

A CB₁ és a CB₂ kannabinoid receptorok működésének vizsgálata

Doktori értekezés

Soltész-Katona Eszter

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Bírálok: Dr. Sántha Péter, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Liliom Károly, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, DSc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Makara Judit, Ph.D., tudományos főmunkatárs

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

Budapest, 2022.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR-ok) általános jellemzése	7
2.2. G-fehérje kapcsolt receptor szabályozása	10
2.2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok	10
2.2.2. A β -arresztin fehérjék	11
2.2.3. A G-fehérje kapcsolt receptorok szelektív jelátvitele	15
2.3. Az endokannabinoid rendszer	20
2.3.1. Az endokannabinoid rendszer fiziológias jelentősége	22
2.3.2. Az endokannabinoid rendszer terápiás jelentősége	23
2.4. A CB ₁ receptorok	24
2.4.1. A CB ₁ receptorok jelátvitele	25
2.4.2. A CB ₁ receptorok szerepe a keringési rendszerben	26
2.4.3. A CB ₁ receptorok és más G-fehérje kapcsolt receptorok kapcsolata	28
2.5. A CB ₂ receptorok	30
2.5.1. A CB ₂ receptorok jelátvitele	30
2.5.2. A CB ₂ receptorok a szervezetben	30
2.5.3. A CB ₂ receptor polimorfizmusai	32
3. CÉLKITŰZÉSEK	33
4. MÓDSZEREK	35
4.1. A kísérletekben használt anyagok	35
4.2. Sejtkultúra és transzfekció	37
4.2.1. HEK 293T sejtvonal	37
4.2.2. Primer aorta simaizom sejtek	37
4.3. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések	38
4.4. Konfokális mikroszkópia és képanalízis	41
4.5. Precipitációs mérések	41
4.5.1. BirA - "közelségi jelölés"	41
4.5.1.1. Kísérleti felállások BirA biotin ligáz alkalmazása esetén	44

4.6. Glo szenzor próba	45
4.7. Western blot	45
4.8. Immunfestés és fluoreszcencia mikroszkópia	47
4.9. Kalcium-jel mérése	48
4.10. Miográfia	48
4.11. Nyomás-videó arteriográfia	49
4.12. Statisztikai analízis	50
5. EREDMÉNYEK	51
5.1. A CB ₁ receptor kapcsolata a G-fehérje kapcsolt receptorokkal	51
5.1.1. Primer aorta simaizom sejtek tenyésztése a CB ₁ receptor vizsgálatához	51
5.1.2. GFKR és a CB ₁ R parakrin transzaktiváció primer simaizom sejteken	51
5.1.3. A CB ₁ R gátlás hatásai GFKR agonista által kiváltott Ca ²⁺ jelre patkány aorta vaszkuláris simaizomsejteken	53
5.1.4. A CB ₁ receptorok hatása a GFKR-ok ingerlésével kiváltott PERK válaszra	55
5.1.5. A CB ₁ R antagonistá hatása a AT ₁ R ingerlésével kiváltott ér összehúzódásra izolált ér gyűrűkön	57
5.2. A CB ₂ receptor és polimorfizmusainak vizsgálata	63
5.2.1. A CB ₂ receptor és polimorfizmusainak kapcsolata β-arresztin2-vel és GRK fehérjékkel	63
5.2.2. A CB ₂ receptor és polimorfizmusainak G-fehérje kötés vizsgálata	69
5.2.3. A CB ₂ receptor és polimorfizmusainak intracelluláris eloszlása	70
5.2.4. A CB ₂ receptor és polimorfizmusainak hatása a receptor internalizációra	72
5.2.5. A CB ₂ receptorok szerkezeti változásai	74
6. MEGBESZÉLÉS	76
7. KÖVETKEZTETÉSEK	85
8. ÖSSZEFOGLALÁS	86
9. SUMMARY	87
10. IRODALOMJEGYZÉK	88
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	113
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

2-AG	2-arachidonil-glicerol
5HT _{2A}	szerotonin 2A receptor
7TMR	hét-transzmembrán receptor
α_1 -AR	α_1 -adrenerg receptor
α_o -Rluc	Renilla luciferázzal jelölt α_o heterotrimer G-fehérje alegység
Ach	acetilkolin
ACEA	arachidonil-2'-kloroetilamid
AEA	N-arachidonoil-etanolamin
AKT	proteinkináz B
Ang II	angiotenzin II
AM251	1-es típusú kannabinoid receptor inverz agonistája
AM630	2-es típusú kannabinoid receptor inverz agonistája
AMP	adenozin-monofoszfát
AT ₁ R	AT ₁ -es angiotenzin receptor
ATP	adenozin-trifoszfát
β ARK1	β_2 -adrenerg receptor kináznak
β -arr1	β -arresztin1
β -arr2	β -arresztin2
β -arr2-mVenus	Venus-szal jelölt β -arresztin2
β arr2Rluc	Renilla luciferázzal jelölt β -arresztin2
BAP	biotin akceptor peptid
BirA	biotin ligáz
BRET	biolumineszcens rezonancia energia transzfer
cAMP	3'-5'-ciklikus adenzin-monofoszfát

CB ₁ R	1-es típusú kannabinoid receptor
CB ₁ R-YFP	EYFP-vel jelölt CB ₁ -es kannabinoid receptor
CB ₂ R	2-es típusú kannabinoid receptor
CHO sejt	kínai hörcsög ováriumsejt
COX	ciklooxygenáz enzim
CXCR	kemokin receptor
DAG	diacil-glicerol
DAGL	diacil-glicerol lipáz
DMEM	Dulbecco által módosított összetételű Eagle médium
eCB	endokannabinoid
ECL 1-3	1-3 extracelluláris hurokrégió (<i>extracellular loop</i>)
ECR	endokannabinoid rendszer
EPAC	cAMP által közvetlenül aktivált cserefaktor (<i>exchange factor directly activated by cAMP</i>)
ERK	extracelluláris jel által regulált kináz
GABA	gamma-aminovajsav
GFKR	G-fehérje kapcsolt receptor
GAP	GTP-áz aktiváló protein (<i>GTPase-activating protein</i>)
GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor
GTP	guanozin-trifoszfát
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (<i>green fluorescent protein</i>)
GRK	G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz
FAAH	zsírsav-amid hidroláz
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
HEK-293 sejt	humán embrionális vesesejt

HRP	torma peroxidáz
ICL 1-3	1-3 intracelluláris hurokrégió (<i>intracellular loop</i>)
IP3	inozitol-triszfoszfát
ISO	isoproterenol, $\beta 1$ és $\beta 2$ -adrenerg receptor agonista
JNK	c-Jun N-terminális kináz
JWH-133	szelektív CB ₂ R agonista
JZL184	monoacil-glicerol lipáz gátló
ISO	izoproterenol
kDa	kilodalton
KO	knockout
LNA	N ω -nitro-l-arginin
M ₁ R	M ₁ acetil-kolin receptor
MAGL	monoacil-glicerol lipáz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MC4R	melanokortin-4 receptor
mVenus	monomer Venus
NADA	N-arachidonil-dopamin
NAPE	N-acil-foszfatidil-etanolamid
NAPE-PLD	NAPE - foszfolipáz D
NArPE	N-arachidonil-foszfatidil-etanolamin
NAT	N-aciltranszferáz
NO	nitrogén-monoxid
O2050	neutrális 1-es típusú kannabinoid receptor antagonist
OEA	oleo-etanol-amidamid
p38	p38 MAP-kináz
PERK	foszforilált extracelluláris jel által regulált kináz

PMSF	phenylmethysulphonyl fluorid
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP ₂	foszfatidil-inozitol-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLL	poli-L-lizin
PLC β	foszfolipáz C β
PLA	foszfolipáz A
PLC	foszfolipáz C
PVDF	poli-vinilidén-fluorid
Rluc	Renilla luciferáz
S.E.	<i>standard error</i>
Ser/Thr	szerin/treonin
THC	⁹ Δ -tetrahydrocannabinol
THL	tetrahidrolipstatin
YFP- β_1	EYFP-vel jelölt β_1 heterotrimer G-fehérje alegység
V ₂ R	V ₂ vazopresszin receptor
VSMC	vaszkuláris simaizomsejt (<i>vascular smooth muscle cell</i>)
Win55	WIN55,212-2 kannabinoid receptor agonista
YFP	sárga fluoreszcens fehérje (<i>yellow fluorescent protein</i>)
μ -OR	μ -opioid receptor

2. BEVEZETÉS

2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR-ok) általános jellemzése

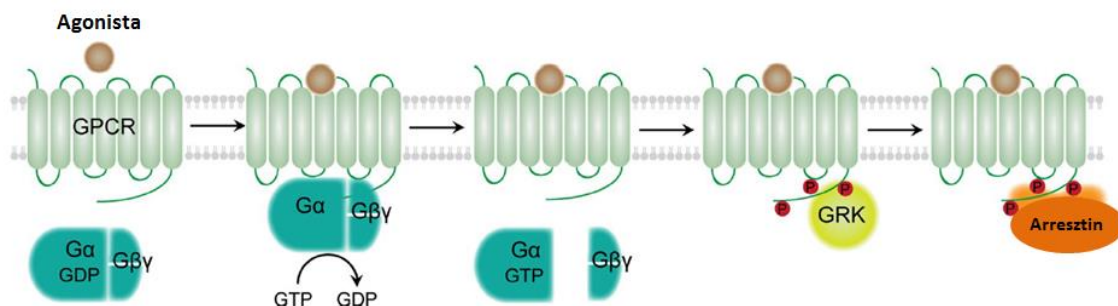
A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GFKR) alkotják az egyik legnagyobb fehérje családot az emberi szervezetben, legalább 800 gén kódolja az ebbe a családba tartozó receptorokat (1), és ezek a receptorok a gyógyszeres terápiák leggyakoribb célpontjai (2). A fény-, szag- és ízérzékelés, a szív működés és a vérnyomás rövid távú szabályozása, az idegsejtek közötti szinaptikus kommunikáció módosítása, vagy a gyomor-bélrendszeri elválasztási funkciók szabályozása, mind magában foglalja a GFKR funkciókat (3).

A legtöbb GFKR osztályozási rendszer jellemzője, hogy a receptorokat strukturális hasonlóságuk alapján osztályozzák. A struktúra meghatározása az elmúlt három évtized kutatásainak köszönhetően sokat javult, mivel egyre több receptor kristályszerkezetét fedezték fel. Az első azonosított GFKR kristályszerkezet a szarvasmarha fotoreceptor rodopszin volt (4). Később meghatározták a $\beta 2$ adrenerg receptor ($\beta 2AR$) kristályszerkezetét a receptor ligandhoz kötött, aktív formájában, vagyis amikor a receptor a G-protein α -alegységével komplexet képez (5,6). A szekvencia homológia alapján a GFKR-okat öt családba sorolhatjuk: A-osztály: a rodopszin-szerű receptorok, B-osztály: a szekretin-szerű receptorok, C-osztály: a metabotróp-glutamát-szerű receptorok, továbbá az adhézis GFKR-ok és a "Frizzled/Smoothed" receptorok családja (7).

Szerkezetüket tekintve hét α -helix transzmembrán domént tartalmaznak, amelyeket egyenként felváltva három extracelluláris és intracelluláris hurok köt össze (ICL1, ECL1, ICL2, ECL2, ICL3, és ECL3). A receptorok N-terminális vége legtöbbször az extracelluláris oldal felé tekint, még a C-terminális régió a citoplazmatikus térben helyezkedik el. A GFKR-ok ligandjait agonista, inverz agonista és antagonisták csoportokba sorolják. A GFKR-okhoz kötődő agonisták elősegítik az aktív konformációt, ami elindítja a jelátvitelt. Ezzel szemben az inverz agonisták gátolják a spontán bazális jelátviteli aktivitást azáltal, hogy stabilizálják a GFKR-ok inaktív konformációját. Az antagonisták nincsenek hatással a GFKR-ok aktív és inaktív konformációi közötti dinamikus egyensúlyra, de megakadályozzák mind az agonisták, mind az inverz agonisták kötődését (8).

A ligandkötés után az aktivált GFKR-ok heterotrimer G fehérjéhez (GTP-kötő fehérje) kötődnek. Különböző tanulmányok azt találták, hogy az ICL2, valamint az ICL3 N- és C-terminális régiói a G-fehérjével kölcsönhatásba lépő régiók a receptorokon. Ezenkívül az ICL1 és néhány C-terminális aminosav hozzájárulhat a G-fehérjék kapcsolódásához (9). Az extracelluláris régióban a ligandkötés szerkezeti átrendeződést indukál a transzmembrán magrégióban, ami további konformációs változashoz vezet citoplazmatikus oldalon az intracelluláris régióban. Ez teszi lehetővé a kölcsönhatást az intracelluláris oldalon lévő effektorokkal, például a G-fehérjékkel. Az agonista kötődés önmagában nem elegendő a GFKR-ok teljesen aktív konformációjának stabilizálásához, ehhez további intracelluláris fehérjére van szükség, például G-fehérjére vagy β -arresztin kötődésre a citoplazmatikus oldalon (10).

A G-fehérjék két funkcionális egységből állnak, egy guanin nukleotid-kötő α alegységből és egy $\beta\gamma$ dimerből. Inaktív állapotot az α alegység GDP-t köt és a két egység összekapcsolódva, heterotrimerként van jelen. A receptor aktiválásakor a G-fehérje konformáció változáson megy át, így az α alegység képes lesz GTP kötésére, miközben az alegységek disszociálnak. Összesen jelenleg 21 $G\alpha$, 6 $G\beta$ és 12 $G\gamma$ alegységet különböztetünk meg, melyek kombinációi különböző heterotrimer komplexeket hoznak létre, hozzájárulva a GFKR-ok és az effektor rendszereik specifikusságához (11). A szekvencia-homológia alapján a $G\alpha$ alegységeket négy családba sorolják: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ és $G\alpha_{12/13}$. Mindegyik $G\alpha$ izoformának különböző funkciói vannak, különféle sejten belüli válaszokat generálnak számos másodlagos hírvivő rendszeren keresztül. A $G\beta\gamma$ alegységnek is jelentős szerepe van a jelátvitelben, közvetlenül kapcsolódik több effektor molekulához (12), és fontos funkciója többek között a K^+ -csatornák aktiválása, a Ca^{2+} -csatornák gátlása és a $PLC\beta 2$ aktiválása (13).



1. ábra GFKR-ok kezdeti jelátvitelének sematikus ábrázolása: Az agonista által aktivált GFKR-ok kölcsönhatásba lépnek a G-fehérjékkel, és ez a kölcsönhatás indukálja a guanidin-difoszfát (GDP) felszabadulását. A G-fehérje üres nukleotid kötő zsebet ezután gyorsan elfoglalja a guanidin-trifoszfát (GTP), ami a $G\alpha$ alegység disszociációját eredményezi a receptortól és a $G\beta\gamma$ alegységektől. Az aktivált GFKR-at ezután foszforilálják a GRK fehérjék, majd a foszforilált receptorokhoz β -arresztin molekula kötődik. Forrás: (14) alapján módosítva.

A legtöbb G-fehérjéhez kapcsolt receptor az aktiválást követően foszforilálódnak, homológ deszenzitizáció esetén a foszforilációt a G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK) végzik (15,16) (1. ábra). Ezután a receptorok bizonyos mértékű internalizáción mennek keresztül, amely szerepet játszik a receptorok deszenzitizációjában, valamint az internalizált receptorok olyan új jelátviteli partnerekkel találkozhatnak, amelyek nem lennének hozzáférhetőek ha a receptorok még a plazmamembránon helyezkednének el (17).

A receptorok internalizációjának legjobban vizsgált formája a klatrin által közvetített endocitózis, amelyet sokféle receptornál megfigyelhetünk, nem csak GFKR-oknál, hanem például tirozin-kináz receptoroknál, vagy a transferrin receptornál is. Bár a klatrinnal bevont gödrök kialakulása és a dinamin toborzás az endocitotikus folyamatok közös jellemzői, a különböző típusú receptorok különböző adapterfehérje-készleteket használnak, és a membrán foszfolipideknek fontos szerepe van. AT_1 receptort vizsgálva azt találták, hogy a receptorok klatrinnal bevont gödrökbe való bejutása, valamint a β -arresztin2-vel való kapcsolata nem függ a $PtdIns(4,5)P_2$ -től (PIP_2), de a klatrinnal burkolt gödrök érése és lefűződése nem következik be e foszfolipid nélkül (18). Érdekes tény, hogy az imént ismertetett folyamaton kívül ma már több mint 30 példa van a GFKR-okra, amelyek a β -arresztintól függetlenül internalizálódnak (19).

Az endocitózis után a receptoroknak alapvetően kétféle sorsuk lehet, lizoszómákba kerülnek és ott lebomlanak, vagy a gyorsan/lassú reciklizáló endoszómákon keresztül újra kijutnak a plazmamembránba. Lebomlás esetében a sejt teljes receptor száma csökken. Az újrahasznosítás során a az endoszómák alacsony pH-ja miatt a ligandok leválnak a receptorokról, és a receptort fehérje-foszfatazok defoszforilálják. Ezen, reszenzitizációnak nevezett folyamat során receptor újra érzékennyé válnak, vagyis képes ismét reagálni a stimulusukra (20).

2.2. G-fehérje kapcsolt receptor szabályozása

2.2.1. A G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok

A β_2 -adrenerg receptor (β_2 AR) klónozásával kiderült, hogy a β_2 AR hasonló szerkezetű mint a rodopszin fehérje hét transzmembrán régiója. Nem sokkal e felfedezése után azt is felismerték, hogy a β_2 AR hasonló foszforiláción megy keresztül, mint a rodopszin, és ezért a módosításért felelős kinázt β_2 -adrenerg receptor-kináznak (β ARK1) keresztelték el, majd átnevezték G-fehérjéhez kapcsolt receptor-kináz 2-re (GRK2) (21). Később két különálló vizuális receptor-kinázt azonosítottak, valamint további öt nem vizuális GRK-t. A hét transzmembrán receptorok foszforilációjában elsődleges fontosságú fehérjék a GRK fehérjék, amiket az emberi genomban 7 gén kódol (GRK1-7). A GRK-k felismerik az agonista által kiváltott konformációs változást, így az aktivált receptorokat képesek foszforilálni a megfelelő aminosavakon (22,23). Más foszfokinázokkal ellentétben a GRK-k ligandfüggő módon aktiválódnak a receptorral történő kölcsönhatásakor (24). Ezek után tud a β -arresztin két lépésben a receptorhoz kötődni. Először a receptor C-terminálisához köt, majd az ennek hatására létrejövő strukturális változások miatt az ujj hurok is beköt a receptor hélixei közé, arra a helyre ahová a G-fehérje is kötődne. Tehát mondhatjuk hogy a GRK-k kooperálnak a β -arresztinnel a GFKR-okkal létrehozott kötésben, bár ennek vizsgálata igen nehézkes, mivel a GRK-ok csak átmenetileg lépnek kapcsolatba a receptorokkal, sőt sokszor ubiquitinált formában is jelen vannak és létezik többféle splice variáns is egyidejűleg a sejtekben. A rendszer bonyolultságát tovább árnyalja hogy a GRK-k nemcsak a receptorok C-terminálisát, hanem bizonyos esetekben más citoszólikus régiót is foszforilálhatnak (25,26).

A receptorokat a GRK fehérjék különböző módon foszforilálják, és ez okozhatja a további jelátviteli különbséget, ezt számos tanulmány megmutatta V₂R, CXCR4, AT₁R esetében, amikor a GRK6 és a GRK5 indukálja a β -arresztin általi ERK aktivációt, míg a GRK2 vagy a GRK3 gátolja azt (27–29). Azoknál a GFKR-nál ahol több foszforilációs kód is jelen van, az adott kód GRK-k általi specifikus foszforilációja meghatározhatja a β -arresztin kötődés pozícióját (30).

2.2.2. A β -arresztin fehérjék

Az arresztinek citoszolikus adapter fehérjék, amelyek képesek kötődni a transzmembrán fehérjékhez, többek között a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokhoz. A gerinceseknek négy arresztin génje van: S-arresztin (arresztin-1, SAG), arresztin-C (arresztin-4, ARR3), β -arresztin1 (arresztin-2, ARRB1) és β -arresztin2 (arresztin-3, ARRB2) (31). Az arresztin-1 és 4 fehérje expressziója a vizuális rendszerre korlátozódik, míg az arresztin-2 és 3 az egész testben expresszálódik. Az arresztin-2-t és a 3-at β -arresztin1-nek és β -arresztin2-nek is nevezik, mivel először azokat a fehérjéket azonosították, amelyek szabályozzák a β_2 -adrenerg receptor szignalizációt, innen származik a β előtag az elnevezésben (32).

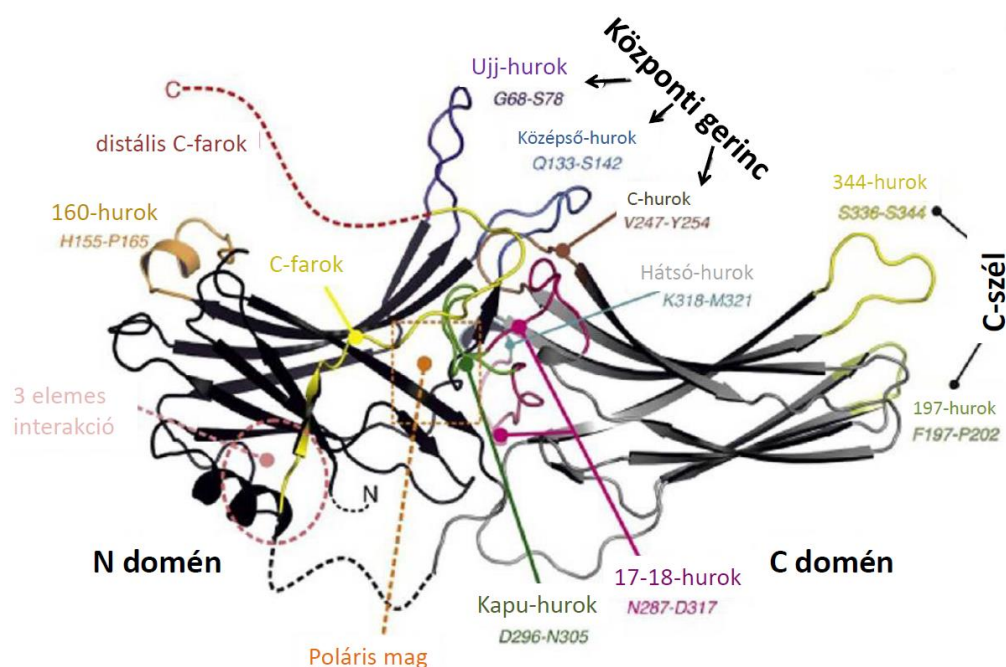
Bár a β -arresztin1 vagy a β -arresztin2 egyszeres knockout egerek életképesek és akár egészségesek is lehetnek, a kettős knockout egerek, amelyekben nincs egyik β -arresztin sem jelen, már embrió korban elpusztulnak (33). Ez azt jelzi, hogy bár a két izoforma jelentős mértékű funkcionális kompenzációt mutat, helyettesíthetik egymást, de összességében a jelenlétük kulcsfontosságú a sejtfunkciókban.

A GFKR-ok túlnyomó többsége deszenzitizálódik β -arresztin molekula kötése után, vagyis csökken a ligand iránti érzékenységük. Homológ deszenzitizáció esetében az agonistához kötött receptor C-terminálisát a GRK fehérjék foszforilálják, ez a folyamat kiváltja az β -arresztinek receptorhoz történő toborzását (23). Fontos viszont megjegyezni, hogy a receptorok foszforilációját nem csak egyedül a GRK-k közvetítik. Régóta ismert, hogy mind a PKA, mind a PKC foszforilálja a GFKR-t, ha az adott receptor rendelkezik a kináz konszenzusos foszforilációs szekvenciájával (34), ennek a foszforilációnak a következménye a heterológ deszenzitizáció. Mivel a arresztin részben a receptor G-fehérje kötőhelyére kapcsolódik, kötődésével meggátolja a receptor G-fehérje kötését és

aktiválását. A receptorok deszenzitizálása és internalizálása mellett a nem vizuális arresztin fehérjék a sejt több jelátviteli folyamatában is szerepet játszanak, állványfehérjeként is működnek, ekképpen széleskörű jelátviteli folyamatokat indítanak el, például a mitogén-aktivált protein-kinázt (MAPK) jelző útvonalakat, beleértve az ERK1/2, p38, és c-Jun N-terminal kináz-3 fehérjéket, továbbá az c-Src kináz család tagjait, vagy az Akt-ot, PI3 kinázt, és RhoA fehérjéket (31). Az arresztinek ily módon a sejtes folyamatok rendkívül széles skáláját szabályozzák, beleértve a sejtek migrációját, proliferációját, differenciálódását és apoptózisát is, a sejtek növekedését, illetve szerepet játszanak a túlélési jelekben. Feltételezhető tehát, hogy az állványfunkciók manipulálása előnyös lehet akár gyulladásos betegségek, vagy fibrózis és rák esetén is (35). A β -arresztinek úgy is befolyásolják a sejtek növekedését, a sejtek apoptózisát vagy általában az immunfunkciókat, hogy a citoplazmában lévő transzkripciós faktorokat, például $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ szabályozzák, vagy képesek ők maguk is transzlokálódni a citoplazmából a magba, ahol különböző transzkripciós kofaktorokkal asszociálódva, közvetlenül modulálják a sejt tulajdonságait (36). De β -arresztinekre van szükség az internalizált GPCR-ok újrahasonosításához is (37).

Az elmúlt évek intenzív kutatásának köszönhetően a β -arresztinek kristályszerkezete mára teljesen feltérképezésre került. Az β -arresztin1 és a β -arresztin2 aminosav-szekvenciája 80% -ban megegyezik, különbségüket leginkább a C-terminálisukon található különböző aminosavak okozzák. Körülbelül 48-50 kDa méretű fehérjék, amelyek két doménből, főleg β -redőkből állnak. Ezeket N- és C-doméneknek nevezzük, „hég”/”csésze” szerű struktúrák. Ezt a két domént egy 10-12 aminosavból álló rövid összekötő régió, pánt („hinge region”) kapcsolja össze. A két domén találkozásánál található a fehérje központi gerince, melyben az aktív receptor kötéséért felelős hurkok találhatóak: az ujj-hurok („finger loop”), a középső-hurok („middle loop”), C-hurok („C-loop”) és a kapu-hurok („gate loop”) (2. ábra). Ebben a gerincben az N és C domének között helyezkedik el, a poláris magot tartalmazó régió, amely felelős az arresztinek inaktív konformációjának stabilizálásáért (38). Ezenkívül a poláris mag feladata, hogy a két domént összetartsa egy központi sóhíd és egy hidrogén hálózat segítségével (39,40). Amikor az arresztin kötődik a receptorokhoz, a kötődése kiszorítja az arresztin C-terminális végét, destabilizálja a poláris magot, elősegítve ezzel az arresztin konformációs átrendeződését, amely lehetővé teszi a nagy affinitású receptor kötést (41) (42).

A β -arresztin-kötést gyakran két külön lépésben tárgyalják. Először is a β -arresztin csak egy alacsony affinitású komplexet képez a receptorral, amelyben a receptor foszforilált C-terminálisa taszítja az arresztin savas C-farkát, és ezáltal hozzáfér az N-domén több bázikus csoportjához. A C-farok elmozdulása konformációs változásokat és domén mozgásokat idéz elő a β -arresztinben, amelyek lehetővé teszik a második kötési lépést, ami már a receptor szoros kötődését jelenti, és így egy nagy affinitású komplex jön létre. Továbbá a β -arresztin olyan szögben kötődik a receptorhoz, ami azt sugallja, hogy az β -arresztin C-széli hurkai is fontosak, kölcsönhatásba léphetnek a plazmamembránnal, amit nemrégiben kísérletileg is megerősítettek (43). A C-farok elmozdulása eltávolítja az arginint (R175 az arresztin-1-ben és R169 az arresztin-2-ben), és ezáltal felborítja a töltési egyensúlyt a poláris magban, a kapu hurokban eltolja, eltaszítja a savas aminosavakat (D296 – N305). Ez valószínűleg hozzájárul a kapu hurok N-domén felé fordulásához. A kapu hurok mozgása pozitív töltésű rést nyit az N-domén oldalán, amely a receptor foszforilált C-terminálisának feltételezett kötési helye. Néhány kísérlet azt sugallja, hogy a kapu hurok mozgását és a poláros mag további felbomlását csak az aktív receptor idézi elő. Ezek szerint a kezdeti alacsony affinitású komplexben a receptor foszforilált C-terminálisa még nem tud hozzáférni a β -arresztin N-doménjének pozitív töltésű hasadékjához, és feltételezhető, hogy ekkor még csak az N-domén homorú részén lévő pozitív töltésű aminosavakhoz kapcsolódik (44). Egy 2018-as tanulmányban munkacsoportunk kimutatta, hogy a β -arresztin2 képes megkötni a második messenger kináz által foszforilált, de inaktív AT₁ angiotenzin receptorokat is. Megállapították, hogy ez a kölcsönhatás a receptor C-terminálisában lévő foszforilált szerin/treonin-klaszterektől és a β -arresztin2 N-doménben lévő két konzervált foszfátkötő lizintől függ. A szerzők ezt stabilitási zárnak nevezték. Ez a szerkezet felelős a GFKR-ok és a β -arresztinek közötti a tartós kötésért (45,46). Feltételezhető, hogy létrejöhet ilyen stabil kapcsolódás más, nem receptor fehérjékkel is.



2. ábra: Arresztin molekula általános szerkezete: Forrás: (47) alapján módosítva.

Az elmúlt években különböző GFKR-arresztin komplexek részletes és egymástól eltérő szerkezetéről számoltak be (14). A feltárt változatosság megmutatja, hogy a GFKR-ok és az arresztinek közötti interakció milyen dinamikus és sokszínű. A legújabb kristályszerkezeti vizsgálatok azt találták, hogy a β -arresztin1 maximális kötődése az M2 muszkarin receptorral nemcsak a receptor foszforilációját igényli, hanem a β -arresztin1 C-terminálisának és a plazmamembránnak a kölcsönhatását is. (48) (49). Egy másik tanulmányban a β -arresztin2 2,3-Å kristályszerkezetét a CXCR7 receptor karboxi-terminálisából származó foszfopeptiddel (C7pp) komplexben hozták létre, a C7pp-hez kötött β -arresztin2 strukturális elemzése kulcsfontosságú különbségeket tár fel a β -arresztin1 korábbi ismert aktív konformációjától. Az egyik legfontosabb különbség a C7pp-hez kötött β -arresztin2 rotációja a domének között (50). Korábbi vizsgálatokból úgy tűnt, hogy bár a β -arresztin domének magjában lévő eredeti struktúrák valószínűleg nem változnak jelentősen az aktiváció során, a domének mozgásának mértéke és a hurkok rugalmassága megváltoztathatja a β -arresztint annyira, hogy különböző aktivációs konformációkat vegyen fel, mondhatni a molekula önmagát alakítja az interakciós partnerekhez. Így válik lehetségessé, hogy több száz féle GFKR-hoz csupán 2 (4) arresztin molekula kötődik, és képes azokat szabályozni, arról nem is beszélve, hogy az

egyes receptorok is ligand függően különböző konformációt vesznek fel (51). 2019-es tanulmányban strukturálisan sikerült bizonyítani hogy a GFKR-ok foszforiláció függő mintázatai befolyásolhatnak egyes arresztin funkciókat anélkül hogy más funkciókat érintenének. Például a GFKR-hoz anélkül is kötődhet az arresztin - meggátolva a G-fehérje jelátvitelt -, hogy a saját konformációjában olyan változások jönnének létre melyek korábbi elképzelések szerint feltétlen beindítják az arresztin függő jelátvitelt. Továbbá az arresztin egyes régióinak konformációs változása egymástól függetlenül is létrejöhethet, ezzel is növelve a molekula sokszínűségét, és a lehetséges kötődő fehérjepartnerek variabilitását (52).

2.2.3. A G-fehérje kapcsolt receptorok szelektív jelátvitel

Többen bizonyították, hogy a különféle GFKR agonisták a G fehérje aktiválása helyett képesek szelektíven aktiválni specifikus jelátviteli kaszkádokat. Ezt a jelenséget „bias (elfogult) agonizmusnak” vagy „jelátvitel szelektív agonizmusnak” nevezik, amely különböző fiziológiai válaszokat vált ki (53,54). Korábban általános egyetértés volt abban, hogy az jelátvitel-szelektív agonizmus alapja a ligand-specifikus változás a GFKR konformációjában (55). Egészen a közelmúltig, az volt a klasszikus nézet, hogy egy adott ligand hatása (vagy adott gyógyszer hatékonysága) abból fakad, hogy ezek különböző hatékonysággal toborozzák a további jelátviteli fehérjéket, például a β -arresztint vagy a G-fehérjéket. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a ligandum-receptor komplexek konformációs különbségei a transzducerekre is áterjednek. A β -arresztin esetében a létrejövő konformációs változások befolyásolják a további fehérjékkel való interakciót. A G-fehérje esetében ezek a változások befolyásolják a GTP-kötés sebességét, valamint a G-fehérje receptorokkal komplexben töltött idejét, és így a receptorok G-fehérje forgalmát, ezáltal modulálva a lefelé irányuló jelátvitel aktiválását (56). Továbbá a GFKR – β -arresztin kölcsönhatás függ a receptorok konzervált motívumain végbemenő foszforilációjától, amely történhet akár GRK-kal, akár más kinázokkal (29).

Több mint egy évtizeddel azután, hogy leírták a β -arresztin receptorok internalizációjában és deszenzitizációjában betöltött szerepét, megszülettek azok a publikációk, melyek a receptorok jelátvitelében betöltött szerepükről szólnak. Kiderült,

hogy a β -arresztinek feladata nemcsak a GFKR-ok aktiválása után megszüntetni a G-fehérje jelátvitelt, hanem új jelátviteli útvonalakat is indítanak (57). A receptorral történő kapcsolódásuk szerkezeti átrendeződéseket indukál, ezáltal aktiválódnak és további jelátviteli molekulák megkötésére lesznek képesek. Így válnak a β -arresztinek állvány fehérjékké és jelátviteli csomópontokká. Közelebb hoznak a receptorhoz különböző kinázokat, foszfatázokat, amelyek együttesen szignáloszómákat képeznek, ezzel a közelséggel lehetőség adódik egyes fehérjék aktivációjára, míg más effektor fehérjéket pedig éppen a megkötés gátolja meg funkciójuk betöltésében. A szignáloszómák azért is fontosak, mert még jóval a receptorok aktiválása után is késleltetett sejtes válaszokhoz vezetnek.

Újabb biolumineszcenciás rezonancia energiatranszfer (BRET) alapú és fluoreszcens rezonancia energiatranszfer (FRET) alapú tanulmányok konformációs bioszenzorokat használva a specifikus G-fehérje aldomeéket (58) vagy a β -arresztineket vizsgálatára (59) kiderítették, hogy a konformációs különbségek a ligand-receptor komplexekben a későbbi átalakító lépésektől is kialakulnak, vagyis a transzducer visszahat a receptor ligand kötő lehetőségeire. Például a β_2 -receptor esetében ha nincs jelen a G_s fehérje, akkor még a leghatékonyabb teljes agonisták sem képesek a receptort az aktív konformációban stabilizálni (60).

Az jelátvitel-szelektív agonizmus molekuláris alapja, vagyis a ligand által specifikusan aktivált jelátviteli út létrejötte számos tényezőtől függ. Nem csak a ligand és a receptor közötti bimolekuláris kölcsönhatásra kell gondolni, ami elősegíti a specifikus receptor konformációt majd az adott G-fehérje, β -arresztin és más jelátviteli molekulák kötődését. A G-fehérjék, a β -arresztinek és a többi jelátviteli partner sztöchiometriai aránya is befolyásolja, hogy egy adott receptor-konformáció milyen mértékben aktiválja őket. Így egy jelátviteli partner magas expressziója ennek az útnak a preferenciális aktiválódásához vezethet, még akkor is, ha a receptor konformáció valamivel alacsonyabb affinitással rendelkezik iránta. Ezek a sztöchiometriai arányok meghatározzák a rendszer jelátvitel-szelektivitását. Azt is meg kell említeni, hogy a G-fehérjék és a β -arresztinek sztöchiometriai arányai egy adott sejttípusban vagy akár a szövetben különféle fiziológiai vagy kóros tényezőkkel módosíthatók. Ezek a hatások mind meghatározzák a dinamikus jelátvitel-szelektivitást (61).

Ha a későbbi jelátviteli fehérjéket tekintjük, akkor érdekes példa a V₂R, mely receptor esetében sikerült kimutatni a β -arresztin2-függő ERK választ (62). Fontos megjegyezni, hogy az ezen az úton aktivált ERK több tulajdonságában is különbözik a G-fehérje-függő ERK aktivációtól. Például a két útvonal időben elkülönül egymástól, a β -arresztin mediált aktivációban az ERK foszforiláció később lesz maximális, mint a G-fehérje függő úton. Valamint térben is más változások történnek. A G-fehérje aktivált ERK a sejtmagba is bejut, és ott aktiválja például az Elk-1 vagy a c-Fos transzkripciós faktort, míg a β -arresztin-függő módon aktiválódott ERK a β -arresztin kötése miatt a citoplazmában marad (63). A citoplazmában jelen lévő foszforilált ERK jelentősége többek között a sejtváz kialakításában, valamint a vezikuláris transzport szabályozásában van (31). Az ERK aktiváción túl a β -arresztinek képesek a foszfatidil-inozitol-3-kinázt (PI3K) szabályozni. Ismert hogy a PI3K-AKT útvonal fontos a sejt apoptotikus funkciói során, a sejtciklus előrehaladásában és a sejtosztódás, a sejtnövekedés szabályozásában (64). A kis G-fehérje Rho GTPázok közé tartozó RhoA működésére is hat a β -arresztin függő aktiváció, így befolyásolva az aktin-citoszkeleton átrendeződést és a kemotaxis irányítását (65). A β -arresztineknek továbbá szerepük lehet a transzkripció szabályozásában (66), gondoljuk arra hogy a β -arresztin1 egyaránt megtalálható a citoplazmában és a sejtmagban is, több gén promóter régiójához is kapcsolódhatnak. Bizonyított például, hogy az NF κ B transzkripciós faktor inhibitor molekuláját (I κ B) képes stabilizálni, így gátolva a további jelátvitelét (67).

A sejtszignalizációban betöltött sokféle szerepüknek megfelelően a β -arresztinek funkciói számos patofiziológiai állapotban és betegségben szerepet játszanak. Az elmúlt évtizedben több betegségben tulajdonítottak jelentőséget a β -arresztineknek, mint például az autoimmun encephalomyelitis, az asztma, a reumás ízületi gyulladás, a gyulladásos bélbetegség, az epeúti cirrhosis, a miokardiális infarktus, a tüdőfibrózis, a cisztás fibrózis (68). Ezek tükrében is érthető, hogy a kutatásoknak sokszor célja a β -arresztin szelektív aktiválásának kidolgozása. Például az AT₁R esetében a vizsgálatok arra utalnak, hogy a β -arresztint aktiváló peptid ligand TRV027, mely bár nem indítja el a G_{q/11}-fehérje jelátvitelt, több kináz útvonalat is aktivál, beleértve az ERK, src és endotheliális nitrogén-oxid szintáz foszforilációját. Hasonlóan az AT₁R blokkolókhöz csökkentik a vérnyomást, viszont ellentétben a már használt gyógyszerekkel csökkenti a szisztémás érellenállást és javítja a szívteljesítményt azáltal, hogy növeli a szív kontraktilitását és fenntartja a

verőterefogatot (69,70). Ugyanakkor egy klinikai fázis II tanulmány (71) kudarcot vallott, hiába tűnt úgy számos kísérletes munkában (72,73), hogy egy hatékony jelátvitel-szelektív agonistáról van szó.

Már egy évszázada ismert, hogy a morfin (mely egy G-fehérje szelektív agonista) csökkenti a fájdalmat, de könnyen toleranciát okoz, emellett székrekedést és légzési elégtelenséget. Klinikailag is elfogadott, jelátvitel-szelektív elfogult agonizmuson alapuló hatékony gyógyszerjelölt volt az oliceridin (korábbi nevén TRV130), egy μ opioid receptor agonistának gondolt vegyület (74), mely robusztus G-fehérje aktivációt mutat. Hatékonysága hasonló a morfinéhoz, de jóval kevésbé vált ki β -arresztin toborzást, erős fájdalomcsillapítóként hatott egerekben és patkányokban, de kevesebb gasztorintesztinális és légzési diszfunkciót okozott a morfinével is megegyező fájdalomcsillapító dózisban. Egy klinikai fázisú vizsgálat megerősítette, hogy az oliceridin egy a betegek számára is megfelelő, erős fájdalomcsillapító gyógyszer, bár a krónikus kezelés hatásait a rövid távú vizsgálatokban még nehéz megjósolni. Természetesen folytatódnak a kutatások más megközelítéssel is. A μ opioid receptor kristályszerkezetéből kiindulva 3 millió molekulát dokkoltattak a receptorhoz ahhoz, hogy találjanak egy olyan molekulát, amely szelektívebben aktiválja a G-fehérjét (75). Az is nehézséget okoz az jelátvitel-szelektív ligandok keresésénél, hogy vajon valóban egy teljesen szelektív agonistát találunk-e, mint ahogy azt nagyon sok összefoglaló cikk is említi az oliceridin esetében, amit az utóbbi években már parciális agonistaként tekintünk (76,77). Összességében tehát ha funkcionális szelektív aktivitásról beszélünk, a transzlációs értéket *in vivo* vizsgálatok nélkül nehéz megjósolni.

Az igazi elfogult agonizmus és a rendszerfüggő elfogultság megkülönböztetése - például részleges agonizmusként - több okból is fontos. Az egyik ilyen ok például, hogy az elfogult agonisták kivételes eszközként szolgálnak a receptor konformációk vizsgálatában, elkülönítve az agonista indukált és a transzducer indukált konformációkat. Érdekes példa erre az AT_1R , melynek vizsgálatakor kiderült hogy a GFKR-ok nem feltétlen G-fehérje irányába szignalizálnak hanem ugyanolyan fontos az GRK/arresztin interakció is (78).

Az jelátvitel-szelektív agonisták felfedezése több szempontból sem egyszerű feladat. A kóros állapotok módosíthatják a sejtek működését, beleértve receptorok lokális

környezetének megváltoztatását is, megváltozhat akár a plazmamembrán összetétele is. De például a hipoxia, a pH változás, vagy a gyulladásos folyamatok okozta redox változások is megváltoztathatják a sejtes környezetet, és ezáltal a lehetséges ligand hatásokat. És ha a vizsgált GFKR gyógyszer válasza ezen megváltozott körülmények miatt módosul, például más további jelátalakítót aktivál, akkor tévesen mondhatjuk egy adott ligandról, hogy annak szelektív hatása van.

A hatékony gyógyszerek fejlesztéséhez és a transzlációs sikerhez figyelembe kell venni a populáción belüli genetikai varianciát az adott receptor szekvenciákban (polimorfizmusok), valamint a receptorok expressziójának változékonyságát az egyének között. Számos tanulmány vizsgálta a receptor polimorfizmusok funkcionális hatását, beleértve az eltérő agonista válaszokat (79,80). Az ilyen vizsgálatok létjogosultságát mutatja egy nemrég készült tanulmány, mely átfogóan elemezte 68496 egyén genom szekvenciáját. Az találták, hogy számos GFKR melyeket szükséges esetén már terápiásan befolyásolhatunk, bizony jelentős mértékű genetikai varianciát mutat, mind a ligand kötő régióban, mind a transzducer kötő régióban (81). Ha a ligand kötő zseb környékén van az aminosav változás, ami az adott receptor variánst létrehozza, akkor lehetséges, hogy egy ismert antagonistá vagy parciális agonistá a polimorfizmust hordozó egyénben teljes agonistaként fog működni. Például a kemokin A receptor egyik polimorfizmusában a ligand kötés után a transzducer kötődés teljesen megváltozott, a vad típusú receptorhoz képest, valamint a CXC-kemokin receptor 4 esetében azt találták (82), hogy a genetikai variáció megváltoztathatja a receptor kötődését a β -arresztinekhez, így megváltoznak a további jelátvitel hatásai. Hasonló változás a vazopresszin receptoroknál is megfigyelhető, ahol a R137H mutáció, amely familiáris nephrogén diabetes insipidus-szal társul, konstitutív, β -arresztin által közvetített deszenzitizációt indukál (83). Ha megérjük és jellemezzük az emberi populációban elterjedt receptor változatokat és figyelembe vesszük ezeket az ismereteket, akkor az új gyógyszerek klinikai tesztelésének próbáin kevesebb problémába futunk bele, ami idő és költséghatékony, valamint számos ember szenvedését mérsékli.

Látható hogy a szelektív jelátvitel igen összetett kérdéskör, de az elfogult hatékonyságú ligandok hasznos indikációkat nyújthatnak a racionális gyógyszertervezésben. Valójában az elfogult hatékonyságot a ligandok szerkezete

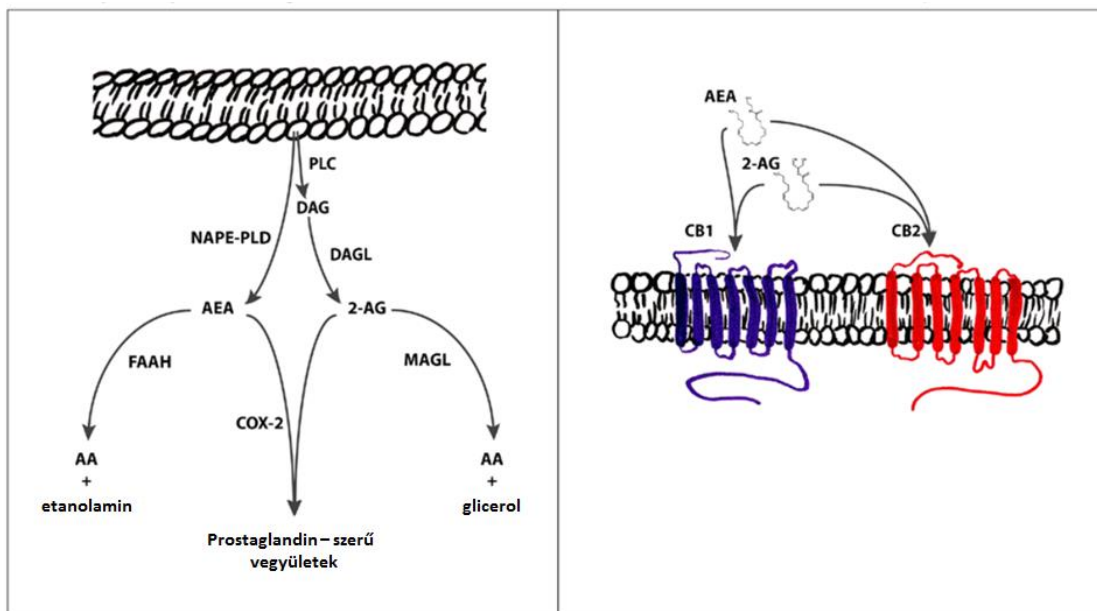
kódolja, míg a rendszerfüggő funkcionális szelektivitás az adott sejttől függ, de fontos a terápiás célt is figyelembe venni. Az elfogult ligandok hatékonyságát a receptor struktúrák vizsgálatával tudjuk meghatározni, amire mindenképpen szükségünk van, amikor a természetes agonistákhoz képest előnyösebb jelátviteli profilú gyógyszereket fejlesztünk (84).

2.3. Az endokannabinoid rendszer

Évszázadok óta használjuk betegségek kezelésére és rekreációs célokra a kannabisz növény (*Cannabis sativa* vagy *indica*) kivonatait, bioaktív anyagukat mégis csak a 1960-as években azonosították Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) néven. Azóta több mint 110 vegyületet izoláltak ugyanabból a növényből, és ezeket együttesen kannabinoidoknak vagy fitokannabinoidoknak nevezzük (85). Az 1990-es években kiderült, hogy a THC G-fehérjéhez kapcsolt receptorokhoz kötődik és aktiválja azokat, így lett ismert az 1. típusú (CB_1R) és a 2. típusú (CB_2R) kannabinoid receptor (86). Kézenfekvő volt olyan endogén molekulákat keresni, amelyek képesek aktiválni ezeket a receptorokat. Végül azonosították a CB_1R és a CB_2R endogén ligandumait anandamidként (AEA) (87) és 2-arachidonoil-glicerint (2-AG) néven (88,89). Ezek a molekulák lettek a legjobban tanulmányozott endokannabinoidok (eCB). Később azonban még több molekulát definiáltak endokannabinoidként, beleértve a 2-arachidonoil-gliceril-étert (noladin-éter, 2-AGE), az O-arachidonoil-etanol-amint (virodhamin), az N-arachidonoil-dopamint (NADA) és az olajsavamidot (oleamid, OA) (90).

Az eCB-ok többféle úton keletkeznek, kialakulásuk szövetenként és a szervezet fejlettségi szintje szerint más és más, kóros folyamatok pedig meg is változtathatják a keletkezési utakat. A 2-AG előállításának kanonikus útja kétlépéses útvonal, a specifikus foszfolipáz C (PLC) a plazmamembránban található inozitol foszfolipidek hidrolízisével diacilglicerint (DAG) hoz létre, amiből a diacilglicerint-lipáz ($DAGL_{\alpha/\beta}$) szintetizálja a 2-AG-t. N-arachidonoil-etanol-amin-t (anandamid, AEA) a sejtek szintén membrán foszfolipid prekursorokból szintetizálják, főleg a Ca^{2+} -függő N-aciltranszferáz (NAT) és az N-acil-foszfatidil-etanol-aminosav-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) segítségével. Az endokannabinoidok biológiai aktivitását gyors katabolizmusuk fejezi be, amelyért főleg a zsírsavamid-hidroláz (FAAH) a felelős, mely az AEA-t hidrolizálja, és

a monoacil-glicerín-lipáz (MAGL), amely 2-AG lebontását végzi. Kimutatták, hogy az AEA-nak nagy affinitása van a CB₁R iránt és alacsonyabb a CB₂R iránt míg a 2-AG mérsékelt affinitással rendelkezik mindkét receptor felé (91,92) (3. ábra).



3. ábra: Az endokannabinoid rendszer egy részének sematikus ábrázolása: Az anandamid (AEA) és a 2-arachidonil-glicerín (2-AG) feltételezett keletkezése és lebomlása, valamint a két fő kannabinoid receptor Forrás: (93) alapján módosítva.

A CB₁R és CB₂R-ok mellett az endokannabinoidok számos más receptort és csatornát befolyásolnak, köztük több tranziens receptor potenciál csatornát (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8), és más G-fehérje kapcsolt receptorokat, mint például a GPR55, GPR18, GPR119. Hatással vannak továbbá még az alábbiakra is: γ -amino-vajsav (GABA)-A receptor, glicin receptorok és a nukleáris receptor peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor gamma (PPAR- γ , PPAR α) (91,94–96). Az endokannabinoidok oxidatív termékei is létrejönnek néhány ismert enzim közreműködésével (COX2, 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX, citokróm P450). Ezeknek a termékeknek a jelentősége, hogy saját biológiai aktivitással rendelkeznek, amelyek különböznek a kiindulási endokannabinoidokétól (97). Az eCB metabolizmust szabályozzák továbbá különböző transzporterek, amelyek megkönnyítik az eCB-k mozgását át a plazmamembránon, segítik a mozgásukat intracellulárisan, valamint lehetővé teszik a tárolásukat citoplazmatikus organellekben, például adiposzómákban (98–100).

2.3.1. Az endokannabinoid rendszer fiziológias jelentősége

Az intenzív kutatások nyomán egyre többet tudunk az endokannabinoid rendszer (ECR) komplexitásáról, és a terápiás lehetőségekről. A kannabisz kivonatok a THC mellett egyéb vegyületeket (terpenoidokat, flavonoidokat és szterineket) is tartalmaznak, amelyekkel különböző mértékben modulálhatóak a THC és a rokon vegyületek aktivitása. Ezen természetes anyagok közül több - különösen a kannabidiol - intenzív kutatások tárgya lett az elmúlt években, mert ezeknek a molekuláknak jelentős terápiás hatékonyságuk lehet különböző neurológiai rendellenességekben, önmagukban is vagy a THC-vel kombinálva (101).

Az ECR számos fiziológiai folyamatban vesz részt: sejtszinten szabályozza a sejtek szaporodását, differenciálódását, a sejtek túlélését és az apoptózist különböző szövetekben, például zsírszövetben, hámsejtben, csontban, vérben, nemi mirigyekben, valamint az agyban. Az endokannabinoidok szintetizálódnak a központi idegrendszerben, és szabályozzák a fájdalomérzékelést, a motoros funkciókat, a remegést és a görcsöket, a tanulást, az emlékezetet, a termogenezist, a alvási ciklusokat, a szinaptikus plaszticitást, az érzelmi viselkedést, a stresszreakciót, az étvágyat, a reprodukív funkciókat és a szexuális viselkedést. Az agy mellett az endokannabinoidok szintetizálódhatnak és működhetnek a perifériás szövetekben is szinte mindenhol a szervezetben, például a szívben, a gasztrointesztinális traktusban, a vérsejtekben, a zsírszövetben, az izmokban, a májban és a hasnyálmirigyben; ahol ezek gyulladásos reakciókat befolyásolnak, továbbá többek között a vérlemezke-aggregációt, a vérnyomást, a pulzusszámot, az értágulatokat és az energiaegyensúlyt. Következésképpen az endokannabinoid rendszer már bizonyítottan számos patológiai folyamatban is részt vesz, és összefüggésben áll neurodegeneratív rendellenességekkel, elhízással, diabetes mellitus-szal, kardiovaszkuláris rendellenességekkel, rákkal, és számos gyulladásos folyamattal.

2.3.2. Az endokannabinoid rendszer terápiás jelentősége

Az endokannabinoid rendszer fontos szerepet játszik a szív- és érrendszerben, különösen betegségek esetén. Normál körülmények között, egészséges állatokban az ECR modulációjának kisebb következményei vannak, és nem eredményez tónusos változásokat. Betegség esetén azonban az ECR szabályozatlan változásokhoz vezet. *In*

vitro és *in vivo* vizsgálatok, valamint néhány klinikai / epidemiológiai tanulmány alapján kardiovaszkuláris megbetegedésekben az ECR megváltozása figyelhető meg. Ez viszont felveti az ECR moduláció terápiás potenciálját is. Az endokannabinoidok és szintetikus analógaik fontos hatással vannak a szív- és érrendszerre, beleértve a szívmotort érintő komplex mechanizmusokat. Az ECR modulációját javasolták a kardiovaszkuláris rendszer különböző rendellenességeinek terápiájában, az érelmeszesedés, a magas vérnyomás, a cirrhotikus kardiomiopátia, a miokardiális infarktus és krónikus szívelégtelenség esetében is (102).

A két legismertebb kannabinoid receptor a CB₁R és CB₂R is fontos terápiás célpont. A CB₁ receptor már több mint 30 éve kutatott farmakológiai szempontból is, és már számos szintetikus liganduma létezik. Állatkísérletek és klinikai vizsgálatok alapján CB₁R farmakológiai befolyásolása előnyös lehet különféle állapotokban, például a fájdalom, a szorongás, a neurodegeneráció és az elhízás csökkentésében (103–105). Az FDA által jóváhagyott jelenlegi CB₁R gyógyszerek közé tartozik a nabilon, egy szintetikus THC analóg, melyet kemoterápia által kiváltott hányinger ellen használnak, és a sativex, egy neuropátiás fájdalom kezelésre használt kannabisz-kivonat. A szintetikus inverz agonista rimonabantot az európai Gyógyszerügynökség 2016-ben jóváhagyta az elhízás kezelésére (106), de nem sokkal később a kedvezőtlen pszichiátriai mellékhatások miatt felfüggesztették a klinikai felhasználását. Ez az eset jól szemlélteti a kockázatot annak ha a központi neuromodulációban is igen jelentős receptort szeretnénk befolyásolni. CB₁R esetében sokszor igen komoly mellékhatások kerülnek elő, mint például a hallucináció, a memória károsodása, görcsök és pszichózis (107). Az elmúlt években új stratégiák kerültek előtérbe a CB₁R ligandumok létrehozására, ilyen például az alloszterikus modulátorok és a perifériás inhibitorok (inverz agonisták / semleges antagonisták) fejlesztése. A receptor struktúra jobb megértése és a komplex jelátviteli kapcsolatok megismerése is az előnyösebb farmakológiai megközelítéseket segíti.

A periférián az endokannabinoid jelátvitelben fontos szerepet játszik az immunrendszer. Kimutatták, hogy a leukociták és más immunsejtek CB₂R-t és kisebb mértékben CB₁ receptort is expresszálnak. A kannabinoid receptorok cAMP és MARK jelátviteli útvonalai kulcsfontosságú szerepet játszanak az immunhomeosztázisban. Modulálják a T- és B-limfociták proliferációját és apoptózisát, az érzékenyített sejtek makrofágok kiváltotta elpusztítását, a gyulladásos citokin termelést, az immunsejtek

aktiválását különféle gyulladásokban, a kemotaxist és a gyulladásos sejtváándorlást (108). Az endokannabinoidokat az immunrendszerben többnyire makrofágok, limfociták, asztrociták, dendritikus sejtek, mikroglia és monociták termelik. Bár az endokannabinoidok nem szelektívek hatnak a kannabinoid receptorokra, bizonyítottan csökkentik a hiperalgéziát különböző ízületi gyulladásos állatmodellekben, és megelőzik az ízületi károsodást. Az AEA vagy a 2-AG lebomlását gátló szerek kombinálva más, jelenleg rendelkezésre álló kezelési stratégiákkal - mint például a COX-2 inhibitorok - segítik a fájdalomcsillapítást és a gyulladáscsökkentést (109).

A kannabinoidok biológiai és szövettani gyulladáscsökkentő hatásait emberben néhány klinikai vizsgálatban is tesztelték már, ilyen megbetegedések a sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis, scleroderma és 1-es típusú cukorbetegség. További pozitív kannabinoid hatásokat figyeltek meg autoimmun gyulladásos bélbetegségek esetén, a fekélyes vastagbélgyulladásban ahol a kannabinoid terápia csökkentette a hasmenéses állapotokat, több alkalmazásban csökkentette a fájdalom kialakulását, de pozitív hatásai vannak az alvásra is. Érdekes megfigyelés, hogy a szintetikus kannabinoidok nagyobb kötési affinitást mutatnak a CB₂R-hoz, aminek terápiás előnye lehet az, hogy ezeket a receptorokat aktiválva pszichoaktív hatások nélkül lehet befolyásolni az immunrendszert. Természetesen a célzott és szelektív hatás nagyon fontos lenne az adott betegségek terápiájában, ezért további kutatásokra van szükség ahhoz, hogy megértsük a kannabinoidokat és hogy miként hasznosíthatjuk őket a legkevesebb mellékhatással (110).

2.4. A CB₁ receptorok

2.4.1. A CB₁ receptorok jelátvitel

A CB₁R a G-fehérje kapcsolt receptorok közé tartozik, és 44%-os aminosav homológiát mutat a CB₂R-al. Akár csak a CB₂R-t, a CB₁R-t is az A osztályú receptorok közé soroljuk. Az A osztályú receptorok, megkötik a β -arresztint a plazmamembránon, de el is engedik azt az internalizálódás közben, mielőtt még a receptor a korai endoszómákba kerülne; ez egy alacsony affinitású kötődés, mely csak átmeneti. Ugyanakkor a B osztályú receptorok, mint például az 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT₁R), a V₂R és az oxitocin receptorok, stabilabb asszociációval rendelkeznek: a β -arresztin együtt marad a receptorral, és az internalizáció után is megjelenik a

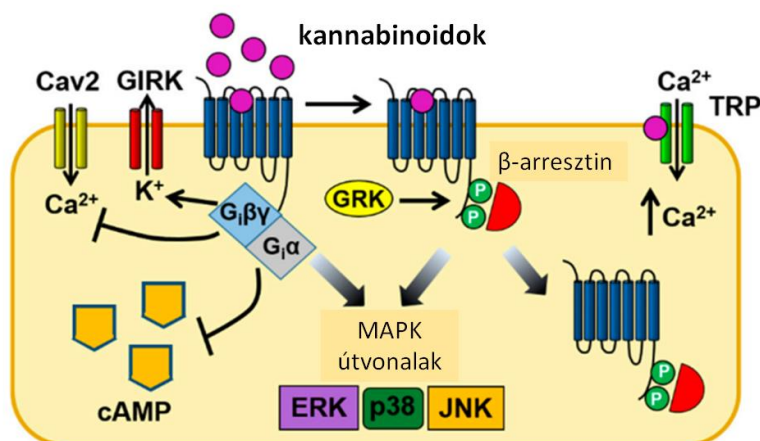
vezikulákban. Tehát ez az interakció hosszú és tartós, és ebben az esetben az arresztin-függő jelátviteli utak aktiválása is jelentősebb. A B osztályú kötődés esetén a receptorok sorsa a lizoszómák felé vezet, míg az A osztályú receptorok újrahasznosításra kerülnek (111).

A CB₁R-ok túlnyomórészt az agyban expresszálódnak, különösen az agykéregben, a hippocampusban, a bazális ganglionokban és a kisagyban, ahol a kannabisz pszichotrop és viselkedési hatásainak többségét közvetítik. De újabb bizonyítékok szerint a CB₁R számos perifériás szövetben is kifejeződik, beleértve a lépet, a bélrendszert, a tüdőt, a méhet, a csemőmirigyet, a szívet és az érrendszert.

Számos vizsgálat bizonyítja, hogy mind a CB₁R, mind a CB₂R-ok G_{i/o} fehérjéhez vannak kapcsolva, gátolják az adenilát-cikláz aktivitását, ami a cAMP-szint csökkenéséhez vezet, emellett csökkenti N-típusú Ca²⁺ csatornák nyitottságát, valamint a G_i fehérje βγ egysége megnyitja a befelé irányuló K⁺ (GIRK) csatornákat, így létrejön egy negatívabb nyugalmi membránpotenciált, mely jelenség a neuronok közötti szinaptikus részben a neurotranszmitter leadás csökkenéséhez vezet. A cAMP jel csökkenése másodpercek alatt megtörténik, ezt követi a receptor-foszforylációja (GRK által), amely kiváltja a β-arresztin1 (βarr1) és a β-arresztin2 (βarr2) toborzását a receptorhoz. A β-arresztinek kötésének következménye a CB₁R deszenzitizációja és internalizációja, ami az ERK1/2, és néhány bizonyított esetben PI3K/Akt jelátviteli utak aktiválásához vezet (112). Fontos megjegyezni, hogy a CB₁R konstitutívan, azaz ligand megkötése nélkül is internalizálódik (113), bár ebben szerepe lehet a sejtek folyamatos 2-AG képzésének is (114). Továbbá CB₁R-okról kimutatták az is, hogy egyes esetekben képesek kapcsolódni a G_s fehérjéhez, stimulálva a cAMP termelést: tenyésztett patkány striatális neuronokban kannabinoid közvetítette cAMP szint növekedését találtak, valamint a CB₁R-t expresszáló CHO sejtekben is, forskolin jelenlétében (115). A CB₁R és G_s kölcsönhatását rekombináns humán CB₁R-okkal transzfektált CHO sejtekben is megerősítették. A CB₁R adenilil-ciklázra gyakorolt kettős gátló és aktiváló hatásáról beigazolódott, hogy ligand-specifikus. Kimutatták, hogy a HU-210, AEA és Win55 agonisták maximális G_{α_i} aktivációt váltottak ki, míg a THC csak részleges G_{α_i} aktivációt okoz. Ezzel szemben csak a HU-210 agonista okozott maximális a G_{α_o} aktivációt, az AEA, a Win55 és a THC csak részlegesen hatottak. A Win55 és a HU-210 vegyületek azonos erősségű receptor - G-fehérje kötődést indukálnak mind a G_{α_i} mind a G_{α_s}

fehérjékhez, míg a CP55,940 és az AEA aktiváció is a $G\alpha_i$ -függő jelátviteli utakhoz vezet (116).

Úgy tűnik, hogy mind a CB₁R-ok, mind a CB₂R-ok intracelluláris hurka (ICL2), és különösen a konzervált DRY (X) 5PL motívumban található Leu-222 aminosav kritikus szerepet játszik a G_s és a G_i fehérje kötésében (115,116).



4. ábra: A CB₁ receptor jelátvitelének egyszerűsített összefoglalása: Forrás: (113) alapján módosítva.

2.4.2. A CB₁ receptorok szerepe a keringési rendszerben

1995-ben mutatták ki először, hogy *in vitro* (nyúl agyi artériákon) a kannabinoidok vazorelaxációt okoznak. Ellis és munkatársai az első azonosított endokannabinoidot, az anandamid-ot (AEA), és a növényi eredetű pszichotróp kannabinoidot a THC-t használták (117). Azóta számos tanulmányban látjuk, hogy ha kannabinoidokat vagy endokannabinoidokat használnak izolált artériákon, akkor ezek az anyagok az érellenállás változását eredményezik. A legtöbb esetben vazorelaxáció az eredmény, bár vazokonstriktor válaszok is megfigyelhetők. A kannabinoidok modulálják a vazoaktív vegyületek, köztük az acetilkolin, a metoxamin, az angiotenzin II és az U46619 (tromboxán agonista) hatását is. A jelenség magyarázataként számos hatásmechanizmust javasoltak, ideértve a receptor aktiválását, a káliumcsatorna aktiválását, a kalciumcsatorna gátlását és a vazoaktív mediátorok, például a kalcitonin génnel rokon peptid, a prosztanoidok, az NO, az endotheliális eredetű hiperpolarizáló faktor és a hidrogén-peroxid termelését (118,119). Bizonyítottan vazorelaxáns hatásokat

okoz továbbá az AEA, az N-arachidonoil-dopaminra (NADA), az oleo-etanol-amidamid (OEA), az oleamid, a CP55 940, a Win55212-2 és a HU-210 is számos artériás preparátumon, beleértve a vese, a mesentericus, a szemészeti és agyi artériákat (120). Ezek a vazorelaxáns hatásokat részben a CB₁R aktiválása közvetíti. Nagyon sok vizsgálatban a kannabinoidok vazoaktív hatásáért nem lehetett a CB₁R felelőssé tenni, bizonyos esetekben ennek az lehet az oka, hogy a CB₁R nem is expresszáldódik az adott artéria vizsgált szegmensében. Például az AEA nem lazítja a patkány disztális femoralis artériáit, de ezekben az artériákban nincs is kimutatható CB₁R. Egy másik magyarázat az, hogy a kannabinoid agonisták funkcionális szelektivitást fejezhetnek ki a CB₁R-okon, oly módon, hogy egyesek hatékonyabban indítják el a relaxációhoz vezető mechanizmusokat - például a Ca²⁺-csatorna gátlása és a káliumcsatorna-aktiváció révén -, mint mások. Egyes kannabinoidok vaszkuláris hatásait metabolikus termékeik közvetítik. A THC, az AEA és a 2-AG vazorelaxáns hatását gátolja a zsírsavamid-hidroláz, a MAGL, a COX és a citokróm p450 gátlása (121).

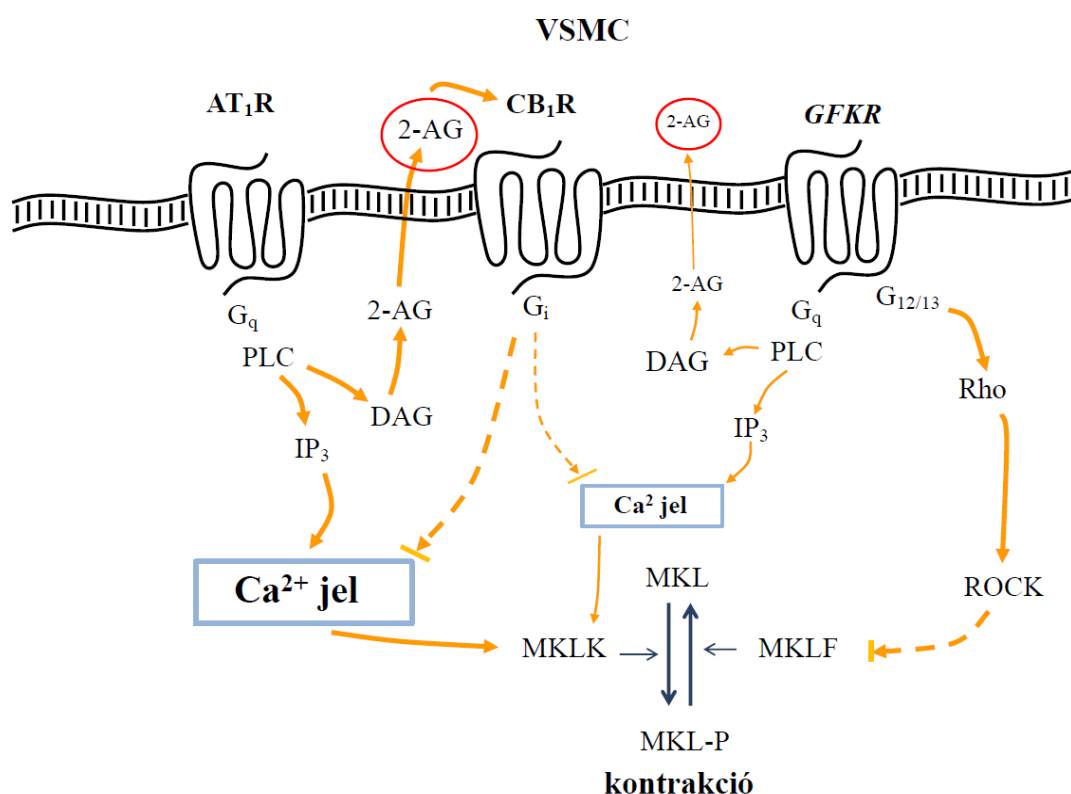
A szívben a CB₁R szerepet játszik a szívizom ischaemiás prekonidációban, és az ischaemia-reperfúziós károsodásában is. A miokardiumban lévő CB₁R-ok negatív inotropiát közvetítenek, *in vivo* és *in vitro* egyaránt, így a szív kevésbé fog összehúzódni. Rágcsálókön folytatott vizsgálatokban a magas vérnyomásos állatoknál az anandamiddal stimulált CB₁R tónusosan csökkenti a szív kontraktilitását, ami végül normalizálja vérnyomást, a csökkent szívösszehúzódon és az érellenállás mérséklésén keresztül. Az ilyen eredmények azt sejtetik, hogy olyan kardiovaszkuláris kockázatok esetében, mint például a magas vérnyomás, figyelembe kell venni a CB₁R hatásokat is (102).

2.4.3. A CB₁ receptorok és más G-fehérje kapcsolt receptorok kapcsolata

Az idegsejtek közötti a posztzinaptikus neurális membránon már régóta ismert, hogy nem csak posztzinaptikus serkentő potenciál jön létre, hanem eCB termelés is történik, ami visszahatva a preszinaptikus membránra, a CB₁R-okon keresztül gátolja a további neurotransmitter felszabadulást. Az eCB termelés mindkét mechanizmusát látjuk itt is: a glutamát receptor aktiválásával kalcium szignál jön létre, amely aktiválhatja az eCB kialakulásában szerepet játszó enzimeket, és a DAG metabolizálásával 2-AG alakul ki. Ez a retrográd kannabinoid jelátvitel az egyik legjobban tanulmányozott központi idegrendszeri hatása az endokannabinoidoknak. Kalcium jel és következményes

endokannabinoid termelés azonban gyakorlatilag bárhol a sejtmembrán közelében kialakulhat. A G_q kapcsolt receptorok aktiválása létrehozza a kalcium jelet, majd aktiválódik a PLC, amely a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) hasítja a plazmamembránban, DAG és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) keletkezik. Az előállított DAG a 2-AG termelés szubsztrátjaként szolgálhat, és a létrejövő endokannabinoid a közelben lévő kannabinoid receptorokat parakrin vagy autokrin módon is aktiválhatja (122). A 2000-es évek elején kezdett ismertté válni, hogy az idegrendszerben a retrográd kannabinoid jelátvitel nemcsak a glutamát receptorok ingerlése során jön létre, hanem jelentősége van például a muszkarinos Ach receptornál is. Továbbá kimutatták, hogy a kolecisztokinin neuropeptid (CCK) eCB-függő mechanizmuson keresztül szabályozza a hippocampusz piramissejtjeinek GABAerg hatását. *In vitro* vizsgálatokból ismert, hogy a szerotonin 5HT_{2A} és 5HT_{2C} receptorok aktiválása 2-AG termeléshez vezetett foszfolipáz C-függő mechanizmussal, sőt a posztzinaptikus szerotonin receptorok aktivitása az inferior oliva magvakban csökkentette a glutamaterg serkentést, és ezt a hatást blokkolta az AM251 CB₁R inverz agonista (123).

Eltávolodva a központi idegrendszertől, munkacsoportunk heterológ expressziós rendszerben bizonyította az AT₁ receptorok kapcsolata a CB₁ receptorokkal. Az AT₁R aktivációja, hasonlóan más $G_{q/11}$ -kapcsolt receptorok is 2-AG felszabadulásához és a közeli sejteken lévő CB₁R parakrin transzaktivációjához vezet (122). Simaizomsejteken, ahol megtalálható a CB₁R és több $G_{q/11}$ -kapcsolt receptor is, elképzelhető hasonló transzaktiváció (5. ábra).



5. ábra: Sematikus ábrázolása a CB₁ receptor transzaktivációjának simaizomsejteken: Az AT₁R aktivációja a Ca²⁺ jel kialakítása közben 2-AG keletkezésével jár, ami az azonos vagy a szomszédos sejteken megtalálható CB₁R-okat trajsztaktiválhatja, mely a G_i válaszon keresztül mérsékli a Ca²⁺-jelet. Hasonló elmondható más GPCR-okról is, nem csak G_q, de G_{12/13} kapcsolt receptorok is felelősek a simaizom összehúzódásért, utóbbi esetében a Rho kinázon keresztül. (saját ábra)

In vivo ez a jelenség befolyásolhatja az Ang II hipertenzív hatását. Ugyanakkor figyelembe kell venni a CB₁R-ek és az AT₁R-ek heterodimerizációját is, ami előfordulhat a vaszkuláris sejteken is, és befolyásolhatja ezen receptorok működését (124). Amennyiben a CB₁R jelen van az adott szövetben és a felszabadult endokannabinoidok elérik a receptort mielőtt lebomlanának, akkor létrejöhet a CB₁R aktivációja aminek lehet fiziológiás hatása, például az értónus szabályozásában is.

2.5. A CB₂ receptorok

2.5.1. A CB₂ receptorok jelátvittele

A CB₂ kannabinoid receptorok is a G fehérje kapcsolt receptorok családjába tartoznak, és a rodopszin, A osztály tagjai, melyre jellemző az átmeneti, rövid idejű β -arresztin kötés kialakítása (125). A humán receptort kódoló CNR2 gén (GeneID1269) az 1-es kromoszómán, a p36.11 pozícióban helyezkedik el, két exont és egy intront tartalmaz. Az első exon nem íródik át, a promóter szekvencia egy részét tartalmazza, így a transzkripció szabályozásában van szerepe. A gén kb. 39,9 kb hosszú, és 360 aminosav méretű peptidet kódol (126). A CB₂R szignál transzdukciója G_{i/o} fehérjékhez van kapcsolva. A G α alegység aktiválása gátolja az adenilil-cikláz aktivitást, és a G $\beta\gamma$ alegységeken keresztül gátolja a feszültségtől függő kalcium csatornákat, elindítja a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) és a foszfoinozidid-3-kináz (PI3K)-Akt útvonalakat (127), (128), (129). Ahogy a CB₁ receptor (130) úgy a CB₂R is mutat konstitutív aktivitást nem csak *in vitro*, de *in vivo* rendszerekben is (131,132).

A kannabinoid receptorok mind konstitutív módon, mind a stimuláció után internalizálódnak. A receptor C-terminálisának foszforizációja után a β -arresztin CB₂R-hoz történő kötődésére a receptor internalizációja és deszenzitizálódása következik (133), (134) (135). β -arresztin2 toborzást figyeltek meg a CB₂R-ok közelében többféle agonista alkalmazása után: a Win55212-2, a CP55,940 és a szelektív CB₂R agonista JWH-015 esetében (135), (136). Patkány mikroglia sejteken az endokannabinoid 2-AG hatására a receptor szintén agonista kifejtett internalizációt mutatott (137). Az internalizálás majd az újra membránba kihelyeződés folyamatában részt vesznek a Rab5 és a Rab11 fehérjével jellemezhető vezikulákat is.

2.5.2. A CB₂ receptorok a szervezetben

A CB₂R-okat jelenlétét leírták számos perifériás szervből is, az immun sejtekben fontos immun funkciókat tulajdonítanak nekik, és számos immunológiai betegséggel hozhatóak összefüggésbe (138). A receptorok stimulációja gyulladáskeltő citokinek csökkentésével, az immunsejtek szaporodásának gátlásával valamint antitestek képzésének serkentésével immunmoduláló, gyulladáscsökkentő hatást fejt ki (139),

(140). A makrofágokon, T-helper sejteken, és a mezenchimális sztoমা sejteken megtalálható CB₂R stimulációja ígéretes gyulladáscsökkentőnek bizonyulhat a jövőben a COVID-19 fertőzött betegeknél (141).

A receptor perifériás elhelyezkedése mellett nem elhanyagolható a központi idegrendszerben betöltött szerepe. A CB₁R-okkal ellentétben a CB₂R agyban való expressziója sokáig ellentmondásos volt, mivel a kutatások első éveiben a munkacsoportok nem tudták kimutatni normál egészséges agyban a CB₂R fehérjét (142). Később mások CB₂R-okat csak az agy immun sejtjeiben találnak, jól láthatóan a mikrogliaon (143), (144). Ezután a mikrogliaon túl a kisagyi mikrovaszkuláris endotél sejtekben, az idegi progenitor sejtekben, a magzati asztrocitákban és néhány mikroglia alcsoportban is azonosították a receptort egészséges emberek esetében (145) (146), (147) (148), valamint a ventrális tegmentális terület dopaminerg neuronjaiban (149). *In vitro* kísérletek kimutatták hogy a receptor fehérje és/vagy mRNS megtalálható az emberi érző idegrostokban, dorzális gyökér-ganglionokban, gerincvelői neuronokban, hippocampális neuron kultúrákban és a kisagy Purkinje sejtjeiben is (145).

Bár fiziológiás körülmények között a CB₂R agyi expressziója alacsonyabb a CB₁R-ok expressziójához képest, de néhány megbetegedésben, mint például az Alzheimer kór, a szklerózis multiplex, vagy az amitrófiás laterálszklerózis, megnövekedett a receptor jelenléte (150,151). A receptorok gyulladás csökkentő hatásai miatt ezekben a megbetegedésekben ígéretes terápiás célpontok lehetnek, különösen olyan körülmények között, ahol krónikus gyulladás játszik szerepet a betegség kialakulásában, mint például az Alzheimer kór esetében (152,153). A 2000-es évek kutatásai rámutattak hogy a CB₂R-oknak kiemelkedő szerepe van egyes pszichológiai rendellenességekben is, mint például a skizofrénia (154), a depresszió, és az alkoholizmus (155,156), és a receptor aktivációja elnyomja mind az akut, mind a neuropátiás fájdalmat (157). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy nemcsak a CB₁R, hanem a CB₂R is fontos szabályozó szerepet tölt be a központi idegrendszerben.

2.5.3. A CB₂ receptor polimorfizmusai

Több pszichiátriai betegségben vizsgálták az 1-es típusú kannabinoid receptor genetikai polimorfizmusainak szerepét és kapcsolatba is hozták különböző

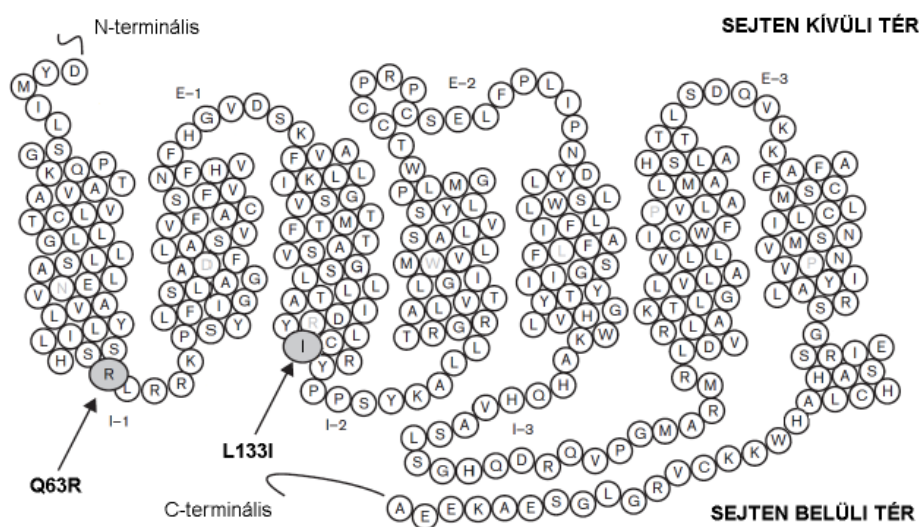
függőségekkel, depresszióval, bipoláris zavarral, neurózissal és az antidepresszáns terápiában megfigyelhető nem megfelelő gyógyszerválasszal (158,159). A CNR2 génnel eddig viszonylag azonban kevesen foglalkoztak, annak ellenére hogy a CB₂R jelentősége is több pszichiátriai kórképben felmerült.

A CB₂R cDNS 188-189 pozíciójában azonosított missense polimorfizmusában dinukleotid megfordulás történt AAGG területen (rs2501432), és ez a változás a fehérjében glutamin-arginin aminosav cserét eredményez a 63. aminosav pozícióban (Q63R) (6. ábra). Az aminosav csere következménye, hogy egy töltetlen aminosavval pozitív töltésűvé válik, amely hatással lehet az első intracelluláris citoplazmatikus hurok struktúrájára, különböző módon befolyásolva ezzel a CB₂R immunmoduláló funkcióját (160). Ezek a mutáns receptorok továbbra is képesek a vad típusú receptorhoz hasonló aktivitással kötni a kannabinoid ligandokat, beleértve az anandamidot és a 2-AG-t, és kialakul itt is a receptorra jellemző szignáltranszdukciót, azonban néhány kannabinoid agonista, például a WIN55 vagy az endogén módon jelen lévő 2-AG, kevésbé voltak képesek kifejteni hatékonyságuk a Q63R polimorfizmus esetén (161). A 2-AG-ról és az anandamidról már korábbról ismert, hogy csökkent koncentrációban mérhető a súlyos depressziós betegek szérumában, és ez a jelenség közvetlenül korrelál a depressziós epizód időtartamával (162). Egyes kutatások beszámolnak a CB₂R-Q63R receptorok szerepéről a depresszióban, az alkoholizmusban (155,156) valamint skizofréniában (154) is. Konstitutív aktivitást a receptor azon képességeként mérték, hogy gátolja-e a forskolin által stimulált ciklikus AMP felhalmozódást kannabinoid agonisták hiányában. A forskolin-stimulált cAMP-felhalmozódás hasonló szintet ért el a CB₂R-Q63R receptort expresszáló sejtekben, mint a vad típusú CB₂R-okat expresszáló sejtekben (161). Egyes tanulmányok Q63R polimorfizmusról számolnak be a kaukázusi és a libanoni populáció autoimmun betegségeihez kapcsolóan. A mutációt hordozó egyének nagyobb kockázatot mutatnak a myasthenia gravis, a reumás ízületi gyulladás és a sclerosis multiplex kialakulása felé. Több esetben súlyosabb gyulladást és hepatocelluláris nekrozist találtak krónikus hepatitis C és B fertőzésben szenvedő betegeknél (163), (164), de a polimorfizmus hozzájárul a gyulladással járó bélbetegségek kockázatához is (165).

Az immunológiai betegségek mellett a juvenilis idiopátiás ízületi gyulladással (166), és étkezési zavarokkal (167) is összefüggésbe hozták a Q63R mutációt, sőt a csontritkulással is találtak összefüggést a CNR2 gén ezen egyetlen nukleotid

polimorfizmusával (168). Egyes Egyiptomban és Olaszországban végzett vizsgálatok összefüggést találtak a Q63R és a thrombocytopenia között gyermekekben (169–171), és olaszországi a túlsúlyos lányoknál végzett vizsgálatokban kiderült, hogy kapcsolat van a CB₂R-Q63R funkcionális variánsa és a menarche kora között (172). A mutációt vizsgálták keringési betegségek szemszögéből is de nem találták szerepét még ilyen összefüggésekben (173).

Egy másik, általunk is vizsgált missense polimorfizmusnál (rs41311993) a 133. pozícióban leucin-izoleucin csere történt (L133I) (6. ábra). Ezt a CB₂R variánst eddig csak Olaszországban találták meg, és bipoláris zavarban szenvedő betegeknél szignifikánsan gyakrabban találták meg ennek mutánsnak az allélját, mint a vad típusú CB₂R-t (174). Ez az aminosavcsere befolyásolhatja a receptor kötődését a G-fehérjéhez, mivel a képződik egy hidrofób csoport ami megváltoztathatja a transzmembrán domén stabilitását (175).



6. ábra: A CB₂R-szekvencia aminosav-változásai: rs2501432 (315ANG; Arg63Gln), rs41311993 (524CNA, Leu133Ile) Forrás: (161) alapján módosítva.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Ph.D. munkám során a két kannabinoid receptor, a CB₁R és CB₂R szerepével és működésével foglalkoztam. A CB₁R esetében annak vaszkuláris hatásait vizsgáltam az AngII vérnyomás emelő hatására, a CB₂R estében pedig két gyakran előforduló receptor polimorfizmus hatásait vizsgáltam a receptor- β -arresztin2 kapcsolatában.

Vizsgálataim első felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

- Létrejön-e parakrin transzaktiváció endogén AT₁R stimulálásával izolált simaizom sejtekben?
- Rágcsáló arteriolákon és aortákon jelenlévő AT₁R és CB₁R milyen módon befolyásolja a G_q kapcsolt receptor ingerlésével létrehozott ér összehúzódást?
- Simaizom sejteken a CB₁R-ok gátlása hogyan befolyásolja az AngII kiváltotta jelátviteli folyamatokat?

Vizsgálataim második felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

- A CB₂R polimorfizmusok esetében mely jelátviteli folyamatokban látunk *in vitro* különbséget?
- Beszélhetünk-e elfogult jelátvitelről a CB₂R-ok ismert két polimorfizmusa esetében?

4. MÓDSZEREK

4.1. A kísérletekben használt anyagok

A sejt kultúra fenntartásához használt anyagokat, mint a DMEM-et (Dulbecco által módosított összetételű Eagle médium), Opti-MEM®-et, a főtális borjú szérum-ot (FBS), a Lipofectamine 2000™ -t az Invitrogen-től (Carlsbad, CA, USA) rendeltük meg. A műanyag edényeket és sejtenyésző lemezeket a Greinertől (Kremsmunster, Ausztria) vettük, az Ibidi lemezeket a Zenon Bio Kft-től (HU). A HEK 293T (ATCC CRL-3216) az American Type Culture Collection cégtől származtak. A molekuláris biológiai reagenseket és a nagy kapacitású NeutrAvidin agaróz gyöngyöket a Thermo Scientific-től (Waltham, MA, USA) vásároltuk. A β -arresztin2 monomer Venus sárga fluoreszcens fehérjével (mVenus) jelölt konstrukció Dr. Gyombolai Páltól származik (130). Felhasznált vegyületek az 1. Táblázatban láthatóak, és minden további felhasznált anyagot és reagenst a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO) szereztük be. 200–230 g-os hím Wistar patkányokat használtunk a simaizom sejtek izolálásához és 300–350 g-os állatokat a miográf kísérletekhez (Charles River Laboratories Semmelweis University, Budapest). C57BL6 (26–31 g) egerek az Élettani Intézet állatházából származnak. CB₁R knockout egerek (–/–, CB₁R-KO) és a vad típusú párjaik (+/+, C57BL6, Cnr1^{tm1zim}) 25–30 g súlyban Prof. Andreas Zimmer nagylelkű felajánlása volt (University of Bonn). A knockout egereket és vad típusú párjaikat a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) SPF (specified pathogene free) állatházában neveltük, a kísérleteink előtt pár nappal kerültek át a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központ (SE-EOK) központi állatházába a konvencionális térbe (MD - minimal disease). A patkányokat a Semmelweis Egyetem Nagyváradtéri Elméleti Tömbjében (NET) tenyésztették, és a kísérlet előtti napokban hoztuk át az EOK-ba, ahol szintén az állatház MD terében éltek az előírásoknak megfelelően. Minden, az állatokon végzett eljárás megfelelt az állategészségügyi jogi és intézményi előírásoknak (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996)). Az állatok kapcsolatos kísérleteket a Semmelweis Egyetem Állat-egészségügyi Bizottsága és a Magyar Állattenyésztési Bizottság is jóváhagyta. Engedélyek száma: 263/003/2008 és 001/2139-4/2012.

1. Táblázat: A kísérletekben használt vegyszerek

Név	Funkció	gyártó
biotin	Biotin ligáz subsztrát	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)
cölkenterazin h	Luciferáz szubsztrát	Regis Technologies (Morton Grove, IL, USA)
candesartan	AT ₁ R antagonist	Tocris (Bristol, Egyesült Királyság)
1-es típusú kollagenáz	Aorta gyűrűk emésztése	Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ)
proteáz inhibitor koktél (cOmplete)	Proteáz gátló	Roche (Basel, Svájc)
Az Immobilon western kemilumineszcens tormaperoxidáz	Kemilumineszcens szubsztrát	Millipore (Billerica, MA, USA)
O2050	CB ₁ R antagonist	Tocris Bioscience (Ellisville, MI, US)
AM251	CB ₁ R inverz agonista	Tocris Bioscience (Ellisville, MI)
2-AG	CB ₁ R és CB ₂ R agonista	Tocris Bioscience (Ellisville, MI, US)
JWH-133	szelektív CB ₂ R agonista	Tocris Bioscience (Ellisville, MI, US)
JZL184	monoacil-glicerol lipáz gátlószere	Tocris Bioscience (Ellisville, MI, US)
THL	diacil-glicerol lipáz gátló	Tocris Bioscience (Ellisville, MI, US)
LNA	NO-szintézis gátló	Sigma

4.2. Sejtkultúra és transzfekció

4.2.1. HEK 293T sejtvonal

HEK 293T sejtvonalat 100 IU/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomocinnel 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 elteltével végeztük. A koprecipitációs kísérletekhez szintén szuszpenzióban transzfektáltunk Ca-foszfát precipitáció módszerével (176), és a sejteket poli-L-lizinnel előkezelt 10 cm-es tenyésztőedényekre tettük le. A kalcium-foszfát–DNS koprecipitációs eljárás alapja, hogy a képződő kalcium-foszfát csapadék elősegíti a DNS molekula kötődését a sejtfelületen, amely ezután endocitózis útján jut be a sejtek citoplazmájába. A transzfekció során a megfelelő mennyiségű DNS-t desztillált vízben elkeverjük, majd CaCl₂ oldat hozzáadásával 60 mM CaCl₂ végkoncentrációjú oldatot állítunk elő, amihez lassan, cseppenként kevergetve adjuk hozzá az ugyanolyan térfogatú 2x HBS foszfát puffert. A reakcióelegy buborékolatásával elősegítjük a minél finomabb csapadékképződést, majd a transzfekciós oldatot cseppenként a sejtkultúrához adjuk, majd az egész keveréket a sejttenyésztő edénybe tesszük. A transzfekciós reagens térfogata az adherens sejteken lévő médium vagy a sejszuszenzió térfogatának 10%-a. A transzfekció után 10-16 órával a sejteken a médiumot friss, komplett (antibiotikummal és borjúsérummal kiegészített) DMEM-re cseréltük. A bemutatott konfokális mikroszkópos felvételek készítéséhez a HEK 293T sejteket poli-L-lizinnel előkezelt üveg fedőlemezekre szélesztettük 6-lyukú tenyésztőedényekben, egyes kísérleteknél 8 luku Ibidi lemezeket használtunk. Másnap a transzfekciót adherens sejteken hajtottuk végre, a kísérleteket harmadnap végeztük el.

4.2.2. Primer aorta simaizom sejtek

Hím Wistar patkányokból pentobarbithallal történő anesztézia után kivettük az aortát. Miután Ca²⁺ tartalmú jéghideg Krebs médiumban (119 mM NaCl, 4,7 KCl mM, 2,5 CaCl₂ mM · 2H₂O, 1,17 mM MgSO₄ · 7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄ mM,

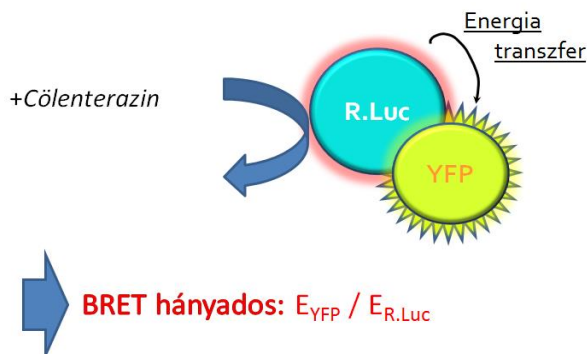
0,027 mM EDTA, 10,5 mM glükóz) megmostuk, vékony hegyű csipesszel eltávolítottuk a zsíros kötőszövetet. Ha még láttunk rajta vért, megtisztítottuk tőle, átmostuk a hideg médiummal. Amikor teljesen megtisztult az artéria egységes fehér színű. Ezek után steril szikével 2 mm széles karikákra szeleteltük az aortát. A karikákat áttettük egy steril csőbe (14 ml-es) amibe már előkészítettünk 3-4 ml, kollagenázzal kiegészített steril DMEM-et. 30 percre 37 °C-os termosztátban rázattuk. Amikor az idő lejárt, ugyanannyi ml DMEM médiumot pipettázunk rá steril körülmények között, mint amennyivel a kollagénnel kiegészített médiumban volt. Így leállítottuk az emésztést. Lefugáltuk (szobahőn, 1200 rpm, 5 perc), hogy a már kiemésztett sejtek a cső aljára kerüljenek. Óvatosan a steril fülkében leszívtuk a felülúszót, így az aorta karikák ott maradtak a cső alján. Kevés DMEM-el felfuszpendáltuk, majd steril sejttenyésztő lemezre szétoszlattuk, egymástól elkülönítve a karikákat. Ekkor még csak néhány ml DMEM médiumot csöpögtettünk rájuk, hogy a felület nedves legyen, de a karikák ne úszkáljanak szét a médiumba (10 cm-es sejttenyésztő edényhez 2-3 ml DMEM). Ekkor megnézve mikroszkóp alatt már látható volt, hogy az aorta fal megemésztődött a kollagenáz hatására, és kis szálak álltak ki a gyűrűkből. Ezek mentén 2-3 nap múlva elkezdtek kinőni a hosszúkás simaizom sejtek. A továbbiakban 37 °C-os CO₂ termosztátban tartottuk, ahogy a többi sejtkultúrát is, minden nap 1 ml DMEM-et csepegtettünk rá, óvatosan hogy a karikák ne kezdjenek el úszkálni. Amikor már több sejt is kinőtt, leszívtuk a médiumot az aorta gyűrűkkel együtt, és feltöltöttük a 10 cm-es plate-et 10 ml DMEM médiummal. A sejtek pár nap múlva benőtték a petri csészét.

4.3. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

A BRET (Biolumineszcencia Rezonancia Energiatranszfer) technikával élő sejtekben követhetőek a fehérje kölcsönhatások és azok modulációi (konformációs változásait). A BRET jelenség előfordul a természetben bizonyos tengeri fajokban is (például a *Renilla reniformis* tengeri árvácskában), ahol nem sugárzó energiaátadás figyelhető meg a *Renilla* luciferáz (energia donor) és a *Renilla* zöld fluoreszcens fehérje (energia akceptor) között (177). Felfedezését és első sikeres használatát (178) követően a BRET technika nagyon jelentőssé vált a molekuláris biológiai kutatások módszertanában. A G-fehérje kapcsolt receptorok vizsgálatában is különösen hasznos és elterjed módszer

az, amikor az egyik fehérjét az energia donorhoz, a másikat az energia akceptorhoz kötik. A módszer jelentős előnye a jelátviteli folyamatok tanulmányozásában, hogy élő sejtekben követhetjük nyomon a sejten belüli események dinamikáját, például receptorok β -arresztin kötését (178–180), de számos más hírvivő molekula sorsát is (178).

Amikor a Renilla luciferase (Rluc) enzim természetes szubsztrátját a cölenterazint hozzáadjuk a sejtekhez, az enzim gerjesztődik és kék fényt kibocsát ki (480 nm). Az energiaátadás feltételeinek teljesítése érdekében a donor emissziós spektrumának át kell fednie az akceptor gerjesztési spektrumát (7. ábra). A BRET kísérletekben alkalmazott tipikus energia-akceptor, amely megfelel ezeknek a kritériumoknak, a sárga fluoreszcens fehérje (YFP), vagy annak fényesebb és monomer természetű változata, a Venus (mVenus). Ha a két fúziós fehérje nem lép kölcsönhatásba, a szubsztrát hozzáadásakor csak kék fény kibocsátás jön létre. Ha a két fúziós fehérje kölcsönhatásba lép, vagyis ha a két vizsgált fehérjénk - vagy ugyanazon fehérje különböző részei - molekuláris közelségbe kerülnek ($<100 \text{ \AA}$) akkor rezonanciaenergia-transzfer történik, azaz a donor molekula energiájának egy részét a közeli akceptor fluoreszcens molekulának adja át, amitől az akceptorról kibocsátott fényjelet lehet detektálni (YFP esetén 535 nm, Venus esetében 530 nm). Az energiatranszfer mértékét a két hullámhosszon mért fényintenzitások hányadosa, az úgynevezett BRET hányados adja meg, ami az akceptor emissziós maximumán mért fényintenzitás osztva a donor emissziós maximumán mért fényintenzitással (530 nm/485 nm). Ha nincs a két fehérje között kölcsönhatás, akkor a BRET hányados alacsony lesz, viszont ha megtörténik az energiatranszfer, a BRET hányados növekedését regisztráltuk.

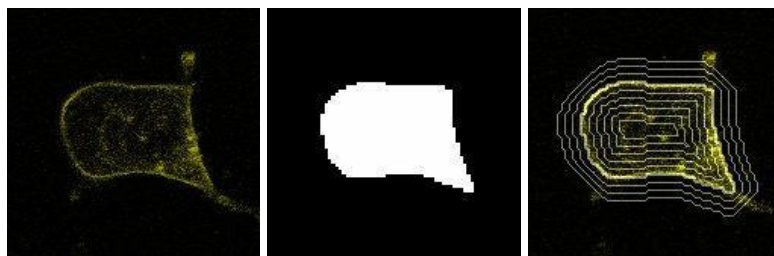


7. ábra: Az energiatranszfer sematikus ábrázolása: A cöleterazin szubsztrátját bontása után létrejöhet az energiatranszfer ha a donor (R.luc) és az akceptor molekula (YFP) molekuláris közelségben van. (saját ábra)

A fénykibocsátások detektálására Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) típusú készüléket használtunk, 480 nm-es (Rluc) és 530 nm-es (mVenus) hullámhosszú szűrőkkel. A letapadt HEK 293T sejteket 96 lyukú, fehér falú PLL-el előkezelte szövettenyésztő lemezekben transzfektáltuk Opti-MEM® mediumban Lipofectamine 2000™ reagenssel. 6 óra múlva a sejtek médiumát lecseréltük friss DMEM-re. A transzfekciót követően, 24 óra múlva végeztük a méréseket 37 °C-on. A sejtek médiumát két 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, amiben a mérést végeztük. A mérések elején sejt-permeabilis cöleterazin *h* szubsztátot adtunk a sejtekhez 5 µM végső koncentrációban. A BRET-hányadost az 530/485 nm hullámhosszokon mért fényintenzitások hányadosaként határoztuk meg. A BRET-eredmények legalább három független kísérlet átlagából kerültek meghatározásra. A BRET görbék elkészítéséhez először az ingerelt sejteken mért BRET-hányadosokból kivontuk a nem ingerelt, kontroll sejteken mért értékeket, majd ezen eredményből kivontuk az ingerlés előtti értékek átlagát. Ezáltal a görbéken az ingerlésre kapott BRET-jel változásokat a csupán vivőanyagot kapott sejtek eredményeire normalizáltan, a stimulálást megelőző BRET-jelhez képesti különbséggént ábrázoltuk. Az idő függvényében ábrázolt eredményeket átlag ± SEM formájában tüntettük fel.

4.4. Konfokális mikroszkópia és képanalízis

A CB₂R-ok lokalizációjának meghatározásához L10-el jelölt Cerulean-t (181) használtunk plazmamembrán markerként és YFP-vel jelölt CB₂R izoformákat transzfektáltuk Ca-foszfát precipitáció módszerével. Másnap a sejteket felszedtük és Ibidi lemezekre tettük le, 50 ezer sejt/pont mennyiségben. A sejtek letapadását követő 5. órában a médiumot szérummentes DMEM-re cseréltük, majd 1 órával később stimuláltuk JWH-133-al (10 μ M) 1 órán át. Ezután 3x mostuk a sejteket hideg PBS-el, majd fixáltuk 4% Pfa-val jégen 15 percig. Konfokális mikroszkópos képeket Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettünk. A sejteket cellpose neurális hálózaton alapuló algoritmussal detektáltuk és a sejtkontúrt folyamatosan csökkentve a sejt belseje felé meghatároztuk a fluoreszcenciát egyre csökkenő körvonalak mentén (8. ábra).



8. ábra: Sejtek detektálása: Konfokális mikroszkópos képeken a sejteket neurális hálózaton alapuló algoritmussal detektáltuk. Minden sejt esetében meghatároztuk a sejtet borító maszkot és a maszkot iteratíván kítágítottuk vagy erodáltuk, ami összesen 60 körvonalat eredményezett. (saját ábra)

4.5. Precipitációs mérések

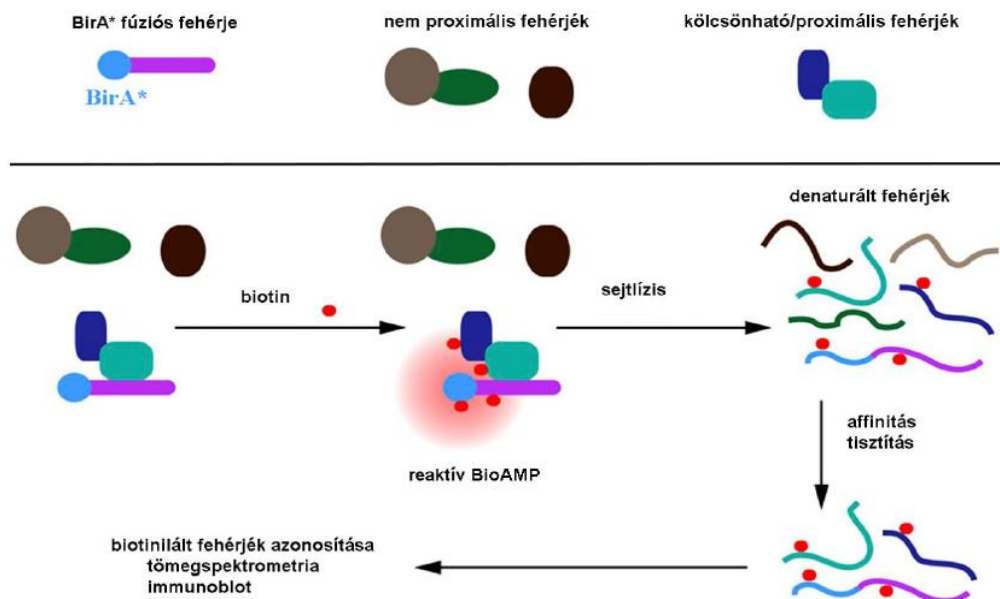
4.5.1. BirA - “közelségi jelölés”

A komplex biológiai folyamatok, jelátviteli kaszkádok megértésében a fehérje-fehérje kölcsönhatások feltérképezése nagy segítséget jelentene. A molekuláris kapcsolatok vizsgálatára többféle genetikai és biokémiai technika létezik. Ilyen módszerek például a koimmunoprecipitáció ahol antitesteket alkalmaznak a fehérjekomplexek izolálásához, vagy a bonyolultabb tandem affinitás komplex tisztítás, amelyben kettős affinitás jelzőket tartalmazó fúziós fehérjéket alkalmaznak az intakt fehérjekomplexek izolálására. Ezek a megközelítések gyakran használják a tömegspektrometriát a fehérjekomplexek összetételének azonosítására és mennyiségi meghatározásra (182). Más módszerek olyan események tárnak fel, amelyeket *in vivo* váltanak ki bizonyos fehérje kölcsönhatások vagy egy adott fehérje közelsége. Ezek közül

a legelterjedtebbek az élesztő kettős hibrid módszer, ami szelektálható riporter gének expresszióján alapul (183). További példák lehetnek a split-luciferáz vagy GFP vizsgálatok, amelyek olyan funkcionális riporterfehérjéket alkalmaznak ahol a fehérjék közvetlen közelségben helyezkednek el. A közelségi ligációs vizsgálat egyesíti a fluoreszcens antitest alapú fehérje jelölést, a PCR-amplifikációt és a fluoreszcens in situ hibridizációt, azért hogy fixált sejtekben azonosítsa két fehérje vagy epitóp közelségét (184).

Az elmúlt években több csoport egymástól függetlenül írta le a enzim által katalizált „közelségi címkézés” lehetőségét, ami jól használható gyengén, vagy éppen csak átmenetileg társult fehérjekomplexek jellemzésére, valamint segíti a fehérjék térbeli helyzetét is megfejteni, előnyös a különböző sejten belüli kompartmentekben történő vizsgálatokhoz (185,186). Az alapkoncepció nagyon egyszerű, a módszer kihasználja az egyes enzimek kicsi, instabil reagenseket képző tulajdonságait, mely reagens - mint például a biotin - képes kovalensen jelölni a fehérjéket (9. ábra). Az enzim által előállított termék rövid felezési ideje biztosítja, hogy csak az enzim közvetlen közelében lévő fehérjék (általában néhány tíz-száz nanométer) módosuljanak kovalensen (187). Ha az enzim ráköthető egy számunkra érdekes specifikus fehérje vagy sejtrészre, és ha a jelölő reagens tartalmaz egy molekuláris jelölést, például biotint, amely lehetővé teszi a könnyű tisztítást is, akkor elvileg a vizsgálandó fehérje közvetlen közelében lévő szomszédos fehérjék lehúzhatóak az adott mintából, és később akár tömegspektrometriai módszerekkel, vagy egyszerűen western blottal is azonosíthatóak. Az *Escherichia coli* baktériumból származó BirA enzim egy biotin fehérje ligáz, amely eredetileg az acetil-CoA karboxilázon lévő lizin biotinizációját katalizálja (188). Alapvetően a BirA a biotint és az ATP-t egyesíti biotinoil-5-AMP előállításához. Ez egy reaktív és instabil köztterméket eredményez, ami általában az enzim aktív helyén marad, amíg át nem kerül a célfehérjére (189). A szélsebb körű alkalmazás érdekében módosítani kellett a BirA enzimet. A létrehozott BirA* nevű mutáns nem specifikusan biotinizál minden olyan lizin aminosavat a fehérjéken, amelyek az enzim közvetlen közelében vannak. Tehát ez az enzim egy promiszkuus biotin ligáz. Habár a pontos mechanizmusa még nem ismert ennek a mechanizmusnak, a legvalószínűbb az, hogy a BirA * mutáns a vad típusú enzimhez képest hamarabb szabadítja fel a biotinoil-5-AMP-t. Az eredeti vad típusú BirA-t is lehet alkalmazni abban az esetben ha a vizsgált fehérjénkre egy BAP (biotin

akceptor peptid) jelet teszünk, és csak a BAP jel fog biotinilálódni, és csak ezeket a fehérjék izoláljuk később. Ha valódi kötődést keresünk és nem csak közelségi kapcsolatot, akkor ez egy igen specifikus technika. Roux és munkatársai tovább módosították a biotin ligázokat (190). A BioID technika a prokarióta promiszkuus biotin ligáz enzimen alapul (BirA*), vagyis ez esetben az enzim képes BAP hiányában is a közel kerülő fehérjék biotinilációjára. A BioID esetében eukarióta sejtekben expresszálnak egy vizsgálandó fehérjéből és a BirA*-ból képzett fúziós fehérjét. A fúziós fehérje mint egy „csali” funkcionál és a partner fehérjéhez asszociálódik, így a biotinilálódott fehérjék sejtfeltárás után szelektíven elválaszthatók és azonosíthatók. A sejtes expresszió után biotint kell adni a sejtekhez és 15-18 órára van szükség, hogy a biotin ligáz a közeli (10 nm) fehérjéket megjelölje. A ilyen jelölési technikáknál a biotinilálás specifikus, a jelölt fehérjék izolálása pedig történhet avidinnal vagy sztreptavidinnel, amelyek rendkívül nagy affinitással kötik a biotint. Mivel a biotinilálás egy kovalens fehérje-módosítás jelent, a biotinilált fehérjék ellenállnak a lízis és mosási lépések szigorú körülményeinek, így ezekkel a szükséges lépésekkel maximalizálható az izolált fehérjék tisztasága.



9. ábra: A BioID alkalmazási módja: A biotin ligáz fúziós fehérje a hozzá közel kerülő fehérje partnereket szelektíven biotinilálja. Sejtlízis és fehérje denaturáció után a biotinnal jelölt molekulák biospecifikus módszerrel elválaszthatók. Az izolált fehérjéket tömegspektrometriával vagy western blottal azonosítani lehet. Forrás: (190) alapján módosítva.

A jelölés javítható a biotin ligázok különböző változataival, például a BioID2 technikával elérték, hogy kisebb biotin koncentráció is elegendő legyen (191).

Ugyanakkor ennek a technikának is vannak korlátai. A tápfolyadékból a biotin aktívan felvételre kerül az emlős sejtek citoplazmájába (192) és szabadon diffundálhat a magig, így csökken a címkézés hatékonysága a citoplazmatikus térben. Ezenkívül a BioID-hez szükséges hosszú címkézési idő megakadályozza, hogy olyan interakciókat vizsgáljunk vele, ami rövidebb idő alatt következik be. Mivel a fehérje jelölés az enzimből történő reaktív biotin felszabadulásán alapul, előfordulhat hogy a BioID technika által azonosított fehérje nem a közvetlenül kötődő partnert, hanem csupán proximális fehérjét ejt csapdába (193).

Az egyre nagyobb módszertani igény miatt a promiszkuus biotin ligázok fejlesztése nem állt meg, az egyik legújabb résztvevője a fehérje-fehérje interakciók kutatásának a 35 kD méretű TurboID, melyet 15 mutációval áll távolabb a vad típusú BirA-tól és a még kisebb 28 kD méretű miniTurbo, amit az N-terminális törlésével és 13 mutációval hoztak létre a vad típusú BirA-ból. Ezeknek jelentős előny, hogy nem csak állati sejt kultúrákban alkalmazható, hanem férgekben is és növényekben is működik (194).

4.5.1.1. Kísérleti felállások BirA biotin ligáz alkalmazása esetén

A kísérlethez a sejteket polilizinnel (0,001 %, 1 óra) előkezelt 10 cm-es sejtenyészítő lemezekre tenyésztettük és az adherens sejteket tranziensen transzfektáltuk a CB2R-BirA fúziós fehérjét kifejező plazmiddal. A transzfekció utáni napon a sejtek médiumát 100 μ M biotin koncentrációjú komplett DMEM-re cseréltük, és ezzel egy időben a sejtek egyik felét 1 μ M szelektív CB2R agonista JWH-133-mal, a másik felét a vivőanyaggal kezeltük. Egy napos inkubáció után a sejtenyészetekről eltávolítottuk a médiumot, háromszor mostuk őket hideg 1x PBS pufferrel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) majd lemezenként 1 ml hideg, 1x proteáz inhibitor koktélt (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) tartalmazó RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA; pH 7,4) pufferben lizáltuk a sejteket. Szonikálás után 4 °C-on, 12000 g-vel, 10 percig centrifugáltuk a lizátumot. A lizátum centrifugálása után a felülúszóbót 25 μ l NeutrAvidinnel fedett agaróz gyöngyre (High Capacity NeutrAvidin® Agarose Resin, Thermo Scientific) pipettáztuk. A mintákat egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a

gyöngyökkel folyamatos forgatás mellett. Másnap háromszor 30 percig mostuk a gyöngyöket 4°C-on nagy sókoncentrációjú RIPA pufferrel (50 mM Tris-HCl, 900 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,25% sodium deoxycholate, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA; pH 7,4), végül desztillált vízzel öblítettük. A fehérjék eluáláshoz 100 µM biotin koncentrációjú, redukáló 1x mintapufferben főztük a gyöngyöket 95 °C-on, 15 percig. A hőkezelés után a mintákat 12000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszó oldatokat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.6. Glo szenzor próba

HEK-293T sejteket transzfektáltunk 6 lyukú lemezeken jelöletlen CB2R plazmidokkal (0,2 µg/pont) és GloSensor™-al (Promega, 2µg/pont), Opti-MEM® mediumban Lipofectamine 2000™ reagenssel. 6 óra múlva a sejtek médiumát lecseréltük friss DMEM-re. Másnap a sejteket áttettük 96 lyukú lemezekre 50.000-100.000 sejt/pont sűrűségben. A kísérletet 48 órával a transzfekció után végeztük. A mérés előtt lecseréltük a médiumot színtelen HBSS pufferra (Hank's Balanced Salt Solution: 1,25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,4 mM KCl, 0,4 mM KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 , 137 mM NaCl, 0,3 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM D-glucose pH 7,4), ami 1 mM luciferint és 0,1% BSA-t tartalmazott. Ebben az oldatban szobahőmérsékleten, két órán át, sötétben tartva töltöttük fel a sejteket luciferinnel. Ezután megmértük a biolumineszcenciát VarioSkan Flash készülékkel. A mérés során JWK-133 és 2-AG agonistákkal stimuláltuk a sejteket növekvő koncentrációban. A cAMP jelet az endogén β_2 -adrenerg receptorokat ingerelve (ISO, 1 µM) váltottuk ki. Az ISO-indukált cAMP-termelés gátlásának elemzéséhez összehasonlítottuk a biolumineszcenciákat 7 perccel az ISO hozzáadása után.

4.7. Western blot

A fehérjék méret szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, 12%-os gélen, 100 V feszültséggel végeztük. Az eluált fehérjemintából 25 µl-t töltöttünk a zsebekbe. Az elektroforézis után a fehérjéket 0,45 µm pórusméretű poli-vinilidén-fluorid (PVDF) membránra (IPVH00010, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

blottoltuk 100 V feszültséggel, 1 óra alatt 4°C-os környezetben. Az elsődleges antitesttel való festés előtt a membránokat 5% zsírszegény tejport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (PBST) blokkoltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Az elsődleges antitest oldatokkal a membránt egész éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk enyhe rázatás mellett. A kísérletek során alkalmazott antitestek: GRK 2 (C-15, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz), GRK 3 (C-14, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz), β -arresztin2 (C16D9, Rabbit mAb Cell Signaling), Az elsődleges festés után a membránt háromszor 15 percig mostuk 1xPBS-T (PBS 0,05%Tween) oldattal, majd 1:5000 hígítású tormaperoxidáz-kapcsolt másodlagos antitesttel (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody vagy Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling) inkubáltuk 1 órán át. Újabb három 15 perces mosás után az antitesteket kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá Immobilon Western chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) oldattal. A biotinizáció mértékét minden kísérletben az egyes mintákban Alexa670-el konjugált sztreptavidin festéssel tettük láthatóvá, Azure 700 fluoreszcencia tartományban előhívva a membránt. Az előhíváshoz Azure c600 (Biosystems) készüléket használtunk. Az eredmények denzitometrálásához Image J Software-t alkalmaztunk. Minden fehérjére kapott eredményt normalizáltunk az adott minta sztreptavidin festődésére.

Western blot az izolált aorta simaizomsejteken: Az CB₁R-gátló O2050-el (1 μ M) 10 percig előkezelt VSMC-eket Ang II-vel (100 nM) stimuláltuk 5 percig 6-lyukú lemezekben. Ezután a sejteket SDS-minta lízispufferben, proteáz és foszfátáz inhibitorokkal kiegészítve (Sigma-Aldrich) lizáltuk, ultrahanggal szonikáltuk, megfőztük és a fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk. A fehérjéket PVDF membránokra vittük át, és ERK, foszfo-ERK antitestekkel (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) festettük másnap reggelig, majd HRP-konjugált másodlagos antitestekkel (Promega, Madison, WI) inkubáltuk 1 órán át. A vizualizációt ECL reagenssel indítottuk el (SuperSignal West Pico: PierceBiotechnology Inc., Rockford, IL). Az előhívott filmeket beszkenneltük és ImageJ szoftverrel elemeztük.

2. táblázat: A Western blot analízishez használt elsődleges antitestek

Elsődleges antitest	Hígítás	Gyártó	Specifitás
GRK 2 Antibody	1:200	Santa Cruz	G-fehérje kapcsolt

(C-15) rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml		Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	receptor kináz 2 (GRK2)
GRK 3 Antibody (C-14) rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	G-fehérje kapcsolt receptor kináz 3 (GRK3)
β-Arrestin2 (C16D9) Rabbit mAb	1:2000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	β-arresztin2
Streptavidin Alexa Fluor 680	1:2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	biotin
P-p44/42 MAPK (P-Erk1/2)	1:1000	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)	P-ERK1/2
p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)	ERK1/2

4.8. Immunfestés és fluoreszcencia mikroszkópia

A patkány aortából izolált VSMC-eket, 3 cm átmérőjű fedőlemezen növesztettük, kb 75%-os konfluencia elérésekor 3x PBS mosás után 4% paraformaldehinnel fixáltuk 4°C-on 15 percig. Lemosás után a sejteket szobahőmérsékleten Tryton-X-el és Naborahidriddel kezeltük 5 és 15 percig, majd 30 percig 1%-os BSA-val blokkoltuk a sejteket, és a festést primer simaizom-aktin antitesttel (Sigma-Aldrich) és szekunder antitesttel konjugált rodaminnal (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) végeztük egész éjjel 4°C-on. Másnap a sejtmagokat 4'-6-Diamidino-2-fenilindollal (DAPI, Sigma-Aldrich) festettük meg. A fluoreszcencia detektálást Zeiss LSM mikroszkóppal végeztük. A képeket ImageJ szoftverrel véglegesítettük.

4.9. Kalcium-jel mérése

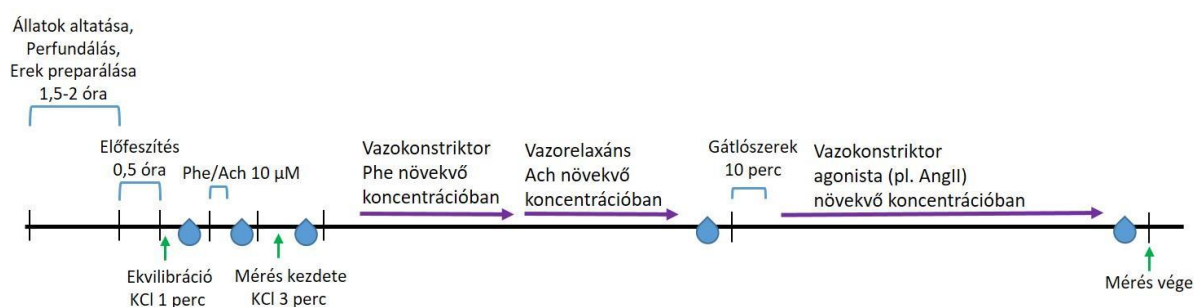
A sejtek kalciumának koncentrációjának mérése FURA2 / AM módszerrel történt. A VSMC-ket ($1,5 \times 10^5$ sejt/well) Fura2/AM fluoreszcens festékkel (2 μ M 45 percig) töltöttük sötétben szobahőmérsékleten: a sejtekhez módosított Krebs oldatot adtunk (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 0,7 mM MgSO_4 , 10 mM glukóz, 10 mM Na-Hepes; pH 7,4), amit a BRET méréseknél is használtunk, és kiegészítettük 200 μ M szulfipirazonnal. A mérés előtt a sejteket 10 percig kezeltük CB_1R gátlóval vagy MAGL gátlóval (O2050 vagy JZL184 1 μ M $n = 6-8$, 74-67 sejt). A mérés során stimuláltuk a sejteket AngII-vel (10 nM, $n = 8$, 128-120 sejt, O2050-el/JZL184-el, vagy anélkül). Inverter mikroszkópot használtunk (Axio Observer, Zeiss), ami 40x-es immerziós olajos objektívvel és Cascade II kamerával (Photometrics) volt felszerelve. A gerjesztési hullámhosszt egy xenon lámpához csatlakoztatott monokromator állította be (DeltaRAM, Photon Technology International). 5 másodpercenként készítettünk egy képet. A fluoreszcencia méréséhez a háttérből kivont felvételekből 340/380 nm arányszámot számítottak ki. Az adatok elemzéséhez MetaFluor (Molecular Devices) szoftvert használtunk. Az idő függvényében ábrázoltuk az átlagokat és a szórást (SEM).

4.10. Miográfia

Patkányok mellkasi aortáit és az egerek hasi aortáit eltávolítottuk, és hideg Krebs-oldatba helyeztük (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,17 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mM NaHCO_3 , 1,18 mM KH_2PO_4 , 0,027 mM EDTA, 10,5 mM glukóz). Aorta gyűrűket (3-4 mm) többkamrás izometrikus miográf rendszerre (Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia) helyeztük fel. A miográfok szervfürdőiben Krebs-oldattal (37 ° C, 5% CO_2 és 95% O_2 , pH 7,4) végeztük az egész kísérletet. Az izometrikus feszültség változását a korábban leírtak alapján végeztük (195). A regisztrátumhoz Powerlab rendszert és a kiértékeléshez LabChart programot (ADInstruments, Oxford, UK-Ballagi LTD, Budapest, Magyarország) használtunk.

Az érgyűrűket 30 percig ekvilibráltattuk, és pihentettük, közben folyamatosan módosítva a feszítést. Amikor elérték az 5 mN előfeszítési erőt referencia összehúzódásokat váltottunk ki hiperkalémiás (124 mM) oldattal. Farmakológiai

agonistákat vagy kumulatív koncentrációban adtuk a kádákba, vagy egyetlen adagban, szubmaximális koncentrációban adtuk. Az inhibitorokat 10 perccel az agonisták előtt alkalmaztuk. Az értágító agonistákkal történő kezelés előtt az ereket előfeszítettük Phe (fenilefrin) ($10\ \mu\text{M}$) hozzáadásával. Az endotélium épségét Ach-al ($10\ \mu\text{M}$, nitrogén-oxid-függő értágító) teszteltük, amely minden szegmenst 90–100% -kal ellazított. Az adatokat a KCl oldattal elvégzett referencia összehúzódnásra normalizáltuk (10. ábra).



10. ábra: Miográfia: Sematikus mérési protokoll. (saját ábra)

4.11. Nyomás-videó arteriográfia

A gracilis és a koronária erek vizsgálatához kis méretüknél fogva (gracilis kb. $120\ \mu\text{m}$) nyomás arteriográf rendszert használtunk. A kis ereket izolálás után hideg Krebs-oldatba helyeztük. A koronária erek esetében érzéstelenítés alatt a patkányok mellkasát kinyitottuk és a szívet tettük a Krebs-oldatba, majd izoláltuk a bal elülső leszálló koszorúérből elágazó arteriolát. Minden állatból egy szegmenst preparáltunk és mértünk. Az ér szakaszt mikrokanülökkel mindkét végén kanülálva Krebs-oldattal töltött nyomás-mikroarteriográfia kamra szövetfürdőjébe (Experimetria, Budapest) tettük. A kísérlet elején az ereket 30-60 percig hagytuk egyensúlyba kerülni $50\ \text{Hgmm}$ intraluminális nyomással. A kanülált ereket video-mikroszkóppal tettük láthatóvá, és a belső átmérőt fotózás után mértük (Leica mikroszkóp, Leica DFC 320 digitális fényképezőgép, LeicaQWin szoftver).

4.12. Statisztikai analízis

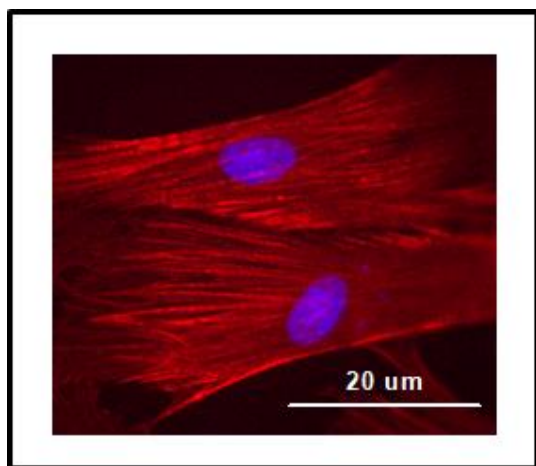
Az adatok átlag \pm standard átlag hiba (S.E.M) GraphPad Prism 9.0.0. Szoftver segítségével elemeztük, és ábráztuk. A CB₁R-al kapcsolatos kutatásban a statisztikai számításokat és a miográf adatok ábrázolását SigmaPlot segítségével és SigmaStat programcsomaggal (Systat Software Inc. San Jose, CA) végeztük. A koncentráció-válasz görbéket és inhibitor hatásokat kétszemponos ANOVA teszttel értékeltük. $P < 0,05$ valószínűségi szinteket vettünk statisztikailag szignifikánsnak. A CB₂R-al kapcsolatos kutatásban a GraphPad Prism 9.0.0. Szoftver mellett Python matplotlib és seaborn könyvtárakat használtunk az ábrázoláshoz, és a statisztikai elemzéshez. Az eredményeket kétszemponos ANOVA-val elemeztük, és Tukey post-hoc tesztjét alkalmaztuk a vad típusú és a mutáns CB₂R-ek páronkénti összehasonlítására.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A CB₁ receptor kapcsolata a G-fehérje kapcsolt receptorokkal

5.1.1. Primer aorta simaizom sejtek tenyésztése a CB₁ receptor vizsgálatához

Patkány aorta simaizom tenyésztéseink az izolálást követő 1 héttel már teljes konfluenciát értek el a sejtenyésztő 10 cm-es lemezekon, és ezeket a sejteket a klasszikus módon versene-nel és tripszinnel szedtük fel további kísérletek céljára. A simaizom sejteket fluoreszcens festéssel kimutatott aktin jelenléte alapján azonosítottuk. Az 11. ábrán látható a sejtekben az aktin festődés, és ez alapján a tenyésztünk primer simaizom tenyészetnek bizonyult. 3-4 passzálásig lehetett a számunkra megfelelő sejtszám eléréséig felszaporítani és használni a sejteket (2-3 millió sejt/tenyésztőedény).



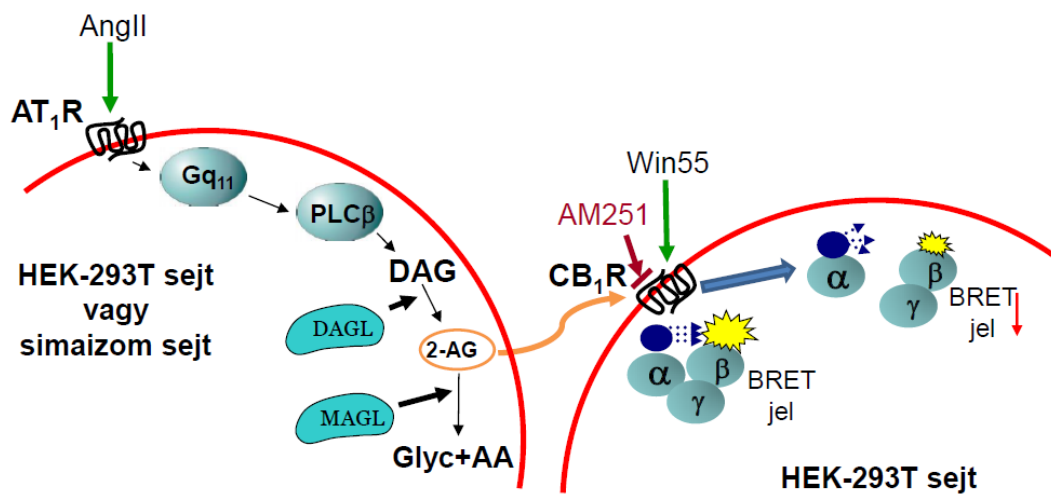
11 ábra: Simaizom-aktin festés a vaszkuláris simaizom sejtekben: A VSMC-et simaizom-aktin (piros) ellenes antitesttel festettük. A sejtmagokat a nukleáris 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, kék) magfestéssel tettük láthatóvá. (saját ábra)

5.1.2. GFKR és a CB₁R parakrin transzaktiváció primer simaizom sejteken

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy *in vitro* létrejön parakrin transzaktiváció AT₁ receptort és CB₁R-t expresszáló COS sejteken. AT₁ receptor ingerlésére endokannabinoidok szabadulnak fel, melyek a szomszédos sejteken expresszált CB₁R-okban G-fehérje aktivitást váltanak ki, ami BRET mérésekkel követhető volt. Ezt a kísérletet szerettük volna megismételni endogén AT₁R jelenlétében.

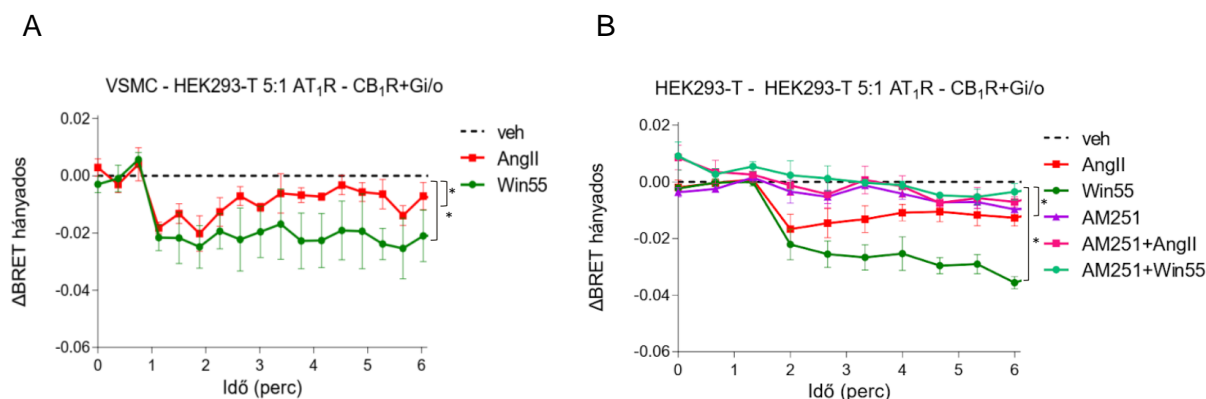
Először HEK 293T sejteken expresszáltunk AT₁ receptort, később pedig a VSMC-et használtuk és az endogén AT₁R-t stimuláltuk. Egy másik HEK 293T sejt populáción CB₁R-t a G_{i/o} BRET-hez szükséges fehérjékkel, majd másnap ezt a két sejt populációt 5:1 arányban összekeverve elvégeztük a BRET mérést.

Az alábbi sematikus ábrán (12.ábra) összefoglalom a BRET mérések elvét és a parakrin transzaktiváció feltételezett mechanizmusát:



12. ábra: Sematikus ábrázolása a BRET kísérletnek: Mivel a HEK 293T sejtek endogén módon nem fejeznek ki AT₁R-t, ezért a CB₁R-t ingerlő endokannabinoidok a másik, vagyis az AT₁R-el ellátott sejtekből származnak a G_q jelátvitel következményeként. Ha a parakrin transzaktiváció létrejön, akkor a BRET jelben egy csökkenést látunk, mert a G-fehérje egységek szétválnak, távolodnak egymástól, csökken az energiatranszfer jel. (saját ábra)

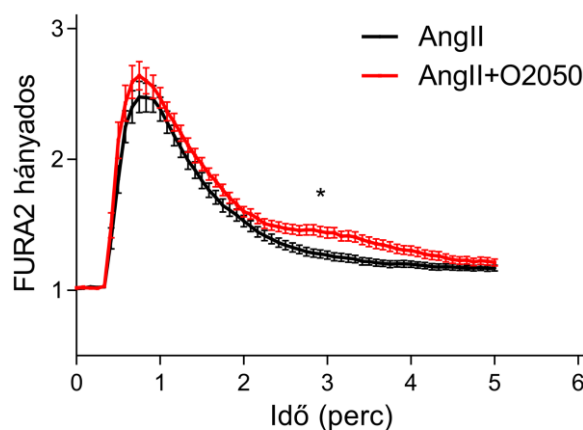
Eredményeinken láthatjuk, hogy AngII stimuláció hatására létrejön a szomszédos sejtekben a CB₁R jelátvitel, vagyis a BRET jel csökkenéséből arra következtetünk, hogy a G-fehérjék eltávolodnak egymástól. Ez az aktiváció megakadályozható volt AM251 CB₁R antagonistá előkezeléssel. Önmagában az AM251 használata nem okozott BRET jel változást (13. ábra B). A Win55 ingerlés csupán a G_{i/o} BRET rendszer működését mutató pozitív kontroll. Amikor a primer simaizom sejteket használtuk és az endogén AT₁R stimuláltuk, akkor is létrejött a parakrin transzaktiváció AngII hatására (13. ábra B).



13. ábra: Parakrin transzaktiváció mérése BRET módszerrel: A HEK-293T sejteket CB₁R és Gi/o fehérje alegységeket tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk: Renilla luciferázzal jelölt α_o alegységet (α_o -Rluc) és sárga fluoreszcens fehérjével jelzett $\beta 1$ alegységgel (EYFP). Az AT₁R-t expresszáló HEK-293T sejteket 5:1 arányban kevertük össze a CB₁R és Gi/o fehérje alegységeket expresszáló sejtekkel (A: VSMC B: HEK293-T). A BRET jelarány változását a HEK-293T sejtekben mutatjuk be, amelyeket vivőanyaggal (veh, szaggatott vonal) kezeltünk, AT₁R agonistával (100 nM angII piros vonal), neutrális CB₁R agonistával (1 μ M Win55 zöld vonal), CB₁R inverz agonistával (10 μ M AM251 lila vonal), és inverz agonista előkezelés után (10 perc) CB₁R agonistával kezeltünk (Win55, világoszöld vonal) (8×10^4 sejt / well). *: Görbe alatti terület elemzése páros t-próbával szignifikáns változást mutat a stimulus hatására (A ábra: AngII *p = 0,048 Win55 *p = 0,037; B ábra: AngII *p = 0,0347 Win55 *p = 0,0107 Átlag \pm S.E.M. n=3 Átlag \pm S.E.M. n=3) (saját ábra)

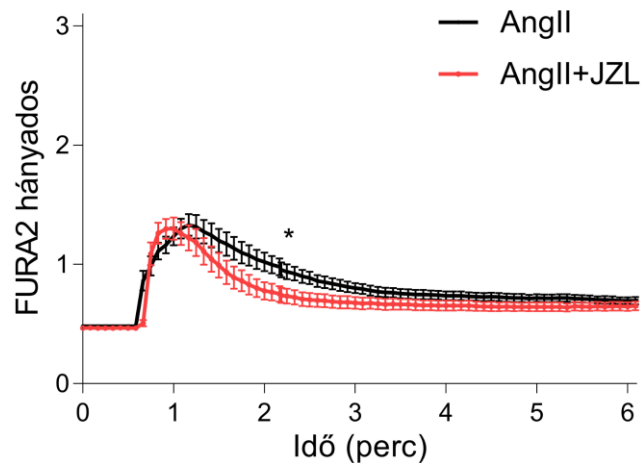
5.1.3. A CB₁R gátlás hatásai GFKR agonista által kiváltott Ca²⁺ jelre patkány aorta vaszkuláris simaizomsejteken

Az AngII (10 nM) stimuláció a citoplazmatikus kalciumszint meredek emelkedését idézte elő, amit egy lassabb lengést mutatott. A CB₁R -ok O2050 általi gátlása megnövelte az AngII-indukált kalcium jel fenntartott fázisát (14. ábra).



14. ábra: A CB₁R gátlás hatása az AngII által kiváltott kalcium szignálra tenyésztett patkány aorta vaszkuláris simaizomsejtek: Normalizált Fura2 fluoreszcencia értékek láthatók. A legelső időpontra normalizáltunk. Az 1-es típusú kannabinoid receptor (CB₁R) inhibitor O2050 (1 μ M) hatásai 5 perces angiotenzin II-vel (10 nM, 120–128 sejt O2050-el vagy anélkül). *: Görbe alatti területek összehasonlítása t-próbával. (*p < 0,05 Átlag \pm S.E.M. n = 8) (saját ábra)

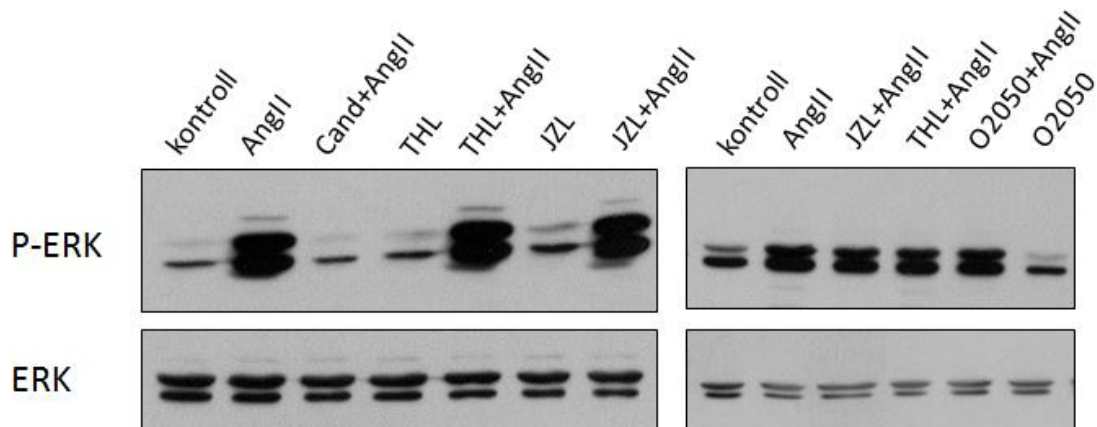
A következőkben érdekes ötletnek tűnt megnézni, hogy MAGL gátló alkalmazása (10 perc előkezelés JZL184 1 μ M) vajon befolyásolja-e az AngII kiváltotta kalcium jelet. JZL184 alkalmazásával elképzeléseink szerint az endokannabinoid 2AG szint tartósabban fent marad. Bár ezekben a kísérletekben az AngII kiváltotta jel eleve kisebbnek bizonyult mint a korábbi méréseinkben - ami összefügghet az aktuálisan használt simaizom sejtek korával, állapotával - megállapítható hogy a MAGL gátlása, és az ebből következő fenntartotta 2-AG szint a sejtekben megrövidített a kalcium jelet, így a méréseknél egy gyorsabb lecsengést tapasztaltunk (15. ábra).



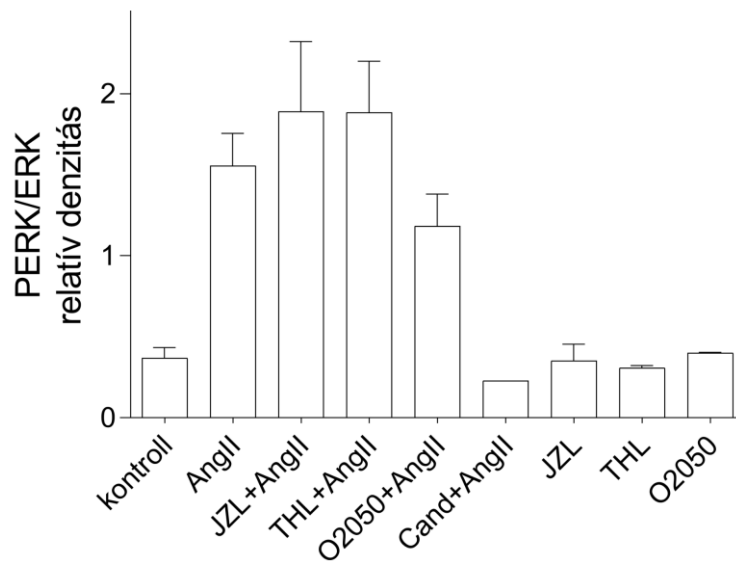
15. ábra: A MAGL gátlás hatása az AngII által kiváltott kalcium szignálra tenyésztett patkány aorta vaszkuláris simaizomsejteken: Normalizált Fura2 fluoreszcencia értékek láthatók. A legelső időpontra normalizáltunk. A MAGL gátló JZL184 (1 μ M) hatásai 5 perces angiotenzin II-vel (10 nM, 120–128 sejt JZL-el vagy anélkül). *: Görbe alatti területek összehasonlítása t-próbával szignifikáns különbséget mutatott (* $p = 0,015$ Átlag \pm S.E.M. $n = 8$). (saját ábra)

5.1.4. A CB₁ receptorok hatása a GFKR-ok ingerlésével kiváltott PERK válaszra

Az izolált simaizom sejteket western blot kísérletekre is felhasználtuk. A sejteket gátlószeres előkezelés után (10 perc) vagy gátlószer alkalmazása nélkül stimuláltuk AngII-vel (5 perc), majd mosási lépések, sejtlízis és fehérje futtatás után a blottokat PERK és total ERK ellenes antitesttel festettük (16. ábra).



16. ábra: Reprezentatív western blot felvételek: A VSMC-ket előkezeltük a specifikus inhibitorokkal (JZL184 1 μ M, THL 1 μ M, O2050 1 μ M, candesartan 1 μ M, 10 perc) és AngII-vel (100 nM, 5 perc) stimuláltuk és utána a sejteket lizáltuk. Elsődleges antitestekkel egész éjjel inkubáltuk a membránt, másnap HRP-s másodlagos antitestekkel 1 órán át. Az előhívás kemilumineszcensen történt. (saját ábra)



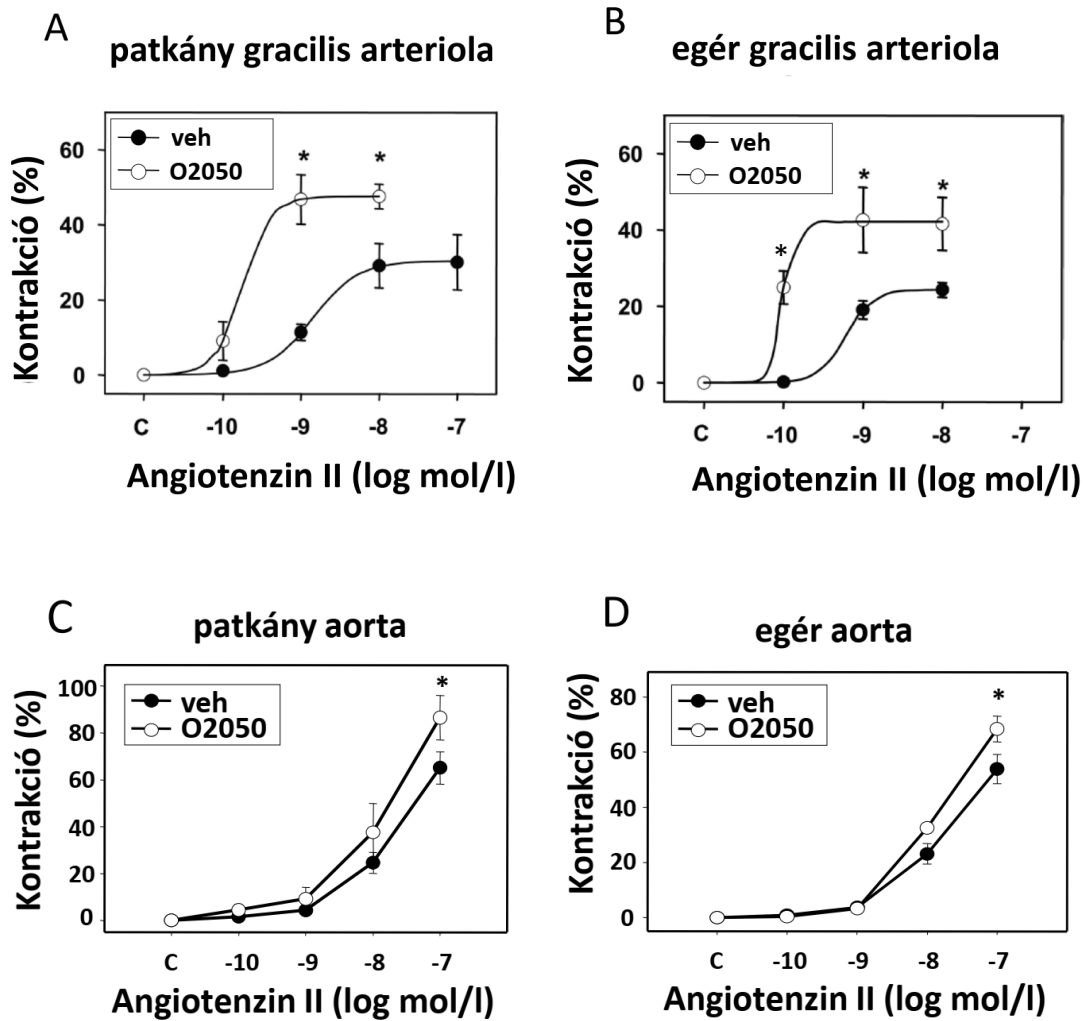
17. ábra: A Western Blot eredmények számszerűsítve: Denzitometria ImageJ programmal történt a háttér levonásával. Az adatokat a kísérleteken belüli átlagra normalizáltuk. Továbbá a PERK festést normalizáltuk a total ERK festésre. Egyszempontos ANOVA: $p = n.s.$ AngII vs. gátlószerek+AngII (Átlag \pm S.E.M. $n=1-7$). (saját ábra)

A fenti ábrákon látható (17.ábra), hogy amint azt vártuk az AngII fokozta a PERK választ a primer simaizomsejtekben. JZL184 és THL alkalmazása esetén egy enyhe

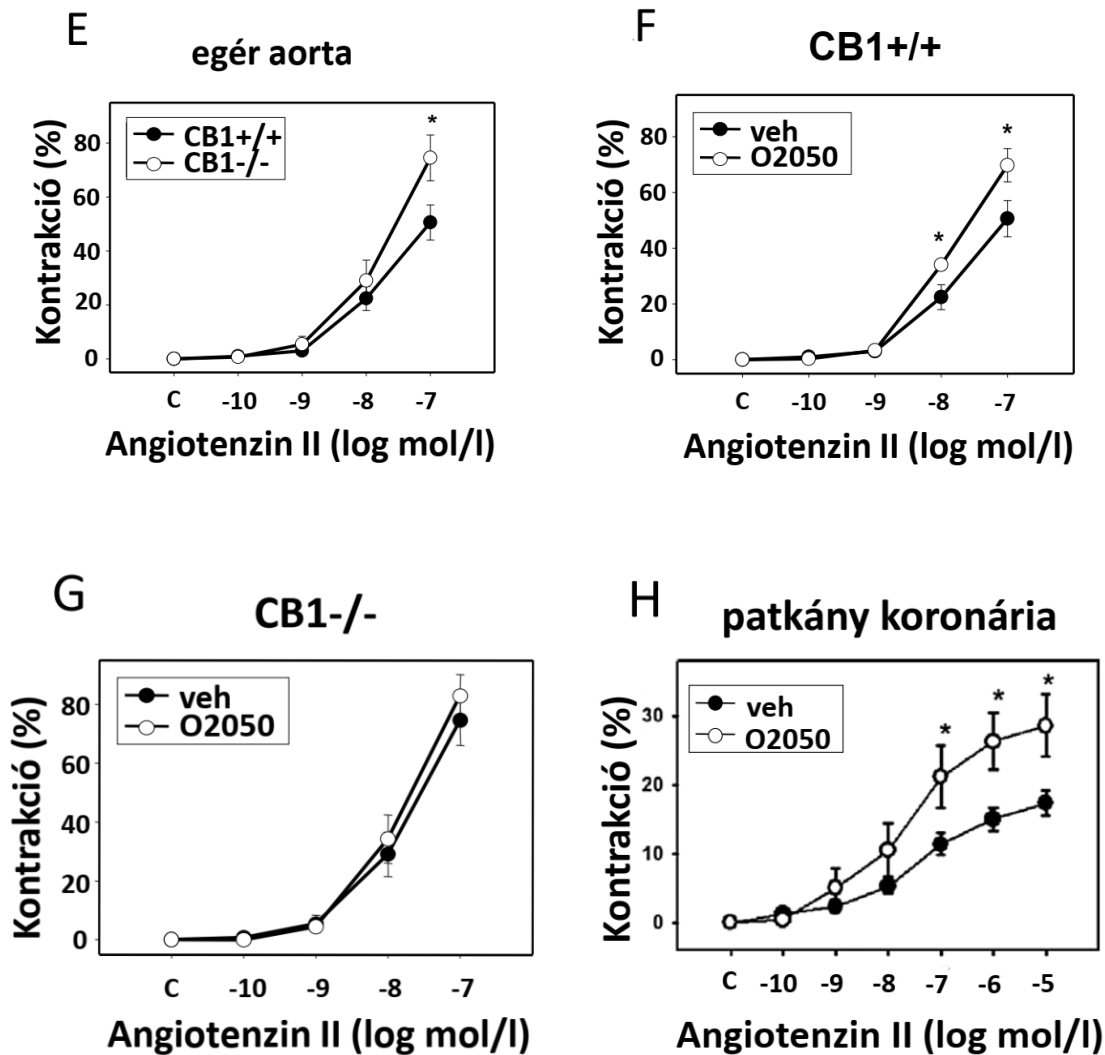
emelkedés sejthető, az O2050-el történő előkezelés pedig enyhén csökkentette az ERK foszforilációját. Ennél az elemszámnál azonban egyik gátlószeres kezelés sem okozott szignifikáns változást. A gátlószereknek önmagában nem volt hatása. Egy kísérletben látható, hogy az AT₁R blokkoló teljes mértékben gátolta az AngII kiváltotta PERK emelkedést.

5.1.5. A CB₁R antagonista hatása a AT₁R ingerlésével kiváltott ér összehúzódásra izolált ér gyűrűkön

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a kannabinoid rendszernek milyen jelentősége van az érrendszerben. Rágcsáló arteriolák majd a későbbiekben rágcsáló aorták szegmensein vizsgáltuk az érszűkületet AngII (100 nM) adása mellett. Az AngII minden esetben érszűkítő hatású volt, ami egér aortákon leellenőrizve AT₁R-függőnek bizonyult, mivel az érszűkületet AT₁R-blokkoló candesartan gátolta. Ahhoz hogy a vazoaktív GFKR és a kannabinoid rendszer összefüggését feltárjuk, CB₁R neutrális antagonistájával kezeltük elő az ereket. Az O2050 előkezelés szignifikánsan növelte az AngII hatásra létrejövő érszűkületeket patkány és egér gracilis arteriolákon (100 nM, $p < 0,05$, 18. ábra A, B) aortákat vizsgálva (C, D) és patkány koronária arteriolákon végzett kísérletekben is (H). Minden esetben megfigyelhető, hogy a dózis hatás görbék balra tolódtak. Az O2050 önmagában nem módosította az aorta szegmensek bazális tónusát.



18. ábra: A CB₁R gátlás hatásai az agonista által kiváltott válaszokra a rágcsáló erekben: A-B: Az Ang II kumulatív log-koncentráció-hatás görbéi patkány (n = 5-6) és egér (n = 4) gracilis arteriola gyűrűkőn és az 1. típusú kannabinoid receptor (CB₁R) antagonistá O2050 (1 μM) előkezelés hatása. C-D: Az Ang II kumulatív log-koncentráció-hatás görbéi patkány (n = 6-10) és egér (n = 8) aorta gyűrűkőn és az 1. típusú kannabinoid receptor (CB₁R) antagonistá O2050 (1 μM) előkezelés hatása. (saját ábra)

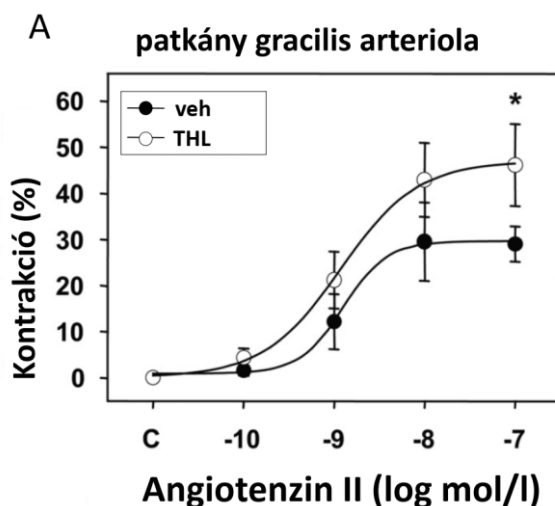


18. ábra (folytatás): A CB₁R gátlás hatásai az agonista által kiváltott válaszokra a rágcsláló erekben: E: AngII által kiváltott kontraktilis válaszok összehasonlítása a CB₁R KO és vad típusú egerek aortáin (n=5-6) F-G: A CB₁R gátlás hatásai az agonista által kiváltott válaszokra a CB₁R KO és vad típusú egerek aortáin az 1-es típusú kannabinoid receptor (CB₁R) inhibitor O2050 előkezelés után (1 μM) a két egér törzsben (n = 5-6). H: Az Ang II kumulatív log-koncentráció-hatás görbéi koronária (n = 8-10) arteriola gyűrűkön és az 1. típusú kannabinoid receptor (CB₁R) antagonistá O2050 (1 μM) előkezelés hatása.

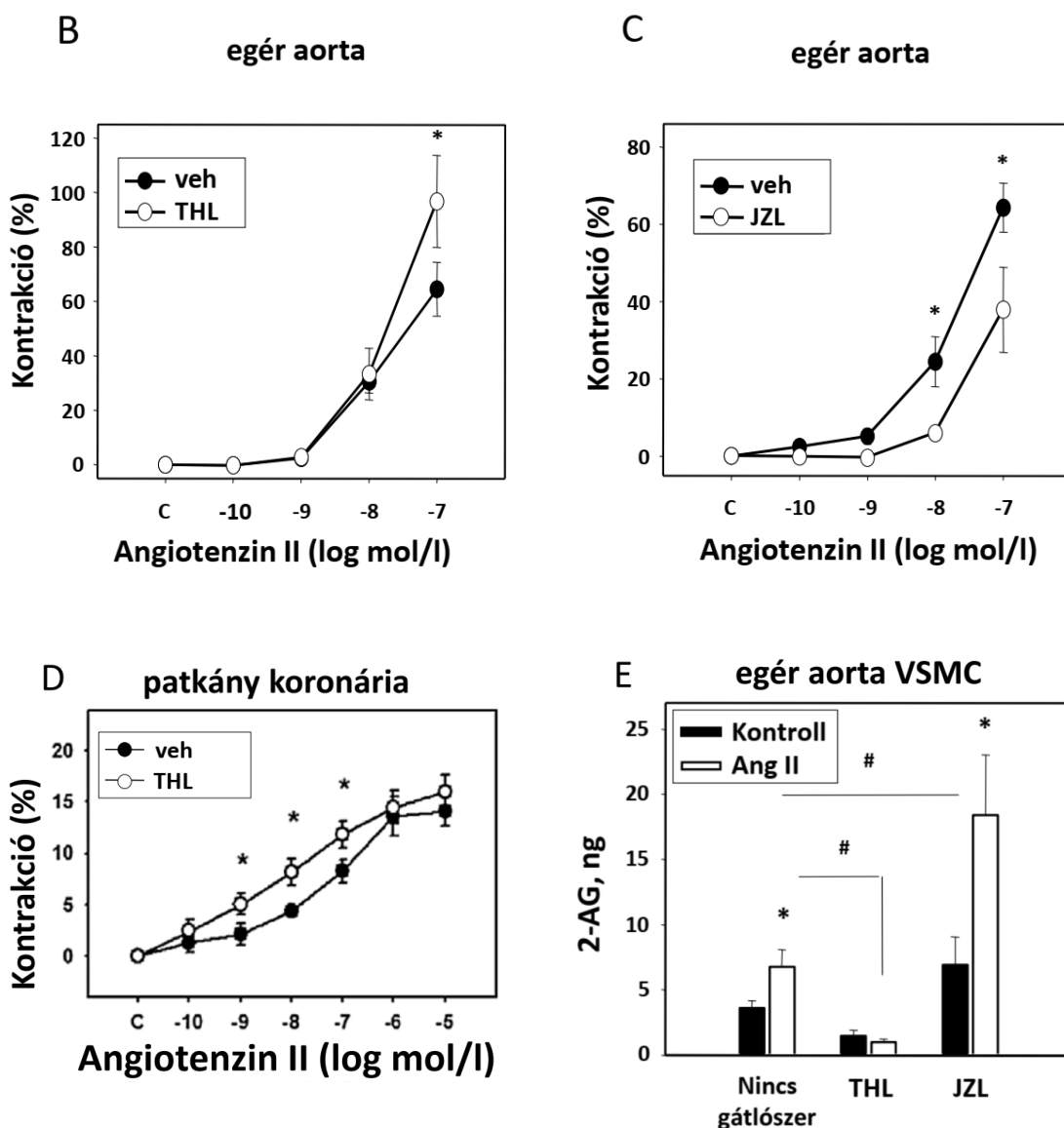
Az összehúzódot a KCl által kiváltott referencia összehúzódot százalékos értéke (124 mM) ábrázoltuk. Egy- vagy kétszemponos ANOVA-t végeztük, majd Tukey és Holm-Sidak post hoc teszteket. (*p <0,05, gátló kezeléssel és anélkül. Átlag ± S.E.M.) (saját ábra)

Vizsgálatunkban CB₁R KO egereken is megnéztük az AngII és O2050 hatását, és látható, hogy a CB₁R KO egerek aortájában növekedett az AngII kiváltotta érszűkület, a legnagyobb dózisban szignifikáns különbséget figyelhetünk meg (18. ábra E). Összehasonlítva a CB₁R^{+/+} és CB₁R^{-/-} állatokból preparált aorta gyűrűket (18. ábra F-G), látható amit vártunk is, hogy az O2050-nek nem volt hatása CB₁R hiányában.

A továbbiakban megvizsgáltuk a kannabinoid rendszer más gátlószereinek a hatását is. A THL, jól ismert DAG lipáz gátlószerezrel történő előkezelés szignifikánsan nagyobb ér összehúzódást okozott 10⁻⁷ M AngII stimulus hatására (19. ábra A-B, D). A JZL184 a MAG lipáz irreverzibilis szelektív gátlószere (196) - mely jelentősen gátolja az endokannabinoid 2-AG lebomlást anélkül hogy az anandamid mennyiségét befolyásolná - szignifikánsan csökkentette az AngII által kiváltott vazokonstriktiót már 10⁻⁸ M -os agonista koncentrációnál is (19. ábra C). Az izolált simaizomsejtekből 2-AG mérést is végeztünk, hogy lássuk AngII stimulus hatására valóban felszabadul ez az endokannabinoid a sejtekből. Látható hogy a THL előkezelés csökkentette a 2-AG keletkezését, míg a JZL184 növelte mind a bazális mind az AngII kezelésre létrejövő 2-AG szintet (19. ábra E).



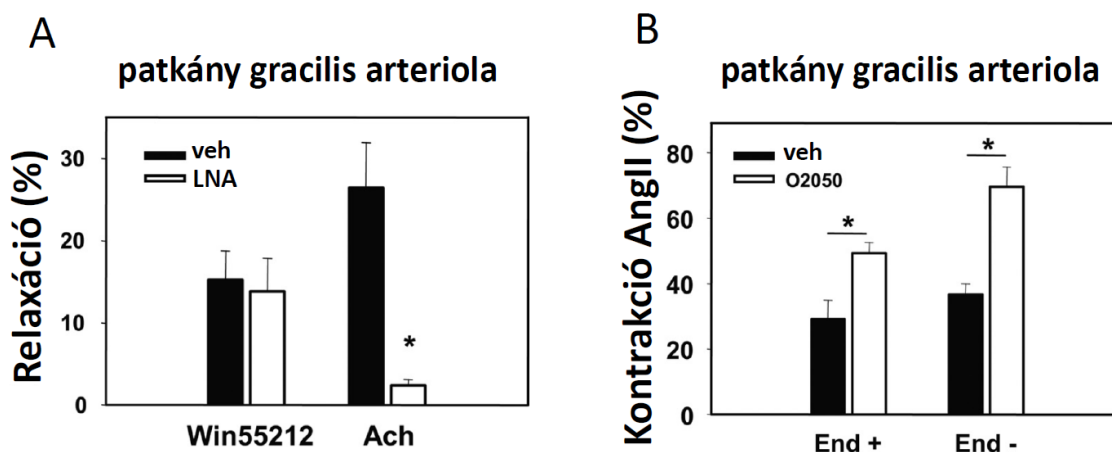
19. ábra: Endokannabinoid hatás vizsgálata az AngII által kiváltott ér összehúzódásra: A diacil -glicerín -lipáz inhibitor tetrahidrolipstatin hatása (A: THL 1 µM) és a monoacil -glicerín -lipáz inhibitor JZL184 (C: JZL 1 µM) hatása az angiotenzin II által kiváltott érszűkületben egér gracilis arteriolákon (n = 5-6) és aortákon (n = 5-8). (saját ábra)



19. ábra (folytatás): Endokannabinoid hatás vizsgálata az AngII által kiváltott ér összehúzódásra: A diacil -glicerín -lipáz inhibitor tetrahidrolipstatin hatása (A-B: THL 1 μ M) és a monoacil -glicerín -lipáz inhibitor JZL184 (C: JZL 1 μ M) hatása az angiotenzin II által kiváltott érszűkületben egér gracilis arteriolákon ($n = 5-6$) és aortákon ($n = 5-8$). D: A diacil -glicerín -lipáz inhibitor tetrahidrolipstatin hatása (THL 1 μ M) az angiotenzin II által kiváltott érszűkületben patkány koronáriákon ($n = 5-6$). Az összehúzódást a KCl (124 mM) által kiváltott referencia összehúzódás százalékos értékében ábrázoltuk. E: Egér aortából tenyésztett VSMC-kből felszabaduló 2-AG mennyiség HPLC-MS-sel mért eredménye ($n = 4-7$). Az AngII stimuláció hatásai (100 nM 5 perc), THL (1 μ M) és JZL (1 μ M) előkezelés után. Egy- vagy kétszempontos ANOVA tesztekkel végeztük, majd Tukey és Holm-Sidak post hoc tesztekkel. Átlag \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, gátló kezeléssel, fehér körök, és anélkül fekete körök. # $p < 0,05$, az AngII hatása inhibitorral és anélkül). (saját ábra)

Ezek az adatok összességében azt mutatják, hogy a felszabaduló endokannabinoid, valóban a GFKR ingerlésre jön létre, és az erekben vazodilatátor hatása van, mérsékelve az AT₁R közvetítette vazokonstrikciót. Bár ebben a disszertációban nem mutatom be, de a 2015-ös publikációban megtalálható eredmények alapján az AngII által kiváltottakhoz hasonlóan, az O2050 előkezelés szignifikánsan fokozta az NE (1 μ M agonista koncentrációnál), és a Phe kiváltott érszűkületet is (100 nM koncentrációnál), mind patkány, mind egér aortákon.

Azért, hogy teszteljük a kannabinoidhatások NO/endothelfüggését a WIN55212 és az Ang II hatásait NOS gátló LNA-val és endotélium irtással is vizsgáltuk (20. ábra).



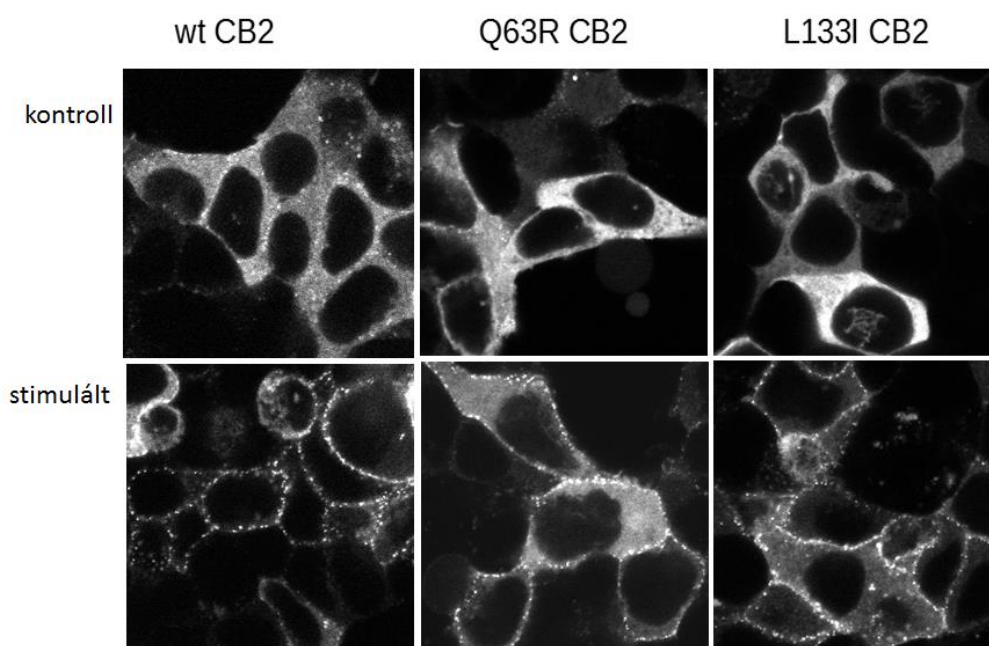
20. Ábra: Az endotél szerepe az agonisták által kiváltott válaszokban: Értónus változás adatok patkány gracilis arteriolákon mért nyomás-arteriográfiával. A: LNA (10 μ M) NO-szintézis inhibitor hatása a Win55212 (1 μ M) és az Ach (10 μ M) által kiváltott értágulásra. B: O2050 (1 μ M) hatását mutatja az Ang II (10 nM) által kiváltott vazokonstrikcióra az intakt endotéllel rendelkező szegmensekben és az endotél eltávolítása után. (* $p < 0,05$ Átlag \pm S.E.M $n=4-5$): ANOVA elemzés szignifikáns változást mutat az inhibitoros kezelés hatására. (saját ábra)

Az NO-szintézis gátlása N ω -nitro-L-argininnel szignifikánsan növelte a gracilis arteriolák alaptónusát (~10%-kal). Az LNA hatékonyan gátolta az Ach által kiváltott vazodilatációt is, de nem módosította jelentősen az Ang II által kiváltott vazokonstrikciót, és nem befolyásolta a Win55212 által kiváltott vazodilatációt sem (20. Ábra A). Az endotél roncsolása nem befolyásolta az O2050 hatását az Ang II által kiváltott vazokonstrikcióra (20. Ábra B). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Ang II által kiváltott vazokonstrikció CB₁R által közvetített modulációja független az NO-termelődéstől és az endotélfunkciótól.

5.2. A CB₂ receptor és polimorfizmusainak vizsgálata

5.2.1. A CB₂ receptor és polimorfizmusainak kapcsolata β -arresztin2-vel és GRK fehérjékkel

A β -arresztinek aktiválása minden GFKR-nál nagy jelentőségű esemény a jelátvitel folytatása szempontjából, ezért a CB₂R polimorfizmusok vizsgálatánál először megnéztük a mutáns receptorok hogyan kötik a β -arresztin-t. Mivel a CB₂R a plazmamembrán közelében csak átmenetileg kötődik a β -arresztinekhez az A osztályú receptorokhoz tartozik (197), és az A osztályú receptorokról ismert, hogy erősebben kötik a β -arresztin2-t, mint a β -arresztin1, ezért először konfokális mikroszkóppal követtük a β -arresztin2 toborzást (21. ábra).

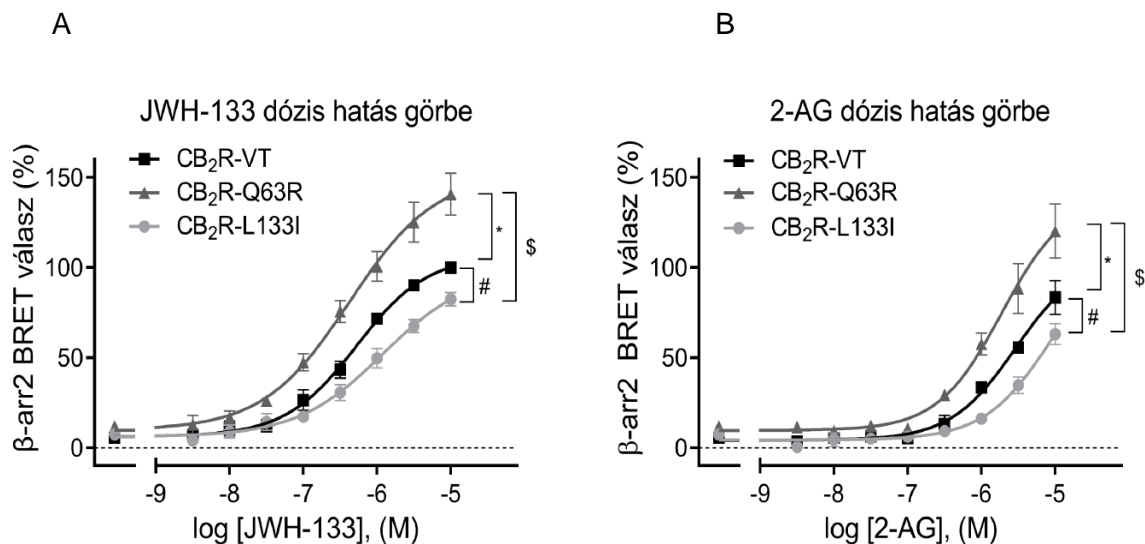


21. ábra: A β -arresztin2 lokalizáció: HEK-293T sejteket kotranszfektáltunk CB₂ receptorokkal és β -arr2-mVenus-al. A sejteket stimuláltuk JWH-133-al (10 μ M) 1 órát, utána a felvételeket Zeiss LSM510 konfokális mikroszkóppal készítettük. (saját ábra)

A három receptor agonista stimulációja a Venus-al jelölt β -arresztin2 plazmamembrán transzlokációját eredményezte, lefűződött intracelluláris vezikulákban nem láttunk β -arresztin2-t. Vizuálisan nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a receptor altípusok között, így a β -arresztin2 kötődés mértékének számszerűsítése

érdekében valós idejű biolumineszcencia rezonancia energia transzfer (BRET) méréseket hajtottunk végre.

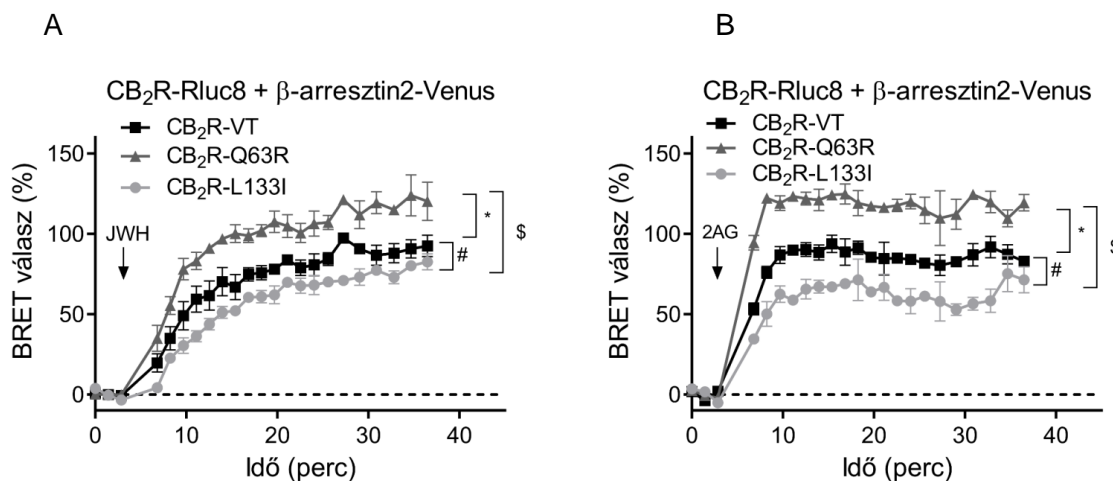
A mutáns receptorok aktivációját β -arresztin2- kötással és a G_i -fehérje aktiválással is jellemeztük a BRET mérések során. Kísérleteinkben YFP-vel jelölt receptorokat és Rluc-cal jelölt β -arresztin2-t termelő HEK 293T sejteket használtunk. Kétféle agonista dózisfüggő hatását vizsgáltuk, a szelektív CB₂R agonista JWH-133-t, továbbá a nem szelektív agonista endokannabinoid 2-AG hatását. Az eredményeket a vad típusú receptoron mért maximális hatásra normalizáltuk.



22. ábra: CB₂ receptorok β -arresztin2 kötésének dózis hatás görbéi: CB₂R-VT (fekete négyzet) CB₂R-Q63R (szürke háromszög) and CB₂R-L133I (világos szürke kör) HEK 293T sejtekben növekvő dózisban adva a JWH-133-at és a 2-AG-t. Az eredményeket kétszemponos ANOVA-val (stimuláció és mutáció) elemeztük, és Tukey post-hoc tesztjét alkalmaztuk a vad típusú és mutáns CB₂R páronkénti összehasonlítására. ($p < 0,001$ Átlag \pm S.E.M $n=4$). *, #, \$ szignifikáns különbséget mutat a kontroll és a CB₂R-Q63R, a kontroll és a CB₂R-L133I, valamint a CB₂R-L133I és a CB₂R-Q63R között. (saját ábra)

Mindkét agonista esetén látható a fenti ábrákon (22. ábra), hogy a Q63R mutáns megnövekedett β -arresztin2-kötésre képes, mely különbség a nagyobb koncentrációknál jobban érvényesül. Továbbá a vad típusú receptorhoz képest csökkent β -arresztin2-kötést mértünk az L133I receptor esetében mindkét agonista használatát követően.

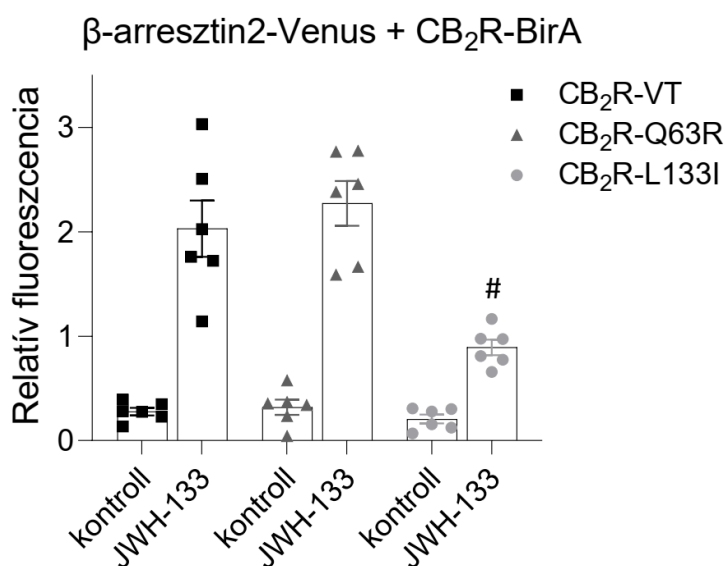
BRET-el a β -arresztin2-kötés kinetikája is nyomon követhető. A kinetikus mérések eredményeit mutatja a következő ábra (23. ábra) JWH-133 és 2-AG ingerlést követően.



23. ábra: CB₂ receptorok és β -arresztin2 kötődés kinetikája: HEK-293T sejtekben CB₂R-VT–Rluc8 és β arr2-Venus koexpresszió után stimulálás JWH-133-val (10 μ M) és 2AG-val (10 μ M). A méréseket a vivőanyagra normalizáltuk, a nyíl a stimulálás idő pillanatát mutatja. A CB₂R-Rluc8 konstrukciókat (CB₂R-VT: fekete négyzetek, CB₂R-Q63R: szürke háromszögek vagy CB₂R-L133I: szürke körök) együtt expresszáltuk β -arresztin2–Venus-szal a HEK293T sejtekben, és BRET-et mértünk JWH-133 (10 μ M, A) vagy 2AG (10 μ M, B) inger hatására. Az adatok a 10⁻⁵ M JWH-133-ra adott maximális válasz százalékában vannak feltüntetve. A nyilak jelzik a stimuláció időpontját. A görbe alatti területet elemeztük páros t-próbával. A *, #, \$ szignifikáns különbséget mutat a CB₂R-VTR és a CB₂R-Q63R, a CB₂R-VTR és a CB₂R-L133I, valamint a CB₂R-L133I és a CB₂R-Q63R között (A ábrán: *p=0,0159 #p=0,0319 \$p=0,0057 B ábrán: *p=0,0011 #p=0,0327 \$p=0,0094 Átlag \pm S.E.M n=3). (saját ábra)

Annak érdekében, hogy a fenti eredményeket egy másik technikával ellenőrizhessük, enzimatis biotinizáció módszerét alkalmaztunk, és számszerűsítettük a CB₂R-ok és a β -arresztin2 közötti kölcsönhatást. A HEK-293T sejteket együtt transzfektáltuk a BirA-R188G biotin-ligázzal (CB₂R-BirA) és a β -arresztin2 – Venus-szal jelölt receptorokkal (24. ábra). Az R188G mutáció a BirA-t promiszkus biotin-ligázzá alakítja, így a jelölt fehérje közelében található fehérjék nem specifikusan biotinizálódnak (190). 10 μ M JWH-133-mal végzett stimuláció után biotinnal jelölt β -arresztin2-Venus-t izoláltunk a NeutrAvidin gyöngyökkel. A megkötött β -arresztin2 mennyiségét a Venusz

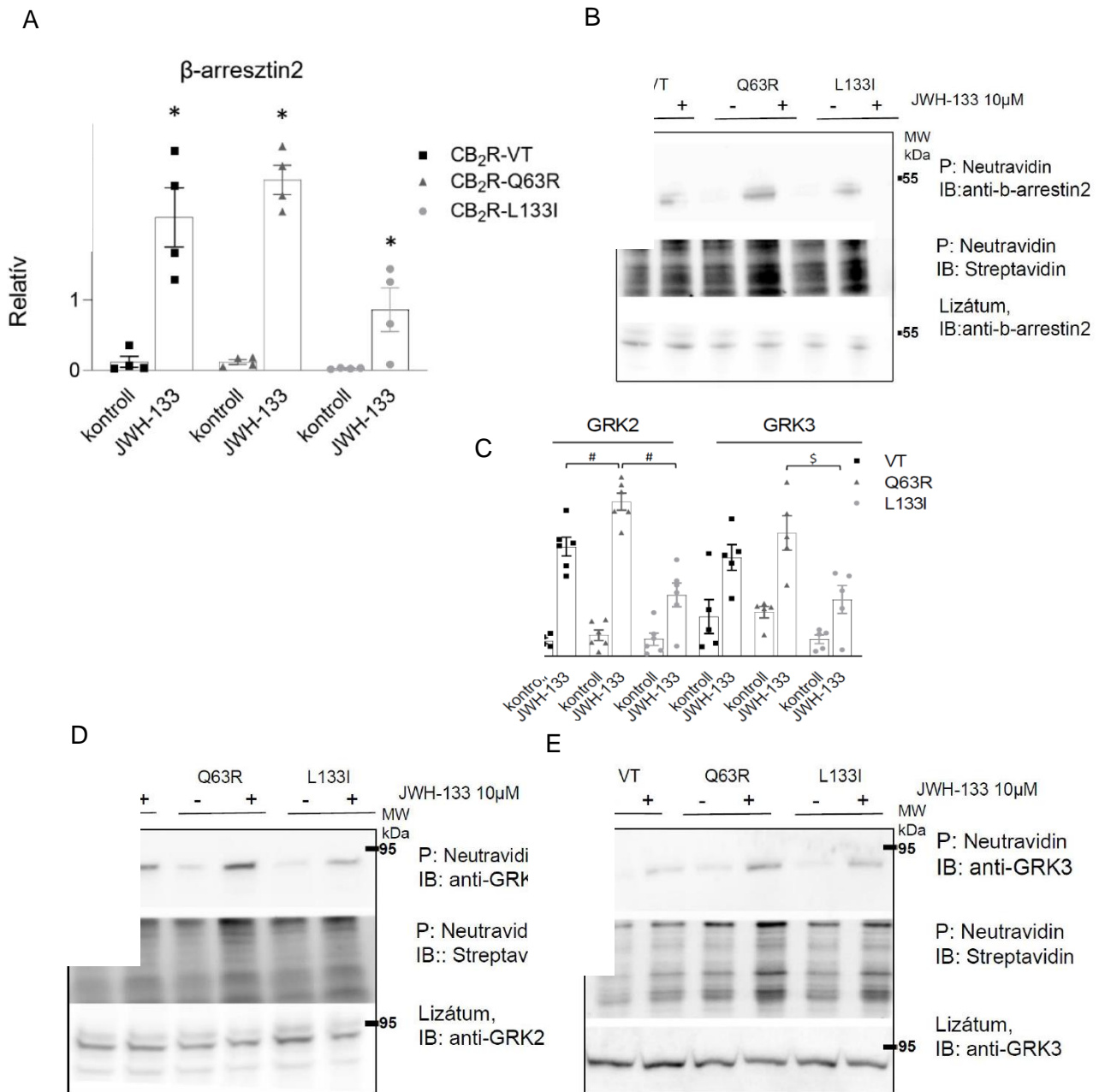
fluoreszcenciájának a gyöngyökön történő mérésével határoztuk meg. A JWH-133 β -arresztin2 kötődést indukált mindegyik CB₂R-BirA receptorhoz. A BRET kísérletek eredményeihez hasonlóan a Q63R-CB₂R-BirA stimuláció emelkedett, az L133I-CB₂R-BirA stimuláció pedig a β -arresztin2-Venus jel csökkenéséhez vezetett a vad típusú receptorokhoz képest.



24. Ábra: CB₂R és β -arresztin2 kötődésének vizsgálata affinitás precipitációval: JWH-133 stimuláció hatására β -arresztin2 erősebben kötődik a receptorhoz mint a kontroll állapotban. HEK 293T sejteket transzfektáltunk β -arresztin2-mVenus -al és a CB₂R-okkal ahol a plazmid BirA-R188G-val fűzőnált. 10 μ M JWH-133 stimuláció után, a sejteket lizáltuk és a biotinnal jelölt β -arresztin2 húztuk le NeutrAvidin gyöngyökkel. A Venus fluoreszcenciáját Varioskan plate readerrel mértük le. A kísérletek átlagára normalizáltunk. Az eredményeket kétszemponyos ANOVA-val (stimuláció és mutáció) elemeztük # jelzi a mutációk hatását az ANOVA-elemzés eredményeire. #: A Tukey post-hoc teszt szignifikáns különbséget jelez a CB₂R-WT és a CB₂R-L133I, valamint a CB₂R-Q63R és a CB₂R-L133I között a stimulált minták esetében a páronkénti összehasonlításban ($p < 0,05$ Átlag \pm S.E.M. $n = 6$). (saját ábra)

A GFKR-okhoz való β -arresztin2 kötődését a GRK-ok szabályozzák. Annak tesztelésére, hogy a CB₂R mutációi befolyásolják-e a GRK kötést, közelségi biotin-jelölő kísérleteket hajtottunk végre. A receptorok stimulálása után az endogén, biotinilált GRK2 és GRK3 fehérjéket, valamint a β -arresztin2-t lehúztuk és Western-blot segítségével detektáltuk (25. ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy a receptorok JWH-133-mal

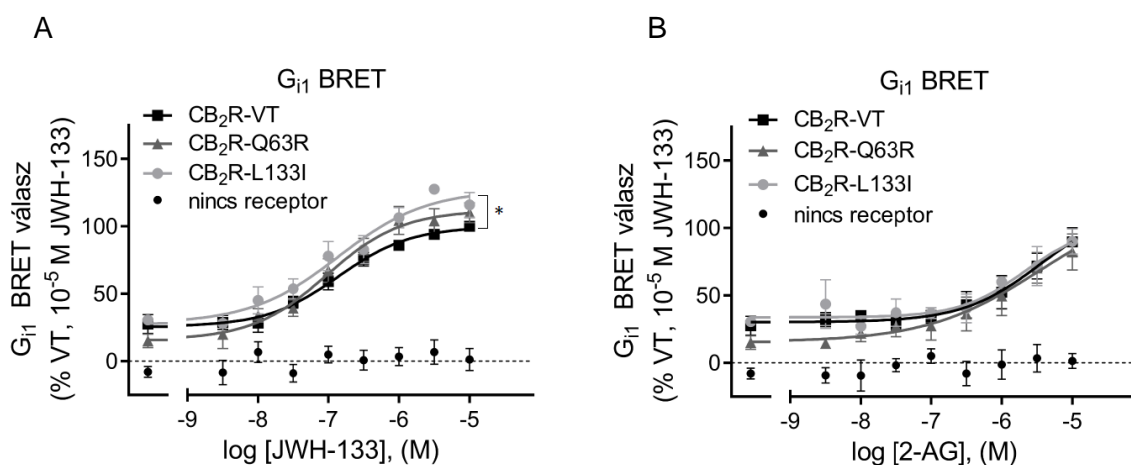
történő stimulálására endogén β -arresztin2-t kötnek, mely anti- β -arresztin2 antitesttel kimutatható volt. Az adatok statisztikai értékelés szignifikáns különbséget mutat a stimuláció hatására (25. Ábra A). Az endogén GRK2 és GRK3 mintákban a fehérjék szintén feldúsultak JWH-133 hatására, mutatva a fehérjék kölcsönhatását az aktivált receptorral. A stimulációnak csak a GRK2 esetében volt szignifikáns a hatása. Mindkét vizsgált GRK fehérje kötésére a CB₂R mutációinak is szignifikáns hatása volt, a Q63R erősebben kötődött a GRK2 és GRK3 fehérjékhez mint a többi CB₂ receptor (25. Ábra B). A denzitometria eredményeit a sztreptavidin festésre normalizáltuk.



25. Ábra: Western blot eredmény: Endogén β-arresztin2, GRK2 és GRK3 festése az affinitás precipitáció után. A-C: denzitometráls kiértékelése. B, D-E: reprezentatív blottok. A sejtlizátumokat és a lehúzható frakciókat Western-blotokban analizáltuk GRK2 és GRK3 elleni antitestekkel (Santa Cruz), majd HRP-konjugált másodlagos antitestekkel kezeltük. A blotokat Alexa680-sztreptavidinnel is festettük, hogy értékeljük a teljes fehérje mennyiséget a lehúzás során. Denzitometriát végeztünk Image J szoftver segítségével. Az eredményeket kétszemponos ANOVA-val (stimuláció és mutáció) elemeztük. Az A panelen * a stimuláció hatására szignifikáns változást jelez (n = 4). A C panelen # szignifikáns különbséget jelez a Q63R mutánsához képest, és a \$ szignifikáns különbséget mutat a Q63R és az L133I között a post-hoc tesztben (Tukey) páros összehasonlításokban (p < 0,05 Átlag ± S.E.M. n = 6–5). (saját ábra)

5.2.2. A CB₂ receptor és polimorfizmusainak G-fehérje kötés vizsgálata

Megvizsgáltuk, hogy a két mutáció befolyásolja-e a receptor G-fehérje aktivitását (26. ábra). A CB₂R köztudottan aktiválja a G-proteinek G_{i/o} alcsaládját és csökkenti az intracelluláris cAMP-szinteket. Először a nem jelölt CB₂R-ek bazális és agonista indukálta G_{i1}-aktivációját értékeltük G_{i1} biolumineszcenciás rezonancia energiatranszfer (BRET) szenzor segítségével. Az alap aktivitást az inverz AM630 agonistával végzett kezeléssel határoztuk meg, és JWH-133-at vagy 2-arachidonoil-glicerint (2-AG) alkalmaztunk agonistaként.

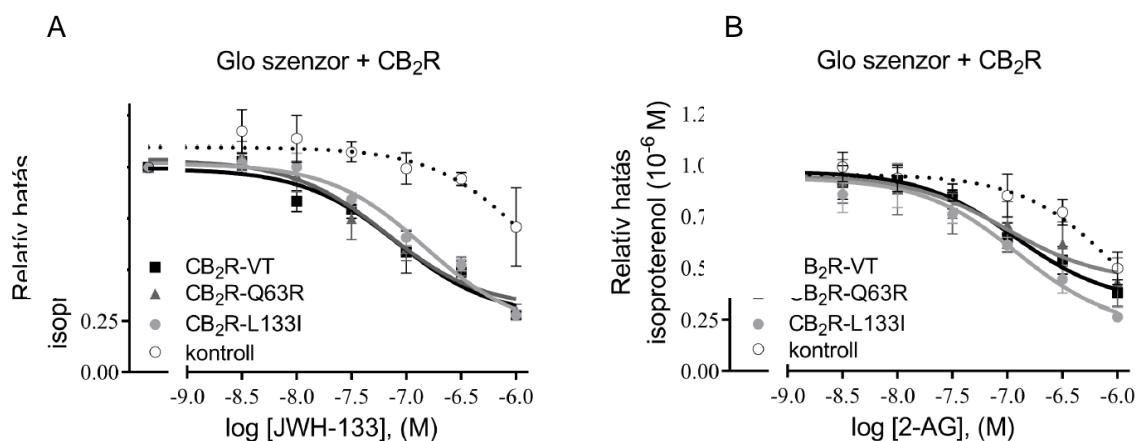


26. ábra: G-fehérje aktiváció: HEK-293T sejteket transzfektáltunk Gαi1–Rluc8-al Venus-β1, és γ2 plazmidokkal. A cAMP szint létrehozásához a sejteket AM630-al kezeltük elő, erre normalizáltunk. A dózis hatás görbék a CB₂R-ok G-fehérje aktivációját mutatják: CB₂R-VT (fekete négyzet) CB₂R-Q63R (szürke háromszög) és CB₂R-L133I (világos szürke kör) növekvő dózisú JWH-133 (A) vagy 2-AG (B) stimulus hatására. Az eredményeket kétszemponos ANOVA-val (stimuláció és expresszált receptor) elemeztük, és Tukey post-hoc tesztjét alkalmaztuk a vad típusú és mutáns CB₂R páros összehasonlítására. * szignifikáns különbséget jelez a vad típusú CB₂R és a CB₂R-L133I között (p < 0,001). B: A receptorok közötti összehasonlításban nem volt szignifikáns különbség, de az összes receptor különbözött a kontrolltól. (Átlag ± S.E.M. n=4) (saját ábra)

Nem találtunk szignifikáns különbséget a mutáns receptorok 2-AG által kiváltott koncentráció-válasz görbéi között, a JWH-133-nak kezelés csak az L133I és a vad típusú receptor között okozott szignifikáns különbséget. A Q63R mutáns bazális aktivitása alacsonyabb volt a vad típusú és az L133I mutat CB₂R-okhoz képest.

A CB₂R mutánsok endogén expresszált G-fehérjékkel történő aktivitásának teszteléséhez Glo szenzort használtunk (27. ábra), amely detektálja a sejtekben az

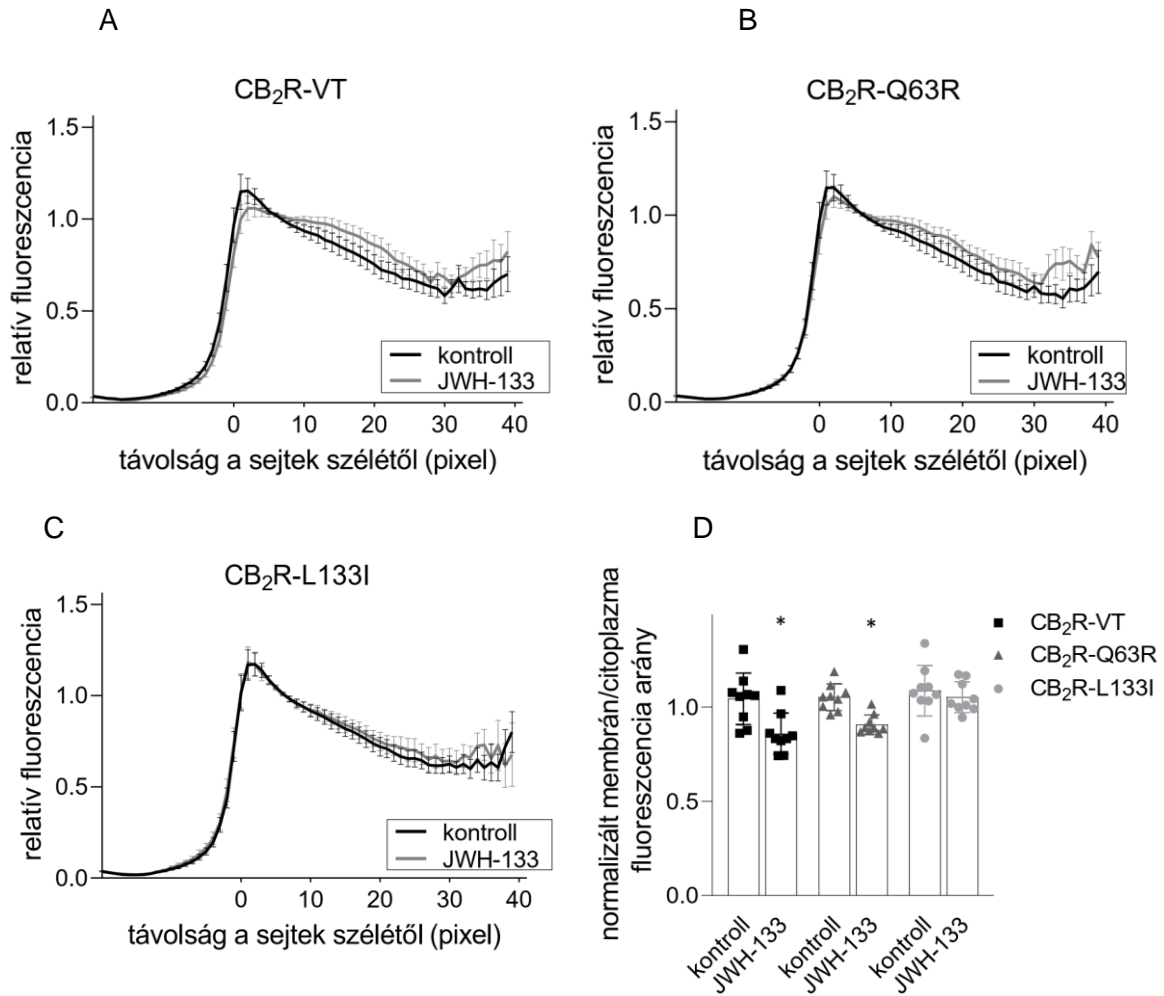
endogén cAMP szinteket. A cAMP jelet a sejtekben az endogén expresszált β 2-adrenerg receptorok izoproterenollal történő stimulálásával hoztuk létre, ezzel egyidejűleg aktiváltuk $G_{i/o}$ -aktiváló CB_2R -okat. A korábbi eredményekhez hasonlóan nem észleltünk különbséget a vad típusú és a mutáns CB_2 receptorok között. Ebből arra következtetünk, hogy a Q63R és L133I mutációknak nincs szignifikáns hatása a CB_2R G-fehérje aktivitásra.



27. ábra: A CB_2 receptorok kiváltotta cAMP jel: A sejteket GloSensor™ (Promega) plazmiddal transzfektáltuk, a kontroll sejtek nem tartalmaztak CB_2R -t. A cAMP jel 1 μ M ISO kezeléssel hoztuk létre. A: JWH-133 kezelés hatása az izoproterenol indukált cAMP keletkezésére a három CB_2R -nál. Az ISO által indukált cAMP jel a CB_2R stimulációval csökken. A sejteket együtt transzfektáltuk CB_2R -ekkel és a GloSensor-szal, és a kontroll sejtekben nem expresszáltak CB_2R -t. A cAMP jelet 1 μ M ISO-val indukáltuk. Az adatok a JWH-133 (A) vagy a 2-AG (B) kezelés hatását mutatják a három CB_2R cAMP-képződésére. Az eredményeket kétszemponyos ANOVA-val (inger és expresszált receptor) elemeztük, és Tukey post-hoc tesztjét alkalmaztuk a vad típusú és mutáns CB_2R páros összehasonlítására. A CB_2R -ek között nem volt szignifikáns különbség. (Átlag \pm S.E.M. n=4) (saját ábra)

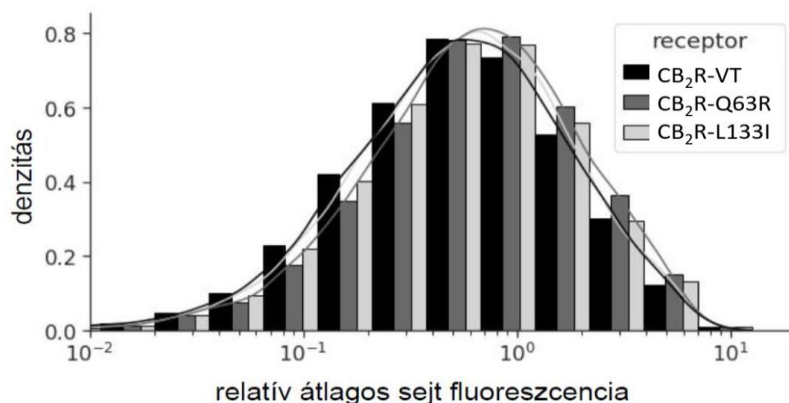
5.2.3. A CB_2 receptor és polimorfizmusainak intracelluláris eloszlása

A mutáns receptorok intracelluláris eloszlásának vizsgálatához sárga fluoreszcens fehérje (YFP)-jelölt CB_2R -eket expresszáltunk HEK 293T sejtekben. Konfokális mikroszkópos felvételek készítése után a sejteket cellpose algoritmusmal azonosítottuk (198). Elemeztük a teljes fluoreszcenciát (28. ábra E) és a sejtek széléhez viszonyított receptor fluoreszcenciák intenzitásának eloszlását (28. ábra A-C).



28. ábra: CB₂ receptorok eloszlás a HEK 293T sejtekben JWH-133-mal történő stimulációt követően: A HEK 293T sejteket együtt transzfektáltuk YFP-vel jelölt CB₂R mutánsokkal és a plazmamembrán marker L10-ceruleannal. Konfokális mikroszkópos képeket Zeiss LSM 710 konfokális lézerszkennelő mikroszkóppal készítettünk, és a sejteket cellpose, egy neurális hálózaton alapuló algoritmussal detektáltuk (lásd Módszerek). A-C: A sejtek fluoreszcencia profilját úgy határoztuk meg, hogy az egyes kontúrok alatti átlagos fluoreszcenciát mértük a kontroll és stimulált HEK 293T sejtekben, sejtek CB₂R-VT-YFP, CB₂R-Q63R-YFP vagy CB₂R-L133I-YFP plazmidokat expresszálnak. Átlagos értékek \pm S.E.M. ábrákon látható ($n = 9$, összesen ~ 50.000 sejt). D: Membrán (0-5 pixel a sejt szélétől) / citoplazma (> 5 pixel a sejt szélétől) fluoreszcencia arányok a vad típusú és mutáns CB₂R-ekhez a kontroll és stimulált sejtekben. (Átlag \pm S.E.M $n = 9$) * szignifikáns különbséget jelez a kontroll és az stimulált minták között ($p < 0,05$), amelyeket kétszemponos ANOVA-val (stimuláció, mutáció) elemeztük Tukey post hoc tesztjével. (saját ábra)

E



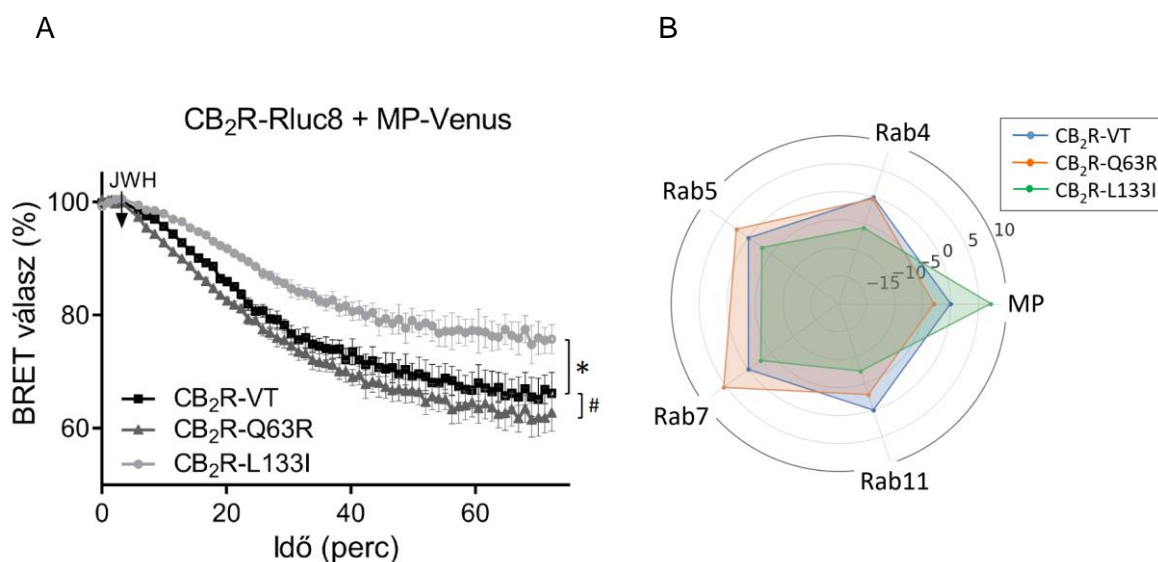
28. ábra (folytatás): CB₂ receptorok eloszlás a HEK 293T sejtekben JWH-133-mal történő stimulációt követően: E: Sejtek fluoreszcencia eloszlás a 9 kísérletben. A fluoreszcenciát az összes kísérlet átlagos sejt-fluoreszcenciájára normalizáltuk. Ebben a kiértékelésben a kontroll és stimulált sejtekről készült összes felvétel szerepel (saját ábra).

Azt tapasztaltuk, hogy receptorok hasonló expresszióval (28. ábra E) és sejten belüli eloszlással rendelkeztek, erősebb intenzitás-csúcsokat mértünk a sejtek széle közelében (28. ábra A-C). A sejtekben található receptorok hasonló membrán expressziója arra utal, hogy a β -arresztin2 kötődésében észlelt különbségeket nem a megváltozott intracelluláris eloszlás okozza. Amikor a sejteket 1 órán át JWH-133-mal stimuláltuk (28. ábra D), az eloszlási profil jelentősen megváltozott: mind a vad típusú, mind a Q63R mutáns receptorok alacsonyabb fluoreszcenciával láthatóak a sejtmembránban és magasabb fluoreszcenciával a citoplazmában. Az L133I mutáció esetében azonban az eloszlás változása nem volt szignifikáns.

5.2.4. A CB₂ receptor és polimorfizmusainak hatása a receptor internalizációra

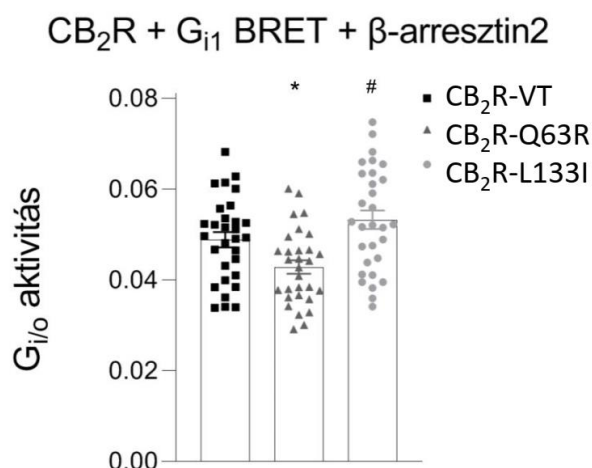
A receptorok internalizációjának követésére bystander BRET-el (72) (45) vizsgáltuk a receptorok eltávolodását a plazmamembránról, és megérkezésüket különböző Rab fehérjékkel jelzett vezikulákba. BRET-t detektáltunk az Rluc8-jelölt receptorok és egy Vénusz-jelölt plazmamembrán vagy intracelluláris vezikulák lokalizációs markerei (Rab fehérjék) között. A plazmamembránt mirisztoiláció-

palmitoiláció célszekvenciával (MP-Venus) jelöltük, míg az intracelluláris vezikulákat különböző Rab kis G-fehérjék jelölik, amelyeket Venus fluoreszcens fehérjével jelöltek: Rab4-Venus azok az endoszómák amik gyors újrahasznosításra kerülnek, Rab5-Venus a korai endoszómákat jelöli, Rab7-Venus a késői endoszómákban található és a Rab11-Venus a késői újrahasznosításra kerülő endoszómákban. Amint az 29. ábrán látszik stimuláció hatására a receptorok eltávolodnak a plazmamembránról. Az internalizációs mintázat megfeleltethető a mutáns receptorokkal megfigyelt β -arresztin2 kötődési mintázatoknak. Vagyis a CB₂R-Q63R, amely erősebben kapcsolódik a β -arresztin2-hez, szintén kissé fokozta a membránból való lefűződését és ezzel együtt a receptor megjelenését a Rab5 és Rab7 endoszómákban. A CB₂R-L133I, amely gyengébben kapcsolódik a β -arresztin2-hez, lassabb internalizációt mutatott és lassabban jelent meg mind a négy típusú endoszómában (29. Ábra B).



29. ábra: Receptorok internalizációs vizsgálata: A: CB₂R-Rluc8-VT (fekete négyzetek) CB₂R-Rluc8-Q63R (szürke háromszögek) és a CB₂R-Rluc8-L133I (világos szürke körök) expresszáltattuk HEK 293T sejtekben Venus-jelölt membrán markerekkel. A sejtmembránt MP-Venus-val jelöltük. A statisztikai elemzést a görbe alatti területre egyszempontos ANOVA-val (mutáció) végeztük, amelyet Tukey post-hoc tesztje követett. * és # szignifikáns különbségeket jeleznek a páronkénti összehasonlításokban, CB₂R-L133I és a CB₂R-VT, illetve a CB₂R-Q63R és a CB₂R-VT között (*p=0,0114, #p=0,0138). B: Radiális diagram, ami az össze endoszóma és a plazmamembrán marker között mutatja az átlagos különbségeket a CB₂R-VT-hez képest. A különböző Rab fehérjék Venus-sal jelöltek. (Átlag \pm S.E.M. n=4) (saját ábra)

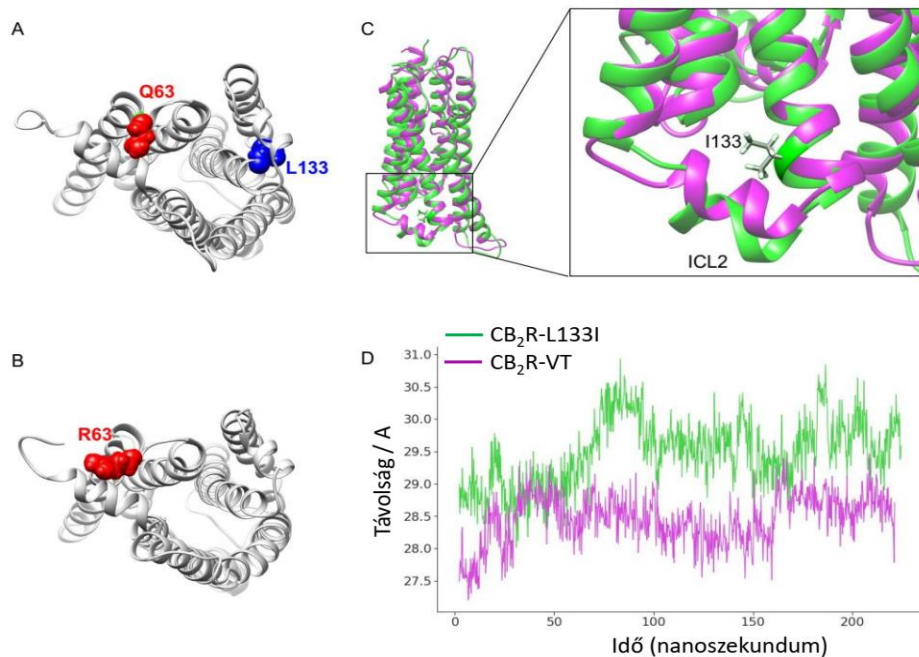
Mivel a hosszan tartó stimuláció után a mutáns receptorok egyértelműen intracelluláris eloszlását mutatnak, ezért megvizsgáltuk a G-fehérje aktivitását 2 órán át tartó JWH-133-mal történő kezelés után. Ehhez G_{i1} BRET szenzorral végeztünk kísérletet β -arresztin2-t is expresszáltatva a HEK 293T sejtekben (30. ábra). Ebben a beállításban az L133I mutáns fokozott G-fehérje választ adott, míg a Q63R kisebb aktivációt mutatott a vad típusú receptorhoz képest. Ez az eredmény korrelál a mutáns receptorok internalizációjában és a sejten belüli eloszlásban megfigyelt különbségekkel.



30. ábra: Hosszú távú stimuláció hatása a G-fehérje kötésre: HEK 293T sejteket transzfektáltuk CB₂R-okkal, $G_{\alpha i1}$ – Rluc8, Vénusz – $\beta 1$, $\gamma 2$ és β -arresztin2 DNS konstrukciókkal. Az oszlopok a CB₂R-ok G-fehérje aktivációját mutatják: CB₂R-VT (fekete négyzetek) CB₂R-Q63R (szürke háromszögek) és CB₂R-L133I (világos szürke körök) HEK 293T sejtekben 2 órás JWH-133 stimuláció után (10 μ M). 5 független kísérlet negatív Δ BRET (G-fehérje aktivitása) értékeinek átlagát egyirányú ANOVA-val (ismételt mérések) hasonlítottuk össze, a vad típusú és a mutáns CB₂R páros összehasonlítására Tukey post-hoc tesztjét alkalmaztuk. A *# szignifikáns különbséget jelez a CB₂R-VT és a CB₂R-Q63R, valamint a CB₂R-L133I és a CB₂R-Q63R között ($p < 0,01$ Átlag \pm S.E.M. $n=5$). Az ábrán az 5 független kísérlet összes technikai ismételése látható. (saját ábra)

5.2.5. A CB₂ receptorok szerkezeti változásai

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a polimorfizmusok által kiváltott lehetséges strukturális változásokba molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk. A szimulációkban a receptorok CP55940 ligandot kötnek és lipid rétegbe ágyazva vannak ábrázolva (199) (31. ábra).



31. ábra: Molekuláris dinamika szimuláció és a Q63 és L133 aminosavak lokalizációja: A: A Q63 (piros) aminosav a CB₂R citoplazmatikus részén, míg az L133 (kék) a TM3 külső oldalán található. A CB₂R receptor szerkezetét a B: A receptor hélicei a citoplazmatikus oldalról nézve. Pirossal jelölve az R63 aminosav. C: A CB₂R-VT (lila) és a CB₂R-L133I (zöld) egymásra épített szerkezetei. Az ILC2 a CB₂R-L133I-ben a citoplazma felé tolódik. D: A szimuláció során a transzmembrán spirálok tömegközéppontjai és az ICL2 aminosavak közötti távolságok láthatók. (saját ábra)

A CB₂R-Q63R esetében nem tapasztaltunk jelentős szerkezeti átrendeződést, bár az arginin sztérikusan nagyobb a glutaminhoz képest, és jelenléte növeli a receptor citoplazmatikus oldalán a pozitív töltések számát (31. ábra). Érdekes megfigyelés, hogy mivel a 133-as pozícióban lévő izoleucin a harmadik spirál külső oldalán helyezkedik el (31. ábra A és C), és $\gamma 2$ -szénatomjának helyzete a második intracelluláris hurkot kicsit elmozdítja a citoplazma felé.

6. MEGBESZÉLÉS

A CB₁R-ral kapcsolatos kutatásunkban a parakrin transzaktiválódás bizonyítékát találtuk nem csak HEK-293T sejteken alkalmazott expressziós rendszerben, hanem endogén receptor ingerlését követően vaszkuláris simaizomsejteken is. AngII indukálta G_{q/11} aktivitás kiváltotta a 2-AG keletkezését és leadását a primer simaizom sejtekből, és ez az endokannabinoid a szomszédos HEK-293T sejtekben expresszált CB₁R G fehérje aktiválódását okozta. A jelenség hátterében húzódó mechanizmus kapcsán elmondható, hogy *in vitro* expressziós rendszerekben az AngII és más kalcium-mobilizáló transzmitterek 2-AG felszabadulását okozhatják a foszfolipáz C aktiválásával, amely inozitol lipidekből diacil-glicerint termel arachidonsavval, amiket további lépésben a DAG lipáz 2-AG-vé alakítja át (114,122).

2012-ben publikált vizsgálatunkban patkány és egér vázizom arteriolákat, saphena artériákat izoláltunk, és mikroangiometriával vizsgáltuk a funkcionális CB₁R értágulatot okozó működését. Win55 CB₁R agonista stimulusra vazodilatációt figyeeltünk meg. Neutrális CB₁R antagonistát alkalmazva (O2050) fokozódott az Ang II érszűkítő hatása. A CB₁R inverz agonistái (SR141716 és AM251) és a diacilglicerín-lipáz tetrahidrolipstatinnal történő gátlása szintén fokozta az Ang II által kiváltott érszűkületet, ami arra utal, hogy az endokannabinoid felszabadulás modulálja a vazoaktív folyamatokat, mégpedig a CB₁R aktiválásán keresztül. További adatok azt mutatják, hogy az Ang II elindítja a vaszkuláris endokannabinoid képződést, ami az endotéliótól függetlenül gyengíti a vazokonstriktor agonista hatását, vagyis a hipertóniás hatásokban, különösen betegségek esetében, a CB₁R-oknak komoly jelentősége lehet az erek simaizomzatán is. Arról keveset tudunk, hogy a simaizmokon a CB₁R-ok pontosan hogyan okoznak relaxációt, de a CB₁R-ok szignalizációja igen sokféle lehet. Alapvetően G_{i/o} fehérjén keresztül szignalizál, ami cAMP szint csökkenést okoz, a Gβγ alegységek pedig gátolják a feszültség függő Ca²⁺ csatornákat, és serkentik a K⁺ csatornákat. Simaizomsejteken ez a jelátviteli út leggyakrabban vazokonstriktációt okoz, például az alpha2 receptorok esetében. Ennek fényében meglepő, hogy a CB₁R-ok vazodilatátor hatása, de irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a receptor válaszkészsége nagyban függ a lokalizációjától, a ligandtól és a sejtes környezettől is. Utóbbi részletei még kevésbé feltártak. Leírtak G_q és G_s kapcsolt jelátvitelt is (118). Sőt az adenil-cikláz 2., 4. vagy 7. izoformájának koexpressziója a CB₁R által közvetített cAMP-képződés

stimulációját eredményezte, de ezt a hatást valószínűleg a G_i -fehérjéktől eltávolodó $G\beta\gamma$ -dimerek közvetítették (200). A simaizomban megfigyelt vazodilatátor mechanizmus pontosan még nem ismert. A mi vizsgálatainkban megfigyelhető a Ca^{2+} jel csökkentés, valószínűsíthetőleg a feszültség függő Ca^{2+} csatornák gátlásán keresztül.

Kis erek vizsgálatában azt találtuk hogy az endokannabinoid rendszer aktivációja csökkentheti egy G_q kapcsolt receptor - legyen az AT_1R vagy más értónust befolyásoló receptor - érszűkítő hatását. A fentiekhez hasonló *in vitro* kísérletekben egér és patkány aorta érszakaszokat szintén ezt a jelenséget találtuk. Annak igazolására, hogy a CB_1R -nak fontos szerepe van az érrendszerben, O2050 előkezelés mellett vizsgáltuk az AT_1R stimulálás hatását, és megállapítottuk, hogy rágszáló aortában a CB_1R gátlása fokozta az AngII indukálta érszűkületet. Azt találtuk, hogy a kalcium-jelt kiváltó GPCR agonisták, amelyek a $G_{q/11}$ aktiválása révén hatnak az intracelluláris kalcium mobilizációval, endokannabinoid felszabadulást indukálnak, és ez a felszabaduló endokannabinoid okozza a vaszkuláris CB_1R -ok aktiválását. Vazokonstriktó növekedést okozott a THL alkalmazása, vagyis amikor a diacilglicerín-lipázt gátoltuk, - mely enzim kulcsfontosságú a 2-AG endokannabinoid képzésében - nem tudott létrejönni és felszabadulni 2-AG, tehát az endokannabinoid rendszer nem tudta fékezni a nagy koncentrációjú AngII érszűkítő hatását. Hasonló eredményeket mutattak a patkány koronárián végzett kísérleteink is. Amikor az egér aorták miográfiás mérésénél JZL184-el gátoltuk a 2-AG lebomlását tehát több endokannabinoid maradt az érfalban, kimutatható volt, hogy ez szignifikánsan csökkentette az AngII vazokonstriktor hatását. Izolált simaizomsejtekből elvégzett 2-AG mérés azt mutatta hogy a G_q kapcsolt agonista hatására növekedett a sejtekből felszabaduló endokannabinoid, mely összhangban van munkacsoportunk korábbi CHO sejtes kísérleteivel (122). THL hatására csökkent az endokannabinoid termelés, és a JZL184 kezelés csökkentette a lebomlást.

In vivo tanulmányok izolált érszakaszokon az találták, hogy a kannabinoidok (pl. anandamid, 2-AG, THC, Win55) a legtöbb esetben értágulatot okoznak nem csak az aortán, hanem, a koszorúérben, az agyi erekben és a mesenterialis artériákon is, de sok esetben ez a hatás nem CB_1R -on keresztül zajlott (121,201). A vaszkuláris szövetekben többféle receptor is célpontja lehet az kannabinoidoknak, nem csak a CB_1R , hanem jelentős lehet a TRPV1, a CB_2R , GPR55, TPR és más prosztanoid receptorok is. Vannak olyan közlemények amelyek azt bizonyítják, hogy a kannabinoidok értágító hatásait főleg

a CB₁R-okon keresztül valósul meg (202). A vázizom arteriolákat vizsgálva, mi is azt találtuk, hogy a CB₁R-agonista Win55212 által kiváltott vazorelaxációt teljes mértékben gátolta az O2050, a CB₁R neutrális antagonistája, és ez a jelenség hiányzott a CB₁R-KO egerekből, bizonyítva funkcionálisan releváns CB₁R-ok jelenlétét ezekben az erekben. Az érrendszerben nem csak fiziológiás esetekben fontos az endokannabinoid rendszer, sőt inkább éppen a különböző elváltozásoknál lehet jelentős, akár jótékony is a rendszer működése. Hipertóniás erekben kimutatták a kannabinoidok értágító és vérnyomáscsökkentő hatását (203), és szívelégtelenségben is előnyösnek bizonyult a CB₁R agonizmus (204).

A mechanizmus további tisztázása érdekében a citoplazmatikus kalcium szinteket mértünk patkány aortából preparált simaizomsejteken. A FURA2-vel töltött sejteken mért fluoreszcia változásokban azt találtuk, hogy a CB₁R gátlása növeli az AngII indukált kalcium jel fenntartott fázisát. Tehát elmondhatjuk hogy a patkány aorta primer simaizom sejtekben a CB₁R -ok befolyásolják a (késői) kalcium beáramlást, amely létrejöhet különböző típusú kalcium csatornák, mint például L-típusú vagy P/Q-típusú csatornák (205). A kalciumot mobilizáló GFKR-ok agonistái, például AngII, vazokonstriktációt indukálnak Gq/11 fehérjétől függő jelátvitelen keresztül. Agonista indukálta simaizom összehúzódás és érszűkület is létrejöhet G_{12/13}-függő jelátvitellel és a Rho-függő utak aktiválásával is (206).

A GFKR-ok a MAPK segítségével szabályozhatják a sejtproliferációt, a sejt differenciálódást, a sejtmozgást és a sejthalált. A MAPK-ok, mint például az extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK), a p38 és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) aktiválása többek között a proliferációt szabályozó és inflammatorikus citokinek mobilizáció funkciók miatt a neurológiai és szív- és érrendszeri betegségekben fontos célpontok. A kannabinoidok is aktiválják az ERK, MAPK útvonalakat, a CB₁R aktiváció stimulálja az ERK1/2-t, p38 MAPK-t és JNK-t is endothelsejteken (207). Az általunk vizsgált primer simaizom tenyészeteken végzett wester blot kísérletben az AngII ingerlésre adott PERK válasz nem mutatott szignifikáns különbséget, amikor az endokannabinoid rendszer különböző pontjait gátoltuk. A simaizomsejteken az AngII ismerten egy magas PERK választ indukál, az még nem ismert hogy a felszabaduló és lebomlásában gátolt endokannabinoid tovább tudja-e még ezt a jelet serkenteni, ahogy az sem egyértelmű, hogy a kannabinoid keletkezés gátlása esetében kisebb jelet várnánk.

Ebben a kísérletsorozatban nem kaptunk változást, melynek lehet oka az alacsony esetszám is. Bár ezekben a kísérletekben nem tudtuk bizonyítani egyértelműen a G_q kapcsolt receptor ingerlését követő endokannabinoid felszabadulás jelentőségét a PERK válaszára, nem kizárt hogy van kapcsolat az AT_1R -ok és CB_1R -ok között a jelátvitelnek ezen a szintjén is a vaszkuláris simaizom sejtekben.

Amikor a G_q -csatolt AT_1R -t CB_1R -el együtt expresszálták CHO-sejtekben, az angiotenzin II-vel történő ingerlés a CB_1R -ok diacilglicerín-lipáz (DAGL) által közvetített transzaktivációjához vezetett (114). A két receptor közötti transzaktiváció megvalósul ERK szinten, amit már több tanulmány is leközölt. Például egészséges patkányból vagy spontán hipertenzív patkányból izolált asztrocitákon vizsgálva a két receptort, a CB_1R aktiváció ACEA-val nemcsak az AT_1R által közvetített MAPK aktiváció gátlásához vezethet, hanem az Ang II a CB_1R jelentős foszforilációját is kiválthatja, ezáltal a CB_1R inaktiválását is okozhatja. Ezenkívül a CB_1R által közvetített jelátviteli útvonalak aktiválása jelentősen csökken a hipertóniás patkányok asztrocitáiban (208).

A megfigyeléseinknek *in vivo* is lehet jelentősége. Jelen dolgozatban nem mutattam be az ezzel kapcsolatos kísérleteinket, de a közleményünkben látható, hogy a CB_1R gátlása fokozta egerekben az AngII infúzió kiváltotta vérnyomás emelkedést. Eredményeink óta több publikáció is született ezen a kutatási területen, és kiderült hogy, hogy az AngII által kiváltott szívhatásokat is modulálja a CB_1R egyidejű aktiválása, valószínűleg az AngII jelátvitel során fellépő 2-AG felszabadulás miatt. Intakt keringésű, izolált szívkészítményben az AngII rövid távú hatásait a DAGL aktiválás és a CB_1R transzaktiváció modulálja. A szív CB_1R -on keresztül reagál a felszabaduló endokannabinoidra, és a létrejövő válasz ellensúlyozhatja az AngII pozitív inotróp hatását, végső soron csökkentheti a szív anyagcsere-igényt (209).

Az endokannabinoidok szerteágazó szerepe, és a terápiákban használt kannabinoid receptor agonisták elterjedése is indokolja a CB_2R -ok vizsgálatát is. Kutatásunk során a receptornak két misszensz polimorfizmusát vizsgáltuk meg és hasonlítottuk a vad típusú CB_2R -hoz. Kérdésünk volt, hogy látunk-e különbséget β -arresztin2 kötődésben, G-fehérje aktivációban, intracelluláris eloszlásban, vagyis vannak-e a jelátvitel első lépéseiben olyan egyértelmű alapvető változások, melyek a receptor mutációhoz köthetőek? A legszembetűnőbb változásokat a mutáns receptorok esetében a

β -arresztin2 kötő tulajdonságaikban észleltük, nevezetesen a CB₂R-Q63R növekedett, míg a CB₂R-L133I csökkent kötődést mutat a vad típusú receptorhoz képest. A G-fehérjék aktiválására való képességük megváltozása viszont kevésbé volt hangsúlyos, csak a CB₂R-L133I mutatott némi fokozott aktivációt 2 órán át történő JWH-133 agonista hatására a G_{i1} fehérje BRET kísérletekben. Bár a gyengébb β -arresztin2 kötődés és az ebből fakadó gyengébb deszenzitizáció esetén erőteljesebb G-fehérje aktivációra lehetett számítani, különbségeket sem az endogén agonista 2-AG-val, sem az endogén cAMP-szintek mérésekor nem tudtunk kimutatni. Ez arra utal, hogy még ha a G-fehérje aktivációja megváltozik is, a különbségek minimálisak. Eredményeink a CB₂R-Q63R G-fehérje aktiválása esetén ellentétesek az irodalomban korábban már kimutatott eredményekkel szemben (161). Carrasquer és munkatársai vizsgálataiban a G-fehérje aktivációja gyengébb volt a Q63R receptorban, ahogy azt a β -arresztin2 erősebb kötődése miatt mi is várnánk. Ők a deszenzitizációt felvetik okként, de ezt kísérletesen nem vizsgálták. Az ellentétes eredmények oka nem világos, de módszertani eltérések vannak a két vizsgálat között, ami expressziós rendszerekben mindig befolyásolhatja a konklúziót. Ők foszfodiészteráz gátlók jelenlétében mérték a forskolin által indukált cAMP-jeleket, ami megnövekedett érzékenységet eredményezhet. Ezenkívül a G-fehérje vizsgálatok érzékenyek lehetnek a receptor-expressziós különbségekre is. Mindazonáltal, amikor hosszú ideig stimuláltuk a receptorokat, a G-fehérje aktiváció korrelált Carrasquer-ék eredményeivel, és azaz a CB₂R-L133I erősebb és a CB₂R-Q63R gyengébb G-fehérje aktivációt mutatott.

A receptor- β -arresztin2 kötési kísérletek értékelésekor a receptorok membrán expressziója is fontos szempont. Mivel a CB₂R csak a sejtmembrán közelében kötődik a β -arresztinhez, önmagában a magasabb vagy alacsonyabb receptor membrán expressziók nagyobb vagy alacsonyabb β -arresztin2 BRET szignálokhoz vezethetnek. Ahhoz, hogy a lehető legpontosabb és leginkább objektív képet kapjunk a receptorok expressziójáról, nagy áteresztőképességű elemzéssel értékeltük a CB₂R sejtek intracelluláris eloszlását. Az alkalmazott cellpose algoritmus lehetővé teszi, hogy a sejtek a konfokális mikroszkópos felvételeken automatikusan azonosítsuk, és objektíven elemezzük a sejtekben detektálható fluoreszcenciát. A sejtek térbeli fluoreszcencia profilja azt mutatta, hogy a három CB₂R eloszlása és teljes fluoreszcenciája nem különbözik szignifikánsan. Tehát a két mutáns CB₂R β -arresztin2 kötődésének különbségei nem magyarázhatók

lokalizációs vagy expressziós különbségekkel, ellenkezőleg, a megváltozott β -arresztin2 kötődés befolyásolja a ligand indukálta internalizációt, meghatározza azt, hogy milyen gyorsan jelenik meg a receptor az endoszómákban. A CB₂R-Q63R esetében az erősebb β -arresztin2-kapcsolás gyorsabb internalizációt mutat és gyorsabban jelent meg a receptor a Rab5- és a késői endoszóma marker Rab7-el jellemezhető vezikulákban. Ezzel szemben a CB₂R-L133I gyengébb β -arresztin2-kötése lassabb internalizálódáshoz vezet, és később éri el a vizsgált, különböző Rab fehérjékkel jelzett vezikulákat.

Többféle módszerrel is meg akartuk mutatni a β -arresztin2 kötődésben látható különbséget, ezért fordultunk a proximitás biotinizáció felé. Ezzel a módszerrel vizsgálva csak az L133I mutáció hatása volt szignifikáns, de meg kell jegyezni, hogy ezekben a kísérletekben a biotinizáció és az agonistával történő stimuláció egyszerre történik, a sejtekhez ~ 18 órán keresztül adtuk a biotint, ennyi idő szükséges a β -arresztinnek elegendő biotinizációjához, és ez idő alatt már több kötődési-elengedési ciklus is létrejöhet. Így a módszer nem lehet elég érzékeny a kicsi különbségek megkülönböztetésére, különösen akkor, ha a kötés már kellően erős.

A β -arresztin kötés megváltozása több más receptor mutációnál is előfordul, és jelentős következményeket hordozhat, mint például a familiáris diabetesz inszipidusszal összefüggésbe hozott V₂ receptor egyik mutációja (R137H) esetében. A V₂R(R137H)-ban a harmadik transzmembrán régió végén - ahol az erősen konzervált DRY régió is van - felcserélődött a 137. arginin egy hisztidinre. A károsodott működés miatt a receptor nem tudja ellátni a funkcióját, mivel nem tud G-fehérjét kötni. A mutáció agonista hiányában is egy konstitutív β -arresztin kötést és ezen keresztül egy konstitutív internalizálódást eredményez (83).

Az SNP-k mint természetes mutációk igen elterjedtek a GFKR-ok és más fehérjék körében. Egyre több vizsgálat tárja fel az ilyen receptorokkal összefüggésbe hozható kórképeket, például a β 2R polimorfizmusai különböző asztma fenotípusokhoz társíthatóak, ezt figyelembe kell venni az alkalmazott β 2R agonista terápiáknál (210,211). Ahhoz hogy megtaláljuk a pontos magyarázatot a megfigyelt klinikai kórképekre, fontos érteni hogy a mutációk miért, és hogyan változtatják meg a jelátviteli folyamatokat. Például az MC4R 61 természetes variánsát vizsgálva kiderült, hogy a variánsok kevésbé szignalizáltak a Gs jelátvitel felé, inkább fokozott β -arresztin toborzást mutattak és

fokozott mitogén-aktivált protein-kináz út aktiválást. Az ilyen receptorokkal rendelkező emberek szignifikánsan alacsonyabb BMI -vel és alacsonyabb elhízási esélyekkel hozhatók összefüggésbe, kevésbé volt jellemző náluk a 2 -es típusú cukorbetegség és koszorúér betegség. Tehát az MC4R esetében a β -arresztin rendszer jelátvitel-szelektív stimulálása hatékony stratégiája lehet a fogyásnak, és az elhízással kapcsolatos kardiometabolikus betegségek kezelésében is felmerül (212). Az általunk vizsgált CB₂R variánsok β -arresztin2 kötődésének megváltozása befolyásolja a sejten belüli receptor sorsot, ami meghatározza a további jelátvitelt, például a CB₂R-Q63R-ről már ismert, hogy csökkent Erk1/2 aktivációt okoz, ami lehet a fokozott deszenzitizáció következménye (213).

Felmerül a kérdés, hogy hogyan befolyásolják a CB₂R variánsokban természetes módon előforduló aminosav cserék a β -arresztin2 kötését? Ismert hogy a β -arresztin2 kötésnek fontos feltétele a C-terminálison bizonyos aminosavak jelenléte és azok foszforilációja. Viszont az általunk vizsgált két mutáció egyike sem érinti a receptor C-terminálisán található szerin/treonin aminosavakat, mivel az aminosav cserék az első (Q63R) vagy a harmadik (L133I) intracelluláris hurokban találhatóak. Minimum két lehetséges magyarázat létezik a vad típusú receptor és a két mutáns közötti β -arresztin kötődésben tapasztalt különbségekre. Először is, a mutációk befolyásolhatják a GRK receptorhoz való kötődését, ez hatással lehetnek a receptor foszforilációjára. Valójában a GRK2 kötés jól korrelált a két mutáció β -arresztin2 kötési mintázatával, ahogy azt proximitás biotinilálás kísérletekben kimutattuk. Másodsorban, a Q63 és L133 aminosavak mutációja közvetlenül is befolyásolhatják a β -arresztin2 kötődését. A β -arresztin-GPCR kölcsönhatások legalább két interakciós helyből állnak: C-terminálissal való kölcsönhatásból és a magi kölcsönhatásból, utóbbihoz tartozik az ujjhurok kimozdulása és illeszkedése a GFKR-ok jelálatalkító zsebébe. A különböző receptorok hélicei közötti üregben a töltések egymástól eltérő távolságra vannak, ez a távolság megszabja hogy az ujjhurok miként tud beilleszkedni. Az ujjhurok rugalmassága teszi lehetővé, hogy a β -arresztin2 különböző irányokban kötődjön különböző receptorokkal. E mellett még számos más interakció is létrejön a második és a harmadik intracelluláris hurok között (ICL2 és ICL3) (214). A Q63 aminosav a ICL2-ben található, és ennek az aminosavnak az argininre történő cseréje megnöveli a pozitív töltések számát a receptor- β -arresztin2 interakciós felületen, ez a változás esetleg befolyásolhatja a két fehérje

kötését. Az L133I mutáció esetében az ok nem annyira nyilvánvaló. A mutációval érintett aminosav a receptor harmadik spiráljában található, oldallánca a receptor külső oldala felé mutat, és valószínűleg nem vesz részt közvetlenül a receptor- β -arresztin2 kölcsönhatásban. A leucin-izoleucin változása szintén nem indokolja a jelentős szerkezeti vagy töltésbeli változásokat. Ezért molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk egy nemrégiben leírt CB₂R modell alkalmazásával, amelyben a receptor aktív állapotát stabilizálták egy nagy affinitású agonistával a CP55 940-el. A szimuláció szerint az izoleucin γ 2 szénatomjának metilcsoportja ütközik a vad típusú receptor ICL2 140-141 aminosavaival, és a citoplazma felé tolja azt. Ez a mozgás zavarhatja a receptor- β -arresztin2 kölcsönhatást, csökkentve a kötés affinitását.

Bár a vad típusú és a mutáns receptorok között a receptor- β -arresztin2 kötődésbeli különbségek viszonylag kicsik, de hosszan tartó stimulálása után ez a kis különbség is jelentősen befolyásolja a receptorok sejten belüli eloszlását. Így ezek az eltérések a későbbi jelátviteli lépések megváltozásához vezethetnek, ahol a különbségek a jelerősítési lépések miatt felerősödhetnek, például a MAPK kaszkádok formájában (215). További vizsgálatokban érdekes lenne kipróbálni a kannabinoidok hatását a CB₂R-t endogén módon expresszáló sejteken, például a perifériás immunsejtek, mikrogliaikon, vagy érdekes lenne olyan idegsejteken vizsgálni a jelátvitelt, amelyek vad típusú vagy CB₂R variánsokat hordozó alanyokból származnak. Ezekkel a vizsgálatokkal lehetne még jobban megérteni a CB₂R variánsok szerepét a bevezetőben említett immun- és pszichoneurológiai rendellenességekben. Összefoglalva a CB₂R-el kapcsolatos munkánkat, elmondhatjuk, hogy e két gyakran előforduló CB₂R missense mutáció, a Q63R és az L133I mutáció befolyásolja a receptor β -arresztin2-kötési képességét. Mivel a G-fehérje aktivációi nagyon hasonlónak tűnnek, vagy akár fokozódhatnak is az L133I mutáns esetében, ezek a változások a CB₂R elfogult jelátviteléhez vezetnek, melyek megmagyarázhatják a mutációkhoz kapcsolódó klinikai megfigyeléseket.

Sok tanulmány foglalkozik az elfogult kannabinoid receptor agonistákkal. CB₂R esetében β -arresztin-toborzás létrejön például a Win55 vagy a CP55 stimulus esetében, de deszenzitizáció leginkább a CP55 alkalmazásakor tapasztalható (135). A már használatban lévő kannabinoid ligandok változatos kémiai szerkezete növelte annak valószínűségét hogy újabb jelátvitel-szelektív agonistát találjanak. Az elmúlt évtizedekben számos kutatócsoport bizonyította a jelátvitel-szelektív agonizmus

jelenségét CB₁ kannabinoid receptor esetében. A CB₁R ligandfüggően aktiválja a különböző G α izoformákat, a 1-et vagy 2-t (216). CB₁R aktiválásának befolyásolására nagyon ígéretesek az alloszterikus modulátorok. Például az ORG27569-ről azt találták, hogy gátolja az agonista által közvetített G-fehérje aktivációt, inkább a PERK1/2 útvonalak felé szignalizál, β -arresztin-1-en keresztül, de számos más hasonló vegyület létezik már (217). A CB₂R funkcionális szelektivitásával is egyre több kutatás foglalkozik, amióta felismerték ennek a kannabinoid receptornak is a terápiás szempontját. A jelenlegi CB₂R terápiákat javíthatják az elfogult ligandok, a CB₂R-t célzó allosztérikus modulátorok, és a CB₁/CB₂R-ok szelektív aktiválása. Ezek az újabb megközelítések optimalizálják a kannabinoid agonistákat, hogy azok kevesebb mellékhatással legyenek jobb gyulladáscsökkentők és jobb fájdalomcsillapítók (218). A CB₂R β -arresztin-kötődését célzó farmakológiai stratégiáknál a leghatékonyabb megoldások érdekében érdemes figyelembe venni a mutációkból fakadó sajátos tulajdonságokat is.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az endokannabinoid receptorok jelátvitelének vizsgálatakor aortából izolált simaizom sejteken BRET mérésekkel kimutattuk, hogy az endogén Gq kapcsolt AT₁R ingerlése parakrin módon aktiválja a CB₁R receptorokat. Ennek a transzaktivációnak a jelét láttuk a kalcium méréseknél is, amikor az O2050 CB₁R antagonistája növelte az AngII kiváltotta kalcium-jel fenntartott fázisát, és a JZL184 MAGL gátlószer jelenlétében a kalcium-jel gyorsabban csökkent.

Rágcsáló arteriolákon, és aortákon is megmutattuk, hogy CB₁R függő módon az O2050 alkalmazása növeli az AngII kiváltotta ér összehúzódást. Az endokannabinoid rendszer más pontjait gátolva is ezzel szinkronban lévő megfigyeléseket kaptunk a miográfus kísérletekben. A DAGL gátló alkalmazása növelte az AngII kiváltotta ér összehúzódást, míg a MAGL gátló használata csökkentette azt.

Megállapítottuk, hogy a két CB₂R misszensz mutáció, a Q63R és az L133I befolyásolja a receptor β -arresztin2 kötési képességét. A CB₂R-Q63R esetében erősebb β -arresztin2 kötést mértünk, míg a CB₂R-L133I esetében gyengébbet. A β -arresztin2 kötéssel korrelált a receptorok GRK kötése is. A G-fehérje kötésben csak az 2 órán át tartó JWH-133 ingerlésnél találtunk különbséget.

A kísérletekben használt receptor plazmidok között nem volt expressziós vagy lokalizációs eltérés. Tehát kimondhatjuk, hogy az eltérő β -arresztin2-kötés okozta azt, hogy a receptorok eltérő sebességgel internalizálódtak, a Q63R hamarabb jelent meg a Rab5 és Rab7-el jelzett endoszómákban mint a másik két receptor, míg az L133I érte el leglassabban mind a négy vizsgált intracelluláris vezikulákat.

A receptorok szerkezetének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a Q63R esetben a megemelkedett pozitív töltések száma befolyásolhatja a receptor- β -arresztin2 interakciót. Az L133I esetében pedig molekuláris dinamikai szimulációkkal megmutattuk, hogy a receptorban az ICL2 az aminosav csere miatt egy kissé eltolódik, ami egy lehetséges magyarázatot a csökkent β -arresztin2 kötésre.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az endokannabinoid rendszer jelentősen befolyásolja szinte valamennyi szervünk működését. Bár nem csak fiziológias állapotban van jelentősége, még mindig keveset tudunk a rendszer elemeinek összefüggéseiről, legyen szó akár a receptorok pontos jelátviteli folyamatairól, akár az endokannabinoidok transzaktiváló hatásáról.

Vizsgálatunk első részében a CB₁R-ok jelentőségét vizsgáltuk rágsáló ereken és primer simaizom kultúrákon. Összefüggést kerestünk az AT₁ receptorok okozta endokannabinoid felszabadulás és a szomszédosan elhelyezkedő CB₁R-ok transzaktivációja között. Többféle érszakaszon vizsgáltuk a G_q hatásra kialakuló vazokonstriktó változását többek között CB₁R gátlás mellett. Ezeknek a gátlószereknek a hatását kerestük simaizomsejteken a Ca²⁺-jel és a PERK vizsgálatával, és BRET módszerrel kimértük a két receptor közötti transzaktiváció létrejöttét is.

Vizsgálatunk második részében a CB₂R két ismert polimorfizmusának jelátvitelét vetettük össze. A jelátviteli lépések kezdeti szakaszára fókuszáltunk, elsősorban a β -arresztin2 kötésre, a G-fehérje aktiválásra, és az internalizációra. Többféle módszert alkalmazva kerestük az mutációk okozta betegségek hátterében szerepelhető jelátviteli eltéréseket. Koprecipitációval és BRET mérésekkel kimutattuk, hogy a β -arresztin2 kötésben különbség van a mutánsok között. A G-fehérje aktivációi nagyon hasonlóknak tűnt, vagy akár fokozódott is az egyik mutáció esetében, összességében ezek a változások a CB₂R jelátvitel-szelektív aktiválódásához vezethetnek, melyek magyarázhatják a megfigyelt klinikai kórképeket.

Eredményeink megmutatják hogy a G-fehérje kapcsolt receptorok jelátvitelének, az endokannabinoidok transzaktivációjának és a természetes módon előforduló receptor polimorfizmusoknak fontos szerepük van az endokannabinoid rendszer működésében.

9. SUMMARY

The endocannabinoid system includes G-protein-coupled endocannabinoid receptors and the formation and action of endocannabinoids influence the functions of all our organs. Although it plays a significant role in both physiological and pathophysiological conditions, little is known about the interrelationships of the elements of the system, whether it is the precise signaling processes of the receptors or the transactivating effect of endocannabinoids.

In the first half of our study, we investigated the relevance of CB₁Rs in rodent blood vessels and primary smooth muscle cultures. We searched for a correlation between endocannabinoid release by AT₁ receptor activation and transactivation of nearby CB₁Rs. The changes in vasoconstriction induced by G_q in different rodent arteries were examined in addition to CB₁R inhibition, among others. We investigated the effects of these inhibitors on smooth muscle cells by examining the Ca²⁺ signal and PERK, and also detected transactivation between the two receptors by BRET.

In the second half of our study, we compared the signaling of two known polymorphisms of CB₂R. We focused on the initial stage of signaling steps, mainly β -arrestin2 binding, G-protein activation, and internalization. Using several methods, we searched for differences that might underlie the diseases caused by mutations. Using coprecipitation and BRET measurements, we showed that there is a difference in β -arrestin2 binding between mutants. G-protein activations appeared to be very similar or even increased in case of one mutation, overall these changes may lead to biased signaling of CB₂R, which could explain the observed clinical conditions.

Our results show that G-protein coupled receptor signaling, endocannabinoid transactivation and naturally occurring receptor polymorphisms play an important role in the functions of the endocannabinoid system.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* (2003) **63**:1256–1272.
2. Tyndall JDA, Sandilya R: GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med Chem* (2005) **1**:405–421.
3. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin J-P, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ: International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* (2005) **57**:279–288.
4. 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: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* (2000) **289**:739–745.
5. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Gebhard F X S, Weis WI, Kobilka BK: Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* (2007) **450**:383–387.
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: Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature* (2011) **469**:175–180.
7. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK: The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* (2009) **459**:356–363.
8. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y: Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* (2016) **428**:3850–3868.
9. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008) **9**:60–71.

10. 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, I Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK: Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* (2011) **477**:549–555.
11. Duc NM, Kim HR, Chung KY: Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol* (2015) **763**:214–222.
12. Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hébert TE: G $\beta\gamma$ subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cellular Signalling* (2000) **12**:673–682. doi:10.1016/s0898-6568(00)00118-2
13. Dupré DJ, Robitaille M, Rebois RV, Hébert TE: The Role of G $\beta\gamma$ Subunits in the Organization, Assembly, and Function of GPCR Signaling Complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2009) **49**:31–56.
14. Kim K, Chung KY: Many faces of the GPCR-arrestin interaction. *Arch Pharm Res* (2020) **43**:890–899.
15. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ: Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* (2002) **66**:61–79.
16. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ: Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* (1990) **4**:2881–2889.
17. Miller WE, Lefkowitz RJ: Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* (2001) **13**:139–145.
18. Tóth DJ, Tóth J, Gulyás G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Várnai P: Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *Journal of Cell Science* (2012) **125**:3013–3013. doi:10.1242/jcs.115048
19. Moo EV, Von Moo E, van Senten JR, Bräuner-Osborne H, Møller TC: Arrestin-

- Dependent and -Independent Internalization of G Protein–Coupled Receptors: Methods, Mechanisms, and Implications on Cell Signaling. *Molecular Pharmacology* (2021) **99**:242–255. doi:10.1124/molpharm.120.000192
20. Tóth AD, Turu G, Hunyady L, Balla A: Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2018) **32**:69–82.
 21. Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ: Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* (1993) **268**:23735–23738.
 22. Gurevich EV, Tesmer JJG, Mushegian A, Gurevich VV: G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* (2012) **133**:40–69.
 23. Reiter E, Lefkowitz RJ: GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* (2006) **17**:159–165.
 24. Chen CY, Dion SB, Kim CM, Benovic JL: Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem* (1993) **268**:7825–7831.
 25. Pals-Rylaarsdam R, Hosey MM: Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* (1997) **272**:14152–14158.
 26. Celver JP, Lowe J, Kovoov A, Gurevich VV, Chavkin C: Threonine 180 Is Required for G-protein-coupled Receptor Kinase 3- and β -Arrestin 2-mediated Desensitization of the μ -Opioid Receptor in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* (2001) **276**:4894–4900. doi:10.1074/jbc.m007437200
 27. Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ: 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* (2005) **102**:1448–1453.
 28. Kim J, Ahn S, Ren X-R, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ: Functional

- antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for β -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**:1442–1447.
29. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL: Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* (2010) **285**:7805–7817.
 30. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK: Distinct phosphorylation sites on the β 2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science* (2011) **4(185)**:ra51
 31. Peterson YK, Luttrell LM: The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev* (2017) **69**:256–297.
 32. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ: beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* (1990) **248**:1547–1550.
 33. Zhang M, Liu X, Zhang Y, Zhao J: Loss of betaarrestin1 and betaarrestin2 contributes to pulmonary hypoplasia and neonatal lethality in mice. *Dev Biol* (2010) **339**:407–417.
 34. Kelly E, Bailey CP, Henderson G: Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* (2008) **153**:S379–S388.
 35. Luttrell LM, Lefkowitz RJ: The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* (2002) **115**:455–465.
 36. Ma L, Pei G: Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* (2007) **120**:213–218.
 37. Gurevich VV, Gurevich EV: Arrestins: Critical Players in Trafficking of Many GPCRs. *Prog Mol Biol Transl Sci* (2015) **132**:1–14.
 38. Vishnivetskiy SA, Paz CL, Schubert C, Hirsch JA, Sigler PB, Gurevich VV: How Does Arrestin Respond to the Phosphorylated State of Rhodopsin? *Journal of*

- Biological Chemistry* (1999) **274**:11451–11454. doi:10.1074/jbc.274.17.11451
39. Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C: Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* (2001) **9**:869–880.
 40. Zhan XZ, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW: Crystal Structure of Arrestin-3 Reveals the Basis of the Difference in Receptor Binding Between Two Non-visual Subtypes. *J Mol Biol* (2011) **406**:467–478.
 41. Kim YJ, Hofmann KP, Ernst OP, Scheerer P, Choe H-W, Sommer ME: Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* (2013) **497**:142–146.
 42. Schröder K, Pulvermüller A, Hofmann KP: Arrestin and Its Splice Variant Arr1–370A (p44) MECHANISM AND BIOLOGICAL ROLE OF THEIR INTERACTION WITH RHODOPSIN. *J Biol Chem* (2002) **277**(46):43987-96
 43. Lally CCM, Bauer B, Selent J, Sommer ME: C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor. *Nat Commun* (2017) **8**:14258.
 44. Scheerer P, Sommer ME: Structural mechanism of arrestin activation. *Curr Opin Struct Biol* (2017) **45**:160–169.
 45. 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) **293**:876–892.
 46. Turu G, Balla A, Hunyady L: The Role of β -Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor. *Front Endocrinol* (2019) **10**:519.
 47. Boussi L, Frishman WH: β -Arrestin as a Therapeutic Target in Heart Failure. *Cardiol Rev* (2021) **29**:223–229.
 48. Staus DP, Hu H, Robertson MJ, Kleinhenz ALW, Wingler LM, Capel WD, Latorraca NR, Lefkowitz RJ, Skiniotis G: Structure of the M2 muscarinic receptor-

- β -arrestin complex in a lipid nanodisc. *Nature* (2020) **579**:297–302.
49. Huang W, Masureel M, Qu Q, Janetzko J, Inoue A, Kato HE, Robertson MJ, Nguyen KC, Glenn JS, Skiniotis G, Kobilka BK: Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with β -arrestin 1. *Nature* (2020) **579**:303–308.
 50. Min K, Yoon H-J, Park JY, Baidya M, Dwivedi-Agnihotri H, Maharana J, Chaturvedi M, Chung KY, Shukla AK, Lee HH: Crystal Structure of β -Arrestin 2 in Complex with CXCR7 Phosphopeptide. *Structure* (2020) **28**:1014–1023.e4.
 51. Józwiak K, Płazińska A: Structural Insights into Ligand—Receptor Interactions Involved in Biased Agonism of G-Protein Coupled Receptors. *Molecules* (2021) **26**:851.
 52. Latorraca NR, Masureel M, Hollingsworth SA, Heydenreich FM, Suomivuori C-M, Brinton C, Townshend RJL, Bouvier M, Kobilka BK, Dror RO: How GPCR Phosphorylation Patterns Orchestrate Arrestin-Mediated Signaling. *Cell* (2020) **183**:1813–1825.e18.
 53. Kenakin T: Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* (1995) **16**:232–238.
 54. Violin JD, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* (2007) **28**:416–422.
 55. Zürn A, Zabel U, Vilardaga J-P, Schindelin H, Lohse MJ, Hoffmann C: Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of α 2a-Adrenergic Receptor Activation Reveals Distinct Agonist-Specific Conformational Changes. *Mol Pharmacol* (2009) **75**:534–541.
 56. Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, Sexton PM: Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2018) **19**:638–653.
 57. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-arrestin-

- dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* (1999) **283**:655–661.
58. Liang Y-L, Khoshouei M, Glukhova A, Furness SGB, Zhao P, Clydesdale L, Koole C, Truong TT, Thal DM, Lei S, Radjainia M, Danev R, Baumeister W, Wang MW, Miller LJ, Christopoulos A, Sexton PM, Wootten D: Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor–Gs complex. *Nature* (2018) **555**:121–125.
 59. Lee M-H, Appleton KM, Strungs EG, Kwon JY, Morinelli TA, Peterson YK, Laporte SA, Luttrell LM: The conformational signature of β -arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* (2016) **531**:665–668.
 60. Gregorio GG, Glenn Gregorio G, 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: Single-molecule analysis of ligand efficacy in β 2AR–G-protein activation. *Nature* (2017) **547**:68–73. doi:10.1038/nature22354
 61. Michel MC, Charlton SJ: Biased Agonism in Drug Discovery—Is It Too Soon to Choose a Path? *Mol Pharmacol* (2018) **93**:259–265.
 62. Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J: Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and β -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2005) **102**(5):1448-53
 63. Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM: β -Arrestin Scaffolding of the ERK Cascade Enhances Cytosolic ERK Activity but Inhibits ERK-mediated Transcription following Angiotensin AT1a Receptor Stimulation. *Journal of Biological Chemistry* (2002) **277**:9429–9436. doi:10.1074/jbc.m106457200
 64. Ahn S, Kim J, Hara MR, Ren X-R, Lefkowitz RJ: β -arrestin-2 mediates anti-apoptotic signaling through regulation of BAD phosphorylation. *J Biol Chem* (2009) **284**:8855–8865.
 65. Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren X-R, Milligan G, Lefkowitz RJ: β -Arrestin 1 and G α q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following

- Receptor Stimulation. *Journal of Biological Chemistry* (2005) **280**:8041–8050.
doi:10.1074/jbc.m412924200
66. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ: Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* (2010) **9**:373–386.
 67. Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ: β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2004) **101**:8603–8607.
doi:10.1073/pnas.0402851101
 68. Sharma D, Parameswaran N: Multifaceted role of β -arrestins in inflammation and disease. *Genes Immun* (2015) **16**:576.
 69. Boerrigter G, Soergel DG, Violin JD, Lark MW, Burnett JC Jr: TRV120027, a novel β -arrestin biased ligand at the angiotensin II type I receptor, unloads the heart and maintains renal function when added to furosemide in experimental heart failure. *Circ Heart Fail* (2012) **5**:627–634.
 70. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW: Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* (2010) **335**:572–579.
 71. Pang PS, Butler J, Collins SP, Cotter G: 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* (2017) **38**(30):2364-2373
 72. Szakadáti G, Tóth AD, Oláh I, Erdélyi LS, Balla T, Várnai P, Hunyady L, Balla A: Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation. *Mol Pharmacol* (2015) **87**:972–981.
 73. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW: Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci* (2014) **35**:308–316.

74. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen X-T, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblish M, Lark WM, Violin JD: AG protein-biased ligand at the μ -opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* (2013) **344**:708–717.
75. Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang Xi-P, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Duan D, Scherrer G, Brian K Kobilka, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK: Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* (2016) **537**:185–190.
76. Gillis A, Gondin AB, Kliever A, Sanchez J, Lim HD, Alamein C, Manandhar P, Santiago M, Fritzwanker S, Schmiedel F, Katte TA, Reekie T, Grimsey NL, Kassiou M, Kellam B, Krasel C, Halls ML, Mark Connor, Lane JR, Schulz S, Christie MJ, Canals M: Low intrinsic efficacy for G protein activation can explain the improved side effect profiles of new opioid agonists. *Science Signaling* (2020) **13**:eaaz3140. doi:10.1126/scisignal.aaz3140
77. Neto JA, Costanzini A, De Giorgio R, Lambert DG, Ruzza C, Calò G: Biased versus Partial Agonism in the Search for Safer Opioid Analgesics. *Molecules* (2020) **25**:3870. doi:10.3390/molecules25173870
78. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Independent β -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* (2003) **100**:10782–10787.
79. Thompson MD, Cole DEC, Capra V, Siminovitch KA, Rovati GE, Burnham WM, Rana BK: Pharmacogenetics of the G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* (2014) **1175**:189–242.
80. Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, Nelson B, Morrison J, Domanski MJ, Wagoner LE, Abraham WT, Anderson JL, Carlquist JF, Krause-Steinrauf HJ, Lazzeroni LC, Port JD, Lavori PW, Bristow

- MR: A polymorphism within a conserved beta1-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2006) **103**:11288–11293. doi:10.1073/pnas.0509937103
81. Hauser AS, Chavali S, Masuho I, Jahn LJ, Martemyanov KA, Gloriam DE, Babu MM: Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* (2018) **172**:41–54.e19.
 82. Freitas C, Wittner M, Nguyen J, Rondeau V, Biajoux V, Aknin M-L, Gaudin F, Beaussant-Cohen S, Bertrand Y, Bellanné-Chantelot C, Donadieu J, Bachelier F, Espéli M, Dalloul A, Louache F, Balabanian K: Lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells requires efficient Cxcr4 desensitization. *J Exp Med* (2017) **214**:2023–2040.
 83. Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG: Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**:93–98.
 84. Suomivuori C-M, Latorraca NR, Wingler LM, Eismann S, King MC, Kleinhenz ALW, Skiba MA, Staus DP, Kruse AC, Lefkowitz RJ, Dror RO: Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein–coupled receptor. *Science* (2020) **367**:881–887.
 85. ElSohly M, Gul W: Constituents of Cannabis sativa. *Handbook of cannabis* (2014) **3**:1093.
 86. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* (2010) **62**:588–631.
 87. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (1992) **258**:1946–1949.

88. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K: 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) **215**:89–97.
89. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR: Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* (1995) **50**:83–90.
90. Laezza C, Pagano C, Navarra G, Pastorino O, Proto MC, Fiore D, Piscopo C, Gazzero P, Bifulco M: The Endocannabinoid System: A Target for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* (2020) **21**: doi:10.3390/ijms21030747
91. Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, Konje JC, Kunos G, Mechoulam R, Pacher P, Sharkey KA, Zimmer A: Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci* (2015) **36**:277–296.
92. Martínez V, Iriondo De-Hond A, Borrelli F, Capasso R, Del Castillo MD, Abalo R: Cannabidiol and Other Non-Psychoactive Cannabinoids for Prevention and Treatment of Gastrointestinal Disorders: Useful Nutraceuticals? *Int J Mol Sci* (2020) **21**: doi:10.3390/ijms21093067
93. Correa F, Wolfson ML, Valchi P, Aisemberg J, Franchi AM: Endocannabinoid system and pregnancy. *Reproduction* (2016) **152**:R191–R200.
94. Oláh A, Szekanecz Z, Bíró T: Targeting Cannabinoid Signaling in the Immune System: “High”-ly Exciting Questions, Possibilities, and Challenges. *Frontiers in Immunology* (2017) **8**: doi:10.3389/fimmu.2017.01487
95. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* (1999) **400**:452–457.
96. Muller C, Morales P, Reggio PH: Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci* (2018) **11**:487.

97. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M: Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* (2014) **19**:17078–17106.
98. Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J: Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem* (2012) **287**:34660–34682.
99. Maccarrone M, Guzmán M, Mackie K, Doherty P, Harkany T: Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci* (2014) **15**:786–801.
100. Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M: Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* (2008) **65**:840–850.
101. Friedman D, French JA, Maccarrone M: Safety, efficacy, and mechanisms of action of cannabinoids in neurological disorders. *Lancet Neurol* (2019) **18**:504–512.
102. Alfulaij N, Meiners F, Michalek J, Small-Howard AL, Turner HC, Stokes AJ: Cannabinoids, the Heart of the Matter. *J Am Heart Assoc* (2018) **7**: doi:10.1161/JAHA.118.009099
103. Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ: The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci* (2015) **16**:705–718.
104. Mackie K: Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2006) **46**:101–122.
105. Makriyannis A, Nikas S, Thakur G, Pavlopoulos S: Cannabinoid Receptors as Therapeutic Targets. *Current Pharmaceutical Design* (2006) **12**:1751–1769. doi:10.2174/138161206776873743
106. Kaur R, Ambwani SR, Singh S: Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr Clin Pharmacol* (2016) **11**:110–117.

107. Cooper ZD: Adverse Effects of Synthetic Cannabinoids: Management of Acute Toxicity and Withdrawal. *Curr Psychiatry Rep* (2016) **18**:52.
108. Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P: Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* (2009) **60**:85–92.
109. Bryk M, Starowicz K: Cannabinoid-based therapy as a future for joint degeneration. Focus on the role of CB2 receptor in the arthritis progression and pain: an updated review. *Pharmacol Rep* (2021) **73**:681–699.
110. Ahmed I, Rehman SU, Shahmohamadnejad S, Zia MA, Ahmad M, Saeed MM, Akram Z, Iqbal HMN, Liu Q: Therapeutic Attributes of Endocannabinoid System against Neuro-Inflammatory Autoimmune Disorders. *Molecules* (2021) **26**: doi:10.3390/molecules26113389
111. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS: Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* (2000) **275**:17201–17210.
112. Zou S, Kumar U: Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* (2018) **19**: doi:10.3390/ijms19030833
113. Walsh KB, Andersen HK: Molecular Pharmacology of Synthetic Cannabinoids: Delineating CB1 Receptor-Mediated Cell Signaling. *Int J Mol Sci* (2020) **21**: doi:10.3390/ijms21176115
114. Turu G, Simon A, Gyombolai P, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L: The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity. *J Biol Chem* (2007) **282**:7753–7757.
115. Chen XP, Yang W, Fan Y, Luo JS, Hong K, Wang Z, Yan JF, Chen X, Lu JX, Benovic JL, Zou NM: Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i). *Br J Pharmacol* (2010) **161**:1817–1834.

116. Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N: New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol* (2019) **12**:239–248.
117. Ellis EF, Moore SF, Willoughby KA: Anandamide and delta 9-THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin. *Am J Physiol* (1995) **269**:H1859–64.
118. Turu G, Hunyady L: Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* (2010) **44**:75–85.
119. O’Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD: Novel time-dependent vascular actions of Δ^9 -tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **337**:824–831.
120. O’Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD: Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *Br J Pharmacol* (2004) **141**:803–812.
121. Stanley C, O’Sullivan SE: Vascular targets for cannabinoids: animal and human studies. *Br J Pharmacol* (2014) **171**:1361–1378.
122. Turu G, Várnai P, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L: Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors. *J Biol Chem* (2009) **284**:16914–16921.
123. Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L: Regulation of endocannabinoid release by G proteins: A paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2012) **353**:29–36. doi:10.1016/j.mce.2011.10.011
124. Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N, Devi LA: AT1R–CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J* (2011) **30**:2350–2363.
125. Console-Bram L, Marcu J, Abood ME: Cannabinoid receptors: nomenclature and

- pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2012) **38**:4–15.
126. Tong DX, He SP, Wang LW, Jin L, Si PR, Cheng XL: Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Cannabinoid Receptor 2 Gene with Schizophrenia in the Han Chinese Population. *J Mol Neurosci* (2013) **51**:454–460.
 127. Howlett AC: The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2002) **68-69**:619–631.
 128. Pulgar TGDEL, del Pulgar TG, Velasco G, Guzmán M: The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochemical Journal* (2000) **347**:369. doi:10.1042/0264-6021:3470369
 129. Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T: Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J Biochem* (2001) **129**:665–669.
 130. Gyombolai P, Toth AD, Timar D, Turu G, Hunyady L: Mutations in the “DRY” motif of the CB1 cannabinoid receptor result in biased receptor variants. *J Mol Endocrinol* (2015) **54**:75–89.
 131. Salort G, Álvaro-Bartolomé M, García-Sevilla JA: Regulation of cannabinoid CB2 receptor constitutive activity in vivo: repeated treatments with inverse agonists reverse the acute activation of JNK and associated apoptotic signaling in mouse brain. *Psychopharmacology* (2017) **234**:925–941. doi:10.1007/s00213-017-4537-5
 132. Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG: AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol* (2012) **165**:2561–2574.
 133. Chen X, Zheng C, Qian J, Sutton SW, Wang Z, Lv J, Liu C, Zhou N: Involvement of β -arrestin-2 and clathrin in agonist-mediated internalization of the human cannabinoid CB2 receptor. *Curr Mol Pharmacol* (2014) **7**:67–80.
 134. Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL: Agonist-directed trafficking

- of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) **315**:828–838.
135. Atwood BK, Wager-Miller J, Haskins C, Straiker A, Mackie K: Functional Selectivity in CB2 Cannabinoid Receptor Signaling and Regulation: Implications for the Therapeutic Potential of CB2 Ligands. *Mol Pharmacol* (2012) **81**:250–263.
 136. McGuinness D, Malikzay A, Visconti R, Lin K, Bayne M, Monsma F, Lunn CA: Characterizing Cannabinoid CB2 Receptor Ligands Using DiscoverX PathHunter™ β -Arrestin Assay. *J Biomol Screen* (2009) **14**:49–58.
 137. Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ: Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* (2004) **65**:999–1007.
 138. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* (1993) **365**:61–65.
 139. Rockwell CE, Raman P, Kaplan BLF, Kaminski NE: A COX-2 metabolite of the endogenous cannabinoid, 2-arachidonyl glycerol, mediates suppression of IL-2 secretion in activated Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol* (2008) **76**:353–361.
 140. Carayon P, Marchand J, Dussossoy D, Derocq JM, Jbilo O, Bord A, Bouaboula M, Galiègue S, Mondière P, Pénarier G, Fur GL, Defrance T, Casellas P: Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood* (1998) **92**:3605–3615.
 141. Rossi F, Tortora C, Argenziano M, Di Paola A, Punzo F: Cannabinoid Receptor Type 2: A Possible Target in SARS-CoV-2 (CoV-19) Infection? *Int J Mol Sci* (2020) **21**: doi:10.3390/ijms21113809
 142. Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Abood ME: Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* (1999) **377**:117–125.

143. Onaivi ES: Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology* (2006) **54**:231–246.
144. Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernandez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Manzanares J: Deletion of CB2 Cannabinoid Receptor Induces Schizophrenia-Related Behaviors in Mice. *Neuropsychopharmacology* (2011) **36**:1489–1504.
145. Roche M, Finn DP: Brain CB₂ Receptors: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Pharmaceuticals* (2010) **3**:2517–2553.
146. Palazuelos J, Aguado T, Egia A: Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *The FASEB* (2006) **20(13)**:2405-7.
147. Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arevalo-Martin A, Gomez-Torres O, Molina-Holgado E: CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci* (2007) **25**:629–634.
148. Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M: Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* (2004) **132**:87–92.
149. Zhang H-Y, Gao M, Liu Q-R, Bi G-H, Li X, Yang H-J, Gardner EL, Wu J, Xi Z-X: Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) **111**:E5007–15.
150. Aymerich MS, Aso E, Abellanas MA, Tolon RM, Ramos JA, Ferrer I, Romero J, Fernández-Ruiz J: Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system. *Biochem Pharmacol* (2018) **157**:67–84.
151. Rossi S, Bernardi G, Centonze D: The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral

- sclerosis. *Exp Neurol* (2010) **224**:92–102.
152. Chen D-J, Gao M, Gao F-F, Su Q-X, Wu J: Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin* (2017) **38**:312–316.
 153. Aso E, Ferrer I: CB2 Cannabinoid Receptor As Potential Target against Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* (2016) **10**:243.
 154. Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Imai K, Suzuki Y, Morikawa M, Inada T, Watanabe Y, Takahashi M, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Onaivi ES, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Naka I, Ohashi J, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T: Brain Cannabinoid CB2 Receptor in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2010) **67**:974–982.
 155. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Onaivi EO, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Chirwa SS, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR: Functional Expression of Brain Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors Are Involved in the Effects of Drugs of Abuse and in Depression. *Drug Addiction: Research Frontiers and Treatment Advances* (2008) **1139**:434–449.
 156. Ishiguro H, Iwasaki S, Teasenfitz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T, Onaivi ES: Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J* (2007) **7**:380–385.
 157. Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG: Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev* (2009) **60**:255–266.
 158. Benyamina A, Kebir O, Blecha L, Reynaud M, Krebs M-O: CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict Biol* (2011) **16**:1–6.
 159. Gonda X, Petschner P, Eszlari N, Sutori S, Gal Z, Koncz S, Anderson IM, Deakin

- B, Juhasz G, Bagdy G: Effects of Different Stressors Are Modulated by Different Neurobiological Systems: The Role of GABA-A Versus CB1 Receptor Gene Variants in Anxiety and Depression. *Front Cell Neurosci* (2019) **13**:138.
160. Rossi F, Bellini G, Tolone C, Luongo L, Mancusi S, Papparella A, Sturgeon C, Fasano A, Nobili B, Perrone L, Maione S, Miraglia del Giudice E: The Cannabinoid Receptor type 2 Q63R variant increases the risk of celiac disease: Implication for a novel molecular biomarker and future therapeutic intervention. *Pharmacol Res* (2012) **66**:88–94.
 161. Carrasquer A, Nebane NM, Williams WM, Song ZH: Functional consequences of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the CB2 cannabinoid receptor. *Pharmacogenet Genomics* (2010) **20**:157–166.
 162. Hill MN, Miller GE, Ho W-SV, Gorzalka BB, Hillard CJ: Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry* (2008) **41**:48–53.
 163. Rossi F, Bellini G, Alisi A, Alterio A, Maione S, Perrone L, Locatelli F, Miraglia del Giudice E, Nobili V: Cannabinoid receptor type 2 functional variant influences liver damage in children with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* (2012) **7**:e42259.
 164. Coppola N, Zampino R, Bellini G, Macera M, Marrone A, Pisaturo M, Boemio A, Nobili B, Pasquale G, Maione S, Adinolfi LE, Laura Perrone, Sagnelli E, Miraglia Del Giudice E, Rossi F: Association between a polymorphism in cannabinoid receptor 2 and severe necroinflammation in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2014) **12**:334–340.
 165. Strisciuglio C, Bellini G, Miele E, Martinelli M, Cenni S, Tortora C, Tolone C, Miraglia Del Giudice E, Rossi F: Cannabinoid Receptor 2 Functional Variant Contributes to the Risk for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* (2018) **52**:e37–e43.
 166. Bellini G, Olivieri AN, Grandone A, Alessio M, Gicchino MF, Nobili B, Perrone

- L, Maione S, del Giudice EM, Rossi F: Association between cannabinoid receptor type 2 Q63R variant and oligo/polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* (2015) **44**:284–287.
167. Ishiguro H, Carpio O, Horiuchi Y, Shu A, Higuchi S, Schanz N, Benno R, Arinami T, Onaivi ES: A nonsynonymous polymorphism in cannabinoid CB2 receptor gene is associated with eating disorders in humans and food intake is modified in mice by its ligands. *Synapse* (2010) **64**:92–96.
168. Karsak M, Malkin I, Toliat MR, Kubisch C, Nurnberg P, Zimmer A, Livshits G: The cannabinoid receptor type 2 (CNR2) gene is associated with hand bone strength phenotypes in an ethnically homogeneous family sample. *Hum Genet* (2009) **126**:629–636.
169. Rossi F, Mancusi S, Bellini G, Roberti D, Punzo F, Vetrella S, Matarese SMR, Nobili B, Maione S, Perrotta S: CNR2 functional variant (Q63R) influences childhood immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* (2011) **96**:1883–1885.
170. Rossi F, Tortora C, Palumbo G, Punzo F, Argenziano M, Casale M, Di Paola A, Locatelli F, Perrotta S: CB2 Receptor Stimulation and Dexamethasone Restore the Anti-Inflammatory and Immune-Regulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells of Children with Immune Thrombocytopenia. *Int J Mol Sci* (2019) **20**: doi:10.3390/ijms20051049
171. Ezzat DA, Hammam AA, El-Malah WM, Khattab RA, Mangoud EM: Role of Cannabinoid CB2 Receptor Gene (CNR2) Polymorphism in Children with Immune Thrombocytopenic Purpura in Beni-Suef Governorate in Egypt. *Egypt J Immunol* (2017) **24**:57–66.
172. Bellini G, Grandone A, Torella M, del Giudice EM, Nobili B, Perrone L, Maione S, Rossi F: The Cannabinoid Receptor 2 Q63R Variant Modulates the Relationship between Childhood Obesity and Age at Menarche. *PLoS One* (2015) **10**: doi:ARTN e0140142

173. Reinhard W, Stark K, Neureuther K, Sedlacek K, Fischer M, Baessler A, Weber S, Kaess B, Wiedmann S, Erdmann J, Lieb W, Jeron A, Riegger G, Hengstenberg C: Common polymorphisms in the cannabinoid CB2 receptor gene (CNR2) are not associated with myocardial infarction and cardiovascular risk factors. *Int J Mol Med* (2008) **22**:165–174.
174. Minocci D, Massei J, Martino A, Milianti M, Piz L, Di Bello D, Sbrana A, Martinotti E, Rossi AM, Nieri P: Genetic association between bipolar disorder and 524A > C (Leu133Ile) polymorphism of CNR2 gene, encoding for CB2 cannabinoid receptor. *J Affect Disord* (2011) **134**:427–430.
175. Xie XQ, Chen JZ, Billings EM: 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins* (2003) **53**:307–319.
176. Qureshi HY, Ahmad R, Zafarullah M: High-efficiency transfection of nucleic acids by the modified calcium phosphate precipitation method in chondrocytes. *Anal Biochem* (2008) **382**:138–140.
177. Ward WW, Cormier MJ: An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* (1979) **254**:781–788.
178. Xu Y, Piston DW, Johnson CH: A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) **96**:151–156.
179. Salahpour A, Espinoza S, Masri B, Lam V, Barak LS, Gainetdinov RR: BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol* (2012) **3**:105.
180. Spillmann M, Thurner L, Romantini N, Zimmermann M, Meger B, Behe M, Waldhoer M, Schertler GFX, Berger P: New Insights into Arrestin Recruitment to GPCRs. *Int J Mol Sci* (2020) **21**: doi:10.3390/ijms21144949
181. Várnai P, Tóth B, Tóth DJ, Hunyady L, Balla T: Visualization and Manipulation of Plasma Membrane-Endoplasmic Reticulum Contact Sites Indicates the Presence of

- Additional Molecular Components within the STIM1-Orai1 Complex. *Journal of Biological Chemistry* (2007) **282**:29678–29690. doi:10.1074/jbc.m704339200
182. Dunham WH, Mullin M, Gingras A-C: Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *PROTEOMICS* (2012) **12**:1576–1590. doi:10.1002/pmic.201100523
 183. Fields S, Song O-K: A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* (1989) **340**:245–246.
 184. Weibrecht I, Leuchowius K-J, Clausson C-M, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Söderberg O: Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics* (2010) **7**:401–409.
 185. Roux KJ: Marked by association: techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells. *Cell Mol Life Sci* (2013) **70**:3657–3664.
 186. Rhee H-W, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY: Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* (2013) **339**:1328–1331.
 187. Osbourn JK: Proximity-guided (ProxiMol) antibody selection. *Methods Mol Biol* (2002) **178**:201–205.
 188. Chapman-Smith A, Cronan JE Jr: Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr* (1999) **129**:477S–484S.
 189. Cronan JE Jr: Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J Biol Chem* (1990) **265**:10327–10333.
 190. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B: A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* (2012) **196**:801–810.
 191. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux KJ: An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell* (2016)

- 27:1188–1196.
192. Zempleni J: Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* (2005) **25**:175–196.
 193. Kim DI, Roux KJ: Filling the Void: Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells. *Trends Cell Biol* (2016) **26**:804–817.
 194. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY: Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* (2018) **36**:880–+.
 195. Horváth B, Orsy P, Benyó Z: Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. *J Cardiovasc Pharmacol* (2005) **45**:225–231.
 196. Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavón FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF: Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* (2009) **5**:37–44.
 197. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS: Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* (2000) **275**:17201–17210.
 198. Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M: Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* (2021) **18**:100–106.
 199. Pandey P, Roy KK, Doerksen RJ: Negative allosteric modulators of cannabinoid receptor 2: protein modeling, binding site identification and molecular dynamics simulations in the presence of an orthosteric agonist. *J Biomol Struct Dyn* (2020) **38**:32–47.
 200. Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z: Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* (1998) **71**:1525–1534.

201. Hillard CJ, Ho W-S, Thompson J, Gauthier KM, Wheelock CE, Huang H, Hammock BD: Inhibition of 2-arachidonoylglycerol catabolism modulates vasoconstriction of rat middle cerebral artery by the thromboxane mimetic, U-46619. *British Journal of Pharmacology* (2007) **152**:691–698. doi:10.1038/sj.bjp.0707468
202. Bátkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertáler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G: Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* (2004) **110**:1996–2002.
203. Ho W-SV, Gardiner SM: Acute hypertension reveals depressor and vasodilator effects of cannabinoids in conscious rats. *Br J Pharmacol* (2009) **156**:94–104.
204. Liao Y, Bin J, Asakura M, Xuan W, Chen B, Huang Q, Xu D, Ledent C, Takashima S, Kitakaze M: Deficiency of type 1 cannabinoid receptors worsens acute heart failure induced by pressure overload in mice. *Eur Heart J* (2012) **33**:3124–3133.
205. Hansen PBL: New Role of P/Q-type Voltage-gated Calcium Channels: From Transmitter Release to Contraction of Renal Vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* (2015) **65**:406–411.
206. Hunyady L, Catt KJ: Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* (2006) **20**:953–970.
207. Liu J, Jie LIU, Bin GAO, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G: Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochemical Journal* (2000) **346**:835–840. doi:10.1042/bj3460835
208. Haspula D, Clark MA: MAPK activation patterns of AT1R and CB1R in SHR versus Wistar astrocytes: Evidence of CB1R hypofunction and crosstalk between AT1R and CB1R. *Cell Signal* (2017) **40**:81–90.
209. Miklós Z, Wafa D, Nádasz GL, Tóth ZE, Besztercei B, Dörnyei G, Laska Z, Benyó Z, Ivanics T, Hunyady L, Szekeres M: Angiotensin II-Induced Cardiac Effects Are

- Modulated by Endocannabinoid-Mediated CB1 Receptor Activation. *Cells* (2021) **10**: doi:10.3390/cells10040724
210. Liggett SB: The pharmacogenetics of β 2-adrenergic receptors: Relevance to asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2000) **105**:S487–S492.
 211. Bhosale S, Nikte SV, Sengupta D, Joshi M: Differential Dynamics Underlying the Gln27Glu Population Variant of the β 2-Adrenergic Receptor. *J Membr Biol* (2019) **252**:499–507.
 212. Lotta LA, Mokrosiński J, Mendes de Oliveira E, Li C, Sharp SJ, Luan J 'an, Brouwers B, Ayinampudi V, Bowker N, Kerrison N, Kaimakis V, Hoult D, Stewart ID, Wheeler E, Day FR, Perry JRB, Langenberg C, Wareham NJ, Farooqi IS: Human Gain-of-Function MC4R Variants Show Signaling Bias and Protect against Obesity. *Cell* (2019) **177**:597–607.e9.
 213. Wang J, Xu J, Liu J, Zhu H, Peng Y, Ding ZM, Hua H: Genetic Variant Q63R of Cannabinoid Receptor 2 Causes Differential ERK Phosphorylation in Human Immune Cells. *Genet Test Mol Biomarkers* (2018) **22**:320–326.
 214. Seyedabadi M, Gharghabi M, Gurevich EV, Gurevich VV: Receptor-Arrestin Interactions: The GPCR Perspective. *Biomolecules* (2021) **11**:218. doi:10.3390/biom11020218
 215. Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. *FASEB J* (1995) **9**:726–735.
 216. Al-Zoubi R, Morales P, Reggio PH: Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. *Int J Mol Sci* (2019) **20**: doi:10.3390/ijms20081837
 217. Ibsen MS, Connor M, Glass M: Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. *Cannabis Cannabinoid Res* (2017) **2**:48–60.
 218. Morales P, Goya P, Jagerovic N: Emerging strategies targeting CB2 cannabinoid receptor: Biased agonism and allosterism. *Biochem Pharmacol* (2018) **157**:8–17.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Szekeres M, Nádasy GyL, Turu G, **Soltész-Katona E**, Tóth ZSE, 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 7;287(37):31540-50. IF: 4,651

Szekeres M, Nádasy GyL, Turu G, **Soltész-Katona E**, Benyó Z, Offermanns S, Ruisanchez É, Szabó E, Takáts Z, Bátkaí S, Tóth ZSE, Hunyady L (2015)

Endocannabinoid-mediated modulation of Gq/11 protein-coupled receptor signaling-induced vasoconstriction and hypertension

Mol Cell Endocrinol 5;403:46-56. IF: 3,859

Szekeres M, Nádasy GyL, **Soltész-Katona E**, Hunyady L (2018)

Control of myogenic tone and agonist induced contraction of intramural coronary resistance arterioles by cannabinoid type 1 receptors and endocannabinoids

Prostaglandins Other Lipid Mediat 134:77-83. IF: 2,253

Turu G, **Soltész-Katona E***, Tóth AD, Juhász C, Cserző M, Misák Á, Balla A, Caron MG, Hunyady L (2021)

Biased coupling to β -arrestin of two common variants of the CB₂ cannabinoid receptor
Front Endocrinol DOI: 10.3389/fendo.2021.714561 IF: 5,555

(*megosztott elsőszerezős közlemény)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőimnek, Prof. Hunyady Lászlónak és Dr. Turu Gábornak szeretnék köszönetet mondani: Prof. Hunyady László bizalmat szavazott nekem, amikor 2009-ben biológusként felvett az Élettani Intézetbe, és néhány évre rá lehetőséget adott, hogy elkezdjem a doktori képzést, mindig hitte hogy sikerülni fog. Dr. Turu Gábor pozitív és bátorító személyiségevel, és persze kiváló ötleteivel kísérte végig a doktori munkámat, nem lehetek elég hálás ezért. Köszönöm program-, és később doktori iskola vezetőmnek, Prof. Ligeti Erzsébetnek, majd Prof. Enyedi Péternek, hogy figyelemmel kísérte munkámat.

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Balla Andrásnak, hogy amikor az intézetbe kerültem megtanított a molekuláris biológiával kapcsolatos labor munkálatokra, bevezette a kísérletezés világába, és meggyőzött arról, hogy érdemes csatlakozni a doktori képzéshez. Külön köszönöm Dr. Tóth Andrásnak az értékes tudását és hatalmas hozzájárulását az itt bemutatott munkához. Köszönöm Dr. Szekeres Máriának, hogy doktori munkám első évében együtt dolgoztunk, és kiegészítve az általános labor technikákat, bevezetett az állatkísérletes munkák világába.

Köszönöm Prof. Várnai Péternek hogy figyelemmel kísérte a munkámat. Köszönöm a közös munkát Dr. Cserző Miklósnak és az együttműködéseket Prof. Nádasy Györgynek.

Köszönöm volt és jelenlegi TDK hallgatóknak, akikkel együtt dolgoztam az évek alatt, Dr. Aczél Dórának, Juhász Cintiának, Dr. Boros Roxánának, Gutti Viktornak, Kis Katalinnak, Ékes Ágostonnak a kísérletekben való részvételüket. Köszönöm laborunk volt és jelenlegi asszisztenseinek, Rácz Juditnak, Oláh Ilonának, Halász Eszternek, és Szabolcsi Katának a rengeteg háttérmunkát, amely nélkül egyik kutatás sem jöhetett volna létre. Köszönöm volt és jelenlegi munkatársaimnak, Dr. Szakadati Gyöngyinek, Dr. Gyombolai Pálnak, Dr. Erdélyi Lászlónak, Dr. Tóth Dánielnek, Matuska Ritának, Porkoláb Editnek, Dr. Tóth Józsefnek, Dr. Gulyás Gergőnek, Dr. Szalai Bencének, Dr. Cserző Miklósnak, Kovács Orsolyának, Barsi Szilviának, Kovács Kingának, Dr. Gém Jankának, Dr. Misák Ádámnak, Dr. Nagy Dánielnek az együtt eltöltött időt és élményeket. Köszönöm Józán Jolánnak, Szilágyi Annának és Pusztai Gyöngyinek, hogy ügyintéзések tekintetében bármikor fordulhattam hozzájuk, és mindig barátságosan

segítettek. Köszönöm az Élettani Intézet jelenlegi igazgatójának Prof. Mócsai Attilának és valamennyi munkatársnak a befogadó környezetet, a kiváló munkakörülményeket, hálás vagyok a lehetőségért, hogy ennek az intézetnek a részese lehetek.

Természetesen a legfontosabb, hogy végtelen köszönettel tartozom barátaimnak és családomnak, amiért mindenben támogattak.