AT₁R agonista a jelenség hátterében.

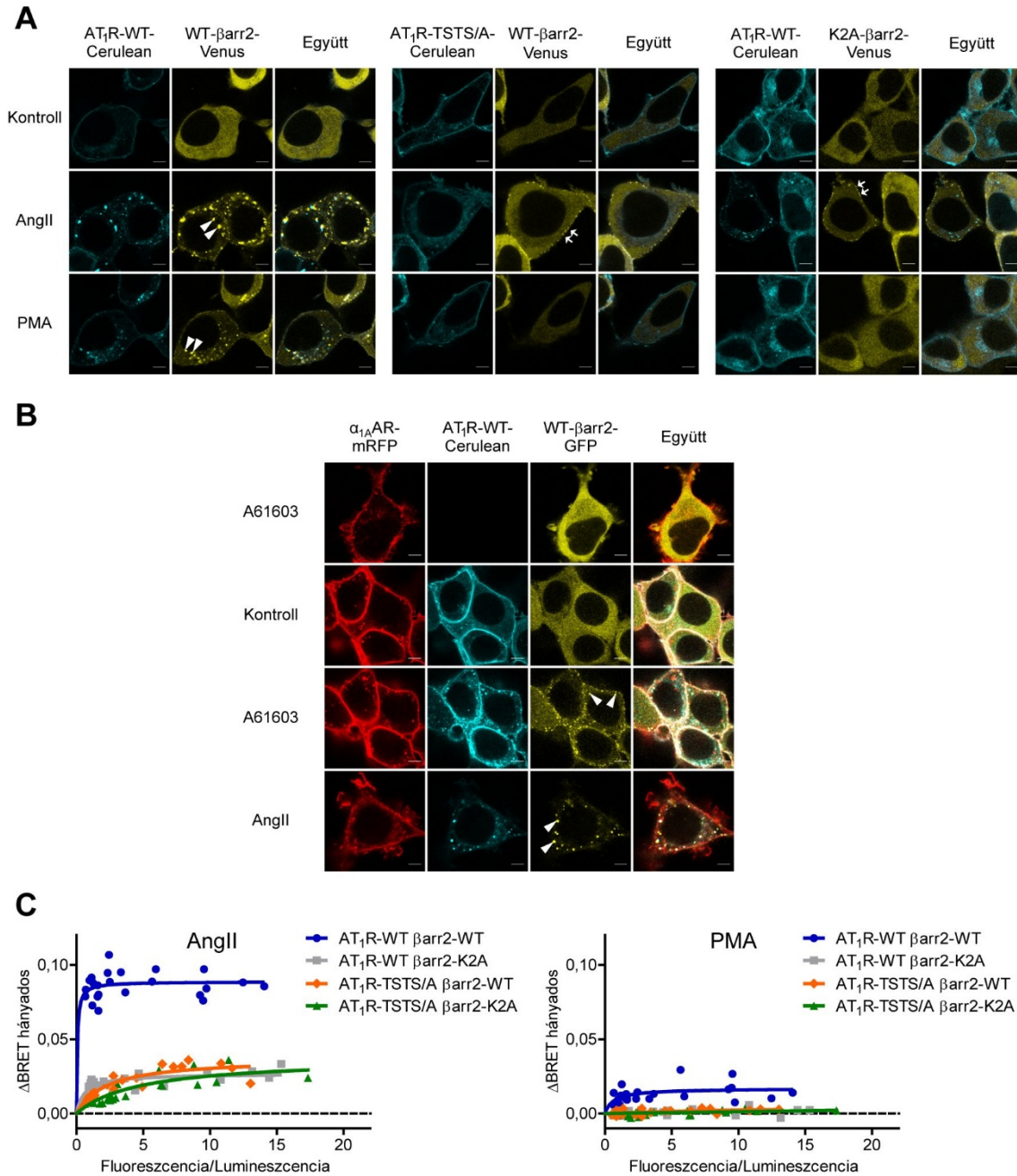


24. ábra Az AT₁R heterológ β-arresztin2 kötése PKC-foszforiláció függő, de nem szükséges hozzá a receptor aktív állapota. HEK 293T sejteket kotranszfektáltunk AT₁R-Rluc8, β-arresztin2-Venus és jelöletlen α_{1A}AR (A, D, E,) vagy M₃AChR (B) vagy EGFR (C) konstrukciókkal (a feliratoknak megfelelően). A BRET mérések előtt 30 perces előkezeléseket végeztünk a következő hatóanyagokkal: PKC inhibitor GF109203X (2 μM, A), AT₁R inverz agonista kandezartán (10 μM, A), széles spektrumú kináz inhibitor staurosporin (500 nM, A-D), GRK2/3 inhibitor Cmpd101 (30 μM, D), MEK1/2 inhibitor PD98059 (100 μM, E), Src inhibitor PP1 (1 μM, E), kalcium/kalmodulin-dependens protein kináz II inhibitor CK59 (20 μM, E), EGFR tirozin kináz gátlószer AG1478 (10 μM, E), p38 MAPK inhibitor SB203580 (20

μM , **E**), Janus-arcú kinázokat (JAK) gátló JAK Inhibitor I ($1 \mu\text{M}$, **E**) vagy vehikulum (DMSO). A BRET mértékét 70 másodpercenként mértük meg, az oszlopdigramokon a stimulus utáni 24 percben mért BRET jelek átlagát (görbe alatti területet) mutatjuk. Az adatok átlag + S.E., $n=3-4$, *, szignifikáns gátló interakciót mutat az előkezelés és a stimulus között, # szignifikáns interakciót mutat a staurosporin és Cmpd101 előkezelés között kétszemponos varianciaanalízis vizsgálatával, $P<0,05$, a nem szignifikáns (n.s.) jelölés vagy a csillag hiánya esetén nem történt szignifikáns mértékű gátlás. A heterológ β -arresztin2 kötés PKC inhibitorral kivédhető volt, de nem befolyásolta azt az AT_1R inverz agonistával történt előkezelés. Az AngII hatást GRK2/3 inhibitor önmagában enyhén gátolta, amit a PKC gátlás staurosporinnal szignifikáns mértékben potenciózott, ami összhangban van azzal, hogy a GRK és PKC foszforilációs helyek átfednek egymással. **F**, A PD98059 előkezelés kivédte az $\alpha_{1A}\text{AR}$ stimuláció által előidézett ERK foszforilációt. A sejteket 2 órás szérummegvonást követően 30 percig vehikulummal (DMSO) vagy $100 \mu\text{M}$ PD98059-cel kezeltük elő, majd $\alpha_{1A}\text{AR}$ agonistával (A61603, $1 \mu\text{M}$) stimuláltuk 5 percig. 3 független kísérletből származó reprezentatív blotok láthatóak a foszfo-ERK válaszról, a felvitt ERK mennyiséget a teljes ERK blotok mutatják.

5.2.2. A β -arresztin a stabilitási kapcsolón keresztül köt az inaktív AT_1R -hez

Következőleg megvizsgáltuk, hogy a heterológ β -arresztin2 kötés az alapfelvetésünknek megfelelően tényleg tartós-e. Ehhez konfokális mikroszkóppal tanulmányoztuk a Cerulean-jelölt AT_1R és a β -arresztin2-Venus sejten belüli elhelyezkedését. Bazális állapotban a β -arresztin2 diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott, míg PMA hatásra az AngII stimulációnál látotthoz hasonló, stabil, B-osztályú kötődés alakult ki: a receptor a β -arresztin2-vel együtt internalizálódott intracelluláris vezikulákba (25. ábra, A, bal panel). $\alpha_{1A}\text{AR}$ -mRFP stimuláció esetén szintén a β -arresztin2 AT_1R -hez történő kötődését és kointernalizációját tapasztaltuk (25. ábra, B). Ezzel szemben nem alakult ki a β -arresztin2 áthelyeződés $\alpha_{1A}\text{AR}$ aktiváció után AT_1R expresszió hiányában (25. ábra, B, felső sor). Mivel PKC hatásra B-osztályú β -arresztin kötés jött létre, feltételeztük, hogy a heterológ mechanizmus kialakulásához azoknak a strukturális elemeknek a kapcsolódása szükséges, melyek szerepet játszanak a stabil interakció kialakításában.



25. ábra **A** β -arresztin2 PKC-indukált AT₁R kötéséhez stabil kapcsolat kialakítása szükséges a receptor C-terminálissal. **A**, PMA hatásra B-osztályú AT₁R- β -arresztin2 kötés jön létre a stabilitási kapcsolón keresztül. Konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk vad típusú (WT) vagy foszforiláció deficiens (TSTS/A) mutáns AT₁R-Cerulean és vad típusú vagy foszfát kötésben deficiens (K2A) mutáns β -arresztin2-Venus konstrukciókat koexpresszáló HEK 293T sejtekről (a feliratoknak megfelelően) 20 perces 100 nM PMA kezelés előtt (felül) ill. után (alul) vagy 20 perces 100 nM AngII stimuláció után (középen). A PMA és az AngII kezelések a vad típusú AT₁R-Cerulean és β -arresztin2-Venus együttes endoszómális megjelenését váltották ki. Ezzel szemben mind a TSTS/A, mind a K2A mutációk esetén a β -arresztin2 kihelyeződése csak a plazmamembrán mentén figyelhető meg AngII stimuláció után, míg a PMA-indukált transzlokáció megszűnt. **B**, A sejteket α_{1A} AR-mRFP, β -arresztin2-GFP konstrukciók mellett AT₁R-WT-Ceruleannal (alsó 3 sor) vagy anélkül (felső sor) kotranszfektáltuk, és AngII vagy α_{1A} AR agonista A61603-mal (1 μ M) stimuláltuk. AT₁R-WT-Cerulean koexpresszió hiányában

A61603 hatására nem jött létre β -arresztin2 redisztribúció, ezzel szemben AT_1R jelenlétében B-típusú kötés jött létre az AT_1R és a β -arresztin2 között. Az **A** és **B** paneleken reprezentatív felvételek láthatóak 3 független kísérletből. A nyílhegyek B-osztályú (endoszómális) kötetést, a nyilak pedig A-osztályú (csak plazmamembrán menti) kötetést jeleznek. **C**, A stabilitási kapcsoló szerepe az AT_1R - β -arresztin2 kötésben. BRET titrációs kísérleteket végeztünk el. A sejteket állandó mennyiségű WT vagy TSTS/A mutáns AT_1R -Rluc8 és növekvő mennyiségű WT vagy K2A mutáns β -arresztin2-Venus konstrukciókat kódoló plazmidokkal kotranszfectáltuk. A stimulus (bal panel: AngII, jobb panel: PMA)-indukált átlagos BRET jel változásokat a fluoreszcencia/lumineszcencia hányados függvényében ábrázoltuk. Egy-kötőhelyes telítési görbéket illesztettünk a mért pontokra. A mutációk az AngII-indukált kötetést részlegesen, a PMA által kiváltottat teljesen gátolták.

Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a stabil AT_1R - β -arresztin kötés létrejöttéhez szükséges a receptor C-terminálisának egy szerin-treonin motívuma (T332, S335, T336 és S338 (TSTS)) [265, 285, 296] és a β -arresztin2 N-domén I. β -redőjében található két lizin (K11 és K12) [152]. Megjegyzendő, hogy az utóbbi háttérben a szerzők a két lizin ubikvitinációjának szerepét feltételezték [152], azonban más munkacsoportok kimutatták, hogy ezek a lizinek foszfát-kötésért felelős aminosavak minden arresztinben [52, 57, 276, 297]. Annak vizsgálatához, hogy ugyanezen elemek felelősek-e a heterológ β -arresztin2 kötésért, alaninra cseréltük az előbb említett aminosavakat (AT_1R -TSTS/A és K2A- β -arresztin2). A korábbi adatoknak megfelelően mindkét mutáns a kötés stabilitásának tranzienssé (A-osztályúvá) válását eredményezte AngII stimuláció esetén (25. ábra, A, középső és jobb panel), azaz a β -arresztin2 csak a plazmamembránhoz transzlokálódott, de nem jelent meg intracelluláris vezikulákban. A mutáns fehérjék kötésének mértékét BRET-tel kvantifikáltuk. Hogy kizárjuk az expressziós különbségből eredő BRET jel különbséget, BRET titrációs méréseket végeztünk állandó mennyiségű Rluc8-jelölt receptor és növekvő mennyiségű Venus-jelölt β -arresztin2 konstrukciók kotranszfectációját követően. Mindkét mutáció hasonló mértékben csökkentette az AT_1R - β -arresztin2 interakció mértékét (25. ábra, C). Nem tapasztaltunk azonban további kötéscsökkenést a két mutánst együtt expresszáltatása esetén, ami arra utal, hogy a foszforilált S-T és a K11,12 aminosavak nem egymástól függetlenül hatnak az interakció erősségére, tehát feltételezhető, hogy a két régió között közvetlen interakció alakul ki. Mivel ezen szerkezeti elemek kapcsolódása szükséges a stabil kötés kialakulásához, elneveztük ezt a molekuláris struktúrát „stabilitási kapcsolónak”. Hipotézisünknek megfelelően azt találtuk, hogy a stabilitási kapcsoló kialakulása kritikus a PMA által kiváltott interakció létrejöttéhez: mindkét mutáció teljes mértékben megszüntette a PKC-függő kötetést (25. ábra, B és C). Azaz a homológ és

heterológ mechanizmusokban tapasztalt stabil β -arresztin2 kötés ugyanazon a strukturális háttéren alapszik, a PKC is a stabilitási kapcsoló kialakításán keresztül hozza létre az interakciót.

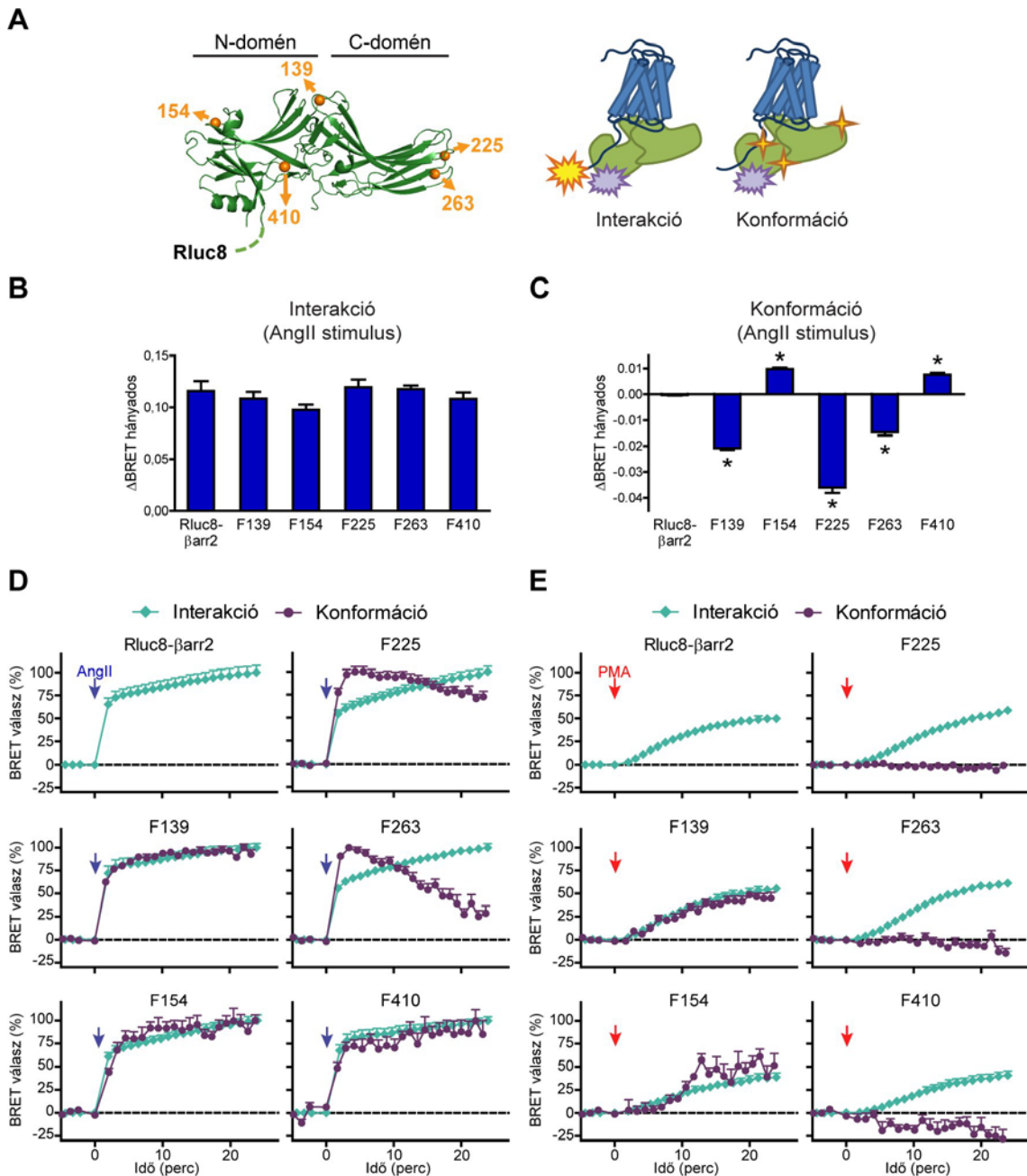
5.2.3. A β -arresztin2 konformációját meghatározza az AT₁R-hez való kapcsolódásának módja

Mivel ismert, hogy a β -arresztinek több különböző konformációt is felvehetnek, ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogy függ-e a β -arresztin2 konformációja a receptorkötés mechanizmusától. A strukturális átrendeződések követésére intramolekuláris β -arresztin2 FAsH BRET bioszenzorokat hoztunk létre korábban közölt FRET- és BRET-alapú szenzorok mintájára [65, 66]. FAsH festék kötésére képes CCPGCC aminosav motívumokat építettünk be a β -arresztin2 fehérjén belülré különböző pozíciókban (26. ábra, A). A CCPGCC motívumokat a 139., 154., 225., 263., ill. 410. aminosavak után (az F139, F154, F225, F263 és F410 szenzorokban) ágyaztuk be, így az F139 és F154 az N-domén, az F225 és F263 a C-domén, az F410 pedig a C-terminálison tartalmaz jelölést. A korábban publikált BRET szenzorokkal szemben mi a szenzorok N-terminálisára Rluc8-at, a biolumineszcens Rluc-nak egy hatszor fényesebb variánsát építettük be [298]. Ez a technikai fejlesztés lehetővé tette számunkra, hogy valós időben követhessük a β -arresztin2 konformációváltozásának dinamikáját legalább 20 percen keresztül.

Elsőként megvizsgáltuk, hogy a CCPGCC motívumok behelyezése befolyásolta-e a β -arresztin2 receptorhoz való kötődését. FAsH festék hiányában a donort tartalmazó szenzor és Venus-jelölt AT₁R között mért intermolekuláris BRET segítségével meghatározhatjuk a két fehérje közötti interakció mértékét. A 26. ábra B paneljén látható, hogy a FAsH-kötő motívumok behelyezése nem változtatta meg a szenzorok AT₁R-hez való kapcsolódásának mértékét a kontroll Rluc8- β -arresztin2-höz képest AngII stimuláció esetén.

Ezután a β -arresztin2-n belüli konformációs változásokat vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben jelöletlen AT₁R-t és különböző β -arresztin2 bioszenzorokat koexpresszáltattunk, majd FAsH jelölés után intramolekuláris BRET-et mértünk a donor Rluc8 és a FAsH festék között. AngII stimuláció hatására BRET jel növekedést mértünk

az F154 és F410 szenzorokkal, míg az F139, F225 és F263 szenzorok BRET jel csökkenéssel válaszoltak (26. ábra, C).



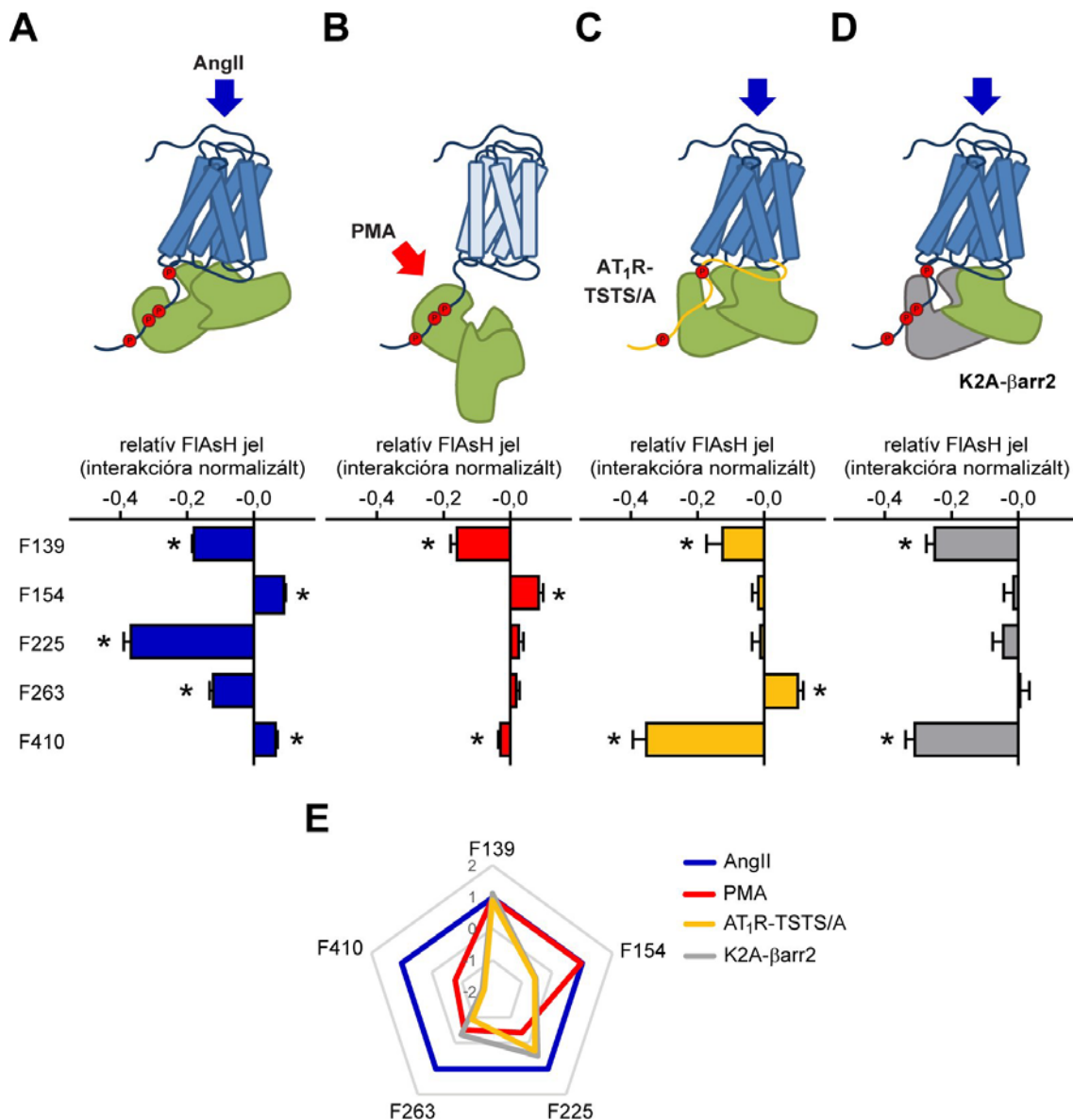
26. ábra A β -arresztin2 kötés és konformációs változás valós idejű követése. A, A FIAsh-alapú β -arresztin2 bioszenzorok sematikus rajza a szarvasmarha β -arresztin2 kristálystruktúrája alapján (a Protein Data Bank adatbázis leltári száma: 3P2D [47]). Az Rluc8-at a β -arresztin2 N-terminálisához, míg a FIAsh-kötő CCPGCC aminosav motívumokat a patkány β -arresztin2 jelölt aminosav pozíciói után helyeztük el (F139, F154, F225, F263 és F410, az ezeknek megfelelő szarvasmarha β -arresztin2 pozíciókat kiemeltük, az F410 a megoldott struktúra utolsó aminosava (393) utánra mutat). Az interakciót intermolekuláris BRET segítségével határozhatjuk meg FIAsh festéket nem kapó Rluc8- β -arresztin2 FIAsh bioszenzor és Venus-jelölt AT₁R között. A konformációs változást az intramolekuláris BRET követésével mérhetjük jelületlen AT₁R és

bioszenzort koexpresszáló sejtekben FAsH festékkel történő jelölés után. **B**, A szenzorok AT₁R kötésének mértéket nem befolyásolta a FAsH-kötő motívumok beillesztése. Intermolekuláris (interakció) BRET-et mértünk Rluc8- β -arresztin2 vagy bioszenzor konstrukció és AT₁R-Venus között AngII stimuláció után. Az átlagos (stimulus utáni 24 percben mért) BRET hányados változásban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni post-hoc teszt, $n=6$) **C**, A szenzorok alkalmasak a β -arresztin2 konformációváltozásának kimérésére. Jelöletlen receptort és Rluc8- β -arresztin2 vagy bioszenzor konstrukciókat koexpresszáló sejtekben a FAsH-jelölés után intramolekuláris (konformációs) BRET-et mértünk. A bioszenzorok szignifikáns mértékű BRET jel változással reagáltak az AngII stimulációra (átlagos BRET jel változás, páros kétmintás kétoldalas t -próba, *, $P<0,05$, $n=6-10$). **D**, A β -arresztin2 kötés és konformációváltozás dinamikája AngII hatásra. A **B** és **C** paneleken látható mérések kinetikus görbéit ábrázoltuk a legnagyobb mértékű (AngII-indukált) BRET változás százalékában az egyes felállásokban (az Rluc8- β -arresztin2 esetében nem mutatunk konformációs jelet, mivel az nem mutatott szignifikáns BRET jel változást). Az N-domén (F139, F154) és a C-terminális (F410) szenzorok az interakcióval párhuzamos lefolyású konformációsváltozást mutattak, míg a C-domén (F225, F263) szenzorok eltérő dinamikájú konformációsváltozást jeleztek, ami a C-domén dinamikus strukturális átrendeződésére utal. **E**, A β -arresztin2 kötés és konformációváltozás dinamikája PMA hatásra. A **D** panelen látottal megegyező módon mutatjuk a PMA-indukált jeleket, a 100% itt is a legnagyobb AngII-kiváltott BRET változás az egyes kísérleti felállásokban. Csak az N-domén és a C-terminális szenzorok jeleztek konformációsváltozást PMA hatása (az utóbbi az AngII hatáshoz képest ellenkező előjelű, és arányaiban kisebb mértékű), melyek kinetikája az interakcióéval megegyezett, ami statikus β -arresztin2 konformációváltozásra utal.

A β -arresztin2 receptorkötésének és konformációváltozásának kinetikus összehasonlításának elősegítéséhez az adatokat a legnagyobb jelváltozás százalékában ábrázoltuk (26. ábra, D). Az F139, F154 és F410 szenzorok intramolekuláris BRET jelének dinamikája megegyezett a szenzor és AT₁R-Venus közötti intermolekuláris BRET jel dinamikájával, ami arra utal, hogy a β -arresztin2-n belüli konformációváltozás a receptorhoz történő kapcsolódással párhuzamosan jött létre. A C-domén szenzorok (F225 és F263) jelének maximuma viszont már pár perccel stimulálás után bekövetkezett, melyet csökkenés követett, szemben az AT₁R- β -arresztin2 interakció kinetikájával, amely folytonos növekedést, majd egy platót mutatott. Ebből arra következtethetünk, hogy a C-domén konformációváltozásai nem fejeződnek be a receptorkötés után azonnal, hanem a fehérje ezen részének strukturális átrendeződései dinamikusak, folyamatosan változnak a receptor stimuláció után legalább 20 percig.

A heterológ β -arresztin2 kötés hatására létrejövő konformációváltozásokat PMA stimulációval vizsgáltuk. Mivel a konformációs (intramolekuláris) BRET jelet meghatározza az aktivált β -arresztinek aránya, hogy a különböző mértékű receptor- β -arresztin kötés mellett fellépő konformációs jeleket összevethessük, relatív FAsH jelet képeztünk az interakció mértékére való normalizálással. Az F139 és F154-es

szenzorokkal kapott relatív FIAsH jelek hasonlóak voltak PMA és AngII stimuláció esetén (27. ábra, A és B), továbbá a konformációs jelek kinetikája megegyezett az interakcióéval (26. ábra, E). Az F225 és F263 szenzorok ellenben nem reagáltak, az F410 jele pedig kisebb és ellentétes előjelű volt PMA kezelés után. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a PKC-foszforilált AT₁R-hez kötődő β -arresztin2 konformációja statikus, és jelentősen különbözik az AngII által indukálttól.



27. ábra A β -arresztin2 strukturális átrendeződése függ az aktiváció módjától. A-D, A konformációváltozások mintázatai a különböző módú AT₁R- β -arresztin2 kötéseket esetén. Az összehasonlítás elősegítése érdekében meghatároztuk a relatív FIAsH jelet (interakcióra normalizált konformációs jel), amely az átlagos intramolekuláris BRET jel változás és az átlagos

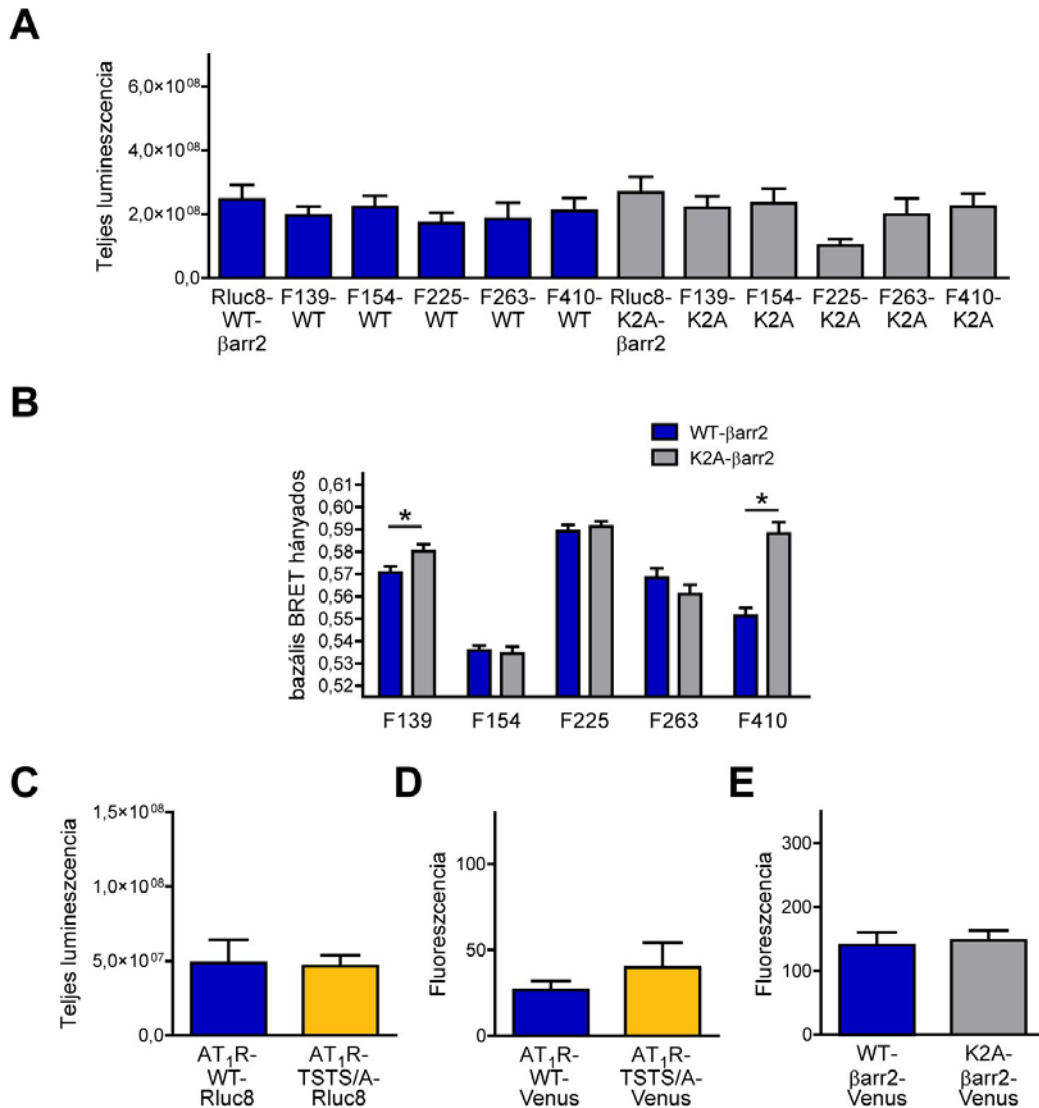
intermolekuláris BRET jel változás hányadosa. **A** és **B**, Konformációváltozások a homológ (AngII általi) és a heterológ (PMA általi) β -arresztin2 aktiváció során. **C** és **D**, A stabilitási kapcsoló vezérli az aktív receptorhoz-kötött β -arresztin2 strukturális átrendeződéseit. A TSTS/A mutáció az AT₁R-ben (**C**) és a K2A mutáció a β -arresztin2-ben megváltoztatta a β -arresztin2 konformációs profilját. Az **A** panelével identikus kísérleti felállásokat alkalmaztunk a jelölt mutánsok használatával. Intramolekuláris BRET mérések elemszámai $n=6$ (**C**) és $n=5$ (**D**), az intermolekuláris BRET-et $n=3$ független kísérletben határoztuk meg. Az adatok átlag + S.E., *: az átlag szignifikánsan eltér a 0 értéktől (egymintás t -próba, $P<0,05$). **E**, A β -arresztin2 konformációs változások hálóját. Az AngII a teljes kötést, a PMA a csak C-terminális interakciót mutatja, míg az AT₁R-TSTS/A és K2A- β -arresztin2 a stabilitási kapcsoló kialakulásának hiányában fellépő változást ad információt. A relatív FAsH jeleket normalizáltuk az AngII-indukált jelekre, majd az értékekből köbgyököt vontunk, és azokat radardiagramon ábrázoltuk. Legalább 3 aktív konformáció mintázatai különböztethetők meg.

Megvizsgáltuk a stabilitási kapcsoló szerepét is a homológ β -arresztin2 aktiváció során fellépő konformációváltozásokban. Ehhez az AT₁R-TSTS/A és a K2A- β -arresztin2 mutánsokat használtuk fel AngII stimuláció mellett. A TSTS/A mutáns AT₁R esetében az F154 és az F225 szenzorok relatív jelei eltűntek, míg az F263 és az F410 jelei megfordultak a vad típusú receptor által kiváltottakhoz képest (27. ábra, C). A K11 és K12 szerepének tanulmányozásához bevittük a K11A és K12A mutációkat a szenzorokba is (K2A-F139, K2A-F154, K2A-F225, K2A-F263, K2A-F410). A K2A mutáns szenzorok expressziója nem különbözött szignifikáns mértékben (28. ábra, A)¹. A bazális BRET hányados a K2A-F410 és kis mértékben a K2A-F139 szenzor esetében emelkedett volt a vad típusú szenzoréhoz képest (28. ábra, B). A K2A- β -arresztin2 megváltozott bazális konformációja várható volt, mivel korábban már kimutatták a két lizin szerepét a β -arresztin C-terminálisának az N-doménhez történő rögzítésében inaktív állapotban [47, 77, 78, 297], és az F410-es szenzorok valószínűleg a β -arresztin2 C-terminálisának helyzetváltozásait jelzik. A vad típusú AT₁R stimulációja után a K2A-mutáns szenzorok relatív jeleinek változásai azonban hasonlóak voltak, mint amit az AT₁R-TSTS/A esetében tapasztaltunk: az F154 és F225 jelek eltűntek, az F410 megfordult és az F263 jele megszűnt (27. ábra, D). A hasonló konformációváltozás ebben a két felállásban támogatja azt a következtetésünket, miszerint a foszforilált TSTS régió közvetlenül kapcsolódik a β -arresztin2 K11 és K12 aminosavaihoz.

A relatív FAsH jeleket radardiagramon is ábrázoltuk (27. ábra, E). Ezen látható, hogy legalább 3 aktív β -arresztin2 konformációt különböztethetünk meg: a teljes (AngII)

¹ A 28. ábra C-E paneljei a további vizsgált, mutációt tartalmazó BRET konstrukciók expressziós viszonyait mutatják.

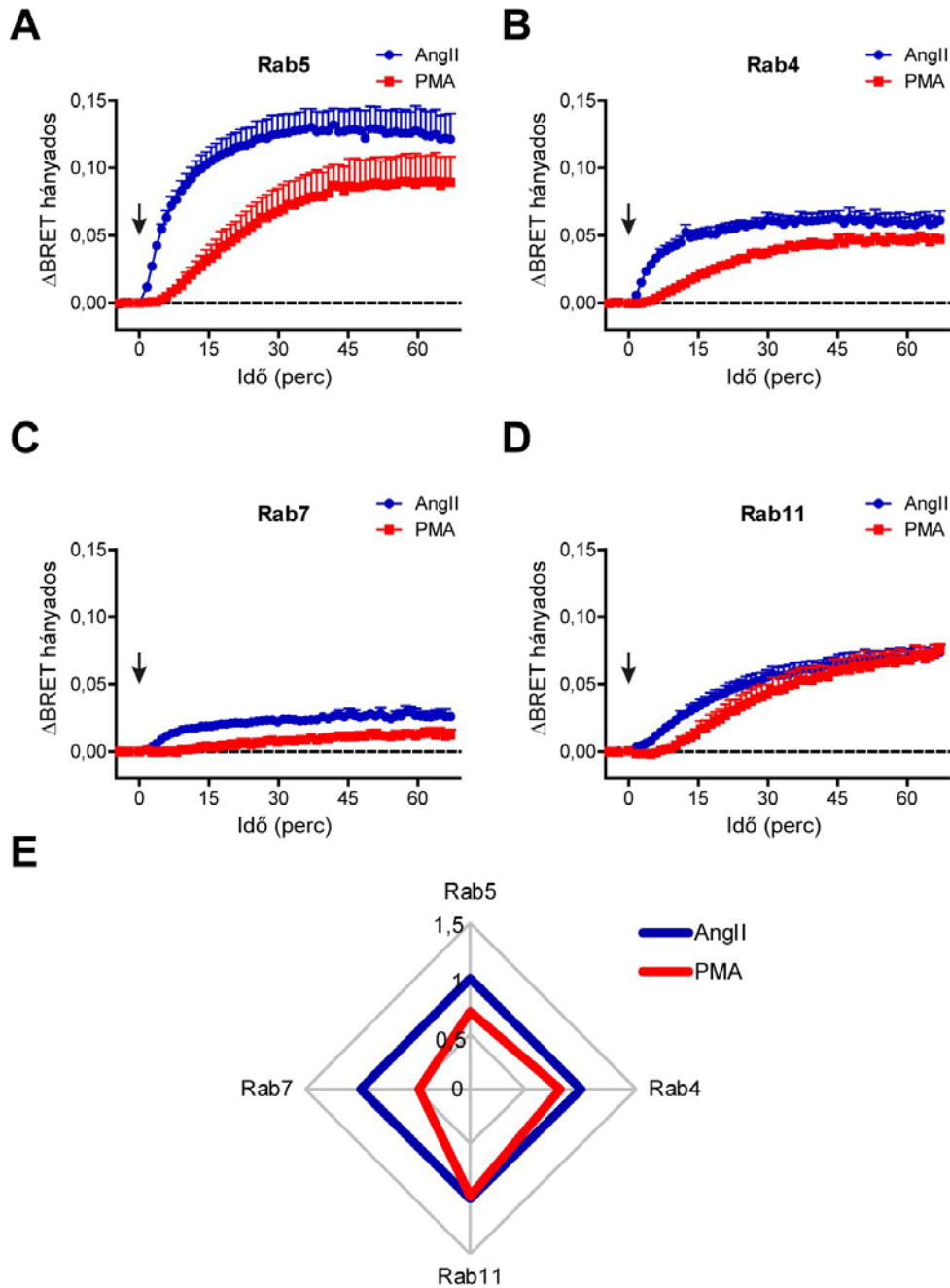
aktiváció során létrejövő konformáció különbözik a PKC-által (PMA) indukálttól és a stabilitási kapcsoló hiányában (AT₁R-TSTS/A és K2A- β -arresztin2) kialakulótól.



28. ábra A TSTS/A mutáns AT₁R és a K2A mutáns β -arresztin2 BRET konstrukciók expressziói és a β -arresztin2 konformációs szenzorok bazális BRET jelei. **A**, A FIAsh-BRET β -arresztin2 szenzorok expressziói. Az expresszió meghatározáshoz megmértük a teljes lumineszcencia értékeket AT₁R-Venus-t és a jelölt konstrukciót koexpresszáló sejtekben. Az Rluc8- β -arresztin2-höz képest a bevitt mutációk nem okoztak szignifikáns mértékű expressziós eltérést (egyszempontos varianciaanalízis Bonferroni post-hoc teszttel, $n=3$). **B**, A WT és K2A FIAsh-BRET β -arresztin2 bioszenzorok bazális BRET hányadosai. A bazális intramolekuláris (konformációs) BRET hányadosokat jelöletlen AT₁R-t és a feltüntetett konstrukciókat koexpresszáló sejtekben határoztuk meg FIAsh-jelölés után. *, $P<0,05$, egyszempontos varianciaanalízis, Bonferroni post hoc teszt, $n=5$. **C-E**, Az AT₁R-TSTS/A vagy K2A- β -arresztin2 mutációk nem okoztak szignifikáns mértékű expressziós változást a BRET konstrukciókban. A donor-jelölt konstrukciók expresszióját a teljes lumineszcencia, az akceptor-jelölt fehérjékét pedig a Venus fluoreszcencia mérésével határoztuk meg ($n=3-6$). Az adatok átlag + S.E.

5.2.4. A homológ és heterológ módon aktiválódó β -arresztin2 eltérően befolyásolja a receptor sorsát

A konfokális felvételeken megfigyelhető volt az AT₁R endocitózisa PMA kezelés hatására (25. ábra, A). Továbbá ismert, hogy a β -arresztinek szabályozzák a receptor intracelluláris közlekedését is [94]. Mivel a β -arresztin2 konformációja eltérőnek bizonyult PKC aktiváció esetén, ezért felmerült, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin esetleg másképpen képes befolyásolni az internalizációs útvonalakat, ezáltal a receptor sejten belüli sorsa különböző lehet. Ennek feltérképezéséhez bystander BRET méréseket végeztünk Rluc8-jelölt AT₁R és Venus-jelölt intracelluláris vezikula markerek (Rab4, Rab5, Rab7, Rab11) között a korábban közltekhez hasonlóan [97, 98]. A Rab5 korai endoszómákon, a Rab4 és Rab11 a gyors ill. lassú reciklizáló endoszómákon, a Rab7 pedig késői endoszómákon található meg [71]. AngII és PMA kezelés hatására is BRET jel növekedést kaptunk mind a négy Rab konstrukció esetében, ami a receptornak a plazmamembránról intracelluláris vezikulákba történő redisztribúcióját mutatja (29. ábra, A-D). A jobb értékelhetőség érdekében a stimulálás után 1 órával mért BRET hányados változásokat ábrázoltuk az AngII jeléhez viszonyítva (29. ábra, E). Látható, hogy PMA stimuláció után a receptor degradációs (Rab7) útvonalon való megjelenése elmaradt, míg a reciklizációs útvonal hasonló effektivitással működött. Hasonló eredményeket kaptunk α_{1A} AR koexpresszió és aktiváció után (adatot nem mutatunk). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin2 eltérően szabályozza a receptor sejten belüli sorsát.

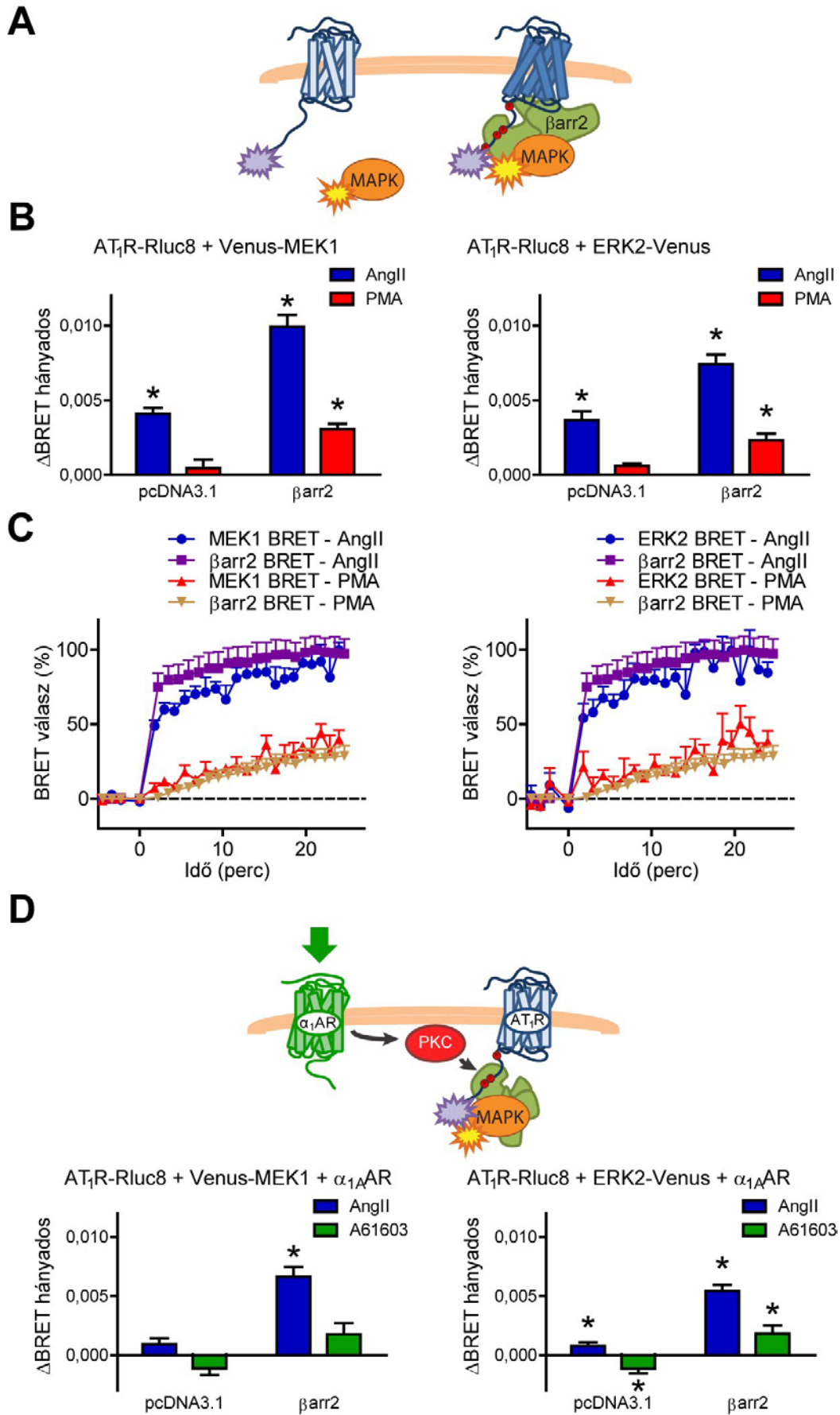


29. ábra Az AT₁R homológ és heterológ β -arresztin kötése különböző módon befolyásolja a receptor sorsát. A-D, Az AT₁R megjelenésű a Rab fehérje dúsult kompartmentekben homológ és heterológ β -arresztin aktiváció után. HEK 293T sejteket kotranszfektáltunk AT₁R-Rluc8, Venus-Rab (Rab5 – korai endoszóma marker (A), Rab4 – gyors reciklizáló és korai endoszóma marker (B), Rab7 – multivezikuláris test/késői endoszóma marker (C) vagy Rab11 – késői reciklizáló út marker (D)) és jelöletlen β -arresztin2 konstrukciókkal. A jelöletlen β -arresztin2 kotranszfekciójára azért volt szükség, mert az endogén β -arresztin2 expresszió relatíve alacsony volt az overexpresszált AT₁R-Rluc8-éhoz képest, ami így limitálta annak internalizációját. 100 nM AngII és 100 nM PMA stimulusokat alkalmaztunk BRET méréseinkben. Az adatok átlag + S.E., $n=3$. E, Az AT₁R intracelluláris redistribúciójának mintázatai. A stimuláció utáni 60 \pm 2 perces BRET hányados változásokat normalizáltuk az AngII-indukált változásra, majd az értékeket radardiagramon ábrázoltuk. A PMA stimuláció az AT₁R kisebb mértékű megjelenését eredményezte Rab7-gazdag vezikulákban.

5.2.5. Az inaktív receptor-kötött β -arresztin2 képes receptor- β -arresztin-MAPK komplexek kialakítására

Ismert, hogy az aktivált β -arresztinek képesek lehetnek receptor- β -arresztin-MAPK komplexek formálódásának kiváltására [64]. Megvizsgáltuk, hogy az inaktív receptorhoz kötődő β -arresztin is rendelkezik-e ezzel a tulajdonsággal. Ennek vizsgálatához BRET-alapú kísérleti felállást dolgoztunk ki, melyben energiatranszfert mértünk AT₁R-Rluc8 és Venus-MEK1 vagy ERK2-Venus között (30. ábra, A). AngII stimuláció hatására a BRET jel növekedését tapasztaltuk (30. ábra, B). Jól nagyobb jelet detektáltunk azonban, ha koexpresszáltunk jelöletlen β -arresztin2-t is, ami arra utal, hogy a helyes receptor-ERK-MEK- β -arresztin2 sztöchiometria szükséges a jelátviteli komplex megfelelő összeállításához. Mások hasonló következtetésekre jutottak egy korábbi, a JNK3 AT₁R-hez történő transzlokációját vizsgáló tanulmányban [299]. Érdekes módon a MEK1 és az ERK2 transzlokáció kinetikája megegyezett a receptor- β -arresztin2 kötés kinetikájával (30. ábra, C), és nem követte az F263 konformációs jelét (26. ábra, D), amelyről korábban mások feltételezték, hogy korrelál a β -arresztin-függő ERK1/2 aktiváció mértékével [65].

PMA hatásra is szignifikáns mértékű BRET jel emelkedést figyeltünk meg, melynek mértéke kisebb volt az AngII esetében tapasztaltnál, de arányos volt az AT₁R- β -arresztin2 kötés mértékével (30. ábra, B és C). Hasonló eredményeket kaptunk, ha a PKC aktivációt α_{1A} AR stimulációval hoztuk létre (30. ábra, D). Ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy nemcsak az aktív receptorok vehetnek részt a jelátviteli folyamatokban, hanem az inaktív receptorok is hozzájárulhatnak jelátviteli komplexek kialakulásához.



30. ábra A PKC-foszforilált AT₁R-hez kötődő β-arresztin2 AT₁R-β-arresztin2-MAPK komplexeket alakít ki. **A**, Az AT₁R-hez asszociált MAPK-k kísérletes detektálásának sematikus rajza. **B**, AngII és PMA stimuláció is előidézi AT₁R-β-arresztin2-MAPK komplexek formálódását. Intermolekuláris BRET-et mértünk AT₁R-Rluc8, Venus-jelölt MAPK fehérje (Venus-MEK1, bal panel vagy ERK2-Venus, jobb panel) és üres vektor pcDNA3.1 vagy jelöletlen β-arresztin2 konstrukciókkal kotranszfectált sejtekben 100 nM AngII vagy 100 nM PMA stimuláció után (átlagos BRET jel változás a stimulus utáni 24 percben, görbe alatti terület). **C**, Az AT₁R-MAPK komplex kialakulásának kinetikája. Az intermolekuláris BRET hányados változásokat a maximális AngII indukált jel százalékában mutatjuk a különböző BRET mérési felállásokban az AT₁R-β-arresztin2 interakció (AT₁R-Rluc8 és β-arresztin2-közötti BRET) és az AT₁R-MAPK komplex kialakulás (AT₁R-Rluc8, jelöletlen β-arresztin2 és Venus-MEK1 (bal panel) vagy ERK2-Venus (jobb panel) konstrukciókat koexpresszáló sejtekből származó BRET jel) mérésére, $n=6$. A β-arresztin2-függő AT₁R-MAPK komplex kialakulás kinetikája és mértéke arányos volt a receptor-arresztin interakcióéval. **D**, A sejteket kotranszfectáltuk az ábrán feltüntetett konstrukciókkal. 100 nM AngII és 1 μM α_{1A}AR agonista A61603 kezeléseket alkalmaztunk. A **B** és **D** paneleken a stimulálás utáni első 24 perc átlagos ΔBRET hányados változása (görbe alatti terület) látható átlag + S.E. formában. $n=3-7$, *, $P<0,05$ (páros kétoldalas kétmintás t -próba).

6. Megbeszélés

6.1. Az AT₁R-β₂AR heterodimer funkcionális vizsgálata

Az eredmények első felében bizonyítékot szolgáltatunk arról, hogy a β₂AR β-arresztin kötését befolyásolja az AT₁R együttes aktivációja [300]. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint a β₂AR és az AT₁R funkcionális egységet alkotnak [211]. Továbbá eredményeink illeszkednek azon tanulmányok sorába, melyek a receptordimerizáció fontos allosztérikus szabályozó szerepét mutatják a receptorok működésében [175, 177, 194, 301]. Mivel mind a β₂AR, mind az AT₁R kiemelt jelentőségű gyógyszer-célpontok [233], továbbá a β₂AR β-arresztin keresztül befolyásolhatja az ERK aktivációt és pozitív inotróp hatással bír szívműködésben [110, 302], eredményeinknek fiziológiai és farmakológiai relevanciái is lehetnek.

Rendszerünkben a jelöletlen vad típusú AT₁R stimulációja önmagában is enyhe emelkedést váltott ki a β₂AR-Sluc és a β-arresztin2-Venus közötti BRET jelben. Mivel ez az emelkedés elmaradt a β-arresztint nem kötő AT₁R-Δ319 mutáns aktivációja esetén, ezért arra következtettünk, hogy ez a jel az AT₁R-hez kötődő β-arresztin és a β₂AR között kialakuló nem specifikus BRET-ből származhat, és nem a β₂AR β-arresztin kötését jelzi. Megjegyzendő, hogy előzőleg egy másik munkacsoport az AT₁R-Δ319 mutáns gyenge β-arresztin kötését találta [303], de ez a mi kísérletes körülményeink között nem volt detektálható.

Korábban mások egy hasonló rendszert fejlesztettek ki receptor heterodimerek azonosítására [304]. Az ún. BRET heteromer identifikációs technológia (BRET-HIT) azon alapszik, hogy a heteromer tagjainak szoros közelsége miatt nagy valószínűséggel ki tud alakulni rezonancia energiáttranszfer egy, az egyik protomerrel komplexben lévő fehérje és a heterodimer másik tagja között. Így a jelöletlen protomerhez kötődő jelölt β-arresztin és a másik, jelölt protomer között BRET mérhető heterodimerizáció esetén. A rendszer elvi alapja nagyon hasonlít a mi AT₁R-β-arresztin2-MAPK komplex kimutatási módszerünkéhez, hisz mi is a szignalizációs komplexen belüli relatíve kis távolságok tényét használtuk ki. A BRET-HIT alapján keletkező jel azonban nem tekinthető a dimerizáció bizonyítékának. Más munkacsoportokhoz hasonlóan már korábban kimutattuk, hogy egy GFKR stimulációja után BRET jel növekedés mérhető donor-jelölt β-arresztin2 és egy, a plazmamembránba irányított fluoreszcens fehérje között [281, 282],

ahol a BRET biztosan aspecifikus interakció eredményeként születik. Ez arra utal, hogy a BRET-HIT módszer megbízhatósága csökken magasfokú receptor expresszió esetén, mivel megemelkedik az aspecifikus BRET létrejöttének valószínűsége. A mi rendszerünkben a β_2 AR-Sluc és β -arresztin2-Venus közötti BRET jel megnőtt a β -arresztint nem kötő AT₁R- Δ 319 mutáns koaktivációja esetén is. Ez biztosan mutatja, hogy ténylegesen a β_2 AR és β -arresztin2 közötti interakció növekedett meg, és a jel nem a bystander BRET emelkedésének következménye. A C-terminálisan trunkált AT₁R mutánssal kapott eredmények azt is sugallják, hogy az AT₁R stimulációja önmagában nem képes a β_2 AR β -arresztin kötését kiváltani. Ebből arra következtethetünk, hogy az AT₁R- β_2 AR heterodimer kicsit másképp működik, mint az AT₁R homodimer vagy a CXC kemokin receptor 2- α_1 AR heterodimer [202, 213], melyekben az egyik protomer önálló aktiválása indukálja a β -arresztin másik protomerhez történő kötődését.

Emelkedett BRET jel eredhet a BRET partnerek közötti megnövekedett asszociációból vagy orientációváltozásból is [182]. Az utóbbi nem valószínű a kostimuláció esetében, hisz hasonló változásokat detektáltunk az N- és a C-terminálisan jelölt β -arresztin2 vizsgálatával. Továbbá egy szimpla orientációbeli eltérés nem tudja magyarázni a β_2 AR- β -arresztin2 kötés dózis-hatás görbéjének balra tolódását az AT₁R koaktivációja mellett. A β_2 AR és a β -arresztin2 közötti megnövekedett asszociációnak teoretikusan három lehetséges mechanizmusa lehet. AT₁R aktiváció után 1) a β_2 AR-ek nagyobb frakciója aktiválódik és tud így β -arresztint kötni; 2) egy β_2 AR-hez egyszerre több β -arresztin kapcsolódik; 3) a β_2 AR és a β -arresztin közötti interakció stabilabbá válik, és az emelkedett BRET jel ezt az új egyensúlyi állapotot jelzi. Az első lehetőséget (több β_2 AR köt β -arresztint) kizárhatjuk, hisz a β_2 AR agonistából telítési koncentrációt alkalmaztunk. Továbbá az eddig megoldott receptor-arresztin komplex struktúrák alapján nem tűnik valószínűnek, hogy egy receptor szimultán több arresztint kössön [51, 59]. A harmadik lehetséges mechanizmust illetően viszont az jól ismert, hogy a β_2 AR és a β -arresztin között az interakció relatíve gyenge és instabil [89]. Ez a kötődés erősebbé tehető a β_2 AR C-terminálisának az AT₁R vagy a V₂R C-terminálisára történő cserélésével [88, 303]. Emiatt észszerű az a feltételezés, hogy a megnövekedett stabilitás vezet a nagyobb BRET jelhez. A komplex stabilitásának növekedését pedig valóban sikerült kimutatnunk a konfokális mikroszkópos kísérleteinkben, ahol a β_2 AR- β -arresztin2 klaszterek élettartamának hosszabbodását találtuk AT₁R kostimuláció esetén. A

konfokális mikroszkóp felbontóképességének határai miatt nem tudtuk meghatározni, hogy a klaszterek csak a plazmamembránban találhatóak-e vagy a plazmamembránhoz közeli nagyon kis vezikulákban is. Mindenesetre nem láttuk a β -arresztin2 korai endoszómákban való megjelenését, a kötés nem váltott át B-osztályúvá.

Az eddig feltárt receptor-arresztin komplexek alapján úgy tűnik, hogy az arresztin C-doménjének van egy nagy szabad felszíne, amely a plazmamembrán felé mutat [51, 59]. Ebből következően lehetséges, hogy a heterodimer protomerjei egyidejűleg kössék ugyanazon β -arresztint [61], ami a kötés stabilitásának növekedését eredményezheti. Továbbá az is elképzelhető, hogy a stabilabb kötés háttérében a β_2 AR-nek egy olyan konformációja áll, amely nagyobb affinitással bír a β -arresztin felé, és amelyet a heterodimerizáció allosztérikus hatása stabilizál. A stabilabb interakció háttérében álló pontos molekuláris mechanizmus feltárása további vizsgálatokat igényel.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a β -arresztin kötés szabályozása aszimmetrikus a β_2 AR-AT₁R heterodimerben, mivel a β_2 AR kostimulációja nem volt képes az AT₁R β -arresztin kötését tovább növelni. Ennek háttérében feltételezésünk szerint az állhat, hogy az AT₁R tartós, B-osztályú β -arresztin kötéssel rendelkezik [89]. Ez az interakció valószínűleg annyira stabil, hogy a kötése erősségben további növekedés már nem lehetséges allosztérikus szabályozás által.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a konzervált DRY motívum kritikus jelentőségű az AT₁R homodimeren belüli allosztérikus szabályozásban [202]. A β_2 AR-AT₁R heterodimerrel kapcsolatban viszont azt találtuk, hogy a DRY/AAY AT₁R mutáns is képes volt növelni a β_2 AR β -arresztin kötését. Ez azt sugallja, hogy szemben az AT₁R homodimerrel, a DRY motívum nem létszükséges a β_2 AR-AT₁R heterodimer szabályozásában.

A tartósabb β_2 AR-AT₁R interakció létrejöttéhez ugyan nem volt szükséges a G_q-fehérje aktiváció, mégsem tudjuk kizárni annak lehetséges befolyásoló szerepét. A mi kísérletes felállásunkban G_{q/11}-fehérje aktiváció hiányában (AT₁R-DRY/AAY vagy TRV120023 stimuláció esetén) lassabb potencírozó hatást figyeltünk meg, ezért felmerülhet, hogy a G-fehérje valamilyen moduláló szereppel bír. Például ismert, hogy az aktivált G α_q -alegység képes a GRK2-t kötni és a plazmamembránhoz lokalizálni, ami hozzájárul az M₃AChR β -arresztin2 kötésének kialakításához [25], de vannak adatok a G_q-fehérje dimeren belüli allosztérikus szabályozó funkciójáról is [203].

Egyre több a bizonyíték arra, hogy számos GFKR képes cAMP jelet nem hagyományos módon is létrehozni, mikors receptor- β -arresztin kötés fenntartottabb G-fehérje-függő cAMP jellel párosul [60, 132, 134, 135]. Ezzel a mechanizmussal magyarázható az az eredményünk, hogy AngII vagy TRV120023 koaktiváció hatására a β_2 AR elnyújtottabb cAMP jelet váltott ki. Megjegyzendő azonban, hogy a látott hatást nemcsak a heterodimer tartósabb G_s fehérje aktivációja magyarázhatja, hanem szerepe lehet a β -arresztin-függő jelátvitelnek is (például adenilát cikláz aktiváláson vagy foszfodiészteráz gátláson keresztül), de eredhet az AT_1R és a β_2AR közötti, a deszenzitizáló apparátusért történő kompetícióból. Mindenesetre ezek az eredmények összhangban vannak egy másik munkacsoport tanulmányával, melyben a szerzők a jelátvitel-szelektív AT_1R agonista [Sar^1, Ile^4, Ile^8]-AngII potencírozó hatását mutatták ki a β_2AR cAMP-függő génszabályozására [305].

A β_2AR és AT_1R közötti közvetlen interakciót kimutató közleményben a szerzők a β -blokkolók és a hagyományos AT_1R antagonisták keresztgátló hatását figyelték meg: mindkét gyógyszer önálló alkalmazása kivédte a másik protomer G-fehérje aktiválását [211]. Ezért megvizsgáltuk, hogy az AT_1R antagonistáknak van-e hasonló hatásuk a β_2AR - β -arresztin interakcióra. A rendszerünkben a hagyományos AT_1R antagonista kandezartán nem volt hatással a β_2AR β -arresztin kötésére, míg a jelátvitel-szelektív AT_1R agonista TRV120023 növelte ezt az interakciót. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a β -arresztin felé elfogult AT_1R agonistáknak nemcsak azért lehetnek különböző hatásai a hagyományos AT_1R antagonistákhoz képest, mert kiváltják az AT_1R β -arresztin-függő jelátvitelét, hanem mert máshogy befolyásolják a β_2AR - AT_1R heterodimer működését. Ehhez hasonló eredményeket kapott egy másik munkacsoport az AT_1R - B_2 bradikinin receptor heterodimer vizsgálatakor, melyben az elfogult AT_1R agonista [Sar^1, Ile^4, Ile^8]-AngII másképp hatott a receptordimerre, mint a hagyományos AT_1R antagonista lozartán [245]. Ezen eredmények felvetik, hogy a β -arresztin felé elfogult AT_1R agonistáknak további váratlan hatásai és mellékhatásai is felléphetnek a heterodimerek megváltozott működése miatt. Ezek esetleg hozzájárulhattak ahhoz, hogy a β -arresztin felé elfogult AT_1R agonista TRV120027 nem hozta a várt pozitív hatásokat az akut szívelégtelenség terápiájában [244]. Emellett felmerül az is, hogy a jelátvitel-szelektív AT_1R ligandumok heterodimereken keresztüli hatásai akár kedvező módon is kiaknázhatóak más betegségek kezelésében.

6.2. Az AT₁R PKC foszforiláción és β -arresztin kötésen keresztüli szabályozásának vizsgálata

Vizsgálataink első felében azt kutattuk, hogy két receptor együttes aktivációja hogyan befolyásolja a jelátvitelt. Ezzel szemben munkám második felében arra kerestük a választ, hogy egy inaktív receptor β -arresztin kötését képesek-e más aktivált receptorok heterológ úton kiváltani [306]. Mivel a β -arresztinek számos módon, többek között jelátviteli utak modulál keresztül is befolyásolják a receptorok funkcióit, így az ilyen úton létrejött β -arresztin kötésnek jelentős hatásai lehetnek a receptorok működésére.

A β -arresztinek két helyen képesek GFKR-ekhez kötődni [59]. Az egyik az aktivált receptor magi régiója, míg a másik a receptorhoz kapcsolt foszfátmolekulákon keresztül történik. Eddig úgy gondoltuk, hogy az aktív receptor konformáció és az azt követő GRK-mediált foszforiláció elengedhetetlenek a β -arresztin kötés kialakulásához [288]. A közelmúltban több tanulmány kimutatta, hogy a foszfát és a magi interakció különválaszthatóak *in vitro* vagy receptor kimérák és mutáns fehérjék alkalmazásával [68, 307, 308]. A kérdés azonban továbbra is fennállt, hogy az egyes interakciók felléphetnek-e egymástól függetlenül egy olyan helyzetben, amely potenciálisan fiziológias körülmények között is előfordulhat. Egy ilyen helyzet lehet a PKC aktiválódása más receptorok által.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a PKC forbol észter, G_{q/11}-kapcsolt receptor és EGFR általi aktivációja kiváltja az AT₁R β -arresztin2 kötését. Továbbá endogén purinerg receptorok stimulációja esetén ugyanezt a hatást tapasztaltuk, ami bizonyítja, hogy fiziológias szintű PKC aktiváció is létrehozhatja az AT₁R- β -arresztin2 interakciót. Habár a kötés endogén fehérjék közötti kimutatása tovább erősítené következtetéseinket, sajnos az AT₁R- β -arresztin2 interakció detektálása AT₁R-t endogéne kifejező sejtekben jelenleg nem lehetséges. Ennek kimutatása kísérletesen például koimmunprecipitációval történhetne, azonban mind a mai napig nem elérhető megbízhatóan működő AT₁R ellenes antitest. A PKC-nek az endogéne kifejeződő AT₁R működésére kifejtett hatását viszont már korábbi tanulmányok igazolták patkány szíveredetű fibroblasztokban, szívizomsejtekben és egy májeredetű sejtvonalban [309–311]. Ezekben a sejtekben a PKC vazopresszin vagy lizofoszfátidsav kezeléssel, vagy közvetlenül PMA-val történő aktivációja az AT₁R deszenzitizációját váltotta ki a receptor foszforilációján keresztül.

Mindeddig azonban a heterológ deszenzitizációt β -arresztintől függetlennek gondolták, és nem mutatták ki annak kötődését a receptorhoz a folyamat során.

Tekintettel arra, hogy található három konszenzus PKC foszforilációs hely az AT₁R C-terminális farkán (S331, S338, S348; az S338 a β -arresztin kötésben fontos TSTS motívum része), és más kinázok gátlószerei nem gátolták a heterológ AT₁R- β -arresztin2 interakciót, ezért arra következtettünk, hogy a PKC főleg közvetlen AT₁R foszforiláción keresztül hat. Természetesen nem zárhatjuk ki azonban, hogy további PKC-függő kinázok szintén szerepelhetnek a folyamatban.

Habár a homológ és a heterológ β -arresztin kötési mechanizmusok sok közös tulajdonsággal rendelkeznek, mint például átfedést mutatnak a kötéshez szükséges foszforilált aminosavak a receptor C-terminálison, de fontos különbségek is vannak: amellett, hogy más kinázok szerepelnek a folyamatban, a heterológ mechanizmus nem igényli a receptor aktív állapotát. Ez meglepő volt, hisz az eddigi általános elképzelés szerint a β -arresztinek receptorkötése megköveteli a receptorok aktív konformációját [288]. Ezek az eredményeink viszont azt mutatják, hogy a β -arresztinek kötődhetnek vagy kizárólag a foszforilált C-terminálishoz a receptor ligandkötésétől függetlenül is.

Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy az az állapot, amikor a β -arresztin csak az aktivált receptor C-terminális foszfátcsoportjaihoz kötődik, sokkal jellemzőbb a B-osztályú, tartós β -arresztin kötéssel rendelkező receptorok esetében [60]. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a „csak C-terminális interakció” létrejöttéhez szükséges a stabilitási kapcsoló kialakulása. Ez az a strukturális elem, amely a stabil receptor- β -arresztin kötés fennmaradásáért felelős. A stabilitási kapcsolót a receptor C-terminálisának foszforilált szerin-treonin klaszterei és a β -arresztin N-doménjének két konzervált lizinje alkotják. Ezt a két lizint elfedi a β -arresztin C-terminálisa a β -arresztin inaktív állapotában [47]. Receptorkötés hatására az arresztinben jelentős strukturális változások jönnek létre, úgymint a poláros mag felbomlása és a β -arresztin C-terminálisának diszlokációja [77, 78]. Ezután a K11 és a K12 a receptor C-terminálisának foszforilált aminosavaihoz kapcsolódhatnak, amivel fenntartják és teljessé teszik a C-terminális cserét, vagy visszakötődhetnek a negatív töltésű β -arresztin C-terminálishoz. Ez a negatív töltések közötti verseny meghatározza a receptor- β -arresztin kötés stabilitását: a foszforilált szerin-treonin klaszter jelenléte kedvez a receptorkötésnek, és a kialakult elektrosztatikus kapcsolatok stabilizálják az interakciót. Ezt a modellt támogatja

a korábbi megfigyelés, miszerint a β -arresztin1 C-terminális trunkálása (β -arresztin1-(1-382)) fokozza annak kötődését a β -arresztint gyengén kötő receptorokhoz [90]. Egy másik munkacsoport azt találta, hogy a β -arresztin 11-es és 12-es lizinjeinek a szintén bázikus tulajdonságú argininekre történő cserélése A-osztályúvá változtatja az AT₁R-rel való interakciót [152]. Emellett a K11,12R mutáció hatására a β -arresztin2 ubikvitinációja tranzienssé vált, emiatt a két lizint mint lehetséges ubikvitinációs helyet írták le. Az eddig megoldott aktív arresztin kristálystruktúrákban azonban az identikus lizinek foszfátkötő szerepe bizonyosodott be [52, 57], amit számos további kísérletes adat támogat [276, 297, 312, 313]. Valószínűtlennek tűnik, hogy a 8,5 kDa nagyságú ubikvitin elférjen a receptor és az arresztin között a β -arresztin receptorkötő felszínéhez kapcsolva. A K11,12R mutáció hatását valószínűleg az magyarázhatja, hogy a kétszeresen pozitív töltésű arginin oldalláncok erősebben kötik a β -arresztin C-terminálisát, így nem engedik a stabil C-terminális csere létrejöttét. Megjegyzendő, hogy ezek a lizinek nem elengedhetetlenek magához a C-terminális cseréhez, mivel vannak receptorok, melyek β -arresztin kötése függ a foszforilációtól, de azt nem befolyásolja a K2A mutáció [276, 313]. Adataink nem zárják ki annak lehetőségét, hogy más bázikus aminosavak is részt vehetnek a stabil interakció kialakításában, de eredményeink egyértelműen mutatják a K11,12-függő stabilitási kapcsoló kiemelt jelentőségű szabályozó szerepét.

Azt találtuk továbbá, hogy a K11,12-n keresztüli kapcsolat nemcsak stabilizálja a receptor C-terminálissal való interakciót, hanem meghatározza a β -arresztin aktív konformációját is. A PKC-foszforilált receptorhoz történő kötés elegendő volt konformációváltozások kiváltásához a β -arresztin2 N-doménjében. A K11,12 ezen szerepe összhangban van egy korábbi tanulmány eredményeivel, ahol a β -arresztin1 különböző foszfopeptidek hatására létrejövő konformációit vizsgálták [31]. Érdekes módon a C-domén konformációs szenzorok (F225, F263) némák maradtak a PKC-foszforilált receptorral történő interakciókor vagy a stabilitási kapcsoló kialakulásának hiányában, ami azt jelzi, hogy mind a receptor aktív konformációja, mind a stabilitási kapcsoló szükségesek a strukturális átrendeződések teljes palettájának létrejöttéhez a C-doménben. Úgy tűnik, hogy a C-domén konformációja folyamatosan és dinamikusan változik. Nem találtunk korrelációt a C-domén aktivációjának és a receptor-arresztin-MEK1/ERK2 komplex kialakulásának kinetikája között, de ez nem zárja ki azt az izgalmas lehetőséget, melyszerint a dinamikus konformációs változások szerepet

játszanak a β -arresztin effektorokkal történő interakciójának időbeli szabályozásában. Szintén megkapó magyarázat lehet az, hogy a konformációs átrendeződések kinetikája a posztranszlációs modifikációk, úgymint a foszforiláció vagy az unibikvitáció dinamikus változásait tükrözi [67], de ezek az elképzelések további kísérletes vizsgálatokat igényelnek. Az eredményeink azt is sugallják, hogy a C-terminális foszforilációs mintázat mellett a receptor hélixek konformációja is jelentős szereppel bír a β -arresztin strukturális átrendeződéseinek vezérlésében, így az fontos része a receptor vonalkódnak.

Adataink illeszkednek azon tanulmányok sorába, melyek bizonyítják azt az elméletet, miszerint több aktív β -arresztin konformáció létezik [29]. A legjobb tudomásunk szerint viszont ez az első példa, amelyben két mechanizmus (azaz a hagyományos homológ és az új heterológ) eltérő konformációjú β -arresztin kötést vált ki ugyanazon receptorhoz egy élettanilag potenciálisan jelentős felállásban. Eddig ezt csak GRK-k géncsendesítésével vagy jelátvitel-szelektív ligandumok alkalmazásával sikerült kimutatni [28, 239, 307, 314].

Korábbi közlemények arra következtettek, hogy a különböző aktív konformációjú β -arresztinek eltérő funkcióval rendelkeznek [31, 315]. Ezzel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy a PKC-aktivált β -arresztin2 kevésbé irányította a receptort a Rab7-gazdag vezikulákba a homológ aktivációhoz képest. Érdekes módon egy munkacsoport azt találta, hogy az α_{1b} adrenerg receptor heterológ β -arresztin2 kötése a receptor késői endoszóma irányú mozgását segíti elő, ami azt jelzi, hogy a szabályozás ezen módja receptor specificitást mutat [316]. Továbbá egy korábbi tanulmányban azt találtuk, hogy az AT₁R intracelluláris sorsa ligandum-specifikus [97]. Ezek a megfigyelések támogatják azt az elképzelést, miszerint a különböző aktív β -arresztin konformációk előnyben részesíthetnek bizonyos effektorokat. Nem zárhatjuk ki azonban annak a lehetőségét, hogy a receptor sorsában látott különbség a kisebb mértékű receptor- β -arresztin2 kötésből származik. Továbbá az is közrejátszhat, hogy az AT₁R endocitózisa β -arresztintől függetlenül is létrejöhet domináns negatív β -arresztin1 koexpresszáltatásával kapott eredmények alapján [317, 318]. Fontos megjegyezni, hogy ennek genetikai bizonyítékát még nem mutatták ki, ami azért is lenne fontos, mert az alkalmazott C-terminálisan trunkált β -arresztin1 (β -arresztin1-(1-349)), bár nem tartalmazza a C-terminális AP-2- és klatrinkötő motívumokat, de még mindig megtalálható benne a 18. és 19. β -redő közötti

másodlagos klatrinkötő hely. Mindenesetre az biztos, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin2 is funkcionálisan aktív, mivel képes a receptor internalizációjának kiváltására.

Adatok sokasága mutatja a β -arresztin2 különleges jelentőségét az AT₁R MAP kináz jelátvitelének mediálásában [64, 105, 108]. A β -arresztin ebben a funkciójában vázfehérjeként szerepel a jelátviteli kaszkád elemei számára. Ismert, hogy a JNK3-mal szemben a β -arresztin-függő ERK aktivációhoz elengedhetetlen a β -arresztin receptorhoz való kötése [107, 319]. Korábban kimutatták, hogy az ERK aktiváció létrejöttéhez nem szükséges a β -arresztin teljes kötődése a receptorhoz, legalábbis a magi kapcsolat nélkülözhető [307, 308]. A mi rendszerünkben, habár a teljesen kötődő forma volt a leghatékonyabb az AT₁R- β -arresztin2-MAPK komplexek kialakításában, de a PKC-aktivált β -arresztin2 is képes volt ezt létrehozni. Továbbá AT₁R- β -arresztin2-MAPK komplex képződést találtunk α_{1A} AR stimuláció esetén is. Az, hogy ez a komplex egy másik receptor stimulációja esetén is összeáll, azt az izgalmas új lehetőséget rejti magában, hogy egy GFKR nemcsak a jelátvitel elindításában vehet részt, hanem vázfehérjeként is funkcionálhat. A komplex kialakulása elindíthatja az ERK jelátvitelt vagy befolyásolja azt a kaszkád tagok sejten belüli lokalizációjának megváltoztatásával. Ez a mechanizmus feloldhatja korábbi tanulmányok látszólagos ellentmondását, miszerint az α_{1A} AR nem köt β -arresztin2-t, mégis β -arresztin2-függő módon aktivál ERK-et [320].

A fent ismertetett eredmények hozzájárulnak a β -arresztin aktiváció mechanizmusának mélyebb megértéséhez, és a receptorok közötti szabályozási mechanizmusok új útvonalait tárják fel.

7. Következtetések

Megbízhatóbb kvantitatív BRET módszer segítségével megerősítettük, hogy a β_2 adrenerg receptor és az AT_1 angiotenzin receptor heterodimereket képez. Részletesen vizsgáltuk a β_2AR - AT_1R heterodimerizáció funkcionális jelentőségét. Kimutattuk, hogy a β_2AR β -arresztin kötését potenciózza az AT_1R együttes aktivációja. Megállapítottuk, hogy az interakció növekedésének hátterében a β_2AR - β -arresztin kötés stabilitásának emelkedése szerepel. Kimutattuk, hogy a konvencionális AT_1 receptor antagonistákhoz képest a jelátvitel-szelektív AT_1 receptor agonisták eltérő módon befolyásolják a β_2 adrenerg- AT_1 angiotenzin receptor heterodimer működését.

Kimutattuk, hogy az AT_1R ligandumkötéstől és a receptor aktív konformációjától függetlenül is képes β -arresztin2 kötésre PKC aktiváció hatására. Megállapítottuk, hogy az inaktív AT_1R - β -arresztin2 kötés szerkezeti alapja a stabilitási kapcsoló struktúra, amely a receptor C-terminális foszforilált szerin-treonin klaszterei és a β -arresztin2 N-doménjének konzervált lizinjei között kialakuló kapcsolat. Kimutattuk, hogy a stabilitási kapcsoló az AT_1R - β -arresztin2 interakció stabilizálása mellett részt vesz a β -arresztin2 aktív konformációjának kialakításában is.

Megállapítottuk, hogy az agonista-aktivált dinamikus konformációhoz képest a β -arresztin2 eltérő, statikus konformációban kapcsolódik a PKC-foszforilált AT_1R -hez. A PKC-foszforilált AT_1R -hez kötött β -arresztin2 kiváltja a receptor endocitózisát, viszont a sejten belüli sorsát a homológ útvonalhoz képest másképpen befolyásolja. Emellett kimutattuk, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin2 kiváltja AT_1R - β -arresztin2-MAPK jelátviteli komplexek képződését, ami felveti az AT_1R lehetséges vázfehérje szerepét más receptorokról induló jelátviteli utak szabályozásában.

8. Összefoglalás

A β -arresztin fehérjék központi szerepet töltenek be a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok szabályozásában. A β -arresztinek leállítják a G-fehérje aktivációt, megindítják a receptorok endocitózisát és részt vesznek az ún. β -arresztin-függő jelátviteli utak mediálásában. Fontosságuk ellenére keveset tudunk arról, hogy a plazmamembrán receptorok közötti interakciók, mint például a receptordimerizáció vagy a jelátvitel, milyen szereppel bírnak a β -arresztin aktiváció szabályozásában. Mivel ezen kölcsönhatások gyógyszerinterakciók alapjául szolgálhatnak, továbbá a β -arresztin aktiváció mértéke nagyban meghatározza a receptorokról induló biológiai választ, ezért ezen mechanizmusok megismerése kiemelt orvosbiológiai jelentőséggel bír.

Munkánk első felében a β_2 adrenerg receptor (β_2 AR) és az AT_1 angiotenzin receptor (AT_1 R) heterodimerizációjának funkcionális jelentőségét vizsgáltuk. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések és konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a heterodimer két tagjának együttes agonistakötése potenciózza a β_2 AR β -arresztin kötését az interakció életidejének fokozása által. Emellett azt találtuk, hogy a különböző AT_1 R blokkolók, a hagyományos AT_1 R antagonisták kandezartán és a jelátvitel-szelektív AT_1 R agonista TRV120023, eltérő módon befolyásolják a heterodimer működését, ugyanis csak az utóbbi fokozza az izoproterenol-indukált β_2 AR- β -arresztin interakció nagyságát.

Vizsgálataink második felében arra kerestük a választ, hogy inaktív, ligandumot nem kötő AT_1 R képes-e heterológ aktivációt követően β -arresztint kötni. Koprecipitáció, konfokális mikroszkópia és BRET mérések alkalmazásával kimutattuk, hogy a β -arresztin2 forbol észter, G_q -fehérje kapcsolt vagy epidermális növekedési faktor receptor általi protein kináz C aktiváció hatására kötődik az AT_1 R-hez. Az interakció szerkezeti alapja a stabil kötés kialakításáért felelős ún. stabilitási kapcsoló, amely a receptor C-terminális foszforilált aminosavai és a β -arresztin2 N-domén két lizinje között alakul ki. Konformációs bioszenzorok segítségével kimutattuk, hogy ez a struktúra jelentős szereppel bír a konformációs változások vezérlésében is. Továbbá azt találtuk, hogy a heterológ módon aktivált β -arresztin eltérő konformációban kötődik a receptorhoz, ami kiváltja AT_1 R-MAPK komplexek kialakulását és a receptor internalizációját.

Eredményeink rávilágítanak a plazmamembrán receptorok közötti interakciók jelentőségére a β -arresztin aktiváció szabályozásában.

9. Summary

β -arrestins have central role in the regulation of G protein-coupled receptors. β -arrestins terminate G protein activation, initiate receptor endocytosis and mediate β -arrestin-dependent signaling pathways. Despite their crucial importance, the role of receptor cross-talk or heterodimerization in β -arrestin activation is still poorly understood. Since these interactions can lead to drug interactions, and the extent of β -arrestin activation determines the biological response of the receptors, unveiling these mechanisms has exceptional biomedical significance.

First, we examined the functional importance of the heterodimerization between β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) and AT_1 angiotensin receptor (AT_1 R). Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) measurements and confocal microscopy, we showed that simultaneous agonist binding of the heterodimer partners potentiates the β -arrestin binding of β_2 AR via elongating the interaction lifetime. Furthermore, different AT_1 R blockers, the conventional AT_1 R antagonist candesartan and the biased AT_1 R agonist TRV120023, influenced the function of the heterodimer distinctly, since co-treatment with only the latter compound enhanced the isoproterenol-induced β_2 AR- β -arrestin interaction.

In the second part of our investigation we tested whether the inactive, unliganded AT_1 R is able to bind β -arrestin via a heterologous mechanism. Using co-precipitation, confocal microscopy, and BRET measurements, we demonstrated that β -arrestin2 binds to AT_1 R upon PKC activation by phorbol ester, G_q protein-coupled or epidermal growth factor receptor stimulation. The structural basis of this interaction is the stability lock, a structure responsible for stable binding between these proteins, and formed by phosphorylated receptor C-terminal residues and two lysines in the N-domain of β -arrestin2. Using conformational biosensors, we showed that the stability lock plays crucial role in governing the conformational rearrangements. Furthermore, we found that the heterologous activated β -arrestin binds to AT_1 R in a distinct active conformation, which induces the assembly of receptor-MAPK complexes and receptor internalization.

Our results reveal the critical importance of plasma membrane receptor interactions in the regulation of β -arrestin activation.

10. Irodalomjegyzék

1. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov.* **9**, 373–86.
2. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin J-P, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev.* **57**, 279–88.
3. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* **63**, 1256–72.
4. Audet M, Bouvier M. (2012) Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell.* **151**, 14–23.
5. Rasmussen SGF, Choi H-J, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI, Kobilka BK. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **450**, 383–7.
6. Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature.* **469**, 175–80.
7. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (80-).* **289**, 739–45.
8. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. (2011) Crystal structure of the $\beta(2)$ adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* **477**, 549–55.
9. Carpenter B, Tate CG. (2017) Active state structures of G protein-coupled receptors highlight the similarities and differences in the G protein and arrestin coupling interfaces. *Curr Opin Struct Biol.* **45**, 124–132.
10. Ballesteros JA, Weinstein H. (1995) [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function

- relations in G protein-coupled receptors. in *Methods in Neurosciences*, pp. 366–428, 10.1016/S1043-9471(05)80049-7
11. Sokolina K, Kittanakom S, Snider J, Kotlyar M, Maurice P, Gandía J, Benleulmi-Chaachoua A, Tadagaki K, Oishi A, Wong V, Maly RH, Deineko V, Aoki H, Amin S, Yao Z, Morató X, Otasek D, Kobayashi H, Menendez J, Auerbach D, Angers S, Pržulj N, Bouvier M, Babu M, Ciruela F, Jockers R, Jurisica I, Stagljar I. (2017) Systematic protein-protein interaction mapping for clinically relevant human GPCRs. *Mol Syst Biol.* **13**, 918.
 12. Kimple AJ, Bosch DE, Giguère PM, Siderovski DP. (2011) Regulators of G-protein signaling and their G α substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol Rev.* **63**, 728–49.
 13. 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**, 7108–17.
 14. Gregorio GG, Masureel M, Hilger D, Terry DS, Juette M, Zhao H, Zhou Z, Perez-Aguilar JM, Hauge M, Mathiasen S, Javitch JA, Weinstein H, Kobilka BK, Blanchard SC. (2017) Single-molecule analysis of ligand efficacy in β 2AR-G-protein activation. *Nature.* **547**, 68–73.
 15. Milligan G, Kostenis E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* **147 Suppl**, S46-55.
 16. Hillenbrand M, Schori C, Schöppe J, Plückthun A. (2015) Comprehensive analysis of heterotrimeric G-protein complex diversity and their interactions with GPCRs in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, E1181-90.
 17. Flock T, Hauser AS, Lund N, Gloriam DE, Balaji S, Babu MM. (2017) Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature.* **545**, 317–322.
 18. Laprairie RB, Bagher AM, Denovan-Wright EM. (2017) Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* **32**, 32–43.
 19. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* **390**, 88–91.
 20. Liang Y-L, Khoshouei M, Radjainia M, Zhang Y, Glukhova A, Tarrasch JT, Thal

- DM, Furness SGB, Christopoulos G, Coudrat T, Danev R, Baumeister W, Miller LJ, Christopoulos A, Kobilka BK, Wootten D, Skiniotis G, Sexton PM. (2017) Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature*. **546**, 118–123.
21. Zhang Y, Sun B, Feng D, Hu H, Chu M, Qu Q, Tarrasch JT, Li S, Sun Kobilka T, Kobilka BK, Skiniotis G. (2017) Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. *Nature*. **546**, 248–253.
 22. Komolov KE, Benovic JL. (2018) G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. *Cell Signal*. **41**, 17–24.
 23. Li L, Homan KT, Vishnivetskiy SA, Manglik A, Tesmer JJG, Gurevich VV, Gurevich EV. (2015) G Protein-coupled Receptor Kinases of the GRK4 Protein Subfamily Phosphorylate Inactive G Protein-coupled Receptors (GPCRs). *J Biol Chem*. **290**, 10775–90.
 24. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJG. (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science (80-)*. **310**, 1686–90.
 25. Wolters V, Krasel C, Brockmann J, Bünemann M. (2015) Influence of gαq on the dynamics of m3-acetylcholine receptor-g-protein-coupled receptor kinase 2 interaction. *Mol Pharmacol*. **87**, 9–17.
 26. Komolov KE, Du Y, Duc NM, Betz RM, Rodrigues JPGLM, Leib RD, Patra D, Skiniotis G, Adams CM, Dror RO, Chung KY, Kobilka BK, Benovic JL. (2017) Structural and Functional Analysis of a β2-Adrenergic Receptor Complex with GRK5. *Cell*. **169**, 407–421.e16.
 27. Gurevich EV, Tesmer JJG, Mushegian A, Gurevich VV. (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther*. **133**, 40–69.
 28. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang T-Y, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ. (2011) Distinct phosphorylation sites on the β(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β-arrestin. *Sci Signal*. **4**, ra51.
 29. Gurevich EV, Gurevich VV. (2006) Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol*. **7**, 236.

30. Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC. (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci.* **29**, 413–20.
31. Yang F, Yu X, Liu C, Qu C, Gong Z, Liu H, Li F, Wang H-M, He D, Yi F, Song C, Tian C, Xiao K, Wang J, Sun J. (2015) Phospho-selective mechanisms of arrestin conformations and functions revealed by unnatural amino acid incorporation and (19)F-NMR. *Nat Commun.* **6**, 8202.
32. Kelly E, Bailey CP, Henderson G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* **153 Suppl**, S379-88.
33. Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA, Organisciak DT. (1977) Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol.* **119**, 1949–58.
34. Kühn H. (1978) Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry.* **17**, 4389–95.
35. Kühn H, Hall SW, Wilden U. (1984) Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* **176**, 473–8.
36. Wilden U, Hall SW, Kühn H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 1174–8.
37. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990) Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (80-)*. **248**, 1547–50.
38. 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**, 17882–90.
39. Rapoport B, Kaufman KD, Chazenbalk GD. (1992) Cloning of a member of the arrestin family from a human thyroid cDNA library. *Mol Cell Endocrinol.* **84**, R39-43.
40. Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF. (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem.* **269**, 4613–9.
41. Chan S, Rubin WW, Mendez A, Liu X, Song X, Hanson SM, Craft CM, Gurevich

- VV, Burns ME, Chen J. (2007) Functional comparisons of visual arrestins in rod photoreceptors of transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48**, 1968–75.
42. Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski JA, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL. (1995) Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* **270**, 720–31.
 43. Gurevich EV., Benovic JL, Gurevich VV. (2002) Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience.* **109**, 421–36.
 44. Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell.* **97**, 257–69.
 45. Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C. (2001) Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure.* **9**, 869–80.
 46. Sutton RB, Vishnivetskiy SA, Robert J, Hanson SM, Raman D, Knox BE, Kono M, Navarro J, Gurevich VV. (2005) Crystal structure of cone arrestin at 2.3Å: evolution of receptor specificity. *J Mol Biol.* **354**, 1069–80.
 47. Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW. (2011) Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J Mol Biol.* **406**, 467–78.
 48. Vishnivetskiy SA, Paz CL, Schubert C, Hirsch JA, Sigler PB, Gurevich VV. (1999) How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J Biol Chem.* **274**, 11451–4.
 49. Storez H, Scott MGH, Issafras H, Burtey A, Benmerah A, Muntaner O, Piolot T, Tramier M, Coppey-Moisan M, Bouvier M, Labbé-Jullié C, Marullo S. (2005) Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem.* **280**, 40210–5.
 50. Milano SK, Kim Y-M, Stefano FP, Benovic JL, Brenner C. (2006) Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J Biol Chem.* **281**, 9812–23.
 51. Kang Y, Zhou XE, Gao X, He Y, Liu W, Ishchenko A, Barty A, White TA,

- Yefanov O, Han GW, Xu Q, de Waal PW, Ke J, Tan MHE, Zhang C, Moeller A, West GM, Pascal BD, Van Eps N, Caro LN, Vishnivetskiy SA, Lee RJ, Suino-Powell KM, Gu X, Pal K, Ma J, Zhi X, Boutet S, Williams GJ, Messerschmidt M, Gati C, Zatsepin NA, Wang D, James D, Basu S, Roy-Chowdhury S, Conrad CE, Coe J, Liu H, Lisova S, Kupitz C, Grotjohann I, Fromme R, Jiang Y, Tan M, Yang H, Li J, Wang M, Zheng Z, Li D, Howe N, Zhao Y, Standfuss J, Diederichs K, Dong Y, Potter CS, Carragher B, Caffrey M, Jiang H, Chapman HN, Spence JCH, Fromme P, Weierstall U, Ernst OP, Katritch V, Gurevich VV, Griffin PR, Hubbell WL, Stevens RC, Cherezov V, Melcher K, Xu HE. (2015) Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*. **523**, 561–7.
52. Zhou XE, He Y, de Waal PW, Gao X, Kang Y, Van Eps N, Yin Y, Pal K, Goswami D, White TA, Barty A, Latorraca NR, Chapman HN, Hubbell WL, Dror RO, Stevens RC, Cherezov V, Gurevich VV, Griffin PR, Ernst OP, Melcher K, Xu HE. (2017) Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*. **170**, 457–469.e13.
53. Schleicher A, Kühn H, Hofmann KP. (1989) Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extrametarhodopsin II. *Biochemistry*. **28**, 1770–5.
54. Granzin J, Cousin A, Weirauch M, Schlesinger R, Büldt G, Batra-Safferling R. (2012) Crystal structure of p44, a constitutively active splice variant of visual arrestin. *J Mol Biol*. **416**, 611–8.
55. Kim YJ, Hofmann KP, Ernst OP, Scheerer P, Choe H-W, Sommer ME. (2013) Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature*. **497**, 142–6.
56. Granzin J, Stadler A, Cousin A, Schlesinger R, Batra-Safferling R. (2015) Structural evidence for the role of polar core residue Arg175 in arrestin activation. *Sci Rep*. **5**, 15808.
57. Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng W-C, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang L-Y, Paduch M, Tripathi-Shukla P, Koide A, Koide S, Weis WI, Kossiakoff AA, Kobilka BK, Lefkowitz RJ. (2013) Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*. **497**, 137–41.
58. Chen Q, Perry NA, Vishnivetskiy SA, Berndt S, Gilbert NC, Zhuo Y, Singh PK,

- Tholen J, Ohi MD, Gurevich EV, Brautigam CA, Klug CS, Gurevich VV, Iverson TM. (2017) Structural basis of arrestin-3 activation and signaling. *Nat Commun.* **8**, 1427.
59. Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang L-Y, Tripathi-Shukla P, Qian J, Li S, Blanc A, Oleskie AN, Dosey AM, Su M, Liang C-R, Gu L-L, Shan J-M, Chen X, Hanna R, Choi M, Yao XJ, Klink BU, Kahsai AW, Sidhu SS, Koide S, Penczek PA, Kossiakoff AA, Jr VLW, Kobilka BK, Skiniotis G, Lefkowitz RJ. (2014) Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature.* **512**, 218–222.
60. Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill TJ, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, Kahsai AW, Strachan RT, Pani B, Mahoney JP, Huang L-Y, Breton B, Heydenreich FM, Sunahara RK, Skiniotis G, Bouvier M, Lefkowitz RJ. (2016) GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell.* **166**, 907–19.
61. Sommer ME, Hofmann KP, Heck M. (2012) Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. *Nat Commun.* **3**, 995.
62. Lally CCM, Bauer B, Selent J, Sommer ME. (2017) C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor. *Nat Commun.* **8**, 14258.
63. Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* **18**, 871–81.
64. Peterson YK, Luttrell LM. (2017) The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev.* **69**, 256–297.
65. Lee M-H, Appleton KM, Strungs EG, Kwon JY, Morinelli TA, Peterson YK, Laporte SA, Luttrell LM. (2016) The conformational signature of β -arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature.* **531**, 665–8.
66. Nuber S, Zabel U, Lorenz K, Nuber A, Milligan G, Tobin AB, Lohse MJ, Hoffmann C. (2016) β -Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature.* **531**, 661–4.
67. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2011) β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci.* **32**, 521–33.
68. Cahill TJ, Thomsen ARB, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, Huang L-

- Y, Kahsai AW, Bassoni DL, Gavino BJ, Lamerdin JE, Triest S, Shukla AK, Berger B, Little J, Antar A, Blanc A, Qu C-X, Chen X, Kawakami K, Inoue A, Aoki J, Steyaert J, Sun J-P, Bouvier M, Skiniotis G, Lefkowitz RJ. (2017) Distinct conformations of GPCR- β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, 2562–2567.
69. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, Houslay MD. (2003) Beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 940–5.
70. Nelson CD, Perry SJ, Regier DS, Prescott SM, Topham MK, Lefkowitz RJ. (2007) Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science (80-)*. **315**, 663–6.
71. Gáborik Z, Hunyady L. (2004) Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*. **15**, 286–93.
72. Gyombolai P, Boros E, Hunyady L, Turu G. (2013) Differential β -arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*. **372**, 116–27.
73. McMahon HT, Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **12**, 517–33.
74. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SSG, Caron MG, Barak LS. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 3712–7.
75. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (2000) The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*. **275**, 23120–6.
76. Tian X, Kang DS, Benovic JL. (2014) β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Handb Exp Pharmacol*. **219**, 173–86.
77. Hanson SM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Kolobova EA, Hubbell WL, Klug CS, Gurevich VV. (2006) Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 4900–5.
78. Zhuo Y, Vishnivetskiy SA, Zhan X, Gurevich VV, Klug CS. (2014) Identification of receptor binding-induced conformational changes in non-visual arrestins. *J Biol*

- Chem.* **289**, 20991–1002.
79. Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*. **383**, 447–50.
 80. Goodman OB, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. (1997) Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem*. **272**, 15017–22.
 81. Kang DS, Kern RC, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Williams JC, Benovic JL. (2009) Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem*. **284**, 29860–72.
 82. Krupnick JG, Goodman OB, 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**, 15011–6.
 83. Balla T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*. **93**, 1019–137.
 84. Posor Y, Eichhorn-Grünig M, Haucke V. (2015) Phosphoinositides in endocytosis. *Biochim Biophys Acta*. **1851**, 794–804.
 85. McDonald PH, Cote NL, Lin FT, Premont RT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1999) Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem*. **274**, 10677–80.
 86. Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2001) Beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem*. **276**, 42509–13.
 87. Nelson CD, Kovacs JJ, Nobles KN, Whalen EJ, Lefkowitz RJ. (2008) Beta-arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Ialpha promotes agonist-stimulated sequestration of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. **283**, 21093–101.
 88. 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**, 32248–57.
 89. 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**, 17201–10.
90. 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**, 19452–60.
 91. Kliewer A, Reinscheid RK, Schulz S. (2017) Emerging Paradigms of G Protein-Coupled Receptor Dephosphorylation. *Trends Pharmacol Sci.* **38**, 621–636.
 92. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science (80-)*. **294**, 1307–13.
 93. Shenoy SK, Barak LS, Xiao K, Ahn S, Berthouze M, Shukla AK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2007) Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem.* **282**, 29549–62.
 94. Moore CAC, Milano SK, Benovic JL. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* **69**, 451–82.
 95. Rajendran L, Knölker H-J, Simons K. (2010) Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* **9**, 29–42.
 96. Hunyady L, Baukal AJ, Gáborik Z, Olivares-Reyes JA, Bor M, Szaszák M, Lodge R, Catt KJ, Balla T. (2002) Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *J Cell Biol.* **157**, 1211–22.
 97. Szakadati G, Tóth AD, Oláh I, Erdélyi LS, Balla T, Vármai P, Hunyady L, Balla A. (2015) Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation. *Mol Pharmacol.* **87**, 972–81.
 98. Namkung Y, Le Gouill C, Lukashova V, Kobayashi H, Hogue M, Khoury E, Song M, Bouvier M, Laporte SA. (2016) Monitoring G protein-coupled receptor and β -arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun.* **7**, 12178.
 99. Tiulpakov A, White CW, Abhayawardana RS, See HB, Chan AS, Seeber RM, Heng JI, Dedov I, Pavlos NJ, Pflieger KDG. (2016) Mutations of Vasopressin Receptor 2 Including Novel L312S Have Differential Effects on Trafficking. *Mol*

- Endocrinol.* **30**, 889–904.
100. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol.* **69**, 483–510.
 101. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. (2011) Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci.* **36**, 457–69.
 102. Hanson SM, Cleghorn WM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Raman D, Song X, Nair KS, Slepak VZ, Klug CS, Gurevich VV. (2007) Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J Mol Biol.* **368**, 375–87.
 103. Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin FT, Kawakatsu H, Owada KM, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (80-)*. **283**, 655–61.
 104. 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 (80-)*. **290**, 1574–7.
 105. 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**, 2449–54.
 106. Zhan X, Kook S, Gurevich EV, Gurevich VV. (2014) Arrestin-dependent activation of JNK family kinases. *Handb Exp Pharmacol.* **219**, 259–80.
 107. Coffa S, Breitman M, Hanson SM, Callaway K, Kook S, Dalby KN, Gurevich VV. (2011) The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS One.* **6**, e28723.
 108. Wei H, 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**, 10782–7.
 109. 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**, 35518–25.
 110. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E,

- Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ. (2006) Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **281**, 1261–73.
111. Ren X-R, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ. (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 1448–53.
112. O’Hayre M, Eichel K, Avino S, Zhao X, Steffen DJ, Feng X, Kawakami K, Aoki J, Messer K, Sunahara R, Inoue A, von Zastrow M, Gutkind JS. (2017) Genetic evidence that β -arrestins are dispensable for the initiation of β 2-adrenergic receptor signaling to ERK. *Sci Signal.* 10.1126/scisignal.aal3395
113. 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**, 9429–36.
114. DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ. (2008) Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem.* **283**, 10611–20.
115. Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell.* **122**, 261–73.
116. Beaulieu J-M, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell.* **132**, 125–36.
117. Kendall RT, Lee M-H, 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**, 26155–66.
118. Hunyady L, Turu G. (2004) The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol Metab.* **15**, 405–8.
119. Tang W, Strachan RT, Lefkowitz RJ, Rockman HA. (2014) Allosteric Modulation of β -Arrestin-biased Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling by Membrane Stretch. *J Biol Chem.* **289**, 28271–28383.

120. Abraham DM, Davis RT, Warren CM, Mao L, Wolska BM, Solaro RJ, Rockman HA. (2016) β -Arrestin mediates the Frank-Starling mechanism of cardiac contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**, 14426–14431.
121. Gesty-Palmer D, Yuan L, Martin B, Wood WH, Lee M-H, Janech MG, Tsoi LC, Zheng WJ, Luttrell LM, Maudsley S. (2013) β -arrestin-selective G protein-coupled receptor agonists engender unique biological efficacy in vivo. *Mol Endocrinol*. **27**, 296–314.
122. Kim J, Zhang L, Peppel K, Wu J-H, Zidar DA, Brian L, DeWire SM, Exum ST, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. (2008) Beta-arrestins regulate atherosclerosis and neointimal hyperplasia by controlling smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res*. **103**, 70–9.
123. Kim J, Ahn S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. (2009) Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **284**, 11953–62.
124. Ahn S, Kim J, Hara MR, Ren X-R, Lefkowitz RJ. (2009) β -Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation. *J Biol Chem*. **284**, 8855–65.
125. Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, Rajagopal S, Strachan RT, Grant W, Towers AJ, Williams B, Lam CM, Xiao K, Shenoy SK, Gregory SG, Ahn S, Duckett DR, Lefkowitz RJ. (2011) A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*. **477**, 349–53.
126. Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K. (2003) A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J Biol Chem*. **278**, 34418–26.
127. Hunton DL, Barnes WG, Kim J, Ren X-R, Violin JD, Reiter E, Milligan G, Patel DD, Lefkowitz RJ. (2005) Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol*. **67**, 1229–36.
128. Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren X-R, 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**, 8041–50.
129. Law J, Zhang G, Dragan M, Postovit L-M, Bhattacharya M. (2014) Nodal signals

- via β -arrestins and RalGTPases to regulate trophoblast invasion. *Cell Signal.* **26**, 1935–42.
130. Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. (2004) Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem.* **279**, 55419–24.
 131. Fereshteh M, Ito T, Kovacs JJ, Zhao C, Kwon HY, Tornini V, Konuma T, Chen M, Lefkowitz RJ, Reya T. (2012) β -Arrestin2 mediates the initiation and progression of myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 12532–7.
 132. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, Vilardaga J-P. (2011) Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol.* **7**, 278–84.
 133. 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**, 534–8.
 134. Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga J-P. (2013) Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-G $\beta\gamma$ complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 1530–5.
 135. Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Hallows KR, Brown D, Bouley R, Vilardaga J-P. (2013) Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem.* **288**, 27849–60.
 136. Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR, Lefkowitz RJ. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 12011–6.
 137. Xiao K, Sun J-P, Kim J, Rajagopal S, Zhai B, Villén J, Haas W, Kovacs JJ, Shukla AK, Hara MR, Hernandez M, Lachmann A, Zhao S, Lin Y, Cheng Y, Mizuno K, Ma'ayan A, Gygi SP, Lefkowitz RJ. (2010) Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 15299–304.
 138. Srivastava A, Gupta B, Gupta C, Shukla AK. (2015) Emerging Functional Divergence of β -Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends Endocrinol Metab.*

- 26, 628–42.
139. Zhang M, Liu X, Zhang Y, Zhao J. (2010) Loss of betaarrestin1 and betaarrestin2 contributes to pulmonary hypoplasia and neonatal lethality in mice. *Dev Biol.* **339**, 407–17.
 140. 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**, 7807–11.
 141. Flores-Otero J, Ahn KH, Delgado-Peraza F, Mackie K, Kendall DA, Yudowski GA. (2014) Ligand-specific endocytic dwell times control functional selectivity of the cannabinoid receptor 1. *Nat Commun.* **5**, 4589.
 142. Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 1740–4.
 143. Cassier E, Gally N, Bourquard T, Claeysen S, Bockaert J, Crépieux P, Poupon A, Reiter E, Marin P, Vandermoere F. (2017) Phosphorylation of β -arrestin2 at Thr383 by MEK underlies β -arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife.* 10.7554/eLife.23777
 144. Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem.* **272**, 31051–7.
 145. Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1999) Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* **274**, 15971–4.
 146. Lin F-T, Chen W, Shenoy SK, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ. (2002) Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry.* **41**, 10692–9.
 147. Paradis JS, Ly S, Blondel-Tepaz É, Galan JA, Beaufrais A, Scott MGH, Enslin H, Marullo S, Roux PP, Bouvier M. (2015) Receptor sequestration in response to β -arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, E5160-8.
 148. Barthet G, Carrat G, Cassier E, Barker B, Gaven F, Pillot M, Framery B, Pellissier

- LP, Augier J, Kang DS, Claeysen S, Reiter E, Banères J-L, Benovic JL, Marin P, Bockaert J, Dumuis A. (2009) Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT₄ receptor signalling. *EMBO J.* **28**, 2706–18.
149. Kim Y-M, Barak LS, Caron MG, Benovic JL. (2002) Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem.* **277**, 16837–46.
150. Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, Wilkinson KD, Miller WE, Lefkowitz RJ. (2009) Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 6650–5.
151. 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**, 14498–506.
152. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem.* **280**, 15315–15324.
153. Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, Stamler JS. (2008) S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell.* **31**, 395–405.
154. Offermanns S. (2006) Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* **99**, 1293–304.
155. Turu G, Simon A, Gyombolai P, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L. (2007) The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity. *J Biol Chem.* **282**, 7753–7.
156. Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. (2012) Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Mol Cell Endocrinol.* **353**, 29–36.
157. Turu G, Várnai P, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L. (2009) Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* **284**, 16914–21.
158. Szekeres M, Nádasy GL, Turu G, Soltész-Katona E, Tóth ZE, Balla A, Catt KJ,

- Hunyady L. (2012) Angiotensin II induces vascular endocannabinoid release, which attenuates its vasoconstrictor effect via CB1 cannabinoid receptors. *J Biol Chem.* **287**, 31540–50.
159. Köse M. (2017) GPCRs and EGFR - Cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg Med Chem Lett.* **27**, 3611–3620.
160. Du H, Kwon I-K, Kim J. (2013) Neuregulin-1 impairs the long-term depression of hippocampal inhibitory synapses by facilitating the degradation of endocannabinoid 2-AG. *J Neurosci.* **33**, 15022–31.
161. Murthy KS. (2006) Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol.* **68**, 345–74.
162. Yao X, Forte JG. (2003) Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol.* **65**, 103–31.
163. Cho E-Y, Cho D-I, Park JH, Kurose H, Caron MG, Kim K-M. (2007) Roles of protein kinase C and actin-binding protein 280 in the regulation of intracellular trafficking of dopamine D3 receptor. *Mol Endocrinol.* **21**, 2242–54.
164. Namkung Y, Sibley DR. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem.* **279**, 49533–41.
165. Lorenz S, Frenzel R, Paschke R, Breitwieser GE, Miedlich SU. (2007) Functional desensitization of the extracellular calcium-sensing receptor is regulated via distinct mechanisms: role of G protein-coupled receptor kinases, protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology.* **148**, 2398–404.
166. Xiang B, Yu GH, Guo J, Chen L, Hu W, Pei G, Ma L. (2001) Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *J Biol Chem.* **276**, 4709–16.
167. Klein U, Müller C, Chu P, Birnbaumer M, von Zastrow M. (2001) Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins. *J Biol Chem.* **276**, 17442–7.
168. Schmidlin F, Déry O, Bunnett NW, Grady EF. (2002) Heterologous regulation of trafficking and signaling of G protein-coupled receptors: beta-arrestin-dependent interactions between neurokinin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 3324–9.

169. Tóth JT. (2016) *A plazmamembrán foszfoinozítidek sejttélettani szerepének vizsgálata újonnan fejlesztett bioszenzorokkal (Doktori értekezés)*. Ph.D. thesis, Semmelweis Egyetem
170. Szakadáti G. (2017) *Az 1-es típusú angiotenzin II receptor jelátvitelszelektív aktivációjának hatása a receptor sorsára (Doktori értekezés)*. Ph.D. thesis, Semmelweis Egyetem
171. Mifune M, Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Brailoiu E, Dun NJ, Frank GD, Inagami T, Higashiyama S, Thomas WG, Eckhart AD, Dempsey PJ, Eguchi S. (2005) G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J Biol Chem.* **280**, 26592–9.
172. Delcourt N, Bockaert J, Marin P. (2007) GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci.* **28**, 602–7.
173. Vickery ON, Machtens J-P, Zachariae U. (2016) Membrane potentials regulating GPCRs: insights from experiments and molecular dynamics simulations. *Curr Opin Pharmacol.* **30**, 44–50.
174. Szidonya L, Cserző M, Hunyady L. (2008) Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol.* **196**, 435–53.
175. Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pflieger KDG, Pin J-P, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS, Franco R. (2009) Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* **5**, 131–4.
176. Milligan G. (2013) The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. *Mol Pharmacol.* **84**, 158–69.
177. Ferré S, Casadó V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin J-P, Guitart X. (2014) G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev.* **66**, 413–34.
178. Kniazeff J, Prézeau L, Rondard P, Pin J-P, Goudet C. (2011) Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol Ther.* **130**, 9–25.
179. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ,

- Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. **396**, 674–9.
180. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. **396**, 683–7.
181. White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. **396**, 679–82.
182. Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C. (2012) Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev*. **64**, 299–336.
183. Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, Erdélyi LS, Várnai P, Hunyady L. (2014) Improved Methodical Approach for Quantitative BRET Analysis of G Protein Coupled Receptor Dimerization. *PLoS One*. **9**, e109503.
184. Lan T-H, Liu Q, Li C, Wu G, Steyaert J, Lambert NA. (2015) BRET evidence that β_2 adrenergic receptors do not oligomerize in cells. *Sci Rep*. **5**, 10166.
185. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 3684–9.
186. Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science (80-)*. **330**, 1066–71.
187. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. (2012) Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. **485**, 321–6.
188. Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang X-P, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth

- BL, Cherezov V, Stevens RC. (2012) Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JD1c. *Nature*. **485**, 327–32.
189. Huang J, Chen S, Zhang JJ, Huang X-Y. (2013) Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*. **20**, 419–25.
190. Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JET, Lazareno S, Molloy JE, Birdsall NJM. (2010) Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 2693–8.
191. Kasai RS, Suzuki KGN, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, Kusumi A. (2011) Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol*. **192**, 463–80.
192. Calebiro D, Rieken F, Wagner J, Sungkaworn T, Zabel U, Borzi A, Cocucci E, Zürn A, Lohse MJ. (2013) Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 743–8.
193. Rovira X, Pin J-P, Giraldo J. (2010) The asymmetric/symmetric activation of GPCR dimers as a possible mechanistic rationale for multiple signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*. **31**, 15–21.
194. Rivero-Müller A, Jonas KC, Hanyaloglu AC, Huhtaniemi I. (2013) Di/oligomerization of GPCRs-mechanisms and functional significance. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **117**, 163–85.
195. Milligan G. (2010) The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol*. **10**, 23–9.
196. Salahpour A, Angers S, Mercier J-F, Lagacé M, Marullo S, Bouvier M. (2004) Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem*. **279**, 33390–7.
197. Kobayashi H, Ogawa K, Yao R, Lichtarge O, Bouvier M. (2009) Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic*. **10**, 1019–33.
198. Chabre M, Deterre P, Antony B. (2009) The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci*. **30**, 182–

- 7.
199. Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, Roux T, Bazin H, Bourrier E, Lamarque L, Breton C, Rives M-L, Newman A, Javitch JA, Trinquet E, Manning M, Pin J-P, Mouillac B, Durroux T. (2010) Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol.* **6**, 587–94.
200. Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin J-P, Banères J-L. (2006) Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J.* **25**, 5693–702.
201. Vilardaga J-P, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. (2008) Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol.* **4**, 126–31.
202. 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**, 477–85.
203. Sleno R, Devost D, Pétrin D, Zhang A, Bourque K, Shinjo Y, Aoki J, Inoue A, Hébert TE. (2017) Conformational biosensors reveal allosteric interactions between heterodimeric AT1 angiotensin and prostaglandin F2 α receptors. *J Biol Chem.* **292**, 12139–12152.
204. Lee C, Ji I, Ryu K, Song Y, Conn PM, Ji TH. (2002) Two defective heterozygous luteinizing hormone receptors can rescue hormone action. *J Biol Chem.* **277**, 15795–800.
205. Rivero-Müller A, Chou Y-Y, Ji I, Lajic S, Hanyaloglu AC, Jonas KC, Rahman N, Ji TH, Huhtaniemi I. (2010) Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 2319–24.
206. Jonas KC, Fanelli F, Huhtaniemi IT, Hanyaloglu AC. (2015) Single molecule analysis of functionally asymmetric G protein-coupled receptor (GPCR) oligomers reveals diverse spatial and structural assemblies. *J Biol Chem.* **290**, 3875–92.
207. Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, Huang B, Zare RN, Kobilka BK, Sunahara RK. (2007) A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A.* **104**, 7682–7.
208. Tsukamoto H, Sinha A, DeWitt M, Farrens DL. (2010) Monomeric rhodopsin is the minimal functional unit required for arrestin binding. *J Mol Biol.* **399**, 501–11.
 209. Jonas KC, Rivero-Müller A, Huhtaniemi IT, Hanyaloglu AC. (2013) G protein-coupled receptor transactivation: from molecules to mice. *Methods Cell Biol.* **117**, 433–50.
 210. Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA. (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol.* **5**, 688–95.
 211. Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA. (2003) Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation.* **108**, 1611–8.
 212. Karip E, Turu G, Süpeki K, Szidonya L, Hunyady L. (2007) Cross-inhibition of angiotensin AT1 receptors supports the concept of receptor oligomerization. *Neurochem Int.* **51**, 261–7.
 213. Mustafa S, See HB, Seeber RM, Armstrong SP, White CW, Ventura S, Ayoub MA, Pflieger KDG. (2012) Identification and profiling of novel α 1A-adrenoceptor-CXC chemokine receptor 2 heteromer. *J Biol Chem.* **287**, 12952–65.
 214. Terrillon S, Barberis C, Bouvier M. (2004) Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 1548–53.
 215. Sartania N, Appelbe S, Padiani JD, Milligan G. (2007) Agonist occupancy of a single monomeric element is sufficient to cause internalization of the dimeric beta2-adrenoceptor. *Cell Signal.* **19**, 1928–38.
 216. Rashid AJ, So CH, Kong MMC, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O’Dowd BF, George SR. (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 654–9.
 217. Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, Nobrega JN, Liu F. (2010) Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med.* **16**, 1393–5.
 218. Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N,

- Devi LA. (2011) AT1R-CB₁R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* **30**, 2350–63.
219. Rozenfeld R, Devi LA. (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J.* **21**, 2455–65.
220. Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, Ong E, Lim M, Maillet E, Junek M, Cahill CM, Harkany T, Devi LA. (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal.* **3**, ra54.
221. Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini GU, Cotecchia S, Maggio R. (2005) Paired activation of two components within muscarinic M3 receptor dimers is required for recruitment of beta-arrestin-1 to the plasma membrane. *J Biol Chem.* **280**, 19768–76.
222. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov.* **16**, 829–842.
223. Kenakin T, Miller LJ. (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev.* **62**, 265–304.
224. 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**, 4625–36.
225. Noda K, Feng Y-H, Liu X, Saad Y, Husain A, Karnik SS. (1996) The active state of the AT1 angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry.* **35**, 16435–42.
226. Le MT, Vanderheyden PML, Szaszák 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**, 23107–10.
227. Wacker D, Stevens RC, Roth BL. (2017) How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell.* **170**, 414–427.
228. Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AGW, Tate CG. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features

- of GPCR activation. *Nature*. **474**, 521–5.
229. Carpenter B, Nehmé R, Warne T, Leslie AGW, Tate CG. (2016) Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein. *Nature*. **536**, 104–7.
 230. Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, Wüthrich K. (2012) Biased signaling pathways in β 2-adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science (80-)*. **335**, 1106–10.
 231. Manglik A, Kim TH, Masureel M, Altenbach C, Yang Z, Hilger D, Lerch MT, Kobilka TS, Thian FS, Hubbell WL, Prosser RS, Kobilka BK. (2015) Structural Insights into the Dynamic Process of β 2-Adrenergic Receptor Signaling. *Cell*. **161**, 1101–11.
 232. Roth BL, Chuang D-M. (1987) Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci*. **41**, 1051–64.
 233. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. (2011) Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*. **17**, 126–39.
 234. Holloway AC, Qian H, Pipolo L, Ziogas J, Miura S, Karnik SS, 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**, 768–77.
 235. Hunyady L, Catt KJ. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. **20**, 953–970.
 236. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*. **35**, 308–16.
 237. 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 receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 16284–9.
 238. Boerrigter G, Lark MW, Whalen EJ, Soergel DG, Violin JD, Burnett JC. (2011) Cardiorenal actions of TRV120027, a novel β -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**, 770–8.

239. Zimmerman B, Beautrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, Bouvier M, Laporte SA. (2012) Differential β -arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal*. **5**, ra33.
240. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. (2010) Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther*. **335**, 572–9.
241. Devost D, Sleno R, Pétrin D, Zhang A, Shinjo Y, Okde R, Aoki J, Inoue A, Hébert TE. (2017) Conformational Profiling of the AT1 Angiotensin II Receptor Reflects Biased Agonism, G Protein Coupling, and Cellular Context. *J Biol Chem*. **292**, 5443–5456.
242. Kim K-S, Abraham D, Williams B, Violin JD, Mao L, Rockman HA. (2012) β -Arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **303**, H1001-10.
243. Monasky MM, Taglieri DM, Henze M, Warren CM, Utter MS, Soergel DG, Violin JD, Solaro RJ. (2013) The β -arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **305**, H856-66.
244. Pang PS, Butler J, Collins SP, Cotter G, Davison BA, Ezekowitz JA, Filippatos G, Levy PD, Metra M, Ponikowski P, Teerlink JR, Voors AA, Bharucha D, Goin K, Soergel DG, Felker GM. (2017) Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). *Eur Heart J*. **38**, 2364–2373.
245. Wilson PC, Lee M-H, Appleton KM, El-Shewy HM, Morinelli TA, Peterson YK, Luttrell LM, Jaffa AA. (2013) The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist [Sar1,Ile4,Ile8]-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers. *J Biol Chem*. **288**, 18872–84.
246. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Qwitterer U. (2001) Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. **7**, 1003–9.

247. Hansen JL, Hansen JT, Speerschneider T, Lyngsø C, Erikstrup N, Burstein ES, Weiner DM, Walther T, Makita N, Iiri T, Merten N, Kostenis E, Sheikh SP. (2009) Lack of evidence for AT1R/B2R heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 cells: how common is the AT1R/B2R heterodimer? *J Biol Chem.* **284**, 1831–9.
248. Le MT, Vanderheyden PML, Szaszák M, Hunyady L, Kersemans V, Vauquelin G. (2003) Peptide and nonpeptide antagonist interaction with constitutively active human AT1 receptors. *Biochem Pharmacol.* **65**, 1329–38.
249. 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.
250. Deshpande DA, Theriot BS, Penn RB, Walker JKL. (2008) Beta-arrestins specifically constrain beta2-adrenergic receptor signaling and function in airway smooth muscle. *FASEB J.* **22**, 2134–41.
251. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 16657–62.
252. Kim I-M, 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**, 14555–60.
253. Raehal KM, Walker JKL, Bohn LM. (2005) Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **314**, 1195–201.
254. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin F-T. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science (80-).* **286**, 2495–8.
255. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin F-T, Lefkowitz RJ, Caron MG. (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature.* **408**, 720–3.
256. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen X-T, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblisch M, Lark MW, Violin JD. (2013) A G protein-biased ligand at the μ -opioid receptor is potently analgesic with reduced

- gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* **344**, 708–17.
257. Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang X-P, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Da Duan, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK. (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature.* **537**, 185–190.
258. 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**, 367–77.
259. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. (2012) A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci.* **3**, 193–203.
260. Changeux J-P, Christopoulos A. (2016) Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell.* **166**, 1084–102.
261. Gaitonde SA, González-Maeso J. (2017) Contribution of heteromerization to G protein-coupled receptor function. *Curr Opin Pharmacol.* **32**, 23–31.
262. Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, Portoghese PS, Whistler JL. (2005) A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 9050–5.
263. Hübner H, Schellhorn T, Gienger M, Schaab C, Kaindl J, Leeb L, Clark T, Möller D, Gmeiner P. (2016) Structure-guided development of heterodimer-selective GPCR ligands. *Nat Commun.* **7**, 12298.
264. Gáborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spät A, Catt KJ, Hunyady L. (2003) The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology.* **144**, 2220–8.
265. Hunyady L, Bor M, Balla T, Catt KJ. (1994) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem.* **269**, 31378–82.
266. Tóth DJ, Tóth JT, Gulyás G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Várnai 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**,

- 2185–97.
267. Tóth JT, Gulyás G, Tóth DJ, Balla A, Hammond GR V., Hunyady L, Balla T, Várnai P. (2016) BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta*. **1861**, 177–87.
 268. Turu G, Szidonya L, Gáborik Z, Buday L, Spät A, Clark AJL, Hunyady L. (2006) Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett*. **580**, 41–5.
 269. Gulyás G, Tóth JT, Tóth DJ, Kurucz I, Hunyady L, Balla T, Várnai P. (2015) Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PLoS One*. **10**, e0125601.
 270. Erdélyi LS, Balla A, Patócs A, Tóth M, Várnai P, Hunyady L. (2014) Altered agonist sensitivity of a mutant v2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Endocrinol*. **28**, 634–43.
 271. De A, Loening AM, Gambhir SS. (2007) An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res*. **67**, 7175–83.
 272. Ferguson SSG, Downey WE, Colapietro A-M, Barak LS, Ménard L, Caron MG. (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science (80-)*. **271**, 363–6.
 273. Barak LS, Ferguson SSG, Zhang J, Caron MG. (1997) A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*. **272**, 27497–500.
 274. Yon J, Fried M. (1989) Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Res*. **17**, 4895.
 275. Balla A, Tóth DJ, Soltész-Katona E, Szakadáti G, Erdélyi LS, Várnai 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**, 9090–9.
 276. Gimenez LE, Kook S, Vishnivetskiy SA, Ahmed MR, Gurevich EV., Gurevich VV. (2012) Role of receptor-attached phosphates in binding of visual and non-visual arrestins to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. **287**, 9028–40.
 277. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P,

- Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, Robers MB, Benink HA, Eggers CT, Slater MR, Meisenheimer PL, Klaubert DH, Fan F, Encell LP, Wood K V. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* **7**, 1848–57.
278. Machleidt T, Woodroffe CC, Schwinn MK, Méndez J, Robers MB, Zimmerman K, Otto P, Daniels DL, Kirkland TA, Wood K V. (2015) NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. *ACS Chem Biol.* **10**, 1797–804.
279. Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. (2015) How FAsH got its sparkle: historical recollections of the biarsenical-tetracysteine tag. *Methods Mol Biol.* **1266**, 1–6.
280. Hoffmann C, Gaietta G, Zürn A, Adams SR, Terrillon S, Ellisman MH, Tsien RY, Lohse MJ. (2010) Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat Protoc.* **5**, 1666–77.
281. Gyombolai P, Tóth AD, Tímár D, Turu G, Hunyady L. (2015) Mutations in the “DRY” motif of the CB1 cannabinoid receptor result in biased receptor variants. *J Mol Endocrinol.* **54**, 75–89.
282. Donthamsetti P, Quejada JR, Javitch JA, Gurevich VV, Lambert NA. (2015) Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) to Characterize Agonist-Induced Arrestin Recruitment to Modified and Unmodified G Protein-Coupled Receptors. *Curr Protoc Pharmacol.* **70**, 2.14.1-14.
283. Woo J, von Arnim AG. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Plant Methods.* **4**, 23.
284. Yeung Y-G, Stanley ER. (2009) A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing. *Anal Biochem.* **389**, 89–91.
285. Qian H, Pipolo L, Thomas WG. (2001) Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. *Mol Endocrinol.* **15**, 1706–19.
286. Eichel K, Jullié D, von Zastrow M. (2016) β -Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol.* **18**, 303–10.

287. Baukal AJ, Hunyady L, Catt KJ, Balla T. (1994) Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cyclic AMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *J Biol Chem.* **269**, 24546–9.
288. Krasel C, Bünemann M, Lorenz K, Lohse MJ. (2005) Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem.* **280**, 9528–35.
289. Castillo-Badillo JA, Sánchez-Reyes OB, Alfonzo-Méndez MA, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA. (2015) α 1B-adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PLoS One.* **10**, e0121165.
290. Hunyady L, Catt KJ, Clark AJL, Gáborik Z. (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept.* **91**, 29–44.
291. Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA, Mihalik B, Jayadev S, Catt KJ. (1998) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT1a receptor is localized to a serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol.* **54**, 935–41.
292. Qian H, Pipolo L, Thomas WG. (1999) Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT1A) receptor. *Biochem J.* **343 Pt 3**, 637–44.
293. 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**, 13266–72.
294. Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ. (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem.* **276**, 1911–5.
295. Pronin AN, Benovic JL. (1997) Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J Biol Chem.* **272**, 3806–12.
296. 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**, 48255–61.
297. Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV., Velez MG, Gurevich VV. (2000) An additional phosphate-binding element in arrestin molecule.

- Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem.* **275**, 41049–57.
298. Kocan M, See HB, Seeber RM, Eidne KA, Pflieger KDG. (2008) Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen.* **13**, 888–98.
299. Zhan X, Perez A, Gimenez LE, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV. (2014) Arrestin-3 binds the MAP kinase JNK3 α 2 via multiple sites on both domains. *Cell Signal.* **26**, 766–776.
300. Tóth AD, Gyombolai P, Szalai B, Várnai P, Turu G, Hunyady L. (2017) Angiotensin type 1A receptor regulates β -arrestin binding of the β 2-adrenergic receptor via heterodimerization. *Mol Cell Endocrinol.* **442**, 113–124.
301. Smith NJ, Milligan G. (2010) Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol Rev.* **62**, 701–25.
302. Carr R, Schilling J, Song J, Carter RL, Du Y, Yoo SM, Traynham CJ, Koch WJ, Cheung JY, Tilley DG, Benovic JL. (2016) β -arrestin-biased signaling through the β 2-adrenergic receptor promotes cardiomyocyte contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **113**, E4107-16.
303. Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SSG. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol.* **14**, 2040–53.
304. See HB, Seeber RM, Kocan M, Eidne KA, Pflieger KDG. (2011) Application of G protein-coupled receptor-heteromer identification technology to monitor β -arrestin recruitment to G protein-coupled receptor heteromers. *Assay Drug Dev Technol.* **9**, 21–30.
305. Christensen GL, Knudsen S, Schneider M, Aplin M, Gammeltoft S, Sheikh SP, Hansen JL. (2011) AT(1) receptor G α q protein-independent signalling transcriptionally activates only a few genes directly, but robustly potentiates gene regulation from the β 2-adrenergic receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **331**, 49–56.
306. Tóth AD, Prokop S, Gyombolai P, Várnai P, Balla A, Gurevich VV, Hunyady L, Turu G. (2018) Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins. *J Biol Chem.* **293**, 876–

- 892.
307. Kumari P, Srivastava A, Banerjee R, Ghosh E, Gupta P, Ranjan R, Chen X, Gupta B, Gupta C, Jaiman D, Shukla AK. (2016) Functional competence of a partially engaged GPCR- β -arrestin complex. *Nat Commun.* **7**, 13416.
 308. Kumari P, Srivastava A, Ghosh E, Ranjan R, Dogra S, Yadav PN, Shukla AK. (2017) Core engagement with β -arrestin is dispensable for agonist-induced vasopressin receptor endocytosis and ERK activation. *Mol Biol Cell.* **28**, 1003–1010.
 309. Zhang M, Turnbaugh D, Cofie D, Dogan S, Koshida H, Fugate R, Kem DC. (1996) Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension.* **27**, 269–75.
 310. Meszaros JG, Raphael R, Lio FL, Brunton LL. (2000) Protein kinase C contributes to desensitization of ANG II signaling in adult rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**, C1978-85.
 311. García-Caballero A, Olivares-Reyes JA, Catt KJ, García-Saínz JA. (2001) Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol.* **59**, 576–85.
 312. Nobles KN, Guan Z, Xiao K, Oas TG, Lefkowitz RJ. (2007) The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J Biol Chem.* **282**, 21370–81.
 313. Gimenez LE, Babilon S, Wanka L, Beck-Sickinger AG, Gurevich VV. (2014) Mutations in arrestin-3 differentially affect binding to neuropeptide Y receptor subtypes. *Cell Signal.* **26**, 1523–31.
 314. 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**, 9988–93.
 315. 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**, 1442–7.

316. Alfonzo-Méndez MA, Hernández-Espinosa DA, Carmona-Rosas G, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA. (2017) Protein Kinase C Activation Promotes α 1B-Adrenoceptor Internalization and Late Endosome Trafficking through Rab9 Interaction. Role in Heterologous Desensitization. *Mol Pharmacol.* **91**, 296–306.
317. 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**, 18302–5.
318. Gáborik Z, Szaszák M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, Clark AJL, Hunyady L. (2001) Beta-arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol.* **59**, 239–47.
319. Breitman M, Kook S, Gimenez LE, Lizama BN, Palazzo MC, Gurevich EV, Gurevich VV. (2012) Silent scaffolds: inhibition OF c-Jun N-terminal kinase 3 activity in cell by dominant-negative arrestin-3 mutant. *J Biol Chem.* **287**, 19653–64.
320. Pérez-Aso M, Segura V, Montó F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, D’Ocon P. (2013) The three α 1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* **1833**, 2322–33.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Tóth AD¹, Prokop S¹, Gyombolai P, Várnai P, Balla A, Gurevich VV, Hunyady L, Turu G. (2018)

Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins.

J Biol Chem, 293(3):876-892. **IF: 4,125**

¹ Társelsőszerzők.

Tóth AD, Gyombolai P, Szalai B, Várnai P, Turu G, Hunyady L. (2017)

Angiotensin type 1A receptor regulates β -arrestin binding of the β_2 -adrenergic receptor via heterodimerization

Mol Cell Endocrinol, 442:113-124. **IF: 3,754**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények:

Prokop S, Perry NA, Vishnivetskiy SA, **Toth AD**, Inoue A, Milligan G, Iverson TM, Hunyady L, Gurevich VV.

Differential manipulation of arrestin-3 binding to basal and agonist-activated G protein-coupled receptors.

Cell Signal, 36:98-107. **IF: 3,937**

Szakadáti G, **Tóth AD**, Oláh I, Erdélyi LS, Balla T, Várnai P, Hunyady L, Balla A. (2015)

Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation.

Mol Pharmacol, 87(6):972-81. **IF: 3,931**

Gyombolai P, **Tóth AD**, Tímár D, Turu G, Hunyady L. (2015)

Mutations in the 'DRY' motif of the CB1 cannabinoid receptor result in biased receptor variants.

J Mol Endocrinol, 54(1):75-89. **IF: 2,947**

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőimnek, Prof. Hunyady Lászlónak és Dr. Turu Gábornak szeretnék köszönetet mondani. Hunyady Profeszor Úr meghívására csatlakoztam még tudományos diákkörösként az általa vezetett laborba, majd örömmel folytattam munkát a doktoranduszi invitáció után. Folyamatos támogatását élvezhettem törekvéseimnek, és megfelelő körülményeket biztosított munkám magas színvonalú végzéséhez. Dr. Turu Gáborhoz bármikor fordulhattam kérdéseimmel, mindennapos szakmai és lelkitámasza nélkül ez a munka nem készülhetett volna el ebben a formában. Köszönöm Prof. Várnai Péternek, hogy megtanított a kritikus, tudományos szemléletű gondolkodásra, és hogy mindig a legmagasabb nívójú munkára ösztönzött. Köszönöm program-, és később doktori iskola vezetőmnek, Prof. Ligeti Erzsébetnek, hogy végig figyelemmel kísérte munkámat. Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Gyombolai Pálnak, aki bevezetett a receptorbiológia vizsgálatának világába diákkörös koromban, kitanított a kísérletezés fortélyaira, és későbbiekben már munkatársként értékes szakmai tapasztalataival támogatta munkámat. Külön köszönöm Dr. Szalai Bencének az értékes tudományos konzultációkat, melyek sokszor javították a kutatásaim minőségét. Hálával tartozom Dr. Prokop Susannának az együtt elvégzett munkáért, és hogy azóta is minden nap a jobb elérésére ösztönöz. Köszönöm volt és jelenlegi TDK hallgatóimnak, Dr. Laczkó Dávidnak, Aczél Dórának és Garger Dánielnek, hogy kérdéseikkel és érdeklődésükkel engem is tudományos motivációm fenntartására és fejlődésre sarkalltak. Köszönöm laborunk asszisztenseinek, Oláh Ilonának, Halász Eszternek és Szabolcsi Katának azt a temérdek mennyiségű háttérmunkát, amely nélkül ez a doktori értekezés nem készülhetett volna el. Köszönöm jelenlegi és volt munkatársaimnak, Dr. Balla Andrásnak, Dr. Erdélyi Lászlónak, Dr. Gulyás Gergőnek, Soltész-Katona Eszternek, Dr. Szakadáti Gyöngyinek, Dr. Tóth Dánielnek és Dr. Tóth Józsefnek az együtt eltöltött éveket, konferenciákat, élményeket, felszabadult légkört és jókedvet, ami a munkát is sokkal könnyebbé tette. Köszönöm Szilágyi Annának és Józan Jolánnak, hogy ügyes-bajos dolgaimmal bármikor fordulhattam hozzájuk. Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának az inspiráló környezetet, megtisztelő érzés, hogy részese lehettem ennek az egyedülálló tudományos műhelynek.

Hálával tartozom Johannes Backs Professzor Úrnak, hogy eltölthettem heidelbergi laborjában egy rendkívül hasznos és gyümölcsöző évet. Köszönöm Thomas Wieland Professzor Úrnak, hogy támogatásával biztosította az ott végzett munkámat.

Köszönöm Prof. Vsevolod V. Gurevich-nek kollaborációs támogatását, és a Journal of Biological Chemistry folyóiratban megjelent közlemény megírásában nyújtott temérdek segítségét. Az utóbbi közlemény az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-III-SE-23 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

Köszönöm családomnak, hogy mindvégig szeretettel biztosították támogatásukat céljaim eléréséhez. Végül köszönöm páromnak, hogy nemcsak szakmai, hanem lelki támaszom volt mind a nehéz, mind a boldog percekben.

13. Függelék

Társszerzők közötti munkamegosztás

A doktori értekezésben bemutatott kísérletek több kutatótársammal közösen végzett munka eredménye. Az egyes szerzőknek az eredményekhez való hozzájárulása a következőképp oszlott meg:

Az AT₁R és a β₂AR közötti kölcsönhatások vizsgálata

Tóth AD, Gyombolai P, Szalai B, Várnai P, Turu G, Hunyady L.

Angiotensin type 1A receptor regulates β-arrestin binding of the β₂-adrenergic receptor via heterodimerization, Mol Cell Endol 2017

A bemutatott kísérleteket én végeztem el. A heterodimerizáció kimutatására alkalmas módosított kvantitatív BRET méréseket Dr. Szalai Bence analizálta. A konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében Dr. Gyombolai Pál volt segítségemre. A β-arresztin pöttyök élettartamának analízisét Dr. Turu Gábor végezte. A cikk megírásában minden társszerző segédkezett. A projektet Dr. Hunyady László és Dr. Turu Gábor felügyelte.

Az inaktív AT₁R heterológ, β-arresztinen keresztüli szabályozásának vizsgálata

Tóth AD, Prokop S, Gyombolai P, Várnai P, Balla A, Gurevich VV, Hunyady L, Turu G.

Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β-arrestins, J Biol Chem 2018

A megjelent közleményben Dr. Prokop Susanne társelsőszerző, a dolgozatban be nem mutatott, viszont a cikkben közölt további eredmények az ő önálló munkájából születtek (J Biol Chem közlemény 3. ábra C panel és 4. ábra). A dolgozatban szereplő kísérleteket én végeztem el, melyek végrehajtásában segítségemre voltak Dr. Prokop Susanne (25. ábra C panel) és Dr. Gyombolai Pál (25. ábra B panel). Az adatok analízisében és a cikk megírásában minden társszerző részt vett. A projekt szakmai felügyeletét Dr. Vsevolod V. Gurevich, Dr. Hunyady László és Dr. Turu Gábor látták el.