

# A $\beta$ -arresztinek szerepe a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor működésének szabályozásában

Doktori értekezés

**Dr. Gyombolai Pál**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

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

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sperlág Beáta, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	9
2.1. A 7-transzmembrán receptorok (7TMR-ok) működésének általános jellemzése.....	9
2.1.1. A 7TMR-ok szerkezetének és működésének alapjai.....	10
2.1.1.1. A DRY motívum szerepe a 7TMR-ok működésében.....	10
2.1.1.2. A 7TMR-ok bazális aktivitása.....	12
2.1.2. A 7TMR-ok jelátvitel.....	14
2.1.2.1. A 7TMR-ok funkcionális szelektivitása – „elfogult” jelátvitel.....	17
2.1.3. A 7TMR-ok válaszkészségének szabályozása.....	19
2.1.3.1. A 7TMR-ok homológ és heterológ deszenzitizációja.....	21
2.1.3.2. A 7TMR-ok internalizációja.....	23
2.1.3.2.1. Az internalizálódott receptor sorsa, az internalizáció jelentősége.....	26
2.1.3.2.2. A 7TMR-ok konstitutív internalizációja.....	27
2.2. A $\beta$ -arresztin fehérjék.....	29
2.2.1. Az arresztin fehérjecsalád.....	29
2.2.2. A $\beta$ -arresztinek szerkezete és a 7TMR-arresztin kapcsolat.....	29
2.2.3. A $\beta$ -arresztinek szerepe a 7TMR-ok szabályozásában.....	34
2.2.3.1. A $\beta$ -arresztinek és a deszenzitizáció.....	34
2.2.3.2. A $\beta$ -arresztinek és az internalizáció.....	34
2.2.3.3. A $\beta$ -arresztinek és a jelátvitel.....	35
2.2.3.4. A $\beta$ -arresztin-7TMR kapcsolat további részletei.....	37
2.3. Az endokannabinoid rendszer és a CB <sub>1</sub> kannabinoid receptor.....	38
2.3.1. Az endokannabinoid rendszer felépítése és működése.....	38
2.3.1.1. Az endokannabinoid rendszer megismerésének rövid története.....	38
2.3.1.2. Az endokannabinoidok keletkezése és lebomlása.....	39
2.3.1.3. A kannabinoid receptorcsalád rövid bemutatása.....	41
2.3.2. A CB <sub>1</sub> kannabinoid receptor (CB <sub>1</sub> R).....	42
2.3.2.1. A CB <sub>1</sub> R élettani szerepe.....	42

2.3.2.1.1. A CB <sub>1</sub> R szerepe az idegrendszerben .....	42
2.3.2.1.2. A CB <sub>1</sub> R szerepe a keringési rendszerben .....	46
2.3.2.1.3. A CB <sub>1</sub> R szerepe a zsírszövetben és a májban.....	47
2.3.2.1.4. A CB <sub>1</sub> R szerepe egyéb szövetekben.....	48
2.3.2.2. A CB <sub>1</sub> R jelátvittele .....	48
2.3.2.3. A CB <sub>1</sub> R deszenzitizációja és internalizációja, a $\beta$ -arr2 szerepe .....	50
2.3.2.3.1. A CB <sub>1</sub> R deszenzitizációja.....	50
2.3.2.3.2. A CB <sub>1</sub> R agonista-indukált és konstitutív internalizációja .....	51
2.3.2.3.3. A $\beta$ -arresztinek és a CB <sub>1</sub> R közötti kapcsolat eddig ismert részletei ....	53
3. Célkitűzések .....	55
4. Módszerek .....	56
4.1. A kísérletekben használt anyagok .....	56
4.2. Plazmid konstrukciók és irányított mutagenézis .....	57
4.3. Sejtkultúrák és transzfekció.....	58
4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések .....	58
4.4.1. A BRET módszer rövid ismertetése .....	58
4.4.2. G <sub>o</sub> -fehérje BRET .....	61
4.4.3. $\beta$ -arresztin BRET .....	62
4.4.4. Receptor-plazmamembrán BRET.....	64
4.4.5. Internalizációs BRET .....	65
4.4.6. cAMP (EPAC) BRET.....	66
4.5. Konfokális lézermikroszkópia.....	67
4.6. Halo-jelölés, jelölési protokollok .....	68
4.7. Western blot mérések .....	69
4.7.1. $\beta$ -arr2 és klatrin nehézlánc Western blot.....	69
4.7.2. pERK1/2 Western blot .....	70
4.8. Az adatok elemzése és statisztikai kiértékelés .....	70
5. Eredmények .....	72
5.1. A CB <sub>1</sub> R és a $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat jellemzése.....	72

5.1.1. A CB <sub>1</sub> R és a β-arresztinek kapcsolatának vizsgálata konfokális mikroszkóppal .....	72
5.1.2. A CB <sub>1</sub> R és a β-arresztinek kapcsolatának vizsgálata BRET módszerrel .....	76
5.2. A CB <sub>1</sub> R agonista-indukált és konstitutív internalizációjának részletes vizsgálata....	78
5.2.1. A β-arr2 szerepének vizsgálata a CB <sub>1</sub> R agonista-indukált internalizációjában .	78
5.2.1.1. Az agonista-indukált internalizáció vizsgálata a Halo-jelölési technika segítségével.....	78
5.2.1.2. Az agonista-indukált internalizáció vizsgálata BRET módszer segítségével .....	82
5.2.2. A konstitutív CB <sub>1</sub> R internalizáció mechanizmusának jellemzése.....	84
5.2.2.1. A konstitutív CB <sub>1</sub> R internalizáció aktivitás-függésének vizsgálata .....	84
5.2.2.2. A konstitutív CB <sub>1</sub> R internalizáció β-arr2- és klatrin-függésének vizsgálata .....	84
5.3. A konzervált DRY motívum szerepének vizsgálata a CB <sub>1</sub> R működésében.....	90
5.3.1. Mutációk létrehozása a CB <sub>1</sub> R DRY régiójában .....	90
5.3.2. A DRY mutáns CB <sub>1</sub> R-ok plazmamembránon való kifejeződésének vizsgálata	90
5.3.3. A DRY mutáns CB <sub>1</sub> R-ok működésének jellemzése.....	92
5.3.3.1. A CB <sub>1</sub> R-DAY mutáns jellemzése .....	92
5.3.3.2. A CB <sub>1</sub> R-DRA mutáns jellemzése.....	95
5.3.3.3. A CB <sub>1</sub> R-AAY mutáns jellemzése .....	97
5.3.3.4. A CB <sub>1</sub> R-DAA mutáns jellemzése .....	99
5.3.4. A DRY mutánsok β-arr1 kötésének vizsgálata .....	101
5.3.5. A CB <sub>1</sub> R-AAY és a CB <sub>1</sub> R-DAA mutánsok elfogult jelátvitelének elemzése ...	103
5.3.6. A CB <sub>1</sub> R-AAY és a CB <sub>1</sub> R-DAA mutánsok további jelátvitelének vizsgálata ..	105
6. Megbeszélés .....	108
6.1. A CB <sub>1</sub> R és a β-arresztinek közötti kapcsolat jellemzése.....	108
6.2. A CB <sub>1</sub> R konstitutív és agonista-indukált internalizációjának részletes vizsgálata..	110
6.3. A konzervált DRY motívum szerepének vizsgálata a CB <sub>1</sub> R működésében.....	114
7. Következtetések.....	119
8. Összefoglalás .....	120

9. Summary.....	121
10. Irodalomjegyzék.....	122
11. Saját közlemények jegyzéke.....	148
12. Köszönetnyilvánítás .....	149

## 1. Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonil-glicerin
5-HT <sub>2C</sub>	2C típusú szerotonin receptor
7TMR	7-transzmembrán receptor
AMP	adenozin-monofoszfát
AP-2	adapter protein-2
ARF6	ADP-ribosilációs faktor 6
ASK1	apoptózis szignál által regulált kináz 1
AT <sub>1</sub> R	1-es típusú angiotenzin II receptor
AtT20	egér hipofízis sejt
β <sub>2</sub> AR	β <sub>2</sub> adrenerg receptor
β-arr1	β-arresztin1
β-arr2	β-arresztin2
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
BSA	szarvasmarha szérum albumin
cAMP	3'-5'-ciklikus adenozin-monofoszfát
CB <sub>1</sub> R	1-es típusú kannabinoid receptor, CB <sub>1</sub> receptor
CB <sub>1</sub> R-AAA	CB <sub>1</sub> R-D3.49A/R3.50A/Y3.51A
CB <sub>1</sub> R-AAV	CB <sub>1</sub> R-D3.49A/R3.50A
CB <sub>1</sub> R-ARA	CB <sub>1</sub> R-D3.49A/Y3.51A
CB <sub>1</sub> R-ARY	CB <sub>1</sub> R-D3.49A
CB <sub>1</sub> R-DAA	CB <sub>1</sub> R-R3.50A/Y3.51A
CB <sub>1</sub> R-DAY	CB <sub>1</sub> R-R3.50A
CB <sub>1</sub> R-DRA	CB <sub>1</sub> R-Y3.51A
cGMP	3'-5'-ciklikus guanozin-monofoszfát
CHO	kínai hörcsög ovárium sejt
DAG	diacilglicerin
DMEM	Dulbecco által módosított összetételű Eagle médium

	( <b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agle <b>M</b> edium)
DMSO	dimetil-szulfoxid (vivőanyag)
DRY	aszparaginsav-arginin-tirozin
DSE	depolarizáció-indukált serkentés-csökkenés ( <b>d</b> epolarization-induced <b>s</b> uppression of <b>e</b> xcitation)
DSI	depolarizáció-indukált gátláscsökkenés ( <b>d</b> epolarization-induced <b>s</b> uppression of <b>i</b> nhibition)
EC <sub>50</sub>	félmaximális effektív koncentráció
ECL1-3	1-3. extracelluláris hurokrégió
EPAC	cAMP-aktivált kicserélő fehérje ( <b>e</b> xchange <b>p</b> rotein <b>a</b> ctivated by <b>c</b> AMP)
eps15	epidermális növekedési faktor receptor szubsztrát 15
ERK	extracelluláris jel által regulált kináz
F11	patkány embrionális hátsó gyöki ganglionsejt
FAAH	zsírsavamid-hidroláz ( <b>f</b> atty <b>a</b> cid <b>a</b> mide <b>h</b> ydrolase)
FBS	magzati borjú szérum ( <b>f</b> etal <b>b</b> ovine <b>s</b> erum)
GABA	γ-amino-vajsav
GASP-1	G-fehérjéhez kapcsolt receptor-asszociált szortírozó protein-1
GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor ( <b>g</b> uanine nucleotide <b>e</b> xchange <b>f</b> actor)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje ( <b>g</b> reen <b>f</b> luorescent <b>p</b> rotein)
GIRK	G-fehérjéhez kapcsolt, befelé rektifikáló kálium-csatorna
GRK	G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz
GTP	guanozin-trifoszfát
Halo-CB <sub>1</sub> R	N-terminálisan HaloTag®-gel jelölt CB <sub>1</sub> R
HEK293	humán embrionális vesesejt
HRP	tornaperoxidáz ( <b>h</b> orseradish- <b>p</b> eroxidase)
IC	intracelluláris
ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1

ICL1-3	1-3. intracelluláris hurokrégió
I $\kappa$ B $\alpha$	NF $\kappa$ B gátló fehérje $\alpha$
IL2R $\beta$	interleukin-2 receptor $\beta$
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LDL	kis sűrűségű lipoprotein ( <b>low-density lipoprotein</b> )
M <sub>3</sub>	muszkarinos acetil-kolin receptor 3
MAG	monoacilglicerín
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEK1	mitogén-aktivált protein kináz kináz 1
MKK4	mitogén-aktivált protein kináz kináz 4
MKP7	mitogén-aktivált protein kináz foszfatáz 7
MP-mVenus	plazmamembránhoz irányított mVenus
MP-Sluc	plazmamembránhoz irányított Sluc
mVenus	monomer Venus
N18TG2	egér neuroblasztóma sejt
NAPE	N-arachidonil-foszfatidiletanolamin
NAPE-PLD	NAPE-specifikus foszfolipáz D
NAT	N-aciltranszferáz
NF $\kappa$ B	nukleáris faktor $\kappa$ B
NMR	nukleáris mágneses rezonancia
PAR1	proteáz aktivált receptor-1
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PBST	0,05% Tween-20 tartalmú PBS
PCR	polimeráz láncreakció
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PM	plazmamembrán
PVDF	polivinilidén fluorid

RET	rezonancia energiatranszfer
RFP	vörös fluoreszcens fehérje
Rluc	Renilla luciferáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	az átlag szórása (standard error of mean)
Ser/Thr	szerin/treonin
Sluc	szuper Renilla luciferáz
THC	$\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol
TM1-7	1-7. transzmembrán hélix
TP $\beta$	tromboxán A2 receptor $\beta$
TRP	tranziens receptor potenciál
TRPV	tranziens receptor potenciál vanilloid
WIN55	WIN55,212-2 (szintetikus CB <sub>1</sub> R agonista)
YFP	sárga fluoreszcens fehérje (yellow fluorescent protein)
YXX $\Phi$	tirozin-X-X-hidrofób aminosavak

## 2. Bevezetés

A dolgozatom alapjául szolgáló kísérletes munka során a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R) és a β-arresztin fehérjék kapcsolatát vizsgáltuk részletesen. Ennek megfelelően a bevezető fejezet legnagyobb részét is e fehérjék működésének, illetve élettani szerepének bemutatása alkotja. Mivel a CB<sub>1</sub>R a 7-transzmembrán receptorok (7TMR-ok) családjába tartozik, így részletesebb megismeréséhez elengedhetetlen e receptorcsalád alapvető szerkezeti és működési jellemzőinek bemutatása. A β-arresztinek pedig alapvetően a 7TMR-ok válaszkészségének szabályozási folyamataiban szerepet játszó fehérjék. Így e folyamatok általános ismertetése is szükséges ahhoz, hogy a β-arresztinek működését részletesebben tárgyalhassuk. Ezért az érintett fehérjék részletes jellemzése előtt külön fejezetet szentelek a 7-transzmembrán receptorok általános ismertetésének, érintve e receptorcsalád alapvető szerkezeti és működési jellemzőit, valamint bemutatva válaszkészségük szabályozásának elemeit. Az így vázolt rendszerbe reményeim szerint könnyebben illeszthetők bele a CB<sub>1</sub>R-ral, illetve a β-arresztinokkal kapcsolatos részletesebb ismeretek, valamint a célkitűzéseink, és a munkánk során feltárt új eredmények is könnyebben értelmezhetővé válnak.

### ***2.1. A 7-transzmembrán receptorok (7TMR-ok) működésének általános jellemzése***

A sejtekben elhelyezkedő receptorok feladata, hogy a külvilágból a sejt környezetébe érkező jeleket nagy érzékenységgel felfogják, és ennek hatására a sejtben megfelelő biológiai válaszreakciót indítsanak el. A 7TMR-ok a plazmamembrán receptorok legnépesebb családját alkotják, az emberi genomban kb. 950 gén kódol ebbe a családba tartozó fehérjét [1]. Természetesen nemcsak számosságuk, hanem az élettani rendszerekben betöltött szerepük is fontossá teszi őket. Valójában igen nehéz olyan élettani szabályozó folyamatot említeni, amelyben a szövetek, illetve sejtek szintjén a 7TMR-ok ne jutnának kiemelt szerephez. A fény-, szag- és ízérzékelés, a szív működés és a vérnyomás rövid távú

szabályozása, az idegsejtek közötti szinaptikus hírközlés módosítása, vagy például a gyomor-bélrendszeri elválasztó működések irányítása mind 7TMR-ok közreműködésével zajlik. Ennek tudatában nem is meglepő az az adat, mely szerint a jelenleg forgalomban lévő gyógyszereknek kb. fele ilyen receptorok működésének módosításával fejt ki hatását [2]. Mindez indokolja a 7TMR-ok szerkezetének és működésének egyre jobb megismerését.

### **2.1.1. A 7TMR-ok szerkezetének és működésének alapjai**

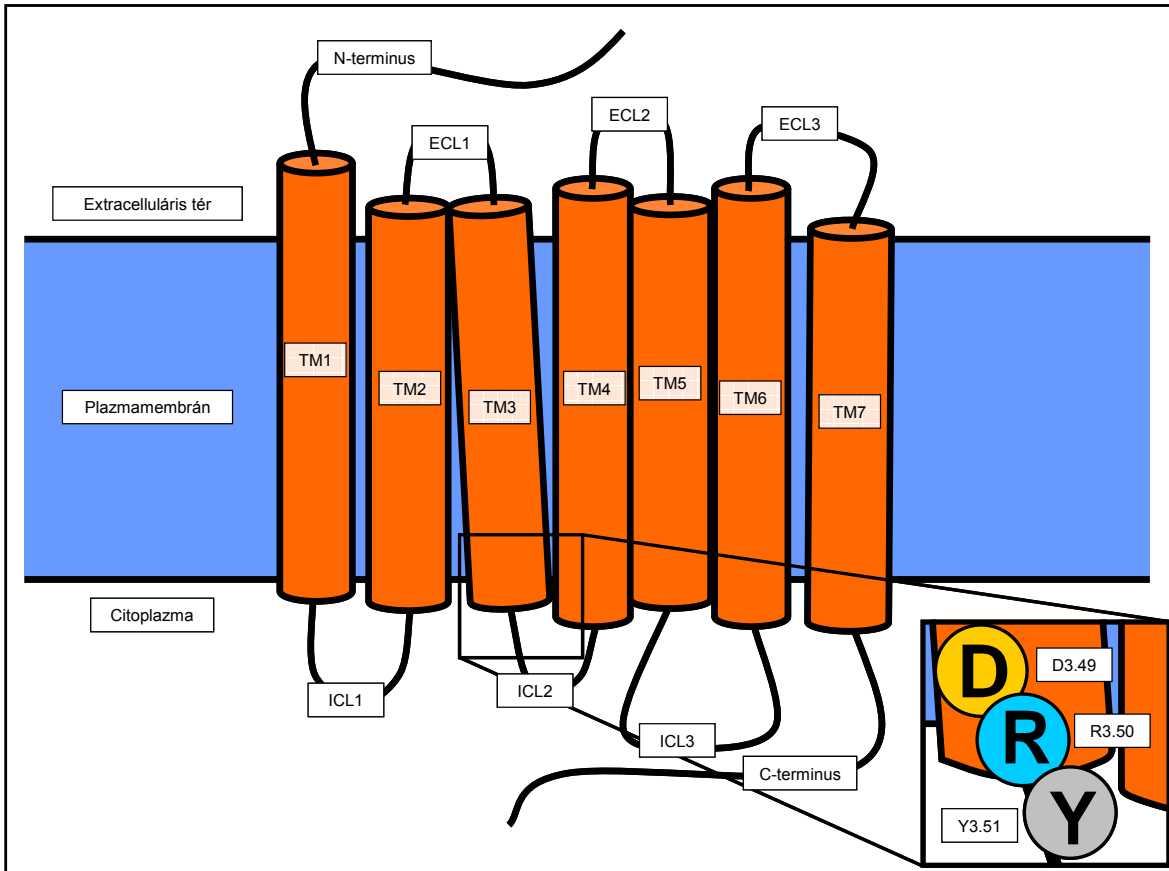
A 7TMR-ok nevüket kémiai szerkezetükről kapták, mivel a család minden tagja hét transzmembrán helikális doménnel rendelkezik (TM1-7), melyeket a sejt belső és külső oldalán három-három intra-, ill. extracelluláris hurokrégió (ICL1-3 és ECL1-3) kapcsol össze egymással. A receptorfehérje N-terminális vége az extracelluláris tér felé, C-terminális vége a citoplazma felé mutat (1. ábra).

A 7TMR-ok működését leíró legegyszerűbb modell szerint ezek a receptorok a sejtek felszínén alapvetően nyugalmi (inaktív) állapotban „várakoznak”, majd agonista ligand érkezése esetén azt nagy érzékenységgel megkötik, ezáltal aktív konformációba váltanak át, és így képessé válnak a rájuk jellemző jelátviteli utak elindítására, ami elsősorban heterotrimer G-fehérjék aktivációját jelenti. (Innen származik a család másik leggyakoribb elnevezése: G-fehérjéhez kapcsolt receptorok).

#### *2.1.1.1. A DRY motívum szerepe a 7TMR-ok működésében*

A 7TMR-ok működésének molekuláris szintű megértéséhez fontos, hogy megismerjük azokat a szerkezeti elemeket, melyek a G-fehérjéhez való kapcsolódást meghatározzák. Ami a receptort illeti, mivel a majdnem ezer 7TMR alig több, mint egy tucat G-fehérjén keresztül fejt ki hatását (ld. később), ezért kell lennie olyan, a törzsfejlődés során megőrzött, konzervált struktúráknak, amelyek a G-fehérje-kötő és -aktiváló képességet minden ilyen receptor esetében biztosítják. A rodopszin-szerű (a 7TMR-ok „A” családjába tartozó) receptorok esetében a harmadik transzmembrán hélix

(TM3) és a második intracelluláris hurok (ICL2) határán elhelyezkedő aszparaginsav-arginin-tirozin aminosav-hármas, az ún. DRY motívum a legkonzerváltabb szekvenciák közé tartozik (1. ábra).



1. ábra A 7TMR-ok vázlatos szerkezete

Az ábrán a 7TMR-ok általános szerkezetét, valamint a konzervált DRY motívum elhelyezkedését tüntettük fel. A rövidítések magyarázata: TM1-7: 1-7. transzmembrán hélix; ECL1-3: 1-3. extracelluláris hurokrégió; ICL1-3: 1-3. intracelluláris hurokrégió; D3.49, R3.50, Y3.51: a DRY motívumot alkotó három aminosav Ballesteros-Weinstein számozás szerinti elnevezése. (A Ballesteros-Weinstein számozás a 7TMR-ok aminosavait úgy nevezi el, hogy az aminosav egybetűs kódját követően egy „X.YZ” formátumú számot ad meg, ahol X a TM hélixet jelenti, YZ pedig a legkonzerváltabb aminosav esetén 50, az ettől N-terminálisan elhelyezkedő aminosavak pedig csökkenő, a C-terminálisan következők növekvő számozást kapnak [3]. Így pl. a 3-as hélix legkonzerváltabb aminosava épp az R3.50, ezért az eggyel előtte található aszparaginsav a D3.49-es, az eggyel utána található tirozin az Y3.51-es elnevezést kapta.)

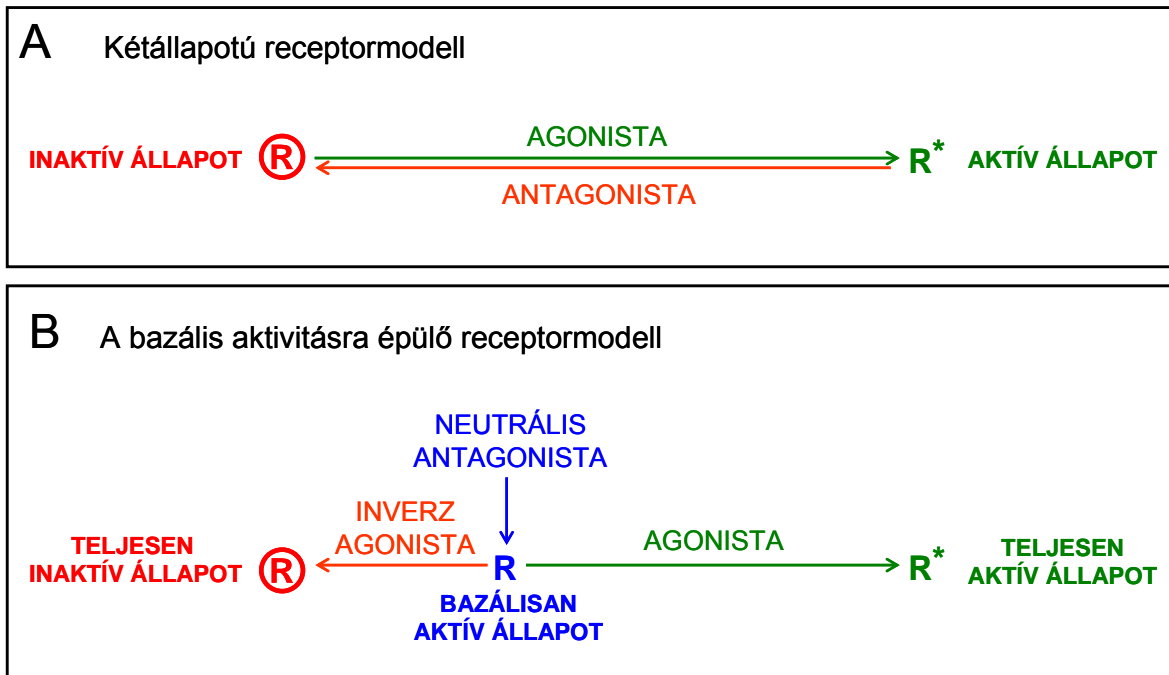
Ennek szerepe tehát a receptor aktiválódásában és G-fehérje kötésében igen hamar felvetődött, és ezt a feltevést a DRY motívumra irányuló számos biokémiai vizsgálat [4-10], valamint a közelmúltban leírt, nagyfelbontású röntgen diffrakciós kristálystruktúrák elemzése is nagyrészt alátámasztja [11]. A jelenlegi elképzelés szerint a 3.50-es arginin (R3.50), amely a motívumon belül is a legkonzerváltabb aminosav, nyugalmi állapotban a receptor inaktív állapotát stabilizálja, részben éppen a szomszédos aszparaginsavval (D3.49), részben pedig a hatodik transzmembrán hélixben található aszpartáttal (D6.30) létesített sóhid-kötések révén. Másrészt az R3.50-t kulcsfontosságúnak gondolják a G-fehérje  $\alpha$  alegységével létrejövő közvetlen kapcsolatban, és ezen keresztül a G-fehérje aktiválásában is. A 3.49-es aszparaginsav (D3.49, amely helyett számos esetben glutaminsavat találunk, azaz E3.49-ről beszélhetünk) az előbb említett sóhid-kötésen keresztül valószínűleg inaktív konformációban stabilizálja a receptort. A tirozin (Y3.51) szerepéről igen kevés ismerettel rendelkezünk. Ráadásul ez mutatja a három aminosav közül a legkisebb fokú megőrzöttséget [11, 12].

A fent leírt klasszikus elképzelést alátámasztó adatok ellenére a DRY motívum szerepe továbbra sem teljesen egyértelmű, ugyanis számos 7TMR esetében ezen aminosavak mutációja csak részlegesen vagy egyáltalán nem hozta létre a várt hatásokat – amely a D3.49 mutációja esetén a receptor konstitutív aktiválódása, R3.50 esetén a G-fehérje kötési képesség elvesztése lenne [6, 8, 13]. Ez arra utal, hogy bár a motívum rendkívüli konzerváltságot mutat, az egyes receptorokban betöltött szerepe mégsem mindig teljesen megegyező, és azt a molekuláris mikrokörnyezet, illetve a receptor másodlagos és harmadlagos szerkezete jelentősen befolyásolhatja [8]. Ezért is érdemes minden vizsgált 7TMR esetében külön-külön elemezni ezen aminosavak szabályozó szerepét.

#### *2.1.1.2. A 7TMR-ok bazális aktivitása*

Amint azt fentebb említettük, a 7TMR-ok működéséről alkotott hagyományos elképzelés szerint ezek a fehérjék úgy működnek, mint egy egyszerű kétállású biológiai kapcsoló, melynek egy ki- és egy bekapcsolt állapota van, a kettő közötti átmenetet pedig

az agonista kötése hozza létre. Ez a farmakológiai modell a receptorok ligandjai között is két típust különböztetett meg: a receptort aktív konformációba állító agonistákat, valamint a receptorhoz szintén kötődő, de azt aktiválni nem képes (kompetitív) antagonistákat (2. ábra, A) [14].



2. ábra A 7-transzmembrán receptorok aktiváltsági állapotai

A, Az eredeti, kétállapotú receptormodell: a receptorok nyugalomban inaktívak, az inaktív és aktív állapotokat pedig az antagonisták és agonisták ligandok stabilizálják (rendre). B, A receptorok bazális aktivitását magában foglaló modell: a receptorok nyugalomban rendelkezhetnek valamekkora bazális aktivitással, a teljesen inaktív, bazálisan aktív és teljesen aktív állapotokat pedig az inverz agonisták, neutrális antagonisták és agonisták stabilizálják (rendre). Az ábrán az áttekinthetőség kedvéért nem tüntettük fel a lehetséges további részlegesen (parciálisan) aktív konformációkat, melyeket parciális agonisták, illetve parciális inverz agonisták képesek stabilizálni.

Az 1980-as évek végén azonban megjelentek az első olyan megfigyelések, melyek szerint bizonyos receptorok agonista jelenléte nélkül is képesek aktív állapotba kerülni [15]. Ezt a jelenséget, amelyet mára számos receptorral kapcsolatban kimutattak, a 7TMR-ok *bazális aktivitásának* (más elnevezéssel: konstitutív, spontán vagy tónusos aktivitásának) nevezzük. A jelenség felfedezése a receptor-állapotokról alkotott modellt is megváltoztatta,

s ez a kibővített modell már magában foglalja a 7TMR-ok azon állapotát, amikor agonista kötése nélkül is aktívak [16]. E modell szerint a receptorok lehetséges aktiváltsági szintjei két végpont (a teljesen aktív és a teljesen inaktív állapot) között egy spektrumot rajzolnak ki (2. ábra, B). Ezen a skálán a bazális aktivitást mutató receptorok alapállapotban is a két végpont között helyezkednek el. A modellváltás kapcsán a receptorok lehetséges ligandjait is újracsoportosították [17]. Az agonista vegyületek a receptorokat az aktív konformációban stabilizálják, és így a teljes aktív állapot felé mozdítják el az egyensúlyi helyzetet (a maximális aktiváció mértékétől függően ezen belül is megkülönböztetnek még teljes, illetve parciális agonista vegyületeket). Neutrális (semleges) antagonisták önmagukban a receptorhoz kötődve nem változtatják meg annak nyugalmi aktiváltsági állapotát, viszont megakadályozzák más ligandok kötődését. Az új fogalomként bevezetett *inverz agonista* molekulák a receptort az inaktív konformációban stabilizálják, így az egyensúlyi helyzetet az alapállapotban meglévő aktivitás felől a teljes inaktív állapot felé mozdítják el. Érdekes módon a fenti modellváltást követő részletes farmakodinamikai vizsgálatok során a korábban egyszerűen antagonistaként leírt ligandok legnagyobb része valójában inverz agonistának bizonyult [18].

Számtalan tanulmány foglalkozott már a 7TMR-ok bazális aktivitásával. Bár a jelenség gyakran receptor-mutáció következtében alakul ki, illetve többnyire mesterséges, rekombináns rendszerekben vizsgálták, élettani jelentőségére is utalnak adatok, például a központi idegrendszeri 5-HT<sub>2C</sub> szerotonin receptor,  $\mu$  opioid receptor vagy a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor esetében [19].

### 2.1.2. A 7TMR-ok jelátvittele

A 7TMR-ok biológiai hatásait döntően a heterotrimer G-fehérjék aktiválásán keresztül hozzák létre. A G-fehérjék neve az eredeti „guanin nukleotid-kötő fehérje” elnevezésből származik, hiszen legfontosabb jellemzőjük, hogy képesek GTP-t, illetve annak hidrolízisét követően GDP-t kötni, és ez alapvetően határozza meg működésüket. A 7TMR-ok által aktivált heterotrimer G-fehérjék (a továbbiakban egyszerűen G-fehérjék)

három alegységből állnak ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Utóbbi kettő azonban a G-fehérje működése során végig szoros kapcsolatban marad, ezért a működés kapcsán  $\alpha$ , illetve  $\beta\gamma$  alegységekről beszélünk. A receptor – G-fehérje kapcsolat működését egy jellegzetes ciklussal írhatjuk le, melyben az inaktív állapotot az  $\alpha$  alegység GDP kötése és a három alegység összekapcsolódása jellemzi, míg a receptor aktiválódásakor a G-fehérje konformációváltozása és az  $\alpha$  alegység GTP kötése következik be, ami az alegységek szétválásával és különböző effektor fehérjék aktiválásával jár együtt. Amennyiben a receptor újra inaktív állapotba kerül, vagy egyéb, a válaszkészségét szabályozó mechanizmusok (ld. később) következtében nem képes tovább aktiválni a G-fehérjét, a ciklus megreked, és a G-fehérje az inaktív, GDP-kötött heterotrimer állapotban stabilizálódik, és ezzel jelátvittele leáll.

A G-fehérjéket az  $\alpha$  alegység alapján nevezzük el, és klasszikusan négy családba soroljuk. A csoportosítást és az egyes G-fehérjékre jellemző legfontosabb hatásokat az 1. táblázatban [20] foglaltam össze.

1. táblázat A heterotrimer G-fehérjék főbb családjai és a rájuk jellemző elsődleges effektorok

G-fehérje család	Főbb altípusok	Elsődleges effektor-mechanizmusok
$G_s$	$G\alpha_s$ , $G\alpha_{olf}$	Adenilát-cikláz $\uparrow$
$G_{i/o}$	$G\alpha_{i1}$ , $G\alpha_{i2}$ , $G\alpha_{i3}$ $G\alpha_{oA}$ , $G\alpha_{oB}$ $G\alpha_{t1}$ , $G\alpha_{t2}$ $G\alpha_z$ $G\alpha_{gust}$	Adenilát-cikláz $\downarrow$ , $K^+$ -csatornák $\uparrow$ , $Ca^{2+}$ -csatornák $\downarrow$ , cGMP foszfodiészteráz $\uparrow$ , cAMP foszfodiészteráz $\uparrow$
$G_{q/11}$	$G\alpha_q$ , $G\alpha_{11}$ , $G\alpha_{14}$ $G\alpha_{15}$ , $G\alpha_{16}$	Foszfolipáz $C\beta$ $\uparrow$
$G_{12/13}$	$G\alpha_{12}$ , $G\alpha_{13}$	RhoGEF-ek $\uparrow$

A legtöbb 7TMR esetében meg lehet nevezni azt a G-fehérje családot, amelyhez a receptor elsődlegesen kapcsolódik, így beszélhetünk  $G_s$ -,  $G_{i/o}$ -  $G_{q/11}$ -, és  $G_{12/13}$ -kapcsolt receptorokról. Ez azonban a valós helyzet leegyszerűsítése. Igen sok receptorról ismert ugyanis, hogy az elsődlegesen aktivált családon túl további G-fehérjékhez is képes

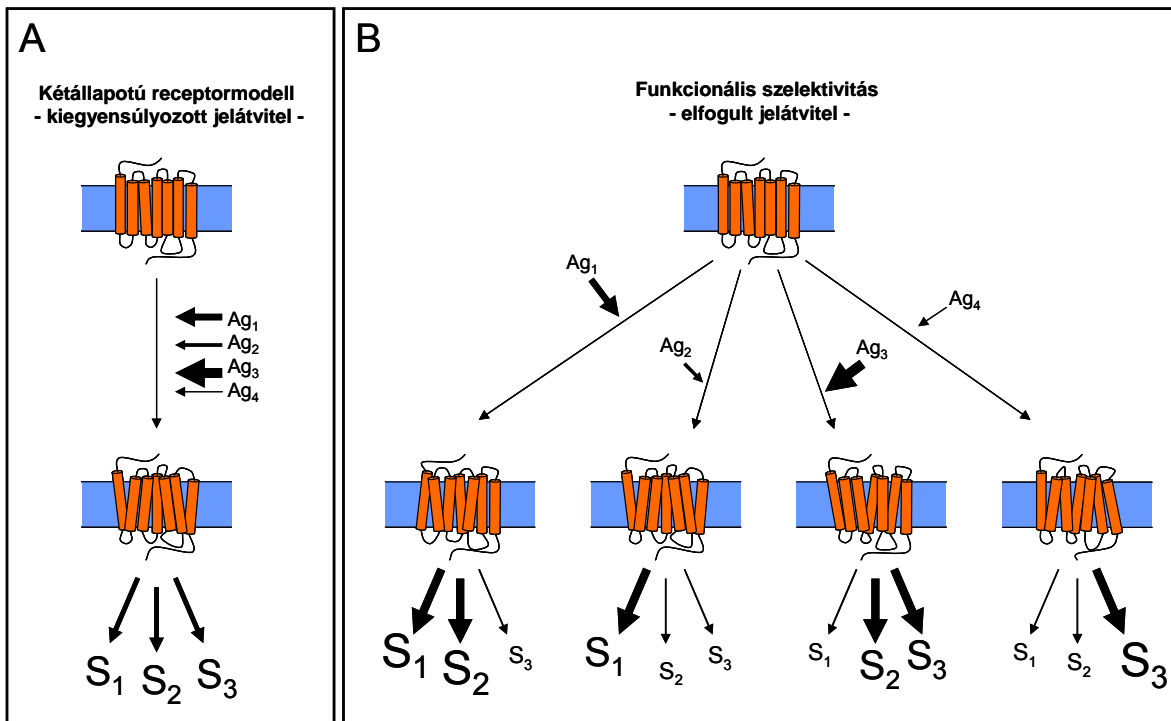
kapcsolódni, és biológiai hatásainak egy részét ezeken keresztül hozza létre. Az  $AT_1$  angiotenzin II receptort ( $AT_1R$ -t) vagy a  $B_2$  bradikinin receptort például klasszikusan  $G_{q/11}$ -kapcsolt receptoroknak tekintik, azonban mindkettő képes aktiválni a  $G_{12/13}$ -fehérjéket, valamint – egyes fajokban, illetve szövetekben – a  $G_{i/o}$ -alcsalád tagjait is [21, 22]. Még a  $G_s$ -kapcsolt receptorok prototípusának tartott  $\beta_2$ -adrenerg receptorról ( $\beta_2AR$ -ról) is leírták, hogy képes  $G_{i/o}$ -fehérjéket aktiválni, ennek pedig szívizomsejtekben lehet élettani jelentősége [23]. Összességében tehát nem ritka jelenség a 7TMR-ok között, hogy egynél több G-fehérje családdhoz kapcsolódhatnak, amit valószínűleg a sejt-, illetve szövetkörnyezet is befolyásol.

Fontos megjegyezni továbbá, hogy bár a G-fehérjét az  $\alpha$  alegység alapján nevezzük el, és a főbb hatásokat is ennek megfelelően jellemezzük, a  $\beta\gamma$  alegység is képes jelátviteli hatásokat létrehozni – ez azonban jelenlegi tudásunk szerint csak a  $G_{i/o}$  típusú G-fehérjékre igaz [24] (az 1. táblázatban látott  $K^+$ -csatorna aktiválás és  $Ca^{2+}$ -csatorna gátlás például  $\beta\gamma$ -függő folyamatok). A  $\beta\gamma$  alegység egyébként szintén változatos összetételű lehet, miután összesen 5  $\beta$  és 12  $\gamma$  alegység létezik (ami elvileg 60-féle különböző  $\beta\gamma$ -kombinációt jelent). Egyelőre azonban nem pontosan ismert, hogy ez az alegység-összetétel milyen szintű sejt-, illetve szövetspecifitást mutat, továbbá az sem, hogy mi a szerepe a G-fehérjék működésének szabályozásában [24].

Az utóbbi évtizedekben az is világossá vált, hogy a 7TMR-ok a klasszikus, G-fehérje-függő hatások mellett G-fehérjétől független jelátvitelre is képesek, és ennek élettani jelentőségét egyre több adat támasztja alá [25]. (Éppen ezért, bár a „G-fehérjéhez kapcsolt receptor” elnevezés továbbra is általánosan elterjedt, számos szerző szívesebben használja a semlegesebb „7-transzmembrán receptor” elnevezést.) Érdekes módon e mechanizmusokban egy eredetileg csupán a válaszkészség szabályozásában fontosnak gondolt fehérjecsalád, a  $\beta$ -arresztinek családja tölt be központi szerepet [25, 26]. A 7TMR-ok  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitelre mára a molekuláris farmakológiai kutatások egyik vezető témájává vált. A jelenséggel a dolgozat  $\beta$ -arresztinekről szóló fejezetében részletesen foglalkozom.

### 2.1.2.1. A 7TMR-ok funkcionális szelektivitása – „elfogult” jelátvitel

A receptorok működéséről alkotott, fentebb említett hagyományos elképzelés, vagyis a kétállapotú receptormodell nem csupán a bazális aktivitás felfedezése miatt szorult változtatásra. Ez a modell ugyanis feltételezte azt is, hogy a receptoroknak mindössze egyféle aktív konformációja létezik, amely minden, a receptor által elérhető jelátviteli utat ugyanolyan erősséggel indít el [14]. Ennek megfelelően, amennyiben egy receptor esetleg több különböző liganddal is aktiválható, illetve a sejt belseje felé is több párhuzamos jelátviteli utat képes elindítani, akkor is mindig egyféle mintázat szerint serkenti ezeket az utakat, függetlenül attól, hogy épp melyik ligand kötődött hozzá (3. ábra, A).



3. ábra A 7-transzmembrán receptorok funkcionális szelektivitása

A, Az eredeti, kétállapotú receptormodell, mely a receptorok kiegyensúlyozott jelátvitelét feltételezi: a receptorok különböző agonistái eltérő farmakodinamikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek, de mind ugyanazt az aktív konformációt stabilizálják, és ezáltal egyféle mintázat szerint aktiválják a receptorról induló jelátviteli útvonalakat. B, A funkcionális szelektivitást (elfogult jelátvitelt) magában foglaló modell: a különböző agonisták különböző aktív konformációkban stabilizálhatják a receptort, melyek eltérő mintázat szerint aktiválják a lehetséges jelátviteli útvonalakat. A példában szereplő rövidítések magyarázata: Ag<sub>1-4</sub>: a

receptor négy különböző agonistája (a nyilak eltérő vastagsága az eltérő farmakodinamikai tulajdonságokra utal); S<sub>1-3</sub>: a receptor által indított három különböző jelátviteli útvonal (a nyilak vastagsága és a betűk mérete az adott útvonal aktiválásának mértékét tükrözi).

Ez az elképzelés mára alapvetően átalakult. Az elmúlt egy-két évtizedben kiderült, hogy a 7TMR-oknak nemcsak egy, hanem többféle aktív konformációja is létezik, melyeket a receptor különböző ligandjai eltérő mértékben stabilizálhatnak. Ezek a különböző aktív konformációk azután eltérő mértékben, eltérő mintázat szerint képesek a receptorról induló egyes jelátviteli utakat aktiválni (3. ábra, B) [27, 28]. A jelenséget *elfogult jelátvitelnek* nevezték el (az angol szaknyelvben *biased signaling*), utalva arra, hogy egyes ligandok a receptor bizonyos jelpályáit előnyben részesítik, míg másokat kisebb hatékonysággal aktiválnak, érintetlenül hagynak vagy akár gátolhatnak is. A jelenség másik gyakori elnevezése a funkcionális szelektivitás, amely pedig azt tükrözi, hogy a receptorok, illetve a hozzájuk kötődő ligandok „válogatnak” a rendelkezésre álló (azaz a receptor által egyáltalán létrehozható) biológiai hatások közül.

Ezek a felismerések hatalmas lendületet adtak a molekuláris gyógyszeres kutatásoknak, és jelenleg is az egyik legmozgalmasabb területet jelentik ebben a tudományágban. Az elfogult jelátvitel jelenségét kihasználva ugyanis lehetséges olyan hatóanyagok kifejlesztése, amelyek a receptorhoz kötődve csak a kívánt terápiás hatást hozzák létre, a mellékhatásokért felelős jelátviteli utakat azonban nem aktiválják [29]. Jó példa erre egy jelenleg már klinikai kipróbálás alatt álló, új típusú AT<sub>1</sub>R-blokkoló (TRV027), amely  $\beta$ -arresztinekre szelektív működésének köszönhetően pozitív szívhatások mellett képes a vérnyomás-csökkentő hatást kifejteni [30]. Szintén korai klinikai fázisba került az a  $\mu$ -opioid receptorokon ható vegyület (TRV130), mely G-fehérje-szelektív jelátvitele miatt a morfiumhoz képest kisebb mértékben okoz hányingert, illetve légzésdepressziót, megtartott fájdalomcsillapító hatás mellett [31]. Mindkét esetben az elfogult jelátvitel jelensége irányította a hatóanyagok kifejlesztését, és ez eredményezi a – korábbi hasonló hatóanyagokéhoz képest – várhatóan kedvezőbb hatás-mellékhatás profilt.

Az elfogult jelátvitelnek azonban nem csak a gyógyszerfejlesztések területén, hanem élettani rendszereken belül is lehet jelentősége, hiszen gyakran előfordul, hogy egy

adott 7TMR többféle endogén liganddal is aktiválható. Jó példa erre a  $\beta_2$ AR, mellyel kapcsolatban kimutatták, hogy két természetes agonistája, az adrenalin és a noradrenalin hasonló, gyakorlatilag maximális mértékű  $G_s$ -fehérje aktivációt hozott létre a receptoron keresztül, azonban internalizáció (receptormediált endocitózis, ld. később) tekintetében a noradrenalin jelentősen kisebb hatékonyságú volt az adrenalinhoz képest [32]. Még összetettebb rendszerrel állunk szemben az immunrendszerben kulcsfontosságú kemokinek és az őket érzékelő kemokin receptorok esetében, ahol a mintegy 45 kemokin ligand összesen kb. 20 kemokin receptoron keresztül hozza létre hatásait [33]. Ez első látásra a rendszer redundanciájára utal, egy nemrégiben megjelent tanulmány azonban a receptorok részletes elemzésével kimutatta, hogy számos esetben a különböző kemokinek ugyanazon a receptoron keresztül eltérő erősséggel serkentik a különféle jelátviteli eseményeket, ami a fehérvérsejtek vándorlására is hatással lehet [34]. Mindez jól mutatja, hogy a funkcionális szelektivitás élettani, kórélettani és gyógyszeres szempontból is fontos biológiai jelenség.

### 2.1.3. A 7TMR-ok válaszkészségének szabályozása

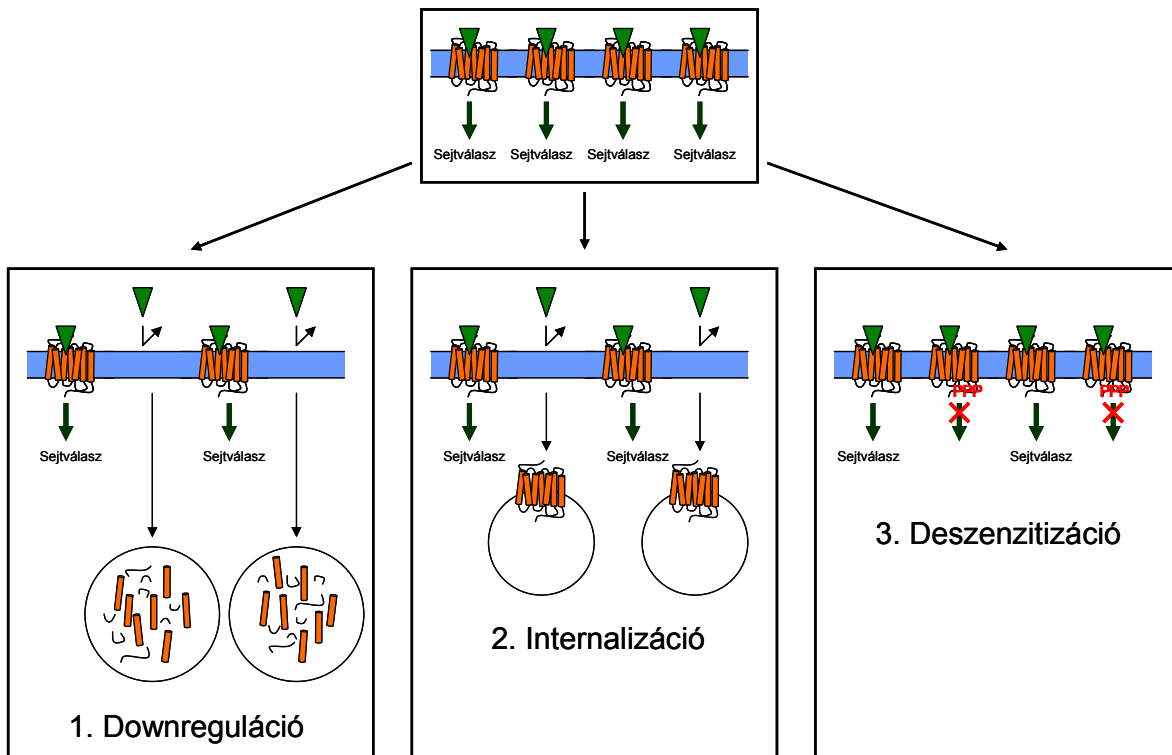
Amint azt a 7TMR-okkal kapcsolatos bevezetőben említettük, a sejtek receptoraik segítségével specifikusan érzékelik a környezetükből érkező jeleket, és azokra megfelelő biológiai válasszal reagálnak. Emellett azonban a sejtekre az is jellemző, hogy az egyes ingerek iránti válaszkészségüket a receptorok befolyásolásán keresztül aktívan szabályozzák. Ennek komoly jelentősége van, mert így a sejt egyrészt tartós ingerhatás esetén megvédeheti magát a túlingerléstől, másfelől pedig akár csökkenő hormonkoncentrációk mellett is ugyanolyan vagy akár nagyobb választ hozhat létre – mindkét esetre számos példát találunk az élettani rendszerekben.

A 7TMR-ok válaszkészségének befolyásolása tömören összefoglalva a *sejtfelszíni, aktiválható* receptorok *menyiségének* változtatását jelenti. Ez a meghatározás három fontos szabályozási szintet foglal magába (4. ábra).

1. A receptorok *(össz)menyiségének* szabályozása a receptorok mint fehérjék szintézisének, illetve lebontásának (degradációjának) egyensúlyát érinti. Ezen folyamatokat

*downreguláció*nak (receptorszám-csökkentés), ill. *upreguláció*nak (receptorszám-növelés) nevezzük [35].

2. További lehetőséget jelenthet ezen belül a *sejtfelszíni* receptorszám változtatása. A szabályozás logikája abból indul ki, hogy alapvetően csak a plazmamembránban helyet foglaló receptor képes az inger érzékelésére, a sejten belüli receptorpopuláció nem. A szabályozásnak ez a szintje a receptorok *internalizációján* (a plazmamembránról való eltávolításán), illetve *reciklizációján* (a plazmamembránba való (újra)kihelyezésén) keresztül valósul meg [36-38].



4. ábra A 7-transzmembrán receptorok válaszkészségének szabályozási lehetőségei

1. Downreguláció – a receptorok sejten belüli lebontása (degradációja)/termelésük gátlása. 2. Internalizáció – a receptorok plazmamembránról történő eltávolítása (sejten belüli vezikulumokba). 3. Deszenzitizáció – a receptorok jelátvitelének gátlása, elsősorban sejten belüli régiók foszforilációján keresztül. A zöld háromszögek a receptorhoz kötődő (vagy ahhoz kötődni nem képes) ligandokat szimbolizálják (a modell feltételezi, hogy a ligand nem képes átjutni a plazmamembránon). Az ábrán a könnyebb áttekinthetőség kedvéért csak a válaszkészséget csökkentő folyamatokat tüntettük fel; az ellentétes irányú, a válaszkészséget

növelő folyamatokat – az ábra logikáját követve: 1. upreguláció, 2. reciklizáció (externalizáció), 3. reszenzitizáció – a dolgozat szövegében említjük.

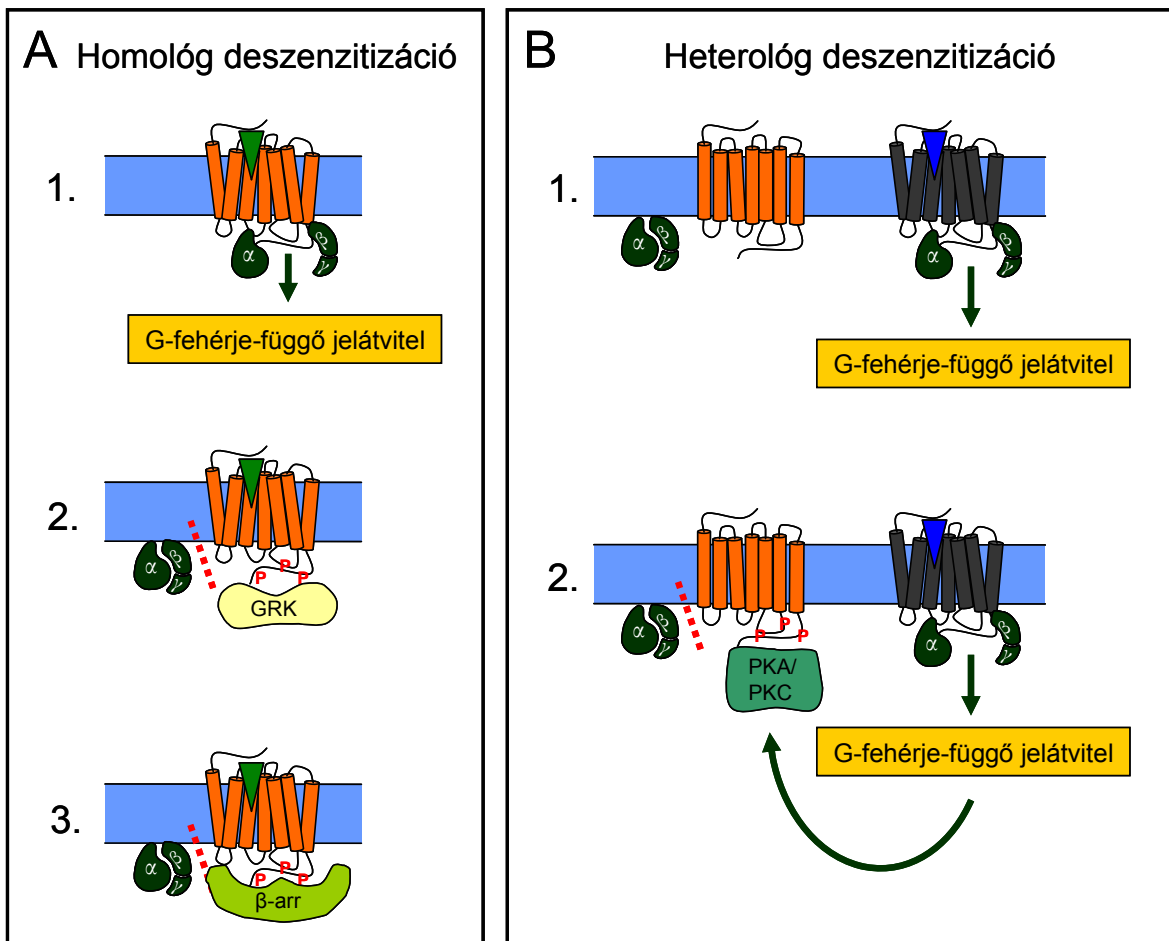
3. A harmadik szint a receptorok *érzékenységének*, aktiválhatóságának változtatását jelenti. Még ha a sejt meg is termelte az adott receptort, és az kint is van a plazmamembránban, akkor is elérheti a sejt – elsősorban a receptor sejten belüli elemeinek foszforilációján keresztül – hogy az a ligandkötés ellenére ne legyen képes továbbítani a jelet [39]. Ez az „érzéketlenítés”, azaz *deszenzitizáció*, amely természetesen visszafordítható jelenség, azaz lehetőség van az érzékenység visszanyerésére, a *reszenzitizációra* is, amely szintén összetett, pontosan szabályozott folyamat [37].

Mivel a munkánk során vizsgált  $\beta$ -arresztin fehérjék a fent leírt szabályozási folyamatok közül alapvető szerepet játszanak a 7TMR-ok deszenzitizációjában és internalizációjában [38], ezért az alábbiakban ezen két folyamat részletesebb ismertetésére kerül sor. A  $\beta$ -arresztinek szerepét itt csak röviden érintem, bővebben majd az azzal foglalkozó külön fejezetben mutatom be.

#### 2.1.3.1. A 7TMR-ok homológ és heterológ deszenzitizációja

A jelenlegi elképzelés szerint a 7TMR-ok deszenzitizációjának két alapvető formáját különítjük el (5. ábra). Homológ deszenzitizációnak nevezzük azt a szabályozási folyamatot, melynek során a receptor azt követően veszíti el érzékenységét, hogy ő maga ligandot kötött, és aktív állapotba került. Ezzel szemben a heterológ deszenzitizáció esetében egy másik receptor aktiválódása vezet közvetett módon – általában az általa indított jelpályán keresztül – az érzékenység elvesztéséhez, azaz ebben az esetben maga a deszenzitizálódó receptor nem kötött előtte ligandot és nem is aktiválódott [39]. Mindkét folyamatban specifikus kinázok játszanak főszerepet, melyek a receptort megfelelő szerin/treonin (Ser/Thr) aminosav-oldalláncokon foszforilálják [39]. Homológ deszenzitizáció esetén a G-fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK-k) végzik ezt a foszforilációt [40]. A GRK-k a G-fehérjéhez hasonlóan képesek felismerni a receptorok aktív konformációját, így a 7TMR-hoz annak aktiválódását követően kapcsolódnak, és

foszforilálják a megfelelő helyeken (általában a receptor C-terminális végén, illetve az ICL3 hurkon) található Ser/Thr oldalláncokat (5. ábra, A) [41]. A GRK-knak hét izoformája ismert (GRK1-7) melyeknek eltérő a szöveti eloszlásuk és a sejten belüli elhelyezkedésük, továbbá az is változó, hogy egy adott 7TMR-t mely GRK izoformák foszforilálnak elsősorban [41]. A receptor-foszforiláció másik lehetséges formája a heterológ deszenzitizáció során jön létre, ezt a jelpálya által aktivált protein kináz C (PKC) vagy protein kináz A (PKA) enzimek végzik, függetlenül a foszforilált receptor ligand kötésétől [42].



5. ábra A 7-transzmembrán receptorok homológ és heterológ deszenzitizációja

A, Homológ deszenzitizáció, melynek során a receptor saját ligandkötése és aktivációja következtében veszíti el érzékenységét. B, Heterológ deszenzitizáció, melynek során a receptor egy másik receptor aktivációja (és jelátvitel) következtében veszíti el érzékenységét. A rövidítések magyarázata: α, β, γ: a heterotrimer G-

fehérje alegységei; GRK: G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz; P: foszfátesoport;  $\beta$ -arr:  $\beta$ -arresztin; PKA/PKC: protein kináz A/protein kináz C. A zöld/kék háromszögek a receptorokhoz kötődő ligandokat szimbolizálják. A piros szaggatott vonalak a receptor és a G-fehérje közötti kapcsolódás gátoltságát jelzik.

A legtöbb receptor esetében a GRK-foszforilációs és a PKA/PKC-foszforilációs helyek legfeljebb részleges átfedést mutatnak [39]. Az érintett oldalláncok foszforilációja mindkét esetben megakadályozza a receptor és a G-fehérje közti további kapcsolódást, ezáltal a G-fehérje-függő jelátvitel leállítását/gátlását eredményezi. A homológ deszenzitizáció során ezen túlmenően  $\beta$ -arresztin kapcsolódik az aktivált és foszforilált receptorhoz, ami egyrészt hozzájárul annak további deszenzitizációjához, másrészt pedig fontos szerepe van a receptor-mediált endocitózis, azaz az internalizáció elindításában [40].

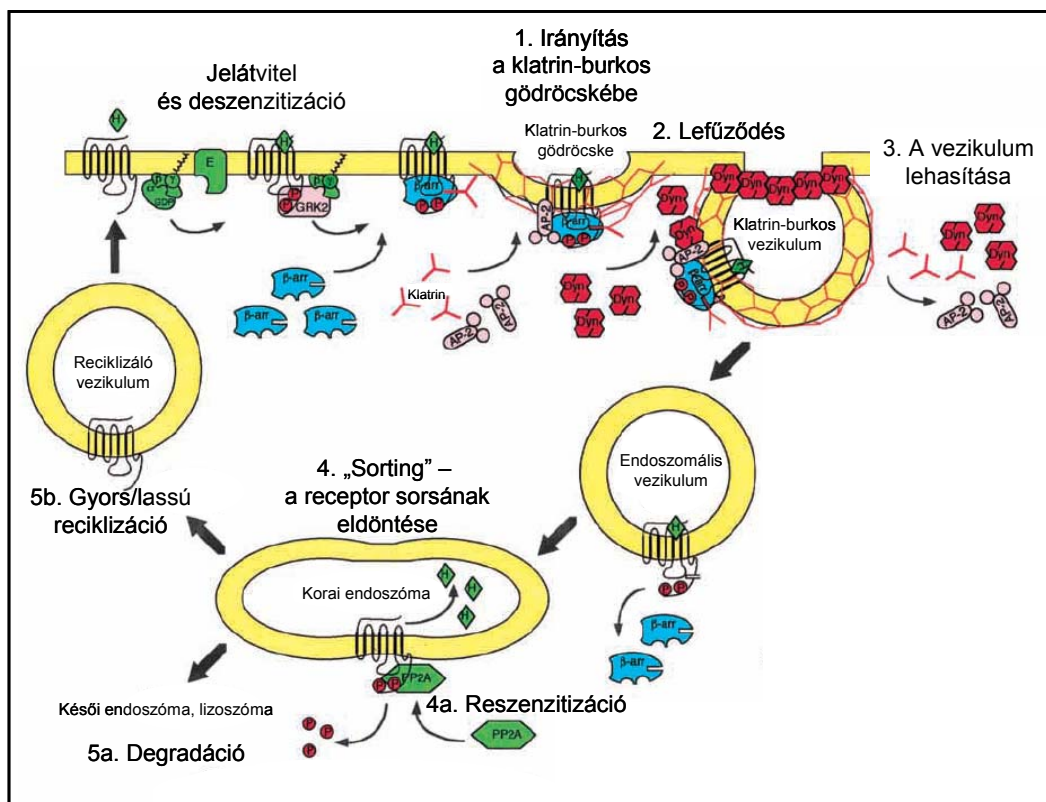
#### 2.1.3.2. A 7TMR-ok internalizációja

Az internalizáció sejtbiológiai értelemben a sejtekben zajló receptor-mediált endocitózist jelenti. Amint azt fent említettük, ez egy központi folyamat a plazmamembrán receptorok válaszkészségének szabályozásában [43]. Számos különböző mechanizmus létezik, amelyek egy receptor sejtbe való bekerülését elindíthatják, illetve vezérelhetik. A 7TMR-ok esetében az internalizáció legáltalánosabb mechanizmusa a klatrin-mediált endocitózis, melynek lépéseit a következőkben részletesen bemutatom (6. ábra, 1-3. pont [37]).

*Az internalizációt közvetlenül megelőző lépések:* az aktiválódott receptor elindítja a G-fehérje-függő jelátvitelt, az aktív konformációt felismeri a GRK, kötődik a receptorhoz és foszforilálja-deszenzitizálja azt ([41], ld. feljebb). Az aktiválódott és foszforilált receptort felismeri a  $\beta$ -arresztin, és kötődik hozzá [44]. A tulajdonképpeni internalizáció ettől a ponttól kezdődik.

1. A  $\beta$ -arresztin állványfehérjeként működve a klatrin-burkos gödröcskéhez irányítja a receptort. Ennek során a  $\beta$ -arresztin a receptoron kívül a klatrinhoz és az adapter protein-2 (AP-2) fehérjekomplexhez is közvetlenül kötődik [45-47]. A klatrin-burok alegységei a három nehéz (190 kDa) és három könnyű (23 kDa) láncból felépülő jellegzetes

háromágú struktúrák, a triszkelionok [48]. Ezek az alegységek egymással összekapcsolódva hozzák létre a membrán belső felszínén (amely lefűződést követően a vezikulum külső felszínének felel meg) a klatrin hálózatot. Az AP-2 egy négy alegységből ( $\alpha$ ,  $\beta_2$ ,  $\mu_2$ ,  $\sigma_2$ ) álló fehérjekomplex, mely az internalizálódó receptor, a klatrin hálózat, a plazmamembrán és az endocitózis egyéb fehérjéi (pl. dinamin, Id. lent) között teremt kapcsolatot [49]. Ezáltal az AP-2-nek központi szerepe van a klatrin-burok membránnal való stabil kapcsolódásában, a receptor vezikulumba történő irányításában, illetve a lefűződés folyamatában [47, 50].



**6. ábra A 7-transzmembrán receptorok klatrin-mediált internalizációjának lépései és az internalizálódott receptor sorsa**

Az internalizációt megelőzően a receptorokról induló jelátvitelt a deszenzitizáció állítja le, ezután a receptorok a klatrin-burkos gödröcskékhez irányítódnak (1.), majd a lefűződést (2.) és a vezikulum lehasítását (3.) követően endoszomális vezikulumokba jutnak. A receptorok a sejten belüli szortírozás (*sorting*) eredményeképp degradációra (5a.) vagy reciklizációra (5b.) kerülnek. A sejten belül zajlik az érzékenység helyreállítása, a reszenzitizáció is (4a.) A rövidítések magyarázata: H: hormon;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : a heterotrimer G-

fehérje alegységei; E: a G-fehérje által aktivált effektor fehérje; GRK2: G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz 2; P: foszfátcsoport;  $\beta$ -arr:  $\beta$ -arresztin; AP-2: adaptor protein-2; Dyn: dinamin; PP2A: protein foszfatáz 2A. Az ábra [37] alapján készült.

2. Miután a receptor bekerült a klatrin-burkos gödröcskébe, a lefűződés tovább folytatódik, míg végül a vezikulum megközelítőleg gömb alakot vesz fel, és ekkor már csak egy vékony szakaszon kapcsolódik a plazmamembránhoz. A membrángörbület megváltoztatásáért és a gömbalak kialakításáért különböző citoplazmatikus struktúrfehérjék, illetve a membrán lipidösszetételének helyi változásai is felelősek [51].

3. A lefűződés utolsó, kulcsfontosságú lépéseként a dinamin GTP-áz fehérje molekuláris ollóként viselkedve, a GTP hidrolíziséből nyert energiával lehasítja a vezikulumot a membránról, ezzel teljessé téve az internalizáció folyamatát [52].

A fenti általános mechanizmus mellett több 7TMR (pl. a PAR1 proteáz-aktivált receptor [53], TP $\beta$  tromboxán A<sub>2</sub> receptor [54],  $\alpha_{1B}$ -adrenerg receptor [55]) esetében leírtak olyan internalizációs folyamatot is, mely klatrin-burkos gödröcskék segítségével, de  $\beta$ -arresztintől függetlenül zajlik le. Ebben az esetben az endocitózis elindulását az teszi lehetővé, hogy a receptor közvetlenül képes kötődni az AP-2 komplexhez, egy saját AP-2-kötő motívum segítségével. Ilyen motívum az YXX $\Phi$  szekvencia, amely egy tirozinből, és az azt követő harmadik helyen egy nagyméretű hidrofób oldalláncú aminosavból áll [38].

A klatrin-függő internalizációtól teljesen független útvonalon zajlik a kaveolin-mediált endocitózis. A kaveolák kesztyűujj-szerűen bemélyedő, belső burok nélküli, koleszterinben és szfingolipidekben gazdag struktúrák a plazmamembránon, melyeknek az endocitózis mellett a sejtek jelátvitelében, a koleszterin-anyagcserében, illetve a tumorképződésben is bizonyították a szerepét [56, 57]. Legjellemzőbb fehérjéjük a kaveolin, mely a membránban oligomerizálódva létrehozza a kaveolák jellegzetes formáját. A kaveola-függő internalizáció során a receptor – egy jelenleg nem pontosan tisztázott mechanizmussal – bekerül a kaveolába, vagy akár már nyugalomban is ott foglalhat helyet. A kaveolát – a klatrin-burkos vezikulumhoz hasonlóan – a dinamin hasítja le a plazmamembránról, így létrehozva az endocitotikus vezikulumot [58].

Léteznek továbbá klatrin- és kaveolin-független (de dinamin-függő), valamint dinamin-független endocitotikus útvonalak is, ezeket általában egy-egy speciális szállított fehérje vagy szabályozó molekula alapján írták le (pl. IL2R $\beta$ -útvonal, flotillin-függő endocitózis) [59]. A pontos mechanizmusokról, illetve a 7TMR-ok internalizációjában betöltött szerepükről nagyon kevés adatot ismerünk.

Fontos megjegyezni, hogy egy sejten belül a különböző endocitotikus útvonalak alapvetően párhuzamosan működnek; sőt, számos példát találunk arra is, hogy ugyanaz a receptor az internalizáció több formáját is igénybe veszi, akár párhuzamosan, akár különböző körülmények hatására változtatva az endocitózis útját. Az AT<sub>1</sub>R-ről írták le például, hogy kisebb, a fiziológiához közeli agonista-koncentrációk esetén az általános,  $\beta$ -arresztin-függő útvonalon internalizálódik, míg jelentősen magasabb koncentrációk esetén az internalizációja nagyrészt  $\beta$ -arresztintől függetlenül megy végbe [60]. A  $\beta_1$ -adrenerg receptorról pedig kimutatták, hogy internalizációjának útvonala attól függ, melyik kináz végzi a foszforilációját: PKA hatására a kaveolákba, míg GRK általi foszforiláció esetén a klatrin-burkos gödröcskébe kerül a receptor [61].

#### 2.1.3.2.1. Az internalizálódott receptor sorsa, az internalizáció jelentősége

A receptor az internalizációt követően a korai endoszómákba kerül, majd különböző, viszonylag jól elkülöníthető sejten belüli kompartmentek között mozog, és ez az „utazás” meghatározza a receptor további sorsát is (6. ábra, 4-5. pont) [37, 38]. Az egyik út a késői endoszómákba, majd onnan a lizoszómális kompartmentek felé vezet, ahol a receptor lebomlik – ez az út tehát a downregulációs szabályozás része. A másik út során a receptor a reciklizáló endoszóma érintésével (lassú reciklizáció), vagy akár anélkül (gyors reciklizáció) visszakerül a plazmamembránba [37, 38]. Fontos eleme a sejten belüli folyamatoknak, hogy az endoszómákban – a kompartmentek alacsonyabb pH-jának köszönhetően – a receptor elengedi az addig megkötött ligandját, leválik róla a  $\beta$ -arresztin, végül pedig protein foszfatázok (pl. a protein foszfatáz 2A) defoszforilálják a deszenzitizáció során foszforilálódott oldalláncokat, azaz megvalósul a *reszenzitizáció*. Így

a reciklizáció során a receptor a plazmamembránba újra érzékeny állapotban kerül vissza [37].

Ezen a ponton fontos kiegészítést kell tennünk az internalizáció szerepével kapcsolatban. Eddig ugyanis úgy írtam le az internalizációt, mint a receptorok válaszkészségét csökkentő folyamatot. Az itt bemutatottak értelmében azonban ez a megállapítás nem pontos. Bár általánosságban igaz, hogy a sejt belsejébe került receptor többé „nem látja” a ligandját, és így érzékenysége elvész. Ráadásul ezt követően akár véglegesen degradálódhat is, ami nyilvánvalóan a válaszkészség hosszútávú csökkenését jelenti. A másik, reciklizációs lehetőség miatt azonban – mivel ez szorosan kapcsolt az érzékenység visszanyerésével – az internalizáció tulajdonképpen a reszenzitizáció feltételének is tekinthető, és hosszú távon éppen a válaszkészség fenntartásában játszhat szerepet. Ezt azok az eredmények is igazolják, melyek szerint számos receptor esetében az internalizáció gátlása a receptor reszenzitizációjának elmaradását eredményezte [62].

További fontos szempontot jelenthet az internalizációról alkotott képünkhöz, hogy számos 7TMR (köztük a dolgozatomban középpontjában álló CB<sub>1</sub>R is) alapvetően lipidtermészetű ligandokat érzékel, és mivel ezen anyagok számára a plazmamembrán nem jelent fizikai akadályt, elvileg a sejtbe bekerült receptorpopuláció is elérhető számukra. E receptorok internalizációja így fölösleges lépés lenne a sejt részéről, ha ezzel akarná „eltüntetni” a receptort a ligand elől. (Erre a kérdésre a CB<sub>1</sub>R-ral kapcsolatban még kitérek a dolgozat későbbi részében.)

Összességében tehát az internalizációt úgy írhatjuk le, mint egy bevezető, de egyben meghatározó jelentőségű lépését annak a folyamatnak, amely során a rövidtávú, plazmamembránon történő érzéketlenítést követően, a receptor sorsa közép- és hosszútávon, a sejt által „jól átgondolt” – azaz pontosan szabályozott módon – eldől: ez jelentheti a receptor újrahazsnosítását, vagy akár végleges eltüntetését, lebontását is.

#### 2.1.3.2.2. A 7TMR-ok konstitutív internalizációja

Az eddigiekben az internalizáció folyamatát mindig a receptor agonista kötésének és aktiválódásának következményeként írtam le. Számos olyan receptor van azonban,

amely agonista kötésétől függetlenül, alapállapotban is folyamatosan internalizálódik – a jelenségnek több elnevezése is elterjedt: konstitutív, tónusos, illetve spontán internalizációnak is nevezik. Bizonyos (elsősorban nem a 7TMR-ok közé tartozó) receptorok esetében ennek a jelenségnek jól meghatározott élettani feladata van, mint például a transzferrin receptor esetében, ahol a sejtek ezzel a mechanizmussal veszik fel folyamatosan a környezetükből a vastartalmú transzferrint [63, 64]. Ugyanez a mechanizmus érvényes továbbá a sejtek LDL-receptoron keresztüli koleszterin-felvételére is [65]. A 7TMR-ok esetében azonban kevésbé tisztázott a konstitutív internalizáció jelentősége, holott számos ilyen receptorról írták már le, hogy serkentés nélkül is bekerül a sejt belsejébe (pl. PAR1 receptor [66], AT<sub>1</sub>R [67, 68], tromboxán A<sub>2</sub> receptor [54], mGlu<sub>1</sub> receptor [69], CB<sub>1</sub>R [70]). A legegyszerűbb magyarázat szerint az adott 7TMR-ok spontán internalizációja a korábban említett bazális aktiválódás egyenes következménye. Annyi különbséggel csupán, hogy ilyenkor az egész folyamat (a G-fehérje aktiválástól kezdve a klatrin-burkos vezikulum lefűződéséig) agonista hiányában zajlik le. Ezt erősítik azok az adatok is, melyek szerint a bazális aktivitás gátlása (inverz agonista kezeléssel) a receptor plazmamembránon való felhalmozódásához vezet [71]. Ugyanakkor sok 7TMR-ról leírták, hogy az agonista hatására létrejövő (agonista-indukált) és a spontán internalizáció eltérő mechanizmussal zajlik, pl. előbbi  $\beta$ -arresztin közvetítésével, míg utóbbi attól függetlenül [54, 69, 72]. Ez arra utal, hogy a két folyamat nem mindig feleltethető meg egyszerűen egymásnak, esetleg más-más receptor-konformáció irányítja őket, illetve valószínűsíthető, hogy a konstitutív és az agonista-indukált internalizáció élettani jelentősége is különböző. Azonban akár a spontán aktiválódás egyenes következménye, akár attól elkülönülő jelenség, továbbra is fennáll a kérdés a konstitutív internalizációval kapcsolatban, hogy miért éri meg egy sejt számára – nyilvánvalóan jelentős energiaráfordítással – alapállapotban is körforgásban tartani egy receptort a plazmamembrán és a citoplazma között. Bár erre a kérdésre sok esetben nincs egyértelmű válasz, a jelenséggel kapcsolatos lehetséges magyarázatokra a CB<sub>1</sub>R-ről szóló fejezet kapcsán még visszatérünk.

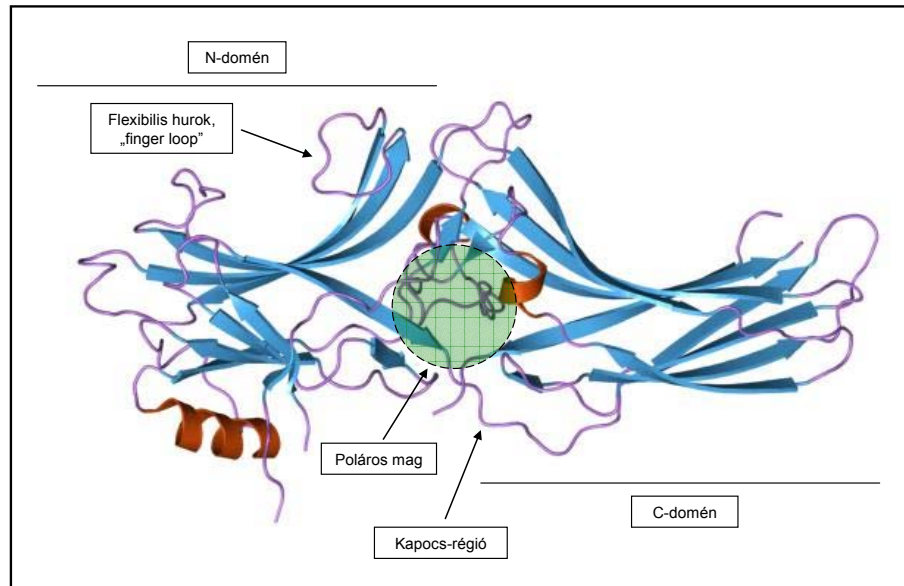
## 2.2. A $\beta$ -arresztin fehérjék

### 2.2.1. Az arresztin fehérjecs család

Az első arresztin fehérjét az 1980-as években a retinában azonosították, mint a fényérzékelésért felelős rodopszinhoz közvetlenül kapcsolódó, annak jelátvitelét leállító (deszenzitizáló) molekulát. (A fehérje angol eredetű elnevezése – *arrest*: elfog, megállít, letartóztat – is erre a funkcióra utal) [73]. Nem sokkal később Robert Lefkowitz és munkatársai a  $\beta_2$ AR működésének vizsgálata során írták le a fehérjecs család további két tagját, melyeket  $\beta$ -arresztineknek neveztek el ( $\beta$ -arresztin1 ( $\beta$ -arr1) és  $\beta$ -arresztin2 ( $\beta$ -arr2), más elnevezés szerint arresztin2 és arresztin3) [74-76]. Mint utóbb kiderült, a  $\beta$ -arresztinek a retina vizuális arresztinjénél sokkal elterjedtebben, gyakorlatilag a szervezet valamennyi szövetében kifejeződnek, és alapvető jelentőségűnek bizonyultak a receptorok deszenzitizációjában. A felfedezésük óta eltelt bő két évtizedben emellett több új funkciójukra is fény derült, így ma már a deszenzitizáció mellett a receptorok endocitózisában, illetve a jelátvitelben is központi szerepet játszó fehérjecs családokként tekintünk rájuk [77]. Robert Lefkowitzot a  $\beta$ -arresztinokkal és a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal kapcsolatos felfedezéseiért 2012-ben Nobel-díjjal jutalmazták. Időközben ismertté vált a család negyedik tagja is, az X arresztin, ennek kifejeződése a vizuális arresztinhez hasonlóan a retinára korlátozódik [78].

### 2.2.2. A $\beta$ -arresztinek szerkezete és a 7TMR-arresztin kapcsolat

A  $\beta$ -arresztinek szerkezete a 7. ábrán látható [79-82]. A fehérje alapvetően két, főleg  $\beta$ -redőket tartalmazó, kissé ívelt („kagylóhéj-alakú”) doménből (N- és C- domén), és az azokat összekötő kapocs-régióból áll. A két fő domén egymáshoz képest való helyzetét nyugalmi állapotban a köztük elhelyezkedő poláros mag (*polar core*) stabilizálja.



### 7. ábra Az arresztinek szerkezete

Az ábrán a szarvasmarha  $\beta$ -arresztin1 szerkezete látható, a valamennyi arresztin típusban megtalálható fontosabb régiók feltüntetésével. A  $\beta$ -redők kék színben, az összekötő-, ill. hurokrégiók lila színben, a helikális struktúrák narancssárga színben láthatók. Az ábra forrása: Protein DataBase (PDB).

A kétféle  $\beta$ -arresztin, a  $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2 között kb. 80%-os a hasonlóság, de szöveti kifejeződésük sejttípustól függően eltér [74, 83]. Az alábbiakban az arresztinek és a receptorok közötti kötődés általános mechanizmusát ismertetjük.

A  $\beta$ -arresztinek inaktív, nyugalmi állapotban a citoplazmában helyezkednek el, stimulációt követően azonban kötődnek a receptorhoz, és így a plazmamembránhoz helyeződnek át. Meghatározó tulajdonságuk, hogy alapvetően az aktivált és foszforilált receptort ismerik fel, ennek megfelelően rendelkeznek egy *aktivációs szenzorral* (melynek szerepe a receptor aktív konformációjának felismerése), illetve egy *foszfát szenzorral* (amely pedig a receptor foszforilált oldalláncait ismeri fel) [44]. Ezek gyakorlatilag úgy

működnek, mint két gomb, melyeket a receptornak egyszerre kell benyomnia ahhoz, hogy az arresztin igazán hatékonyan működésbe jöjjön. A részletes biokémiai vizsgálatok a foszfát szenzort mára gyakorlatilag pontosan azonosították, míg az aktivációs szenzor mibenlétéről inkább csak feltételezések léteznek.

A foszfát szenzorban központi jelentőségű a fent leírt poláros magban elhelyezkedő, 175-ös pozíciójú arginin (R175, a vizuális arresztin számozását alapul véve), amely nyugalomban egy negatív töltésű oldallánccal, a 296-os aszpartáttal (D296) alakít ki sóhíd kötést [84]. Amennyiben a receptorhoz kapcsolt foszfátcsoportok közel kerülnek a poláros maghoz, ez a sóhíd kötés felbomlik, és az R175 a D296 helyett a továbbiakban a negatív töltésű foszfát-csoporthoz kapcsolódik. Bár más pozitív töltésű aminosavak (pl. K14, K15, K166, R171, K176) is részt vesznek a foszfátcsoportok érzékelésében [85, 86], lényegében a fenti sóhíd kötés jelenti az arresztinben a foszfát szenzort [44]. Az említett két aminosav mind a négy arresztin izoformában megtalálható a homológ pozíciókban, illetve kísérletes mutációjuk jelentősen befolyásolja a receptor-foszforiláció arresztin általi felismerését [84].

Az aktivációs szenzort az eddigi vizsgálatok alapján sokkal kevésbé sikerült egy specifikus területre korlátozni az arresztinen belül. Ha összegezzük mindazon oldalláncokat, melyek a különböző vizsgálatok szerint befolyásolják a receptorhoz való kötődést, azok szinte a teljes konkáv (a kötődés során a receptor felé mutató) felszín lefedik [44]. Ez vagy azt jelenti, hogy a receptor aktív állapotának felismerése sok kapcsolódási ponton keresztül valósul meg, vagy azt, hogy az aktivációs szenzor érzékeny azokra a másodlagos szerkezeti változásokra, melyeket az egyéb régiókba bevitt mutációkkal hoztak létre. Mindazonáltal több vizsgálat felvetette egy az N-doménben elhelyezkedő flexibilis hurok (*finger loop* régió) központi szerepét az aktív receptor-konformáció felismerésében [44, 87, 88].

Ha a 7TMR-arresztin kapcsolatot a receptor oldaláról nézzük, a kötés feltétele logikus módon az aktivációs és foszforilációs motívumok együttes bemutatása az arresztin felé.

A foszforilációs helyek azonosítása a receptorokon elvileg nem ütközik különösebb nehézségbe, hiszen ez a deszenzitizáció mechanizmusát ismerve a receptor intracelluláris

felszínén található szerin és treonin aminosavakat jelenti. A helyzet persze valójában ennél bonyolultabb, hiszen nem törvényszerű, hogy minden lehetséges Ser/Thr valóban foszforilálódik is. Illetve, még ha ez meg is történne, nem kell feltétlenül mindnek szerepet játszania a  $\beta$ -arresztin kötésben. Ráadásul kimutatták, hogy a foszforilálható aminosavaknak „érdemes” csoportokban jelen lenniük – legalább két Ser/Thr egymás mellett – a megfelelően erős  $\beta$ -arresztin kötés kialakításához [89]. Végző soron azonban számos esetben igazolták ezen Ser/Thr oldalláncok szerepét a különböző 7TMR-ok arresztin kötésében, ezek leggyakrabban a receptor C-terminálisán, ill. az ICL3 vagy az ICL2 hurkokban találhatók [44].

Az aktivációs motívum azonosítása már nehezebb kérdés, ahhoz ugyanis először is ismernünk kell azokat a változásokat, amelyek a receptor szerkezetében aktiválódás során végbemennek. A rendelkezésre álló 7TMR kristálystruktúrák elemzése megerősítette, hogy ezen változások közül az egyik legjellegzetesebb a TM6-os hélix kifelé történő mozgása és forgása, amely egy a hélixek közötti üreget nyit meg a receptor intracelluláris oldalán [90-92]. Ebbe a kis üregbe illeszkedhet a G-fehérje  $\alpha$  alegysége is [11, 93]. Több vizsgálat is arra utal, hogy az arresztin is ezt az üreget ismeri fel az aktív receptorhoz való kötődés során, valószínűleg a fent említett flexibilis hurok részvételével [87, 88]. Több adat mutat ezen kívül az ICL2-es hurok, illetve az annak kezdetén elhelyezkedő DRY motívum szerepére az aktiváció arresztin felé történő közvetítésében [88, 94-96].

Mindezen információk birtokában az arresztin receptorhoz való kötődésére, és ezzel párhuzamos aktiválódására egy többlépéses modellt alkottak meg [44]. Első lépésben az arresztin (az aktivációs szenzor segítségével) felismeri a receptor aktiválódáskor átrendeződött elemeit vagy (a foszfát szenzorral) a foszforilált oldalláncokat. Ha mindkét feltétel adott (azaz a receptor aktív és foszforilált állapotban van), akkor az stabilabbá teszi a kapcsolatot, és az arresztint ún. előaktivált konformációba hozza. Ezt követően a két fehérje között további kötőhelyek is létesülnek, és ennek eredményeként kialakul az arresztin valódi aktív konformációja, illetve a receptor-arresztin komplex. Ez az arresztin esetében az N- és C-domének egymáshoz képesti elmozdulásával (elsősorban mintegy 20°-

os rotációval) jár, illetve bizonyos kötőhelyek felszínre kerüléséhez is vezet, amelyek viszont további sejten belüli fehérjék aktiválását teszik lehetővé [97, 98].

A fenti, általánosan elfogadott modell azt is magában foglalja, hogy az arresztinnek a receptorhoz való kötődése nem egy „minden vagy semmi”-típusú kapcsolat. Számos biokémiai vizsgálat igazolta, hogy az aktív, de nem foszforilált, illetve a foszforilált, de nem aktív receptor is kiválthat bizonyos mértékű (általában a teljes kötésnél jóval alacsonyabb affinitású) kapcsolódást [99-101]. Továbbá sok adat és elvi megfontolás utal arra, hogy nincs *egy* jól meghatározott arresztin-receptor komplex, hanem az arresztin többféle aktív konformációt vehet fel, illetve a komplexen belüli helyzete is eltérő lehet [44]. Erre utal már maga az a tény is, hogy nagyon kevés (szám szerint kétféle)  $\beta$ -arresztin képes kötődni igen sokféle 7TMR-hoz, melyeknek az intracelluláris régiói is bizonyítottan nagy változatosságot mutatnak. Továbbá egy receptor általában nem egy, hanem több (gyakran térben is távolabb lévő) helyen képes foszforilálódni az arresztin kötést megelőzően, ami szintén fölveti többféle arresztin-receptor komplex létrejöttének lehetőségét. Ebbe az irányba mutat még az a becslés is, mely szerint az arresztin aktív konformációja kevésbé stabil, mint az inaktív, azaz nagyobb mozgás megengedett az N- és C-domének között, mint nyugalomban [102]. Mára számos vizsgálat meg is erősítette a fenti feltételezést: az arresztinek tehát többféle konformációban képesek kötődni a 7TMR-okhoz, akár még egy adott receptor esetén is [103, 104]. Ezt valószínűleg a receptornak a különböző ligandok általi eltérő aktív konformációi, illetve a különböző GRK izoformák általi eltérő foszforilációs mintázat szabályozza. Mindennek a receptorok funkcionális szelektivitásában lehet jelentősége, amint azt a  $\beta$ -arresztineknek a jelátvitelben betöltött szerepével kapcsolatban később még bemutatom [25].

A fentiekből is látszik, hogy az arresztinek és a 7TMR-ok közötti kapcsolat jelenleg is intenzíven vizsgált és dinamikusan fejlődő terület. Ugyanakkor, bár mostanra valamennyi arresztin, illetve több mint 10 7TMR kristályszerkezete ismertté vált, a teljes receptor-arresztin komplexet leíró kristálystruktúrák sajnos még nem állnak rendelkezésre. Csak

ezek ismeretével nyerhetünk majd valóban pontos információkat a két fehérje közötti kapcsolatról, illetve az abban szerepet játszó régiókról.

### **2.2.3. A $\beta$ -arresztinek szerepe a 7TMR-ok szabályozásában**

A  $\beta$ -arresztineknek jelenleg három fő funkcióját különítik el a 7TMR-ok szabályozásában. Ezek – a felfedezésük sorrendjében – a deszenzitizációban, az internalizációban és a receptorok (G-fehérje független) jelátvitelében való részvétel.

#### *2.2.3.1. A $\beta$ -arresztinek és a deszenzitizáció*

Amint azt a fejezet bevezető részében tárgyaltuk, a  $\beta$ -arresztinek először leírt szerepe a receptor jelátvitelének leállítása, azaz deszenzitizációja volt [75]. Mivel ebben az esetben magához az aktivált receptorhoz kötődik a  $\beta$ -arresztin, így ezen az úton a korábban leírt homológ deszenzitizáció valósul meg (ld. 2.1.3.1. alfejezet) [39]. A  $\beta$ -arresztin kötését megelőző lépés (és egyben a kötés feltétele is) a receptor GRK-k általi foszforilációja, amely már önmagában is csökkenti a G-fehérje kötését. A deszenzitizáció azonban a  $\beta$ -arresztin jelenlétében sokkal nagyobb mértékű, mint ha csupán GRK van jelen a rendszerben [75]. A G-fehérje-függő jelátvitel leállítása direkt fiziko-kémiai gátláson alapul, azaz a  $\beta$ -arresztin kötődését követően a G-fehérje egyszerűen nem fér hozzá a receptorhoz, ami részben a  $\beta$ -arresztin méretéből következik, részben pedig valószínűleg abból, hogy a G-fehérje és a  $\beta$ -arresztin receptoron található kötőhelyei nagymértékű átfedést mutatnak [103, 105].

#### *2.2.3.2. A $\beta$ -arresztinek és az internalizáció*

A  $\beta$ -arresztinek felfedezését követően hamar kiderült, hogy nem csak a receptorok deszenzitizációjában, hanem azok endocitózisában, illetve ezzel kapcsolatosan a sejten belüli transzportjukban is szerepet játszanak [106]. Ez nem is meglepő tudván, hogy a  $\beta$ -

arresztinek közvetlenül képesek kötni több endocitotikus fehérjét, így a klatrint, az adaptint vagy az ARF6-ot [105]. E direkt kötések segítségével a receptort a klatrin-burkos gödröcskéhez irányítják, elindítva azt az internalizáció útján.

A receptorinternalizáció és a  $\beta$ -arresztinek közti kapcsolat elmélyültebb vizsgálata során további érdekes részletekre derült fény. Bizonyos 7TMR-ok, így pl. a  $\beta_2$ AR, a  $V_1$  vazopresszin receptor vagy a  $\mu$ -opioid receptor, a  $\beta$ -arresztint csak a plazmamembránál, illetve annak közvetlen közelében kötik, azaz a  $\beta$ -arresztin már az endocitózis korai fázisában leválik a receptorról, és nem tart vele annak sejten belüli útján [107]. Ezen receptorok abban is hasonlítanak, hogy a két  $\beta$ -arresztin izoforma közül jelentősen nagyobb affinitással kötik a  $\beta$ -arr2-t, mint a  $\beta$ -arr1-t. Más receptorok (pl. az  $AT_1R$ , a  $V_2$  vazopresszin receptor vagy az oxitocin receptor) esetében viszont a  $\beta$ -arresztin az endocitózis folyamatát követően is a receptorhoz kapcsolva marad, és megjelenik a sejten belüli vezikulumokban is [107]. Továbbá ezek a 7TMR-ok a  $\beta$ -arr1-et és -2-t nagyjából hasonlóan magas affinitással kötik. Előbbi receptorokat „A osztályú”, míg utóbbiakat, melyek tehát alapvetően nagyobb  $\beta$ -arresztin affinitással rendelkeznek, „B” osztályú 7TMR-ok néven csoportosították [107]. A továbbiakban az is kiderült, hogy összefüggés van a  $\beta$ -arresztinek iránti affinitás, azaz az „A” osztályú, illetve „B” osztályú viselkedés, valamint a receptor C-terminálisán található Ser/Thr csoportok (*clusterek*) száma között. Míg az „A” osztályú 7TMR-ok C-terminális szerin és treonin oldalláncai egyáltalán nem rendeződnek csoportokba, vagy legfeljebb egy ilyen Ser/Thr clustert tartalmaznak, addig a „B” osztályba sorolható, mindkét  $\beta$ -arresztint tartósan kötni képes 7TMR-ok minden esetben több, akár 3-4 C-terminális Ser/Thr csoporttal is rendelkeznek [89].

### 2.2.3.3. A $\beta$ -arresztinek és a jelátvitel

Mivel a  $\beta$ -arresztineket felfedezésüktől fogva a receptorok „kikapcsolásában”, azaz a jelátvitel leállításában közreműködő fehérjékként tartották számon (sőt még elnevezésük is ebből ered), meglepő és igen jelentős hatással bírtak azok a kezdeti eredmények, melyek szerint  $\beta$ -arresztin hiányában bizonyos jelátviteli események nem hogy tartósabban, hanem

éppenséggel csökkent mértékben jönnek létre a sejtben. Az egyik első ilyen megfigyelés szerint például a  $\beta_2$ AR  $\beta$ -arresztin segítségével képez komplexet az Src kinázzal, a receptorhoz kötődni képtelen  $\beta$ -arresztin mutánsok pedig (domináns negatív módon) gátolják a receptorról induló ERK1/2 aktivációt [108]. További fontos megfigyelés volt, hogy a  $\beta$ -arresztin kötés G-fehérje aktivációtól függetlenül indít jelátvitelt, amire az első bizonyítékot egy G-fehérje aktivációra képtelen AT<sub>1</sub>R mutáns (AT<sub>1</sub>R-DRY/AA<sub>Y</sub>) szolgáltatta, amely továbbra is képes volt ERK1/2 aktivációra, mégpedig  $\beta$ -arresztinek közvetítésével [109]. Mára kiderült, hogy a  $\beta$ -arresztinek állványfehérjeként működve (a jelátviteli út különböző fehérjéit megkötve, azokat egymással térbeli közelségbe hozva) számos különböző út elindítására képesek, és így a 7TMR-ok G-fehérje-független hatásainak központi közvetítői [26]. A legfontosabb  $\beta$ -arresztin-függő jelátviteli utakat a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A legfontosabb  $\beta$ -arresztin-függő jelátviteli utak összefoglalása

Jelátviteli molekulák	Megjegyzés	Érintett sejtfunciók
c-Src ERK1/2 p38 MAPK JNK3	további kináz kaszkádok aktiválása; a komplex részei még a Raf-1 és a MEK1 fehérjék  a komplex részei még az MKP7, az ASK1 és a MKK4 fehérjék	a sejtciklus előrehaladása az apoptózis gátlása sejtnövekedés, sejtosztódás génátírási hatások
PI3K Akt RhoA NF $\kappa$ B	G <sub>q</sub> fehérjével együttműködve  I $\kappa$ B $\alpha$ -val egy komplexben, az NF $\kappa$ B jelátvitel gátlása	aktin-citoszkeleton átrendeződés a mikrotubulusok stabilizációja a kemotaxis serkentése
c-fos, p27	a sejtmagban	

Ezeknek a  $\beta$ -arresztin-függő folyamatoknak a felfedezése nagy lendületet adott a 7TMR-okkal kapcsolatos kutatásoknak, nem csak azért, mert ezáltal egy egészen új fejezettel bővültek a receptorok jelátvitelével kapcsolatos ismereteink, hanem azért is, mert a 7TMR-ok fentebb bemutatott funkcionális szelektivitása is új értelmezési keretet nyert. A G-fehérje-függő és a  $\beta$ -arresztin-függő 7TMR funkciók elkülönült serkentésének lehetőségét bizonyos esetekben a szervezet is kihasználja [32, 34], a gyógyszeres terápiában pedig a jelenség a hatás-mellékhatás profil optimalizálásának új megközelítésére ad lehetőséget [29] – amint azt a 2.1.2.1. alfejezetben részletesebben is bemutattuk. Léteznek továbbá olyan mutáns 7TMR-ok is, melyek jelátvitelére nem egy adott ligand, hanem a mutáció következtében válik  $\beta$ -arresztin-szelektívvé. Ennek prototípusa a fent említett AT<sub>1</sub>R-DRY/AAY mutáns [110], de ilyen tulajdonságú egy hármas mutáns  $\beta_2$ AR, a  $\beta_2$ AR-TYY [111], illetve az M<sub>3</sub>-R3.50L mutáns acetilkolin receptor is [112]. Ezen receptorok elfogult jelátvitelüknél fogva jó eszközként szolgálhatnak a molekuláris farmakológiai kutatásokban, a  $\beta$ -arresztin-, ill. G-fehérje-függő hatások elkülönült vizsgálatára.

#### *2.2.3.4. A $\beta$ -arresztin-7TMR kapcsolat további részletei*

Fentebb említettük, hogy a 7TMR-ok  $\beta$ -arresztin kötése jelentős különbségeket mutathat, mind a kötés tartósságát, mind a  $\beta$ -arr1, illetve  $\beta$ -arr2 iránti affinitást tekintve, mely alapján ezen receptorokat „A” és „B” osztályba sorolhatjuk [107]. A receptorok  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitelének megismerése érdekes megvilágításba helyezi ezt a jelenséget is, hiszen könnyen elképzelhető, hogy az „A”, illetve „B” osztályú viselkedés a  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitelt is alapvetően meghatározza. Mindezt kísérletesen is bizonyították, amikor a V<sub>2</sub> vazopresszin receptort és a  $\beta_2$ AR-t példának véve kimutatták, hogy az átmeneti  $\beta$ -arresztin kötéssel járó („A” osztályú) viselkedés kisebb  $\beta$ -arresztin-függő ERK1/2 aktivációt eredményez, ugyanakkor a G-fehérje-függő, és így főleg a sejtmagba lokalizálódó ERK1/2 aktiváció nagyobb mértékű volt, mint a tartós  $\beta$ -arresztin kötést jelentő „B” osztályú receptorok esetében [113]. Mindez arra utal, hogy az „A”, illetve „B”

osztályú  $\beta$ -arresztin kötés, illetve a  $\beta$ -arresztinek iránti affinitás meghatározása fontos, mind a receptor sejten belüli sorsa, mind pedig a róla induló jelátvitel szempontjából.

### ***2.3. Az endokannabinoid rendszer és a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor***

#### **2.3.1. Az endokannabinoid rendszer felépítése és működése**

##### *2.3.1.1. Az endokannabinoid rendszer megismerésének rövid története*

A kannabiszt (más néven marihuánát) különböző formákban évezredek óta használja az emberiség, részben kábítószerként, részben pedig orvosi célokra, elsősorban fájdalomcsillapító, nyugtató, illetve étvágyfokozó hatásai miatt [114]. Mindazonáltal a pontos hatásmechanizmusairól sokáig csak találgatások léteztek. Gaoni és Mechoulam 1964-ben azonosították a  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinolt (THC-t) mint a kannabisz legfőbb pszichoaktív hatóanyagát [115]. Mintegy 25 évvel később, 1990-ben Matsuda és munkatársai írták le azt a 7TMR-t, amely – főként a központi idegrendszerben kifejeződve – képes specifikusan kötni a kannabinoid vegyületeket, és ezáltal közvetíteni szerkezeti hatásaikat [116]. Ezt nevezték el később CB<sub>1</sub> kannabinoid receptornak. Hamarosan leírták a másik kannabinoid receptort, az elsősorban a periférián megtalálható – szintén G-fehérjéhez kapcsolt – CB<sub>2</sub>-t [117]. Mivel addig csak növényi eredetű kannabinoidokat ismertek, a specifikus receptorok létezésének ténye hamar a belső termelődésű kannabinoidok (endokannabinoidok) keresésére irányította a figyelmet. Ennek eredményeképp pár éven belül sikerült azonosítani a két legfontosabb ilyen vegyületet, az anandamidot [118], illetve a 2-arachidonil-glicerint [119, 120]. Ezzel voltaképpen kialakult az endokannabinoid rendszer fogalma, amely tehát alapvetően az endokannabinoid vegyületeket, az e vegyületeket érzékelő receptorokat, illetve a termelésükért és lebontásukért felelős enzimeket foglalja magába.

### 2.3.1.2. Az endokannabinoidok keletkezése és lebomlása

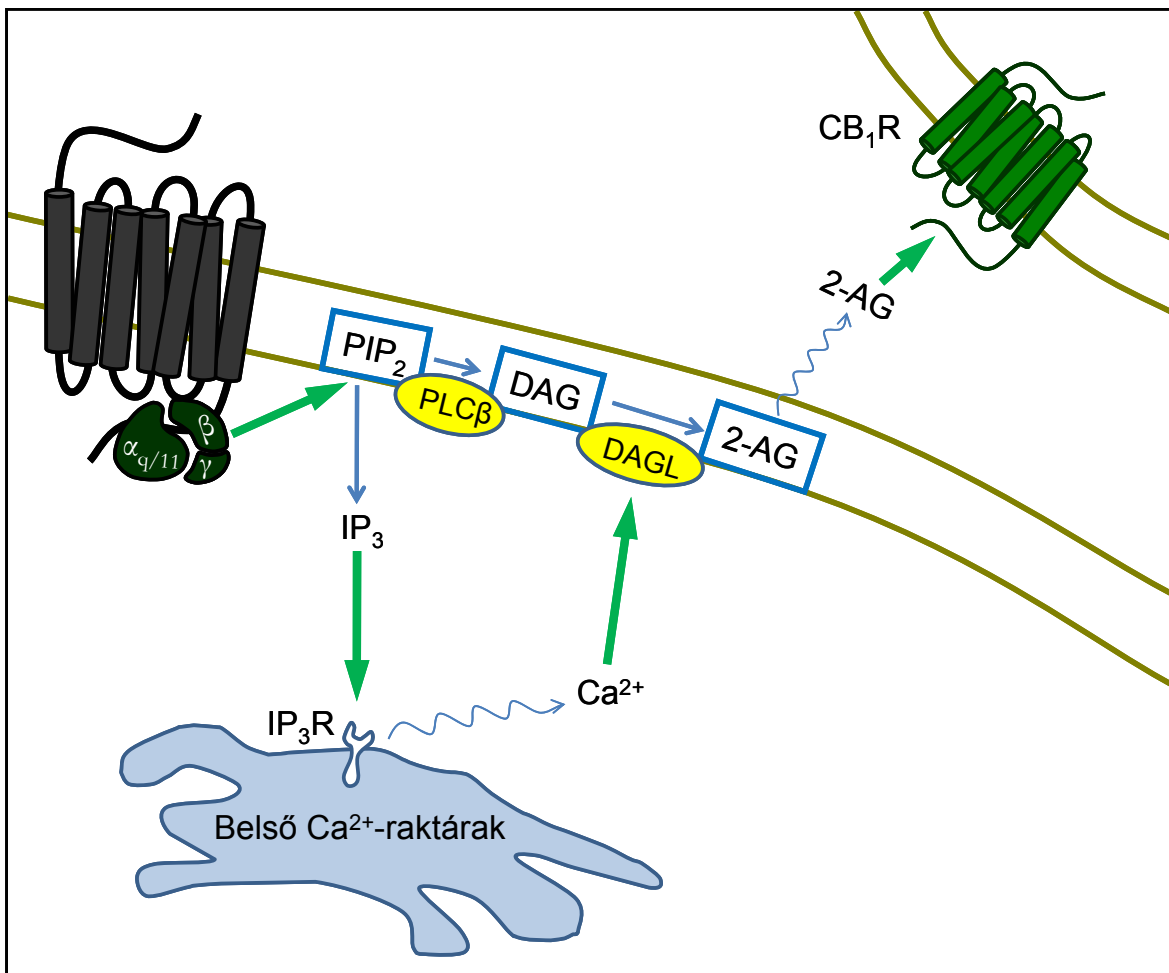
A két legfontosabb endokannabinoid vegyület az N-arachidonil-etanolamid, vagy anandamid (a kifejezés a szanszkrit *ananda* = *boldogság, gyönyör* szóból származik), illetve a 2-arachidonil-glicerín (2-AG). Mindkét vegyület membránlipidek hasításával jön létre, lipidoldékonyságuknál fogva pedig könnyen képesek átjutni a különböző membránokon.

Az anandamid forrása elsősorban az N-arachidonil-foszfátidiletanolamin (NAPE) molekula. A NAPE általában egy enzimatis transzfer-reakció során képződik a membránban, amit a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő N-aciltranszferáz (NAT) enzim hajt végre [121]. A NAPE ezután közvetlenül anandamiddá alakul a NAPE-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) enzim segítségével [122]. Bár a közvetlen anandamid képzésért a NAPE-PLD felelős, a folyamat sebesség-meghatározó, egyben (főként  $\text{Ca}^{2+}$  által) szabályozott lépése a NAT enzim általi NAPE keletkezés [123]. Sokáig az itt vázolt folyamatot tartották az egyetlen igazán fontos anandamid képződési lehetőségnek, azonban újabb eredmények alternatív útvonalakat is feltártak [124-126], és enzim-génhiányos egerekkel végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy fentiek képesek egymást helyettesíteni, *in vivo* körülmények között [127, 128].

Az anandamid lebomlását egy zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH) enzim katalizálja, melynek eredményeképp arachidonsav és etanolamin szabadul fel [121]. A FAAH enzim szerkezeti eloszlása viszonylag jó egyezést mutat a  $\text{CB}_1\text{R}$ -ével, és a gátlószerekkel, illetve génhiányos egerekkel végzett részletes vizsgálatok szerint alapvető szerepe van abban, hogy bár az anandamid hatékonyan képes kötődni a  $\text{CB}_1\text{R}$ -hoz, *in vivo* létrehozott hatásai mégis gyengének és átmenetinek tekinthetők más kannabinoidokhoz képest [129].

A 2-AG alapvetően a plazmamembrán diacilglicerinjéből (DAG-ból) keletkezik, a glicerín 1-es szénatomjához kapcsolódó zsírsavlánc lehasításával – a reakciót a DAG-lipáz enzim katalizálja [121]. Fontos megjegyezni, hogy a DAG, mely tehát a 2-AG legfontosabb előanyagát jelenti, alapvetően a plazmamembrán foszfoinozítidjeiből keletkezik, a foszfolipáz C (PLC) enzimek hatására [121]. A PLC serkentése pedig számos jelátviteli út

kezdeti állomását jelenti, így ezen útvonalak elindulása egyben az endokannabinoid-felszabadulás lehetőségét is megteremti. Ez a funkcionális kapcsolat jelenti annak a folyamatnak az alapját is, melynek során a  $G_{q/11}$ -fehérjéhez kapcsolt 7TMR-ok aktivációja – PLC $\beta$  aktiváción keresztül (a DAG-lipáz közreműködésével) – 2-AG felszabaduláshoz, és így a CB $_1$ R-ok parakrin transzaktivációjához vezet (8. ábra). A jelenséget számos  $G_{q/11}$ -kapcsolt receptor esetében kimutatták, és jelentősége is sok élettani rendszerben megmutatkozott [130].



8. ábra A CB $_1$ R transzaktivációja  $G_{q/11}$ -fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztül

A  $G_{q/11}$ -fehérjéhez kapcsolt receptorok jelátvittele során egyrészt DAG keletkezik a plazmamembránban, másrészt Ca $^{2+}$  szabadul fel a belső raktárakból. Mindkét hatás hozzájárul, hogy a plazmamembránban a DAG-lipáz enzim közreműködésével 2-AG képződik. A felszabaduló 2-AG aktiválja a közelben elhelyezkedő CB $_1$ R-okat. A rövidítések magyarázata:  $\alpha_{q/11}$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : a heterotrimer  $G_{q/11}$ -fehérje alegységei; PIP $_2$ :

foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PLC $\beta$ : foszfolipáz C $\beta$  enzim; DAG: diacil-glicerin; DAGL: DAG-lipáz enzim; 2-AG: 2-arachidonil-glicerin; IP $_3$ : inozitol-1,4,5-triszfoszfát; IP $_3$ R: IP $_3$  receptor

A 2-AG lebomlását a monoacilglicerin-lipáz (MAG-lipáz) enzim irányítja, amely az arachidonsav-oldallánc lehasításával glicerinre és arachidonsavra bontja a 2-AG-t. Így végső soron az egyes sejtekben a 2-AG keletkezését, illetve lebomlását irányító fő enzimek, azaz a DAG-lipáz és a MAG-lipáz aktivitásának egyensúlya határozza meg a 2-AG szinteket és így a CB $_1$ R aktivitását, akár nyugalmi, akár serkentett körülmények között [131]. Igen valószínű például, hogy a DAG-lipáz tónusos aktivitása, azaz a folyamatos, kismértékű 2-AG felszabadulás hozzájárul a CB $_1$ R különböző rendszerekben észlelhető bazális aktivitásához. A két enzim kémiai vagy genetikai alapú befolyásolásán keresztül pedig a sejtek, illetve szövetek 2-AG szintjét, ezáltal a kannabinoid rendszer aktivációját igen hatékonyan lehet befolyásolni [132].

Az endokannabinoidok bioszintetikus útvonalainak általános jelentőségét az a tény is mutatja, hogy valamennyi érintett enzim és szubsztrát jelen van a szervezet szinte minden szövetében [129].

### *2.3.1.3. A kannabinoid receptorcsalád rövid bemutatása*

Jelenleg két kannabinoid receptort ismerünk: a CB $_1$ -et és a CB $_2$ -t. Mindkét receptor a 7TMR-ok családjába tartozik. Amellett, hogy kb. 43 %-os szekvencia-homológiát mutatnak egymással, jelentős eltérések figyelhetők meg szöveti eloszlásukban, valamint a kannabinoid ligandok iránti érzékenységük és az általuk aktivált jelátviteli útvonalak is számos ponton különböznek [133]. Emellett egyre több irodalmi adat utal további kannabinoid receptorok létezésére. Ilyen például az eredetileg „árva” receptorokhoz sorolt GPR55, melynek különböző kannabinoidok iránti affinitását több tanulmány is igazolta [134-136]. A hatások létrejötte azonban erősen sejttípus-függőnek és szövetfüggőnek bizonyult, így továbbra is vitatott, hogy a GPR55 valóban kannabinoid receptornak tekinthető-e [137]. Még összetettebbé teszi a képet, hogy bizonyos endokannabinoid

ligandok (így főleg az anandamid) nem csak a klasszikus kannabinoid receptorokon, hanem más célfehérjéken (pl. TRP csatornákon vagy szerotonin receptorokon) keresztül is kifejezhetnek szervezeti hatásokat [138]. Mivel munkánk során a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor működésének szabályozásával foglalkoztunk, a továbbiakban ezt a receptort mutatom be részletesen.

### **2.3.2. A CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R)**

Az eredetileg „árva” (*orphan*) G-fehérjéhez kapcsolt receptorokhoz sorolt fehérjét Matsuda és munkatársai 1990-ben azonosították mint kannabinoid receptort, miután képes volt specifikusan kötni a vizsgált kannabinoid ligandokat, továbbá szöveti eloszlása valamint az általa létrehozott hatások is megfeleltek annak a képnek, amely az addigi, kannabinoidokkal kapcsolatos megfigyelésekből kialakult [116].

#### *2.3.2.1. A CB<sub>1</sub>R élettani szerepe*

##### *2.3.2.1.1. A CB<sub>1</sub>R szerepe az idegrendszerben*

A CB<sub>1</sub>R a központi idegrendszerben a legnagyobb mértékben kifejeződő 7TMR, legnagyobb sűrűséggel az agykéregben, a hippokampuszban, a bazális ganglionokban és a kisagyban mutatható ki, de jelentős mennyiségben van jelen a hipotalamuszban és a gerincvelőben is [133, 139]. A központi idegrendszerrel kapcsolatos funkcionális anatómiai ismeretekkel összevetve, a fenti elhelyezkedési mintázat jól magyarázza a CB<sub>1</sub>R szerepét olyan működésekben, mint a tanulás és emlékezés folyamatai, a mozgás tervezése és végrehajtása, a fájdalomérzet modulálása vagy az étvágy- és éhségérzet szabályozása [140]. Ezen központi idegrendszeri hatások rövid összefoglalását a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A CB<sub>1</sub>R legfontosabb központi idegrendszeri hatásainak összefoglalása

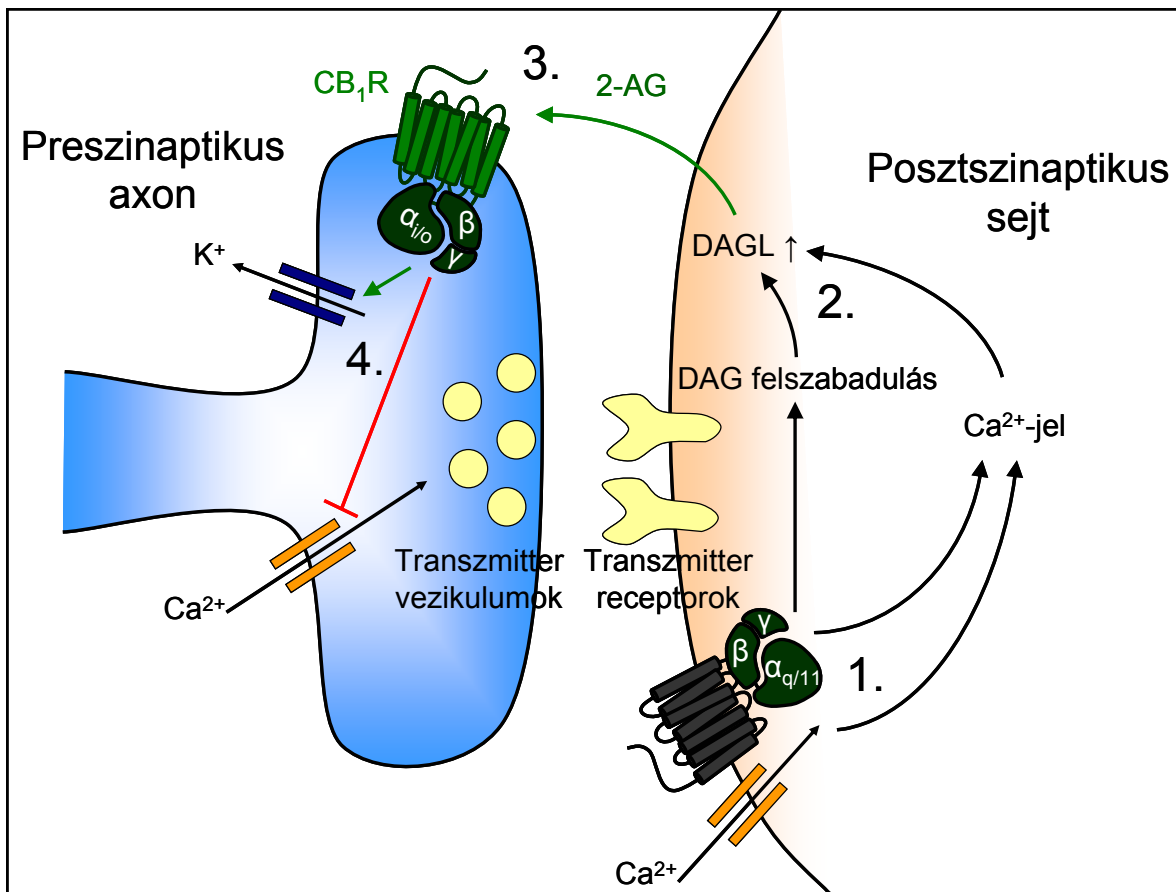
<i>Idegrendszeri működés</i>	<i>Idegrendszeri struktúrák CB<sub>1</sub>R kifejeződéssel</i>	<i>A CB<sub>1</sub>R szerepe</i>
Tanulás és emlékezés	Hippokampusz Nagyagykéreg Kisagykéreg	Emlékképek rögzítése és előhívása, érzelmi kondicionálás, mozgástanulás (exogén kannabinoidok a rendszer zavarát okozzák) [140, 141]
Fájdalomérzet	Periaquaeductális szürkeállomány Rostroventromediális nyúltvelő Gerincvelő hátsó szarv Hátsó gyöki ganglionok C-típusú fájdalomérző rostok	Fájdalomcsillapítás perifériás, gerincvelői és centrális szinteken [140, 141]
Étvágó és táplálékfelvétel	Hypothalamus Nucl. accumbens	Az étvágy és a táplálékfelvétel fokozása [140, 141]
Hányinger és hányás	Area postrema Nucl. tractus solitarii Nucl. dorsalis nervi vagi	Hányinger- és hányáscsillapítás [140]
Szorongás	Bazolaterális amygdala Prefrontális kéreg Elülső cinguláris kéreg	Szorongáscsökkentés (de nagy dózisú kannabinoidok esetén a szorongás előidézése) [141]
Örömrzet, jutalmazás	Ventrális tegmentális area Nucl. accumbens Prefrontális kéreg	Az örömrzet fokozódása, jutalomkeresés [140]

	Amygdala	
Mozgásszabályozás	Bazális ganglionok Kisagy	Mozgástervezés és mozgáskoordináció szabályozása (exogén kannabinoidok a rendszer gátlását okozzák)[140]
Az idegsejtek védelme	Gyakorlatilag valamennyi említett struktúra	Védelem a túlingerlés (epilepszia), a neurodegeneráció és az idegsejtek (traumát vagy ischaemiát követő) másodlagos károsodása ellen [140, 141]

Megjegyzendő, hogy a fenti, élettani körülmények között is igazolt CB<sub>1</sub>R hatások jó részét (fájdalomcsillapítás, örömrzet, szorongáscsökkentés stb.) az emberiség évezredek óta kihasználja, a marihuánából nyert különböző készítmények alkalmazásával [114]. Újabban pedig egyre nagyobb teret nyer a CB<sub>1</sub>R-on ható gyógyszerek (pl. szintetikus THC) kontrollált, orvosi körülmények közötti alkalmazása; az Egyesült Államokban és Európa számos államában is több ilyen készítmény van forgalomban, melyeket degeneratív idegrendszeri kórképekben, fájdalomszindrómákban, kemoterápia során fellépő hányinger és hányás csillapításában, vagy AIDS-es betegeknél étvágyfokozás céljából alkalmaznak [142].

Mindezen funkciókat a CB<sub>1</sub>R jellegzetes elhelyezkedésén és működésén keresztül valósítja meg. A CB<sub>1</sub>R-ok ugyanis az említett struktúrákban főként az idegi szinapszisokban, azon belül is a preszinaptikus axonvégződéseken vannak jelen, fiziológiás aktivációjuk pedig úgynevezett retrográd transzmisszió segítségével zajlik (9. ábra) [143]. Ennek során a posztzinaptikus sejtől serkentés hatására endokannabinoid (elsősorban 2-AG) szabadul fel, mely a szinapszisban visszafelé (retrográd módon) hat, azaz a preszinaptikus CB<sub>1</sub>R-okhoz kötődik. Mivel a CB<sub>1</sub>R-ok alapvetően gátló jelátvitellel

rendelkeznek (ld. később), így a retrográd hatás eredménye ( $K^+$ -csatornák nyitásán és  $Ca^{2+}$ -csatornák gátlásán keresztül) a preszinaptikus gátló (általában GABAerg) neuron transzmissziójának csökkenése [144, 145]. Ezzel a visszacsatolással a posztoszínaptikus sejt ingerelhetősége megnő, hiszen a gátló sejt gátlása valósul meg. Ennek a jelenségnek ezért a DSI (depolarizáció-indukált gátláscsökkenés, depolarization-induced suppression of inhibition) nevet adták [146].



9. ábra Endokannabinoid-mediált retrográd transzmisszió a szinapszisokban

A posztoszínaptikus membránban  $G_{q/11}$  aktiváció vagy  $Ca^{2+}$ -csatorna nyitás hatására  $Ca^{2+}$ -jel alakul ki (1.). A  $G_{q/11}$  aktiváció ezen kívül serkenti a DAG képződését a plazmamembránban. E folyamatok eredményeképp DAG-lipáz közreműködésével 2-AG szabadul fel a posztoszínaptikus membránból (2.). A 2-AG a szinapszisban visszafelé (retrográd) diffundálva serkenti a preszinaptikus  $CB_1R$ -okat (3.). A preszinaptikus  $CB_1R$  aktiváció  $K^+$ -csatornák aktiválásán és  $Ca^{2+}$ -csatornák gátlásán keresztül csökkenti a preszinaptikus idegvégződésből a neurotransmitter-felszabadulást (4.). A rövidítések magyarázata:  $\alpha_{q/11}$ , ill.  $\alpha_{i/o}$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : a

heterotrimer  $G_{q/11}$ , ill.  $G_{i/o}$ -fehérje alegységei; DAG: diacil-glicerin; DAGL: DAG-lipáz; 2-AG: 2-arachidonil-glicerin.

Ezen a mechanizmuson keresztül a  $CB_1R$  alapvetően befolyásolja a fent említett területeken az idegrendszeri hálózatok rövid és hosszú távú alakíthatóságát és alkalmazkodóképességét, a szinaptikus plaszticitást [147]. Ritkábban fordul ugyan elő, de a fentihez hasonló retrográd gátlás létrejöhet olyan szinapszisokban is, ahol a preszinaptikus sejt nem gátló (ld. GABAerg), hanem serkentő (pl. kolinerg, szerotoninerg, glutamáterg) jellegű. Ebben az esetben nem DSI-ről, hanem DSE-ről (depolarizáció-indukált serkentéscsökkenés, depolarization-induced suppression of excitation) beszélünk [143].

A központi idegrendszeren kívül a  $CB_1R$  jelen van a perifériás idegrendszerben is, pl. a szenzoros idegrostokon és az autonóm idegrendszer neuronjain. Hatásai itt is jórészt preszinaptikus gátláson keresztül valósulnak meg [147].

#### 2.3.2.1.2. A $CB_1R$ szerepe a keringési rendszerben

A  $CB_1R$ -ok jelen vannak a szívizomban, ahol serkentésük kontraktilitást és frekvenciát csökkentő (negatív inotróp és kronotróp) hatást hoz létre, illetve megtalálhatóak az erek szöveteiben is, ahol pedig aktivációjuk értágulatot idéz elő [148, 149]. Az értágulat hátterében feltételezik  $Ca^{2+}$ -csatornák gátlását [150], endothel-mediált nitrogén-monoxid felszabadulást [151],  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$ -csatornák aktiválását [152], illetve az ERK1/2-kaszád szerepét [153]. A pontos mechanizmus valószínűleg függ a vizsgált élőlény fajtától és az ér elhelyezkedésétől is. Az erek falához és a szívhez futó szimpatikus posztganglionáris idegek axonterminálisai is tartalmaznak  $CB_1R$ -okat, melyek stimulációjakor gátlást szenved a végkiszülékből a noradrenalin felszabadulása, s ezáltal csökken a szimpatikus tónus a szíven és az érrendszerben [148]. Mindezen mechanizmusokon keresztül a  $CB_1R$  aktivációjakor csökken a szív perctérfogata és a perifériás ellenállás, ezáltal pedig a vérnyomás is.

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy bár a  $CB_1R$  jelenlétét és szabályozó szerepét többszörösen igazolták izolált erekben [148], egészséges patkányokban  $CB_1R$  gátlószer

adása nem volt jelentős hatással a vérnyomásra és a lokális keringésre, és CB<sub>1</sub>R-génhiányos egerekben sem változott jelentősen a vérnyomás egészséges társaikhoz képest [154, 155]. Különböző keringési betegségmodellekben azonban a CB<sub>1</sub>R gátlása, illetve hiánya már kifejezettebb hatású volt [149, 154]. Mindez arra utal, hogy a CB<sub>1</sub>R-nak kóros állapotok esetén megnő a szerepe a keringési rendszer szabályozásában. További érdekessége ennek a területnek, hogy a kannabinoidok által kiváltott keringési hatások egy részéért valószínűleg a CB<sub>1</sub>R-on kívül más receptorok (pl. az anandamidot kötni képes TRPV receptor, illetve újabb kannabinoid receptorok) is felelősek [138, 148]. Az endokannabinoidok szív-érrendszeri hatásainak megértését az is bonyolítja, hogy a lebomlásuk során igen gyakran vasoaktív hatású metabolitok (pl. arachidonsav-származék prostanoidok) keletkeznek, melyek az elsődleges hatásokat módosíthatják [156]. Megemlítendő továbbá az is, hogy a CB<sub>1</sub>R a központi idegrendszerben kifejeződve, centrális mechanizmussal is befolyásolja a keringési rendszer vegetatív tónusát [157]. Így összességében a keringési rendszer endokannabinoidokon, illetve CB<sub>1</sub>R-on keresztüli szabályozása egy igen összetett és a mai napig nem teljesen feltérképezett terület.

#### 2.3.2.1.3. A CB<sub>1</sub>R szerepe a zsírszövetben és a májban

A CB<sub>1</sub>R jelen van a zsírszövet sejtjeiben [158], ahol serkentése megnöveli a lipoprotein lipáz enzim aktivitását, és csökkenti az adiponektin termelését. Ezáltal fokozza a sejtek zsírsavfelvételét és a trigliceridképzést, azaz a zsírsejtek zsírtartalma és mérete megnő [159]. A májban is kimutatták a receptort, itt – a zsírsav-szintáz serkentésének és az AMP-aktivált protein-kináz gátlásának köszönhetően – fokozódik a zsírsavsintézis és csökken a  $\beta$ -oxidáció, ami szintén a lipidanyagcsere anabolikus irányba való eltolódását jelenti [160].

A fenti hatások, kombinálva a központi idegrendszeri, étvágyra és táplálékfelvételre gyakorolt pozitív hatásokkal azt jelentik, hogy a CB<sub>1</sub>R alapvetően a szervezeti tápanyagraktározásban és a zsírszövet gyarapításában vesz részt [159]. Mindez a kezdeti kutatások alapján annyira ígéretes gyógyszerképpontnak tűnt, hogy a 2000-es évek közepén a

szelektív CB<sub>1</sub>R-gátlószer rimonabant fogyasztószerként forgalomba is került, míg aztán – súlyos pszichés mellékhatásaira hivatkozva – néhány évvel később visszavonták a gyógyszerpiacról [161]. A centrális mellékhatások problémáját egyébként megoldhatja a vér-agy gáton átjutni képtelen – így pszichés mellékhatásoktól mentes – CB<sub>1</sub>R gátlók fejlesztése. E vegyületek kipróbálása jelenleg is folyamatban van [162].

#### 2.3.2.1.4. A CB<sub>1</sub>R szerepe egyéb szövetekben

A kannabinoidokkal kapcsolatos intenzív kutatások eredményeképp ma már nem igazán lehet olyan szövetet említeni, ahol ne mutatták volna ki a CB<sub>1</sub>R, illetve az endokannabinoid rendszer egyéb elemeinek a jelenlétét. Így a receptor megtalálható például a szem szöveiben, ahol serkentése a szemnyomás csökkenéséhez vezet [163], vagy a spermiumokban, amelyek mozgását és anyagcseréjét gátolja [164], de jelen van a gyomor-bélrendszerben, a bőrben, a tüdőben, a vesében és a csontban is [140].

A fentiekből látható, hogy a CB<sub>1</sub>R számos élettani folyamatban fontos szabályozó szereppel bír. Ráadásul, bár továbbra is kiemelten fontosnak tartják a receptor központi idegrendszeri jelenlétét és szabályozó szerepét, mára kiderült, hogy messze nem csak ezek a kezdetben igazolt hatások állnak élettani jelentőségének háttérében. A CB<sub>1</sub>R gyakorlatilag az összes perifériás szövetben jelen van, és ha nem is alapvetően szabályozza, de mindenképpen befolyásolja a legkülönbözőbb szervezeti funkciókat. Mindez pedig különösen indokoltá teszi működésének és szabályozásának részletesebb megismerését.

#### 2.3.2.2. A CB<sub>1</sub>R jelátvittele

A CB<sub>1</sub>R – 7TMR lévén – hatásainak legnagyobb részét G-fehérjéken keresztül hozza létre. A receptor aktív állapotban elsősorban G<sub>i/o</sub>-fehérjéket aktivál, s ezzel számos, e fehérjékre jellemző jelátviteli útvonalat indít el. Ezek közül a legfontosabbak [165]:

*A cAMP képzés gátlása.* A CB<sub>1</sub>R serkentése a G $\alpha_{i/o}$ -n keresztül az adenil-cikláz enzim gátlásához vezet. Ennek következtében a sejtben a cAMP szint csökken, és így a protein-kináz A (PKA) enzim is gátlódik. Ezt a hatást számos sejtvonalonban, primer sejt kultúrákban valamint szöveti preparátumokban is kimutatták, és gyakorlatilag – változó hatáserősséggel – valamennyi kannabinoid agonista létrehozza, így a CB<sub>1</sub>R legfőbb G-fehérje-függő hatásának tekinthető [165]. Ismert, hogy a G $\alpha_{i/o}$  családba tartozó G-fehérje altípusok közül mind a G $\alpha_o$ , mind pedig a G $\alpha_{i1}$ , G $\alpha_{i2}$  és G $\alpha_{i3}$  képes kötődni a CB<sub>1</sub>R-hoz [166]. Kimutatták továbbá, hogy a különböző (természetes és szintetikus) kannabinoid agonisták különböző erősséggel képesek a különböző G $\alpha_{i/o}$  altípusokat serkenteni, ami a CB<sub>1</sub>R-on keresztüli funkcionális szelektivitás létezését bizonyítja [167-169]. Ennek pontos élettani jelentősége egyelőre nem tisztázott, azonban a CB<sub>1</sub>R-G $\alpha_{i/o}$  kapcsolat sejt-, illetve szövetspecifikusságára számos adat utal [165, 166, 170].

*A cAMP képzés serkentése és Ca<sup>2+</sup>-jel.* A CB<sub>1</sub>R bizonyos körülmények között képes G<sub>s</sub> fehérjét is aktiválni, és ezzel az adenil-cikláz enzim serkentésén keresztül a cAMP szintet megnövelni [165]. Mindez elsősorban az endogén G $\alpha_{i/o}$ -fehérjék pertusszisz toxinnal történő gátlása mellett tehető láthatóvá, és valószínűleg – csakúgy, mint a különböző G $\alpha_{i/o}$  altípusok aktivációja – erősen függ a vizsgált sejtípustól, a receptor kifejeződésének mértékétől, illetve az alkalmazott kannabinoid agonista típusától [171]. Szintén nem tekinthető általános hatásnak a CB<sub>1</sub>R-on keresztül létrejövő Ca<sup>2+</sup>-jel, amely – a rendelkezésre álló adatok alapján – csak egyes sejtvonalakban vagy csak bizonyos agonisták hatására jön létre. A folyamat pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Vannak adatok G $\alpha_{q/11}$ -fehérjék aktivációjára,  $\beta\gamma$ -alegységen keresztüli foszfolipáz C serkentésre, illetve felmerül lehetséges magyarázatként a receptor-dimerizáció jelensége is [165, 172, 173].

*Ioncsatornák módosítása.* A CB<sub>1</sub>R – a G $\alpha_{i/o}$ -fehérje  $\beta\gamma$ -alegységen keresztül – gátolja a különböző (L-, N-, P/Q-típusú) feszültség-függő Ca<sup>2+</sup>-csatornákat. Szintén a  $\beta\gamma$ -alegység hatása a GIRK befelé rektifikáló K<sup>+</sup>-csatornák CB<sub>1</sub>R-on keresztüli aktiválása [150, 174-176]. Ezen hatásoknak elsősorban a fentebb bemutatott módon, az idegrendszeri szinapszisokban, illetve az érfal simaizomsejtjeiben van jelentősége [141].

*Mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) jelpályák serkentése.* A CB<sub>1</sub>R képes aktiválni mindhárom fő MAPK jelátviteli útvonalat, azaz az ERK1/2, a p38 MAPK és a JNK kaszkádokat [177-179]. A CB<sub>1</sub>R-függő ERK1/2 aktivációt a cAMP képzés gátlásához hasonlóan alapvető jelentőségűnek tekintik a CB<sub>1</sub>R jelátviteli hatásai között, amit az ezzel foglalkozó számos tanulmány igazolt. A lehetséges mechanizmusokkal kapcsolatban azonban a kép korántsem ilyen egyértelmű. Különböző rendszerekben igazolták már a G<sub>i/o</sub> fehérjék szerepét [133], a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) βγ-függő serkentését [180], növekedési faktor receptorok transzaktivációját [181], újabb tanulmányok pedig a β-arresztinek szerepét is felvetették a CB<sub>1</sub>R-függő ERK1/2 válasz kialakulásában [182-184].

Fontos jellemzője a CB<sub>1</sub>R-nak, hogy a fent leírt G-fehérje függő hatások nagy részét nyugalmi, nem stimulált körülmények között is részlegesen létrehozza, vagyis bazális aktivitást mutat [70, 185]. Az irodalomban máig sincs konszenzus arra vonatkozóan, hogy ez a bazális aktivitás mennyiben valóban konstitutív (azaz a receptor saját, intrinszik tulajdonságából származik), illetve mennyiben okozója annak a sejtekből tónusosan, kis mértékben felszabaduló endokannabinoidok (részleges) aktiváló hatása [165, 186-189]. Mindkét lehetőség mellett számos adat és érvelés látott már napvilágot, illetve nem szabad elfelejtenünk, hogy a két folyamat együtt is érvényes lehet. Így az egyes rendszerekben észlelt bazális CB<sub>1</sub>R aktivitáshoz a receptor konstitutív, intrinszik aktiválódása mellett sejttípustól, illetve szövettípustól függően járulhat hozzá a bazális endokannabinoid tónus.

### 2.3.2.3. *A CB<sub>1</sub>R deszenzitizációja és internalizációja, a β-arr2 szerepe*

#### 2.3.2.3.1. *A CB<sub>1</sub>R deszenzitizációja*

A legtöbb 7TMR-hoz hasonlóan a CB<sub>1</sub>R-nak is csökken a válaszkészsége aktivációt követően. A CB<sub>1</sub>R deszenzitizációját először *Xenopus* oocitákban, illetve AtT20 sejtekben írták le [190], a receptorválasz csökkenését a GIRK káliumcsatornákra kifejtett aktiváló hatás csillapodásán keresztül mutatták be. Azt is igazolták, hogy mind GRK3, mind β-arr2

ko-expressziójára szükség van a folyamat megfelelő lezajlásához, továbbá több feltételezett foszforilációs helyet (S426 és S430 aminosavak) is azonosítottak a receptor C-terminális régiójában [190]. Később a CB<sub>1</sub>R által létrehozott ERK1/2-válasz lecsengésében is igazolták a 426-os és 430-as szerin aminosavak szerepét [191]. Egy másik tanulmány hippokampális neuronokban mutatta ki, hogy fenntartott agonista serkentés vagy agonista előkezelés hatására csökken a CB<sub>1</sub>R-ok válaszkészsége (ebben az esetben a Ca<sup>2+</sup>-csatornákra kifejtett gátló hatása), illetve domináns negatív konstrukciók alkalmazásával bizonyították a GRK2 és a β-arr2 szerepét a folyamatban [192]. A csökkent válaszkészséghez hozzájárul a krónikus adagolás esetén fellépő receptorszám-csökkenés, azaz downreguláció is, melyben a receptorhoz endocitózist követően kötődő GASP-1 fehérje szerepét igazolták [193].

A CB<sub>1</sub>R deszenzitizációjának jelentős élettani és kórélettani következményei vannak. Ismert, hogy krónikus kannabinoid adagolás esetén tolerancia fejlődik ki kísérleti állatokban, aminek hátterében elsősorban a CB<sub>1</sub>R válaszkészségének csökkenése áll [194, 195]. Ezt igazolják azok az eredmények is, melyek szerint egy genetikailag módosított egértörzsből, amely a vad típusú CB<sub>1</sub>R helyett egy nem deszenzitizálódó mutáns receptort (CB<sub>1</sub>R-S426A/S430A) fejez ki, jelentősen csökken a hosszú távú kannabinoid adagoláskor kifejlődő tolerancia [196]. β-arr2-génhiányos egerekben szintén leírták a CB<sub>1</sub>R csökkent deszenzitizációját és downregulációját a központi idegrendszer bizonyos területein [197]. Ami az emberi kannabisz-fogyasztást illeti, alkalomszerű használatnál ugyan nem, de rendszeres marihuána-élvezők esetén szintén kialakul a hozzászokás [198]. Ráadásul a kannabinoidok gyógyszerként történő alkalmazásakor is problémát jelent a tolerancia [199], ami jelentősen befolyásolhatja a terápiás hatást. Mindez rámutat annak jelentőségére, hogy a háttérben álló mechanizmusokat, azaz a CB<sub>1</sub>R válaszkészségének molekuláris szintű szabályozását célszerű még pontosabban megismernünk.

#### 2.3.2.3.2. A CB<sub>1</sub>R agonista-indukált és konstitutív internalizációja

A CB<sub>1</sub>R agonista hatására kialakuló internalizációját számos sejttípusban kimutatták (köztük CHO [200], AtT20 [190, 201, 202], F11 [203], neuroblasztóma N18TG2 [204] és

HEK293 [70, 204] sejtekben), valamint igazolták hippokampális idegsejttenyészetekben is, amelyek természetes módon fejeznek ki CB<sub>1</sub>R-t [186, 203]. A rendelkezésre álló különböző adatok szerint ez az agonista-indukált CB<sub>1</sub>R endocitózis klatrin- és/vagy kaveolin-függő módon zajlik az egyes sejtípusokban [201, 204-206]. A  $\beta$ -arr2 szerepe is fölmerül az internalizáció folyamatában, hiszen a CB<sub>1</sub>R-hoz való kötődését, illetve a deszenzitizációban betöltött szerepét többszörösen igazolták [190-192, 197], azonban direkt bizonyítékot a  $\beta$ -arr2 kötés és a CB<sub>1</sub>R internalizáció összefüggésére az ezzel foglalkozó tanulmányok egyike sem mutatott.

A CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációját, azaz agonista hiányában is létrejövő, spontán endocitózist is számos sejtípusban megfigyelték, köztük hippokampális neuronokban, CHO és HEK293 sejtekben [70, 186, 187, 189]. A jelenség élettani szerepére (mint általában a 7TMR-ok konstitutív internalizációja esetén) egyelőre nincs széles körben elfogadott magyarázat. Központi idegrendszeri sejteken végzett vizsgálatok azt a lehetőséget vetették fel, hogy az idegsejtek különböző részein a CB<sub>1</sub>R eltérő mértékű spontán internalizációja a receptor megfelelő (azaz elsősorban axonterminálisokra jellemző) sejtben belüli elhelyezkedésének a feltétele [186]. A CB<sub>1</sub>R eloszlásának szabályozásával kapcsolatos bizonytalanságot azonban jól érzékelteti, hogy van olyan tanulmány, mely még azt is kétségbe vonja, hogy a CB<sub>1</sub>R élettani körülmények között egyáltalán kijut-e a sejtmembránra, vagy inkább termelése után intracelluláris kompartmentekben elhelyezkedve működik, illetve ezt követően a lizoszómákban lebomlik [207, 208]. (Ne feledjük, hogy a CB<sub>1</sub>R ligandjai hidrofób természetűek, így a plazmamembránon átjutva elvileg a sejt belsejében elhelyezkedő receptorok is könnyen elérhetőek számukra.)

Érdekes továbbá, hogy egyes kutatások szerint a jelenség a receptor fentebb említett bazális aktivitásának egyenes következménye, mivel az inverz agonista kezelés, illetve a bazális aktivitás DAG-lipáz-gátlóval létrehozott csökkentése gátolta a folyamatot [70, 186, 189, 200]. Ugyanakkor más tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a konstitutív internalizáció független a receptor aktivitásától, mivel e kísérletekben az inverz agonista hatására nem változott a sejt felszíni receptorszám [187, 209]. Ha a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációja valóban az aktivitástól függetlenül zajlik, az felveti annak lehetőségét, hogy

a receptor agonista-indukált, illetve konstitutív internalizációjának mechanizmusa között is különbség van [187]. Mindazonáltal egyelőre nincs rá bizonyíték, hogy ez a két folyamat valóban eltér egymástól, azaz, hogy létrejöttek különböző endocitotikus mechanizmusokat igényel. Közvetlen vizsgálatokkal kimutatták ugyan, hogy a konstitutív internalizációban szerepel a dinamin, valamint egy az AP-2 komplexhez közvetlenül kötődő fehérje, az eps15 [186], mindez azonban a korábbi adatok alapján valószínűleg az agonista-indukált internalizációra is igaz. Ennél részletesebb vizsgálatok pedig nem történtek a mechanizmusok pontos tisztázására.

Összességében tehát a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációja, bár alapvetően jól dokumentált jelenség, számos megválaszolandó kérdést vet fel, mind élettani jelentőségét, mind pedig pontos mechanizmusát illetően.

#### 2.3.2.3.3. A $\beta$ -arresztinek és a CB<sub>1</sub>R közötti kapcsolat eddig ismert részletei

Amint az a fent leírtakból is látszik, számos adat utal arra, hogy a  $\beta$ -arr2 szerepet játszik a CB<sub>1</sub>R szabályozásában. Ami a két fehérje közötti konkrét kapcsolatot illeti, a  $\beta$ -arr2 kihelyeződését az aktivált CB<sub>1</sub>R-hoz szintén igazolták [191]. Ezért a kötődésért valószínűleg – más 7TMR-okhoz hasonlóan – a receptor aktivációja és azt követő foszforilációja felelős. Érdekes azonban, hogy a lehetséges foszforilációs helyek közül a C-terminális S426 és S430 aminosavak mutációja (amely a fentebb bemutatott eredmények alapján gátolja a receptor deszenzitizációját) nem volt hatással sem a receptor  $\beta$ -arr2 kötésére, sem pedig az internalizációra [210]. Egy még disztálisabban elhelyezkedő Ser/Thr csoport (T461-S469) viszont valószínűleg szerepet játszik az utóbbi két folyamatban, mert e hat aminosav együttes kicserélése alaninra gyakorlatilag megszüntette a  $\beta$ -arr2 kötetést és az agonista-indukált CB<sub>1</sub>R endocitózist [210]. A fenti eredmények ellenére nem pontosan tisztázott, hogy a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arr2 kötését a receptor mely régiói szabályozzák. A lehetséges foszforilációs helyek szerepét ugyan már meglehetősen részletességgel vizsgálták, azonban fontos tanulságokkal szolgálhatna további, elsősorban a receptor aktivációs állapotát közvetítő CB<sub>1</sub>R régiók azonosítása, hiszen, mint azt a  $\beta$ -arresztinek működésével

foglalkozó fejezetben bemutattuk, mindkét (foszforilációs és aktivációs) szenzor aktiválódására szükség van a megfelelő  $\beta$ -arresztin kötés kialakulásához [44]. Ezért indokolt a CB<sub>1</sub>R-ban további szabályozó aminosavak és régiók keresése, melyek hatással lehetnek a receptor  $\beta$ -arresztin kötésére.

További kérdést vet fel, hogy míg a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arr2 közötti kötést egyértelműen igazolták, korábban nem állt rendelkezésre közvetlen adat a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arr1 izoforma kapcsolatára vonatkozóan. Egyes régebbi tanulmányok a  $\beta$ -arr1 és egy szintetizált CB<sub>1</sub>R-C-terminus közti kapcsolódást mutattak ki [211, 212], ezeket az eredményeket azonban – munkánk kezdetéig – nem erősítették meg teljes fehérjékkel, illetve sejtes rendszerekben vizsgálva.

Érdekes és viszonylag új fejezete a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolatnak a CB<sub>1</sub>R esetleges  $\beta$ -arresztin-függő jelátvitelére. Annak ismeretében, hogy a  $\beta$ -arresztineknek általában véve mennyire alapvető funkciója a 7TMR-ok jelátvitelében való közvetlen közreműködés, nem is meglepő, ha a CB<sub>1</sub>R is „használja” a  $\beta$ -arresztint bizonyos jelátviteli hatások közvetítésére. Eddig mindössze néhány tanulmány közölt ilyen irányban adatokat, ezen eredmények egyértelműen a  $\beta$ -arresztinek szerepére utalnak a CB<sub>1</sub>R által létrehozott ERK1/2-válaszban [182-184].

### 3. Célkitűzések

Munkánk során a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat eddig feltáratlan részleteit vizsgáltuk, középpontba helyezve a receptor  $\beta$ -arresztinek iránti affinitását, a  $\beta$ -arresztineknek a CB<sub>1</sub>R internalizációjában betöltött szerepét, illetve a receptor  $\beta$ -arresztin kötésért felelős újabb szabályozó régióinak azonosítását. Így a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan jellemezhető a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arr1 közötti kötés? Van-e különbség a CB<sub>1</sub>R és a két  $\beta$ -arresztin izoforma ( $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2) közötti kapcsolat affinitásában?

2. Milyen szerepet játszik a  $\beta$ -arr2 a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált, illetve konstitutív internalizációjában? Különbözik-e valójában ez a két folyamat egymástól?

3. Mi a szerepe a konzervált DRY motívumnak a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arresztin kötésében és G-fehérje aktiválásában?

## 4. Módszerek

### *4.1. A kísérletekben használt anyagok*

A patkány CB<sub>1</sub>R és CB<sub>1</sub>R-eYFP cDNS-eket Lenkei Zsolttól (Centre National de la Recherche Scientifique, Párizs) kaptuk. A humán  $\beta_1$  és  $\gamma_{11}$  G-fehérje alegységek cDNS-eit a Missouri S&T cDNA Resource Center-től vásároltuk (Rolla, MO). A  $\beta$ -arr1,  $\beta$ -arr2 és a  $\beta$ -arr2-eGFP cDNS-eit Dr. Marc G. Carontól (Duke University, Durham, NC) kaptuk. A molekuláris biológiai enzimeket a Fermentastól (Vilniusz, Litvánia) és a Stratagene-től (La Jolla, CA) szereztük be. A pcDNA3.1 vektort, magzati borjú szérumot (FBS-t), OptiMEM-et, Lipofectamine 2000-t és a PBS-EDTA-t az Invitrogen-től (Carlsbad, CA) vásároltuk. A coelenterazin h-t a Regis Technologies-től (Morton Grove, IL) szereztük be. A WIN55,212-2-t, a 2-AG-t és az AM251-et a Tocris-től (Bristol, UK) rendeltük. A sejt kultúrák fenntartásához és a mérésekhez használt edények és tálcák a Greiner-től (Kremsmunster, Ausztria) származtak. A HaloTag® Alexa Fluor® 488 ligandot a Promegától (Madison, WI) vásároltuk. A kontroll siRNS-t, humán  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS-t, egér  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS-t és a klatrin nehézlánc-specifikus siRNS-t (melyek szekvenciái a következők voltak, sorrendben: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3', 5'-GGACCGCAAAGUGUUUGUG-3', 5'-ACGUCCAUGUCACCAACAA-3' és 5'-GAAAGAAUCUGUAGAGAAA-3') az Eurofins MWG Operontól (Ebersberg, Germany) rendeltük. A CHO-K1, HeLa és Neuro-2a sejteket az ATCC-től (American Type Culture Collection, Manassas, VA) vettük. Az anti- $\beta$ -arr2, anti-pERK1/2, antiERK1/2 és a HRP-konjugált nyúl- és egér-elleni antitesteket a Cell Signaling Technology Inc-től (Beverly, MA) szereztük be. A klatrin nehézlánc elleni antitestet a Transduction Laboratories-től (Lexington, KY) vásároltuk. Amennyiben másként nem jeleztük, minden más vegyszert és reagenst a Sigmától (St. Louis, MO) rendeltünk.

#### ***4.2. Plazmid konstrukciók és irányított mutagenézis***

Az alábbi konstrukciók készítését munkacsoportunk korábbi közleményeiben már ismertette:  $\alpha_0$ -Rluc és YFP- $\beta_1$  [189],  $\beta$ -arr2-Rluc [213], eYFP-vel jelölt ICAM-1 (ICAM-YFP) [214], plazmamembránhoz irányított mVenus (MP-mVenus) [214], EPAC-alapú BRET-szenzor [215]. Az mVenus-szal jelölt patkány  $AT_{1a}$  receptor ( $AT_{1R}$ -mVenus), humán  $\beta_2AR$  ( $\beta_2AR$ -mVenus) és patkány  $CB_1R$  ( $CB_1R$ -mVenus) úgy készült, hogy kicseréltük a fluoreszcens fehérjéket kódoló szekvenciákat az  $AT_{1R}$ -YFP-ben [213],  $\beta_2AR$ -Sluc-ban [216], illetve a  $CB_1R$ -eYFP-ben, az mVenus szekvenciájára, AgeI és NotI restriktív enzimek használatával. Az mCherry-vel jelölt  $AT_{1R}$  ( $AT_{1R}$ -mCherry) és a Cerulean-nal jelölt  $\beta_2AR$  ( $\beta_2AR$ -Cerulean) hasonló módon készült. A  $\beta$ -arr1-Rluc-t és a  $\beta$ -arr1-eGFP-t a  $\beta$ -arr2-Rluc-ból, illetve a  $\beta$ -arr2-eGFP-ből hoztuk létre, a  $\beta$ -arr2 cDNS-ének  $\beta$ -arr1-re történő cseréjével. A  $CB_1R$ -mCherry és a  $\beta$ -arr2-RFP úgy készült, hogy a  $CB_1R$ , illetve a  $\beta$ -arr2 cDNS-ét klónoztuk az mCherry-t, illetve az RFP-t tartalmazó vektorokba (melyeket Dr. Roger Tsien-től (University of California, San Diego, CA) kaptunk). A Halo- $CB_1R$  konstrukció létrehozásához először PCR segítségével felsokszoroztuk a HaloTag® cDNS-ét a HaloTag-pHT2 vektorból (Promega, Madison, WI), ahol az 5' primer tartalmazott még egy az influenza hemagglutininből származó, hasítható szignálszekvenciát (MKTIIALSIFYFCLVFA) kódoló szakaszt is – ezzel értük el a végső konstrukció megfelelő plazmamembrán elhelyezkedését [217]. Ezt a terméket beillesztettük a pEGFP-C1 vektorba (Clontech, Palo Alto, CA), az eGFP szekvenciájának helyére (pHalo-C1 vektor). Ezt követően a  $CB_1R$  cDNS-ét illesztettük be a pHalo-C1-be a HaloTag® szekvencia után, így kaptuk a Halo- $CB_1R$  konstrukciót. A  $CB_1R$ -Sluc-ot a  $CB_1R$ -eYFP-ből hoztuk létre úgy, hogy az eYFP-t kódoló szekvenciát a szuper Renilla luciferáz (Sluc) [218] cDNS-ére cseréltük ki. A V54D pontmutációt a különböző  $\beta$ -arr2 konstrukciókba, valamint a különböző mutációkat a  $CB_1R$  és a  $CB_1R$ -mVenus DRY motívumába a QuikChange® irányított mutagenézis kit (Stratagene, La Jolla, CA) segítségével illesztettük be, a gyártó utasításainak megfelelően. Valamennyi konstrukció szekvenciáját automatizált DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük.

### ***4.3. Sejtkultúrák és transzfekeció***

A HeLa és Neuro-2a sejteket DMEM médiumban, a CHO-K1 sejteket Ham's F12 médiumban tartottuk fenn, melyeket minden esetben 10%-os FBS-sel, 100 µg/ml sztreptomocinnal és 100 IU/ml penicillinnel egészítettünk ki. A sejtek fenntartása 5% CO<sub>2</sub>-ban, 37 °C-on történt. A konfokális mikroszkópos kísérletekhez a sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük (melyeket a Neuro-2a sejtek esetében poli-L-lizinnel fedtünk be), 6-lyukú tálcákban. Valamennyi egyéb kísérletben a sejteket 6-lyukú tálcákon növesztettük. A sejteket a megadott plazmidokkal, illetve siRNS-sel (jelzés szerint) transzfekektáltuk 2 µl/pont Lipofectamine 2000-rel, OptiMEM médiumban, a gyártó utasításait követve. A transzfekecióhoz használt plazmidok és siRNS-ek pontos mennyiségét minden esetben a kísérletek leírásánál ismertetjük.

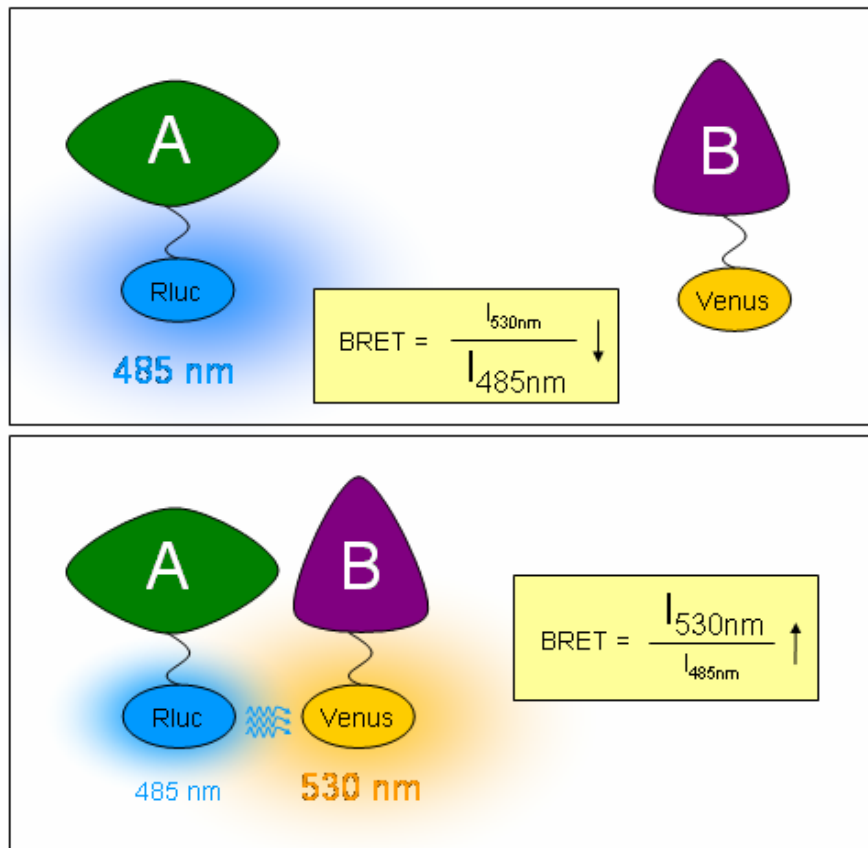
### ***4.4. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések***

#### **4.4.1. A BRET módszer rövid ismertetése**

A BRET módszer alapvetően egy fehérjék közötti interakciók vizsgálatára, illetve ezen kölcsönhatások kialakulásának (és felbomlásának) valós idejű, érzékeny követésére kifejlesztett technika. A módszer egy biofizikai jelenségen, a rezonancia energiatranszferen (RET) alapul. Ennek során egy fluoreszcens vagy biolumineszcens donor molekula, megfelelő fizikai közelség esetén (ennek mértéke igen kicsi, mintegy 1-10 nm), energiájának egy részét fénykibocsátás helyett rezonancia útján átadja az akceptor molekulának, így gerjesztve azt. Az eredmény az akceptor molekula (saját emissziós spektrumának megfelelő) fénykibocsátásának megjelenése. Az energiatranszfer létrejöttének feltétele, hogy a donor emissziós spektruma megfelelő átfedést mutasson az akceptor molekula gerjesztési spektrumával. Az energiatranszfer mértéke igen erősen függ a két molekula közötti távolságtól (annak hatodik hatványával fordítottan arányos), de

befolyásolja azt a donor és akceptor egymáshoz képest történő elhelyezkedése, orientációja is [219].

A BRET során a donor egy biolumineszcens enzim, a Renilla luciferáz (Rluc, illetve annak különböző módosított, továbbfejlesztett formái, pl. szuper Rluc (Sluc)), mely megfelelő szubsztrát (cölaterazin) jelenlétében, annak bontásán keresztül 485 nm-es maximummal bocsát ki fényt. Az akceptor molekula általában az YFP sárga fluoreszcens fehérje, illetve annak továbbfejlesztett változatai (pl. Venus, monomer Venus (mVenus) fehérjék), amelyek emissziós maximuma 530 nm. Amennyiben a BRET-et fehérjék közötti specifikus interakciók követésére akarjuk használni, úgy a vizsgálni kívánt fehérjéket meg kell jelölnünk a BRET donor és akceptor partnerekkel (10. ábra).



10. ábra A biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) módszer működési elve

A BRET során a két vizsgálni kívánt struktúrát (példánkban A és B fehérjék) biolumineszcens donor (kísérleteinkben Renilla luciferáz (Rluc) fehérje vagy annak módosított formája, a szuper Rluc (Sluc) fehérje) és fluoreszcens akceptor fehérjékkel (kísérleteinkben Venus vagy YFP sárga fluoreszcens fehérjék) jelöljük meg. A, Ha a két struktúra között nagy a távolság, csak a donor (Rluc) bocsát ki fényt, saját emissziós spektrumának megfelelően (kb. 485 nm maximummal). A mért BRET jel (azaz az 530 nm-en és 485 nm-en mért fényintenzitások hányadosa ( $I_{530\text{nm}}/I_{485\text{nm}}$ )) alacsony lesz. B, Amennyiben a két vizsgált fehérje molekuláris közelségbe (1-10 nm) kerül egymással, az Rluc fehérje energiájának egy részét rezonancia energiáttranszfer útján átadja az akceptornak, gerjesztve azt, így a Venus (ill. YFP) saját emissziós spektrumának megfelelően (kb. 530 nm maximummal) fényt bocsát ki. Ezt a BRET jel ( $I_{530\text{nm}}/I_{485\text{nm}}$ ) növekedése jelzi.

A kapcsolat követésére használt BRET jel az 530 nm-en és 485 nm-en mért fényintenzitások hányadosa ( $I_{530\text{nm}}/I_{485\text{nm}}$ ). Ha a két fehérje között nincs kölcsönhatás, a BRET jel alacsony lesz. A két fehérje közti interakció kialakulása esetén megtörténik az energiáttranszfer, a BRET jel növekedését tapasztaljuk.

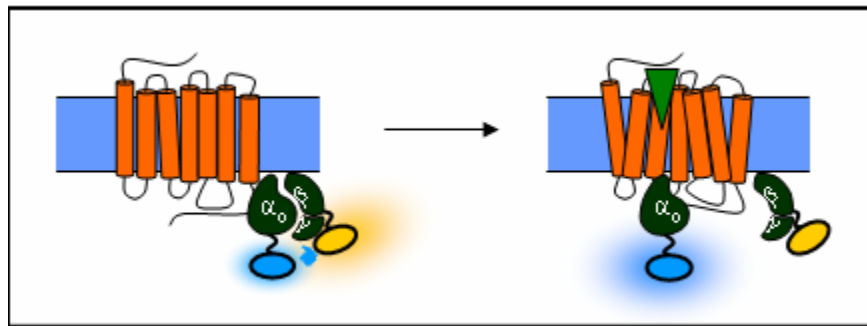
A módszer további alkalmazási lehetősége a sejtélettani kutatásokban, hogy az egyik BRET partnert valamilyen sejtstruktúrához vagy meghatározott sejtstruktúrához (pl. plazmamembrán, endoplazmás retikulum, endoszóma stb.) irányítjuk, specifikus szekvenciák segítségével. Ebben az esetben egy másik fehérje kölcsönhatását vizsgálhatjuk az adott struktúrával (közeledés-távolodás, sejten belüli mozgások stb.). A kialakuló BRET jelet itt nem a fehérjék közti specifikus interakció eredményezi, csupán a BRET partnerek között fellépő találkozások valószínűsége növekszik meg, amennyiben ugyanabban a sejt-kompartimentben foglalnak helyet (ún. nem-specifikus BRET).

További felhasználási módot jelent a BRET-alapú bioszenzor molekulák kifejlesztése. Ennek során a BRET donor és akceptor egy fehérjeláncon belül helyezkedik el. Amennyiben a szenzorfehérje az adott sejt-funkció, másodlagos hírvivő, kémiai változás, stb. megjelenésére konformációváltozással reagál, azt a donor és akceptor távolságának, illetve orientációjának megváltozása is követi, amelyet a BRET jel változásaként detektálhatunk.

A következőkben ismertetem a munkánk során alkalmazott BRET kísérleti felállásokat, a jelölt fehérjéket, illetve a pontos kísérleti körülményeket.

#### 4.4.2. G<sub>o</sub>-fehérje BRET

A CB<sub>1</sub>R G<sub>o</sub>-fehérje aktiválását mérő BRET beállítás esetén a sejteket Rluc-cal jelölt  $\alpha_o$  alegységgel ( $\alpha_o$ -Rluc, 0,5  $\mu$ g/pont), YFP-vel jelölt  $\beta_1$  alegységgel (YFP- $\beta_1$ , 2  $\mu$ g/pont), valamint  $\gamma_{11}$  alegységgel (2  $\mu$ g/pont), illetve a (jelöletlen) receptorral (2  $\mu$ g/pont) transzfektáltuk (11. ábra). 22-26 órával később a sejtek letapadását PBS-EDTA-val megszüntettük, a sejteket összegyűjtöttük, lecentrifugáltuk majd reszuszpendáltuk egy módosított Krebs-Ringer oldatban (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glükóz, 0,1% BSA és 10 mM Na-HEPES, pH 7,4), ezt követően pedig szétoztottuk őket egy 96-lyukú tálca pontjaira.



11. ábra A kísérleteinkben alkalmazott G<sub>o</sub>-fehérje BRET működési elve

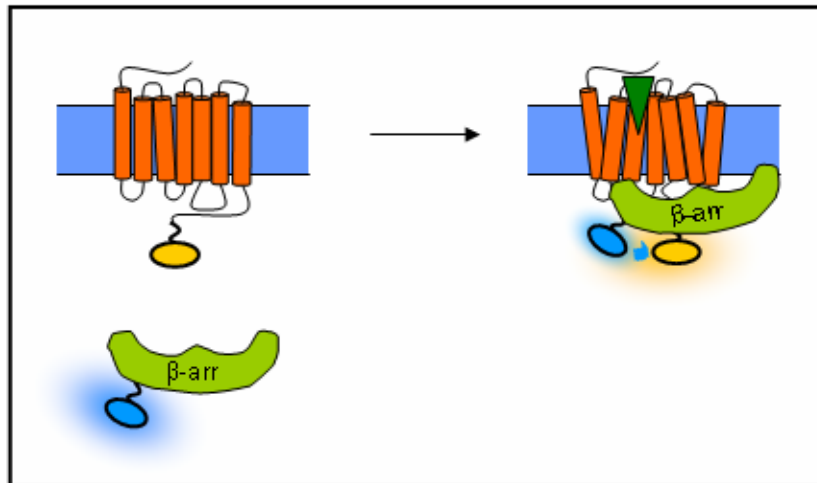
A kísérletek során a heterotrimer G<sub>o</sub> fehérje alegységeinek szétválását követtük: BRET-et mértünk az Rluc-cal jelölt  $\alpha_o$ , ill. a YFP-vel jelölt  $\beta\gamma$  alegységek között. Ilyen kísérleti felállás esetén a receptorok inaktív állapotában magas BRET jelet mérünk, míg a BRET jel csökkenése a G<sub>o</sub>-fehérje alegységeinek szétválását, azaz a receptor aktiválódását jelzi.

A méréseket 37°C-on végeztük, a sejt-permeábilis szubsztátat coelenterazin h hozzáadását követően, melynek végső koncentrációja 5  $\mu$ M volt. A fluoreszcencia és biolumineszcencia intenzitásokat Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Németország) típusú leolvasóval rögzítettük, 485 nm-es (Rluc), illetve 530 nm-es (YFP) hullámhosszú szűrőket használva. A BRET jelet az YFP/Rluc emissziós hányadossal fejeztük ki. A méréseket triplikátumokban végeztük. A dózis-hatás görbék egyes pontjait úgy határoztuk meg, hogy először kiszámoltuk a stimulálás előtti BRET jel átlagának,

illetve a stimulálást követő 1-3 perc BRET jel átlagának különbségét. Ezeket az adatokat azután egy %-os skálává alakítottuk át, ahol a 0%-ot (teljes inaktivitást) az inverz agonista AM251 kezelés hatására kialakuló BRET jelként definiáltuk, a 100%-ot (maximális aktivitást) pedig a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55-re adott válaszaként határoztuk meg.

#### 4.4.3. $\beta$ -arresztin BRET

A vad típusú CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2 kötését vizsgáló kísérletekben az mVenus-szal jelölt receptor és a Rluc-cal jelölt  $\beta$ -arresztinek között mértünk BRET-et (12. ábra).



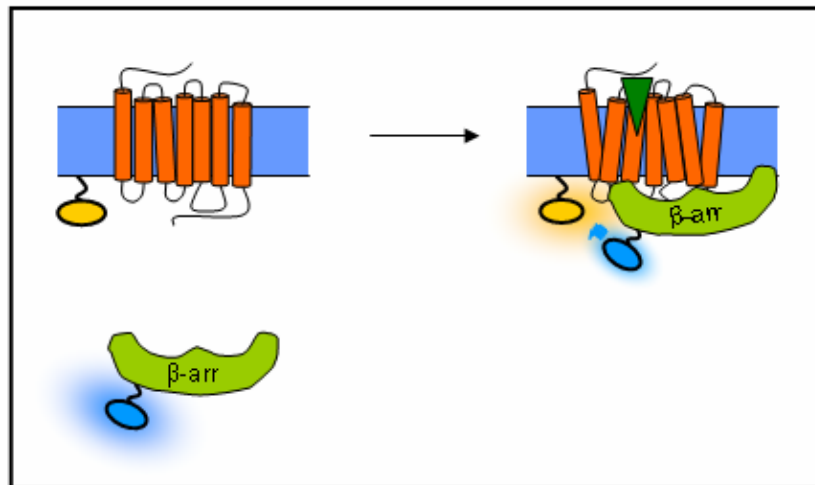
12. ábra A kísérleteinkben alkalmazott  $\beta$ -arresztin-receptor BRET működési elve

A kísérletek során a  $\beta$ -arresztin és a receptor közötti kapcsolódást követtük: BRET-et mértünk az Rluc-cal jelölt  $\beta$ -arr1 vagy  $\beta$ -arr2, ill. az mVenus-szal jelölt receptor között. Aktiválódást követően a  $\beta$ -arresztin kötődik a receptorhoz, amit a BRET jel emelkedése jelez.

Ennek során a sejteket a jelzett  $\beta$ -arresztin konstrukcióval (0,5  $\mu$ g/pont) és a receptor konstrukcióval (1  $\mu$ g/pont) transzfektáltuk, a mérést pedig a transzfekciót követő napon végeztük, a G-fehérje BRET-nél leírt körülmények között. A görbéken a BRET jel változásait a stimulálást megelőző BRET jelhez képesti különbségként ábrázoltuk. Minden görbét a csupán vivőanyagot kapott sejtek eredményeire normalizáltunk.

A receptorok és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat affinitását vizsgáló BRET titrációs mérések során a fenti konstrukciókkal transzfektáltuk a sejteket, változtatva a donor ( $\beta$ -arr1-Rluc vagy  $\beta$ -arr2-Rluc), illetve az akceptor (CB<sub>1</sub>R-mVenus,  $\beta$ <sub>2</sub>AR-mVenus vagy AT<sub>1</sub>R-mVenus) transzfekciós arányát. A teljes transzfektált DNS mennyiséget változó mennyiségű üres pcDNA3.1 vektor hozzáadásával állandó szinten (2,5  $\mu$ g/pont) tartottuk. Ebben az esetben az mVenus/Rluc emissziós hányadost úgy határoztuk meg a kísérletekben, hogy elosztottuk az átlagos mVenus fluoreszcencia-intenzitást (melyet a coelenterazin h hozzáadása előtt mértünk, 485 nm-es excitációs és 530 nm-es emissziós hullámhosszal) az átlagos Rluc lumineszcencia-intenzitással (melyet a coelenterazin h hozzáadása után mértünk, a sejtek serkentése előtt). Ennek a hányadosnak a függvényében ábrázoltuk az átlagos BRET jel változást 3-5 perccel az agonista stimulust követően. A G-fehérje BRET-hez hasonlóan minden mérést triplikátumban végeztünk, és az ábrázolt pontok legalább három független kísérletből származnak.

A különböző DRY mutáns CB<sub>1</sub>R-ok  $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2 kötésének vizsgálatakor a BRET-et a plazmamembránhoz irányított mVenus (MP-mVenus), valamint a  $\beta$ -arr2-Rluc között mértük, a jelöletlen receptor együttes transzfekciója mellett (13. ábra).



13. ábra A kísérleteinkben alkalmazott  $\beta$ -arresztin-MP BRET működési elve

A kísérletek során a  $\beta$ -arresztin és a receptor közötti kapcsolódást közvetett módon követtük: a BRET-et az Rluc-cal jelölt  $\beta$ -arr1 vagy  $\beta$ -arr2, illetve a plazmamembránhoz irányított mVenus (MP-mVenus) között

mértük. Aktiválódást követően a  $\beta$ -arresztin kötődik a receptorhoz, ezáltal a plazmamembránhoz helyeződik ki, ami a BRET jel emelkedését eredményezi.

Ennek során a sejteket a jelzett  $\beta$ -arresztin konstrukcióval (0,5  $\mu\text{g/pont}$ ), az MP-mVenus konstrukcióval (0,25  $\mu\text{g/pont}$ ) és a jelöletlen receptor konstrukcióval (2  $\mu\text{g/pont}$ ) transzfektáltuk, a mérést pedig a transzfekciót követő napon végeztük, a G-fehérje BRET-nél leírt körülmények között. A dózis-hatás görbék egyes pontjait úgy határoztuk meg, hogy először kiszámoltuk a stimulálás előtti BRET jel átlagának, illetve a stimulálás követő 5-20 perc BRET jel átlagának különbségét. Ezeket az adatokat azután egy százalékos skálává alakítottuk át, a fent leírtakhoz hasonló módon. A  $\beta$ -arr1 BRET esetében a 100%-ot a vad típusú  $\text{CB}_1\text{R}$  helyett a  $\text{CB}_1\text{R-AAV}$  mutáns maximális WIN55, ill. 2-AG által kiváltott válaszként határoztuk meg.

#### 4.4.4. Receptor-plazmamembrán BRET

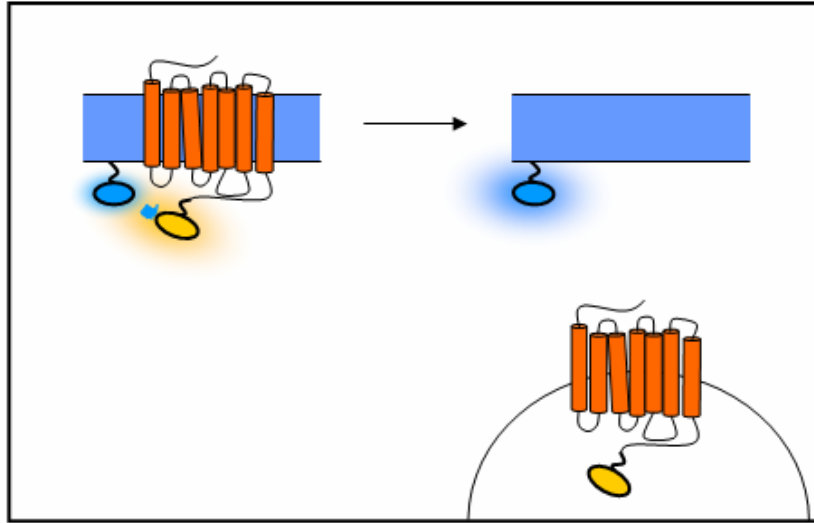
A  $\text{CB}_1\text{R}$  variánsok plazmamembránon való elhelyezkedésének vizsgálatokor a BRET-et a plazmamembránhoz irányított Sluc, valamint az mVenus-szal jelölt receptor között mértük, a sejtek nem-stimulált állapotában (14. ábra). Ennek során a sejteket MP-Sluc konstrukcióval (0,25  $\mu\text{g/pont}$ ) és  $\text{CB}_1\text{R-mVenus}$  variánsokkal (2  $\mu\text{g/pont}$ ) transzfektáltuk, a mérést pedig a transzfekciót követő napon végeztük, a G-fehérje BRET-nél leírt körülmények között.

A PM/összes receptor BRET értékét a következő képlettel számoltuk ki:

$$BRET_{PM / \text{összes rec}} = \frac{BRET - BRET_{\text{csak Sluc}}}{\frac{I_{\text{Venus}}}{I_{\text{Sluc}}}}, \text{ ahol a BRET a nyers BRET hányadost jelenti az}$$

MP-Sluc-ot és  $\text{CB}_1\text{R-mVenus}$  kifejező sejtekben (ami a nyers plazmamembrán-receptor BRET kölcsönhatást tükrözi); a  $BRET_{\text{csak Sluc}}$  a nyers BRET hányadost jelenti az MP-Sluc-ot és *jelöletlen*  $\text{CB}_1\text{R-t}$  kifejező sejtekben (ami a háttér BRET jelet mutatja). Az  $I_{\text{Venus}}$  az átlagos mVenus fluoreszcencia-intenzitás, a coelenterazin hozzáadása előtt mérve, 485 nm-es excitációval és 530 nm-es emisszióval (ami a teljes receptorexpressziót mutatja); az  $I_{\text{Sluc}}$

pedig az átlagos Sluc biolumineszcencia-intenzitás, a coelenterazin hozzáadása után mérve, 530 nm-es emisszióval (ami a receptorexpresszióhoz tartozó belső kontrollt jelenti). Az adatokat a vad típusú receptor %-ában fejeztük ki.

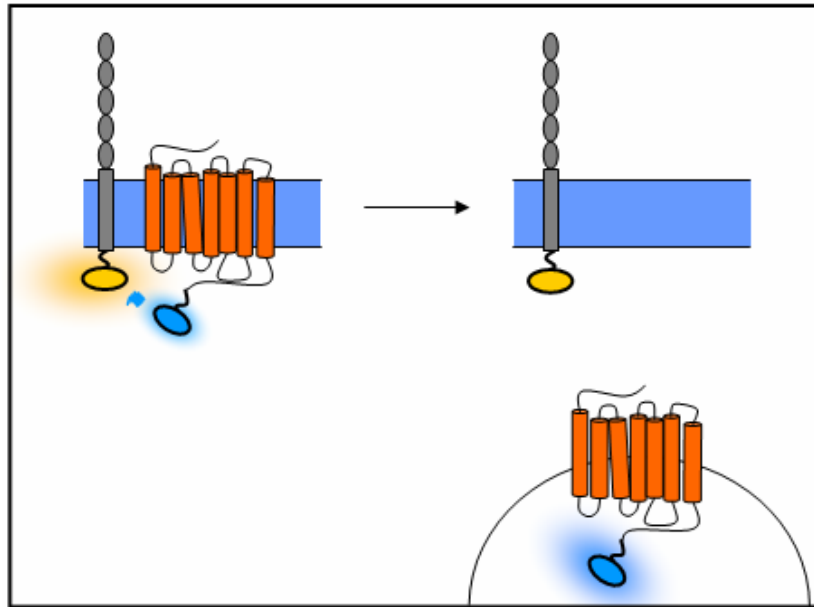


14. ábra A kísérleteinkben alkalmazott receptor-MP BRET működési elve

A kísérletek során a receptorok plazmamembránon való elhelyezkedését követtük: BRET-et mértünk a plazmamembránhoz irányított Sluc és a mVenus-szal jelölt receptor között. Megfelelő normalizálásokat követően (ld. a módszer leírásánál) a kapott BRET érték arányos a plazmamembránon elhelyezkedő receptorok mennyiségével.

#### 4.4.5. Internalizációs BRET

A CB<sub>1</sub>R internalizációjának követésére az Sluc-cal jelölt CB<sub>1</sub>R és az eYFP-vel jelölt ICAM-1 plazmamembrán-fehérje között mértünk BRET-et (15. ábra). Ennek során a sejteket a CB<sub>1</sub>R-Sluc-cal (1 µg/pont), az ICAM-YFP-vel (3 µg/pont), illetve a jelzett β-arr2 konstrukcióval (0,5 µg/pont) vagy siRNS-sel (25 pmol/pont) transzfektáltuk, a mérést pedig a transzfekciót követő első vagy (siRNS kotranszfekció esetén) második napon végeztük, a G-fehérje BRET-nél leírt körülmények között. A görbéken a BRET jel változásait a stimulálást megelőző BRET jelhez képest kapott különbségként ábrázoltuk. Minden görbét a csupán vivőanyagot kapott sejtek eredményeire normalizáltunk.

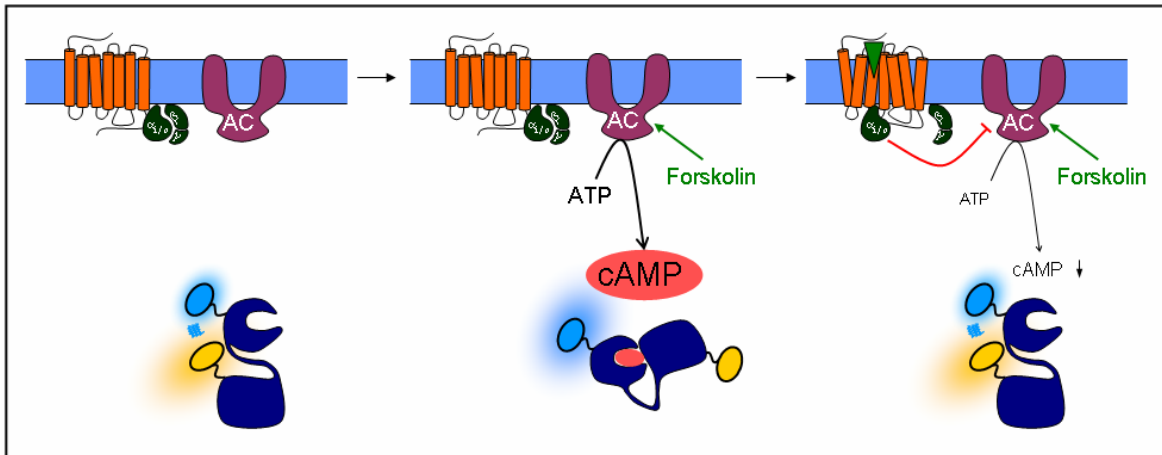


15. ábra A kísérleteinkben alkalmazott receptor-ICAM BRET működési elve

A kísérletek során a receptorok plazmamembránról való eltávolítását, azaz internalizációját követtük: BRET-et mértünk az Sluc-cal jelölt receptor és a YFP-vel jelölt ICAM-1 plazmamembránfehérje között. A receptor plazmamembrántól való eltávolodását a BRET jel csökkenése mutatja.

#### 4.4.6. cAMP (EPAC) BRET

A különböző CB<sub>1</sub>R variánsok hatását a forskolin-indukált cAMP emelkedésre egy intramolekuláris BRET szenzor, az EPAC-BRET segítségével követtük (16. ábra). Ennek során a sejteket az EPAC-BRET szenzorral (1 µg/pont) és a (jelöletlen) receptorral (10 ng/pont) transzfektáltuk, a mérést pedig a transzfekciót követő napon végeztük, a G-fehérje BRET-nél leírt körülmények között. A méréseket triplikátumokban végeztük. A sejteket a CB<sub>1</sub>R liganddal (vagy vivőanyaggal) és 5 µM forskolinnal egyszerre kezeltük. A relatív cAMP szinteket a 30 perccel a serkentés utáni átlagos BRET jelként határoztuk meg. Ezeket az adatokat ugyancsak százalékos skálává alakítottuk át, a fent leírt módon.



16. ábra A kísérleteinkben alkalmazott cAMP (EPAC) BRET működési elve

A kísérletek során a sejten belüli cAMP szint változásait követtük az EPAC BRET szenzor segítségével, amely egy intramolekuláris BRET szenzor, azaz egy molekulán belül tartalmazza az Sluc és Venus jelöléseket. A sejtek nyugalmi állapotában (alacsony cAMP szint mellett) a szenzor magas BRET jelet mutat. Az adenilát-cikláz (AC) enzim forskolinnal történő aktivációja megemeli a cAMP szintet, ami a BRET jel csökkenéséhez vezet. A receptor  $G_{i/o}$ -fehérje aktivációja gátolja az adenilát-cikláz, azaz ellensúlyozza a forskolin hatását, a cAMP szint csökken, a BRET jel növekszik. Összességében tehát ebben a rendszerben a receptorok  $G_{i/o}$  aktivációját a BRET jel emelkedése jelzi.

#### 4.5. Konfokális lézermikroszkópia

A konfokális mikroszkópos mérésekhez a sejteket üveg fedőlemezen növesztettük és a receptorok (1  $\mu\text{g}/\text{pont}$ ), illetve a  $\beta$ -arr1 vagy -2 (0,5  $\mu\text{g}/\text{pont}$ ) megfelelően jelzett konstrukcióival, illetve siRNS-sel (25 pmol/pont, ahol jelezzük) transzfektáltuk, egy vagy (siRNS kotranszfekció esetén) két nappal a méréseket megelőzően. A méréseket Zeiss LSM 510 és Zeiss LSM 710 lézer konfokális mikroszkóppal végeztük. Az eGFP-t (ill. a Halo-Alexa488-at) 488 nm-es, az mVenus-t 514 nm-es, az mCherry-t (ill. az RFP-t) pedig 543 nm-es hullámhosszú lézerrel gerjesztettük. A Halo- $\text{CB}_1\text{R}$  internalizációjának számszerűsítéskor mintánként 20-20 felvételt készítettünk különálló sejtekről, majd a képeken meghatároztuk az intracelluláris és a teljes sejt fluoreszcenciát, az ImageJ program segítségével. (W.S. Rasband, ImageJ, United States National Institutes of Health, Bethesda, MD ([rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/))) A két érték hányadosát képezve kaptuk az IC/teljes sejt

fluoreszcencia arányt. A minták fényképezését és elemzését vakon végeztük, hogy elkerüljünk bármiféle elfogultságot az internalizációs adatok kiértékelése során.

#### ***4.6. Halo-jelölés, jelölési protokollok***

A Halo-jelölési technika azon alapul, hogy a vizsgálni kívánt fehérjéhez egy módosított bakteriális dehalogenáz enzimet, a HaloTag® fehérjét fúzionálunk. Ha a fehérjét kifejező sejtekhez hozzáadjuk az enzim fluoreszcensen jelölt szubsztrátját (Halo-Alexa488 ligand), az részleges átalakulást követően kovalensen kötődik a HaloTag®-hez. Ezen keresztül a fluoreszcens ligand vizsgált fehérjét is megjelöli, így annak mozgása (esetünkben internalizációja) megfelelő képalkotó technikával követhetővé válik.

A receptorok agonista-indukált internalizációjának méréséhez a Halo-CB<sub>1</sub>R-ral transzfektált sejteket először 15 percig festettük a Halo-Alexa488 liganddal (amelyet DMEM médiumban, 1:20000 hígításban adtunk a sejtekhez, és 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> mellett inkubáltuk őket). A festést követően a sejteket DMEM-mel kétszer lemostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött Halo-Alexa488-at, majd a sejteket DMSO-val, WIN55-tel (10 µM) vagy WIN55 + AM251-gyel (10 µM + 30 µM, rendre) kezeltük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett 30 percig. A stimulációs periódus végén a sejteket kétszer lemostuk PBS-sel, és 4%-os formaldehiddel fixáltuk őket 4°C-on 15 percig. A fixált sejteket konfokális mikroszkóppal elemeztük a fent leírt módon.

A receptorok konstitutív internalizációjának méréséhez a Halo-CB<sub>1</sub>R-ral transzfektált sejteket először 15 percig festettük a Halo-Alexa488 liganddal (amelyet DMEM médiumban, 1:20000 hígításban adtunk a sejtekhez, és 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> mellett inkubáltuk őket). A festést követően a sejteket kétszer DMEM-mel lemostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött Halo-Alexa488-at, majd a sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett 5 óra 45 percig inkubáltuk, további kezelés nélkül, illetve DMSO, WIN55 (10 µM) vagy AM251 (30 µM) jelenlétében. Azért, hogy az siRNS transzfekció hatékonyságát a 6 órás inkubációs periódus során is kontrollálhassuk, párhuzamos mintákat is indítottunk, és hasonló mosási lépéseknek tettük ki őket. E mintákat azonban a mérés kezdetén még nem

festettük meg Halo-Alexa488-cal. Ehelyett ezeket a sejteket egy „agonista-indukált” protokollnak vetettük alá (15 perc festés + 30 perc WIN55 stimulus, lásd fent), 45 perccel a kísérlet vége előtt. A 6 órás periódus végén együtt, valamennyi mintát kétszer lemostuk PBS-sel, és 4%-os formaldehiddel fixáltuk őket 4°C-on 15 percig. A fixált sejteket konfokális mikroszkóppal elemeztük, a fent leírt módon.

## **4.7. Western blot mérések**

### **4.7.1. $\beta$ -arr2 és klatrin nehézlánc Western blot**

A  $\beta$ -arr2 Western blot analíziséhez a sejteket 6-lyukú tálcákon transzfektáltuk, párhuzamosan a konfokális mérésekhez használt sejtekkel (a használt plazmidok mennyiségét lásd ott). A kísérlet napján a sejteket jégre helyeztük, jéghideg PBS-sel lemostuk, SDS mintapufferben felkapartuk, röviden szonikáltuk, 95°C-on 5 percig főztük, majd 4°C-on 10 percig centrifugáltuk, és SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. A fehérjéket PVDF membránokra blottoltuk át, majd a membránokat blokkoltuk (30 percig szobahőmérsékleten, 5%-os zsírszegény tejporthoz és 0,05%-os Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (PBST-ben)). Továbbá inkubáltuk az elsődleges antitesttel (1 óráig, 1:1000 hígítású nyúlból származó anti- $\beta$ -arr2 antitesttel vagy 1:4000 hígítású egérből származó anti-klatrin nehézlánc antitesttel, 5%-os zsírszegény tejporthoz tartalmazó PBST-ben), majd a másodlagos antitesttel (30 percig, 1:2000 hígítású HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér antitesttel, 5%-os zsírszegény tejporthoz tartalmazó PBST-ben). Azért, hogy a mintákban a teljes fehérjemennyiséget kontrollálni tudjuk, az antitesteket egy standard *stripping* puffer segítségével eltávolítottuk, és egy második immunfestési eljárást alkalmaztunk, egérből származó anti- $\beta$ -aktin elsődleges antitesttel (1 óráig, 1:10000 hígításban), illetve HRP-konjugált anti-egér másodlagos antitesttel (30 percig, 1:10000 hígításban). Az antitesteket SuperSignal West Pico reagens (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) segítségével tettük láthatóvá, a gyártó utasításait követve. A Western blot felvételeket beszkeneltük, és az ImageJ program segítségével kvantifikáltuk. A  $\beta$ -aktin szintekben kialakult változásokat

használtuk a  $\beta$ -arr2, illetve a klatrin nehézlánc szintekben létrejött változások normalizálására.

#### **4.7.2. pERK1/2 Western blot**

A pERK1/2 Western blot mérésekhez a sejteket 6-lyukú tálcákra transzfektáltuk a különböző CB<sub>1</sub>R mutánsokkal (2  $\mu$ g/pont). 22-26 órával később a sejteket 2 óras szérummegvonásnak vetettük alá, majd WIN55,212-2-vel kezeltük a jelzett ideig, ezt követően pedig jégre helyeztük és jéghideg PBS-sel kétszer lemostuk. A továbbiakban a Western blot mérést a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük el, a következő antitestekkel: egér anti-pERK1/2 vagy nyúl anti-ERK1/2 elsődleges antitest (1 óra, 1:500-as vagy 1:1000-es hígítás, rendre), illetve HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitest (30 perc, 1:5000-es hígítás mindkét esetben). Az antitesteket az Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, MA) segítségével tettük láthatóvá, ismét a gyártó utasításait követve. A Western blot felvételeket beszkeneltük, és az ImageJ program segítségével kvantifikáltuk.

#### ***4.8. Az adatok elemzése és statisztikai kiértékelés***

A kotranszfektált siRNS internalizációra gyakorolt hatásait, a cAMP (EPAC) BRET-ből származó adatokat, valamint a számszerűsített pERK1/2 Western blot adatokat kétszemponos variancia-analízissel (Holm-Sidak-féle post-hoc teszttel kombinálva) értékeltük, a SigmaStat for Windows 3.5 (Systat Software Inc., Richmond, CA) program segítségével. A G-fehérje és  $\beta$ -arresztin BRET dózis-hatás görbék illesztését és statisztikai összehasonlítását a GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) program beépített algoritmusainak segítségével végeztük. A szignifikancia-küszöböt  $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

Az elfogult jelátvitel értékeléséhez használt ekvimoláris összehasonlítást így készítettük: a G-fehérje és a  $\beta$ -arr2 BRET dózis-hatás görbék azonos koncentrációkhoz

tartozó pontjait (így a két görbe -8 (csak WIN55 esetén), -7,5, -7, -6,5, -6, -5,5 és -5 (csak 2-AG-nál)  $\log[\text{WIN55}]$  vagy  $\log[2\text{-AG}]$  (M) koncentrációkhoz tartozó pontokat) egymás függvényében ábrázoltuk, ugyanazon receptor esetében.

Az “ekviaktív” összehasonlítást úgy végeztük, hogy meghatároztuk az „elfogultsági együtthatót” (*bias factor*,  $\beta$ ), a következő egyenletet használva:

$$\beta = \log \left( \left( \frac{E_{\max,1}}{EC_{50,1}} \frac{EC_{50,2}}{E_{\max,2}} \right)_{mut} \times \left( \frac{E_{\max,2}}{EC_{50,2}} \frac{EC_{50,1}}{E_{\max,1}} \right)_{ref} \right) \quad [220],$$

ahol az  $E_{\max,1}$ ,  $EC_{50,1}$ ,  $E_{\max,2}$  és az  $EC_{50,2}$  jelölések a G-fehérje és a  $\beta$ -arresztin BRET dózis-hatás görbékből származó  $E_{\max}$  és  $EC_{50}$  értékeket jelentik ugyanazon receptor esetében, a vad típusú CB<sub>1</sub>R-t referenciareceptorként használva.

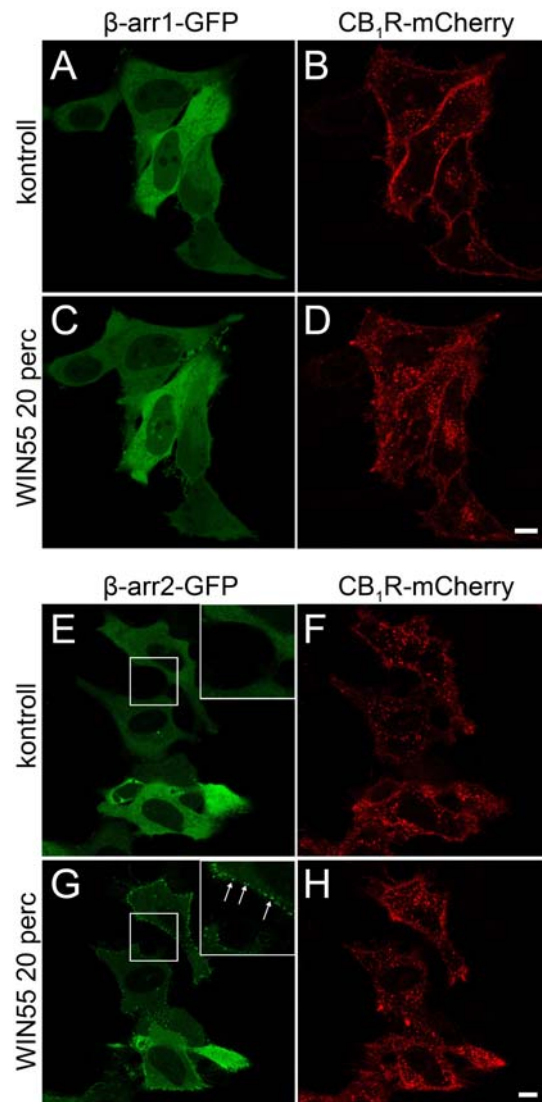
Amennyiben másként nem jeleztük, az adatokat mindenhol átlag  $\pm$ SEM formában ábrázoltuk.

## 5. Eredmények

### *5.1. A CB<sub>1</sub>R és a $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat jellemzése*

#### **5.1.1. A CB<sub>1</sub>R és a $\beta$ -arresztinek kapcsolatának vizsgálata konfokális mikroszkóppal**

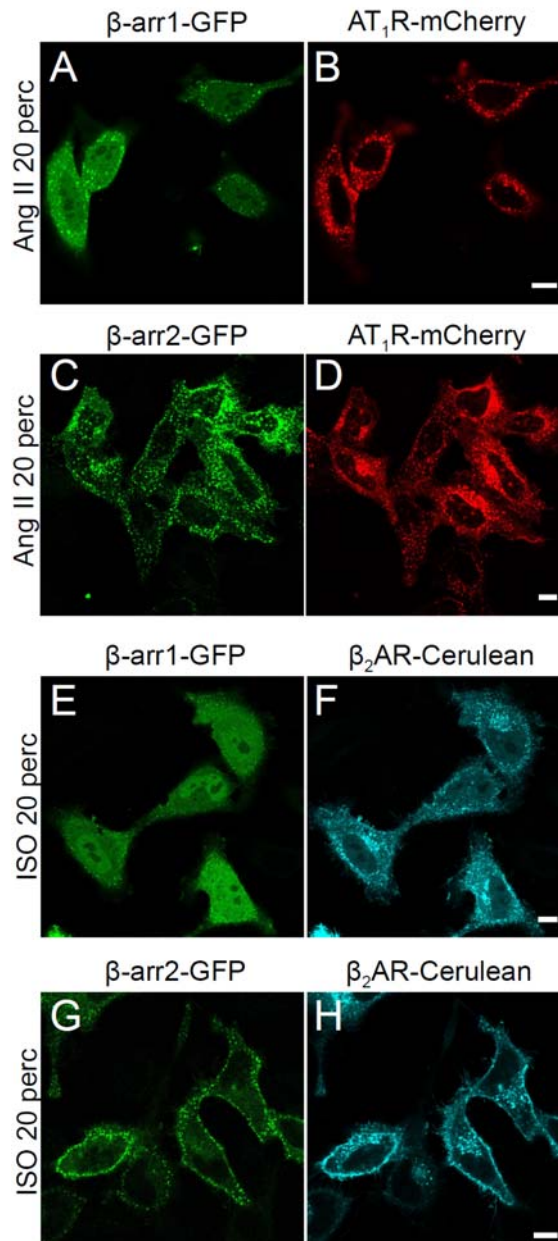
A CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat jellemzéséhez először a fehérjék fluoreszcensen jelölt formáit vizsgáltuk konfokális mikroszkóp segítségével. HeLa sejteket transziensen transzfektáltunk mCherry-vel jelölt CB<sub>1</sub>R-ral (CB<sub>1</sub>R-mCherry) és eGFP-vel jelölt  $\beta$ -arr1-gyel vagy  $\beta$ -arr2-vel ( $\beta$ -arr1-GFP vagy  $\beta$ -arr2-GFP). Ezekben a sejtekben a CB<sub>1</sub>R-mCherry nyugalmi körülmények között jelen volt a plazmamembránon, csakúgy mint intracelluláris vezikulumokban. Ez az eloszlás megfelel a CB<sub>1</sub>R jól ismert konstitutív internalizációjának (17. ábra, B és F). Ugyanezekben a sejtekben a  $\beta$ -arr1-GFP és a  $\beta$ -arr2-GFP diffúz citoplazmatikus (továbbá a  $\beta$ -arr1-GFP esetében sejtmagi) elhelyezkedést mutatott, és sem a plazmamembránon, sem pedig intracelluláris vezikulumokban nem volt észlelhető (17. ábra, A és E). Kísérleteinkben WIN55-tel (10  $\mu$ M) történő stimulációt követően a  $\beta$ -arr2-GFP esetében pár percen belül markáns átrendeződést figyeltünk meg, a fehérje pontozott struktúrákban jelent meg a plazmamembránnál. (A WIN55 a CB<sub>1</sub>R szintetikus teljes agonistája, amely kémiai szerkezetét tekintve eltér az endogén kannabinoidoktól, a sejtek környezetében nem bomlik le és nem alakul át, így elterjedten használják a CB<sub>1</sub>R-ral kapcsolatos kutatásokban.) Ugyanakkor a citoplazma belsőbb (plazmamembrántól távolabb eső) területein nem jelentek meg  $\beta$ -arr2-GFP-tartalmú vezikulumok, még hosszabb (20 perces) stimulálást követően sem (17. ábra, G). A  $\beta$ -arr2-GFP-vel ellentétben a  $\beta$ -arr1-GFP nem mutatott semmilyen átrendeződést a WIN55 hatására, még tartós (20 perces) serkentés esetén sem (17. ábra, C).



**17. ábra A konfokális mikroszkópos elemzés a  $\text{CB}_1\text{R}$  „A” osztályú  $\beta$ -arresztin kötési mintázatára utal**

$\beta$ -arr1-GFP-t (A-D) vagy  $\beta$ -arr2-GFP-t (E-H)  $\text{CB}_1\text{R-mCherry}$ vel együtt kifejező HeLa sejteket elemeztünk konfokális mikroszkóppal. Nyugalmi körülmények között a  $\beta$ -arr1-GFP diffúz citoplazmatikus és sejtmagi elhelyezkedést mutat (A). 20 perces WIN55 (10  $\mu\text{M}$ ) kezelést követően nem észlelhető változás a  $\beta$ -arr1-GFP eloszlásában (C). A  $\beta$ -arr2-GFP diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutat kontroll sejtekben (E, nagyított kép). 20 perces WIN55 (10  $\mu\text{M}$ ) kezelést követően a  $\beta$ -arr2-GFP-t pontszerű struktúrákban láthatjuk, de csupán a plazmamembrán közvetlen közelében (G, nagyított kép, a nyilak  $\beta$ -arr2-GFP pontokra mutatnak). A  $\text{CB}_1\text{R-mCherry}$  nagy része konstitutívan a sejtben belül helyezkedik el (B, D, F, H). Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10  $\mu\text{m}$ .

Hogy kizárjuk a jelölt  $\beta$ -arresztin konstrukciók esetleges hibájából adódó tévedési lehetőséget, megvizsgáltuk ugyanebben a rendszerben a Ceruleannal jelölt  $\beta_2$ AR ( $\beta_2$ AR-Cerulean) és az mCherry-vel jelölt AT<sub>1</sub>R (AT<sub>1</sub>R-mCherry)  $\beta$ -arresztin kötését, mivel ezek a receptorok az „A” osztályú ( $\beta_2$ AR), illetve „B” osztályú (AT<sub>1</sub>R)  $\beta$ -arresztin kötési prototípusainak tekinthetők, és így referenciaként használhatók [107]. A vizsgált két receptor a mi rendszerünkben is az irodalomból ismertnek megfelelő  $\beta$ -arresztin kötési mintázatot mutatott, azaz a  $\beta_2$ AR-Cerulean mindkét izoformát csak a plazmamembránál kötötte, míg az AT<sub>1</sub>R-mCherry nagy affinitással kapcsolódott hozzájuk, és mind a  $\beta$ -arr1-GFP, mind a  $\beta$ -arr2-GFP megjelent a receptorral együtt az endoszomális vezikulumokban (18. ábra, A-H). (A serkentést megelőzően ezekben a kísérletekben is mindkét  $\beta$ -arresztin izoforma diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott – az adatokat nem mutatjuk.)

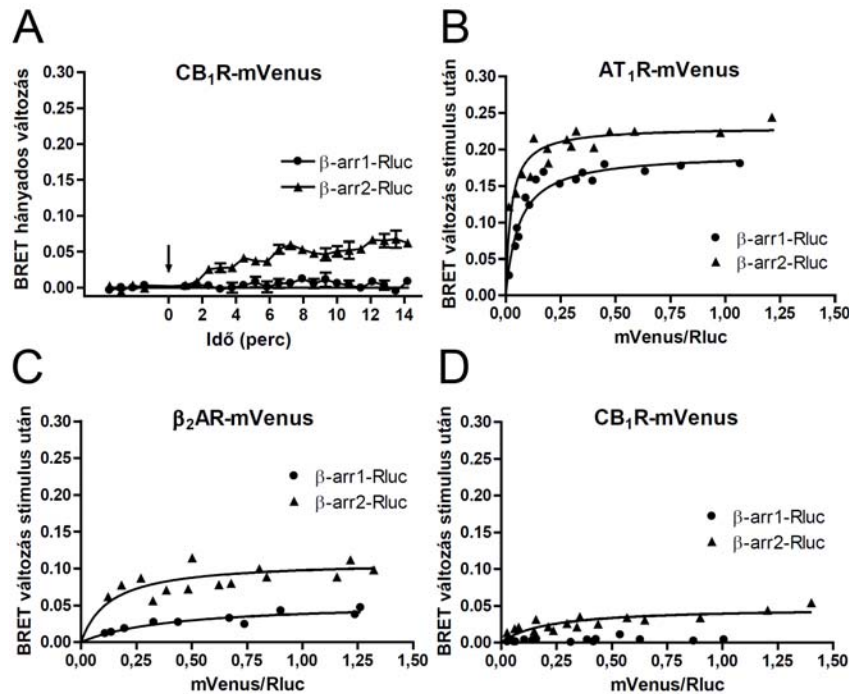


**18. ábra Az AT<sub>1</sub>R és a β<sub>2</sub>AR β-arresztin kötését mutató konfokális mikroszkópos elemzés**

β-arr1-GFP-t (A, B, E, F) vagy β-arr2-GFP-t (C, D, G, H) AT<sub>1</sub>R-mCherryvel (A-D) vagy β<sub>2</sub>AR-Ceruleannal (E-H) együtt kifejező HeLa sejteket elemeztünk konfokális mikroszkóppal. Az AT<sub>1</sub>R-mCherryt kifejező sejtekben mind a β-arr1-GFP, mind a β-arr2-GFP megtalálható volt intracelluláris vezikulumokban 20 perces Ang II (100 nM) kezelést követően (A, C). A β<sub>2</sub>AR-Ceruleant kifejező sejtekben a β-arr1-GFP és a β-arr2-GFP a plazmamembránál, pontokban helyezkedett el 20 perces isoproterenol (ISO, 1 μM) kezelést követően (E, G). Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10 μm.

### 5.1.2. A CB<sub>1</sub>R és a $\beta$ -arresztinek kapcsolatának vizsgálata BRET módszerrel

A BRET módszer előnye, hogy általában a konfokális mikroszkópnál nagyobb érzékenységgel képes detektálni a fehérjék közötti specifikus kapcsolatot. Ezért a továbbiakban a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolatot megpróbáltuk kimutatni BRET módszerrel is (ld. 12. ábra). A BRET-et a Renilla luciferázzal jelölt  $\beta$ -arr1 vagy  $\beta$ -arr2 ( $\beta$ -arr1-Rluc vagy  $\beta$ -arr2-Rluc) és az mVenus-szal jelölt CB<sub>1</sub>R (CB<sub>1</sub>R-mVenus) között mértük tranziensen transzfektált HeLa sejtekben. A sejtek WIN55-tel (10  $\mu$ M) történő serkentése a BRET jel emelkedéséhez vezetett, amennyiben a CB<sub>1</sub>R-mVenus-t a  $\beta$ -arr2-Rluc-cal együtt fejeztük ki (19. ábra, A), ami a  $\beta$ -arr2-Rluc molekulák CB<sub>1</sub>R-mVenus-hoz való kihelyeződését tükrözi a receptor aktivációját követően. Ezzel szemben ugyanez a stimulus nem okozott jelentős változást a CB<sub>1</sub>R-mVenus és a  $\beta$ -arr1-Rluc között mért BRET jelben (19. ábra, A).



19. ábra A CB<sub>1</sub>R, AT<sub>1</sub>R és  $\beta_2$ AR agonista-indukált  $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2 kötését mutató BRET mérések

A, A CB<sub>1</sub>R-mVenus-t HeLa sejtekben együtt fejeztük ki  $\beta$ -arr1-Rluc-cal vagy  $\beta$ -arr2-Rluc-cal, és az agonista (WIN55, 10  $\mu$ M) hatására létrejövő BRET változásokat mértük. Az adatokat a csak vivőanyagot kapott sejtek

görbéire normalizáltuk (amit a vízszintes vonal jelez). A nyíl az agonista hozzáadásának időpontját jelzi. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk. B-D, BRET titrációs görbék, amelyek az AT<sub>1</sub>R (B), a  $\beta_2$ AR (C) vagy a CB<sub>1</sub>R (D)  $\beta$ -arresztin izoformák iránti relatív affinitásait tükrözik. A HeLa sejteket állandó mennyiségű  $\beta$ -arr1-Rluc vagy  $\beta$ -arr2-Rluc konstrukcióval, valamint változó mennyiségű mVenus-szal jelölt receptorral transzfektáltuk, ami különböző akceptor/donor arányokat eredményezett. Az ábrán az agonistával (100 nM angiotenzin II (B), 1  $\mu$ M izoproterenol (C) vagy 10  $\mu$ M WIN55 (D)) történő serkentést követően 3-5 perccel mért átlagos BRET változásokat tüntettük fel, az mVenus/Rluc intenzitás-hányadosok függvényében (melyet a kísérlet elején mértünk). A legalább három független kísérletből származó pontokra nem-lineáris regresszióval illesztettünk görbét, egy-kötőhelyes kötésre vonatkozó egyenlet felhasználásával.

A két fehérje közötti affinitást még alaposabban meg kívántuk vizsgálni, ezért ún. BRET titrációs méréseket végeztünk. Ezekben a kísérletekben a BRET jelet nem az idő függvényében vizsgáljuk, hanem egy adott időpillanatban (vagy időtartamban) mért BRET jelet ábrázolunk a BRET akceptor/donor fehérjék (itt: mVenus/Rluc) expressziós arányának függvényében. Specifikus interakció esetén (mint amilyen a 7TMR-ok és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat) ez egy telítési görbét eredményez, melynek meredeksége jellemzi a két BRET partner közötti affinitást [221]. Így tehát BRET titrációs görbéket vettünk fel a CB<sub>1</sub>R-mVenus és a  $\beta$ -arr1-Rluc vagy a  $\beta$ -arr2-Rluc esetén, továbbá a korábban alkalmazott referencia-receptorokat is bevontuk a mérésekbe, azaz hasonló görbéket készítettünk a jelölt  $\beta$ -arresztinek és a  $\beta_2$ AR-mVenus vagy az AT<sub>1</sub>R-mVenus között mért BRET alapján is. Amint várható volt, a receptorok serkentését követően felvett BRET titrációs görbék telítési kinetikát mutattak mind az AT<sub>1</sub>R-mVenus, mind a  $\beta_2$ AR-mVenus esetén, mindkét  $\beta$ -arresztin izoforma esetén. Azonban míg az AT<sub>1</sub>R mindkét izoformát nagy affinitással kötötte (19. ábra, B), a  $\beta_2$ AR esetén a  $\beta$ -arr1-Rluc-hoz tartozó görbe jóval kisebb meredekségű volt, mint a  $\beta$ -arr2-Rluc-é (19. ábra C). Az eredmény arra utal, hogy ez a receptor nagyobb affinitással köti a  $\beta$ -arr2-t (azaz „A” osztályú receptor). A CB<sub>1</sub>R-mVenus és a  $\beta$ -arr2-Rluc BRET titrációs görbéje szintén telítési kinetikát mutatott, ennek meredeksége azonban igen kicsi volt. Ezzel szemben a CB<sub>1</sub>R-mVenus és a  $\beta$ -arr1-Rluc között nem volt jelentős BRET jel változás, még magas akceptor/donor arányoknál sem (19. ábra, D). Ebből arra következtethetünk, hogy a CB<sub>1</sub>R a  $\beta$ -arr2-t alacsony affinitással köti, a  $\beta$ -arr1-et pedig ilyen kísérleti körülmények között nem, vagy kimutathatatlanul alacsony mértékben.

## **5.2. A CB<sub>1</sub>R agonista-indukált és konstitutív internalizációjának részletes vizsgálata**

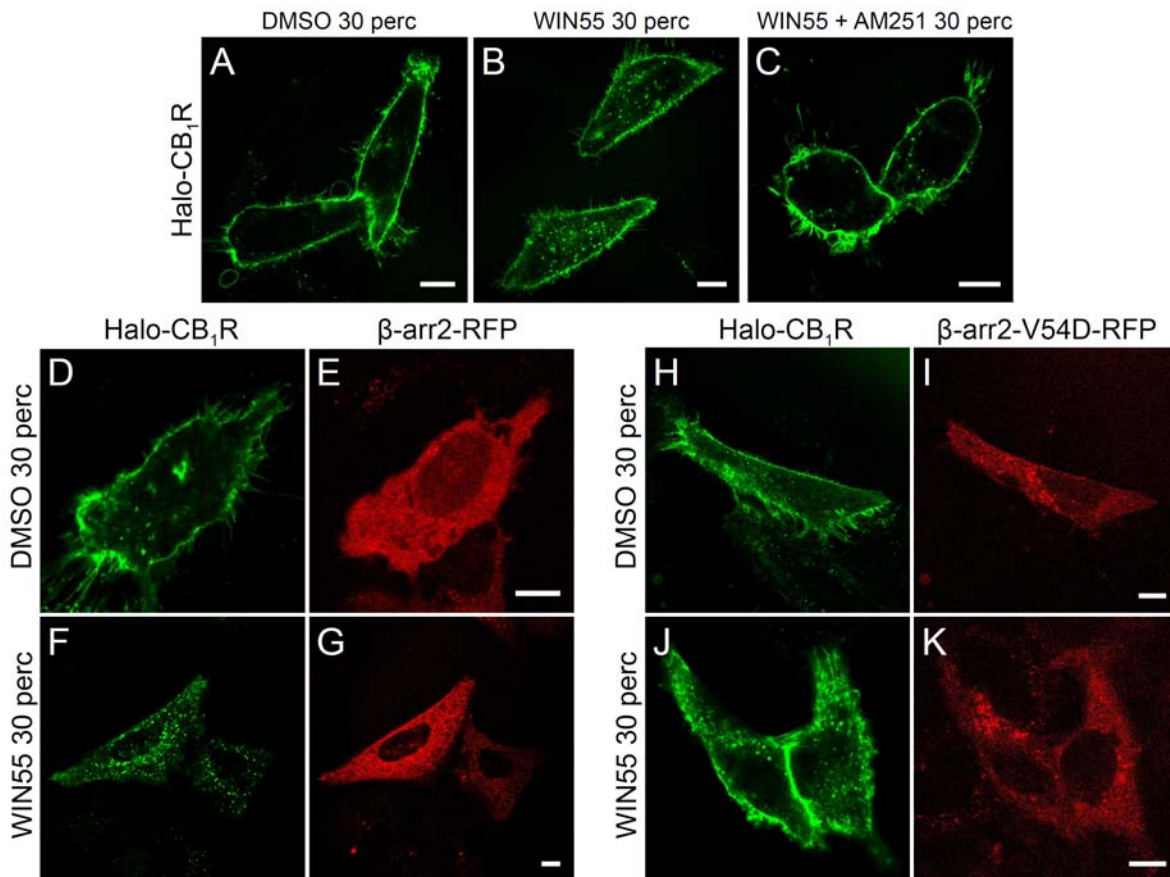
### **5.2.1. A $\beta$ -arr2 szerepének vizsgálata a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációjában**

#### *5.2.1.1. Az agonista-indukált internalizáció vizsgálata a Halo-jelölési technika segítségével*

A továbbiakban a  $\beta$ -arr2-nek a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációjában betöltött szerepét kívántuk közvetlenül vizsgálni. Az internalizáció láthatóvá tételéhez a Halo-jelölési technikát alkalmaztuk. Ennek során a HaloTag® fehérjét a receptor N-terminális, azaz extracelluláris végéhez fuzionáltuk (Halo-CB<sub>1</sub>R). A plazmamembránra kijutva a HaloTag® gyorsan és kovalensen köti a Halo-Alexa488-at, amely a fehérje fluoreszcensen jelölt, membrán-impermeabilis ligandja. Ezzel a módszerrel tehát végsősoron a plazmamembránon elhelyezkedő receptorpopuláció szelektíven jelölhető, és annak internalizációja jól követhető. A Halo-CB<sub>1</sub>R megfelelő működését BRET kísérletek segítségével jellemeztük, melyekben a receptor G-fehérje aktiválását és  $\beta$ -arr2 kötését mértük, és nem találtunk szignifikáns eltérést a vad típusú, illetve a HaloTag®-gel jelölt CB<sub>1</sub>R-ok dózis-hatás görbéinek EC<sub>50</sub> értékei között (pEC<sub>50</sub> 9,0 ± 0,2 és 9,0 ± 0,1 a G-fehérje kötés, illetve 6,5 ± 0,1 és 6,5 ± 0,1 a  $\beta$ -arr2 kötés esetén, rendre).

Az agonista-indukált internalizáció vizsgálatához a sejteket 15 percig festettük a Halo-Alexa488-cal, majd 30 percig kezeltük vivőanyaggal vagy CB<sub>1</sub>R liganddal, ezt követően pedig fixáltuk és konfokális mikroszkóppal elemeztük őket. A csupán vivőanyaggal kezelt sejtekben a plazmamembrán festődése egyértelműen látszott, a sejten belüli vezikuláris jelölődés minimális volt (20. ábra, A). A WIN55-tel (10  $\mu$ M) történő kezelés számos sejten belüli vezikulum megjelenését eredményezte, ami megfelel az intenzív agonista-függő internalizációnak (20. ábra, B), és ez gátolható volt a CB<sub>1</sub>R gátlószer AM251-gyel (30  $\mu$ M; 20. ábra, C). (Az AM251 az egyik legelterjedtebben használt szintetikus CB<sub>1</sub>R *inverz agonista* vegyület, amely tehát nem csak megakadályozza

más CB<sub>1</sub>R ligandok kötődését, hanem önmagában is a receptor inaktív konformációját stabilizálja.) A  $\beta$ -arr2 szerepét a folyamatban először egy domináns negatív  $\beta$ -arr2 mutáns, a  $\beta$ -arr2-V54D segítségével vizsgáltuk. Ennek a mutánsnak csökkent a 7TMR-okhoz való kötődési képessége [106, 222], és korábban már széles körben alkalmazták a  $\beta$ -arr2 internalizációban betöltött szerepének vizsgálatára. Mi a  $\beta$ -arr2-V54D, illetve a vad típusú  $\beta$ -arr2 RFP-vel jelölt formáit ( $\beta$ -arr2-V54D-RFP, ill.  $\beta$ -arr2-RFP) fejeztük ki a sejtekben a Halo-CB<sub>1</sub>R-ral együtt. A  $\beta$ -arr2-RFP expressziója nem rontotta el a CB<sub>1</sub>R WIN55-indukált internalizációját (20. ábra D-G). Ugyanakkor a  $\beta$ -arr2-V54D-RFP-t kifejező sejtekben a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációja jelentősen csökkent. (20. ábra, H-K).

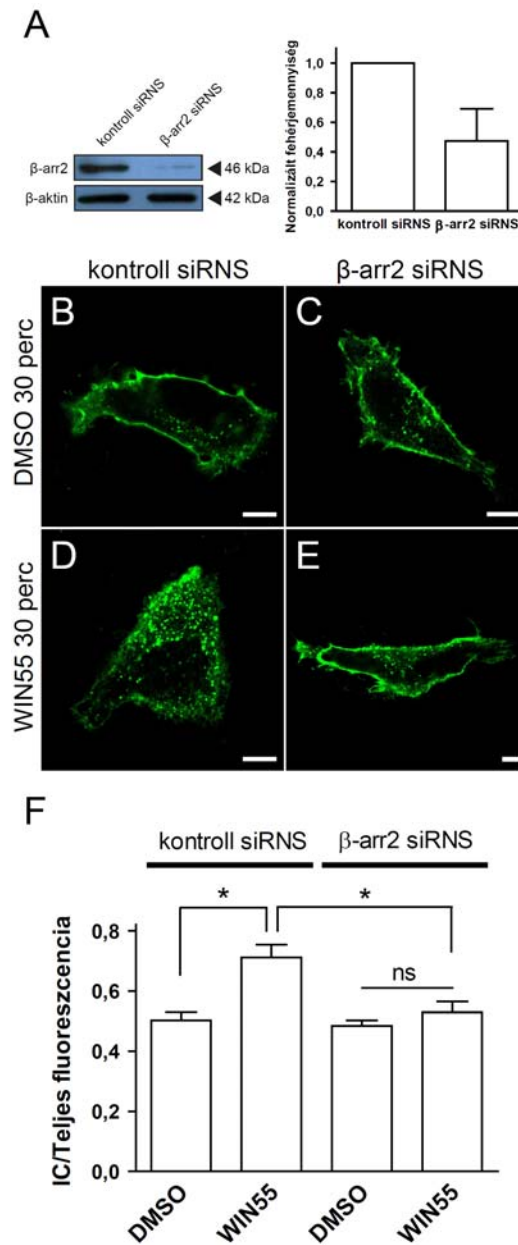


20. ábra A CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációját gátolja a domináns-negatív  $\beta$ -arr2

A Halo-CB<sub>1</sub>R-t HeLa sejtekben fejeztük ki egyedül (A-C) vagy vad típusú  $\beta$ -arr2-RFP (D-G), ill.  $\beta$ -arr2-V54D-RFP (H-K) mellett, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 15 perc Halo-Alexa488 festés, és 30 perc vivőanyag (A, D, E, H, I), WIN55 (10  $\mu$ M, B, F, G, J, K) vagy WIN55 + AM251 (10 $\mu$ M +

30  $\mu$ M, rendre, C) kezelést követően. A vivőanyag-kezelés nem okoz jelentős CB<sub>1</sub>R internalizációt egyik sejtpopulációban sem (A, D, H), míg a WIN55 kezelés a receptor erőteljes endocitózist váltja ki a kontroll (B) és a vad típusú  $\beta$ -arr2-RFP-t kifejező (F, G) sejtekben, a  $\beta$ -arr2-V54D-t kifejező sejtekben azonban nem (J, K). A WIN55-indukált internalizációt az AM251 együttes hozzáadása kivédi (C). Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10  $\mu$ m.

Ugyanebben a rendszerben megvizsgáltuk a  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS ( $\beta$ -arr2 siRNS) CB<sub>1</sub>R-internalizációra gyakorolt hatását is. A fehérjék Western blot elemzése a  $\beta$ -arr2 szintjének kb. 50%-os csökkenését mutatta a teljes sejtpopulációban,  $\beta$ -arr2 siRNS hatására (21. ábra, A). A Halo-CB<sub>1</sub>R internalizációját a fent leírtakhoz hasonlóan vizsgáltuk. A CB<sub>1</sub>R WIN55-tel létrehozott internalizációja érintetlen maradt a sejtek kontroll siRNS-sel történő transzfekcióját követően, azonban jelentősen károsodott a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtekben (21. ábra, B-E). Mivel ezekben a mérésekben nem lehetséges az siRNS-sel valóban transzfektálódott sejteket egyenként azonosítani, ezért elvégeztük a konfokális minták számszerűsítését (egy intracelluláris/teljes sejt fluoreszcencia-hányados segítségével), hogy megfelelően értékelhessük az siRNS hatását. Ez az elemzés is a  $\beta$ -arr2 siRNS szignifikáns gátló hatását mutatta a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációjára (21. ábra, F).



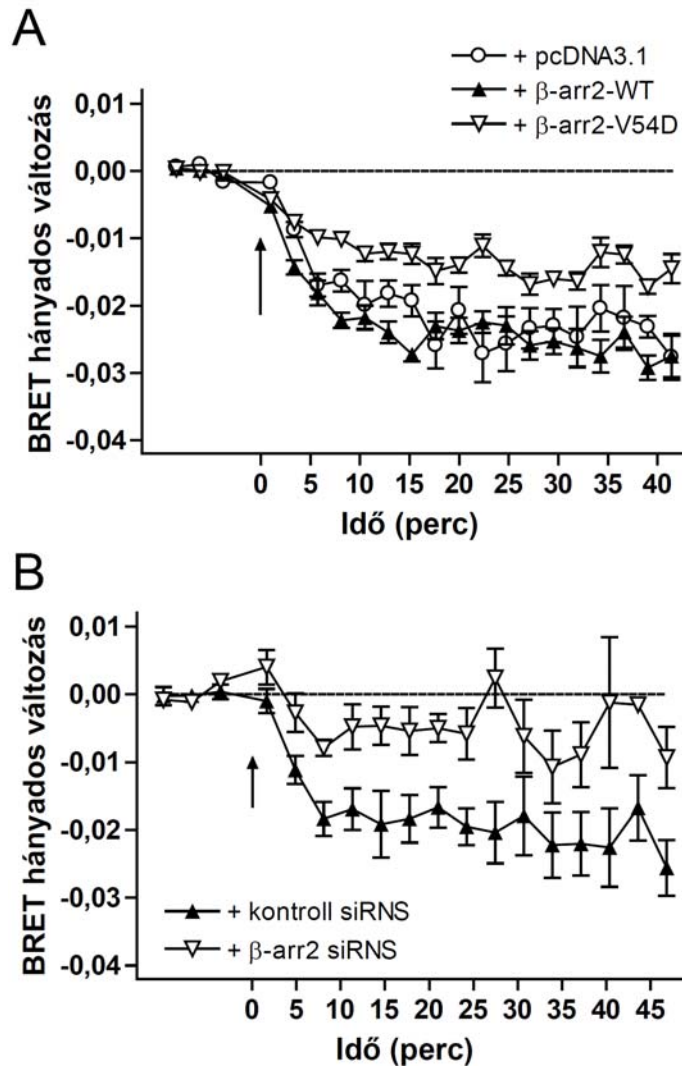
**21. ábra A  $CB_1R$  agonista-indukált internalizációját gátolja a  $\beta$ -arr2-specifikus siRNA**

A, A Western blot vizsgálatok a  $\beta$ -arr2 fehérje szintjének kb. 50%-os csökkenését mutatják a  $\beta$ -arr2 siRNA-sal transzfektált sejtekben a kontroll siRNA-sal transzfektált sejtekhez képest.  $n=3$ . B-E, HeLa sejteket transzfektáltunk Halo- $CB_1R$ -ral és kontroll (B, D) vagy  $\beta$ -arr2-specifikus (C, E) siRNA-sal, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 15 perc Halo-Alexa488 festés, és 30 perc vivőanyag (B, C) vagy WIN55 (10  $\mu$ M, D, E) kezelést követően. A vivőanyag-kezelés nem okoz jelentős  $CB_1R$  internalizációt egyik sejt populációban sem (B, C), míg a WIN55 kezelés a receptor erőteljes endocitózisát váltja ki a kontroll sejtekben (D), a  $\beta$ -arr2 siRNA-sal transzfektált sejtekben azonban nem (E). Lépték: 10  $\mu$ m. F, A konfokális

adatok számszerűsítése az intracelluláris/teljes sejt fluoreszcencia-hányados segítségével azt mutatja, hogy a sejten belüli receptorszám szignifikánsan megemelkedik WIN55 kezelésre a kontroll siRNS-t kapott sejtekben, és ez a hatás statisztikailag jelentős mértékben csökken a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtekben. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk,  $n=6$ ,  $*p<0,05$ , ns = nem szignifikáns.

#### *5.2.1.2. Az agonista-indukált internalizáció vizsgálata BRET módszer segítségével*

A továbbiakban a  $\beta$ -arr2 CB<sub>1</sub>R-internalizációban betöltött szerepét a pontosabban számszerűsíthető BRET módszerrel is megvizsgáltuk (ld. 15. ábra). Ennek során a receptor mozgását követtük a plazmamembrán és a citoplazma között, azáltal, hogy a folyamatosan plazmamembránban elhelyezkedő ICAM-1 fehérje YFP-vel jelölt formája (ICAM-YFP), és a szuper Renilla luciferázzal jelölt CB<sub>1</sub>R (CB<sub>1</sub>R-Sluc) között mértünk BRET-et. Az így transzfektált sejtekben a WIN55 hozzáadása a BRET jel csökkenését eredményezte, ami a CB<sub>1</sub>R-ok plazmamembránról való eltűnését jelzi (22. ábra, A). Ez a csökkenés a serkentést követően 10-20 perccel érte el a maximumát, és ezután nem mutatott jelentős változást a kísérlet végéig (kb. 40 perccel a serkentést követően). A vad típusú  $\beta$ -arr2 ko-expressziója nem volt jelentős hatással a CB<sub>1</sub>R internalizációjára. Ugyanakkor a  $\beta$ -arr2-V54D kifejeződése esetén a WIN55-re kialakuló BRET jel csökkenés mértéke jelentősen elmaradt a kontroll körülményekhez képest (22. ábra, A). A  $\beta$ -arr2 siRNS hatását szintén megvizsgáltuk ugyanilyen körülmények között, és azt láttuk, hogy a  $\beta$ -arr2 siRNS transzfekciója is jelentősen mérsékelte a CB<sub>1</sub>R aktivációt követő BRET csökkenés mértékét, azaz a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációját a kontroll siRNS-hez képest (22. ábra, B).



22. ábra Az agonista-indukált  $CB_1R$  internalizáció  $\beta$ -arr2-függését mutató BRET mérések

$CB_1R$ -Sluc-ot és ICAM-YFP-t fejeztünk ki HeLa sejtekben, majd BRET méréssel követtük a receptor plazmamembrántól való eltávolodását agonista hatására. A, A BRET jel csökkenését tapasztaljuk WIN55 (10  $\mu$ M) serkentést követően, üres pcDNA3.1 plazmid együttes transzfekciója esetén (fehér körök). A vad típusú  $\beta$ -arr2 együttes kifejeződése nincs jelentős hatással a BRET változásra (fekete háromszögek). A  $\beta$ -arr2-V54D kifejeződése jelentősen csökkenti a BRET jel változását (fehér háromszögek). Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk,  $n=8$ . B, A BRET jel csökkenését tapasztaljuk WIN55 (10  $\mu$ M) kezelést követően kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekben (fekete háromszögek). A BRET jel csökkenését jelentősen gátolja a  $\beta$ -arr2 siRNS transzfekciója (fehér háromszögek). Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk,  $n=4$ . A méréseket a csak vivőanyagot kapott görbére normalizáltuk (amit a vízszintes vonal jelez). A nyilak az agonista hozzáadásának időpontját jelzik.

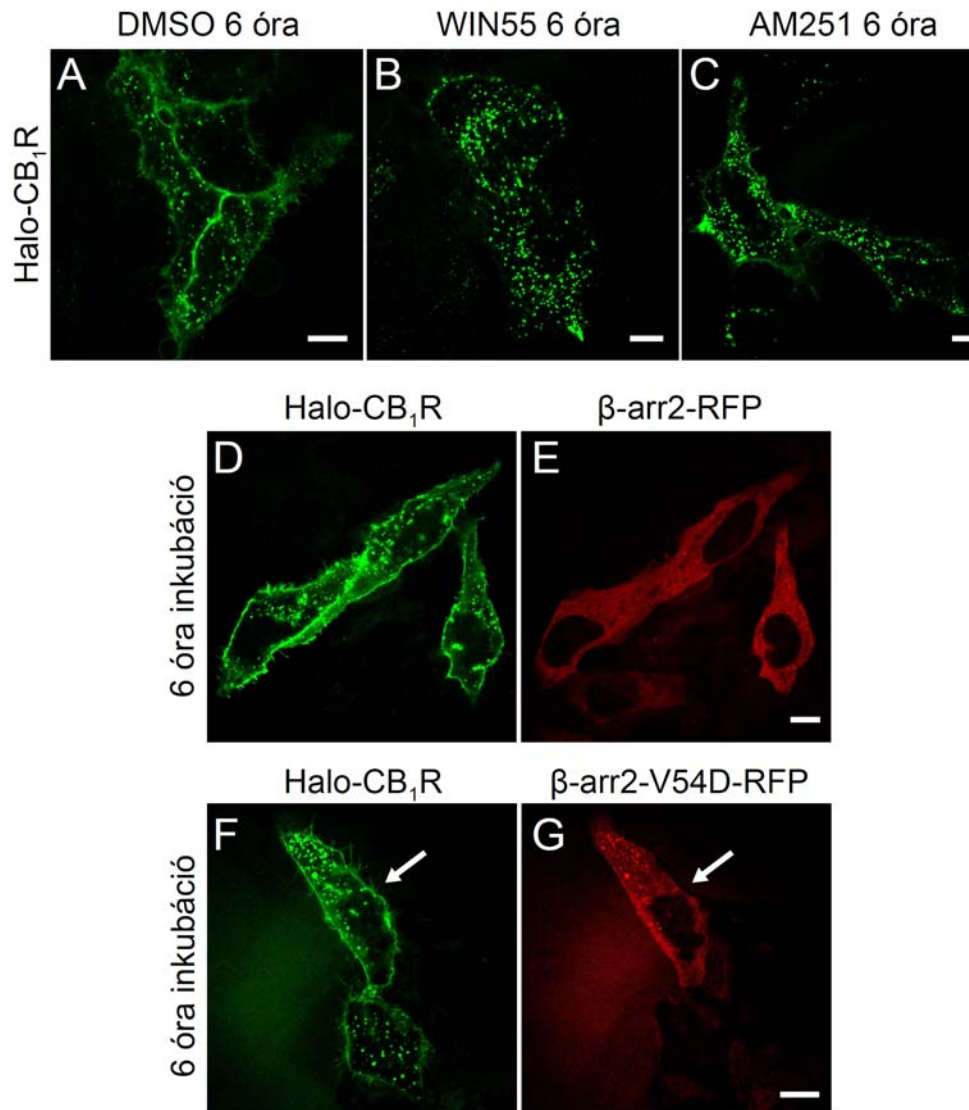
## 5.2.2. A konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció mechanizmusának jellemzése

### 5.2.2.1. A konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció aktivitás-függésének vizsgálata

Mivel az irodalmi adatok nem teljesen egységesek abban, hogy a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációja függ-e annak aktiváltsági állapotától, elsőként ezt a kérdést kívántuk vizsgálni, a fent bemutatott Halo-jelölési technika segítségével. Ezekben a kísérletekben a korábbiakhoz hasonló 15 perces Halo-festést alkalmaztunk, ezt követően pedig 6 óráig az inkubátorban (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) hagytuk a sejteket, hogy ezalatt a CB<sub>1</sub>R spontán endocitózisa megfelelő mértékben kialakulhasson. Ezek után a kontroll sejtekben nagyszámú sejten belüli vezikulumot láttunk, ami a CB<sub>1</sub>R konstitutív endocitózisára utal (23. ábra, A). A WIN55-kezelés tovább fokozta az endocitózist, ekkor gyakorlatilag nem maradt észlelhető receptor a plazmamembránon az inkubációs periódus végére (23. ábra, B). Érdekes módon azonban az inverz agonista AM251 folyamatos jelenléte (azaz a CB<sub>1</sub>R-ok inaktív állapotban történő stabilizálása) sem gátolta meg a hat órás időtartam alatt kialakuló konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizációt (23. ábra, C), ami arra utal, hogy a receptor aktív konformációja nem szükséges a konstitutív internalizációhoz.

### 5.2.2.2. A konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció $\beta$ -arr2- és klatrin-függésének vizsgálata

A továbbiakban a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációjának mechanizmusát kívántuk elemezni, elsőként a  $\beta$ -arr2 szerepét a folyamatban. A fentihez hasonló módon hagytuk létrejönni a Halo-CB<sub>1</sub>R spontán internalizációját, majd  $\beta$ -arr2-RFP és  $\beta$ -arr2-V54D-FRP ko-expressziójának hatását vizsgáltuk. A vad típusú  $\beta$ -arr2-RFP jelenléte nem okozott látható változást a konstitutív internalizáció mértékében (23. ábra, D és E).



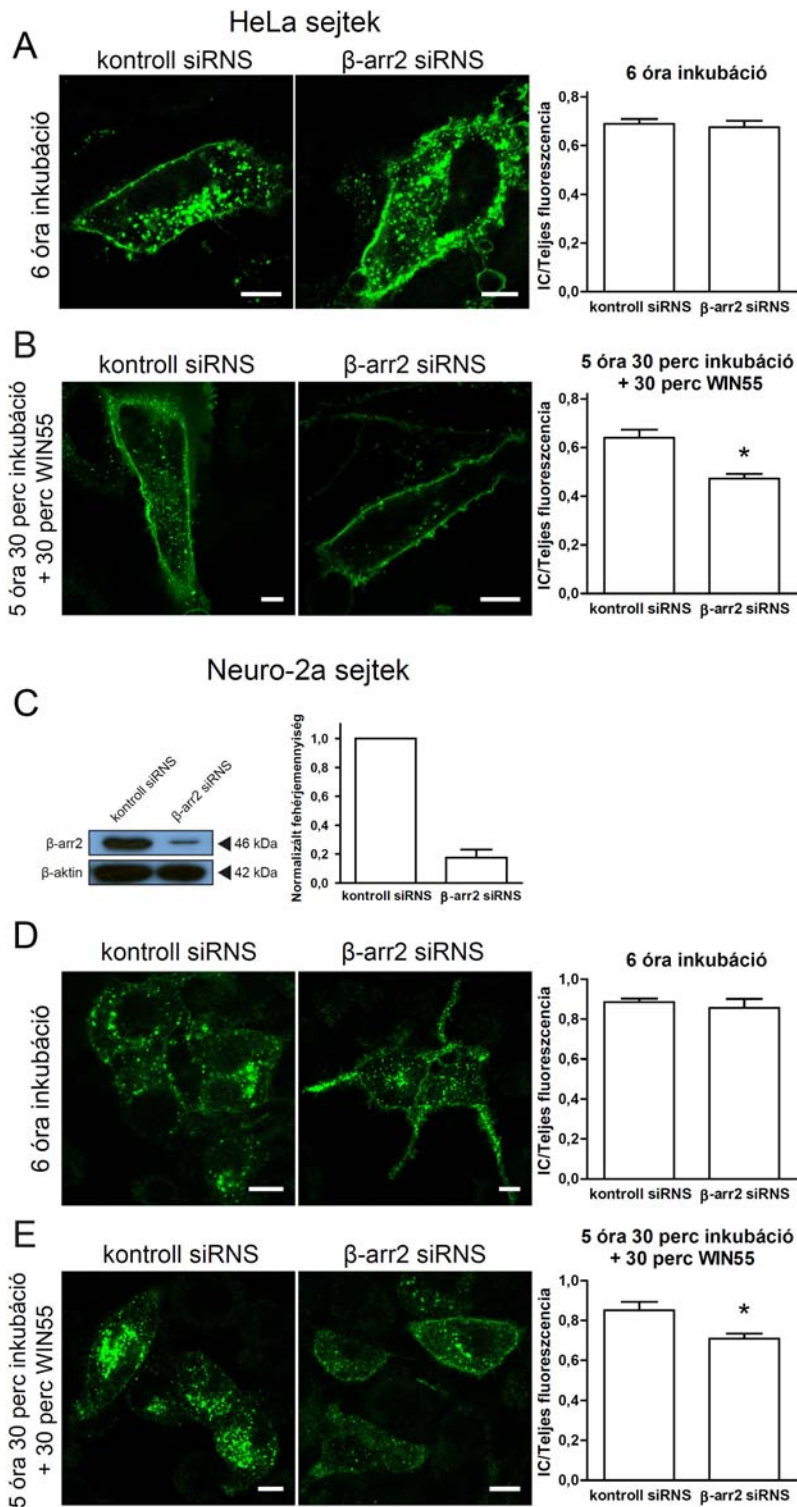
23. *ábra* A CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációját nem befolyásolja az inverz agonista kezelés, sem pedig a domináns-negatív β-arr2

A Halo-CB<sub>1</sub>R-t HeLa sejtekben fejeztük ki egyedül (A-C) vagy vad típusú β-arr2-RFP (D, E), ill. β-arr2-V54D-RFP (F, G) mellett, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 15 perc Halo-Alexa488 festés és 5 óra 45 perc 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> melletti inkubációt követően. Kontroll sejtekben jelentős mennyiségű Halo-CB<sub>1</sub>R-t figyelhetünk meg intracellulárisan (A). Az internalizáció fokozódik WIN55 (10 μM) jelenlétében (B), de nincs rá hatással az AM251 (30 μM, C). A konstitutív internalizáció megfigyelhető a vad típusú β-arr2-RFP-t kifejező sejtekben (D, E), és a β-arr2-V54D-t kifejező sejtekben is (F, G, ld. a nyíllal jelzett sejtet). Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10 μm.

Sőt, az agonista-indukált internalizációnál tapasztaltakkal ellentétben, a domináns negatív formát ( $\beta$ -arr2-V54D-RFP) kifejező sejtekben is jelen voltak a Halo-CB<sub>1</sub>R tartalmú sejten belüli vezikulumok, a kontroll sejtekhez hasonló mértékben (23. ábra, F és G).

A sejtek  $\beta$ -arr2 siRNS-sel történő transzfekciója sem eredményezte a konstitutív internalizáció gátlását, és ezt a számszerűsített adatok is megerősítették (24. ábra, A). Ez utóbbi kísérletekhez kontrollként megvizsgáltuk a hat órás inkubációs periódus végén létrejövő agonista-indukált endocitózist, hogy lássuk, nem az siRNS hatásának lecsengése okozta-e a gátló hatás elmaradását. Ezekben az esetekben a  $\beta$ -arr2 siRNS transzfekciója továbbra is jelentősen csökkentette a WIN55-indukált internalizációt, azaz az siRNS az inkubáció végén is hatékonyan gátolta a  $\beta$ -arr2-függő folyamatokat (24. ábra, B).

Kíváncsiak voltunk továbbá, hogy hasonló különbségeket tapasztalunk-e az internalizációs folyamatokban egy olyan sejtvonalon esetén, mely a CB<sub>1</sub>R-t endogén módon kifejezi, és így vizsgálata az élettanhoz közelebbi helyzetet jelent. A Neuro-2a egér neuroblasztóma sejteket gyakran használgják ilyen kísérletekben, így ebben a sejtvonalon is elvégeztük a fenti  $\beta$ -arr2 siRNS méréseket, azaz a Halo-CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációjának vizsgálatát. A Western blot eredmények a  $\beta$ -arr2 szintjének mintegy 80%-os csökkenését mutatták ki ezekben a sejtekben a  $\beta$ -arr2 siRNS transzfekcióját követően (24. ábra, C). Az eredmények a HeLa sejtek esetében kapott eredményekkel megegyeztek: a 6 óra alatt kialakuló spontán endocitózist nem gátolta a  $\beta$ -arr2 siRNS transzfekciója, az inkubációs periódus utolsó fél órájában létrehozott WIN55-indukált internalizációt azonban igen (24. ábra, D és E). Ez tovább erősíti azt a következtetést, hogy az agonista-indukált CB<sub>1</sub>R internalizáció  $\beta$ -arr2-függő folyamat, míg a konstitutív forma nem.

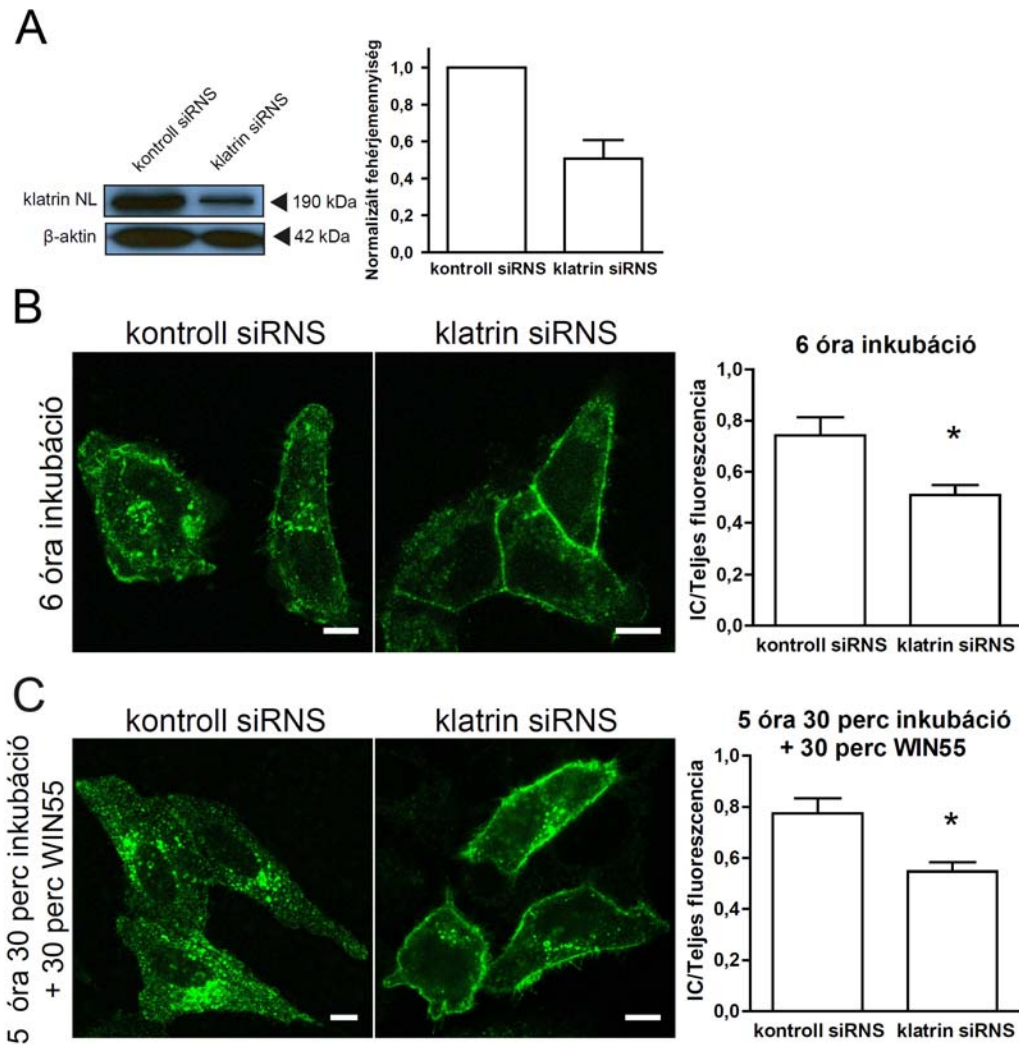


24. ábra A  $CB_1R$  konstitutív internalizációját nem befolyásolja a  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS

A és D, HeLa (A), ill. Neuro-2a (D) sejteket transzfektáltunk Halo- $CB_1R$ -ral és kontroll vagy  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS-sel, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 15 perc Halo-Alexa488 festés, és 5

óra 45 perc 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> melletti inkubációt követően. Mind a kontroll, mind pedig a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtekben jelentős mennyiségű receptor látható a sejten belül. Az adatok számszerűsítése az intracelluláris/teljes sejt fluoreszcencia-hányados segítségével nem mutat szignifikáns különbséget a kontroll és a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtek között a 6 órás inkubációt követően. B és E, Ugyanezekben a kísérletekben a kontroll vagy  $\beta$ -arr2-specifikus siRNS-sel transzfektált HeLa (B) vagy Neuro-2a (E) sejteket 5 óra 15 percig inkubáltuk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, amit 15 perc Halo-Alexa488 festés, majd 30 perc WIN55 (10  $\mu$ M) kezelés követett. A kontroll sejtekben jelentős mennyiségű internalizálódott receptor látható, a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtekben azonban nem. Az adatok számszerűsítése azt mutatja, hogy a WIN55-indukált internalizáció az 5 óra 30 perces inkubációt követően szignifikánsan csökkent a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált sejtekben. Lépték: 10  $\mu$ m. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=3, \*p<0,05. C, A Western blot vizsgálatok a  $\beta$ -arr2 fehérje szintjének kb. 80%-os csökkenését mutatják a  $\beta$ -arr2 siRNS-sel transzfektált Neuro-2a sejtekben a kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=3.

Ezt követően azt akartuk megvizsgálni, hogy a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált, illetve konstitutív internalizációja klatrin-függő mechanizmussal zajlik-e. Ehhez a klatrin nehéz láncának kifejeződését csökkentettük siRNS segítségével. A Western blot eredmények a klatrin nehézlánc szintjének kb. 50%-os csökkenését mutatták ki (25. ábra, A). Eredményeink azt mutatták, hogy a klatrin nehézlánc elleni siRNS-sel transzfektált sejtekben jelentősen kisebb mértékben alakul ki a Halo-CB<sub>1</sub>R konstitutív endocitózisa 6 óra alatt a kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest (25. ábra, B). Ugyanez érvényesült az inkubáció utolsó fél órájában, WIN55-tel létrehozott internalizáció esetében is (25. ábra, C). Ez arra utal, hogy a CB<sub>1</sub>R internalizáció mindkét formája klatrin részvételével zajlik.



**25. ábra A CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációját gátolja a klatrin nehézlánc-specifikus siRNS**

A, A Western blot vizsgálatok a klatrin nehézlánc (klatrin NL) fehérje szintjének kb. 50%-os csökkenését mutatják a klatrin nehézlánc siRNS-sel transzfektált sejtekben a kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest.  $n=3$ . B, HeLa sejteket transzfektáltunk Halo-CB<sub>1</sub>R-ral és kontroll vagy klatrin nehézlánc-specifikus siRNS-sel, majd a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 15 perc Halo-Alexa488 festés, és 5 óra 45 perc 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> melletti inkubációt követően. Jelentős mennyiségű sejten belüli receptort láthatunk a kontroll sejtekben, a klatrin nehézlánc siRNS-sel transzfektált sejtekben azonban nem. A konfokális adatok számszerűsítése az intracelluláris (IC)/teljes sejt fluoreszcencia-hányados segítségével szignifikáns különbséget mutat a kontroll és a klatrin NL siRNS-sel transzfektált sejtek között. C, Ugyanezekben a kísérletekben a kontroll vagy klatrin NL siRNS-sel transzfektált HeLa sejteket 5 óra 15 percig inkubáltuk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, amit 15 perc Halo-Alexa488 festés, majd 30 perc WIN55 (10  $\mu$ M) kezelés követett. A kontroll sejtekben jelentős mennyiségű internalizálódott receptor látható, a klatrin NL siRNS-sel transzfektált sejtekben azonban nem. Az adatok számszerűsítése azt mutatja, hogy a WIN55-indukált

internalizáció az 5 óra 30 perces inkubációt követően szignifikánsan csökkent a klatrin NL siRNS-sel transzfektált sejtekben. Lépték: 10  $\mu$ m. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=3, \*p<0,05

### ***5.3. A konzervált DRY motívum szerepének vizsgálata a CB<sub>1</sub>R működésében***

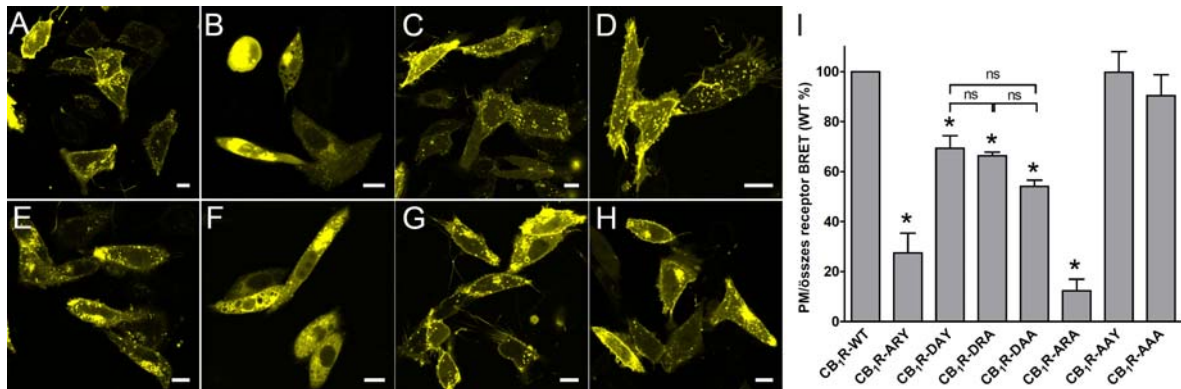
#### **5.3.1. Mutációk létrehozása a CB<sub>1</sub>R DRY régiójában**

A konzervált DRY régió szerepét a CB<sub>1</sub>R működésében úgy kívántuk vizsgálni, hogy a három érintett aminosavat (irányított mutagenézis segítségével) valamennyi lehetséges (egyes, kettes és hármas) kombinációban alaninra cseréltük. Így az első vizsgálatokat a vad típusú CB<sub>1</sub>R mellett hét mutánsal végeztük: (a Ballesteros-Weinstein számozás alapján) CB<sub>1</sub>R-D3.49A, CB<sub>1</sub>R-R3.50A, CB<sub>1</sub>R-Y3.51A, CB<sub>1</sub>R-R3.50A/Y3.51A, CB<sub>1</sub>R-D3.49A/Y3.51A, CB<sub>1</sub>R-D3.49A/R3.50A, CB<sub>1</sub>R-D3.49A/R3.50A/Y3.51A. A mutánsokat a továbbiakban az egyszerűbb azonosítás kedvéért (a fenti felsorolás sorrendjében) a CB<sub>1</sub>R-ARY, CB<sub>1</sub>R-DAY, CB<sub>1</sub>R-DRA, CB<sub>1</sub>R-DAA, CB<sub>1</sub>R-ARA, CB<sub>1</sub>R-AAY és CB<sub>1</sub>R-AAA elnevezésekkel jelöljük. Kísérleteinket CHO sejtekben végeztük, melyek endogén CB<sub>1</sub>R-t nem fejeznek ki, és ennek megfelelően kontroll kísérleteinkben egyik kísérleti felállásban, egyik CB<sub>1</sub>R ligandra sem láttunk jelentős változást a receptorral nem transzfektált sejtekben (az adatokat nem mutatjuk).

#### **5.3.2. A DRY mutáns CB<sub>1</sub>R-ok plazmamembránon való kifejeződésének vizsgálata**

Mielőtt részletesebben megvizsgáltuk volna a mutáns CB<sub>1</sub>R-ok jelátviteli tulajdonságait, ellenőrizni kívántuk, hogy az egyes mutációk nem befolyásolják-e a receptor plazmamembránra való megfelelő kijutását. Ehhez a sejtekben kifejeztük a receptorok mVenus-szal jelölt formáit, és a sejteket konfokális mikroszkóp alatt elemeztük. A CB<sub>1</sub>R ezekben a sejtekben nyugalmi körülmények között a plazmamembránon, valamint

sejten belüli vezikulumokban helyezkedik el, ami egybevág a receptor konstitutív internalizációjával (26. ábra, A). Fontos megfigyelés volt, hogy a D3.49A mutáció önmagában jelentősen rontotta a CB<sub>1</sub>R plazmamembránon való elhelyezkedését, az érintett receptorok (CB<sub>1</sub>R-ARY és CB<sub>1</sub>R-ARA) többsége a sejtek endoplazmás retikulumában halmozódott fel (26. ábra, B és F). Érdekes módon a D3.49A mutációnak ezt a hatását az R3.50A együttes mutációja kivédte, hiszen mind a dupla mutáns CB<sub>1</sub>R-AAY, mind a tripla mutáns CB<sub>1</sub>R-AAA megfelelően kijutott a plazmamembránra (26. ábra, G és H). A többi mutáns, azaz a CB<sub>1</sub>R-DAY, a CB<sub>1</sub>R-DRA és a CB<sub>1</sub>R-DAA a konfokális felvételek alapján a vad típusú receptorhoz megközelítőleg sejten belüli eloszlást mutatott (26. ábra, C, D és E).



26. ábra A vad típusú és mutáns CB<sub>1</sub>R-mVenus variánsok sejten belüli eloszlása

A-H, Az mVenus-szal jelölt CB<sub>1</sub>R variánsokat kifejező CHO sejtekről készült konfokális mikroszkópos felvételek. A, CB<sub>1</sub>R-mVenus; B, CB<sub>1</sub>R-ARY-mVenus; C, CB<sub>1</sub>R-DAY-mVenus; D, CB<sub>1</sub>R-DRA-mVenus; E, CB<sub>1</sub>R-DAA-mVenus; F, CB<sub>1</sub>R-ARA-mVenus; G, CB<sub>1</sub>R-AAY-mVenus; H, CB<sub>1</sub>R-AAA-mVenus. Lépték: 10 µm. I, Az mVenus-szal jelölt CB<sub>1</sub>R variánsok plazmamembránon elhelyezkedő hányadát tükröző *PM/összes receptor BRET* értékek. A 0% a BRET interakció teljes hiányát, a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R-mVenus-hoz tartozó értéket mutatja. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk, n=3, \*p<0,05, ns: nem szignifikáns.

Mivel a konfokális képek elemzése sok esetben nem eléggé érzékeny a receptorok eloszlásában mutatkozó finomabb különbségek kimutatásához, ezért egy jobban számszerűsíthető, érzékenyebb módszert is alkalmaztunk a receptorok plazmamembránon való elhelyezkedésének meghatározására: BRET-et mértünk az mVenus-szal jelölt receptorok és a plazmamembránhoz irányított Sluc fehérje között (ld. 14. ábra). A nem-

stimulált sejtekben a plazmamembránon elhelyezkedő receptorok arányát a *PM/összes receptor BRET* hányados tükrözi. Kísérleteinkben azt láttuk, hogy ez a hányados a mutánsok közül a CB<sub>1</sub>R-AAY és a CB<sub>1</sub>R-AAA esetén a vad típusú receptorhoz hasonló, míg a CB<sub>1</sub>R-DAY, CB<sub>1</sub>R-DRA és CB<sub>1</sub>R-DAA mutánsok esetén kb. 40%-kal kisebb mértékű. A CB<sub>1</sub>R-ARY és CB<sub>1</sub>R-ARA mutánsok esetén – a konfokális felvételekkel összhangban – a plazmamembrán lokalizáció szinte teljes megszűnését tapasztaltuk (26. ábra, I).

Mivel a fentiek alapján a CB<sub>1</sub>R-ARY és a CB<sub>1</sub>R-ARA mutánsok plazmamembránon való kifejeződése jelentős zavart szenvedett, ezért a további vizsgálatok során ezt a két mutánst nem jellemeztük részletesebben.

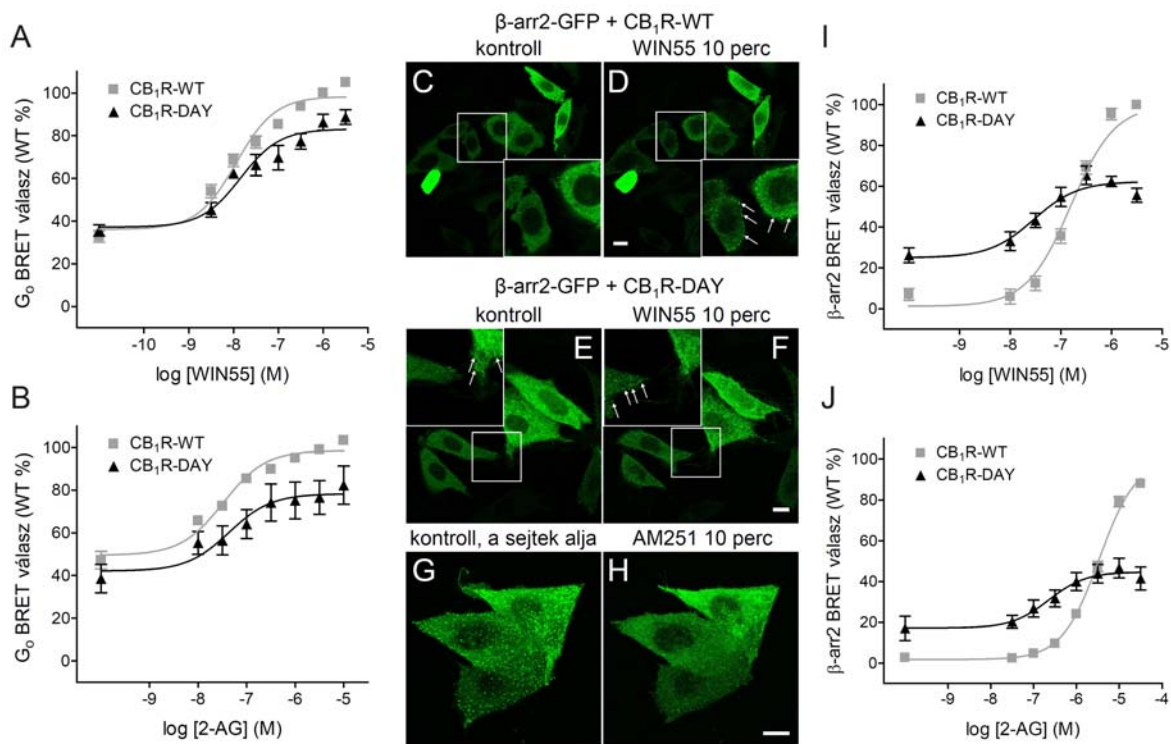
### 5.3.3. A DRY mutáns CB<sub>1</sub>R-ok működésének jellemzése

#### 5.3.3.1. A CB<sub>1</sub>R-DAY mutáns jellemzése

Az R3.50 a DRY motívumon belül is a legkonzerváltabb aminosav, így először a CB<sub>1</sub>R-DAY mutáns működését vizsgáltuk meg. A receptor G-fehérje aktivációját közvetlenül mértük, a heterotrimer G<sub>0</sub>-fehérje alegységek ( $\alpha_0$ -Rluc és YFP- $\beta_{1\gamma_{11}}$ ) közötti BRET változások követésével (ld. 11. ábra), melyeket a vad típusú vagy a mutáns CB<sub>1</sub>R-ral együtt fejeztünk ki CHO sejtekben. A szintetikus CB<sub>1</sub>R-agonista WIN55-tel, illetve az endokannabinoid 2-AG-val készült G<sub>0</sub> BRET dózis-hatás görbék azt mutatták, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAY G-fehérje aktiválási képessége a vad típuséhoz képest csökkent, de nem szűnt meg teljesen. Továbbá a CB<sub>1</sub>R-DAY a CB<sub>1</sub>R-hoz hasonló mértékű bazális aktivitást mutatott (27. ábra, A és B). Az EC<sub>50</sub> értékek is hasonlóak voltak a két receptor esetében, ami arra utal, hogy az R3.50A mutáció nem változtatta meg jelentősen a receptor G-fehérje iránti affinitását (4. táblázat).

A továbbiakban a CB<sub>1</sub>R-DAY  $\beta$ -arresztin kötését vizsgáltuk meg. GFP-vel jelölt  $\beta$ -arr2-t ( $\beta$ -arr2-GFP) fejeztünk ki CHO sejtekben a vad típusú vagy mutáns CB<sub>1</sub>R-ral, és a  $\beta$ -arr2-GFP elhelyezkedését elemeztük konfokális mikroszkóppal. Érdekes módon azt

figyeltük meg, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAY-t kifejező sejtekben a  $\beta$ -arr2-GFP már nyugalmi körülmények között is pontszerű struktúrákban volt jelen a plazmamembránnál, ami a CB<sub>1</sub>R-DAY megnövekedett bazális  $\beta$ -arr2 kötésére utal (27. ábra, E és G). Hasonló bazális  $\beta$ -arr2 kötést a vad típusú receptor esetében nem tudtunk megfigyelni (27. ábra, C). Ez a bazális kötés egy parciálisan aktív receptor-konformáció következménye volt, ugyanis a sejtek inverz agonista AM251-gyel történő kezelése (10  $\mu$ M, 10 perc) a  $\beta$ -arr2-GFP pöttyök többségének plazmamembránról való eltűnését eredményezte (27. ábra, H).



27. ábra A CB<sub>1</sub>R-DAY mutáns működésének elemzése

A-B, Dózis-hatás görbék, melyek a vad típusú CB<sub>1</sub>R (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DAY (fekete görbék) G<sub>0</sub>-fehérje BRET válaszát mutatják CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (A) vagy 2-AG-val (B) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (A), ill. 2-AG (B) által létrehozott válaszána ( $E_{max}$ ) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk,  $n=3-8$ . C-H, Konfokális felvételek, melyek a  $\beta$ -arr2-GFP elhelyezkedését mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (C és D) vagy CB<sub>1</sub>R-DAY-t (E-H) kifejező CHO sejtekben, kontroll körülmények között (C, E és G), ill. 10 perces WIN55 (1  $\mu$ M, D és F) vagy AM251 (10  $\mu$ M, H) kezelést követően. A nyilak a plazmamembránál elhelyezkedő  $\beta$ -arr2-GFP pontokat mutatják. Az ábrán legalább négy független kísérletről származó reprezentatív felvételek

láthatók. Lépték: 10  $\mu\text{m}$ . I-J, Dózis-hatás görbék, melyek a  $\beta$ -arr2 BRET választ (azaz a  $\beta$ -arr2 plazmamembránhoz történő kihelyeződését) mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DAY-t (fekete görbék) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (I) vagy 2-AG-val (J) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu\text{M}$ ) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (I), ill. 2-AG (J) által létrehozott válaszában ( $E_{\text{max}}$ ) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábráztuk, n=4-7.

**4. táblázat A különböző CB<sub>1</sub>R variánsok Go BRET és  $\beta$ -arr2 BRET dózis-hatás görbéinek paraméterei**

A bazális és  $E_{\text{max}}$  értékeket a vad típusú CB<sub>1</sub>R  $E_{\text{max}}$  értékének %-ában adtuk meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábráztuk, n=3-8. \*p<0,05 a vad típusú CB<sub>1</sub>R-hoz képest. n.d. – nem detektálható

Receptor	G <sub>o</sub> BRET					
	WIN55			2-AG		
	pEC <sub>50</sub>	bazális	E <sub>max</sub>	pEC <sub>50</sub>	bazális	E <sub>max</sub>
vad típusú CB <sub>1</sub> R	-7,9 $\pm$ 0,1	37 $\pm$ 2	100	-7,4 $\pm$ 0,1	50 $\pm$ 2	100
CB <sub>1</sub> R-DAY	-7,9 $\pm$ 0,2	37 $\pm$ 4	83 $\pm$ 4*	-7,4 $\pm$ 0,3	42 $\pm$ 6	78 $\pm$ 4*
CB <sub>1</sub> R-DRA	-6,8 $\pm$ 0,3*	66 $\pm$ 3*	97 $\pm$ 4	-7,5 $\pm$ 0,2	64 $\pm$ 2*	87 $\pm$ 1*
CB <sub>1</sub> R-DAA	-7,3 $\pm$ 0,2	44 $\pm$ 3	75 $\pm$ 3*	-7,3 $\pm$ 0,4	54 $\pm$ 4	73 $\pm$ 2*
CB <sub>1</sub> R-AAAY	-7,2 $\pm$ 0,2*	0 $\pm$ 4*	64 $\pm$ 4*	-7,0 $\pm$ 0,2*	17 $\pm$ 4*	78 $\pm$ 4*
Receptor	$\beta$ -arr2 BRET					
	WIN55			2-AG		
	pEC <sub>50</sub>	bazális	E <sub>max</sub>	pEC <sub>50</sub>	bazális	E <sub>max</sub>
vad típusú CB <sub>1</sub> R	-6,8 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 3	100	-5,5 $\pm$ 0,0	2 $\pm$ 1	100
CB <sub>1</sub> R-DAY	-7,5 $\pm$ 0,2*	25 $\pm$ 4*	62 $\pm$ 3*	-6,7 $\pm$ 0,3*	17 $\pm$ 4*	45 $\pm$ 3*
CB <sub>1</sub> R-DRA	-7,2 $\pm$ 0,2*	14 $\pm$ 2*	43 $\pm$ 2*	-6,4 $\pm$ 0,2*	10 $\pm$ 2*	35 $\pm$ 2*
CB <sub>1</sub> R-DAA	> -5,0*	21 $\pm$ 2*	n.d.	> -4,5*	15 $\pm$ 5*	n.d.
CB <sub>1</sub> R-AAAY	-7,2 $\pm$ 0,1*	33 $\pm$ 11*	284 $\pm$ 10*	-6,2 $\pm$ 0,1*	26 $\pm$ 6*	145 $\pm$ 8*

Az agonista WIN55 hozzáadása után (1  $\mu\text{M}$ , 10 perc), további  $\beta$ -arr2-GFP kihelyeződés volt megfigyelhető a CB<sub>1</sub>R-DAY esetben, azonban ez nem érte el a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arr2-GFP kötésének mértékét (27. ábra, D és F).

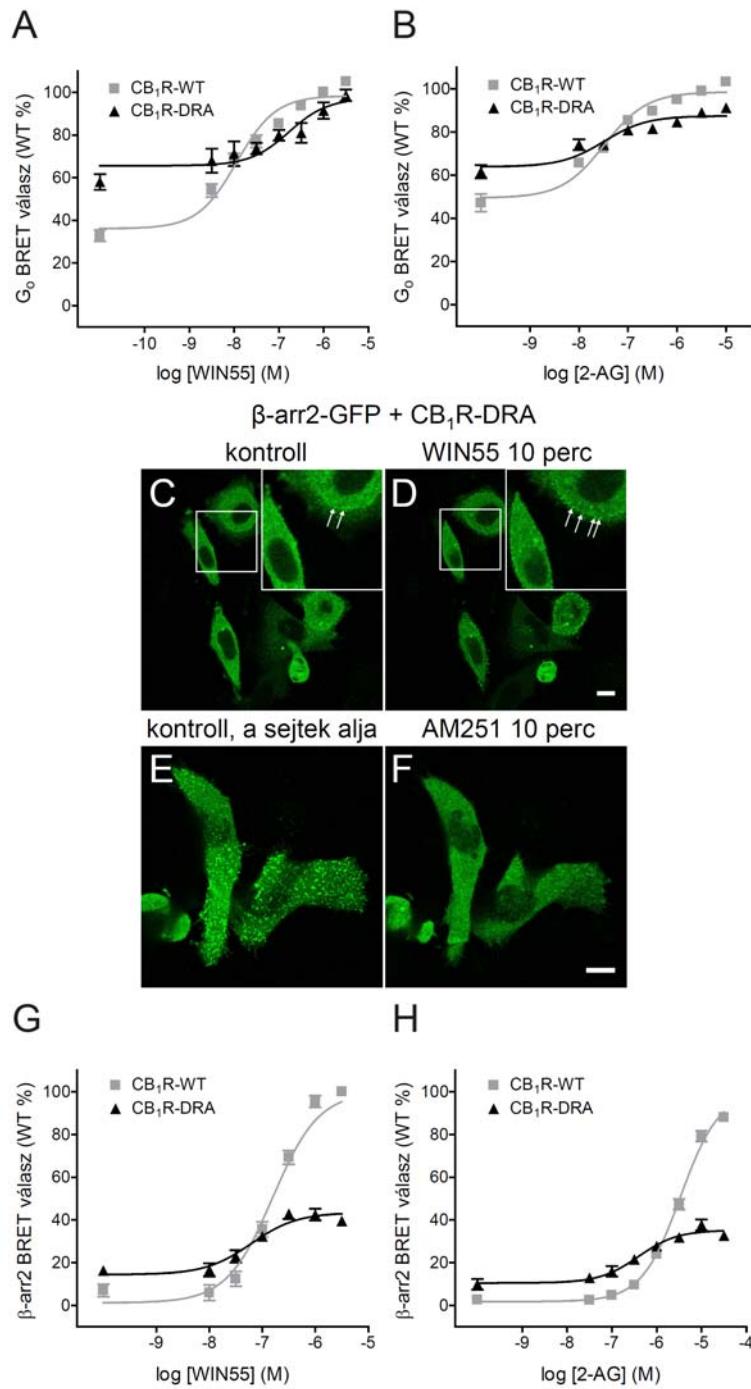
Azért, hogy a  $\beta$ -arr2 kötést pontosabban, számszerűsíthető módon is megvizsgáljuk, a  $\beta$ -arr2 membránhoz való kihelyeződését a  $\beta$ -arr2-Rluc és a plazmamembránhoz irányított

mVenus (MP-mVenus) közötti BRET változásokon keresztül mértük (ld. 13. ábra). Ezzel a kísérleti felállással lehetséges a vizsgált receptor  $\beta$ -arr2 kötésének vizsgálata anélkül, hogy magát a receptort közvetlenül megjelölnénk. Ez előnyös megoldás, hiszen így a mért BRET jeleket nem befolyásolják az esetleges orientációs változások, amiket a receptorokba bevitt mutációk hozhatnak létre. Továbbá az így mért BRET-et kizárólag a plazmamembránon elhelyezkedő receptorok befolyásolják, azaz a BRET hányadost nem zavarja a sejten belül elhelyezkedő receptorpopuláció.

A fenti  $\beta$ -arr2 BRET felállásban WIN55-tel felvett dózis-hatás görbék összhangban voltak a konfokális mikroszkóppal nyert adatokkal, azaz látható volt a  $CB_1R$ -DAY megnövekedett bazális  $\beta$ -arr2 kötése, illetve az agonista hatására létrejövő csökkent  $\beta$ -arr2-kihelyeződés (27. ábra, I). Hasonló eredményeket kaptunk az endokannabinoid 2-AG-val történő stimulálás esetén (27. ábra, J).

#### 5.3.3.2. *A $CB_1R$ -DRA mutáns jellemzése*

A DRY motívum három aminosava közül az Y3.51 a legkevésbé konzervált, és viszonylag keveset tudunk a 7TMR-ok működésében betöltött szerepéről. Azért, hogy a  $CB_1R$  szabályozásában játszott szerepéről információt nyerjünk, megvizsgáltuk a  $CB_1R$ -DRA mutánst is a fent leírt kísérleti felállásokban. Miközben a receptor maximális G-fehérje aktivációja csak kis mértékben csökkent (azaz az  $E_{max}$  csökkenése csak a 2-AG esetében mutatkozott szignifikánsnak), a G-fehérje BRET dózis-hatás görbék sajátos módon azt mutatták, hogy ez a mutáns jelentősen magasabb bazális G-fehérje aktivációval rendelkezik, mint a vad típusú  $CB_1R$  (28. ábra, A és B, 4. táblázat).



### 28. ábra A CB<sub>1</sub>R-DRA mutáns működésének elemzése

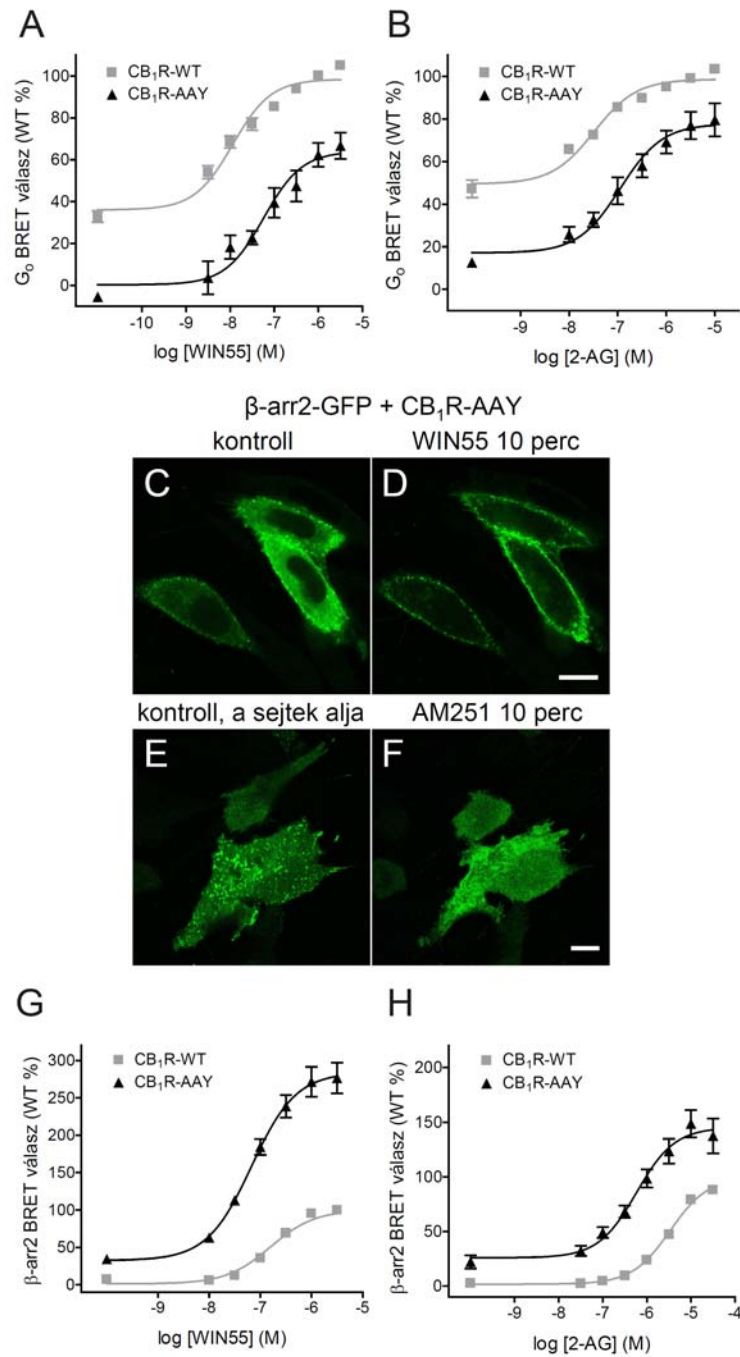
A-B, Dózis-hatás görbék, melyek a vad típusú CB<sub>1</sub>R (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DRA (fekete görbék) G<sub>0</sub>-fehérje BRET válaszát mutatják CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (A) vagy 2-AG-val (B) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10 μM) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (A), ill. 2-AG (B)

által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk, n=4-8. C-F, Konfokális felvételek, melyek a β-arr2-GFP elhelyezkedését mutatják CB<sub>1</sub>R-DRA-t kifejező CHO sejtekben, kontroll körülmények között (C és E), ill. 10 perces WIN55 (1 μM, D) vagy AM251 (10 μM, F) kezelést követően. A nyilak a plazmamembránál elhelyezkedő β-arr2-GFP pontokat mutatják. Az ábrán négy független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10 μm. G-H, Dózis-hatás görbék, melyek a β-arr2 BRET választ (azaz a β-arr2 plazmamembránhoz történő kihelyeződését) mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DRA-t (fekete görbék) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (G) vagy 2-AG-val (H) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10 μM) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (G), ill. 2-AG (H) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk, n=4-7.

A konfokális mikroszkópos elemzés során azt láttuk, hogy – a CB<sub>1</sub>R-DAY-hoz hasonlóan – a CB<sub>1</sub>R-DRA-nál is megjelenik a bazális β-arr2 kötés (28. ábra, C és E), amit az inverz agonista kezelés lecsökkent (28. ábra, F). Az agonista-indukált β-arr2-GFP kihelyeződés a plazmamembránhoz igen gyenge volt (28. ábra, D). A β-arr2 BRET analízis ezúttal is összhangban volt a konfokális adatokkal, azaz a dózis-hatás görbe emelkedett bazális β-arr2 kötéset mutatott, az agonista-indukált β-arr2 kihelyeződés pedig jelentősen gyengült (28. ábra, G és H).

### 5.3.3.3. *A CB<sub>1</sub>R-AAY mutáns jellemzése*

A továbbiakban a dupla mutáns CB<sub>1</sub>R-AAY jelátviteli tulajdonságait elemeztük. A G-fehérje aktivációt ezúttal is a fent leírt BRET próba segítségével követtük. A dózis-hatás görbéket elemezve látszott, hogy a CB<sub>1</sub>R-AAY-nak csökkent a G-fehérje aktiválási képessége, ami mind az E<sub>max</sub> értékekben, mind pedig a pEC<sub>50</sub> értékekben tükröződött. Ezen felül a CB<sub>1</sub>R-AAY bazális G-fehérje aktivációja jelentős mértékben csökkent (29. ábra, A és B, 4. táblázat). A CB<sub>1</sub>R-AAY β-arr2 kötését szintén először a receptor és a β-arr2-GFP együttes kifejezésével vizsgáltuk konfokális mikroszkópban. Azt láttuk, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAY-hoz és a CB<sub>1</sub>R-DRA-hoz hasonlóan a CB<sub>1</sub>R-AAY is a plazmamembránhoz gyűjti a β-arr2-GFP-t nem stimulált sejtekben (29. ábra, C és E).



### 29. ábra A CB<sub>1</sub>R-AAY mutáns működésének elemzése

A-B, Dózis-hatás görbék, melyek a vad típusú CB<sub>1</sub>R (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-AAY (fekete görbék) G<sub>0</sub>-fehérje BRET válaszát mutatják CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (A) vagy 2-AG-val (B) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (A), ill. 2-AG (B) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=3-8. C-F,

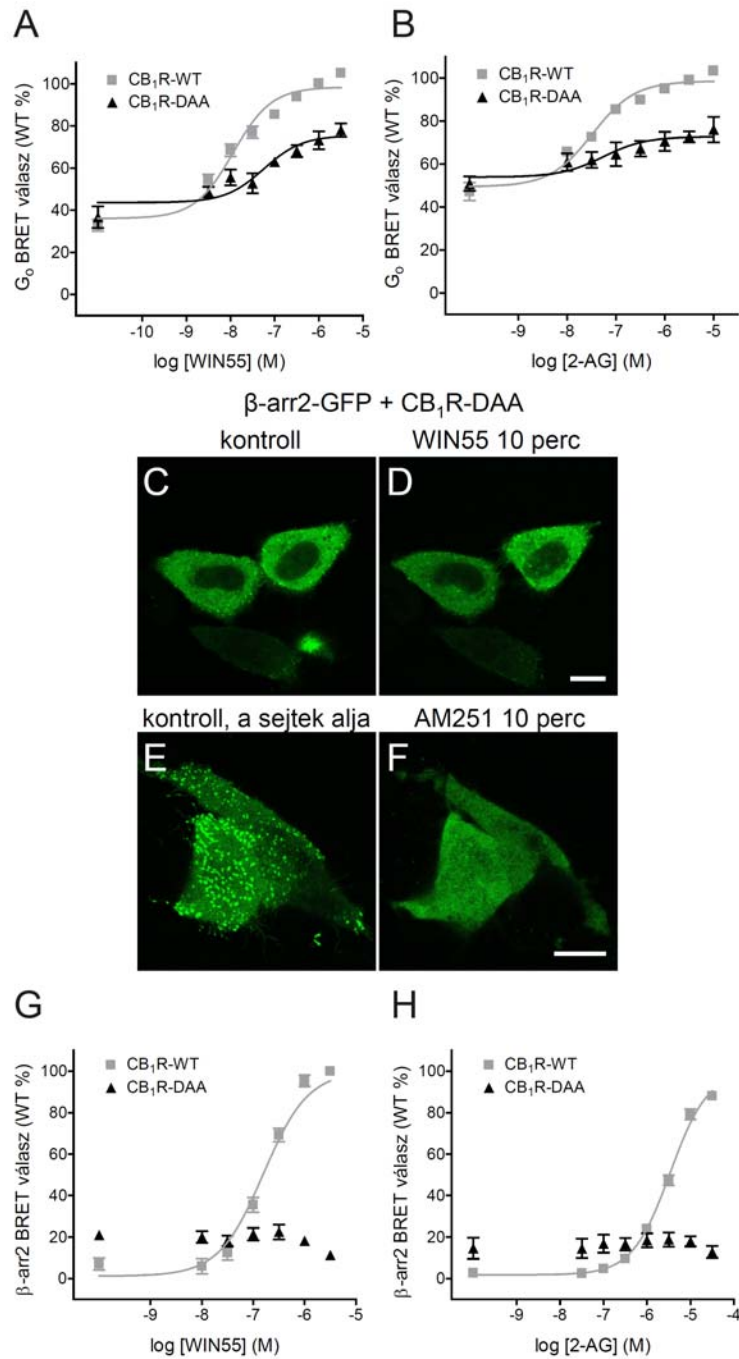
Konfokális felvételek, melyek a  $\beta$ -arr2-GFP elhelyezkedését mutatják CB<sub>1</sub>R-AAY-t kifejező CHO sejtekben, kontroll körülmények között (C és E), ill. 10 perces WIN55 (1  $\mu$ M, D) vagy AM251 (10  $\mu$ M, F) kezelést követően. Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10  $\mu$ m. G-H, Dózis-hatás görbék, melyek a  $\beta$ -arr2 BRET választ (azaz a  $\beta$ -arr2 plazmamembránhoz történő kihelyeződését) mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-AAY-t (fekete görbék) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (G) vagy 2-AG-val (H) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (G), ill. 2-AG (H) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=4-7.

A bazális  $\beta$ -arr2 kötést az inverz agonista AM251-kezelés ezúttal is visszafordította (29. ábra, F). A CB<sub>1</sub>R agonista WIN55 hozzáadásakor a  $\beta$ -arr2-GFP igen kifejezett áthelyeződését láttuk a plazmamembránhoz, gyakorlatilag nem maradt  $\beta$ -arr2-GFP fluoreszcencia a citoplazmában (29. ábra, D). Tovább vizsgáltuk a CB<sub>1</sub>R-AAY  $\beta$ -arr2 kötését a fent leírt, BRET-alapú módszerrel, és az így kapott WIN55 és 2-AG dózis-hatás görbék megerősítették, hogy – a fokozott bazális  $\beta$ -arr2 kötés mellett – ez a mutáns sokkal nagyobb mértékben képes serkentést követően  $\beta$ -arr2-t kötni, amit a görbék balra és felfelé toródása jelez (29. ábra G és H, 4. táblázat).

A tripla mutáns CB<sub>1</sub>R-AAA jellemzői hasonlóak voltak a CB<sub>1</sub>R-AAY-hoz, azaz a bazális és agonista-indukált G-fehérje aktiváció csökkenése mellett a bazális és serkentést követő  $\beta$ -arr2 kötés fokozódását láttuk (az adatokat nem mutatjuk).

#### 5.3.3.4. A CB<sub>1</sub>R-DAA mutáns jellemzése

A következőkben egy másik dupla mutáns, a CB<sub>1</sub>R-DAA működésének jellemzőit vizsgáltuk meg. A G-fehérje BRET módszerrel kapott dózis-hatás görbéken látszott, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAA képes G-fehérjét aktiválni, bár a vad típusú CB<sub>1</sub>R-nál kisebb mértékben (kb. 75%-ban). Mindazonáltal a pEC<sub>50</sub> értékek és a bazális G-fehérje aktiváció nem változott jelentős mértékben (30. ábra, A és B, 4. táblázat).



### 30. ábra A CB<sub>1</sub>R-DAA mutáns működésének elemzése

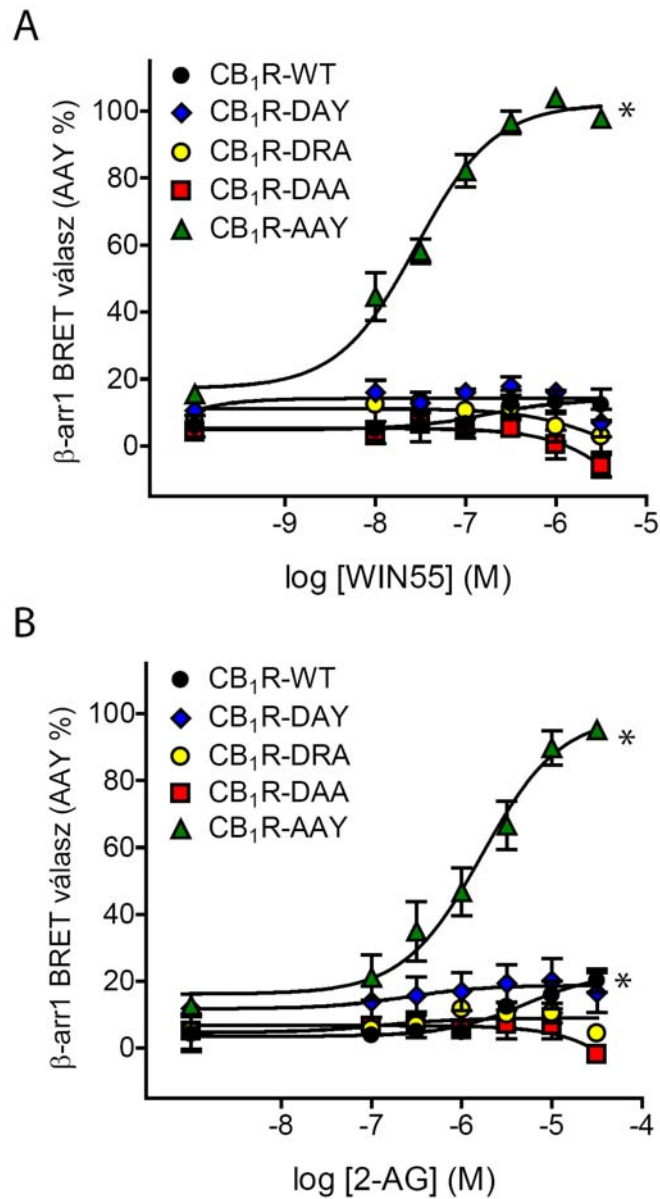
A-B, Dózis-hatás görbék, melyek a vad típusú CB<sub>1</sub>R (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DAA (fekete görbék) G<sub>0</sub>-fehérje BRET válaszát mutatják CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (A) vagy 2-AG-val (B) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (A), ill. 2-AG (B) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=4-8. C-F,

Konfokális felvételek, melyek a  $\beta$ -arr2-GFP elhelyezkedését mutatják CB<sub>1</sub>R-DAA-t kifejező CHO sejtekben, kontroll körülmények között (C és E), ill. 10 perces WIN55 (1  $\mu$ M, D) vagy AM251 (10  $\mu$ M, F) kezelést követően. Az ábrán három független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. Lépték: 10  $\mu$ m. G-H, Dózis-hatás görbék, melyek a  $\beta$ -arr2 BRET választ (azaz a  $\beta$ -arr2 plazmamembránhoz történő kihelyeződését) mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (szürke görbék), ill. a CB<sub>1</sub>R-DAA-t (fekete görbék) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (G) vagy 2-AG-val (H) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 (G), ill. 2-AG (H) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=4-7.

A CB<sub>1</sub>R-DAA-val együtt kifejezett  $\beta$ -arr2-GFP konfokális mikroszkópos elemzése azt mutatta, hogy ez a mutáns, hasonlóan az összes korábban vizsgált DRY mutáns CB<sub>1</sub>R-hoz, kontroll körülmények között is köti a  $\beta$ -arr2-t a plazmamembránál (30. ábra, C és E), és ez visszafordítható AM251 kezeléssel (30. ábra, F). Érdekes módon azonban a CB<sub>1</sub>R agonista WIN55 hozzáadását követően semmilyen további  $\beta$ -arr2-GFP kihelyeződést nem észleltünk (30. ábra, D). Ezen eredményeket a  $\beta$ -arr2 BRET méréseink megerősítették, amennyiben ezek a kísérletek is kimutatták a CB<sub>1</sub>R-DAA bazális  $\beta$ -arr2 kötését, amely azonban agonista hozzáadásával tovább nem fokozható (30. ábra, G).

#### 5.3.4. A DRY mutánsok $\beta$ -arr1 kötésének vizsgálata

Korábbi méréseink során nem tudtunk szignifikáns  $\beta$ -arr1 kihelyeződést kimutatni a vad típusú CB<sub>1</sub>R ingerlését követően. Ugyanakkor, miután kiderült, hogy a DRY régió mutációi jelentős mértékben képesek befolyásolni a  $\beta$ -arr2 kötését, felmerült, hogy ezek a különbségek a  $\beta$ -arr1 kötésében is megmutatkozhatnak. Ennek a kérdésnek a vizsgálatára a fentihez hasonló BRET-alapú megközelítést használtuk, azaz a  $\beta$ -arr1-Rluc plazmamembránhoz való kihelyeződését követtük, és dózis-hatás görbéket vettünk fel WIN55-tel, illetve 2-AG-val.



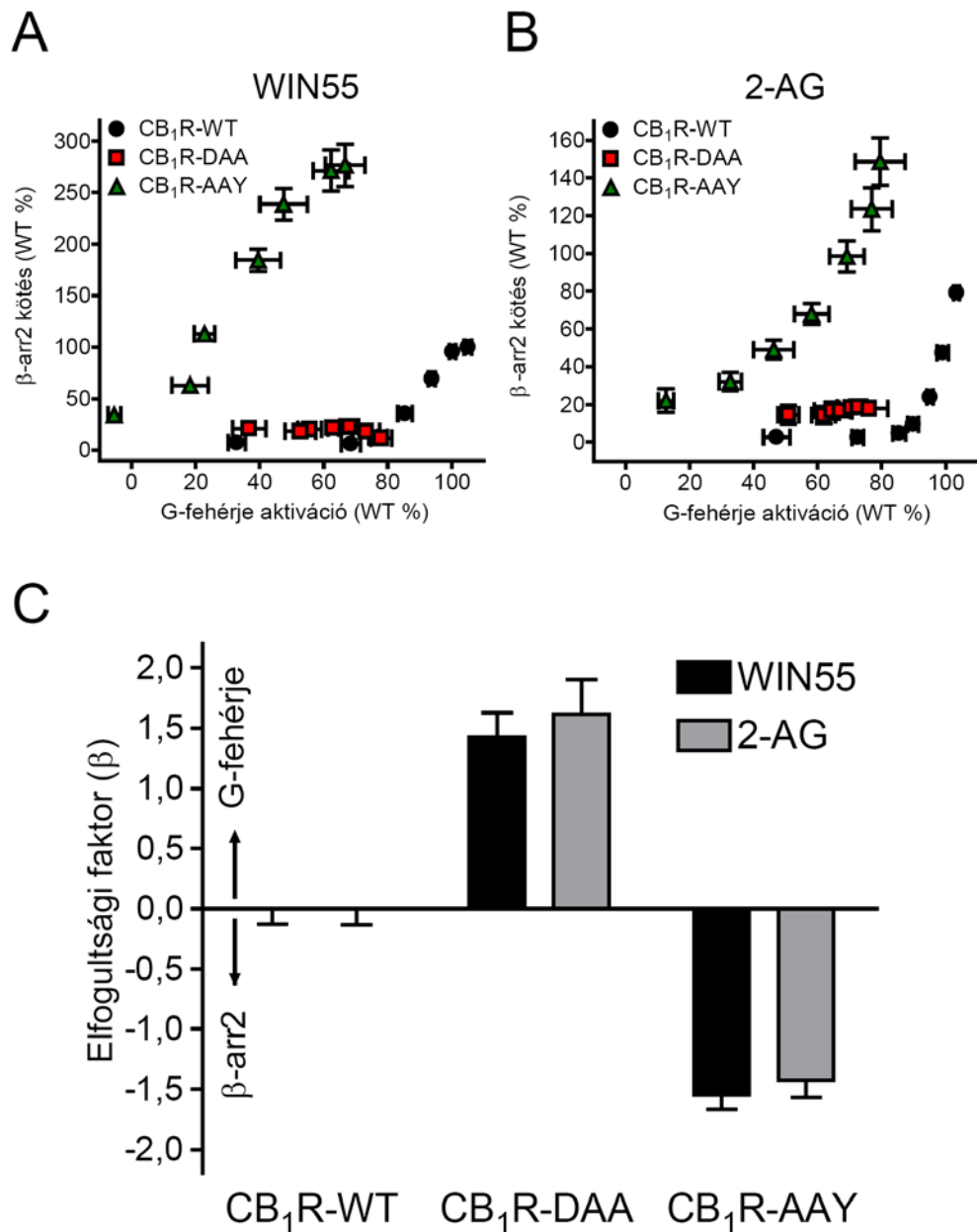
31. ábra A CB<sub>1</sub>R mutánsok β-arr1 kötését bemutató dózis-hatás görbék

A-B, Dózis-hatás görbék, melyek a β-arr1 BRET választ (azaz a β-arr1 plazmamembránhoz történő kihelyeződését) mutatják vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (fekete körök), CB<sub>1</sub>R-DAY-t (fehér rombuszok), CB<sub>1</sub>R-DRA-t (fehér körök), CB<sub>1</sub>R-DAA-t (fehér négyzetek), ill. CB<sub>1</sub>R-AAY-t (fehér háromszögek) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel (A) vagy 2-AG-val (B) stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli, amit inverz agonista (AM251, 10 μM) kezeléssel értünk el, míg a 100% a CB<sub>1</sub>R-AAY maximális WIN55 (A), ill. 2-AG (B) által létrehozott válaszána (E<sub>max</sub>) felel meg. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk, n=3. \*p<0,05 a vivőanyaggal történő kezeléshez képest.

Eredményeink azt mutatták, hogy az agonista-indukált  $\beta$ -arr1 kihelyeződés igen alacsony a vad típusú CB<sub>1</sub>R-t kifejező sejtekben, ami annyit jelent, hogy csupán 2-AG kezelés esetén kaptunk statisztikailag jelentős mértékű emelkedést, míg a WIN55 által létrehozott változások nem bizonyultak szignifikánsnak (31. ábra, A és B). Érdekes módon a CB<sub>1</sub>R-AA<sub>Y</sub> mutáns jelentősen fokozott  $\beta$ -arr1 kötést mutatott, mind WIN55, mind 2-AG serkentés esetén. Mindhárom másik mutáns (CB<sub>1</sub>R-DAY, CB<sub>1</sub>R-DRA és CB<sub>1</sub>R-DAA) csupán nem-szignifikáns változásokat hozott létre a  $\beta$ -arr1 plazmamembránhoz történő kihelyeződésében.

### 5.3.5. A CB<sub>1</sub>R-AA<sub>Y</sub> és a CB<sub>1</sub>R-DAA mutánsok elfogult jelátvitelének elemzése

A fenti eredmények arra utaltak, hogy a CB<sub>1</sub>R konzervált DRY motívumában létrehozott különböző mutációk eltérően befolyásolhatják ugyanazon receptor G-fehérje aktivációját és  $\beta$ -arr2 kötését, és ezáltal jelátvitel-szelektív mutánsok jöhetnek létre. Ez az adatok alapján a CB<sub>1</sub>R-AA<sub>Y</sub> és a CB<sub>1</sub>R-DAA mutánsok esetén volt a legkifejezettebb. A továbbiakban szerettük volna ezt a jelátviteli elfogultságot pontosabb módon is kiértékelni, ezért két különböző módszert is alkalmaztunk a kapott adatok elemzésére, melyeket Rajagopal és munkatársai javasoltak [220]. Az első az *ekvimoláris összehasonlítás* volt, melynek során az azonos receptornál, ugyanolyan ligand-koncentrációk által kiváltott G-fehérje és  $\beta$ -arr2 válaszokat ábrázoltuk egymás függvényében. A referencia-receptor, azaz a vad típusú CB<sub>1</sub>R esetében ez az analízis egy hiperbola-szerű alakot ad mind WIN55, mind 2-AG esetén (32. ábra, A és B, fekete körök). Ez a G-fehérje és a  $\beta$ -arr2 válaszok során kapott jel erősítésének különbségét tükrözi. Lényeges, hogy a CB<sub>1</sub>R-AA<sub>Y</sub>-hoz tartozó pontok jelentősen balra tolódtak ezen az ábrán, ami a  $\beta$ -arr2 kötés irányába való elfogultságot jelenti (32. ábra, A és B, fehér háromszögek). Továbbá az is látható, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAA-hoz tartozó pontok ilyen ábrázolásnál gyakorlatilag egy vízszintes vonal mentén helyezkednek el, jelezvén e mutáns G-fehérje aktiváció irányába való elfogultságát (32. ábra, A és B, szürke négyzetek).



32. ábra A CB<sub>1</sub>R mutánsok funkcionális szelektivitását bemutató jelátviteli adatelemzés

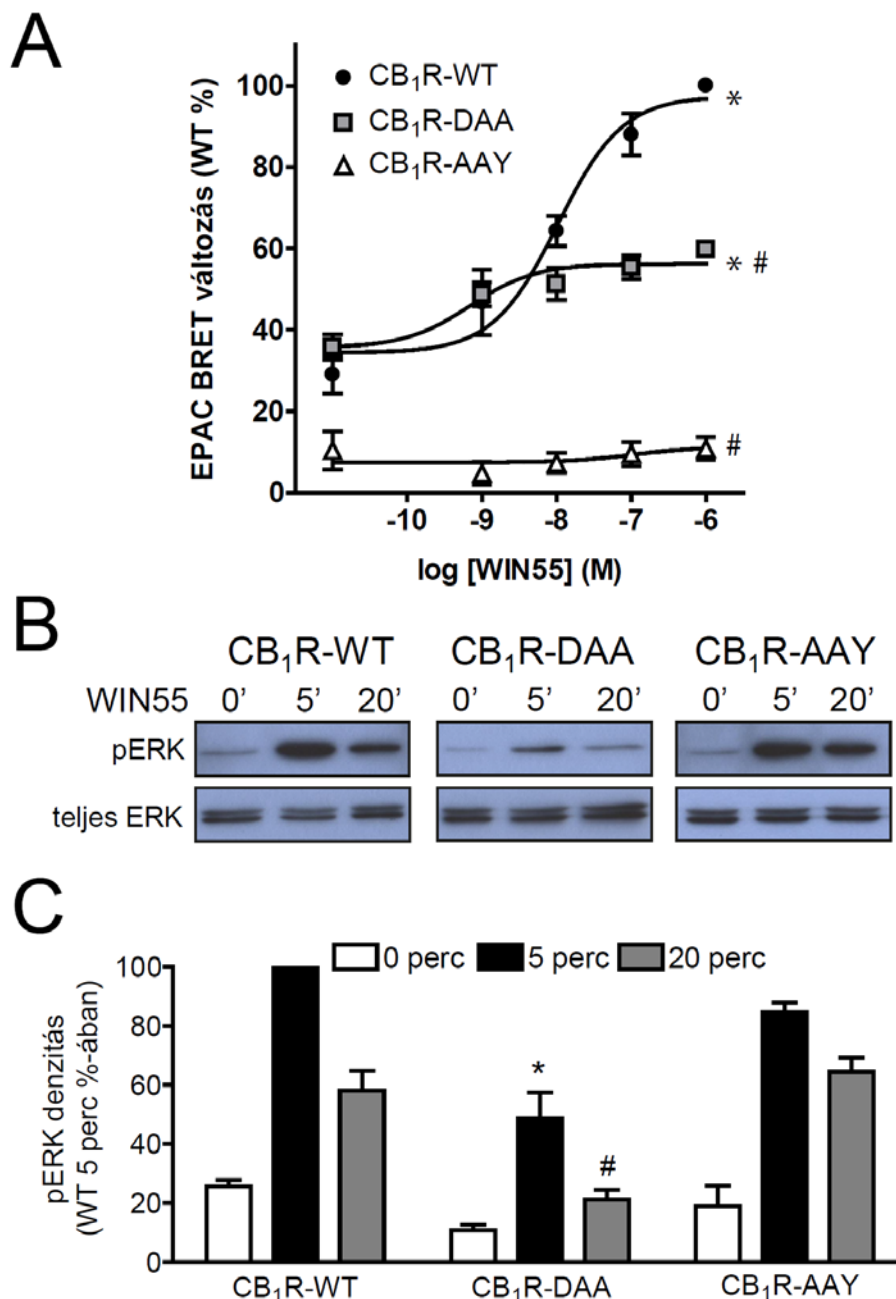
A-B, A vad típusú CB<sub>1</sub>R (fekete pontok), valamint a CB<sub>1</sub>R-DAA (szürke négyzetek) és a CB<sub>1</sub>R-AAAY (fehér háromszögek) mutánsok jelátvitelét összehasonlító ekvimoláris analízis. Minden egyes pont egy adott WIN55- (A), ill. 2-AG- (B) koncentrációt tükröz, az ábra az adott koncentráció által kiváltott G<sub>o</sub>-fehérje BRET, ill.  $\beta$ -arr2 BRET válaszokat mutatja egymás függvényében. A CB<sub>1</sub>R-AAAY pontok balra és felfelé tolódása a  $\beta$ -arr2 kötés irányába való elfogultságra utal, míg a CB<sub>1</sub>R-DAA pontok lefelé tolódása a G-fehérje irányú elfogultságot jelzi. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk. C, A vad típusú CB<sub>1</sub>R, ill. a CB<sub>1</sub>R-DAA és a CB<sub>1</sub>R-AAAY mutánsok jelátvitelét összehasonlító ekviaktív analízis. Minden receptor esetén

meghatároztuk az elfogultsági faktort ( $\beta$ ), a WIN55-tel (fekete oszlopok), ill. 2-AG-val (szürke oszlopok) készült  $G_o$ -fehérje BRET, ill.  $\beta$ -arr2 BRET dózis-hatás görbék  $EC_{50}$  és  $E_{max}$  értékei alapján. A  $\beta$ -t leíró pontos képletet ld. a Módszerek c. fejezetben. A vad típusú  $CB_1R$ -t tekintettük referencia-receptornak. A pozitív értékek a G-fehérje felé kialakult elfogultságra utalnak, a negatív értékek  $\beta$ -arresztin irányú elfogultságot tükröznek. Az adatokat átlag  $\pm$  SD formában ábráztuk.

A másik módszer az *ekviaktív összehasonlítás*, ahol az egyes receptorok jelátvitelét egy úgynevezett elfogultsági faktor (*bias factor*,  $\beta$ ) segítségével jellemezzük, amelyet a G-fehérje, illetve  $\beta$ -arr2 dózis-hatás görbék  $EC_{50}$  és  $E_{max}$  értékei alapján határozzuk meg [220]. A referencia-receptor (vad-típusú  $CB_1R$ ) esetén ez az érték definíció szerint 0. A  $CB_1R$ -DAA esetén a  $\beta$  értékek 1,42 és 1,61 voltak (WIN55 és 2-AG esetén, rendre) míg ugyanezek az értékek  $CB_1R$ -AAV esetén -1,54 és -1,42-nek adódtak. Ez (a  $\beta$  faktor logaritmikussága miatt) a két receptor több mint 10-szeres elfogultságát jelenti, a  $CB_1R$ -DAA esetén a G-fehérje aktiválás, a  $CB_1R$ -AAV esetén pedig a  $\beta$ -arr2 kötés irányába (32. ábra, C).

### **5.3.6. A $CB_1R$ -AAV és a $CB_1R$ -DAA mutánsok további jelátvitelének vizsgálata**

A továbbiakban meg akartuk vizsgálni, hogy a receptor és az elsődleges effektor fehérjék (G-fehérje és  $\beta$ -arresztin) kapcsolódásának szintjén talált különbségek jelentkeznek-e a  $CB_1R$  által indított jelpályák későbbi eseményeinél is. Először a receptorok  $G_{i/o}$ -mediált jelátvitelét értékeltük ki, a forskolin-indukált cAMP felhalmozódás gátlásának mérésén keresztül, amelyhez egy EPAC alapú intramolekuláris BRET szenzort használtunk (ld. 16. ábra; [215]). Eredményeink alapján a  $CB_1R$  már nem stimulált állapotban is gátolja a forskolin-indukált cAMP felhalmozódást, és ez jelentősen, valamint dózis-függő módon fokozódik WIN55 hatására (33. ábra, A). Lényeges eredmény, hogy a G-fehérjék irányába elfogult  $CB_1R$ -DAA mutáns WIN55-indukált cAMP gátlása kisebb mértékűnek bizonyult ugyan, de továbbra is jelen volt a sejtekben, míg a  $CB_1R$ -AAV –  $\beta$ -arresztin-szelektivitásával összhangban – nem volt képes gátolni a cAMP felhalmozódását, agonista serkentést követően (33. ábra, A).



33. ábra A vad típusú és mutáns CB<sub>1</sub>R-ok további jelátvitelét bemutató funkcionális vizsgálatok

A, Dózis-hatás görbék, melyek a forskolin-indukált cAMP felhalmozódás gátlását mutatják (az EPAC-alapú intramolekuláris BRET szenzorral kapott BRET válaszokon keresztül), vad típusú CB<sub>1</sub>R-t (fekete körök), ill. a CB<sub>1</sub>R-DAA-t (szürke négyzetek) és a CB<sub>1</sub>R-AAY-t (fehér háromszögek) kifejező CHO sejtekben, bazális és különböző WIN55-tel stimulált körülmények között. A 0% a receptorok teljesen inaktív állapotát jelöli,

amit inverz agonista (AM251, 10  $\mu$ M) kezeléssel értünk el, míg a 100% a vad típusú CB<sub>1</sub>R maximális WIN55 által létrehozott válaszána ( $E_{max}$ ) felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=6. \*p<0,05 a bazális állapothoz képest, #p<0,05 a vad típusú CB<sub>1</sub>R-hoz képest. B, A foszforilált ERK1/2 (pERK) és a teljes ERK1/2 fehérjék mennyiségének kimutatása Western blottal, vad típusú CB<sub>1</sub>R-t, CB<sub>1</sub>R-DAA-t vagy CB<sub>1</sub>R-AA<sub>2</sub>-t kifejező CHO sejtekben, 0, 5 vagy 20 perces WIN55 (1  $\mu$ M) kezelést követően. Az ábrán négy független kísérletből származó reprezentatív felvételek láthatók. C, A Western blot adatok számszerűsítése. A 0% a háttér intenzitását jelenti, a 100% pedig a vad típusú CB<sub>1</sub>R esetén, 5 perces WIN55 kezelés után mért pERK intenzitásnak felel meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában ábrázoltuk, n=4, \*p<0,05 a vad típusú CB<sub>1</sub>R 5 perces kezeléséhez képest, #p<0,05 a vad típusú CB<sub>1</sub>R 20 perces kezeléséhez képest.

Mivel néhány nemrég megjelent közlemény szerint a CB<sub>1</sub>R által létrehozott ERK1/2-választ – melyet korábban G-fehérje-függő folyamatok eredményének tekintettek [180, 223, 224] – a  $\beta$ -arresztinek is közvetíthetik [182, 184], meg akartuk vizsgálni, hogy az ERK1/2 válaszok milyen korrelációt mutatnak az elfogult CB<sub>1</sub>R mutánsok  $\beta$ -arresztin kötésével, illetve G-fehérje aktivációjával. A vad-típusú CB<sub>1</sub>R-t kifejező sejtekkel végzett Western blot kísérletek a foszforilált ERK1/2 (pERK1/2) mennyiségének erőteljes emelkedését mutatták 5 perces WIN55 (1  $\mu$ M) kezelést követően. Ezen kívül alacsonyabb, de továbbra is emelkedett pERK1/2 szinteket észleltünk 20 perces WIN55-kezelést követően (33. ábra, B és C). Azt láttuk továbbá, hogy a  $\beta$ -arr2 szelektív CB<sub>1</sub>R-AA<sub>2</sub> a vad típusú CB<sub>1</sub>R-hoz hasonló pERK1/2 válaszokat vált ki, mind 5 perces, mind 20 perces serkentést követően, míg a G-fehérje szelektív CB<sub>1</sub>R-DAA mutáns szignifikánsan alacsonyabb pERK1/2 választ hozott létre, mint a vad típusú receptor (33. ábra, B és C).

## 6. Megbeszélés

### *6.1. A CB<sub>1</sub>R és a β-arresztinek közötti kapcsolat jellemzése*

Konfokális mikroszkóppal, illetve BRET módszerrel végzett méréseink azt mutatták, hogy a CB<sub>1</sub>R β-arresztin kötésének affinitása általánosan alacsonynak mondható más receptorokéhoz (pl. AT<sub>1</sub>R, β<sub>2</sub>AR) képest. Ezen belül a CB<sub>1</sub>R és a β-arr1 közötti kapcsolatot az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között sem konfokális mikroszkóppal, sem az általában érzékenyebbnek mondható BRET módszerrel nem sikerült kimutatnunk, amennyiben azt WIN55 stimulálást követően vizsgáltuk. A későbbi, DRY mutánsokkal végzett BRET vizsgálatokban is részben hasonló eredményeket kaptunk, vagyis a vad típusú CB<sub>1</sub>R WIN55-tel történő ingerlése ezen mérésekben sem hozott létre szignifikáns mértékű β-arr1 kihelyeződést. Itt azonban a 2-AG kezelést követően statisztikailag is jelentős mértékű β-arr1 kötést tudtunk kimutatni.

A fenti eredmények alapján úgy tűnik, hogy a β-arr1 kötődése a CB<sub>1</sub>R-hoz igen gyenge. Olyannyira, hogy konfokális mikroszkópiával – legalábbis a mi kísérleti körülményeink között – még a két fehérje jelentős túlexpresszállása mellett sem tehető láthatóvá, az ennél jelentősen érzékenyebbnek tekinthető BRET módszer esetén pedig a kimutathatóság határán van.

Mint a bevezetőben említettük, korábban igen kevés előzetes adat állt rendelkezésre a CB<sub>1</sub>R β-arr1 kötésével kapcsolatban. Egy régebbi tanulmányban Bakshi és munkatársai nukleáris mágneses rezonancia (NMR) módszer segítségével igazolták, hogy a CB<sub>1</sub>R-nak egy C-terminális darabja képes kötődni a β-arr1-hez [211]. A fenti eredményeink közlése óta további munkacsoportok is vizsgálták a két fehérje kölcsönhatását. Egy nemrég megjelent közleményben különböző kannabinoid agonisták funkcionális szelektivitását tanulmányozták, és kimutatták, hogy a β-arr1 képes kötődni a CB<sub>1</sub>R-hoz, ez a kapcsolat azonban agonista-függő különbségeket mutat, pl. 2-AG esetén jelentősen nagyobb mértékű, mint a WIN55 serkentés hatására [183]. Megjegyzendő, hogy ezeket a méréseket egy β-arr2-t nem, csak β-arr1-et kifejező sejttypusban végezték. Egy másik, közelmúltban

megjelent tanulmány hasonló eredményeket mutat ki: a WIN55 gyengén, a 2-AG valamivel tartósabban fokozza a  $\beta$ -arr1 kötődését a CB<sub>1</sub>R-hoz, de mindkét esetben csak átmeneti kapcsolódásról beszélhetünk [225]. Fenti eredmények annyiban egyeznek a mi adatainkkal, hogy a 2-AG nagyobb mértékben (adott esetben kevésbé érzékeny körülmények között is kimutathatóan) lehet képes a  $\beta$ -arr1 kihelyeződését serkenteni a CB<sub>1</sub>R-hoz, mint a WIN55.

Eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a CB<sub>1</sub>R alapvetően igen kis affinitással köti a  $\beta$ -arr1 izoformát. A kötés erőssége ezen belül a vizsgált sejtípustól, illetve az alkalmazott agonistától függően is különbségeket mutathat.

Az adatokból az is látszik, hogy a CB<sub>1</sub>R különbséget tesz a két  $\beta$ -arresztin izoforma között, amennyiben a  $\beta$ -arr2-t agonista hatására más receptorokhoz képest kisebb affinitással köti, a  $\beta$ -arr1-et azonban még ennél is sokkal gyengébben. Továbbá a  $\beta$ -arr2 kötése is egyértelműen csak a plazmamembrán közvetlen közelében zajlik, endoszómás vezikulumokban a  $\beta$ -arr2 nem fordult elő a CB<sub>1</sub>R-ral együtt. Mindezen eredmények – a két  $\beta$ -arresztin izoforma eltérő kötése, erősebb  $\beta$ -arr2 kötéssel, illetve átmeneti, csak a plazmamembrán közelében kialakuló kapcsolat – egyértelműen azt mutatják, hogy a CB<sub>1</sub>R a 7TMR-ok „A” osztályába tartozik. Ezt a következtetést, illetve az ehhez vezető részletes eredményeket – a 2013-ban megjelent közleményünket megelőzően – nemzetközi folyóiratban nem közöltük, de munkacsoportunk egyik tagja, Dr. Turu Gábor 2008-ban írt PhD dolgozatában már leírja, mint megállapítást. Ő azonban csak a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arr2 kapcsolatának vizsgálatából vonta le ezt a következtetést, és dolgozatában nem is tárgyalta részletesen. A dolgozatomban bemutatott,  $\beta$ -arr1-gyel végzett kísérletek lényeges kiegészítést jelentenek, és egyben megerősítik az ott leírtakat, miszerint a CB<sub>1</sub>R a 7TMR-ok „A” osztályába sorolható  $\beta$ -arresztin kötés szempontjából.

Eredményünk egyébként jól egybevágh azzal a bevezetésben említett elmélettel is, mely szerint a 7TMR-ok „A” vagy „B” osztályú viselkedését alapvetően a receptorok C-terminálisán található Ser/Thr csoportok hiánya vagy jelenléte határozza meg. A CB<sub>1</sub>R ezen régiójában ugyanis csupán egy ilyen csoport fedezhető fel (463-SVSTDTTS-469).

A CB<sub>1</sub>R „A” osztályú viselkedésének fontos hatása lehet a receptor internalizációjára, de-, ill. rezenszitizációjára. Továbbá a CB<sub>1</sub>R jelátvitelének vizsgálatakor is figyelembe kell vennünk ezt a tulajdonságát. A  $\beta$ -arresztin ugyanis – amint a

bevezetésben kifejtettük – maga is számos jelátviteli utat elindíthat, és az „A”, illetve „B” osztályú  $\beta$ -arresztin kötés ezt a jelátvitelt (pl. a receptorról induló ERK1/2 aktivációt) is nagyban befolyásolja (ld. 2.2.3.4. fejezet). Azaz, bár ilyen irányú közvetlen adatok jelenleg nem állnak rendelkezésre, igen valószínű, hogy a  $CB_1R$  által indított ERK1/2 aktiváció sejten belüli eloszlását is markánsan befolyásolja a receptor arresztinek iránti affinitása. E feltételezések megerősítéséhez természetesen további, közvetlenebb vizsgálatok szükségesek.

## ***6.2. A $CB_1R$ konstitutív és agonista-indukált internalizációjának részletes vizsgálata***

A  $CB_1R$  internalizációjának konfokális mikroszkópos vizsgálatokor a Halo-jelölési technikát alkalmaztuk. E módszer alkalmazását érdemes röviden tárgyalni. A 7TMR-ok membránforgalmát gyakran követik fluoreszcens fehérjék segítségével, melyeket leggyakrabban a receptor intracelluláris, C-terminális végéhez kapcsolnak. Mi is alkalmaztunk ilyen variánsokat (pl.  $CB_1R$ -mCherry,  $CB_1R$ -mVenus) a receptor kifejeződésének, illetve elhelyezkedésének megítélésére. Ugyanakkor az így jelölt receptorok internalizációjának láthatóvá tétele, illetve annak pontos elemzése gyakran nehézségekbe ütközik, főként a folyamatosan látható sejten belüli receptorpopuláció miatt, ami az érésben lévő, vagy az endoszómákban helyet foglaló receptorokat tükrözi. Különösen igaz ez a konstitutívan internalizálódó receptorokra, mint amilyen a  $CB_1R$  is. Ez az intracelluláris fluoreszcencia nagy sejten belüli háttérrel jelent már a vizsgálat kezdetekor is, ami megnehezíti a különböző kezeléseket követő változások pontos kiértékelését. Az is komplikálhatja az így nyert adatokat, hogy a receptorok eloszlása a plazmamembrán, illetve a sejten belüli vezikulumok között nem csak az internalizáció, hanem a reciklizáció sebességétől is függ, azaz mindig e két folyamat aktuális egyensúlyát tükrözi. Ha pedig a sejtet pl. antagonistával kezeljük, az elméletileg mindkét folyamatot befolyásolhatja: az internalizáció csökkenhet a receptor konstitutív aktivitásának gátlása miatt, illetve a reciklizáció is megváltozhat azáltal, hogy a receptor más sejten belüli útvonalakra terelődik. Így tehát a C-terminálisan jelölt receptorok mennyiségének mérése a sejtben félrevezető

lehet, ha kizárólag a receptor (konstitutív) internalizációját szeretnénk követni. Továbbá bizonyos eredmények szerint maga a C-terminális jelölés is megváltoztathatja a CB<sub>1</sub>R-ok sejten belüli forgalmát [207]. Mindezek a nehézségek megoldhatók olyan N-terminális jelzőfehérjék alkalmazásával, melyek kovalensen jelölhetők kisméretű, membrán-impermeábilis fluoreszcens ligandokkal. Ilyen technikát a CB<sub>1</sub>R internalizációjának vizsgálatakor is alkalmaztak már (SNAP- és CLIP-jelölt CB<sub>1</sub>R-ok [226, 227]). Mi a munkánk során egy harmadik variánst, a Halo-jelzést használtuk. Mint arra az Eredmények c. fejezetben utaltunk, a Halo-CB<sub>1</sub>R G-fehérje aktivációja és  $\beta$ -arresztin kötése nem változott jelentős mértékben az N-terminális jelölés következtében, így ez a receptor a korábban használtakhoz hasonló előnyök mellett alkalmazható a CB<sub>1</sub>R internalizációjának vizsgálatára.

A domináns negatív  $\beta$ -arr2-vel valamint  $\beta$ -arr2 siRNS-sel végzett konfokális és BRET méréseink eredményei arra utalnak, hogy a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációja  $\beta$ -arr2-függő módon megy végbe. Ez nem meglepő eredmény annak tükrében, hogy – amint a bevezetőben leírtuk – a  $\beta$ -arr2 és a CB<sub>1</sub>R közötti kapcsolódást, valamint a  $\beta$ -arresztinek szerepét a CB<sub>1</sub>R deszenzitizációjában korábbi tanulmányok már igazolták. Ezek után a  $\beta$ -arr2-nek a CB<sub>1</sub>R endocitózisában betöltött szerepe is logikus és talán egyértelmű következménynek tűnik. Mégis fontosnak tartottuk e kérdés részletesebb vizsgálatát, mert valójában a fenti vizsgálatok egyike sem szolgált sejtszintű, közvetlen bizonyítékkal arra, hogy a  $\beta$ -arresztin kötés szükséges a CB<sub>1</sub>R internalizációjához. Ennek azért van jelentősége, mert több példát is találunk a 7TMR-ok között arra, hogy a  $\beta$ -arresztin kötés és a receptor internalizációja párhuzamosan, de valójában egymástól függetlenül vannak jelen. Így viselkedik például a PAR1 trombin receptor [53], a CXCR2 kemokin receptor [228, 229], az FPR N-formil-peptid receptor [230] vagy magas agonista koncentrációk esetén az AT<sub>1</sub>R is [60, 231, 232]. Mindez megadta a kérdés közvetlen vizsgálatának értelmét. Eredményeink ugyanakkor egyértelművé tették, hogy a CB<sub>1</sub>R nem csatlakozik a 7TMR-ok imént felsorolt csoportjához. A  $\beta$ -arr2 szerepe a CB<sub>1</sub>R-ok szabályozásában nem csak a receptorhoz való kötődésig és a deszenzitizációig terjed, hanem a receptor serkentést követő endocitózisát is irányítja.

Ezzel szemben a fenti technikákat alkalmazva – domináns negatív  $\beta$ -arr2 és  $\beta$ -arr2 siRNS – azt láttuk, hogy a CB<sub>1</sub>R 6 óra alatt kialakuló konstitutív internalizációja a  $\beta$ -arr2-től független folyamat. Korábban McDonald és munkatársai vetették fel, hogy a konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció mechanizmusa nem azonos az agonista-indukált endocitózisával [187]. Jelen munkánk kísérletes bizonyítékokat mutat e felvetés megerősítésére. Ugyanakkor ez a típusú szabályozási jelenség nem egyedülálló tulajdonsága a CB<sub>1</sub>R-nak, hiszen hasonló különbségeket írtak le a tónusos és az agonista-indukált internalizáció mechanizmusa között más 7TMR-ok esetében is, mint pl. a TP tromboxán A<sub>2</sub> receptor [54], az Y1 neuropeptid Y receptor [72] vagy a mGlu<sub>1</sub> metabotróp glutamát receptor [69].

Eredményeinkből az is kitűnik, hogy a CB<sub>1</sub>R spontán internalizációja nem egyszerűen a konstitutív aktivitás következménye, hiszen az inverz agonista AM251 jelenlétében is kialakul, amikor pedig valamennyi receptor inaktív konformációban stabilizálódik. Ez összhangban van McDonald és munkatársai adataival, akik nem találtak változást a CB<sub>1</sub>R eloszlásában inverz agonista kezelést követően idegsejtekben [187]. Ezzel szemben egy korábbi tanulmány, melyben szintén inverz agonistát használtak [186], illetve a munkacsoportunk által korábban közölt adatok, melyekben DAG-lipáz gátlószert alkalmaztunk [189], a receptor bazális endocitózisának gátlását mutatták e kezeléseket követően. Ez a következmény viszont arra utal, hogy a receptor folyamatos internalizációjának mégiscsak a bazális CB<sub>1</sub>R aktivitás (illetve a bazális 2-AG termelés) állhat a háttérben. Mivel pedig az (akár bazálisan) aktivált receptorok  $\beta$ -arr2-függő mechanizmussal internalizálódnak, ez utóbbi eredmények ellentétesnek tűnnek a mi jelen eredményeinkkel, ahol is azt láttuk, hogy a  $\beta$ -arr2 kifejeződésének vagy működésének gátlása nincs hatással a konstitutív internalizációra. Az egyik lehetséges magyarázat a látott különbségekre az a korábbi megfigyelésünk, hogy a CB<sub>1</sub>R bazális aktivitása az érintett tanulmányokban használt különböző sejttípusokban eltérő mértékű (saját, nem publikált megfigyelés). A másik lehetőség, hogy az inverz agonistával történő gátló kezelés nem csupán a receptor aktivitás-függő endocitózisát gátolja, de – lipidoldékony vegyület lévén – a sejtbe bejutva komplexebb módon is megváltoztathatja annak sejtben belüli mozgását, például gyorsíthatja a reciklizációt, és így a receptor aktivitás-függő bazális internalizációját ezekben a mérésekben túlbecsülhették. Ebbe az irányba mutat az a

megfigyelés is, hogy nyugvó sejtekben nem látunk  $\beta$ -arr2-t a plazmamembránál. Ez pedig arra utal, hogy ott alacsony az aktív receptorok aránya (ld. 17. ábra, E, valamint 27. ábra, C). Itt utalok vissza a Halo-technika előnyére, mellyel a sejtfelszíni receptorokat szelektíven tudjuk követni, és így a belső kompartmentekből történő hosszabb távú kihelyeződés, illetve reciklizáció kevésbé befolyásolja az eredményeket.

Összességében az itt közölt eredmények – a korábbi adatokkal egybevetve – egy olyan modellel vannak összhangban, mely szerint a sejtekben a CB<sub>1</sub>R folyamatos internalizációjának egy bizonyos hányadáért a bazális endokannabinoid-tónus felelős – ennek mértéke pedig sejttípusonként változó lehet (pl. a jelen kísérletekben alkalmazott HeLa sejtekben kisebb, a más mérésekben használt CHO sejtekben nagyobb). A bazális CB<sub>1</sub>R internalizáció másik (valószínűleg nagyobb) része viszont „valóban” konstitutív, azaz független a receptor aktivációjától, és egy olyan mechanizmussal jön létre, mely nem igényel  $\beta$ -arr2-t, azaz különbözik az agonista-indukált internalizáció folyamatától.

Mi lehet ez a mechanizmus? Mint a bevezetőben láttuk, számos lehetőség van a  $\beta$ -arr2-függő endocitózison kívül, mellyel a 7TMR-ok internalizációja megvalósulhat. Kísérleteinkben megmutattuk, hogy a konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció az agonista-indukált formához hasonlóan (legalább részben) klatrin-függő módon megy végbe. Továbbá valószínűleg dinamin is szerepet játszik a folyamatban, emellett szól a klatrin-függő endocitózis általánosan elfogadott mechanizmusa, illetve a bevezetőben említett, közvetlenül a CB<sub>1</sub>R-ra vonatkozó korábbi eredmények is [186]. Mint azt szintén a bevezetőben ismertettük, a  $\beta$ -arrestintől független, de klatrin-függő internalizáció esetén a receptornak rendelkeznie kell egy saját AP-2 kötő motívummal (pl. YXX $\Phi$ ) [38]. Az AP-2 komplex, illetve az ahhoz közvetlenül kötődő eps15 fehérje szerepét kimutatták a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációjában [186], és a receptor aminosav-szekvenciája alapján lehet AP-2 kötő funkciója az ICL2-es (224-YKRI-227) vagy az ICL3-as (296-YILW-299) hurokban található motívumoknak. (E feltételezés bizonyításához természetesen közvetlen vizsgálatok szükségesek.) A fentiek alapján tehát a legvalószínűbb, hogy a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációja az AP-2 közvetlen kötésével, klatrin- és dinamin-függő módon zajlik le. Emellett természetesen nem zárható ki más (pl. kaveola-függő) mechanizmusok párhuzamos jelenléte sem.

Bár vizsgálataink céljai között közvetlenül nem szerepelt, mégis érdemes felvetni a kérdést: mi lehet valójában a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációjának élettani jelentősége? A magyarázattal kapcsolatos bizonytalanságra a bevezető fejezetben is rávilágítottam. Bár idegsejtekben van elképzelés a jelenség fontosságára – a változó mértékű spontán internalizáció áll a receptor megfelelő sejten belüli eloszlásának hátterében – ez azonban nem ad teljes magyarázatot. Figyelembe kell vennünk, hogy a CB<sub>1</sub>R számos nem-neuronális sejtípusban is kifejeződik, és jelenleg sajnos semmilyen adatunk nincs arra vonatkozóan, hogy ezekben a szövetekben milyen mértékű a receptor folyamatos internalizációja, illetve, hogy ennek mi lehet a jelentősége. Mindazonáltal több eredmény is utal arra, hogy a sejten belüli CB<sub>1</sub>R-ok működőképessége, aktiválhatósága megtartott [208, 233]. Mivel a receptor endogén ligandjai is hidrofób természetűek, így ebből a szempontból sincs akadálya annak, hogy a sejten belüli vezikulumokban elhelyezkedő receptorról is induljon jelátvitel. Ez alapján felmerül, hogy a sejten belüli, illetve a plazmamembránon elhelyezkedő receptorpopulációk aktivációja eltérő jelátvitelt indít, és így eltérő sejtfunkciókat szabályoz. Így a konstitutív CB<sub>1</sub>R internalizáció jelentősége abban állhat, hogy a belső kompartmentekből, illetve a plazmamembránról induló CB<sub>1</sub>R-függő jelátvitel közti egyensúlyt szabályozza [207]. Természetesen ez a gondolatmenet közvetlen bizonyítékokat igényel. Jelen vizsgálataink alapján annyit jelenthetünk ki, hogy a CB<sub>1</sub>R konstitutív internalizációja az agonista-indukált endocitózistól eltérő mechanizmussal jön létre, és így valószínűleg élettani szerepe is más.

### ***6.3. A konzervált DRY motívum szerepének vizsgálata a CB<sub>1</sub>R működésében***

Vizsgálataink harmadik részében a konzervált DRY motívum szerepét vizsgáltuk a CB<sub>1</sub>R működésének szabályozásában. Az volt a célunk, hogy értékeljük e szekvencia szerepét a receptor bazális és agonista-indukált G-fehérje aktivációjában, illetve β-arr2 kötésében, illetve hogy kimutassuk a receptor e két fő effektor funkciójában kialakuló esetleges különbségeket.

Érdekes módon a legkonzerváltabb, R3.50-es aminosav alanin-mutációja csak mintegy 15%-os csökkenést eredményezett a CB<sub>1</sub>R G-fehérje kapcsolódásának hatékonyságában, a bazális aktivációt, illetve az EC<sub>50</sub> értéket pedig nem érintette. Ez meglepő eredménynek tűnik, hiszen a kristálystruktúrák elemzése, valamint számos mutációs adat utal ezen oldallánc kitüntetett szerepére a 7TMR-ok G-fehérje kapcsolódásában. Ugyanakkor több olyan 7TMR létezik, ahol az R3.50 hasonló nem-konzervatív mutációja nem szüntette meg a G-fehérje aktiválást [6, 8]. Így a CB<sub>1</sub>R valószínűleg a 7TMR-oknak egy olyan alcsoportjába tartozik, ahol ez a konzervált arginin nem játszik kizárólagos szerepet a közvetlen receptor-G-fehérje kapcsolatban.

A vizsgálataink kimutatták továbbá, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAY mutánsnál (vagy bármely dupla/tripla mutánsnál, amely tartalmazza ezt a mutációt) megjelenik egy bazális  $\beta$ -arr2 kötés. Ez jó egyezést mutat korábbi adatokkal, melyek hasonló tulajdonságot jeleztek más R3.50 mutáns 7TMR-oknál [234], megerősítve azt az elképzelést, mely szerint ez a konzervált arginin valamiképpen megelőzi az arresztin kötetést a nyugalmi receptor-konformációban. A CB<sub>1</sub>R-DAY és a CB<sub>1</sub>R-DRA mutánsok esetén történő agonista-indukált  $\beta$ -arr2 kihelyeződés csökkent volt. Ennek hátterében valószínűleg a két mutáns csökkent plazmamembránon való kifejeződése áll (ld. 26. ábra, I).

A DRY motívum szerepére vonatkozó vizsgálataink legérdekesebb eredménye a két dupla mutáns, a CB<sub>1</sub>R-DAA és a CB<sub>1</sub>R-AAY működése között talált nagy különbség. Bár mindkét mutáns tartalmazza az R3.50A mutációt, és ennek megfelelően bazális  $\beta$ -arr2 kötetést mutat, a további jellemzőiket nagyban befolyásolja a második mutáció elhelyezkedése. A D3.49 és R3.50 oldalláncok együttes cseréje domináns-pozitív hatással van a receptor  $\beta$ -arr2 kötésére (amit az is alátámaszt, hogy a tripla mutáns CB<sub>1</sub>R-AAA működésében a CB<sub>1</sub>R-AAY-ra emlékeztet), míg a G-fehérje aktiváció jelentősen csökkent. Ezek alapján a CB<sub>1</sub>R-AAY egy  $\beta$ -arresztin-szelektív mutáns. Érdekes módon a CB<sub>1</sub>R-AAY-nak ez a jellemzője hasonlít a korábban leírt elfogult mutáns AT<sub>1</sub>R-DRY/AAY-ra (AT<sub>1</sub>R-AAY). Ugyanakkor fontos különbség, hogy míg az AT<sub>1</sub>R-AAY olyan módon  $\beta$ -arresztin-szelektív, hogy a G-fehérje aktivációja hiányzik, ugyanakkor a  $\beta$ -arresztin kötése jelen van, de semmiképpen nem megnövekedett [109, 235], addig a CB<sub>1</sub>R-AAY úgy elfogult a  $\beta$ -arresztin irányába, hogy a  $\beta$ -arresztin kötése jelentősen megemelkedett,

miközben G-fehérje aktivációja csökkent, de nem szűnt meg. Kimutatható volt továbbá, hogy a CB<sub>1</sub>R-AAY  $\beta$ -arr1 kötése is erősen megemelkedett a vad típusú receptorhoz képest, mind WIN55, mind 2-AG kezelés esetén. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a CB<sub>1</sub>R-AAY megnövekedett affinitása mindkét  $\beta$ -arresztin izoforma irányába megmutatkozik.

Ettől jelentősen eltér a CB<sub>1</sub>R-DAA mutáns, amely G-fehérje-szelektívnek bizonyult, mivel agonista hatására létrejövő  $\beta$ -arresztin kötése gyakorlatilag megszűnt, de továbbra is képes volt G-fehérjéket aktiválni, bár csökkent mértékben (a vad típusú CB<sub>1</sub>R kb. 70%-a). Az adataink azt mutatták, hogy ennek a mutánsnak a vad típusú receptorhoz képest kb. 40%-kal csökkent a plazmamembránon való kifejeződése. Mindazonáltal nem valószínű, hogy ez a csökkenés állhatna a  $\beta$ -arresztin kihelyeződés teljes elvesztésének hátterében. A receptor- $\beta$ -arresztin kapcsolódás sztöchiometriája ugyanis jelenlegi elképzelésünk szerint 1:1 arányú, azaz a plazmamembránon való megjelenés 40%-os csökkenése esetén a  $\beta$ -arresztin kötésnek is hasonló mértékben kellene csökkennie (amint az a CB<sub>1</sub>R-DAY és CB<sub>1</sub>R-DRA mutánsok esetén egyébként valószínű). A CB<sub>1</sub>R-DAA agonista-indukált  $\beta$ -arresztin kötésének megszűnése tehát nem magyarázható a plazmamembrán-lokalizáció csökkenésével. Ezt támasztja alá az is, hogy a CB<sub>1</sub>R-DAA kimutatható bazális  $\beta$ -arr2 kötést hoz létre a plazmamembránnál.

A korábban elfogult mutánsként leírt 7TMR-ok közé tartozik a bevezetőben is említett M<sub>3</sub>-R3.50L muszkarinos receptor [112], illetve a tripla mutáns  $\beta$ <sub>2</sub>AR-TYY [111]. Érdekes azonban, hogy mindezek a mutánsok (ideértve még a fent említett AT<sub>1</sub>R-AAY-t is)  $\beta$ -arresztin-szelektívek, azaz nem kapcsolódnak G-fehérjéhez, de  $\beta$ -arresztin kötésük megtartott, bár csökkent mértékű. Az itt bemutatott CB<sub>1</sub>R-DAA érdekes ebből a szempontból is, hiszen a G-fehérjék irányába elfogult, holott a bevitt mutáció éppen egy klasszikus G-fehérje kötő régiót érint. Az is érdekes továbbá, hogy bár a CB<sub>1</sub>R-DAA gyakorlatilag nem képes  $\beta$ -arresztint kötni aktivációt követően, mégis van bizonyos mértékű  $\beta$ -arresztin kötés nyugalmi körülmények között. Ez utóbbi valószínűleg az R3.50A mutáció jelenlétén múlik, hiszen, mint fent említettük, valamennyi ezt hordozó mutáns konstitutívan kötötte a  $\beta$ -arr2-t. A fentiek alapján tehát úgy tűnik, hogy a konzervált arginin hiánya önmagában meghatározhat egy olyan receptor-konformációt, amely spontán módon köti a  $\beta$ -arr2-t. Másrészt viszont a receptor agonista-indukált  $\beta$ -arr2 kötése továbbra is

bármely irányba erősen változhat, a szomszédos oldalláncok együttes mutációjának hatására.

Összefoglalva, a CB<sub>1</sub>R-AAAY és CB<sub>1</sub>R-DAA mutánsokkal kapcsolatos eredményeink erősen valószínűsítenek egy olyan modellt, amely szerint az aktív G-fehérje kapcsolt, és az aktív  $\beta$ -arresztin-kötött 7TMR konformációk különböznek. Továbbá a konstitutív és az agonista-indukált  $\beta$ -arresztin kötésért felelős receptor-állapotok szintén mutathatnak különbségeket.

Azt is bemutattuk, hogy az agonista-indukált ERK1/2 foszforiláció jó egyezést mutat az elfogult CB<sub>1</sub>R mutánsaink  $\beta$ -arr2 kötésével, sokkal inkább, mint a G-fehérje aktivációjukkal vagy a forskolin-indukált cAMP felhalmozódást gátló képességükkel. Ezek az adatok konzisztensek a  $\beta$ -arresztin-függő CB<sub>1</sub>R jelátvitel, azaz a CB<sub>1</sub>R aktivációját követő,  $\beta$ -arr2-mediált ERK1/2 foszforiláció nemrég felvetődött koncepciójával.

Az itt bemutatott DRY mutánsokkal kapcsolatos egyik legérdekesebb kérdés: hogyan (milyen molekuláris szerkezeti átrendeződések következtében) okozhatnak az egyes mutációk ilyen nagy különbségeket a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arresztin kötésében. A legegyszerűbb magyarázat az volna, hogy a DRY motívum mutációi elsősorban a receptor G-fehérje kötését érintik, és a  $\beta$ -arr2 kötésre kifejtett hatásaik pusztán másodlagosak, azáltal, hogy a G-fehérje és a  $\beta$ -arresztin tulajdonképpen versengenek a 7TMR kötésért. Ha azonban ez volna az egyetlen magyarázat, akkor nagyjából fordított arányosságot kellene látnunk a különböző mutánsok  $\beta$ -arresztin kötési és G-fehérje aktiválási képessége között, ami viszont nem teljesül. Így igen valószínű, hogy a DRY motívumot érintő mutációk a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arr2 kötését annak G-fehérje aktivációjától függetlenül befolyásolják. Azt a kérdést, hogy maga a DRY szekvencia része-e a receptor arresztin-kötő régiójának, jelen eredményeink alapján nem lehet egyértelműen megválaszolni. Az általunk alkalmazott mutagenézis technika erre nem képes teljesen közvetlen bizonyítékkal szolgálni. Ugyanakkor egyes korábbi adatok, melyek azt mutatták, hogy az ICL2-es hurok (és az annak kezdetén elhelyezkedő DRY motívum) részét képezi a  $\beta$ -arresztin kötőhelynek, érdekes szempontokat adnak hozzá jelen vizsgálatainkhoz [95, 236]. Két további, a közelmúltban megjelent vizsgálat is fontos eredményeket mutatott a 7TMR- $\beta$ -arresztin komplex szerkezeti jellemzőivel kapcsolatban. Mindkét említett tanulmány egy fontos

kölcsönhatásra mutat rá a  $\beta$ -arresztin flexibilis *finger loop* hurokrégiója és a receptor *aktív magja* között, a DRY motívum közvetlen részvétele mellett [88, 96]. Ezen tanulmányokkal egybevetve az eredményeink jól beleilleszkednek egy olyan modellbe, mely szerint a DRY régió közvetlenül érintett a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arresztinnel történő kölcsönhatásában. A DRY-ban létrehozott mutációk továbbá közvetetten is befolyásolhatják a  $\beta$ -arresztin kötést, mégpedig a motívumot követő ICL2 hurokban létrehozott szerkezeti átalakulásokon keresztül, amely különböző, akár teljesen ellentétes  $\beta$ -arresztin kötési fenotípusokat eredményezhet. Ugyanakkor a fenti jellemzőket szabályozó intramolekuláris kölcsönhatások még pontosabb megértéséhez a receptor-arresztin komplexet leíró, nagy felbontású kristálystruktúrákra és/vagy kifinomult számítógépes modellekre van szükség.

## 7. Következtetések

Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a CB<sub>1</sub>R és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolat általánosan alacsony affinitású más 7TMR-okhoz képest. Megerősítettük, hogy a CB<sub>1</sub>R a 7TMR-ok „A” osztályába sorolható, amennyiben a  $\beta$ -arr1 izoformát jelentősen kisebb affinitással köti, mint a  $\beta$ -arr2-t, a kötés pedig csak a plazmamembránnál, illetve annak közvetlen közelében figyelhető meg, azaz átmeneti jellegű.

Kimutattuk, hogy a  $\beta$ -arr2 közvetlen szerepet játszik a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációjában, ugyanakkor a receptor konstitutív internalizációja a  $\beta$ -arr2-től független mechanizmussal zajlik. Igazoltuk továbbá, hogy mindkét fenti internalizációs útvonal klatrin-mediált útvonalon jön létre.

Részletesen vizsgáltuk a konzervált DRY motívum szerepét a CB<sub>1</sub>R  $\beta$ -arresztin kötésében és G-fehérje aktivációjában. Megállapítottuk, hogy a konzervált R3.50 aminosav nem játszik kizárólagos szerepet a receptor G-fehérje kapcsolódásában, valamint az R3.50 oldallánc hiánya bazális  $\beta$ -arr2 kötés kialakulásához vezet. Kimutattuk továbbá, hogy a CB<sub>1</sub>R-AAY egy  $\beta$ -arresztin-szelektív mutáns, amennyiben  $\beta$ -arr1 és  $\beta$ -arr2 kötése jelentősen fokozott, míg G-fehérje aktivációja csökkent. Ezzel szemben a CB<sub>1</sub>R-DAA mutáns jelátvitel a G-fehérjék irányába elfogult, hiszen agonista-indukált  $\beta$ -arresztin kötése gyakorlatilag megszűnt, míg G-fehérje aktivációja csökkent mértékben ugyan, de továbbra is jelen volt. Fenti eredményeink arra utalnak, hogy a CB<sub>1</sub>R konzervált DRY motívuma nem csak a G-fehérje aktiválásában, hanem a receptor és a  $\beta$ -arresztinek közötti kapcsolódásban is fontos szerepet játszik.

## 8. Összefoglalás

A CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R) a 7-transzmembrán receptorok (7TMR-ok) családjába tartozik, és fontos szerepet tölt be számos idegi, metabolikus és keringési szabályozó folyamatban. A CB<sub>1</sub>R működését szabályozó molekuláris folyamatok megértése ezért nagy jelentőséggel bír. Ismert, hogy a CB<sub>1</sub>R agonista serkentés hatására deszenzitizálódik, majd internalizálódik. Ezen kívül a receptor alapállapotú (konstitutív) internalizációt is mutat. A β-arresztin fehérjék (két izoformájuk a β-arr1 és a β-arr2) alapvető jelentőségűek a 7TMR-ok fenti – deszenzitizációs és internalizációs – folyamataiban. A CB<sub>1</sub>R esetén azonban nem pontosan ismert, hogy a receptor milyen affinitással kötődik az egyes β-arresztin izoformákhoz, illetve, hogy ez a kötődés szerepet játszik-e a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált, illetve konstitutív internalizációjában. Továbbá nem áll rendelkezésre adat arról, hogy a 7TMR-ok egyik legkonzerváltabb régiója, a „DRY” motívum milyen szerepet játszik a CB<sub>1</sub>R G-fehérje aktiválásában, illetve β-arresztin kötésében. Munkánk során a fenti kérdésekre kerestük a választ.

Kísérleteinkben biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések és konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a CB<sub>1</sub>R a 7TMR-ok „A” osztályába sorolható, amennyiben a β-arr2 izoformát jelentősen nagyobb affinitással köti, mint a β-arr1-et. A kötés pedig csak a plazmamembránnál figyelhető meg, azaz átmeneti jellegű. Domináns-negatív konstrukciók, valamint siRNS technika segítségével kimutattuk, hogy a β-arr2 szerepet játszik a CB<sub>1</sub>R agonista-indukált internalizációjában, ugyanakkor a receptor konstitutív internalizációja β-arr2-től független mechanizmussal zajlik. Eredményeink alapján mindkét internalizációs forma a klatrin részvételével zajlik. A konzervált DRY motívum szerepét a CB<sub>1</sub>R működésében mutáns receptorok segítségével elemeztük, és megállapítottuk, hogy a régió különböző mutációival funkcionálisan szelektív – azaz a G-fehérje aktiválás vagy a β-arresztin kötés irányába elfogult – mutánsok hozhatók létre. Ez pedig arra utal, hogy a DRY motívum eltérő módon vesz részt a CB<sub>1</sub>R G-fehérjéhez történő kapcsolódásában és β-arresztin kötésében.

## 9. Summary

The CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>R) belongs to the 7-transmembrane receptor (7TMR) superfamily, and it plays important roles in several neuronal, metabolic and circulatory regulatory processes. Therefore, understanding the molecular processes which regulate CB<sub>1</sub>R function is of great importance. CB<sub>1</sub>R is known to be desensitized and internalized upon agonist stimulus. Besides, CB<sub>1</sub>R displays basal (constitutive) internalization. The  $\beta$ -arrestin proteins (their two isoforms are  $\beta$ -arr1 and  $\beta$ -arr2) are key players in the above processes, i.e. in the desensitization and internalization of 7TMRs. However, in the case of CB<sub>1</sub>R, the relative affinities of the receptor towards the two  $\beta$ -arrestin isoforms, as well as the role of  $\beta$ -arrestins in the agonist-induced and/or constitutive internalization of CB<sub>1</sub>R are not clearly understood. Furthermore, there is no current data available on how the ‘DRY’ motif, which is one of the most conserved regions in 7TMRs, is implicated in the G protein-activation and  $\beta$ -arrestin binding of CB<sub>1</sub>R. Our goal was therefore to answer these questions.

In our experiments we demonstrated, using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) measurements and confocal microscopy, that CB<sub>1</sub>R can be classified as a ‘Class A’ 7TMR, i.e. it binds  $\beta$ -arr2 with substantially higher affinity than  $\beta$ -arr1, and the binding is transient, i.e. it can be detected only at the plasma membrane. Using dominant-negative constructs and siRNA technique we showed that  $\beta$ -arr2 is involved in the agonist-induced internalization of CB<sub>1</sub>R, whereas the constitutive internalization of the receptor occurs via a  $\beta$ -arr2-independent mechanism. Based on our results, clathrin is involved in both processes. The role of the conserved DRY motif in CB<sub>1</sub>R function was analysed using mutant receptor variants. We found that distinct mutations of this region can result in functionally selective receptor variants, i.e. in mutants that are biased towards G protein activation or  $\beta$ -arrestin binding. These data suggest that the DRY motif plays different roles in the G protein coupling and  $\beta$ -arrestin binding of CB<sub>1</sub>R.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett*, 520: 97-101.
- [2] Tyndall JD, Sandilya R. (2005) GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med Chem*, 1: 405-421.
- [3] Ballesteros JA, Weinstein H. (1995) Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci*, 25: 366-428.
- [4] Ballesteros J, Kitanovic S, Guarnieri F, Davies P, Fromme BJ, Konvicka K, Chi L, Millar RP, Davidson JS, Weinstein H, Sealfon SC. (1998) Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*, 273: 10445-10453.
- [5] Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA. (2001) Activation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem*, 276: 29171-29177.
- [6] Fanelli F, Barbier P, Zanchetta D, de Benedetti PG, Chini B. (1999) Activation mechanism of human oxytocin receptor: a combined study of experimental and computer-simulated mutagenesis. *Mol Pharmacol*, 56: 214-225.
- [7] Li J, Huang P, Chen C, de Riel JK, Weinstein H, Liu-Chen LY. (2001) Constitutive activation of the mu opioid receptor by mutation of D3.49(164), but not D3.32(147): D3.49(164) is critical for stabilization of the inactive form of the receptor and for its expression. *Biochemistry*, 40: 12039-12050.
- [8] Rovati GE, Capra V, Neubig RR. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, 71: 959-964.

- [9] Scheer A, Fanelli F, Costa T, de Benedetti PG, Cotecchia S. (1996) Constitutively active mutants of the  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J*, 15: 3566-3578.
- [10] Scheer A, Fanelli F, Costa T, de Benedetti PG, Cotecchia S. (1997) The activation process of the  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 808-813.
- [11] Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. (2011) Crystal structure of the  $\beta 2$  adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477: 549-555.
- [12] Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494: 185-194.
- [13] Rhee MH, Nevo I, Levy R, Vogel Z. (2000) Role of the highly conserved Asp-Arg-Tyr motif in signal transduction of the CB2 cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 466: 300-304.
- [14] De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 255: 7108-7117.
- [15] Costa T, Herz A. (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 7321-7325.
- [16] Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. (1993) A mutation-induced activated state of the  $\beta 2$ -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, 268: 4625-4636.
- [17] Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21: 90-113.

- [18] Bond RA, Ijzerman AP. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 92-96.
- [19] Meye FJ, Ramakers GM, Adan RA. (2014) The vital role of constitutive GPCR activity in the mesolimbic dopamine system. *Transl Psychiatry*, 4: e361-
- [20] Hermans E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 99: 25-44.
- [21] de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52: 415-472.
- [22] Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57: 27-77.
- [23] Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG. (1999) Coupling of  $\beta_2$ -adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res*, 84: 43-52.
- [24] Smrcka AV. (2008) G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*, 65: 2191-2214.
- [25] Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. (2011) Emerging paradigms of  $\beta$ -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*, 36: 457-469.
- [26] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. (2007)  $\beta$ -arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69: 483-510.
- [27] Kenakin T. (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*, 72: 1393-1401.
- [28] Michel MC, Alewijnse AE. (2007) Ligand-directed signaling: 50 ways to find a lover. *Mol Pharmacol*, 72: 1097-1099.

- [29] Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 308-316.
- [30] Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. (2010) Selectively engaging  $\beta$ -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther*, 335: 572-579.
- [31] DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen XT, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblisch M, Lark MW, Violin JD. (2013) A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 344: 708-717.
- [32] Reiner S, Ambrosio M, Hoffmann C, Lohse MJ. (2010) Differential signaling of the endogenous agonists at the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 285: 36188-36198.
- [33] Bachelierie F, Ben Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiya H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. (2014) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 66: 1-79.
- [34] Rajagopal S, Bassoni DL, Campbell JJ, Gerard NP, Gerard C, Wehrman TS. (2013) Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *J Biol Chem*, 288: 35039-35048.
- [35] Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1991) Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu Rev Physiol*, 53: 497-508.

- [36] Sibley DR, Lefkowitz RJ. (1985) Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, 317: 124-129.
- [37] Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2002) The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115: 455-465.
- [38] Moore CA, Milano SK, Benovic JL. (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69: 451-482.
- [39] Kelly E, Bailey CP, Henderson G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1: S379-S388.
- [40] Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and  $\beta$ -arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, 66: 61-79.
- [41] Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV. (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther*, 133: 40-69.
- [42] Clark RB, Kunkel MW, Friedman J, Goka TJ, Johnson JA. (1988) Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 1442-1446.
- [43] McMahon HT, Boucrot E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 517-533.
- [44] Gurevich VV, Gurevich EV. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 110: 465-502.
- [45] Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996)  $\beta$ -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *Nature*, 383: 447-450.

- [46] Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. (1999) The  $\beta$ 2-adrenergic receptor/ $\beta$ arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3712-3717.
- [47] Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (2000) The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta$ 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, 275: 23120-23126.
- [48] Kirchhausen T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem*, 69: 699-727.
- [49] Kirchhausen T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 705-732.
- [50] Traub LM. (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 583-596.
- [51] Farsad K, De Camilli P. (2003) Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 372-381.
- [52] Wiejak J, Wyroba E. (2002) Dynamin: characteristics, mechanism of action and function. *Cell Mol Biol Lett*, 7: 1073-1080.
- [53] Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. (2002)  $\beta$ -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem*, 277: 1292-1300.
- [54] Parent JL, Labrecque P, Driss RM, Benovic JL. (2001) Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J Biol Chem*, 276: 7079-7085.
- [55] Diviani D, Lattion AL, Abuin L, Staub O, Cotecchia S. (2003) The adaptor complex 2 directly interacts with the  $\alpha$ 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 278: 19331-19340.
- [56] Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, 54: 431-467.

- [57] Parton RG, del Pozo MA. (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 98-112.
- [58] Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol*, 141: 101-114.
- [59] Doherty GJ, McMahon HT. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78: 857-902.
- [60] Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L, Balla B, Paku S, Catt KJ, Clark AJ, Hunyady L. (2001)  $\beta$ -arrestin- and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol*, 59: 239-247.
- [61] Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates  $\beta$ -1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem*, 278: 35403-35411.
- [62] Ferguson SS. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53: 1-24.
- [63] Mayle KM, Le AM, Kamei DT. (2012) The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta*, 1820: 264-281.
- [64] Tortorella S, Karagiannis TC. (2014) Transferrin receptor-mediated endocytosis: a useful target for cancer therapy. *J Membr Biol*, 247: 291-307.
- [65] Goldstein JL, Brown MS. (2009) The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 431-438.
- [66] Shapiro MJ, Trejo J, Zeng D, Coughlin SR. (1996) Role of the thrombin receptor's cytoplasmic tail in intracellular trafficking. Distinct determinants for agonist-triggered versus tonic internalization and intracellular localization. *J Biol Chem*, 271: 32874-32880.
- [67] Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. (2000) Receptor/ $\beta$ -arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of  $\beta$ 2-

adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol*, 14: 2040-2053.

- [68] Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. (1997) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol*, 11: 1266-1277.
- [69] Dale LB, Bhattacharya M, Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS. (2001) Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is  $\beta$ -arrestin1 isoform-specific. *Mol Pharmacol*, 60: 1243-1253.
- [70] Leterrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z. (2004) Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem*, 279: 36013-36021.
- [71] Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG. (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 93-98.
- [72] Holliday ND, Lam CW, Tough IR, Cox HM. (2005) Role of the C terminus in neuropeptide Y Y1 receptor desensitization and internalization. *Mol Pharmacol*, 67: 655-664.
- [73] Wilden U, Hall SW, Kuhn H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 1174-1178.
- [74] Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1992)  $\beta$ -arrestin2, a novel member of the arrestin/ $\beta$ -arrestin gene family. *J Biol Chem*, 267: 17882-17890.
- [75] Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1987) Functional desensitization of the isolated  $\beta$ -adrenergic receptor by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 8879-8882.

- [76] Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990)  $\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science*, 248: 1547-1550.
- [77] Lefkowitz RJ. (2013) Arrestins come of age: a personal historical perspective. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 118: 3-18.
- [78] Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF. (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem*, 269: 4613-4619.
- [79] Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C. (2001) Crystal structure of  $\beta$ -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure*, 9: 869-880.
- [80] Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, 97: 257-269.
- [81] Sutton RB, Vishnivetskiy SA, Robert J, Hanson SM, Raman D, Knox BE, Kono M, Navarro J, Gurevich VV. (2005) Crystal structure of cone arrestin at 2.3Å: evolution of receptor specificity. *J Mol Biol*, 354: 1069-1080.
- [82] Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW. (2011) Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J Mol Biol*, 406: 467-478.
- [83] Sterne-Marr R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL. (1993) Polypeptide variants of  $\beta$ -arrestin and arrestin3. *J Biol Chem*, 268: 15640-15648.
- [84] Vishnivetskiy SA, Paz CL, Schubert C, Hirsch JA, Sigler PB, Gurevich VV. (1999) How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J Biol Chem*, 274: 11451-11454.
- [85] Gurevich VV, Benovic JL. (1995) Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J Biol Chem*, 270: 6010-6016.
- [86] Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV. (2000) An additional phosphate-binding element in arrestin molecule.

Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem*, 275: 41049-41057.

- [87] Hanson SM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Kolobova EA, Hubbell WL, Klug CS, Gurevich VV. (2006) Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 4900-4905.
- [88] Szczepek M, Beyriere F, Hofmann KP, Elgeti M, Kazmin R, Rose A, Bartl FJ, von Stetten D, Heck M, Sommer ME, Hildebrand PW, Scheerer P. (2014) Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. *Nat Commun*, 5: 4801-
- [89] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem*, 276: 19452-19460.
- [90] Dror RO, Arlow DH, Maragakis P, Mildorf TJ, Pan AC, Xu H, Borhani DW, Shaw DE. (2011) Activation mechanism of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 18684-18689.
- [91] Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*, 274: 768-770.
- [92] Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG. (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem*, 63: 243-290.
- [93] Janz JM, Farrens DL. (2004) Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin  $\alpha$ -subunit C terminus. *J Biol Chem*, 279: 29767-29773.
- [94] Bennett TA, Maestas DC, Prossnitz ER. (2000) Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J Biol Chem*, 275: 24590-24594.

- [95] Huttenrauch F, Nitzki A, Lin FT, Honing S, Oppermann M. (2002)  $\beta$ -arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J Biol Chem*, 277: 30769-30777.
- [96] Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, Qian J, Li S, Blanc A, Oleskie AN, Dosey AM, Su M, Liang CR, Gu LL, Shan JM, Chen X, Hanna R, Choi M, Yao XJ, Klink BU, Kahsai AW, Sidhu SS, Koide S, Penczek PA, Kossiakoff AA, Woods VL, Jr., Kobilka BK, Skiniotis G, Lefkowitz RJ. (2014) Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 512: 218-222.
- [97] Kim YJ, Hofmann KP, Ernst OP, Scheerer P, Choe HW, Sommer ME. (2013) Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature*, 497: 142-146.
- [98] Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng WC, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang LY, Paduch M, Tripathi-Shukla P, Koide A, Koide S, Weis WI, Kossiakoff AA, Kobilka BK, Lefkowitz RJ. (2013) Structure of active  $\beta$ -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 497: 137-141.
- [99] Gurevich VV, Benovic JL. (1992) Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction. *J Biol Chem*, 267: 21919-21923.
- [100] Gurevich VV, Benovic JL. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem*, 268: 11628-11638.
- [101] Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, Hosey MM, Benovic JL. (1995) Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin,  $\beta$ 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem*, 270: 720-731.
- [102] Vishnivetskiy SA, Hirsch JA, Velez MG, Gurevich YV, Gurevich VV. (2002) Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J Biol Chem*, 277: 43961-43967.

- [103] Gurevich VV, Gurevich EV. (2014) Extensive shape shifting underlies functional versatility of arrestins. *Curr Opin Cell Biol*, 27: 1-9.
- [104] Shukla AK, Violin JD, Whalen EJ, Gesty-Palmer D, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2008) Distinct conformational changes in  $\beta$ -arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9988-9993.
- [105] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. (2003) Multifaceted roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*, 375: 503-515.
- [106] Ferguson SS, Downey WE, III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. (1996) Role of  $\beta$ -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, 271: 363-366.
- [107] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. (2000) Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ -arrestin1, and  $\beta$ -arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, 275: 17201-17210.
- [108] 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. (1999)  $\beta$ -arrestin-dependent formation of  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283: 655-661.
- [109] Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2003) Independent  $\beta$ -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10782-10787.
- [110] Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spat A, Catt KJ, Hunyady L. (2003) The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology*, 144: 2220-2228.
- [111] Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ. (2006)  $\beta$ -arrestin-dependent, G

protein-independent ERK1/2 activation by the  $\beta$ 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281: 1261-1273.

- [112] Nakajima K, Wess J. (2012) Design and functional characterization of a novel, arrestin-biased designer G protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol*, 82: 575-582.
- [113] Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. (2003) The stability of the G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*, 278: 6258-6267.
- [114] Zuardi AW. (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*, 28: 153-157.
- [115] Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*, 86: 1646-1647.
- [116] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
- [117] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.
- [118] Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.
- [119] Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, . (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
- [120] Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous

cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.

- [121] Bisogno T. (2008) Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1: 1-9.
- [122] Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279: 5298-5305.
- [123] Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N. (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*, 4: 1842-1857.
- [124] Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13345-13350.
- [125] Simon GM, Cravatt BF. (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for  $\alpha/\beta$ -hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*, 281: 26465-26472.
- [126] Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. (2004) Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*, 380: 749-756.
- [127] Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. (2006) Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*, 45: 4720-4726.
- [128] Simon GM, Cravatt BF. (2010) Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst*, 6: 1411-1418.
- [129] Basavarajappa BS. (2007) Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, 14: 237-246.

- [130] Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. (2012) Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Mol Cell Endocrinol*, 353: 29-36.
- [131] Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45: 405-446.
- [132] Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T. (2011) Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors*, 37: 1-7.
- [133] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54: 161-202.
- [134] Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152: 1092-1101.
- [135] Pertwee RG. (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*, 152: 984-986.
- [136] Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2699-2704.
- [137] Zhao P, Abood ME. (2013) GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Life Sci*, 92: 453-457.
- [138] De Petrocellis L, Di Marzo V. (2010) Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5: 103-121.
- [139] Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11: 563-583.

- [140] Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58: 389-462.
- [141] Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89: 309-380.
- [142] Koppel BS, Brust JC, Fife T, Bronstein J, Youssof S, Gronseth G, Gloss D. (2014) Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 82: 1556-1563.
- [143] Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, 83: 1017-1066.
- [144] Wilson RI, Nicoll RA. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410: 588-592.
- [145] Wilson RI, Nicoll RA. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296: 678-682.
- [146] Pitler TA, Alger BE. (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 12: 4122-4132.
- [147] Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 29: 37-76.
- [148] Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2005) Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 599-625.
- [149] Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. (2002) Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther*, 95: 191-202.
- [150] Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. (1999) Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol*, 276: H2085-H2093.
- [151] Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, Bilfinger TV, Stefano GB. (1999) Morphine and anandamide stimulate intracellular

calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell Signal*, 11: 189-193.

- [152] Sade H, Muraki K, Ohya S, Hatano N, Imaizumi Y. (2006) Activation of large-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by cannabinoids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290: C77-C86.
- [153] Su JY, Vo AC. (2007) 2-Arachidonylglyceryl ether and abnormal cannabidiol-induced vascular smooth muscle relaxation in rabbit pulmonary arteries via receptor-pertussis toxin sensitive G proteins-ERK1/2 signaling. *Eur J Pharmacol*, 559: 189-195.
- [154] Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertaler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G. (2004) Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, 110: 1996-2002.
- [155] Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, 283: 401-404.
- [156] Vandevoorde S, Lambert DM. (2007) The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers*, 4: 1858-1881.
- [157] Pfitzer T, Niederhoffer N, Szabo B. (2004) Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol*, 142: 943-952.
- [158] Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. (2006) Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol*, 126: 177-187.
- [159] Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Batkai S. (2008) Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem*, 283: 33021-33025.

- [160] Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115: 1298-1305.
- [161] Lazary J, Juhasz G, Hunyady L, Bagdy G. (2011) Personalized medicine can pave the way for the safe use of CB receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, 32: 270-280.
- [162] Kunos G, Osei-Hyiaman D, Batkai S, Sharkey KA, Makriyannis A. (2009) Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci*, 30: 1-7.
- [163] Jarvinen T, Pate DW, Laine K. (2002) Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther*, 95: 203-220.
- [164] Lewis SE, Maccarrone M. (2009) Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. *Pharmacol Res*, 60: 126-131.
- [165] Turu G, Hunyady L. (2010) Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*, 44: 75-85.
- [166] Prather PL, Martin NA, Breivogel CS, Childers SR. (2000) Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein  $\alpha$ -subunits with different potencies. *Mol Pharmacol*, 57: 1000-1010.
- [167] Glass M, Northup JK. (1999) Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol*, 56: 1362-1369.
- [168] Mukhopadhyay S, Howlett AC. (2001) CB1 receptor-G protein association. Subtype selectivity is determined by distinct intracellular domains. *Eur J Biochem*, 268: 499-505.
- [169] Hudson BD, Hebert TE, Kelly ME. (2010) Ligand- and heterodimer-directed signaling of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, 77: 1-9.

- [170] Breivogel CS, Walker JM, Huang SM, Roy MB, Childers SR. (2004) Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. *Neuropharmacology*, 47: 81-91.
- [171] Chen XP, Yang W, Fan Y, Luo JS, Hong K, Wang Z, Yan JF, Chen X, Lu JX, Benovic JL, Zhou NM. (2010) 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*, 161: 1817-1834.
- [172] Lauckner JE, Hille B, Mackie K. (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 19144-19149.
- [173] Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 229: 58-64.
- [174] Caulfield MP, Brown DA. (1992) Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol*, 106: 231-232.
- [175] Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE. (1998) Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem*, 70: 671-676.
- [176] Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15: 6552-6561.
- [177] Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312 ( Pt 2): 637-641.

- [178] Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. (2000) Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*, 346 Pt 3: 835-840.
- [179] Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M. (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol*, 58: 814-820.
- [180] Galve-Roperh I, Rueda D, Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M. (2002) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, 62: 1385-1392.
- [181] Korzh A, Keren O, Gafni M, Bar-Josef H, Sarne Y. (2008) Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell. *Brain Res*, 1189: 23-32.
- [182] Ahn KH, Mahmoud MM, Shim JY, Kendall DA. (2013) Distinct roles of  $\beta$ -arrestin 1 and  $\beta$ -arrestin 2 in ORG27569-induced biased signaling and internalization of the cannabinoid receptor 1 (CB1). *J Biol Chem*, 288: 9790-9800.
- [183] Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Dupre DJ, Denovan-Wright EM. (2014) Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *J Biol Chem*, 289: 24845-24862.
- [184] Mahavadi S, Sriwai W, Huang J, Grider JR, Murthy KS. (2014) Inhibitory signaling by CB1 receptors in smooth muscle mediated by GRK5/ $\beta$ -arrestin activation of ERK1/2 and Src kinase. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol*, 306: G535-G545.
- [185] Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem*, 272: 22330-22339.

- [186] Leterrier C, Laine J, Darmon M, Boudin H, Rossier J, Lenkei Z. (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci*, 26: 3141-3153.
- [187] McDonald NA, Henstridge CM, Connolly CN, Irving AJ. (2007) An essential role for constitutive endocytosis, but not activity, in the axonal targeting of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*, 71: 976-984.
- [188] Pertwee RG. (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*, 76: 1307-1324.
- [189] Turu G, Simon A, Gyombolai P, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L. (2007) The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity. *J Biol Chem*, 282: 7753-7757.
- [190] Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Kooor A, Chavkin C, Mackie K. (1999) Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci*, 19: 3773-3780.
- [191] Daigle TL, Kearns CS, Mackie K. (2008) Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology*, 54: 36-44.
- [192] Kouznetsova M, Kelley B, Shen M, Thayer SA. (2002) Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol*, 61: 477-485.
- [193] Martini L, Waldhoer M, Pusch M, Kharazia V, Fong J, Lee JH, Freissmuth C, Whistler JL. (2007) Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB J*, 21: 802-811.
- [194] Martin BR, Sim-Selley LJ, Selley DE. (2004) Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 325-330.
- [195] Sim-Selley LJ. (2003) Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol*, 15: 91-119.

- [196] Morgan DJ, Davis BJ, Kearns CS, Marcus D, Cook AJ, Wager-Miller J, Straiker A, Myoga MH, Karduck J, Leishman E, Sim-Selley LJ, Czyzyk TA, Bradshaw HB, Selley DE, Mackie K. (2014) Mutation of putative GRK phosphorylation sites in the cannabinoid receptor 1 (CB1R) confers resistance to cannabinoid tolerance and hypersensitivity to cannabinoids in mice. *J Neurosci*, 34: 5152-5163.
- [197] Nguyen PT, Schmid CL, Raehal KM, Selley DE, Bohn LM, Sim-Selley LJ. (2012)  $\beta$ -Arrestin2 Regulates Cannabinoid CB(1) Receptor Signaling and Adaptation in a Central Nervous System Region-Dependent Manner. *Biol Psychiatry*, 71: 714-724.
- [198] D'Souza DC, Ranganathan M, Braley G, Gueorguieva R, Zimolo Z, Cooper T, Perry E, Krystal J. (2008) Blunted psychotomimetic and amnesic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in frequent users of cannabis. *Neuropsychopharmacology*, 33: 2505-2516.
- [199] Bedi G, Foltin RW, Gunderson EW, Rabkin J, Hart CL, Comer SD, Vosburg SK, Haney M. (2010) Efficacy and tolerability of high-dose dronabinol maintenance in HIV-positive marijuana smokers: a controlled laboratory study. *Psychopharmacology (Berl)*, 212: 675-686.
- [200] Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le Fur G. (1998) Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J Pharmacol Exp Ther*, 287: 1038-1047.
- [201] Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K. (1999) Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem*, 73: 493-501.
- [202] Roche JP, Bounds S, Brown S, Mackie K. (1999) A mutation in the second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Mol Pharmacol*, 56: 611-618.
- [203] Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, Irving AJ. (2001) Agonist-induced internalization and trafficking of

cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 21: 2425-2433.

- [204] Keren O, Sarne Y. (2003) Multiple mechanisms of CB1 cannabinoid receptors regulation. *Brain Res*, 980: 197-205.
- [205] Bari M, Oddi S, De Simone C, Spagnolo P, Gasperi V, Battista N, Centonze D, Maccarrone M. (2008) Type-1 cannabinoid receptors colocalize with caveolin-1 in neuronal cells. *Neuropharmacology*, 54: 45-50.
- [206] Wu DF, Yang LQ, Goschke A, Stumm R, Brandenburg LO, Liang YJ, Holtt V, Koch T. (2008) Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J Neurochem*, 104: 1132-1143.
- [207] Rozenfeld R. (2011) Type I cannabinoid receptor trafficking: all roads lead to lysosome. *Traffic*, 12: 12-18.
- [208] Rozenfeld R, Devi LA. (2008) Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *FASEB J*, 22: 2311-2322.
- [209] Kleyer J, Nicolussi S, Taylor P, Simonelli D, Furger E, Anderle P, Gertsch J. (2012) Cannabinoid receptor trafficking in peripheral cells is dynamically regulated by a binary biochemical switch. *Biochem Pharmacol*, 83: 1393-1412.
- [210] Daigle TL, Kwok ML, Mackie K. (2008) Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism. *J Neurochem*, 106: 70-82.
- [211] Bakshi K, Mercier RW, Pavlopoulos S. (2007) Interaction of a fragment of the cannabinoid CB1 receptor C-terminus with arrestin-2. *FEBS Lett*, 581: 5009-5016.
- [212] Singh SN, Bakshi K, Mercier RW, Makriyannis A, Pavlopoulos S. (2011) Binding between a distal C-terminus fragment of cannabinoid receptor 1 and arrestin-2. *Biochemistry*, 50: 2223-2234.

- [213] Turu G, Szidonya L, Gaborik Z, Buday L, Spat A, Clark AJ, Hunyady L. (2006) Differential  $\beta$ -arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett*, 580: 41-45.
- [214] Varnai P, Balla T. (2007) Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch*, 455: 69-82.
- [215] Erdelyi LS, Balla A, Patocs A, Toth M, Varnai P, Hunyady L. (2014) Altered agonist sensitivity of a mutant v2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Endocrinol*, 28: 634-643.
- [216] Toth DJ, Toth JT, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Varnai P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 125: 2185-2197.
- [217] Guan XM, Kobilka TS, Kobilka BK. (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J Biol Chem*, 267: 21995-21998.
- [218] Woo J, von Arnim AG. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Plant Methods*, 4: 23-
- [219] Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC. (2002) Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol Metab*, 13: 415-421.
- [220] Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, DeWire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ. (2011) Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol*, 80: 367-377.
- [221] Marullo S, Bouvier M. (2007) Resonance energy transfer approaches in *Mol Pharmacol* and beyond. *Trends Pharmacol Sci*, 28: 362-365.
- [222] Krupnick JG, Santini F, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1997) Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of  $\beta$ -arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem*, 272: 32507-32512.

- [223] Dalton GD, Howlett AC. (2012) Cannabinoid CB1 receptors transactivate multiple receptor tyrosine kinases and regulate serine/threonine kinases to activate ERK in neuronal cells. *Br J Pharmacol*, 165: 2497-2511.
- [224] Davis MI, Ronesi J, Lovinger DM. (2003) A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 278: 48973-48980.
- [225] Flores-Otero J, Ahn KH, Delgado-Peraza F, Mackie K, Kendall DA, Yudowski GA. (2014) Ligand-specific endocytic dwell times control functional selectivity of the cannabinoid receptor 1. *Nat Commun*, 5: 4589-
- [226] Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. (2011) Hetero-multimerization of the cannabinoid CB1 receptor and the orexin OX1 receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J Biol Chem*,
- [227] Ward RJ, Pediani JD, Milligan G. (2011) Ligand-induced internalization of the orexin OX(1) and cannabinoid CB(1) receptors assessed via N-terminal SNAP and CLIP-tagging. *Br J Pharmacol*, 162: 1439-1452.
- [228] Fan GH, Yang W, Wang XJ, Qian Q, Richmond A. (2001) Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry*, 40: 791-800.
- [229] Zhao M, Wimmer A, Trieu K, Discipio RG, Schraufstatter IU. (2004) Arrestin regulates MAPK activation and prevents NADPH oxidase-dependent death of cells expressing CXCR2. *J Biol Chem*, 279: 49259-49267.
- [230] Vines CM, Revankar CM, Maestas DC, LaRusch LL, Cimino DF, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Prossnitz ER. (2003) N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem*, 278: 41581-41584.
- [231] Hunyady L, Catt KJ. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20: 953-970.

- [232] Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. (1996) Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*, 271: 18302-18305.
- [233] Brailoiu GC, Oprea TI, Zhao P, Abood ME, Brailoiu E. (2011) Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J Biol Chem*, 286: 29166-29174.
- [234] Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG. (2002) Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry*, 41: 11981-11989.
- [235] Balla A, Toth DJ, Soltesz-Katona E, Szakadati G, Erdelyi LS, Varnai P, Hunyady L. (2012) Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *J Biol Chem*, 287: 9090-9099.
- [236] Marion S, Oakley RH, Kim KM, Caron MG, Barak LS. (2006) A  $\beta$ -arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 281: 2932-2938.

## 11. Saját közlemények jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

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

### Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

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

Turu G, Várnai P, **Gyombolai P**, Szidonya L, Offertáler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L. (2009) Paracrine transactivation of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor by AT<sub>1</sub> angiotensin and other G<sub>q/11</sub> protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 284:(25) 16914-16921. **IF: 5,328**

Turu G, Simon A, **Gyombolai P**, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L. (2007) The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor-stimulated cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor activity. *J Biol Chem*, 282:(11) 7753-7757. **IF: 5,581**

## 12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Prof. Hunyady Lászlónak szeretnék köszönetet mondani. Aktív élettan gyakorlatvezetői munkásságának utolsó csoportjába jártam, így még épp „időben érkeztem”, hogy megismertesse és megszerettesse velem az élettan és a sejtelettan világát. Azóta is mindig támogatta minden törekvésemet és ötletemet, és nyugodt légkört biztosított a munkámhoz. Köszönöm Prof. Várnai Péternek, hogy az évek során bármikor fordulhattam hozzá ügyes-bajos dolgaimmel. Köszönöm programvezetőmnek, Prof. Ligeti Erzsébetnek, hogy végig figyelemmel kísérte munkámat. Kiemelt köszönet illeti Dr. Turu Gábort, aki bevezetett a kannabinoid receptorok működésének világába, illetve megtanított az igényes kísérlettervezés és értékelés fortélyaira. Köszönöm volt és jelenlegi TDK hallgatóimnak, Dr. Boros Eszternek és Tímár Dánielnek, hogy kérdéseikkel és ötleteikkel engem is tudásom és érdeklődésem fenntartására sarkalltak. Külön köszönöm Dr. Tóth Andrásnak azt a rengeteg segítséget, amit értékes és kritikus észrevételeivel munkám során mindvégig nyújtott. Köszönöm laborunk volt és jelenlegi asszisztenseinek, Süpeki Katinkának, Rácz Juditnak, Oláh Ilonának, Schulcz Mártonnénak, Halász Eszternek és Szabolcsi Katának az elengedhetetlen és biztonságot jelentő háttérmunkát. Köszönöm közvetlen munkatársaimnak és barátaimnak, Dr. Szalai Bencének és Dr. Tóth Dánielnek az együtt eltöltött éveket, a számtalan értékes – néha még szakmai témákat is érintő – konzultációt. Szintén köszönöm az eggyel fiatalabb generáció tagjainak, Dr. Erdélyi Lászlónak, Dr. Gulyás Gergőnek és Dr. Tóth Józsefnek az inspiráló és felszabadult légkört, amelyben együtt dolgozhattunk. Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának, hogy az itt folyó magas színvonalú szakmai munkával engem is folyamatos javulásra ösztönöztek.

Köszönöm nagyszüleimnek, szüleimnek és testvéreimnek, hogy mindvégig szeretettel és érdeklődéssel kísérték és támogatták munkámat.

Végül, legfontosabbként, köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek, hogy bátorító, türelmes és meleg légkört biztosítanak számomra, amely mindig a munkámhoz szükséges töltekezés legfontosabb forrása volt.