

# G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálata eukarióta sejtekben

Doktori értekezés

**Dr. Szalai Bence**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja,  
egyetemi tanár
- Hivatalos bírálók: Dr. Herényi Levente, Ph.D., egyetemi  
docens  
Dr. Szakács Gergely, Ph.D., tudományos  
tanácsadó
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gyires Klára, az MTA doktora,  
egyetemi tanár,  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sperlágh Beáta, az MTA doktora,  
tudományos tanácsadó  
Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2016

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	3. oldal
2. Bevezetés .....	5. oldal
2.1 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorokról általában .....	6. oldal
2.2 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatása .....	8. oldal
2.2.1 Biokémiai módszerek.....	9. oldal
2.2.2 Biofizikai módszerek .....	9. oldal
2.2.2.1 Rezonancia energiatranszfer módszerek .....	9. oldal
2.2.2.2 Egyéb biofizikai módszerek.....	14. oldal
2.3 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának strukturális háttere .....	17. oldal
2.4 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának funkcionális következményei .....	20. oldal
2.4.1 Sejtfelszíni expresszió.....	20. oldal
2.4.2 Ligandkötés.....	21. oldal
2.4.3 Receptor konformáció.....	23. oldal
2.4.4 G-fehérje aktiválás .....	23. oldal
2.4.5 Internalizáció és G-fehérje független jelátvitel.....	24. oldal
2.5 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának jelentősége .....	26. oldal
3. Célkitűzések .....	28. oldal
4. Módszerek .....	29. oldal
4.1 A munkánk során használt anyagok .....	29. oldal
4.2 Plazmid konstrukciók .....	29. oldal
4.3 Sejtenyészetek fenntartása és transzfektálása.....	32. oldal
4.4 Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések .....	32. oldal
4.5 A citoplazmatikus kalciumkoncentráció mérése .....	34. oldal
4.6 A liganddisszociáció mérése.....	34. oldal
4.7 Monte Carlo szimulációk.....	35. oldal

4.8 Az adatok kiértékelése és statisztikai analízise.....	36. oldal
5. Eredmények .....	37. oldal
5.1 Allosztérikus interakciók az AT <sub>1</sub> -es angiotenzin receptor homodimerben .....	37. oldal
5.1.1 Az AT <sub>1</sub> R homodimerizációjának kimutatása.....	37. oldal
5.1.2 Szelektív stimulálás az AT <sub>1</sub> R homodimerben .....	38. oldal
5.1.3 A nem stimulált alegység β-arresztin2 kötése .....	40. oldal
5.1.4 Konformáció változások a nem stimulált alegységben.....	44. oldal
5.1.5 Negatív kooperatív ligandkötés .....	46. oldal
5.2 GPCR-ok dimerizációjának vizsgálata kvantitatív BRET módszerrel .....	47. oldal
5.2.1 A V <sub>2</sub> vazopresszin receptor dimerizációjának vizsgálata klasszikus kvantitatív BRET módszerrel .....	48. oldal
5.2.2 A változó donormennyiség hatásai a kBRET görbékre – Monte Carlo szimulációk.....	50. oldal
5.2.3 A változó donormennyiség hatásai a kBRET görbékre – indukálható dimerizáció .....	52. oldal
5.2.4 GPCR-ok dimerizációjának vizsgálata módosított kvantitatív BRET módszerrel .....	55. oldal
6. Megbeszélés .....	59. oldal
7. Következtetések.....	66. oldal
8. Összefoglalás .....	67. oldal
9. Summary.....	68. oldal
10. Irodalomjegyzék .....	69. oldal
11. Saját publikációk jegyzéke .....	83. oldal
12. Köszönetnyilvánítás .....	84. oldal

## 1. Rövidítések jegyzéke

7TMR	7 transzmembrán receptor
A/D	akceptormennyiség / donormennyiség hányados
AT <sub>1</sub> R	I-es típusú angiotenzin receptor
AT <sub>2</sub> R	II-es típusú angiotenzin receptor
β <sub>2</sub> AdR	β <sub>2</sub> adrenerg receptor
BiFC	bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció („Bimolecular Fluorescent Complementation”)
BRET	Biolumineszcencia Rezonancia Energia Transzfer
CaSR	kalcium érzékelő receptor („calcium sensing receptor”)
CB <sub>1</sub> R	1-es típusú cannabinoid receptor
CHO	kínai hörcsög ovárium („chinese hamster ovarium”) sejtvonala
CFP	cián fluoreszcens fehérje („cyan fluorescent protein”)
CPM	percenkénti beütésszám („count per minute”)
ECL	extracelluláris hurok régió („extracellular loop”)
ER	endoplazmás retikulum
FBS	magzati borjú szérum („foetal bovine serum”)
FCS	Fluoreszcencia Korrelációs Spektroszkópia
FRAP	fotoelhalványítást követő fluoreszcencia visszatérés („fluorescence recovery after photobleaching”)
FRET	Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer
GABA <sub>B1</sub> R	B1 típusú GABA (gamma-amino-vajsav, „gamma-aminobutyric acid”) receptor
GABA <sub>B2</sub> R	B2 típusú GABA (gamma-amino-vajsav, „gamma-aminobutyric acid”) receptor
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor („G Protein-coupled Receptor”)
GRK	G-fehérjéhez kapcsolt receptor kináz („G Protein-coupled Receptor Kinase”)
H8	8-as hélix (GPCR-ok C terminális régiójának membrán közeli, helikális régiója)

HEK293	humán embrionális vese („human embryonic kidney”) 293 sejtvonal
ICL	intracelluláris hurok régió („intracellular loop”)
kBRET	kvantitatív BRET
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz („mitogen activated protein kinase”)
N&B	szám és fényesség analízis („number and brightness analysis”)
PCR	polimeráz láncreakció („polymerase chain reaction”)
PLC	foszfolipáz C
RLuc	<i>Renilla</i> luciferáz
S.E.M.	az átlag szórása („standard error of mean”)
SI-Ang II	szarkozin-izoleucin angiotenzin II
TIRF	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia („total internal reflection fluorescence”)
TM	transzmembrán régió
V <sub>1a</sub> R	1a típusú vazopresszin receptor
V <sub>2</sub> R	2-es típusú vazopresszin receptor
YFP	sárga fluoreszcens fehérje („yellow fluorescent protein”)

## 2. Bevezetés

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok („G Protein-coupled Receptor”, GPCR) a plazmamembrán receptorok egyik legnépesebb családját alkotják. Jelentőségüket mutatja, hogy gyakorlatilag minden eukarióta élőlényben megtalálhatóak [1], a humán genomban több mint 1000 gén kódol GPCR-t [2]. Számos fontos fiziológiai mechanizmus, mint például a szenzoros működések, a neurotranszmisszió, a hormonális szabályozás és az immunreguláció közvetítésében is alapvető szerepet játszanak. Ligandjaik között eltérő kémiai természetű molekulák fordulnak elő, kezdve az ionoktól, a lipdeken, nukleotidokon, biogén aminokon keresztül a peptidekig és glikoproteinekig, de a fény észlelése is GPCR-okon keresztül történik. Orvosbiológiai jelentőségüket alátámasztja, hogy a jelenleg használt gyógyszerek közel fele GPCR-okon keresztül fejt ki hatását [3].

A különböző receptorok magasabb rendű szerveződése, dimer és oligomer képzése már régóta ismert. A tirozin-kináz receptorok és a különféle citoplazmatikus receptorok működéséhez elengedhetetlen azok dimerizációja. Ezekkel ellentétben a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok hosszú időn keresztül monomerként funkcionáló fehérjékként éltek a tudományos köztudatban. Az elmúlt két évtized eredményei azonban azt mutatják, hogy a GPCR-ok is képesek dimereket vagy magasabb rendű oligomereket képezni [4] (Az oligomerek pontos sztöchiometriája máig intenzív kutatások tárgyát képezi. Dolgozatomban általában dimereknek fogom nevezni a több receptorból létrejött komplexeket, az oligomer elnevezést fenntartva azokra az esetekre, amikor egyértelműen kettőnél több receptor alkot komplexet.). Dimer létrejöhet két azonos receptor között (homodimerizáció), illetve különböző receptorok között is (heterodimerizáció). A dimerizáció befolyásolhatja a receptorok ligandkötését, konformációját, interakcióját a különféle effektor fehérjékkel, ezáltal azok jelátvitelét és internalizációját, vagyis a receptorműködés gyakorlatilag teljes spektrumát. A megváltozott jelátvitel fontos élettani és kóreltani jelentőséggel bírhat, a különféle receptordimerek szelektív farmakológiai befolyásolása pedig kedvezőbb hatás-mellékhatás profilú gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethet.

A jelen dolgozatban bemutatott munkám során a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatásával, illetve a dimerizáció funkcionális

következményeinek vizsgálatával foglalkoztam. A GPCR-ok dimerizációjával foglalkozó kutatások alapvetően két csoportra oszthatóak: egyrészt a dimerizációnak mint közvetlen protein-protein interakciónak a kimutatását célzó, másrészt a dimerizáció funkcionális, a jelátvitelre gyakorolt következményeit vizsgáló munkákra (természetesen ezek egymást kiegészítve erősítik a GPCR-ok dimerizációjának koncepcióját). Ennek megfelelően az alábbiakban – a GPCR-ok általános leírását követően – röviden bemutatom a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatására alkalmazott módszereket, a jelenlegi elképzeléseket a dimerizáció strukturális háttéréről, valamint összefoglalom a dimerizációnak a receptorműködésre gyakorolt hatásait, azok jelenleg ismert fiziológiai és farmakológiai következményeit.

## **2.1 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorokról általában**

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok a plazmamembrán receptorok legnépesebb szupercsaládját alkotják. Az elmúlt évek, Nobel-díjjal is jutalmazott kutatásainak köszönhetően mára több GPCR nagyfelbontású röntgenkristallográfia segítségével meghatározott térszerkezete a rendelkezésünkre áll [5-7]. A GPCR-ok szerkezetére jellemző a hét transzmembrán (TM) domén (innen származik másik elnevezésük, a hét transzmembrán receptor, 7TMR), melyeket extra- és intracelluláris hurok régiók kapcsolnak össze (ECL és ICL). A receptorok N-terminálisa extracellulárisan, míg C-terminálisa intracellulárisan helyezkedik el. Filogenetikai analízis alapján a humán G-fehérjéhez kapcsolt receptorok 5 családba sorolhatók [2], melyek közös strukturális és funkcionális jellemzőkkel rendelkeznek.

A rodopszin család (korábbi elnevezéssel Class A) a legnépesebb csoport. Szekvenciájukra jellemző a konzervált D/E-RY motívum a hármas TM domén és kettős intracelluláris hurok határán, valamint a NSxxNPxxY motívum a hetes TM doménban. Ligandjukat jellemző módon a transzmembrán domének extracelluláris régiója által képzett üregben kötik. E csoportba tartoznak a névadó opszin mellett többek között a prosztanoidok, cannabinoidok, biogén aminok receptorai, számos peptid receptor (például a vazopresszin és angiotenzin II receptorai), a glikoprotein hormonok receptorai, valamint a szagló receptorok.

A szekretin receptor család (Class B) jellemzője a relatív nagy, 60-80 aminosav hosszúságú N-terminális, mely konzervált cisztein aminosavakat tartalmaz, és szerepet

játszik e receptorok ligandkötésében is. E receptorok endogén ligandjai jellemzően hosszabb peptidek. A névadó szekretin receptor mellett a kalcitonin receptor, a glukagon receptor és a parathormon receptor is e családba tartoznak.

A glutamát receptor család (Class C) N-terminálisa lényegesen hosszabb, mint az eddig említett receptorcsaládokban, 300-600 aminosav hosszúságú, és a ligandkötésben szerepet játszó „Venus fly trap” (Vénusz légycsapója) domént alkotja. E család tagjai a metabotróp glutamát receptorok, a GABA<sub>B1</sub> és GABA<sub>B2</sub> receptorok, a kalciumérzékelő receptor, valamint az egyes típusú ízéző receptorok. A glutamát receptor család tagjairól ismert, hogy obligát dimerként funkcionálnak [8], azaz a dimerizáció esetükben elengedhetetlen feltétele a receptorműködésnek.

A további két család, a Frizzled receptor és az adhéziós receptor család funkciója jelentősen eltér a klasszikus G-fehérjéhez kapcsolt receptor funkciótól, ezért részletesebb tárgyalásuktól eltekintek.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok agonista kötés hatására aktív konformációjukban stabilizálódnak, és különféle effektor fehérjéket aktiválnak. A GPCR-ok klasszikus (egyben névadó) jelátvitelük során heterotrimer G-fehérjéket aktiválnak. A heterotrimer G-fehérjék  $\alpha$  és  $\beta\gamma$  alegységekből állnak, melyek a receptoraktiváció hatására disszociálnak, és enzimek, illetve ioncsatornák szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat [9]. Mára általánosan elfogadottá vált, hogy a GPCR-ok a heterotrimer G-fehérjék aktiválásán kívül, más, G-fehérje független jelátviteli útvonalak elindítására is képesek. Az egyik legismertebb ilyen útvonal az arresztin fehérjék aktiválása [10]. Az arresztin fehérjék az aktivált, majd G-fehérje kapcsolt receptor-kinázok (GRK-ok) által foszforilált receptorhoz kötődnek, részt vesznek a G-fehérje függő jelátvitel leállításában, majd a receptorok internalizációjában. Emellett az arresztinek úgynevezett „scaffold” (állvány) fehérjeként különböző fehérjék kötésén keresztül jelátviteli útvonalak, például a MAP kináz kaszkád elindításában is részt vesznek [11]. A jelenleg elfogadott GPCR aktivációs modellek alapján a receptorok nem csak egy aktív konformációval rendelkeznek, és a különféle konformációk eltérő mértékben aktiválhatják a G-fehérje függő és független jelátviteli folyamatokat. Az úgynevezett „biased” (elfogult) ligandok, illetve megfelelő mutációk segítségével stabilizálhatóak olyan receptor konformációk, melyek szelektíven aktiválnak egy specifikus jelátviteli folyamatot [12]. Az ilyen jelátvitel-szelektív ligandok kedvezőbb



hatás/mellékhatás profilú gyógyszereket eredményezhetnek, melyek közül néhány már klinikai kipróbálás fázisába is eljutott [13].

## 2.2 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatása

A glutamát receptor családba tartozó receptorokról mára egyértelműen elfogadott, hogy obligát homo- illetve heterodimerként funkcionálnak. Ezzel szemben a rodopszin család receptorainak dimerizációja, illetve a dimerizáció funkcionális jelentősége a több mint két évtizede tartó intenzív kutatások ellenére máig vitatott kérdés (Tekintettel arra, hogy kísérletes munkám során főként a rodopszin családba tartozó receptorok dimerizációjával foglalkoztam, a továbbiakban nagyrészt ezek dimerizációjának leírásával foglalkozom. Ahol más családba tartozó receptorok dimerizációjáról írok, külön jelölöm ezt.). Bár számos funkcionális adat szól a receptorok dimerizációja mellett, ezek önmagukban sok esetben nem elégségesek a dimerizáció bizonyítására. A funkcionális kísérletek sok esetben koexpresszálódó GPCR-ok megváltozott jelátviteléből következtetnek a dimerizáció meglétére. A megváltozott jelátvitel azonban, tekintettel a receptorok által elindított számos jelátviteli útvonalra, nem feltétlenül a dimerizáció következménye, hanem következhet a két receptor szignalizációja közti átbeszélésből („crosstalk”) is [14]. Bár megfelelő kontrollok alkalmazásával (például hasonló jelátvitelű, de nem dimerizáló receptorok alkalmazásával) az átbeszélés lehetőségének valószínűsége csökkenthető, a dimerizáció bizonyításához elengedhetetlen a receptorok közötti közvetlen fizikai interakció kimutatása.

A fehérje-fehérje interakciók kimutatására számos módszer áll rendelkezésre. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatása során problémát jelent, hogy azok membránfehérjék, így mozgásuk, szemben a citoszólikus fehérjékkel, 2 dimenzióra korlátozódik. A legtöbb módszer alkalmazásához szükséges a receptorok jelölése (fluoreszcensen vagy epitóppal), így azok csak expressziós rendszerekben alkalmazhatóak, sok esetben a receptorok fiziológiánál nagyobb mértékű expressziójához vezetve. E két tényező könnyen a vizsgált receptorok aspecifikus kapcsolatát eredményezheti. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálatához alapvető fontosságú e nem-specifikus interakciók elkülönítése a valódi, specifikus kapcsolattól, azaz a dimerizációtól.

### 2.2.1 Biokémiai módszerek

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának kimutatására alkalmazott első módszerek a Western-blot és a koimmunprecipitáció voltak. Számos GPCR esetén, így például a  $\beta_2$  adrenerg [15] és a  $\delta$  ópioid [16] receptor esetén leírták, hogy a Western-blotokon a monomer receptornak megfelelő csík mellett további, a receptor dimernek, illetve oligomereknek megfelelő magasságban futó fehérje is detektálható, ami e receptorok homodimerizációjára utal. Megfelelő epitóp-párral (HA-Myc illetve FLAG-Myc) jelölt receptorok koexpressziója esetén az egyik epitóp ellenes antitesttel koimmunprecipitálható volt a másik epitóppal jelölt receptor, ami tovább valószínűsítette a homodimerizáció fennállását. Koimmunprecipitáció segítségével nemcsak a receptor homodimerek, hanem heterodimerek, mint például a  $\kappa$  és  $\delta$  ópioid receptor közti heterodimerizáció is kimutathatóvá váltak [17].

Bár a koimmunprecipitáció gyakran alkalmazott módszer volt a GPCR dimerek kimutatására, számos hátránnyal rendelkezik [18]. Értelmszerűen csak a vizsgált sejtek lízisét követően alkalmazható, tehát élő sejtek nem vizsgálhatóak segítségével. A receptorok TM régióinak hidrofóbicitása, valamint az overexpresszió könnyen mesterséges aggregátumok képződéséhez vezethet. A fals pozitív eredmények kizárására gyakran alkalmazott kontroll, hogy az epitóppal jelölt receptorokat külön sejtekben expresszáltatják, majd a nyert mintákat összekeverik. Amennyiben ez esetben (szemben azzal, amikor a receptorokat egy sejtben koexpresszáltatták) nem tapasztalható koimmunprecipitáció, az erősíti a dimerizáció fennállását. Az adekvát kontrollok ellenére születtek olyan közlemények, melyek az összes vizsgált receptor koimmunprecipitációját, és így dimerizációját írták le, ami legalábbis megkérdőjelezi a módszer használhatóságát a receptorok közti specifikus kapcsolat kimutatására [19].

### 2.2.2 Biofizikai módszerek

#### 2.2.2.1 Rezonancia energiatranszfer módszerek

Jelenleg a leggyakrabban alkalmazott módszerek a GPCR-ok közti közvetlen fizikai interakció kimutatására a Förster-féle rezonancia energiatranszfer elvén működő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) és a biolumineszcencia rezonancia energia transzfer (BRET) [20]. A Förster-féle rezonancia energiatranszfer lényege két

kromofór, egy energia donor és egy energia akceptor között létrejövő, fénykibocsátás nélkül, dipól-dipól kölcsönhatások révén létrejövő energiaátadás. A gerjesztett állapotban lévő donor energiát ad át a molekuláris közelségben lévő akceptornak, mely ennek hatására gerjesztett állapotba kerül, és többnyire fényt bocsájt ki. Az energiatranszferhez értelemszerűen szükséges a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedése. Az energia transzfer létrejöttét a donor emissziós maximumán történő emisszió csökkenése, illetve az akceptor emissziós maximumán az emisszió emelkedése jelzi. Az energia transzfer hatékonysága a távolság függvényében az

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

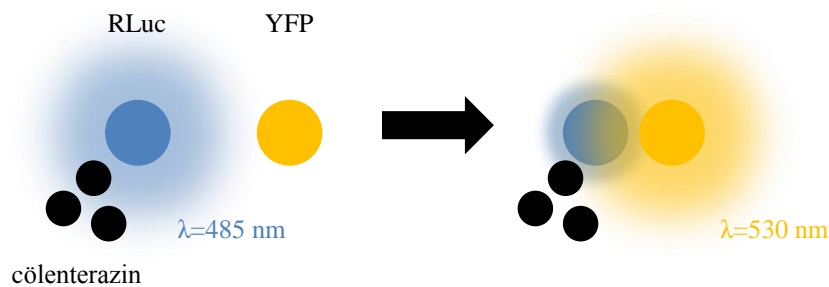
egyenlet alapján (ahol E az energia transzfer hatékonysága, r a donor-akceptor távolság,  $R_0$  az 50%-os energia transzfernek megfelelő távolság) intenzíven csökken a donor-akceptor távolság növekedésével, így körülbelül 100 Å távolságon belüli kapcsolatok detektálására alkalmas. Az energiatranszfer mértéke emellett függ a donor és akceptor egymáshoz viszonyított orientációjától is. Fontos megjegyezni, hogy az energiatranszfer mérések nem közvetlen fizikai interakciót, hanem molekuláris közelséget detektálnak, vagyis a fejezet bevezetőjében említett problémák esetükben is megjelennek.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálatában egyik legelterjedtebben használt módszer a biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET). BRET esetében energia donorként a cölenterazin nevű molekula *Renilla* luciferáz enzim által katalizált oxidálása szerepel. Bár a fényenergia a cölenterazin oxidálása során keletkezik, az irodalomban általánosan elfogadott a *Renilla* luciferáz donorként történő megnevezése, így a továbbiakban dolgozatomban a *Renilla* luciferáz enzimet fogom donorként említeni. Tekintettel arra, hogy a BRET mérésekben a cölenterazin feleslegben van jelen, a fény emisszió mértékét valóban a *Renilla* luciferáz mennyisége határozza meg, így ez az elnevezés - fizikai pontatlansága ellenére - elfogadható. *Renilla* luciferáz hatására a cölenterazin cölenteramidá oxidálódik, és 485 nm emissziós maximummal fény emittálódik (1. ábra). Amennyiben molekuláris közelségben energia akceptor, például egy sárga fluoreszcens fehérje („yellow fluorescent protein”, YFP) található, létrejön az energiatranszfer, melyet a YFP

emissziós maximumán, 530 nm-en fokozódó fénykibocsátás jelez. A BRET jel vagy BRET hányados, mely a

$$BRET_{\text{hányados}} = \frac{\text{Emisszió}_{530 \text{ nm}}}{\text{Emisszió}_{485 \text{ nm}}}$$

képlet alapján számolható, jól jelzi a donor és az akceptor közötti molekuláris közelséget.



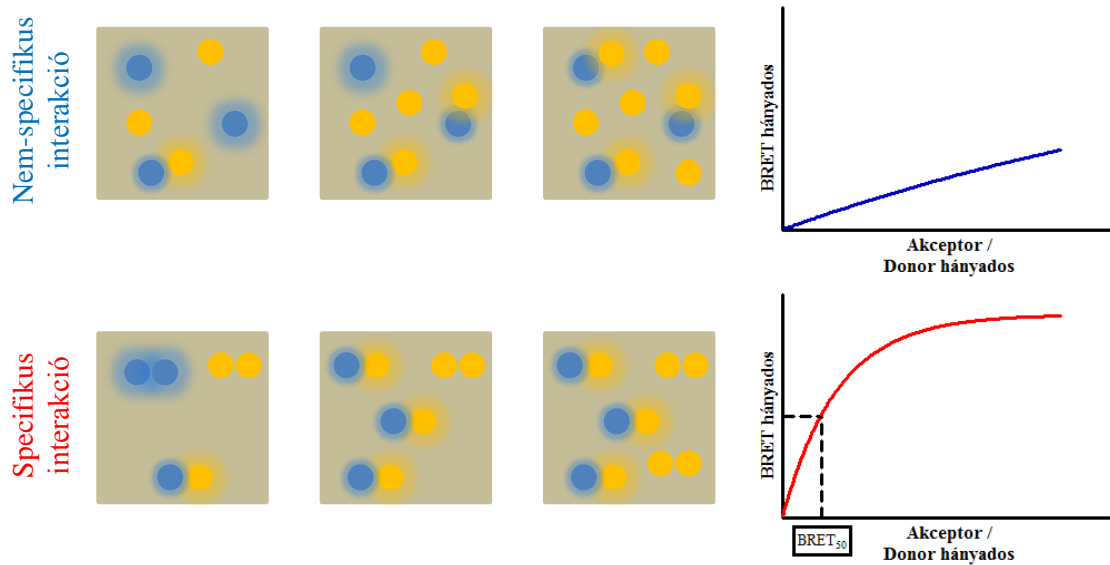
$$BRET_{\text{hányados}} = \frac{\text{Emisszió}_{530 \text{ nm}}}{\text{Emisszió}_{485 \text{ nm}}}$$

### 1. ábra - A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) elve

Az energia donor *Renilla* luciferáz enzim (RLuc) szubsztrátját a cölenterazint oxidálva 485 nm emissziós maximumon fényt emittál. Amennyiben az energia akceptor sárga fluoreszcens fehérje (YFP) molekuláris közelségbe kerül (<100 Å), az a rezonancia energiatranszfer révén gerjesztődik, így 530 nm emissziós maximumon fényt bocsát ki. A molekuláris közelséget jelző BRET hányados a két emissziós maximumon mért fényintenzitás hányadosaként definiálható.

A vizsgálni kívánt fehérjepár egyik tagját *Renilla* luciferázzal, másik tagját YFP-vel jelölve vizsgálható a köztük lévő interakció. A BRET mérések kiválóan alkalmazhatóak fehérje-fehérje interakciók megváltozásának (asszociáció, disszociáció) vizsgálatára, azonban a statikus illetve egyensúlyi interakciók vizsgálata problémásabb. Az energia transzfer mértéke, így a BRET hányados függ a donor és az akceptor közti interakción kívül azok abszolút és relatív mennyiségétől, illetve a donornak és az akceptornak a negyedleges szerkezeten belül elfoglalt helyétől. Ennek megfelelően a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálatakor az emelkedett BRET hányados nem feltétlenül jelent dimerizációt, származhat az overexpresszióból és a fehérjék véletlenszerű mozgásából adódó nem-specifikus kapcsolatokból is.

A specifikus (dimerizáció) és nem-specifikus interakciók elkülönítésére ad lehetőséget a Bouvier és munkacsoportja által kidolgozott, úgynevezett kvantitatív BRET módszere (kBRET) [21]. A módszer lényege, hogy állandó donorral jelölt receptor mennyiség mellett az akceptorral jelölt receptor mennyiségét növelik, majd a BRET hányadost az akceptormennyiség/donormennyiség (A/D) hányados függvényében ábrázolják (2. *ábra*). Nem-specifikus interakció esetén az akceptormennyiség fokozásával egyre nő a valószínűsége annak, hogy egy donor molekula molekuláris közelségbe kerüljön egy akceptorral, így a fenti ábrázolásban egyenest (vagy csak nagyon nagy A/D hányados esetén ellapuló görbét) kapunk. Ezzel szemben specifikus kapcsolat esetén az akceptormennyiség növelésével egy idő után már mindegyik donor akceptorral képez párt, az akceptor szám további emelkedése nem fokozza a BRET jelet, így az A/D hányados függvényében való ábrázolás esetén telítési görbét kapunk. A BRET hányados abszolút értéke, mint már említettem, függ a donor és az akceptor dimeren belüli távolságától és orientációjától is, így nem alkalmazható a dimerizációs affinitás megítélésére. A  $BRET_{50}$  érték, azaz a félmaximális BRET jelnél mérhető A/D hányados ezzel szemben jól jelzi a donorral és akceptorral jelzett receptorok egymás iránti affinitását: egy bizonyos donorral jelölt receptor dimerizációját vizsgálva különböző, akceptorral jelölt receptorokkal az alacsony  $BRET_{50}$  érték a dimerizációt igazolja, míg a magas  $BRET_{50}$  érték gyenge interakciót, vagy a dimerizáció hiányát jelenti.



## 2. ábra - A kvantitatív BRET módszerének elve

Az állandó mennyiségű energia donorral és növekvő mennyiségű energia akceptorral jelölt receptorokat expresszáló sejtekben mért BRET jelnek az akceptormennyiség/donormennyiség hányados függvényében történő ábrázolása nem-specifikus interakció esetén lineáris, specifikus interakció esetén telítési görbével leírható összefüggést eredményez ([20] alapján).

Egy alternatív módszer a specifikus és nem-specifikus interakciók elkülönítésére az úgynevezett BRET kompetíciós kísérletek alkalmazása. E kísérleti felállásban az állandóan tartott mennyiségű donorral és akceptorral jelzett receptorok mellé növekvő mennyiségben jelöletlen receptort transzfektálnak. Ha a jelöletlen receptor dimerizál a donorral, az akceptorokat kiszorítja a dimerekből, ami BRET jel csökkenéshez vezet [20]. A kvantitatív BRET módszerrel számos receptor homo- és heterodimerizációját írták le [22-26]. Bár az idők folyamán több közlemény is feleltette az így kapott eredményekhez való kritikus hozzáállás fontosságát [27-29], az eljárás továbbra is az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a GPCR-ok közti dimerizáció vizsgálatára.

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának vizsgálatára a BRET mellett a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) módszerét is számos esetben alkalmazták. FRET esetében a donor és az akceptor is fluoreszcens molekula, leggyakrabban egy kék („cyan fluorescent protein”, CFP) és egy sárga fluoreszcens fehérje (YFP), vagy azok származékai. A FRET mérések alapvető előnyét jelenti a BRET-tel szemben, hogy képalkotó eljárásokkal (átnézeti és konfokális mikroszkópia) kombinálva szubcelluláris szinten is vizsgálható velük a dimerizáció. A GPCR-ok

szintézisük és érésük során az endoplazmás retikulumból, a Golgi hálózaton és exocitotikus vezikulákon keresztül érik el a plazmamembránt. FRET mérések igazolják, hogy a dimerizáció a plazmamembránban is fennáll [30], nem csak a receptorok útjának korábbi stádiumaiban, ahol esetleg a GPCR-ok egy kisebb felületen (például exocitotikus vezikulák felszínén) helyezkednek el. Szintén FRET alapú technikával igazolódott, hogy a  $\beta_2$  adrenerg receptorok mesterséges lipidvezikulákban is dimereket, illetve a kvantitatív BRET elvéhez hasonló kiértékelés alapján tetramereket képeznek [31]. Ez utóbbi azért alapvető fontosságú megfigyelés, mert a sejtes rendszerekben végzett mérések nem tudják egyértelműen kizárni azt a lehetőséget, hogy a dimerek más „scaffold” fehérjéken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Az oligomerek pontos sztöchiometriáját vizsgáló egyéb FRET alapú kísérletek is a receptorok tetramerben való elhelyezkedését írták le [32].

A FRET másik előnye a BRET-tel szemben, hogy kis molekulaméretű fluoreszcens festékekkel nemcsak a receptorok, hanem azok ligandjai is jelölhetőek. Az ily módon jelölt ligandokkal endogén receptorok dimerizációját is sikerült kimutatni [33], mely eredmények jelentősen erősítették a GPCR-ok dimerizációjának koncepcióját.

Fontos megjegyezni, hogy bár a rezonancia energiatranszfer alapú mérések többsége arra utal, hogy a rodopszin családba tartozó G-fehérjéhez kapcsolt receptorokra általánosan jellemző a homodimerizáció, egyes BRET [28] illetve FRET [34] mérések alapján a receptorok monomerként fordulnak elő, és a dimerizáció és oligomerizáció csak az overexpresszióból fakadó mesterséges aggregáció következménye.

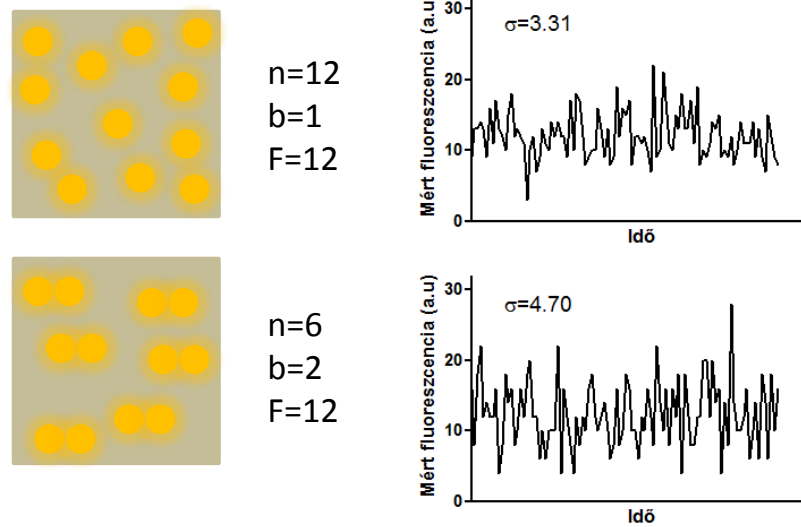
### **2.2.2.2 Egyéb biofizikai módszerek**

Az utóbbi pár évben több, az egyedi fluoreszcens molekulák mozgását követő („single molecule fluorescence”) közlemény foglalkozott a GPCR-ok dimerizációjának vizsgálatával [35, 36]. Ezen munkák során specifikusan a plazmamembránban elhelyezkedő receptorokat jelölték fluoreszcensen, majd azok mozgását illetve asszociációját/disszociációját követték nyomon TIRF („total internal reflection fluorescence”, teljes belső visszaverődés fluoreszcencia) mikroszkópia segítségével. Az így nyert eredmények arra utalnak, hogy a receptorok folyamatos, tranzienst átmenetben

vannak a monomer-dimer-oligomer állapotok között, és egy dimer életideje másodperces nagyságrendűnek mérhető. Az egyes receptor homodimereket vizsgálva a monomer/dimer arány változónak bizonyult: míg a  $\beta_1$  adrenerg receptor zömmel monomeként fordul elő, és csak az expressziós szint fokozásával jelennek meg a dimer és oligomer formák, addig a  $\beta_2$  adrenerg receptorok már alacsony expressziós szint mellett is nagyrészt dimerként fordultak elő [35].

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) [37], illetve a hasonló elven alapuló „number&brightness analysis” (N&B, szám és fényesség analízis) [38] módszere a fluoreszcencia intenzitás időbeli fluktuációjából következtet a fluoreszcens fehérjék oligomerizációs állapotára. Fluoreszcens (konfokális vagy TIRF) mikroszkópiával egy adott területen (illetve térfogatban) mérve a fluoreszcencia intenzitását, az két paramétertől függ: az egyedi fluoreszcens molekulák fényességétől, illetve az adott területen elhelyezkedő fluoreszcens molekulák számától (3. ábra). Amennyiben a fluoreszcensen jelölt fehérjék dimerként vagy oligomerként fordulnak elő, az az adott fehérje fényességének emelkedéséhez (megkétszereződéséhez vagy többszöröződéséhez) vezet. Egy adott mért fluoreszcencia érték származhat sok monomer, illetve kevesebb oligomer fluoreszcens fehérje emissziójából, így önmagában nem ad információt sem az oligomerizációs állapotról, sem a mért térfogatban elhelyezkedő molekulák számáról. A fluoreszcens molekulák azonban véletlenszerű mozgásuk hatására elhagyhatják a mérési területet, illetve új molekulák is léphetnek be oda, ezáltal a mért fluoreszcencia időbeli fluktuációjához vezetve. Ez a fluktuáció, és így a mért fluoreszcencia szórása nagyobb, ha az egyedi fluoreszcens molekulák fényessége nagyobb (oligomerek), hiszen ilyenkor egy adott fluoreszcens oligomer be- illetve kilépése a mérési területre/területről nagyobb mértékben változtatja meg a mérhető fluoreszcenciát. A fentiek alapján megfelelő matematikai analízissel már következtetni lehet a vizsgált molekulák oligomerizációs állapotára [38]. A GPCR-ok dimerizációját az FCS és N&B módszerekkel vizsgáló kísérletek is a különböző GPCR-ok homodimerizációját erősítették meg, azonban a dimer állapot dominanciáját és stabilabb fennállását valószínűsítették [39, 40].





### 3. ábra - A fluoreszcencia fluktuációját mérő módszerek alkalmazása az oligomerizáció vizsgálatára

Egy adott mért területen (térfogatban) a fluoreszcencia intenzitás értéke ( $F$ ) megegyezik az ott található fluoreszcens molekulák számának ( $n$ ) és fényességének ( $b$ , „brightness”) szorzatával ( $F=n*b$ ). Egy adott fluoreszcencia érték származhat sok monomer molekulából (*felső ábrák*) illetve kevesebb oligomer (dimer) molekulából (*alsó ábrák*). A fluoreszcencia időbeli fluktuációja (*jobb ábrák*) nagyobb lesz oligomerek esetén (a mért fluoreszcenciát az egyes esetekben Poisson-eloszlást követő véletlen számokkal modelleztük,  $\sigma$  a szórást jelöli, az ábra [38] alapján készült).

Míg az eddig említett módszerek többsége nem feltétlenül a receptorok közvetlen fizikai interakcióját, hanem csak molekuláris közelségét vizsgálta, több eredmény utal a receptorok direkt fizikai kapcsolatára, élő sejtekben is. Ezen vizsgálatokban általában az egyik receptor immobilizációjának hatását vizsgálták a másik receptor mozgására. FRAP („fluorescence recovery after photobleaching”, fotoelhalványítást követő fluoreszcencia visszatérés) módszer segítségével vizsgálható a különféle fluoreszcensen jelölt fehérjék diffúziója a plazmamembránban. A plazmamembrán egy adott területét nagy intenzitású lézerténnel megvilágítva az ott elhelyezkedő fluoreszcens fehérjék „kiégnek”, a továbbiakban nem képesek fényt emittálni. Az ennek következtében lecsökkent fluoreszcencia a FRAP mérések során a szomszédos területekről a vizsgált területre diffundáló fluoreszcens molekuláknak köszönhetően visszatér a kiindulási értékre (illetve annak közelébe). A fluoreszcencia visszatérésének sebessége arányos a diffúzió sebességével. Egy plazmamembrán molekulát például antitest segítségével immobilizálva diffúziójának sebessége lecsökken. Amennyiben ezzel párhuzamosan egy másik, fluoreszcensen jelölt

plazmamembrán molekula FRAP segítségével mérhető diffúziója is csökken, az arra utal, hogy a két fehérje között közvetlen fizikai interakció áll fenn. Egy, az adrenerg receptorok homodimerizációját vizsgáló közlemény e módszerrel is a  $\beta_1$  receptorok tranziens, míg a  $\beta_2$  receptorok stabil dimerizációját írta le [41], ezzel szemben egy másik közlemény szerint a  $\beta_2$  receptorok sem befolyásolják egymás mobilitását [42], ami a tranziens dimerizáció koncepciót erősíti.

Egy további, a fluoreszcencia tárgykörébe tartozó, a GPCR-ok dimerizációjának vizsgálatára gyakran alkalmazott módszer a bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció („bimolecular fluorescence complementation”, BiFC) módszere [43]. A BiFC során egy fluoreszcens fehérje két, önmagában nem fluoreszkáló darabját kötik a vizsgálni kívánt fehérjékhez [44]. Amennyiben a vizsgált fehérjék interakcióba lépnek egymással, a két fluoreszcens fehérje darab összeáll, egy fluoreszkáló komplexet alkotva. A BiFC előnye, hogy rezonancia energia transzfer módszerekkel kombinálva nemcsak két, hanem három vagy akár négy fehérje közti interakciók is kimutathatóak segítségével [45]. A BiFC esetében is nagy problémát jelent, hogy a fluoreszcens komplex pusztán véletlenszerű fehérje-fehérje interakciók következtében is létrejöhet. A BiFC specificitását vizsgáló közlemények többsége azt találta [46], hogy specifikus interakció hiányában is létrejöhet fluoreszcencia (ezt saját, nem publikált eredményeink is megerősítik), tehát az így kapott eredmények fenntartással kezelendők.

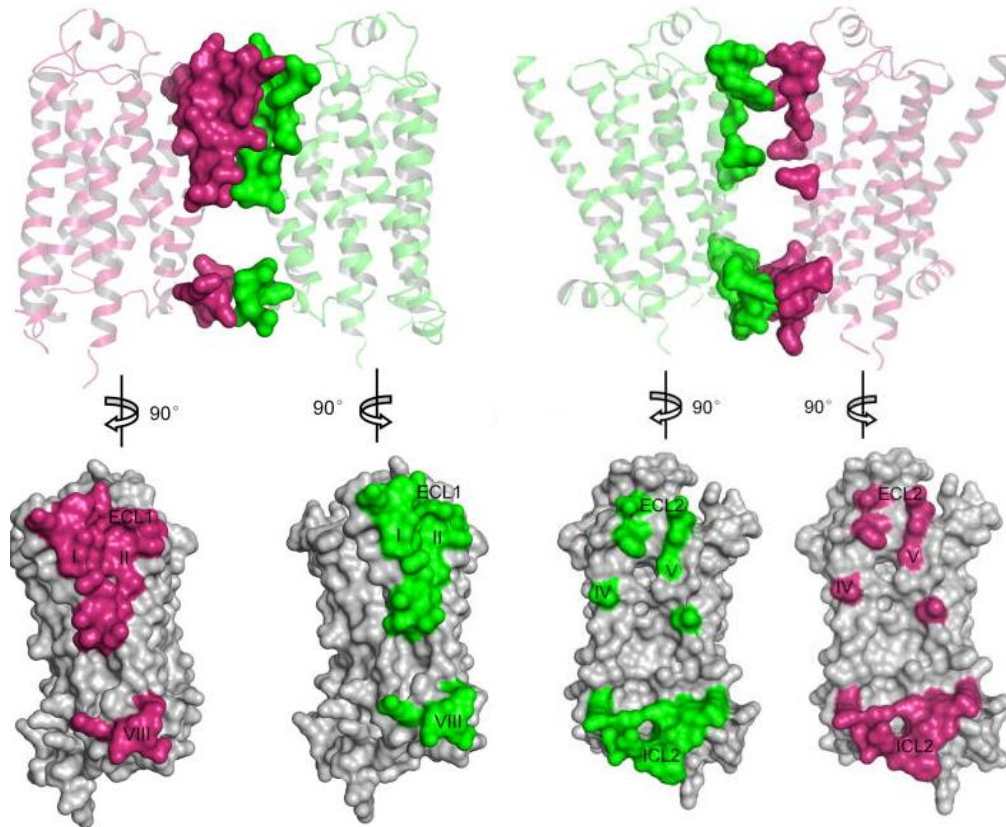
### **2.3 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának strukturális háttere**

Egy további, alapvető fontosságú kérdés a dimerizáció strukturális háttere, azaz hogy mely doméneken keresztül jön létre a receptorok közti interakció. A glutamát receptor család tagjai esetén itt is tisztább kép nyerhető a rendelkezésre álló adatokból. E receptoroknál a „Venus fly trap” illetve a C terminális fark régiók jelentőségét írták le a dimerizáció kialakulása szempontjából, illetve e receptorok között nagy valószínűséggel kovalens kötések is stabilizálják a kialakult kapcsolatot [8]. Ezzel szemben a rodopszin család esetén nagy valószínűséggel a transzmembrán régiók közötti hidrofób interakciók játsszák a főszerepet a dimerizáció kialakulásában.

A korai, a dimerizációért felelős régiókat vizsgáló kutatásokban gyakori felállás volt, hogy egy adott transzmembrán régiót pepidként szintetizálva, majd a sejtekbe juttatva vizsgálták hatásait a dimerizációra. Mind a  $\beta_2$  adrenerg [15], mind az A típusú

kolecisztokinin [47] receptor esetén a TM6 régióknak a dimerizációban játszott szerepét sikerült igazolni e megközelítést használva. Egy másik gyakran alkalmazott módszer a transzmembrán régiók közti interakciók kimutatására azok diszulfidkötéseken keresztüli stabilizálása. E megközelítésben a receptorok endogén cisztein aminosavait többnyire eltávolítják, majd a vizsgált TM régiókba cisztein mutációkat létrehozva, oxidáló ágens segítségével kereszt-kötik azokat, majd az így stabilizált receptor dimereket Western blot segítségével kimutatják. Az  $M_3$  muszkarinos acetilkolin receptor esetében TM4-TM5 régiók intracelluláris részei közti interakciót, valamint a TM1-TM2 és az úgynevezett 8-as hélix (H8, a C terminalis farok régió membránközeleli, helikális struktúrájú régiója) kapcsolatát valószínűsítették a dimeren belül [48]. Hasonló eredményeket hoztak a rodopszinnal végzett diszulfid-kereszt-kötéses kísérletek is [49].

Az egyik legközvetlenebb információt a dimerizációban résztvevő receptor régiókról az utóbbi években röntgenkristallográfiával meghatározott receptor struktúrák adják. Bár már a legelső kikristályosított receptor, a rodopszin [50] is dimer struktúrát mutatott, tekintettel arra, hogy a dimerizáció nem közvetlen aminosav-aminosav interakciókon, hanem a membrán lipidjein keresztül jött létre, ezt hosszú ideig csak kristályosítási műtermékek vélték. Az időközben meghatározott egyéb GPCR térszerkezetek azonban már specifikusabb dimerizációt jeleztek. A dimerizáció mind a CXCR4 kemokin [51], mind a  $\mu$  ópioid receptor [52] esetén a TM5-6 régiókon keresztül jön létre, ami – legalábbis részben – megerősíti a biokémiai módszerekkel nyert eredményeket. A TM5-6 interakción kívül a  $\mu$  ópioid receptorok esetében egy másodlagos, a TM1-TM2-H8 felületet magában foglaló interakciós régió is megjelent. A  $\kappa$  ópioid [53] és  $\beta_1$  adrenerg [54] receptorok kristályszerkezete alapján is két régiót mutattak ki, melyeken keresztül a dimerizáció létrejöhet. E receptoroknál a TM1-TM2-H8 interakciós felület mellett egy a TM4-TM5 régió között létrejövő interakciót írtak le (4. ábra). A két eltérő dimerizációs felület magyarázhatja azokat az egyéb módszerekkel nyert eredményeket, melyek a GPCR dimerek tetramerekbe rendeződését írják le [31, 32, 35]. A rodopszin receptorok dimerizációját, majd oszlopokba rendeződését mutatta a pálcikák külső szegmentumáról készült atomerő mikroszkópiás felvételek is [55], mely negyedleges szerkezetben a TM4-TM5 interakciót találták felelősnek a dimerizációért, és a TM1-TM2-H8 valamint a TM5-TM6 közötti kapcsolatot a magasabb rendű szerveződésért [56].



#### 4. ábra – A $\beta_1$ adrenerg receptor homodimer kristálystruktúrája

A  $\beta_1$  adrenerg receptor homodimerizációjában feltételezhetően szerepet játszó régiók: a TM1-TM2-H8 (balra) és a TM4-TM5 (jobbra) által alkotott felületek (az ábra az [54] közleményből származik).

A dimerizációban szerepet játszó régiók, illetve aminosavak vizsgálatában számos, a bioinformatika és a „computational biology” (számítógépes biológia) tárgykörébe tartozó módszert is alkalmaznak. A különféle, szekvencia analízis alapján működő módszerek (korrelált mutációk analízise, „evolutionary trace” (evolúciós nyom) analízis) számos, sajnos sok esetben eltérő pozíciót perdictáltak fontosnak a dimerizáció szempontjából [57]. Összességében azonban ezen módszerekkel nyert adatok is a TM4-5-6 régiók szerepét valószínűsítik a receptorok közti interakcióban, hasonlóan a molekuláris dinamikai szimulációkon és fehérje-fehérje dokkoláson alapuló módszerekhez [58]. E modellek értékes kiindulópontjai lehetnek különféle, a dimerizációban résztvevő aminosavakat vizsgáló kísérleteknek, azonban kísérleti validálásuk a legtöbb esetben még várat magára.

## 2.4 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának funkcionális következményei

Fiziológiai és farmakológiai szempontból a legfontosabb kérdés, hogy a dimerizáció hogyan befolyásolja a receptorok működését. Az eltérő szövetekben egy adott receptor más-más egyéb receptorokkal alkothat heterodimereket, ami a jelátvitel szövetspecifikus finomhangolásában is szerepet játszhat, valamint új gyógyszerek célpontját is jelentheti. A következőkben a dimerizációnak a receptorműködésre gyakorolt hatásairól rendelkezésre álló eredményeket foglalom össze.

### 2.4.1 Sejtfelszíni expresszió

A jelenleg elfogadott elképzelés szerint a dimerizáció már a receptorok szintézisének korai stádiumában, az endoplazmás retikulumban (ER) illetve a Golgi készülékben kialakul [59]. Mint sok más esetben, az első egyértelmű eredmények itt is a glutamát családba tartozó receptorok esetében születtek meg. A GABA<sub>B1</sub> receptor a C-terminális régiójában egy endoplazmás retikulum retenciós szekvenciát tartalmaz, így önállóan kifejezve nem képes elhagyni az ER-t. A koexpresszált GABA<sub>B2</sub> receptor dimert alkot a GABA<sub>B1</sub> receptorral, elfedi annak retenciós szekvenciáját, így a GABA<sub>B1</sub>-GABA<sub>B2</sub> dimer már kijut a plazmamembránra [60].

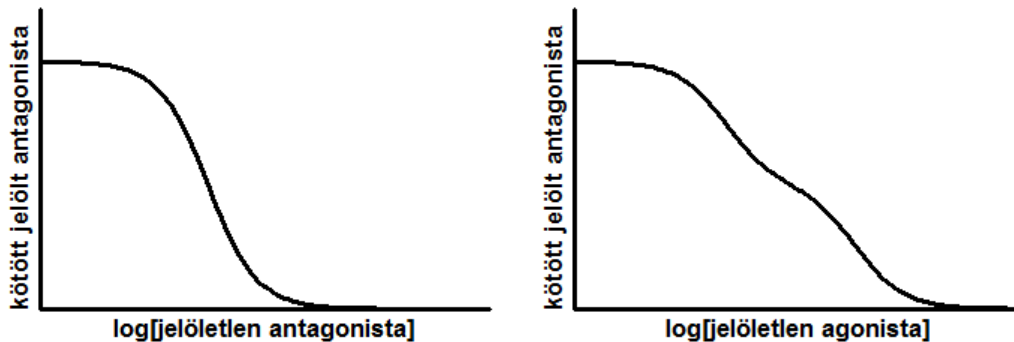
Különbéle módosított, ER retenciós mutáns receptorokkal a rodopszin család tagjai esetén is sikerült kimutatni, hogy a dimerizáció már az ER-ban létrejön. Az ER retenciós  $\beta_2$  adrenerg receptor [61], illetve az 1-es típusú angiotenzin receptor [62] esetén is igazolódott, hogy gátolják a koexpresszált vad típusú receptor plazmamebrán kihelyeződését. A fluoreszcensen jelölt szerotonin 2C receptorok közti rezonancia energia transzfert szubcelluláris szinten vizsgálva mind a plazmamembránban, mind az ER és a Golgi készülék felszínén a dimerizációnak megfelelő jelek voltak mérhetőek [30].

A dimerizációnak nagy valószínűséggel szerepe van a receptoroknak az ER minőségellenőrzési („quality control”) mechanizmusán való áthaladásán. Az ER különféle dajkafehérjei („chaperonok”) csak a megfelelő harmadlagos/negyedleges szerkezetet felvevő receptorok továbbhaladását teszik lehetővé, a nem megfelelő szerkezetű receptorok az ER-ban maradnak, illetve a lizoszómális degradáció irányába

haladnak tovább. Egyes receptor dimerek esetében már ismertek olyan dajkafehérjék, melyek a dimer kifejeződéséhez szükségesek [63].

#### 2.4.2 Ligandkötés

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok ligandkötése radioaktívan vagy fluoreszcensen jelölt ligandok segítségével vizsgálható. Már a korai, a 80-as években elvégzett vizsgálatok rámutattak arra, hogy a GPCR-ok ligandkötése komplexebb képet mutat a szimpla monomer receptor modelltől elvárhatónál [64]. A jelöletlen agonistával végzett kompetitív ligandkötési kísérletek eredményeit vizsgálva általában egy az agonistát magas, és egy azt alacsony affinitással kötő receptor populáció azonosítható (5. ábra).



#### 5. ábra – Kompetitív ligandkötési kísérletek negatív kooperatív agonista kötés esetén

A jelöletlen agonistával végzett kompetitív ligandkötési kísérletekben (*jobb ábra*) két eltérő ligandaffinitással jellemezhető receptor alpopuláció azonosítható, szemben a jelöletlen antagonistával végzett kísérletek (*bal ábra*) eredményeivel (a szimulációkat Octave programmal végeztük, [65] alapján)

Az egyik kézenfekvő modell ezen eredmények magyarázatára a dimerizáció és a dimer alegységei közötti allosztérikus interakció [65]. E modell szerint a dimer egyik alegységének agonista kötése gátolja a másik alegység agonista kötését, azaz a dimeren belül negatív kooperativitás áll fenn. Alacsony agonista koncentrációk esetén csak a dimer egyik tagja köt ligandot (magas affinitás), és csak magas koncentrációk esetén fog mindkét alegység ligandkötött állapotba kerülni (alacsony affinitású kötőhely). A negatív kooperáció nemcsak ligandkötési, hanem ligand disszociációs kísérletekkel is vizsgálható [66]. Ez esetben a receptorokat alacsony koncentrációjú radioaktívan jelölt agonistával jelölik, majd a nem kötött jelölt ligandot mosással eltávolítják, és a jelölt ligand disszociációjának kinetikáját vizsgálják. Amennyiben a nagy koncentrációban

adott jelületlen (hideg) agonista a disszociációt fokozza, az szintén a negatív kooperáció, és így a dimerizáció tényét erősíti. E módszerek előnye, hogy nem igénylik a receptorok módosítását (epitóp vagy fluoreszcens jelölés), így endogén módon expresszált receptorok esetén is alkalmazható. A homodimeren belüli negatív kooperativitás mellett számos receptor heterodimerben is igazolták, hogy az egyik receptor agonistája fokozza a másik receptorhoz kötődő agonista disszociációját [25, 26, 66].

Megjegyzendő azonban, hogy a negatív kooperativitás dimerizáció hiányában, a monomer receptorok G-fehérjéért történő kompetíciójával is magyarázható [67]. Ismert jelenség, hogy a receptor nagy affinitású ligandkötésért szükséges a heterotrimer G-fehérjével létrejövő kapcsolat (a heterotrimer G-fehérje allosztérikus modulátorként fokozza a receptor agonista iránti affinitását). Amennyiben a receptorok száma meghaladja a heterotrimer G-fehérjék számát (ez overexpressziós rendszerekben könnyen elképzelhető), a G-fehérjét kötő és nem kötő receptorok megfelelhetnek a magas és alacsony affinitású receptor populációnak, és a disszociációs kinetikában látható eltéréseket is okozhatja a G-fehérjéért történő kompetíció. Az endogén receptort expresszáló, élő sejteken fluoreszcens liganddal végzett kísérletek [33] azonban ezt a magyarázatot gyengítik, csakúgy, mint az a kísérletsorozat, ahol a GLP1 („glucagon-like peptid 1”) receptor dimerizációját megfelelő pontmutációkkal gátolva a negatív kooperativitás megszűnését is észlelték [68].

A GPCR-ok heterodimerizációja a kooperatív ligandkötés mellett új típusú kötőhelyek létrejöttét eredményezheti. Régóta ismert jelenség, hogy a farmakológiai módszerekkel azonosítható ópoid kötőhelyek száma meghaladja a genomban kódolt ópoid receptorok számát. Az egyik legelfogadottabb magyarázat szerint a különböző kötőhelyek az ópoid receptor homodimereknek, illetve heterodimereknek felelnek meg [69]. A különböző heterodimereket megcélzó farmakológiai szerek komoly terápiás jelentőséggel bírhatnak, így intenzív kutatások tárgyát képezik [70, 71]. Egy adott gyógyszer kívánatos hatásaiért többnyire csak a célszövetek egy részében expresszálódó receptorok felelősek, míg a további szövetekben kifejeződő receptorok mellékhatásokhoz vezethetnek, így egy adott szövetspecifikus heterodimer megcélzása esetén kedvezőbb hatás-mellékhatás profilú gyógyszerek hozhatók létre.

### 2.4.3 Receptor konformáció

A dimerekben létrejövő negatív kooperativitás aszimmetrikus dimer létrejöttéhez vezet: a dimer egyik tagja ligandkötött, míg a másik tag szabad állapotban van. A dimeren belüli aszimmetriát a ligandkötés mellett a receptorkonformáció szintjén is több esetben igazolták. Lohse és munkatársai az  $\alpha_{2a}$  adrenerg receptor 3-as intracelluláris hurok és C terminális fark régiójába egy-egy fluoreszcens fehérjét beépítve intramolekuláris FRET receptor-bioszenzort hoztak létre, mellyel a receptor aktiváció hatására létrejövő konformációváltozások vizsgálhatóak [72]. Eredményeik szerint a receptor-bioszenzorral együtt expresszált, azzal dimert képző  $\mu$  opioid receptor stimulálása gátolja az  $\alpha_{2a}$  adrenerg receptor aktív konformációjának kialakulását. Más megközelítést használva (a TM6 régióban található triptofán aminosav receptor konformációtól függő fluoreszcenciáját vizsgálva) egy másik kutatócsoport is megerősítette, hogy a BLT1 leukotrién receptor homodimerben csak az agonistát kötött receptor kerül teljesen aktív konformációba, míg az agonistát nem kötött alegység egy átmeneti, mind a bazális, mind az aktív konformációtól eltérő szerkezetet vesz fel [73].

### 2.4.4 G-fehérje aktiválás

A GPCR-okról és a heterotrimer G-fehérjékről rendelkezésre álló strukturális adatok arra utalnak, hogy a heterotrimer G-fehérje mérete jelentősen nagyobb, mint a receptor-G fehérje közti interakciós felület, ami felveti annak lehetőségét, hogy a heterotrimer G-fehérje nem a monomer receptorral, hanem egy dimerrel lép interakcióba. Ezzel szemben a mesterséges lipid vezikulákban szigorúan monomerként kifejezett receptorok G-fehérje aktiválása egyértelműen bizonyítja, hogy a monomer receptor is képes heterotrimer G-fehérjét kötni és aktiválni [74-76]. Ez azonban még természetesen nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy *in vivo* a dimerizáció befolyásolja a G-fehérje aktiválás folyamatát, melyet számos kísérleti eredmény is megerősít.

A  $D_2$  dopamin receptor homodimer G-fehérje aktiválását vizsgáló elegáns kísérletsorozat igazolta, hogy a G-fehérje kötéshez elegendő az egyik alegység aktiválása, de a másik alegység aktivitása befolyásolja azt [77]: maximális G-fehérje aktiválás akkor mérhető, ha csak az egyik alegység aktív, míg a másik inverz agonistával inaktív állapotban tartott, míg mindkét alegység aktiválása esetén csökkent G-fehérje aktiválás volt tapasztalható. A mutációs kísérletek, valamint



molekulamodellzés segítségével nyert adatok alapján úgy tűnik, hogy a D<sub>2</sub> receptor homodimer teljesen aktív tagja a 2-es és 3-as, míg a „moduláló” alegység csak a 3-as intracelluláris hurok segítségével vesz részt a G-fehérje aktiválásban. A dimeren belüli interakcióknak a G-fehérje aktiválásra gyakorolt hatását az AT<sub>1</sub>-es angiotenzin és β<sub>2</sub> adrenerg receptor heterodimerben is leírták: itt azonban az egyik receptor szelektív antagonistával történő gátlása nem fokozta, hanem gátolta a másik receptor G-fehérje aktiválását [78]. Saját munkacsoportunk korábbi eredményei is arra utalnak, hogy egy nem szignalizáló AT<sub>1</sub>R mutáns antagonisták kötése gátolja a vele dimert képző vad típusú AT<sub>1</sub>R jelátvitelét [79].

A dimerizáció megváltoztathatja a receptorok G-fehérje specificitását és a G-fehérje aktiválás hatékonyságát is. A D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> dopamin receptorok által alkotott heterodimer G<sub>q</sub> heterotrimer G-fehérjét aktivál, és így intracelluláris Ca<sup>2+</sup> jelet hoz létre, szemben az önállóan expresszált receptorok G<sub>s</sub> illetve G<sub>i/o</sub> fehérje aktiválásával [80]. A D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heterodimerek megváltozott jelátvitelének jelentősége a major depresszió patomechanizmusában is felvetődött [81]. Hasonlóan megváltozott G-fehérje specificitást írtak le az AT<sub>1</sub>-es angiotenzin és CB<sub>1</sub>-es cannabinoid heterodimerben [82] (megjegyzendő azonban, hogy ez utóbbi esetben a megváltozott G-fehérje aktiválás a dimerizáció nélkül, a felszabaduló endocannabinoidok segítségével is magyarázható [83]). A G-fehérje aktiválás fokozódása észlelhető az AT<sub>1</sub> angiotenzin és a B<sub>2</sub> bradikinin heterodimerben [84], és a két receptor fokozott heterodimerizációja szerepet játszhat a preeklampsziában észlelhető, angiotenzin II-re adott fokozott válaszkészségben [85] (a két receptor heterodimerizációja azonban az eredeti leírásuk óta intenzív vita tárgyát képezi az irodalomban [63, 86]).

#### **2.4.5 Internalizáció és G-fehérje független jelátvitel**

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok agonista kötést követően a GRK kinázok által foszforilálódnak, majd az arresztin család fehérjéit kötik. Az arresztin kötés részét vesz a receptorok heterotrimer G-fehérjétől való szétkapcsolásában, elindítja az internalizációt, valamint különféle G-fehérje független jelátviteli folyamatok (például MAPK aktiválás) aktiválásához is vezet. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok az arresztin kötés erőssége alapján két osztályba sorolhatóak: az A osztályba tartozó

receptorok tranziensen, míg a B osztályba tartozó receptorok stabilan kötik az arresztin fehérjéket [87].

A heterotrimer G-fehérjékhez hasonlóan már az arresztinekről is kimutatták, hogy mesterséges lipid vezikulákban monomerként kifejezett receptorok képesek az aktiválásukra [88]. Ennek ellenére számos eredmény utal arra, hogy *in vivo* a dimerizáció befolyásolja a receptorok arresztin kötését illetve internalizációját.

A  $V_{1a}$  és  $V_2$  vazopresszin receptorokból álló heterodimer egyes alegységeinek szelektív agonistával történő stimulálása a másik alegység internalizációjához is vezet [89]. Emellett az arresztin kötés kinetikája is megváltozik: míg az önmagában expresszált  $V_{1a}$  receptor az arresztin kötés tekintetében az A osztályba tartozik (azaz a  $\beta$ -arresztin fehérjéket csak tranziensen köti), a koexpresszált  $V_2$  receptor hatására a  $V_{1a}$  receptor is a B osztályra jellemző (stabil)  $\beta$ -arresztin2 kötést mutat. Hasonló hatásokat írtak le a  $\beta_2$  adrenerg receptor homodimer esetében is, ahol egy mutáns, csak mesterséges liganddal aktiválható, és egy vad típusú receptor szelektív stimulálása is mindkét receptor internalizációjához vezetett [90]. A dimerizáció az ópioid receptorok arresztin kötését is befolyásolja, mely jelenségnek fontos klinikai következményei is lehetnek. A morfin klinikailag hasznos hatásainak nagy részéért a  $\mu$  ópioid receptor heterotrimer Gi/o fehérje aktiválása felelős, míg a mellékhatások, illetve a tolerancia kialakulásában a  $\beta$ -arresztin függő jelátvitel szerepe tűnik valószínűnek [91]. Míg a  $\mu$  receptor homodimer morfin hatására főként a heterotrimer G-fehérjék irányába szignalizál, a  $\mu$ - $\delta$  receptorokból álló heterodimer csökkent G-fehérje, és fokozott  $\beta$ -arresztin2 aktiválást mutat [92]. Egyes adatok arra utalnak, hogy krónikus morfin kezelés hatására a  $\mu$ - $\delta$  receptor heterodimerek aránya megemelkedik, ami részben magyarázhatja a kialakuló morfin toleranciát [93].

A fent említett kísérletek alapján a dimer egyik tagjának aktiválása már elégséges az arresztin kötés létrejöttéhez, illetve a receptor dimer internalizációjához. Egyes kísérletek azonban ezzel ellenkező eredményre jutottak: mind a  $\beta_2$  adrenerg [94], mind az  $M_3$  muszkarinos acetilkolin [95, 96] receptorral kapcsolatban megjelentek olyan közlemények, melyek szerint a  $\beta$ -arresztin kötéshez, illetve a G-fehérje független jelátvitel elindításához a dimer mind a két alegységének aktiválása szükséges. Ezen eredmények alapján Giraldo és munkacsoportja egy érdekes modellt állított fel [97], mely szerint a receptor dimerek aszimmetrikus aktiválása lenne felelős a heterotrimer

G-fehérje aktiválásért, míg szimmetrikus aktiválás esetén (nagyobb agonista koncentrációknál) következne be az arresztin fehérjék, illetve egyéb G-fehérje független jelátviteli utak aktiválása. Bár e modell szépen magyaráz számos, a GPCR-ok jelátvitelével kapcsolatos kérdést – kiemelve azt, a munkacsoportunk által is megfigyelt jelenséget, hogy a GPCR-ok arresztin kötési görbéje jelentősen jobbra tolt az agonista kötési görbékhez képest – egyértelmű kísérleti megerősítése még nem történt meg.

Fontos megjegyezni, hogy az arresztinek, illetve a G-fehérje független jelátvitel aktiválása viszonylag disztális eleme a GPCR-ok jelátvitelének. Az arresztin kötést számos jelátviteli folyamat (például a receptorok foszforilációja) is befolyásolja, így a koexpresszált receptorok megváltozott arresztin kötése esetén sok esetben könnyen előfordulhat, hogy a jelenség háttérben nem a dimerizáció, hanem a receptoriális jelátvitel átbeszélése áll.

## **2.5 A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának jelentősége**

A fenti rövid összefoglaló is jól mutatja, hogy a GPCR-ok dimerizációja egy jelenleg is aktívan kutatott, korántsem lezárt kérdésköre az irodalomnak. Bár a dimerizációval kapcsolatos adatok sok esetben egymásnak ellentmondóak, az eredmények többsége arra utal, hogy a rodopszin családba tartozó receptorokra általánosan jellemző a homodimerizáció, illetve egyes specifikus receptor párok között a heterodimerizáció. Az utóbbi évek eredményei alapján két adatbázis is rendelkezésünkre áll, melyekbe a kísérletesen is igazolt GPCR homo- és heterodimereket szisztematikusan összegyűjtötték. Az első adatbázist [98] a terület legnevesebb kutatóinak „konzorciuma” hozta létre, ennek megfelelően valóban megbízható adatokat tartalmaz (összesen körülbelül 200 GPCR dimert, melyből közel 60 heterodimer). Sajnos ezt az adatbázist az elmúlt évben már nem frissítették, így a legújabb eredmények hiányoznak belőle. A másik adatbázist [99] 2014-ben publikálták, így a legfrissebb eredményeket is tartalmazza (közel 200 heterodimer párt), azonban véleményem szerint szerzői jóval megengedőbbek voltak az adatbázisba kerülés kritériumainak szempontjából, így az itt fellelhető adatok nagyobb fenntartással kezelendők.

Egyértelmű adatok bizonyítják, hogy *in vitro* körülmények között monomer GPCR-ok mind a heterotrimer G-fehérjéket, mind a G-fehérje független jelátvitelben

kulcsszerepet játszó arresztin fehérjéket képesek aktiválni. Ezek alapján felmerülhet a kérdés, mi lehet a jelentősége a GPCR-ok homodimerizációjának? A receptor dimerek egyik új funkciója, mellyel a monomer receptorok még nem rendelkeznek, a kooperatív ligand kötés. A rendelkezésre álló adatok alapján úgy tűnik, hogy a GPCR homodimerekre általánosan jellemző a negatív kooperatív ligandkötés. Alacsony agonista koncentráció jelenlétében csak a dimerek egyik alegysége köt agonistát (magas affinitású kötőhely), míg mindkét alegység agonista kötése a negatív kooperativitás miatt csak lényegesen nagyobb koncentráció esetén következhet be (alacsony affinitású kötőhely). Ezáltal a receptorok által érzékelhető agonista koncentráció tartomány jelentősen kiszélesedik, ami a fiziológias szabályozás szempontjából kedvező jelenség lehet. Ha figyelembe vesszük azt a modellt, mely szerint a dimer egyik alegységének aktiválása a heterotrimer G-fehérje függő jelátvitelért felelős, míg mindkét alegység aktiválása  $\beta$ -arresztin kötéshez, ezáltal a receptorok internalizációjához és G-fehérje független jelátviteléhez vezet, tovább bővül a homodimerizációnak a jelátvitelben betöltött fiziológias szerepe. Fontos megjegyezni, hogy a számos *in vitro* illetve sejttenyészetekben végzett kísérlet mellett, már *in vivo*, transzgénikus egerekkel végzett kísérletek is igazolják a homodimerizáció élettani jelentőségét [100].

A receptor heterodimerek fiziológias jelentősége már könnyebben belátható. A különböző szövetekben eltérő GPCR-ok expresszálódnak, ezáltal szövetspecifikus heterodimerek jöhetnek létre, melyek a neuroendokrin szabályozás egy magasabb rendű szerveződését eredményezhetik. Emellett a megváltozott mértékű heterodimerizáció egyes patológias állapotok kialakulásában is szerepet játszhat, valamint a heterodimerek célzott farmakológiai befolyásolása új, kedvezőbb hatású gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethet.

### 3. Célkitűzések

Ph.D. munkám során a laboratóriumunkban vizsgált GPCR-ok dimerizációjának kimutatásával és a dimerizáció funkcionális következményeinek vizsgálatával foglalkoztam. Kísérletes munkám főbb célkitűzései a következők voltak:

- Az 1-es típusú angiotenzin receptor ( $AT_1R$ ) homodimerizációjának kimutatása kvantitatív BRET módszerrel
- Az  $AT_1$  receptorban létrejövő konformációváltozások közvetlen vizsgálatát lehetővé tevő BRET alapú receptor-bioszenzor létrehozása
- Az  $AT_1$  receptor homodimerizációjának a  $\beta$ -arresztin2 kötésre, a receptorkonformációra és a ligandkötésre gyakorolt hatásának vizsgálata
- Az  $AT_1$  receptor homodimeren belüli interakciók molekuláris mechanizmusának vizsgálata
- Olyan kvantitatív BRET alapú módszer beállítása, mellyel a klasszikus módszernél nagyobb biztonsággal detektálható a különféle GPCR-ok dimerizációja

## 4. Módszerek

### 4.1 A munkánk során használt anyagok

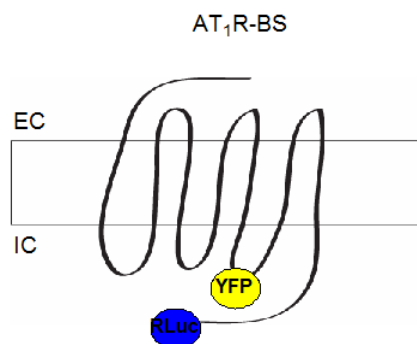
A molekuláris biológiai munkában használt enzimeket a Fermentas (Vilnius, Litvánia) és Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) cégektől vásároltuk. A PCR („polymerase chain reaction”, polimeráz láncreakció) reakciókhoz a primer szekvenciákat a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. Az irányított mutagenéziseket a Stratagene (La Jolla, CA, USA) cég QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit-jének segítségével hoztuk létre. A sejtenyésztéshez és a mérésekhez használt flaskákat és lemezeket a Greiner Bio-One BmbH-tól (Kremsmunster, Ausztria) szereztük be. Az eukarióta sejtenyészetek fenntartásához és transzfektálásához, illetve a mérések során használt Ham’s F12, DMEM, Opti-MEM, FBS („foetal bovine serum”, magzati borjú szérum) és Versene oldatokat és a Lipfectamine2000 transzfekciós reagenst az Invitrogen-től vásároltuk. A kísérletekben használt rapamycin a Merck-től (Darmstadt, Németország), az angiotenzin II és az U-73122 a Sigma-Aldrich-től, a candesartan az AstraZeneca-tól (Mölnal, Svédország), a FURA-2/AM és a cöleterazin h pedig az Invitrogen-től származott. A <sup>125</sup>I radioaktív izotóppal jelölt angiotenzin II-t és SI-angiotenzin II-t Dr. R. C. Speth (University of Mississippi, University, MS, USA) bocsájtotta rendelkezésünkre. A kísérleteinkben használt CHO („chinese hamster ovarium”, kínai hörcsög ovárium) és HEK293 („human embryonic kidney 293”, humán embrionális vese 293) sejtvonalakat az American Type Cell Culture Collection-től vásároltuk (Manassas, VA, USA). A BRET kísérleteket módosított Krebs-Ringer oldatban végeztük, melynek összetétele 120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glükóz, 10 mM Na-Hepes (pH 7,4) volt. A ligand disszociációs kísérletekben a mosást PBS oldattal végeztük, melynek összetétele 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) volt.

### 4.2 Plazmid konstrukciók

A munkánk során a fluoreszcensen nem jelölt fehérjék esetén pcDNA3.1 plazmidot (Invitrogen), míg fluoreszcens és/vagy lumineszcens jelölés esetén pEYFP-N1 és pEYFP-C3 plazmidokat (Invitrogen) használtunk kiindulópontnak, melyekbe

restrikciós enzimekkel való hasítás után illesztettük a kívánt fehérjét kódoló génszakaszokat. A PCR reakció illetve irányított mutagenézis segítségével előállított konstrukciók kódoló szekvenciáját minden alkalommal szekvenálással ellenőriztük (Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország).

A különböző 1-es típusú angiotenzin receptort ( $AT_1R$ ) kódoló konstrukciókhoz a patkány  $AT_{1a}$  receptor (Agtr1a, UniProt ID: P25095) szekvenciáját használtuk fel. A jelöletlen vad típusú ( $AT_1R$ ) és mutáns (DRY/AA $Y$ - $AT_1R$ , S109 $Y$ - $AT_1R$ , S109 $Y$ -DRY/AA $Y$ - $AT_1R$ ) receptorok Dr. Szidonya Lászlótól származnak [101], csakúgy, mint a YFP-vel és *Renilla* luciferázzal jelölt receptor-konstrukciók ( $AT_1R$ -YFP, DRY/AA $Y$ - $AT_1R$ -YFP és  $AT_1R$ -RLuc). A  $\beta$ -arresztin2-t nem kötő TSTS/A- $AT_1R$  és TSTS/A- $AT_1R$ -YFP mutáns receptorokat Dr. Balla András bocsájtotta rendelkezésünkre [102]. Az S109 $Y$ -TSTS/A- $AT_1R$  mutáns elkészítéséhez SacI-EcoRI emésztéssel vittük át a TSTS/A mutációkért felelős szekvencia darabot az S109 $Y$ - $AT_1R$  konstrukcióba. A monomer Venus fluoreszcens fehérjével [103, 104] jelölt receptor ( $AT_1R$ -Venus) elkészítéséhez az  $AT_1R$ -YFP konstrukció fluoreszcens fehérjéjét cseréltük le AgeI-NotI restrikciós enzimpár segítségével. Az intramolekuláris  $AT_1R$  BRET bioszenzor ( $AT_1R$ -BS) előállításához az  $AT_1R$ -RLuc konstrukció N231 és K232 aminosavai közé (a 3as intracelluláris hurok régióba) PvuI és Bsp1407I restrikciós helyeket vittünk be irányított mutagenézissel (az 5'-GAAATTCAAAGAACGCGATCGGTATAATTATATTG TACAAACCAAGAAACGATGACATCTTTAGG-3' és 5'-CGTTTCTTGGTTTGTA CAATATAATTATAACCGATCGCGTTCTTTTGAATTCATAAGCCTTC-3' primer pár felhasználásával), majd a restrikciós enzimekkel való emésztéssel illesztettük be a YFP-t kódoló szekvenciát (6. ábra).



6. ábra – Az  $AT_1R$ -BS intramolekuláris bioszenzor sematikus felépítése

Az  $AT_1R$ -BS az ICL3 hurokban YFP molekulát, C terminálisan *Renilla* luciferáz enzimet tartalmaz.

Az emberi  $V_2$  vazopresszin receptort (AVPR2, UniProt ID: P30518) kódoló plazmidokat ( $V_2$ R-Venus,  $V_2$ R-RLuc) Dr. Erdélyi László Sándor [105], az emberi  $\beta_2$  adrenerg receptor (ADRB2, UniProt ID: P07550) konstrukciót ( $\beta_2$ AdR-Venus) Dr. Tóth Dániel [106], az emberi  $CB_1$  cannabiod receptort (CNR1, UniProt ID: P21554) kifejező plazmidot ( $CB_1$ R-Venus) Dr. Gyombolai Pál készítette [107]. A patkány 2-es típusú angiotenzin receptor (Agtr2, UniProt ID: P35351) monomer Venus fehérjével jelölt formájának ( $AT_2$ R-Venus) előállításához a Dr. Turu Gábortól kapott  $AT_2$ R-YFP konstrukció [108] fluoreszcens fehérjéjét cseréltük le AgeI-NotI restriktációs enzimpárral. A humán kalciumérzékelő receptort (CASR, UniProt ID: P41180) Dr. Czirják Gábortól kaptuk pcDNA3.1 plazmidban [109], melyből a receptort kódoló szekvenciát PCR reakció segítségével felszorzottuk (az 5'-TTATTATTAAGCTTGGCAG AACCATGGCATT TTAGCTGCTGCTGGGTCC-3' és 5'-TTATTATTAACCCG GTGAATTC ACTACGTTTCTGTAACAGTGCTGCCTCCACC-3' primer pár felhasználásával) majd EcoRI és AgeI enzimekkel való emésztést követően szuper *Renilla* luciferázt [110] illetve monomer Venus-t tartalmazó pEYFP-N1 vektorba klónoztuk (CASR-RLuc illetve CASR-Venus). Az emberi  $V_{1a}$  vazopresszin receptort (AVPR1A, UniProt ID: P37288) kifejező konstrukció ( $V_{1a}$ R-Venus) elkészítéséhez a Missouri S&T cDNA Resource Center-től (Rolla, MO, USA) vásárolt plazmidból a receptor kódoló szekvenciát PCR reakció segítségével sokszoroztuk fel (az 5'-TTATTATTAAGATCTGCCACCATGCGTCTCTCCGCCGGTCCCGACGCG-3' és 5'-CGGCGGCGGACCGGTCTAGTTGAAACAGGAATGAATTTGATGG-3' primer pár segítségével), majd BglII-AgeI emésztést követően monomer Venus-t tartalmazó pEYFP-N1 vektorba illesztettük.

A *Renilla* luciferázzal jelölt patkány  $\beta$ -arresztin2 (Arrb2, UniProt ID: P29067) konstrukciót ( $\beta$ -arresztin2-RLuc) Dr. Turu Gábor készítette [108].

A plazmamembránhoz targetált fluoreszcens és lumineszcens fehérjéket kódoló plazmidok esetében az emberi Lyn kináz (LYN, UniProt ID: P07948) N-terminális szekvenciáját (MGCIKSKGKDSAGA) (PM-YFP és PM-FKBP-RLuc konstrukciók), illetve a humán kRas fehérje (KRAS, UniProt ID: P01116) C terminális CAAX doménjét (KMSKDGKKKKKSKTKCVIM) (Venus-FRB-CAAX) használtuk fel. A PM-YFP konstrukciót Dr. Balla András készítette [102]. A PM-FKBP-Rluc konstrukció elkészítéséhez a PM-FKBP-mRFP-t kódoló plazmidban [111] cseréltük le a



fluoreszcens fehérjét szuper *Renilla* luciferázra AgeI-NotI restrikciós enzimpárral. A Venus-FRB-CAAX konstrukció elkészítéséhez a Dr. Balla Andrásról kapott CFP-FRB-CAAX konstrukció fluoreszcens fehérjét cseréltük le AgeI-Bsp1407I emésztés segítségével.

#### 4.3 Sejttenyészetek fenntartása és transzfektálása

A kísérleteinkben használt CHO sejtvonalat Ham's F12, a HEK293 sejtvonalat DMEM médiumban tartottuk fenn, melyeket 10% FBS-sel, 100 µg/ml streptomycin és 100 IU/ml penicillin antibiotikumokkal egészítettünk ki. A médiumok NaHCO<sub>3</sub>-ot tartalmaztak pufferként, a sejteket pászított, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó inkubátorokban tenyésztettük.

A CHO sejteket a kísérletek előtt két nappal 6 lyukú (illetve 24 lyukú) szövettenyésztő lemezekre osztottuk 5\*10<sup>5</sup> sejt/lyuk (illetve 10<sup>5</sup> sejt/lyuk) sűrűségben. A kísérleteket megelőző napon a sejteket Opti-MEM médiumban, 2 µg (1 µg) DNS plazmid és 2 µl (1 µl) Lipofectamine2000 felhasználásával transzfektáltuk. A HEK293 sejteket a kísérleteket megelőző napon felszedtük, majd Opti-MEM médiumban, 0,5 µg DNS plazmid és 0,5 µl Lipofectamin2000 jelenlétében 75000 sejt/lyuk sűrűségben 96 lyukú, fehér szövettenyésztő lemezekre helyeztük. A transzfektálást 6 órával követően a médiumot minden esetben a sejteknek megfelelő komplett médiumra cseréltük.

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

A BRET méréseket a transzfekciót követően 24 órával végeztük, 37°C-on temperált sejteken.

A CHO sejteket Versene-nel szedtük fel, majd centrifugálást követően módosított Krebs-Ringer oldatban reszuszpendáltuk. A gátlószeres kísérletek esetén (candesartan, U-73122) a sejteket 5 percig előinkubáltuk a gátlószerrel (illetve kontroll esetben vivóanyaggal). A sejteket 10<sup>5</sup> sejt/lyuk sűrűségben 96 lyukú fehér szövettenyésztő lemezekre helyeztük 100 µl/lyuk végtérfogatban. A méréseket Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Németország) készülékkel végeztük. A mérések kezdetén 510 nm-es excitációs és 530 nm-es emissziós filterrel detektáltunk a YFP fluoreszcenciát, majd 5 µM végkoncentrációban cöleterazin h-t adtunk, és 485

valamint 530 nm-es emissziós filter mellett detektáltuk a lumineszcenciát. A BRET hányadost a

$$BRET_{hányados} = \frac{Emisszió_{530\text{ nm}}}{Emisszió_{485\text{ nm}}}$$

egyenlet alapján számoltuk ki.

A kinetikai BRET méréseknél ( $\beta$ -arresztin2 kötés, AT<sub>1</sub>R-BS aktiválódás) a sejteket az alkalmazott gátlószer (candesartan és/vagy U-73122) vagy vivőanyag jelenlétében 5 percen keresztül inkubáltuk, majd cöleterazin adása után kezdtük el a méréseket. Rövid kontroll szakaszt követően angiotenzin II-vel stimuláltunk, majd a stimulált és a nem stimulált pontok közti BRET hányados különbséget ábrázoltuk az idő függvényében.

A kvantitatív BRET mérések esetében az akceptort (AT<sub>1</sub>R-YFP illetve PM-YFP) is expresszázó sejtekben mérhető BRET hányadosból levontuk a csak donort (AT<sub>1</sub>R-Rluc) expresszázó sejtekben mért BRET hányadost, és az így kapott nettó BRET értéket ábrázoltuk az intenzitás hányados függvényében. Az intenzitás hányadost az

$$Intenzitás\ hányados = \frac{Fluoreszcencia_{530\text{ nm}}}{Lumineszcencia_{485\text{ nm}}}$$

képlet alapján számoltuk, azaz a mérés elején mért YFP fluoreszcenciát elosztottuk a cöleterazin adása után 485 nm-en mérhető emisszióval. Az intenzitás hányados (a mérőműszer eltérő fluoreszcencia és lumineszcencia érzékenysége miatt) nem egyezik meg az akceptor/donor hányadossal, de egyenesen arányos azzal. Kalibráló méréseink alapján a 0,025 körüli intenzitás hányados felel meg az 1:1 akceptor/donor aránynak.

A HEK293 sejteken végzett kvantitatív BRET mérések során a médiumot 100  $\mu$ l módosított Krebs-Ringer oldatra cseréltük. Az indukálható dimerizációs mérések során a sejteket 30 percen keresztül 100 nM koncentrációjú rapamycin (illetve vivőanyag) jelenlétében előinkubáltuk. A méréseket Varioskan Multimode Reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel végeztük. A mérések kezdetén 510 nm-es excitációs és 530 nm-es emissziós filterrel detektáltunk a Venus fluoreszcenciát, 5  $\mu$ M végkoncentrációban cöleterazin h-t adtunk, majd 485 és 530 nm-es emissziós filter mellett, valamint filter nélkül (totál lumineszcencia) detektáltuk a lumineszcenciát. A nettó BRET hányadost a fentebb leírtak alapján számoltuk ki, majd az intenzitás

hányados illetve a mért Venus fluoreszcencia függvényében ábrázoltuk. Az intenzitás hányadost e mérésekben az

$$\text{Intenzitás hánydos} = \frac{\text{Fluoreszcencia}_{530 \text{ nm}}}{\text{Lumineszcencia}_{\text{totál}}}$$

egyenlet alapján számoltuk. A Varioskan Multimode Reader-rel végzett méréseinknél az 1-2 közötti intenzitás hányados felelt meg 1:1 donor/akceptor hányadosnak.

#### 4.5 A citoplazmatikus kalciumkoncentráció mérése

A kísérleteket 24 órával a transzfekciót követően végeztük. A CHO sejteket Versene-vel szedtük fel, centrifugálást követően HEPES-sel puffereelt Ham's F-12 médiumban regeneráltuk 1 órán keresztül, majd 45 percen keresztül Fura-2/AM-mel töltöttük. A sejteket 5 percen keresztül gátlószerrel (U-73122), illetve vivóanyaggal inkubáltuk. Az angiotenzin II hatására létrejövő citoplazmatikus kalcium koncentráció változásokat ismételt centrifugálást követően, módosított Krebs-Ringer oldatban,  $10^6$  sejt/ml koncentrációban reszuszpendált sejteken vizsgáltuk, DelataScan fluoreszcens spektrofotométerrel (PTI, Lawrenceville, NJ, USA), 340 és 380 nm-en történő excitációval és 505 nm-en mért emisszióval.

#### 4.6 Ligandkötés és liganddisszociáció mérése

A  $^{125}\text{I}$  radioizotóppal jelölt angiotenzin II disszociációját 24 órával a transzfekció után vizsgáltuk,  $4^\circ\text{C}$ -on, hogy gátoljuk a receptorok jelátvitelét és internalizációját. A CHO sejtek médiumát 0,5 ml HEPES-sel puffereelt Ham's F-12 médiumra cseréltük, mely 0,01 nM végkoncentrációban tartalmazta a jelölt ligandot. 2 óra inkubáció után a sejteket kétszer 1 ml PBS oldattal mostuk, így a receptorhoz nem kötött radioaktív ligandot eltávolítottuk. A ligand disszociációt kontroll körülmények között, illetve  $1 \mu\text{M}$  jelöletlen angiotenzin II jelenlétében mértük. A megfelelő idő elteltével a sejteket ismét  $2 \times 1$  ml PBS oldattal mostuk, a disszociált radioligand eltávolítása céljából, majd 0,5 M NaOH és 0.05% SDS keverékével szolubilizáltuk. A kötött radioaktivitást  $\gamma$ -spektrometriával (Wallac 1470 WIZARD) detektáltuk. A CPM („count per minute”) értékeket a maximális értékek (0 perc disszociáció) átlagára normalizáltuk, majd a disszociációs idő függvényében ábrázoltuk.

Az AT<sub>1</sub>R-BS receptor-bioszenzor karakterizálásához <sup>125</sup>I izotóppal jelölt SI-Angiotenzin II-vel végeztünk kötési vizsgálatokat. Ezen méréseket hasonlóan végeztük a liganddisszociációs kísérletekhez, azonban a jelölt ligand kimosása után rögtön szolubilizáltuk a sejteket a teljes bekötött ligandkoncentráció meghatározása céljából.

#### 4.7 Monte Carlo szimulációk

Szimulációinkat Linderman és munkatársai modelljét felhasználva [112, 113], kisebb módosításokat követően végeztük. A szimulációkat egy kétdimenziós, 100x100-as, hatszögekből álló membránon végeztük. A donor és akceptor molekulákat monomerként, véletlenszerűen helyeztük el a membrán üres hatszögein. A teljes donor+akceptor számot 200 és 2000 között változtattuk az egyes szimulációkban. A molekulák minden szimulációs lépésben mozoghattak, illetve egymással dimert képezhettek. A mozgatás során a periodikus határfeltétel koncepcióját alkalmaztuk, azaz a membránt az egyik szélén elhagyó molekula az átellenes oldalon visszaérkezett. A mozgatás során az egyes molekulák a szomszédos 6 hatszög egyikére léphettek, véletlenszerűen. Amennyiben a kiválasztott pozícióban egy másik molekula tartózkodott, a lépést elvetettük, és nem ismételtük meg újra. A dimerek mozgatása során feltétel volt, hogy mindkét molekula szabad hatszögre érkezzen, illetve a mozgatási lépés során a dimerek nem eshettek szét. A dimerek ezáltal egy irányba mozoghattak, és/vagy foroghattak egymás körül. A mozgás mellett a molekulák dimert képezhettek, illetve a dimerek monomerekre eshettek szét az egyes iterációs lépésekben. A monomer molekulák szomszédos monomerekkel képezhettek dimert, egy bizonyos  $p_{\text{asszociáció}}$  valószínűséggel, mely függött a molekulák típusától (donor-donor, donor-akceptor, akceptor-akceptor pár). A dimerek az őket alkotó alegységek típusától függő  $p_{\text{disszociáció}}$  valószínűséggel eshettek szét az egyes lépések során. A szimulációt 1000 lépésen keresztül futtattuk, majd kiszámoltuk a szimulált BRET hányadost. A szimulált BRET értéket a

$$BRET_{\text{szimulált}} = \frac{N_{\text{szomszédos donor-akceptor pár}}}{N_{\text{donor}}}$$

egyenlet alapján számoltuk, azaz a szomszédos hatszögben elhelyezkedő donor-akceptor párok számát elosztottuk a teljes donor számmal, majd egy korrekciós faktorról (0.25) is szoroztuk (ez utóbbit csak azért alkalmaztuk, hogy a szimulált BRET jel

mértéke nagyobb mértékben legyen összehasonlítható kísérletes rendszerben nyert eredményekkel). Szomszédos donor-akceptor párok kialakulhattak egyrészt a véletlenszerű mozgás, másrészt a dimerizáció következtében. A szimulációk során a specifikus és nem-specifikus kapcsolatot a  $p_{\text{asszociáció}}$  és a  $p_{\text{disszociáció}}$  változtatásával modelleztük. Minden egyes adott donor és akceptor számmal, illetve  $p_{\text{asszociáció}}$  és a  $p_{\text{disszociáció}}$  értékkel jellemezhető szimulációt 5 alkalommal futtattunk le. A szimulációkat Python 2.7 programnyelvben írtuk.

#### 4.8 Az adatok kiértékelése és statisztikai analízise

Az adatokat átlag  $\pm$  S.E.M. („standard error of mean”, az átlag szórása) formában mutatjuk. Ez alól kivételt lépeznek a kvantitatív BRET görbék, ahol egyedi pontok sokaságát ábrázoltuk. Az elemszám ebben az esetben a független (különböző napon végzett) transzfekciókat, illetve méréseket jelzi. A kvantitatív BRET görbék analíziséhez lineáris regressziót illetve nem-lineáris regressziót egy kötőhelyes kötési modell felhasználásával alkalmazunk, a GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) program segítségével. A módosított kBRET görbék esetén a pontok alacsony/közepes/magas, illetve alacsony/magas lumineszcencia csoportokba való sorolását egy adott donor receptorral mért lumineszcencia értékek tercilis értékei, illetve medián értéke alapján végeztük. A ligand disszociációs és citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  mérési kísérletek esetében a csoportok közti különbségeket két szempontos varianciaanalízissel majd Bonferroni féle post-hoc teszttel vizsgáltuk, 0,05-nél kisebb  $p$  értéket tekintve szignifikánsnak. A módosított kvantitatív BRET kísérletek során az egyenesek meredeksége közötti különbséget kovariancia analízissel vizsgáltuk.

## 5. Eredmények

### 5.1 Allosztérikus interakciók az AT<sub>1</sub>-es angiotenzin receptor homodimerben

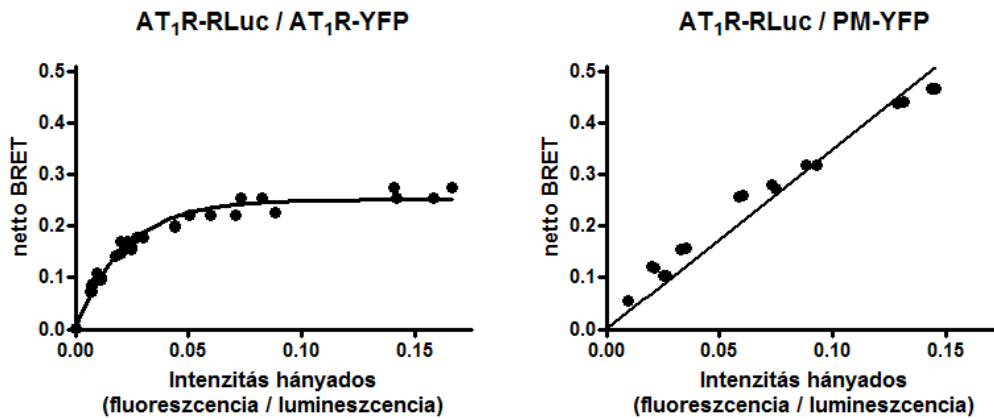
A GPCR dimereket alkotó alegységek közötti allosztérikus kommunikáció alapvetően befolyásolhatja a receptorok funkcióját. Munkánk során az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT<sub>1</sub>R) homodimerben mint modellrendszerben vizsgáltuk az alegységek közötti interakcióknak a receptorműködésre gyakorolt hatásait. Munkacsoportunk évek óta foglalkozik az AT<sub>1</sub> receptor jelátvitelével, így a laborunkban rendelkezésre álló számos AT<sub>1</sub>R mutáns kitűnő lehetőséget teremtett a dimeren belüli interakciókért felelős molekuláris mechanizmusok feltérképezésére.

#### 5.1.1 Az AT<sub>1</sub>R homodimerizációjának kimutatása

Az AT<sub>1</sub> receptor homodimerizációját már több kutatócsoport leírta [62, 114], valamint saját munkacsoportunk korábbi, funkcionális eredményei is a homodimerizáció fennállását valószínűsítették [79]. Az AT<sub>1</sub>R homodimerizációjának saját tesztrendszerünkben való megerősítése céljából kvantitatív biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer méréseket (kBRET) végeztünk (a módszer részletes bemutatása a Bevezető fejezet ide tartozó részében (2.2.2) olvasható).

CHO sejteket transzfektáltunk állandó mennyiségű energiadonor *Renilla* luciferázzal és növekvő mennyiségű energiaakceptor YFP-vel jelölt AT<sub>1</sub> receptort kódoló plazmidokkal (AT<sub>1</sub>R-RLuc és AT<sub>1</sub>R-YFP). A transzfekciós hatékonyság állandóan tartása céljából a teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid hozzáadásával állandóan tartottuk.

A mért BRET jelet az akceptor/donor hányadossal arányos intenzitás hányados függvényében ábrázoltuk. A fenti ábrázolásban az AT<sub>1</sub>R-RLuc és AT<sub>1</sub>R-YFP közötti interakció esetében telítési görbét kaptunk, ami megerősítette a receptorok közötti dimerizáció fennállását (7. ábra). Kontrollként az AT<sub>1</sub>R-RLuc és a plazmamembránhoz targetált PM-YFP közti interakciót vizsgáltuk. Ez esetben a BRET jelet az intenzitás hányados függvényében ábrázolva lineáris összefüggést találtunk, ami megfelel a donor és akceptor között fennálló nem-specifikus interakciónak.



### 7. ábra – Az AT<sub>1</sub>R homodimerizációjának kimutatása kvantitatív BRET módszerrel

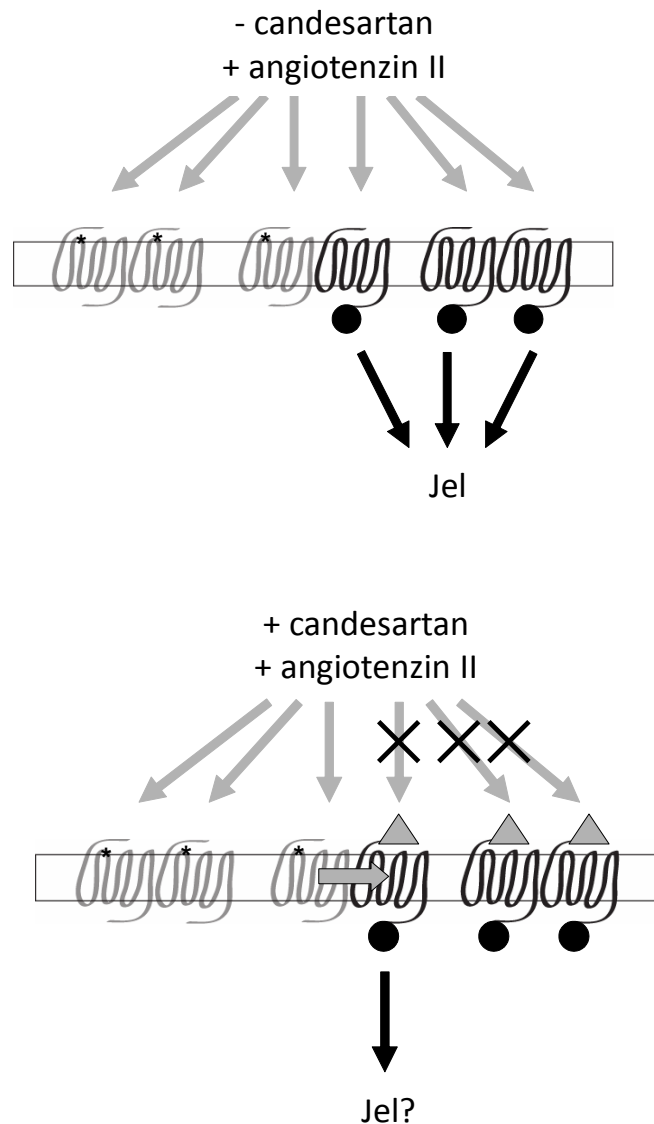
CHO sejteket állandó mennyiségű AT<sub>1</sub>R-RLuc és növekvő mennyiségű AT<sub>1</sub>R-YFP (*bal ábra*), illetve PM-YFP (*jobb ábra*) plazmiddal transzfektáltunk, a teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid adásával állandóan tartva. A mért BRET jelet a kísérletek kezdetén mért YFP fluoreszcencia és RLuc lumineszcencia hányadosa (intenzitás hányados) függvényében ábrázoltuk. n=3

#### 5.1.2 Szelektív stimulálás az AT<sub>1</sub>R homodimerben

Az allosztérikus interakciók kimutatása céljából szükséges volt, hogy a receptor dimer egyes alegységeit szelektíven tudjuk stimulálni. A szelektív stimulálás nehezen oldható meg egy homodimerben, hiszen az agonista mindkét alegységet aktiválja, így a közvetlen stimulus és az allosztérikus hatások következményei egymástól nem elkülöníthetőek. E probléma megoldására adott lehetőséget a munkacsoportunkban korábban létrehozott, antagonistá rezisztens mutáns AT<sub>1</sub> receptor. Az S109Y-AT<sub>1</sub>R nem köti a nem-peptid antagonistá candesartant, de egyéb tulajdonságai (sejtfelszíni expresszió, angiotenzin II kötés, G fehérje függő és független jelátvitel) megegyeznek a vad típusú receptoréval [101].

Kísérleteink során a candesartan rezisztens, jelöletlen S109Y-AT<sub>1</sub>R-t koexpresszáltuk candesartan érzékeny, fluoreszcensen jelölt AT<sub>1</sub> receptorral CHO sejtekben. A candesartan érzékeny receptor jelölése lehetővé tette, hogy specifikusan a receptor aktivációját követhessük különböző funkcionális vizsgálatokban, míg candesartan jelenlétében szelektíven tudtuk stimulálni az S109Y-AT<sub>1</sub>R-t. A két receptort koexpresszáló sejtekben három receptor alpopuláció jelenlétére számíhattunk (*8. ábra*): két S109Y-AT<sub>1</sub>R-ből álló dimerekre, két jelölt AT<sub>1</sub>R-ből álló dimerekre és S109Y-AT<sub>1</sub>R / jelölt AT<sub>1</sub>R dimerekre (természetesen ez a modell túlegyszerűsített, a

fenti rendszerben előfordulhatnak például más, endogén receptorokkal alkotott dimerek is, de feltételezhető, hogy egy overexpressziós rendszerben e három dimer forma a leggyakoribb).



**8. ábra – Szelektív stimulálás az AT<sub>1</sub>R homodimerben – általános mechanizmus**

CHO sejteket kotranszfektáltunk jelöletlen, candesartan rezisztens S109Y mutáns AT<sub>1</sub> receptorral (szürke, \* jelöli az S109Y mutáció helyét a receptorban) illetve jelölt, candesartan érzékeny AT<sub>1</sub> receptorral (fekete). A candesartan érzékeny receptor jelölése (fekete kör) biztosítja, hogy különféle funkcionális tesztekben e receptorok aktiválódását tudjuk nyomon követni. A felső ábra candesartan hiányában, az alsó candesartan jelenlétében mutatja az egyes receptor dimerek angiotenzin II stimulus hatására létrejövő aktivációját.



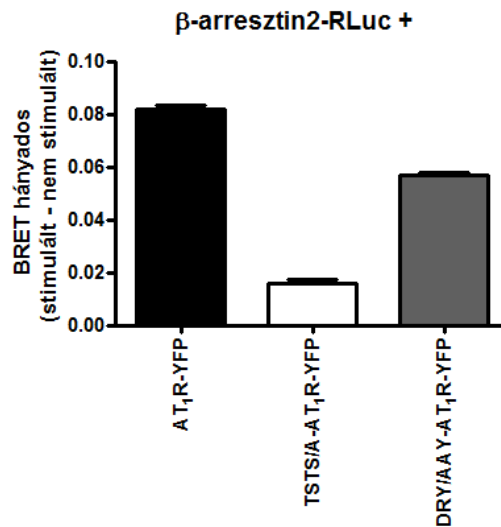
Candesartan hiányában, angiotenzin II stimulus hatására minkét receptor aktiválódik, így ilyenkor az jelölt AT<sub>1</sub>R-t tartalmazó dimerek aktiválása detektálható (8. *ábra*, felső rész). A candesartan előkezelés gátolja a jelölt receptorokat, így ez esetben csak az S109Y-AT<sub>1</sub> receptorokat tudjuk aktiválni (8. *ábra*, alsó rész). A két S109Y receptorból felépült dimerek aktiválhatóak, de mivel nem jelöltek, aktiválódásuk nem észlelhető. A két, candesartan érzékeny jelölt receptorból álló dimereket gátolja a candesartan, tehát szintén nem hoznak létre jelet a rendszerünkben. Az S109Y-AT<sub>1</sub>R / jelölt AT<sub>1</sub>R dimerekben azonban képesek vagyunk stimulálni az S109Y alegységet és követni a jelölt AT<sub>1</sub>R aktiválódási folyamatát. Tehát a candesartan jelenlétében mért változások specifikusak az S109Y-AT<sub>1</sub>R / jelölt AT<sub>1</sub>R dimerekre, és a dimeren belüli allosztérikus interakció következményei. A nem stimulált, jelölt alegység aktiválódásának nyomon követése céljából két módszert alkalmaztunk: a YFP-vel jelölt alegység és a *Renilla* luciferázzal jelölt  $\beta$ -arresztin2 közti interakciót vizsgáltuk BRET mérések segítségével, illetve a jelölt alegységként egy általunk kifejlesztett, BRET alapú intramolekuláris receptor bioszenzort alkalmazva annak konformáció változásait vizsgáltuk közvetlenül.

### 5.1.3 A nem stimulált alegység $\beta$ -arresztin2 kötése

Az arresztin fehérjék az aktivált GPCR-okhoz kötődnek, majd részt vesznek azok deszenzitizációjában, internalizációjában, illetve „scaffold” fehérjeként különböző jelátviteli útvonalak elindításában. Mivel az arresztin fehérjék az aktivált receptorokhoz kötődnek, az AT<sub>1</sub> receptor és a  $\beta$ -arresztin2 közötti interakció mérése lehetővé teszi a receptorok aktiváltsági állapotának nyomonkövetését.

Első lépésben a kísérleteinkben használt vad típusú és különböző mutáns AT<sub>1</sub> receptorok  $\beta$ -arresztin2 kötését karakterizáltuk (9. *ábra*). CHO sejteket vad típusú AT<sub>1</sub>R-YFP-vel és  $\beta$ -arresztin2-Rluc-cal transzfektálva angiotenzin II stimulus (100 nM) hatására jelentős BRET jel emelkedést mértünk, mely megfelel az AT<sub>1</sub>R és  $\beta$ -arresztin2 között létrejövő jól ismert interakciónak. Az AT<sub>1</sub>R arresztin2 kötésében fontos szerepet játszanak a receptor C terminális farok régiójában elhelyezkedő szerin és treonin aminosavak, illetve azok foszforilációja. A TSTS/A-AT<sub>1</sub>R-YFP-ben négy ilyen aminosav volt alaninra mutálva, ami e receptor lényegesen gyengébb  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez vezetett. A harmadik általunk használt mutáns receptor, a DRY/AAY-AT<sub>1</sub>R-

YFP arresztin kötése összemérhető volt a vad típusú receptoréval. A DRY/AA Y mutáció a rodopszin családba tartozó GPCR-okban rendkívül konzervált, a TM3-ICL2 határon elhelyezkedő DRY szekvenciát érintette. Az DRY/AA Y mutáns AT<sub>1</sub> receptorról már korábban ismert volt, hogy nem képes teljesen aktív konformációt felvenni, nem aktivál heterotrimer G-fehérjét, de képes arresztint kötni és internalizálni [115].

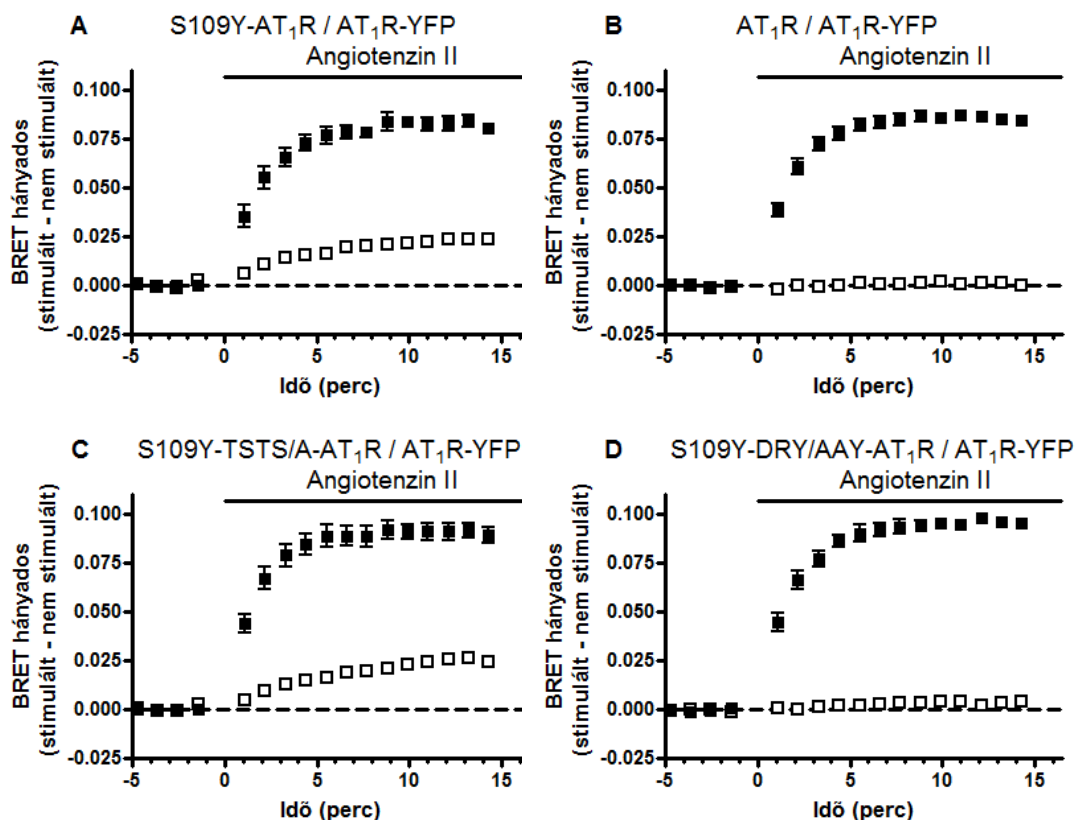


#### 9. ábra – A különböző AT<sub>1</sub>R mutánsok β-arresztin2 kötése

CHO sejteket β-arresztin2-RLuc-cal és a YFP-vel jelölt vad típusú, illetve mutáns AT<sub>1</sub> receptorokkal transzfektáltunk. A 100 nM angiotenzin II stimulusra létrejövő BRET jel változást ábrázoltuk. n=3, átlag +/- S.E.M.

A dimeren belüli allosztérikus interakciókat vizsgáló kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy hogyan befolyásolja a candesartan rezisztens aegység aktiválása a candesartan érzékeny, jelölt aegység β-arresztin2 kötését. CHO sejteket S109Y-AT<sub>1</sub>R-rel, AT<sub>1</sub>R-YFP-vel és β-arresztin2-vel kotranszfektálva 100 nM angiotenzin II-vel stimulálva jelentős BRET jel emelkedést mértünk, ami megfelelt az AT<sub>1</sub>R-YFP közvetlen aktiválásának (10. ábra A). Ha a sejteket 10 μM candesartan jelenlétében előinkubáltuk, az angiotenzin II stimulus egy kisebb mértékű, de továbbra is jelentős BRET jel emelkedéshez vezetett, ami a nem stimulált AT<sub>1</sub>R-YFP arresztin kötésének következménye volt (10. ábra A, 11. ábra). Ha mindkét aegység candesartan érzékeny volt, nem tapasztaltunk BRET jel emelkedést a receptor blokkoló jelenlétében,

ami igazolta, hogy az alkalmazott candesartan koncentráció elegendő volt a receptorok teljes gátlásához (10. ábra B, 11. ábra).



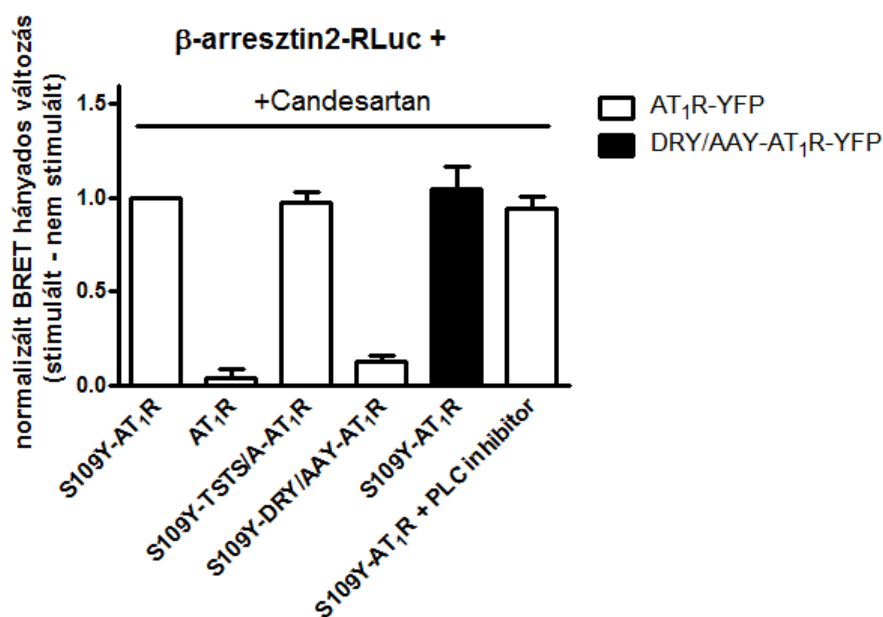
#### 10. ábra – Az AT<sub>1</sub>R homodimer $\beta$ -arresztin2 kötése

CHO sejteket transzfektáltunk  $\beta$ -arresztin2-RLuc-cal, AT<sub>1</sub>R-YFP-vel (jelölt alegység) illetve a stimulált alegységként S109Y-AT<sub>1</sub>R (A), AT<sub>1</sub>R (B), S109Y-TSTS/A-AT<sub>1</sub>R (C) és S109Y-DRY/AAY-AT<sub>1</sub>R (D) receptorokkal. A sejteket 5 percen keresztül vivőanyag (■) illetve 10  $\mu$ M candesartan (□) jelenlétében előinkubáltuk, majd 100 nM angiotenzin II-vel stimuláltuk. Az ábrákon a stimulált és a nem stimulált pontok közti BRET hányados különbséget ábrázoltuk az idő függvényében. n=4-8, átlag +/- S.E.M.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a nem stimulált alegység arresztin2 kötésének háttérében álló molekuláris mechanizmusokat, különböző mutációkat vittünk be a stimulált és/vagy a jelölt alegységbe, és a BRET jel változásait vizsgáltuk candesartan jelenlétében.

Első lépésben a stimulált alegység  $\beta$ -arresztin2 kötésének szerepét vizsgáltuk. Ehhez a candesartan rezisztens és károsodott arresztin2 kötésű S109Y-TSTS/A-AT<sub>1</sub>R-t alkalmaztuk a stimulált alegységként (10. ábra C, 11. ábra). Ebben az esetben hasonló BRET jel emelkedést tapasztaltunk, mint az S109Y-AT<sub>1</sub>R-t expresszáló sejtekben, mely

eredmény azt mutatja, hogy a stimulált alegység arresztin kötése nem játszik szerepet a nem stimulált alegység –  $\beta$ -arresztin2 interakció kialakulásában.



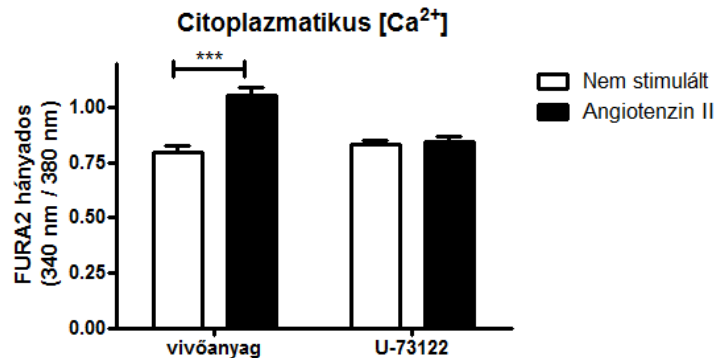
#### 11. ábra – Az AT<sub>1</sub>R homodimer nem stimulált alegységének $\beta$ -arresztin2 kötése

A candesartan jelenlétében mért BRET jel változások különböző jelöletlen, stimulált (X tengely) és YFP-vel jelölt, nem stimulált (színkód) alegységek alkalmazása esetén. A BRET jel változásokat az S109Y-AT<sub>1</sub>R-t és AT<sub>1</sub>R-YFP-t expresszáló sejtekben mért értékekre normalizáltuk. n=4-8, átlag +/- S.E.M.

A stimulált alegység aktív konformációjának szerepét az S109Y-DRY/AA-AT<sub>1</sub>R mutáns segítségével vizsgáltuk. E mutáns candesartan rezisztens, képes arresztint kötni, ám nem képes a teljesen aktív receptor konformáció felvételére. E mutánst alkalmazva a stimulált alegységként a BRET jel emelkedés teljes megszűnéséhez vezetett a candesartan kezelt sejtekben (10. ábra D, 11. ábra). Ezzel szemben, amikor a jelölt alegység tartalmazta a DRY/AA mutációt (DRY/AA-AT<sub>1</sub>R-YFP), a candesartan rezisztens alegység stimulálása létrehozta a BRET jel növekedést (11. ábra). Ezek alapján a DRY szekvencia épsége a stimulált alegységben szükséges a jelölt, nem stimulált alegység  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez.

Mindezek mellett a jelátvitel esetleges szerepét is meg kívántuk vizsgálni a fentebb leírt jelenség háttérében. Az AT<sub>1</sub> receptor fő jelátviteli útvonala a G<sub>q/11</sub> heterotrimer G-fehérjék aktiválása, mely következményes foszfolipáz C $\beta$  enzim (PLC) aktiválódáshoz vezet. Az S109Y-AT<sub>1</sub>R-t, AT<sub>1</sub>R-YFP-t és  $\beta$ -arresztin2-RLuc-t koexpresszáló sejteket 2  $\mu$ M U-73122 jelű foszfolipáz C inhibitorral kezeltük elő. Az

ebben a koncentrációban alkalmazott gátlószer már teljesen kivédte az AT<sub>1</sub>R-t expresszáló CHO sejtekben FURA-2/AM-mel detektálható intracelluláris [Ca<sup>2+</sup>] emelkedést (12. ábra), azonban a candesartan jelenlétében mérhető BRET jel változást nem befolyásolta (11. ábra), ami arra utal, hogy a PLC-függő jelátvitel nem játszik szerepet a nem stimulált alegység β-arresztin2 kötésében.



#### 12. ábra – Citoplazmatikus [Ca<sup>2+</sup>] mérések

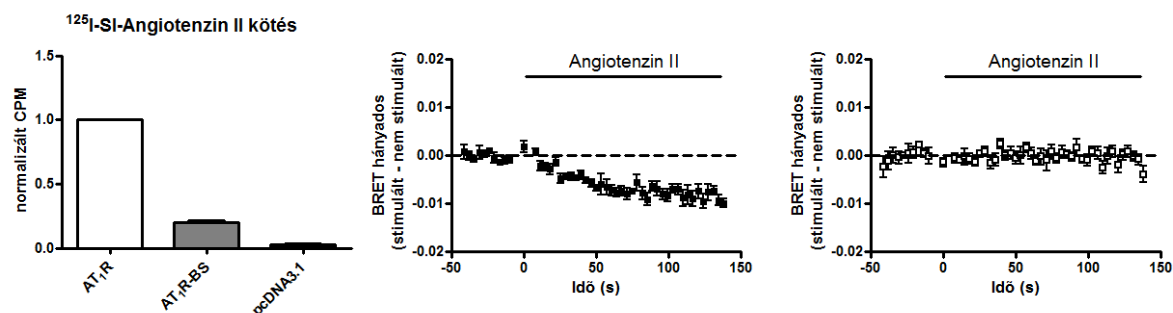
Az AT<sub>1</sub>R-t expresszáló, FURA2/AM-mel töltött CHO sejtek vivőanyaggal vagy U-73122 PLC gátlóval 5 percen keresztül előinkubáltuk, majd 100 nM angiotenzin II-vel stimuláltuk. A citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> koncentrációt jelző FURA2 hányadosot a 340 nm-es és 380 nm-es excitáció mellett 505 nm-en mérhető emissziók hányadosaként számoltuk. A csoportok közötti eltéréseket két szempontos varianciaanalízissel, majd Bonferroni féle post-hoc teszttel vizsgáltuk. n=3, átlag +/- S.E.M \*\*\*: p<0.001

#### 5.1.4 Konformáció változások a nem stimulált alegységben

Következő lépésben a dimeren belüli allosztérikus interakcióknak közvetlenül a receptorkonformáció szintjén megjelenő hatásait kívántuk vizsgálni. Ehhez egy a receptorkonformáció megváltozására érzékeny, BRET alapú receptor-bioszenzort hoztunk létre. Az AT<sub>1</sub>R-BS receptor ICL3 régióban egy YFP, a C terminális fark régióban egy *Renilla* luciferáz enzimet tartalmazott (6. ábra). Az AT<sub>1</sub>R-BS aktiválásra megváltozik a receptorkonformáció, így az energia donor és akceptor közti távolság, illetve orientáció, ami BRET jel változáshoz vezethet.

Első lépésben karakterizálni kívántuk az AT<sub>1</sub>R-BS működését. <sup>125</sup>I izotóppal jelölt SI-angiotenzin II-vel (szarkozin-izoleucin angiotenzin II) vizsgálva a szenzor ligandkötését a vad típusú receptornál lényegesebben alacsonyabb, de továbbra is megtartott ligandkötést találtunk (13. ábra, bal ábra). FURA-2/AM-mel vizsgálva a szenzor aktiválására nem tapasztaltunk intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelkedést. Ez

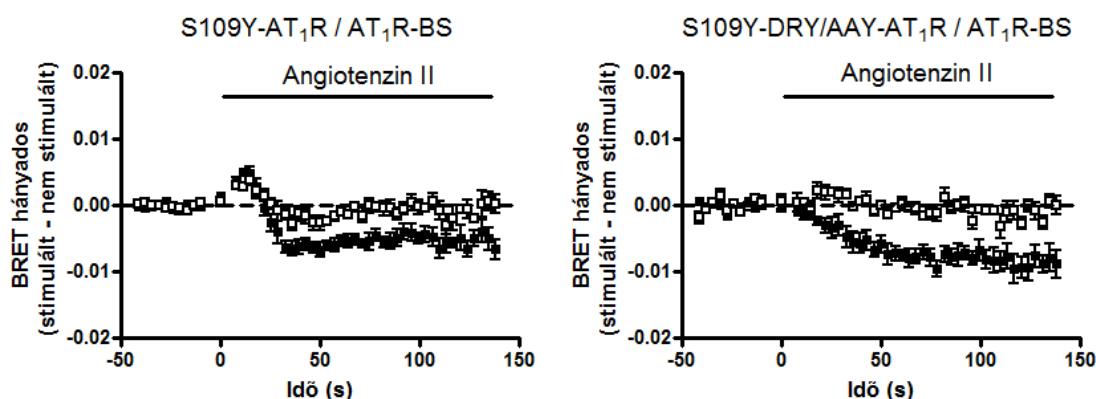
utóbbi eredmény nem meglepő, hiszen a szenzor elkészítéséhez a G-fehérje aktiválásban kulcsszerepet játszó ICL3 régióba illesztettünk egy nagyméretű fluoreszcens fehérjét. Mindezek ellenére 100 nM angiotenzin II stimulus hatására az AT<sub>1</sub>R-BS gyors BRET jel csökkenését észleltük, mely hatás candesartannal (10 μM) kivédhető volt (13. ábra, középső és jobb ábra), mely alapján azt alkalmasnak találtuk az AT<sub>1</sub>R receptorban létrejövő konformáció változások vizsgálatára.



### 13. ábra – Az AT<sub>1</sub>R-BS karakterizálása

A vad típusú AT<sub>1</sub>R, az AT<sub>1</sub>R-BS konstrukciókkal illetve üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektált CHO sejtek <sup>125</sup>I-SI-Angiotenzin II kötése (bal ábra). Az AT<sub>1</sub>R-BS konformáció változása: AT<sub>1</sub>R-BS-t expresszáló CHO sejteket 10 μM candesartan jelenlétében (jobb ábra) illetve hiányában (középső ábra) stimuláltunk 100 nM angiotenzin II-vel. Az ábrákon a stimulált és a nem stimulált pontok közti BRET hányados különbséget ábrázoltuk az idő függvényében. n=3, átlag +/- S.E.M.

Az AT<sub>1</sub>R-BS receptort a jelölt alegységként alkalmazva rendszerünkben vizsgálhatóvá vált a nem stimulált alegység allosztérikus hatásokra létrejövő konformáció változása. Az S109Y-AT<sub>1</sub>R-t (stimulált alegység) és AT<sub>1</sub>R-BS-t (jelölt alegység) koexpresszáló CHO sejtekben jelentősen megváltozott a BRET jel kinetikája már candesartan hiányában is: angiotenzin II stimulus (100 nM) hatására egy gyors BRET jel emelkedés jött létre, melyet a szenzor egymagában történő expressziója esetén is látott BRET jel csökkenés követett (14. ábra, bal oldal). Candesartan jelenlétében csak a kezdeti BRET jel emelkedés volt látható (14. ábra, bal ábra). Feltételezhetően a kezdeti emelkedésért felelős a stimulált alegység allosztérikus hatása az AT<sub>1</sub>R-BS-ra, míg a candesartan hiányában látható későbbi BRET jel csökkenés az AT<sub>1</sub>R-BS közvetlen aktiválásának felelhet meg.



#### 14. ábra – Az AT<sub>1</sub>R homodimer nem stimulált alegységének konformáció változása

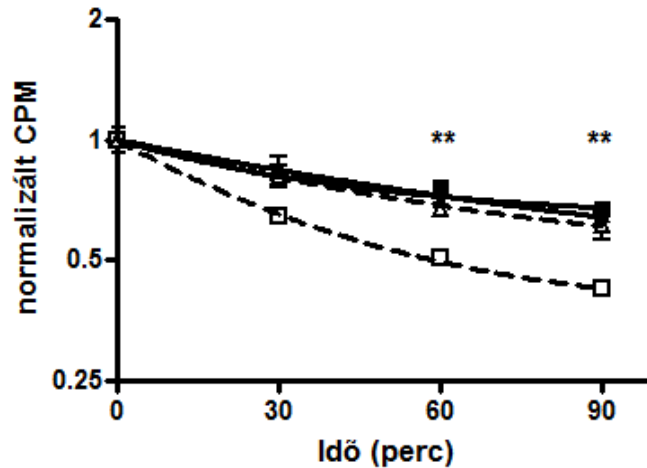
CHO sejteket transzfektáltunk AT<sub>1</sub>R-BS-sel (jelölt alegység) illetve a stimulált alegységként S109Y-AT<sub>1</sub>R (*bal ábra*) és S109Y-DRY/AA1Y-AT<sub>1</sub>R (*jobb ábra*) receptorokkal. A sejteket 5 percen keresztül vivőanyag (■) illetve 10 μM candesartan (□) jelenlétében előinkubáltuk, majd 100 nM angiotenzin II-vel stimuláltuk. Az ábrákon a stimulált és a nem stimulált pontok közti BRET hányados különbséget ábrázoltuk az idő függvényében. n=3-5, átlag +/- S.E.M.

A DRY szekvenciának az allosztérikus interakciókra gyakorolt hatását tovább vizsgáltuk S109Y-DRY/AA1Y-AT<sub>1</sub>R-t és AT<sub>1</sub>R-BS-t koexpresszáló CHO sejtekben. Ebben az esetben az angiotenzin II hatására létrejövő BRET jel emelkedés elmaradt, illetve candesartan jelenlétében egyáltalán nem tapasztaltunk BRET jel változást (*14. ábra*, jobb ábra), mely eredmények szintén megerősítik a DRY szekvencia alapvető szerepét a dimeren belüli interakciókban.

#### 5.1.5 Negatív kooperatív ligandkötés

A GPCR-ok kooperatív ligandkötése háttérben szintén a receptorok dimerizációja és allosztérikus interakciója a leggyakrabban feltételezett mechanizmus. A dimeren belüli kooperatív ligandkötés vizsgálata céljából radioligand disszociációs kísérleteket végeztünk. Ehhez az AT<sub>1</sub>R-t expresszáló CHO sejteket 4°C-on (az internalizáció és szignalizáció elkerülése céljából) 0,01 nM <sup>125</sup>I-tel jelölt angiotenzin II jelenlétében inkubáltuk. A radioligand alacsony koncentrációja miatt feltételezhető, hogy ilyenkor csak a dimerek egyik tagja köt ligandot (az AT<sub>1</sub>R – angiotenzin II kötés K<sub>d</sub> értéke a nanomoláros nagyságrendben helyezkedik el). 2 óra előinkubálást követően mértük a kötött radioligand disszociációját telítési koncentrációjú (1 μM) jelöletlen angiotenzin II hiányában, illetve jelenlétében. Eredményeink alapján a jelöletlen

angiotenzin II fokozta a jelölt ligand disszociációját, ami háttérben nagy valószínűséggel a receptorok közti allosztérikus interakció állhat (15. ábra). Ha kísérleteinket DRY/AA<sub>Y</sub>-AT<sub>1</sub>R-t expresszáló sejteken végeztük el, a jelöletlen ligand disszociációt fokozó hatása elmaradt, ami korábbi kísérleteinkkel összhangban az mutatja, hogy a dimeren belüli allosztérikus interakciókhoz (jelen esetben a negatív kooperatív ligandkötés) szükséges a DRY szekvencia megléte.



#### 15. ábra – Az AT<sub>1</sub>R homodimer negatív kooperatív ligandkötése

Az AT<sub>1</sub>R-t (■) vagy DRY/AA<sub>Y</sub>-AT<sub>1</sub>R-t (▲) expresszáló CHO sejtek <sup>125</sup>I-vel jelölt angiotenzin II disszociációját mértük 1 μM jelöletlen angiotenzin II jelenlétében (üres szimbólum) vagy hiányában (teli szimbólum). A mért CPM értékeket a 0 időpontban mért értékek átlagára normalizáltuk. A csoportok közötti eltéréseket két szempontos varianciaanalízissel vizsgáltuk. n=3, átlag +/- S.E.M \*\*: p<0.01 (interakció a receptor típus és a jelöletlen angiotenzin II jelenléte/hiánya között)

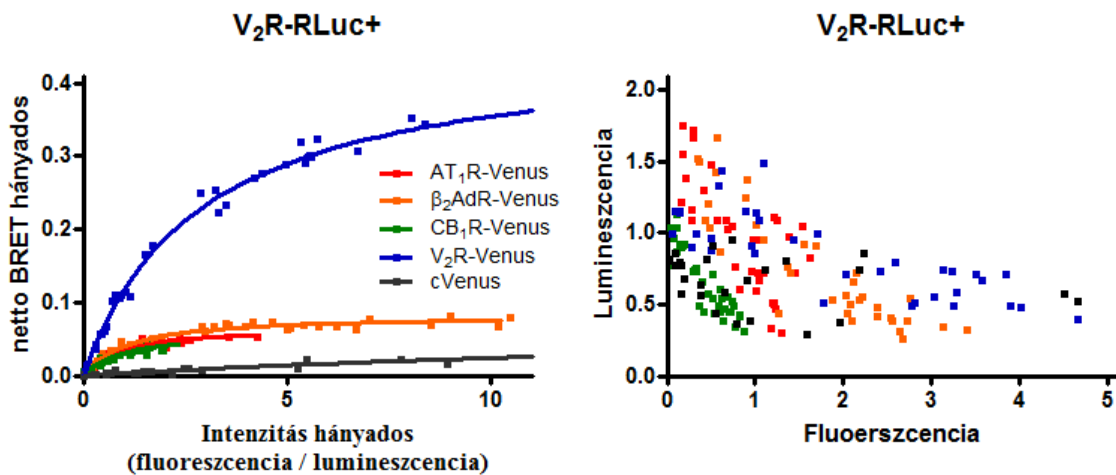
## 5.2 GPCR-ok dimerizációjának vizsgálata kvantitatív BRET módszerrel

Az AT<sub>1</sub>R homodimer vizsgálata jó lehetőséget adott számunkra a dimerizáció vizsgálatára alkalmas módszerek beállítására, valamint a dimeren belüli interakciók háttérben álló molekuláris mechanizmusok jobb megértésére. A dimerizáció élettani, kórélettani és farmakológiai szempontból legfontosabb következményei azonban nem is annyira a homodimerizáció, hanem az eltérő receptorok között létrejövő heterodimerizáció hatására jönnek létre. További kísérleteink a munkacsoportunk által vizsgált receptorok közti heterodimerizáció kimutatására irányultak.



### 5.2.1 A $V_2$ vazopresszin receptor dimerizációjának vizsgálata klasszikus kvantitatív BRET módszerrel

Munkánk során a munkacsoportunk érdeklődési körébe került  $V_2$  vazopresszin receptor más GPCR-okkal való dimerizációját kezdtük el vizsgálni kvantitatív BRET módszerrel. Kísérleteinkben HEK293 sejteket transzfektáltunk állandó mennyiségű energia donor *Renilla* luciferázzal jelölt  $V_2$  receptorral ( $V_2$ R-RLuc), valamint a vizsgálni kívánt  $AT_1$ R,  $\beta_2$  adrenerg,  $CB_1$  cannabinoid és  $V_2$  receptorok növekvő mennyiségű, energia akceptor Venus fluoreszcens fehérjével jelölt formáival ( $AT_1$ R-Venus,  $\beta_2$ AdR-Venus,  $CB_1$ R-Venus,  $V_2$ R-Venus). Az teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid hozzáadásával tartottuk állandó szinten. Kísérleteinkben negatív kontrollként citoplazmatikusan expresszálódó Venus fehérjét (cVenus) is használtunk. Ez utóbbi fehérje gyakran alkalmazott negatív kontroll a GPCR-ok dimerizációját vizsgáló kísérletekben, annak ellenére, hogy nem plazmamembránban kifejeződő fehérje. A mért BRET jelet az akceptor/donor hányadossal arányos intenzitás hányados függvényében ábrázoltuk.



16. ábra – A  $V_2$  receptor dimerizációjának vizsgálata klasszikus kvantitatív BRET módszerrel

HEK293 sejteket transzfektáltunk állandó mennyiségű  $V_2$ R-RLuc-t én növekvő mennyiségű  $AT_1$ R-Venus-t,  $\beta_2$ AdR-Venus-t,  $CB_1$ R-Venus-t,  $V_2$ R-Venus-t és cVenus-t kódoló plazmidokkal, a teljes transzfektált DNS mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmiddal állandóan tartva. A nettó BRET jelet az intenzitás hányados függvényében (*bal ábra*), illetve a mért teljes lumineszcenciát a mért Venus fluoreszcencia függvényében (*jobb ábra*) ábrázoltuk. n=3

Látható, hogy a  $V_2R$ -RLuc receptor mind a négy másik vizsgált GPCR-ral telítési BRET görbét eredményezett (16. ábra, bal ábra), csak a citoplazmatikus Venus fehérjével kaptunk lineáris összefüggést az intenzitás hányados és a BRET jel között. Önmagában a maximális BRET jel értéke nem alkalmazható a receptorok közti kapcsolat erősségének megítélésére, hiszen az függ a donornak és az akzeptornak a dimeren belüli elhelyezkedésétől is, ezért az irodalomban elfogadott módszer az interakció megítélésére a  $BRET_{50}$  értékeknek, azaz a félmáximális BRET jelnél mérhető akceptor/donor hányadosoknak az összehasonlítása (1. táblázat). Eredményeink alapján hasonló nagyságú  $BRET_{50}$  érték volt meghatározható a  $V_2$  receptor és az  $AT_1R$ ,  $\beta_2AdR$  és  $CB_1R$  között, míg a  $V_2R$ -RLuc –  $V_2R$ -mVenus homodimer nagyobb  $BRET_{50}$  értékkel volt jellemezhető, ami a  $V_2$  receptor a vizsgált receptorokkal való heterodimerizációjára, illetve valamivel kisebb affinitású homodimerizációjára utal. Fontos megjegyezni, hogy a kvantitatív BRET mérések kiértékelését leíró matematikai modell feltételezi, hogy a donorral jelölt receptor mennyisége a kísérletek során állandó. Ezt megerősítő a donormennyiséggel arányos teljes lumineszcenciát ábrázoltuk az akceptormennyiséggel arányos Venus fluoreszcencia függvényében (16. ábra, jobb ábra). Látható, hogy minden esetben az akceptormennyiség növekedése a donormennyiség csökkenéséhez vezet, azaz a donormennyiség állandóan tartását nem sikerült megoldanunk kísérleti rendszerünkben. Megjegyzendő, hogy a legtöbb kBRET kísérletben a donormennyiség állandóan tartását csak feltételezik a szerzők a donort kódoló plazmid állandó mennyisége alapján, de ezt explicit módon szinte soha sem mutatják.

**1. táblázat – A  $V_2R$ -RLuc számított  $BRET_{max}$  és  $BRET_{50}$  értékei a vizsgált Venus-sal jelölt konstrukciókkal**

Akceptor	$AT_1R$	$\beta_2AdR$	$CB_1R$	$V_2R$	cVenus
$BRET_{max}$	0,068 +/- 0,003	0,083 +/- 0,002	0,059 +/- 0,005	0,457 +/- 0,010	0,088 +/- 0,011
$BRET_{50}$	0,985 +/- 0,116	1,092 +/- 0,100	0,962 +/- 0,192	2,903 +/- 0,163	26,220 +/- 6,186

## 5.2.2 A változó donormennyiség hatásai a kBRET görbékre – Monte Carlo szimulációk

A  $V_2$  receptorral végzett kvantitatív BRET kísérleteink a receptor hasonló affinitású dimerizációját mutatták a vizsgált receptorokkal, illetve arra utaltak, hogy tranziens transzferációs rendszerünkben nem sikerült állandó szinten tartani a donor expressziót. A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolhatja a változó donormennyiség a kBRET görbék lefutását. Ehhez először Monte Carlo szimulációkat végeztünk.

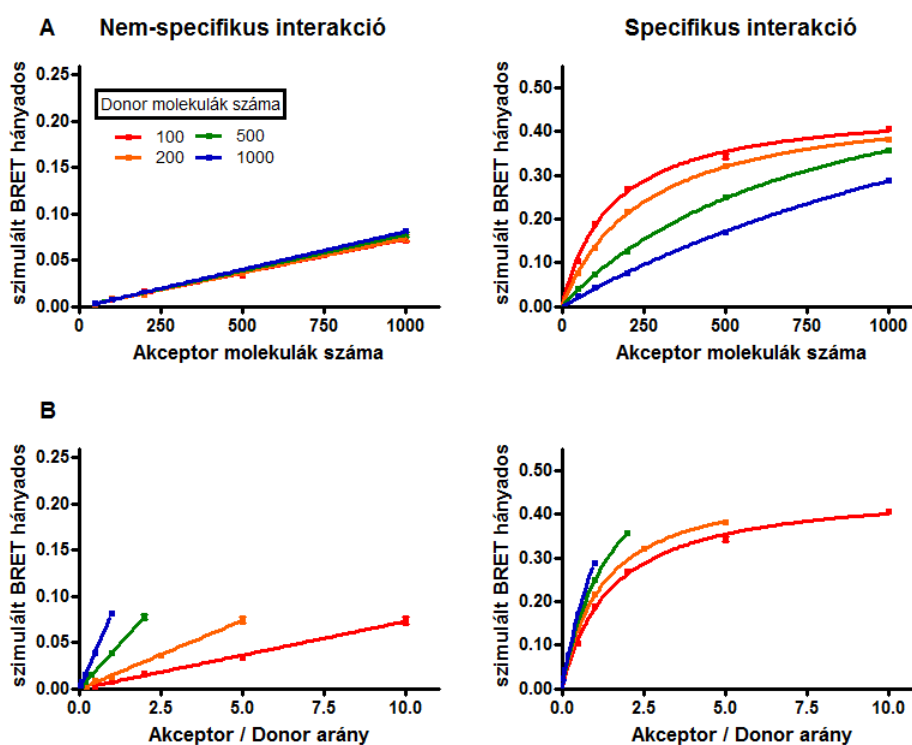
Egy 100x100-as, hatszögekből álló membránon helyeztünk el véletlenszerűen monomer donor és akceptor molekulákat, melyek a szimuláció során véletlenszerűen mozoghattak illetve dimerizálhattak egymással (a szimuláció részletesebb leírása a 4.7 alfejezetben olvasható). A dimerek kialakulását illetve szétválását asszociációs ( $p_{\text{asszociáció}}$ ) és disszociációs ( $p_{\text{disszociáció}}$ ) valószínűségek megadásával szimuláltuk. A szimulációkat különböző  $p_{\text{asszociáció}}$  és  $p_{\text{disszociáció}}$  értékkel is elvégeztük, a dolgozatban azonban csak két szélsőséges esetet modellező (2. táblázat) eredményeinket mutatom be. Az különböző szimulációkban mind a donor, mind az akceptormennyiségét 100 és 1000 között változtattuk. A szimulációt 1000 lépésen keresztül futtattuk, majd a szomszédos donor-akceptor párok száma alapján szimulált BRET jelet számítottunk ki. A szimulált BRET jelet az akceptor szám, illetve a klasszikus ábrázolásnak megfelelő akceptor/donor hányados függvényében ábrázoltuk, külön jelölve a donormennyiséget (17. ábra).

2. táblázat – A szimulációk során használt  $p_{\text{asszociáció}}$  és  $p_{\text{disszociáció}}$  értékek

Interakció típusa	Nem-specifikus	Specifikus
Donor - Donor	$p_{\text{asszociáció}}=0,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$	$p_{\text{asszociáció}}=0,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$
Donor - Akceptor	$p_{\text{asszociáció}}=0,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$	$p_{\text{asszociáció}}=1,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$
Akceptor - Akceptor	$p_{\text{asszociáció}}=0,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$	$p_{\text{asszociáció}}=0,0$ $p_{\text{disszociáció}}=0,0$

Nem-specifikus interakció (17. ábra, bal oldal) esetén a BRET jel eredményeink alapján csak az akceptormennyiségtől függ, a donormennyiség nem befolyásolja azt. Az akceptor/donor hányados függvényében történő ábrázolás esetén ez úgy jelenik meg, hogy adott donormennyiség esetén a BRET jel lineárisan változik az akceptor/donor hányadossal, és a donormennyiség az egyenes meredekségét határozza meg.

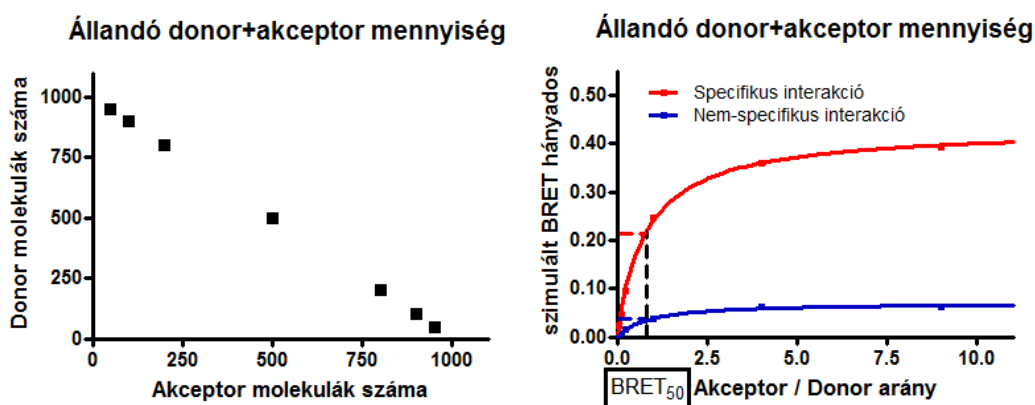
Specifikus interakció esetén (17. ábra, jobb oldal) mind az akceptor, mind az akceptor/donor hányados függvényében ábrázolva a BRET jelet, a donormennyiségtől függően eltérő lefutású telítési görbéket kaptunk, ami megfelel annak, hogy dimerizáció esetén a donormennyiség is befolyásolja a BRET jel mértékét. Az akceptormennyiség függvényében történő ábrázolás esetén látható, hogy a donormennyiség növelése a görbék ellapulásához vezet, hiszen ebben az esetben egyre több, akceptorral párt nem képző donor molekula található a rendszerben.



**17. ábra – A változó donormennyiség hatása a kBRET görbék lefutására – Monte Carlo szimulációk**

A szimulációk során a nem-specifikus (bal ábrák) és a specifikus (jobb ábrák) interakciókat a  $p_{\text{asszociáció}}$  és  $p_{\text{disszociáció}}$  értékek változtatásával modelleztük. A szimulált BRET jelet az akceptor molekulák száma (A) illetve az akceptor/donor arány (B) függvényében ábrázoltuk. A különböző donormennyiségeket a színek jelöli.  $n=5$ , átlag  $\pm$  S.E.M.

Klasszikus kvantitatív BRET kísérleteinkben azt találtuk, hogy az akceptormennyiség fokozódása következetesen a donor expresszió csökkenéséhez vezetett. Szimulációink során ezt úgy modelleztük, hogy a teljes donor+akceptormennyiséget állandóan tartva változtattuk azok egymáshoz viszonyított arányát (18. ábra). Látható, hogy a BRET jelet az akceptor/donor hányados függvényében ábrázolva mind specifikus, mind nem-specifikus interakció esetén telítési görbét kaptunk, közel megegyező  $BRET_{50}$  értékkel. Szimulációs eredményeink alapján így elmondható, hogy amennyiben a donormennyiséget nem lehet állandóan tartani, nem-specifikus interakció esetén is telítési kBRET görbét kaphatunk, mely jelensége a dimerizációs állapot téves megítéléséhez vezethet.



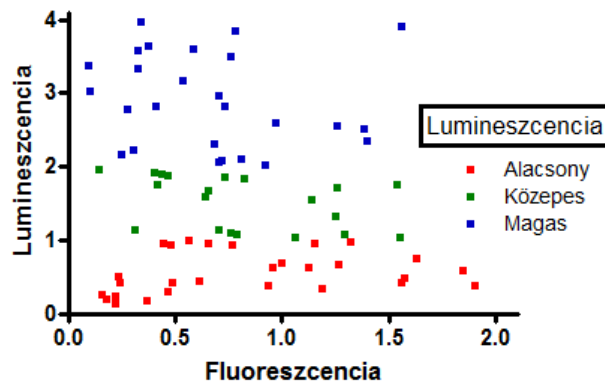
18. ábra – Monte Carlo szimulációk – a kBRET görbék állandó donor + akceptormennyiség mellett  
A szimulációk során a teljes donor+akceptormennyiséget állandóan tartva változtattuk azok arányát (bal ábra). A szimulált BRET jelet az akceptor/donor arány függvényében ábrázoltuk (jobb ábra).  $n=5$ , átlag  $\pm$  S.E.M.

### 5.2.3 A változó donormennyiség hatásai a kBRET görbékre – indukálható dimerizáció

A szimulációban kapott eredmények kísérletes validálása céljából a munkacsoportunk által már hosszú ideje használt rapamycin indukálta heterodimerizációs rendszert használtuk fel. A módszer lényege az FRB és FKBP fehérje domének rapamycin hatására létrejövő kapcsolódása. Kísérleteinkben két plazmamembrán markert jelöltünk az FRB és FKBP doménekkal, illetve energia donor *Renilla* luciferáz és energia akceptor Venus fehérjékkal (PM-FKBP-RLuc és Venus-FRB-CAAX). A két plazmamembrán marker alapállapotban a plazmamembrán eltérő

mikrodoménjeiben helyezkedik el [102], azaz ilyenkor köztük csak nem-specifikus interakció állhat fenn. Rapamycin hatására az FRB és FKBP domének kapcsolódnak, így innentől specifikus interakcióról beszélhetünk.

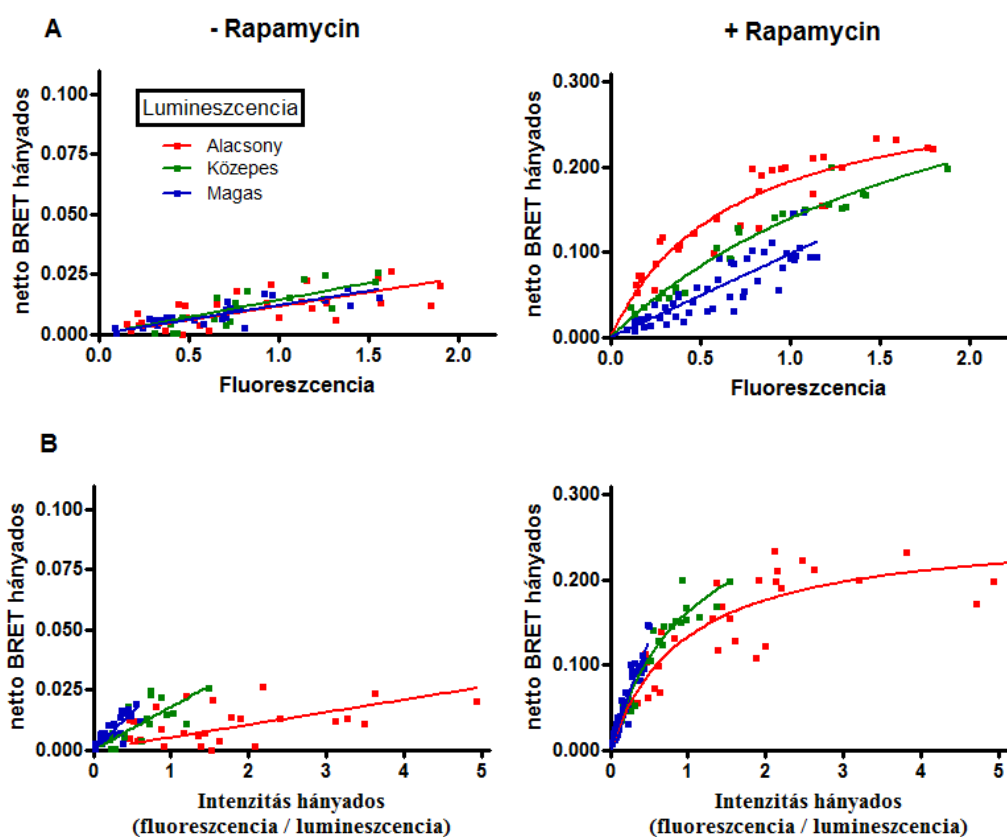
Kísérleteinkben HEK293 sejteket transzfektáltunk PM-FKBP-Rluc és Venus-FRB-CAAX konstrukciókkal. A klasszikus kvantitatív BRET kísérletekkel szemben nemcsak az akceptorral, hanem a donorral jelölt fehérjét kódoló plazmid mennyiségét is változtattuk. A transzfekciós hatékonyság állandóan tartásához ezekben a kísérletekben is üres pcDNA3.1 plazmid hozzáadásával tartottuk állandóan a teljes transzfektált DNS mennyiséget. Látható (*19. ábra*), hogy a fenti módszer segítségével a donor és akceptor expressziót egymástól függetlenül tudtuk változtatni. Kísérleteinket rapamycin hiányában, illetve 30 percig tartó, 100 nM rapamycin jelenlétében történő előinkubálás után végeztük. A mért BRET jelet a szimulációknak megfelelően két módon ábrázoltuk: egyrészt a Venus fluoreszcencia függvényében (mely arányos az akceptor expresszióval), másrészt az akceptor/donor hányadossal arányos intenzitás hányados függvényében. A mért pontokat a donor expresszióval arányos teljes lumineszcencia alapján alacsony, közepes és magas donor expressziójú csoportokba osztottuk, és külön ábrázoltuk. A csoportokba sorolásnál a lumineszcencia értékek első tercilisénel alacsonyabb értékkel rendelkező pontok kerültek az alacsony, a két tercilis közötti értékkel rendelkező pontok a közepes, míg a második tercilisénel nagyobb lumineszcenciájú pontok a magas lumineszcencia csoportba.



**19. ábra – Változó mennyiségű donort és akceptort kódoló plazmival transzfektált HEK293 sejtek fluoreszcencia – lumineszcencia összefüggése**

HEK293 sejteket transzfektáltunk változó mennyiségű PM-FKBP-RLuc és Venus-FRB-CAAX konstrukciókkal, a teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid adásával állandóan tartva. A mért teljes lumineszcencia értékeket a Venus fluoreszcencia függvényében ábrázoltuk. A teljes lumineszcencia érték alapján a mért pontok alacsony/közepes/magas lumineszcencia csoportokba soroltuk, és külön színnel ábrázoltuk. n=3

Kísérleti eredményeink szép egyezést mutattak a szimulációval kapott eredményekkel (20. ábra). A Venus fluoreszcencia függvényében való ábrázolás mutatja, hogy nem-specifikus interakció esetén (rapamycin hiányában) a BRET jel csak az akceptormennyiségtől függ, míg specifikus interakció esetén (rapamycin jelenlétében) a donor expresszió fokozása itt is a görbék ellapulásához vezetett.



20. ábra – A változó donormennyiség hatása a kBRET görbék lefutására – Indukálható dimerizáció

HEK239 sejteket transzfektáltunk változó mennyiségű PM-FKBP-RLuc és Venus-FRB-CAAX konstrukciókkal, a teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid adásával állandóan tartva. A nem-specifikus interakció esetén 30 percen keresztül vivőanyaggal (bal ábrák), a specifikus interakció létrehozásához 30 percig 100 nM rapamycin jelenlétében (jobb ábrák) inkubáltuk a sejteket. A nettó BRET értéket a Venus fluoreszcencia (A) illetve az intenzitás hányados (B) függvényében ábrázoltuk. A teljes lumineszcencia érték alapján a mért pontokat alacsony/közepes/magas lumineszcencia csoportokba soroltuk, és külön színnel ábrázoltuk.  $n=3$

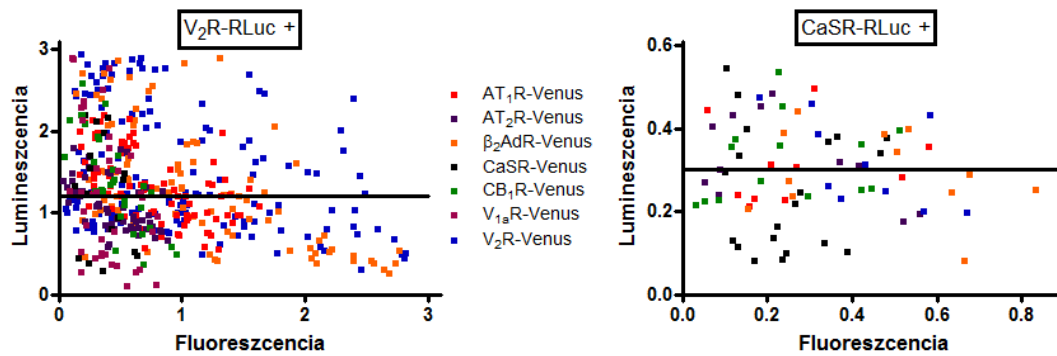
#### 5.2.4 GPCR-ok dimerizációjának vizsgálata módosított kvantitatív BRET módszerrel

Szimulációs, illetve indukálható dimerizációs rendszerben végzett eredményeink alapján a specifikus és a nem-specifikus interakció jobban elkülöníthető, ha BRET jelet nem az akceptor/donor hányados, hanem az akceptor expresszió függvényében ábrázoljuk. Ilyenkor a nem-specifikus interakció esetén a donormennyiségtől függetlenül, alacsony meredekségű lineáris összefüggést kapunk. Ezzel szemben a specifikus interakció meredekebb, telítésbe átmenő görbék eredményez, ahol a donor



expresszió fokozása a görbe ellapulásához vezet. Fontos kiemelni, hogy a klasszikus kvantitatív BRET kísérletek esetén magas akceptor expresszió szükséges a telítés eléréséhez. Az általunk módosított módszer segítségével már a görbék kezdeti, közel lineáris szakaszában elkülöníthető egymástól a specifikus és nem-specifikus interakció, ezért további kísérleteinkben már csak ezt a szakaszt vizsgáltuk.

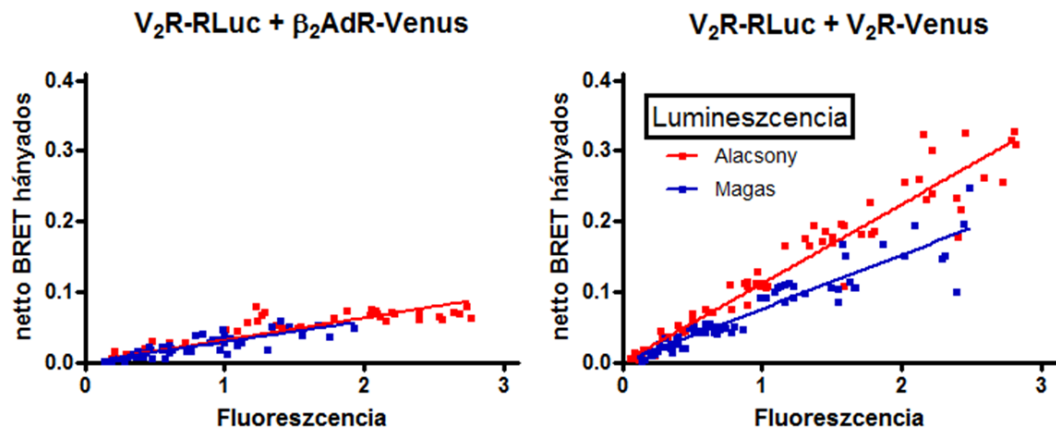
Kísérleteinkben a  $V_2$  vazopresszin receptor mellett a CaSR kalcium érzékelő receptor egyéb GPCR-okkal való dimerizációját vizsgáltuk, ezáltal egy klasszikus, a glutamát receptor családba tartozó receptort is bevontunk vizsgálatainkba. HEK293 sejteket transzfektáltunk energiadonorral jelölt  $V_2$ R-RLuc illetve CaSR-RLuc receptorokkal, valamint az eddig is vizsgált  $AT_1$ R-Venus,  $\beta_2$ AdR-Venus,  $CB_1$ R-Venus,  $V_2$ R-Venus mellett Venus-sal jelölt II-es típusú angiotenzin ( $AT_2$ R-Venus), CaSR-Venus és a  $V_2$ R-RLuc esetében  $V_{1a}$  vazopresszin ( $V_{1a}$ R-Venus) receptorokat kódoló plazmidokkal. A transzfekció során mind a donorral, mind az akceptorral jelzett konstrukció mennyiségét változtattuk, illetve a teljes plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid hozzáadásával tartottuk állandó szinten. A mért pontokat a teljes lumineszcencia alapján alacsony és magas lumineszcencia csoportokba osztottuk (21. ábra). Az adott donor receptor esetén mért lumineszcencia értékek mediánjánál kisebb lumineszcencia értékű pontok kerültek az alacsony, az ennél magasabb értékkel rendelkező pontok a magas lumineszcencia csoportba. A BRET jelet a különböző donor – akceptor párok esetén a Venus fluoreszcencia függvényében ábrázoltuk.



### 21. ábra – Fluoreszcencia – Lumineszcencia összefüggés a vizsgált receptor párok esetében

HEK239 sejteket transzfektáltunk változó mennyiségű donorral ( $V_2R$ -RLuc és CaSR-RLuc, bal és jobb ábra) illetve akceptorral (AT<sub>1</sub>R-Venus, AT<sub>2</sub>R-Venus,  $\beta_2$ AdR-Venus, CaSR-Venus, CB<sub>1</sub>R-Venus,  $V_2R$ -Venus,  $V_{1a}$ R-Venus, színkód) jelölt receptor konstrukciókkal, a teljes transzfektált plazmid mennyiséget üres pcDNA3.1 plazmid adásával állandóan tartva. A mért teljes lumineszcencia értékeket a Venus fluoreszcencia függvényében ábráztuk. A teljes lumineszcencia érték alapján a mért pontokat alacsony és magas lumineszcencia csoportokba soroltuk (fekete vízszintes egyenes). n=3-8

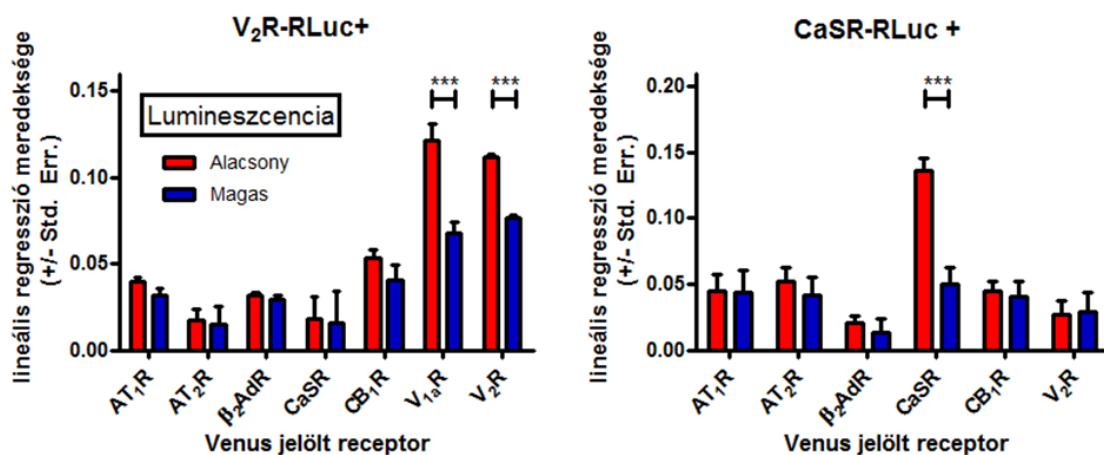
A 22. ábrán a  $V_2R$ -RLuc –  $V_2R$ -Venus és  $V_2R$ -RLuc –  $\beta_2$ AdR-Venus párok esetén mért eredmények láthatóak. A  $V_2R$ - $\beta_2$ AdR interakció esetén alacsony meredekségű, lineáris összefüggés látható, ahol a donor expresszió nem befolyásolja az egyenes meredekségét, ami megfelel a nem-specifikus interakció esetén várhatóknak. Ezzel szemben a  $V_2R$ - $V_2R$  kapcsolat esetén az egyenesek meredeksége nagyobb, és a donor expresszió fokozódása a meredekség csökkenéséhez vezet, ami specifikus interakcióra, azaz a  $V_2$  receptor homodimerizációjára utal.



### 22. ábra – A dimerizáció és a nem-specifikus interakció elkülönítése GPCR-ok esetén

A nettó BRET jelet a mért fluoreszcencia függvényében ábrázoltuk a V<sub>2</sub>R-β<sub>2</sub>AdR (bal ábra) és V<sub>2</sub>R-V<sub>2</sub>R (jobb ábra) párok esetén. A mért teljes lumineszcencia alapján a mért pontokat alacsony és magas lumineszcencia csoportokba soroltuk, és külön színnel ábrázoltuk. n=6-8

Hasonló analízist végeztünk el az összes donor-akceptor pár esetében, majd az egyenes meredekségét oszlopdiagram formájában ábrázoltuk (23. ábra). Látható, hogy a donor expresszió csak a V<sub>2</sub>R-V<sub>2</sub>R, V<sub>2</sub>R-V<sub>1a</sub>R illetve a CaSR-CaSR interakció esetén befolyásolja a meredekséget, azaz csak ez a három interakció felel meg valódi dimerizációnak. Eredményeink arra utalnak, hogy mind a V<sub>2</sub> vazopresszin, mind a CaSR kalcium érzékelő receptorok képesek homodimerizálni, heterodimerizáció azonban csak a két közeli rokon V<sub>2</sub>R-V<sub>1a</sub>R receptor között volt detektálható.



### 23. ábra – GPCR-ok dimerizációjának kimutatása módosított kvantitatív BRET módszerrel

A 20. ábrán szemléltetett analízist minden vizsgált receptor pár esetén elvégeztük, majd az illetett egyenesek meredekségét oszlopdiagram formájában ábrázoltuk. n=3-8, számolt meredekség +/- standard hiba. \*\*\*: p<0.001

## 6. Megbeszélés

A dimerizáció vizsgálata az elmúlt évtizedben fontos, intenzíven kutatott részterületévé vált G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal foglalkozó irodalomnak. Mára általánosan elfogadottá vált, hogy e receptorok dimereket, illetve magasabb rendű oligomereket képesek alkotni, mely jelenség alapvetően befolyásolhatja a receptorok működését.

Doktori munkám során az I-es típusú angiotenzin receptor homodimerben, mint modellrendszerben vizsgáltam az alegységek közötti interakciók következményeit, illetve az ezek háttérében álló molekuláris mechanizmusokat. Kísérleteinkkel megállapítottuk, hogy az AT<sub>1</sub>R homodimer egyik alegységének stimulálása a másik alegység  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez, megváltozott konformációjához és csökkent ligand kötéséhez vezet. Eredményeink alapján a fenti hatások létrejöttéhez szükséges az aktivált receptor konzervált DRY szekvenciája.

Egy nem stimulált receptor és az arresztinek között létrejövő interakció vizsgálatát már több esetben alkalmazták a GPCR-ok közötti dimerizáció kimutatására. E módszerrel igazolták már az AT<sub>1</sub> receptor homodimerizációját [62], az AT<sub>1</sub> és AT<sub>2</sub> receptorok közti heterodimerizációt [43], valamint e jelenség hiánya fontos érv volt az AT<sub>1</sub>R és a B<sub>2</sub> bradykinin receptor dimerizációját megkérdőjelező közleményben [86]. Ezen kísérletek háttérében az az elképzelés állt, hogy a stimulált alegységhez kötődő arresztin molekuláris közelségbe kerül a dimer nem stimulált alegységéhez, így BRET jel emelkedés detektálható. Saját kísérleteinkben is fokozott BRET jelet mértünk a dimer YFP-vel jelölt, nem stimulált alegysége és a  $\beta$ -arresztin2-RLuc között (10. ábra, A). Eredményeink alapján azonban a  $\beta$ -arresztin2 közvetlenül a dimer nem stimulált alegységéhez kötődik, hiszen a TSTS/A mutáns, így arresztint nem kötő receptor stimulálása esetén is észleltük a fenti hatást (10. ábra, C). Kísérleteink arra utalnak, hogy a stimulált alegység hatására olyan konformációváltozás jön létre a nem stimulált alegységben, mely következtében az  $\beta$ -arresztin2-t köt. Fontos megjegyezni, hogy ezen eredményeink nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a nem stimulált alegység arresztin kötésének háttérében nem egy közvetlen, dimeren belüli receptor-receptor kölcsönhatás, hanem valamilyen jelátviteli mechanizmus (például receptor foszforiláció) áll. A foszfolipáz C gátlószer jelenlétében végzett kísérleteink (11. ábra)

– ahol az AT<sub>1</sub>R fő jelátviteli mechanizmusát gátoltuk – csökkentik e lehetőség valószínűségét, de teljes mértékben természetesen nem zárják azt ki.

Hogy a receptor aktiválódási mechanizmusának egy korábbi szintjén (ahol az esetleges jelátviteli hatások szerepe kisebb) is vizsgálni tudjuk a dimeren belüli interakciók szerepét, létrehoztunk egy BRET alapú, intramolekuláris receptor bioszenzort. <sup>125</sup>I-SI-Angiotenzin II-vel végzett kötési vizsgálatainkban lényegesen kisebb ligandkötést észleltünk a bioszenzorral transzfektált sejtekben, mint a vad típusú receptorral történt transzfecció esetén (*13. ábra*). Ez utalhat a szenzor csökkent sejt felszíni expressziójára, illetve csökkent ligand affinitására is. E kérdés pontos eldöntése további kísérleteket igényelt volna, számunkra azonban elégséges volt az az információ, hogy az AT<sub>1</sub>R-BS expresszálódik a plazmamembránban, és képes ligandot kötni. Agonista stimulusra az AT<sub>1</sub>R-BS BRET jel csökkenéssel válaszolt (*13. ábra*), ami megfelel az irodalomban korábban leírt, hasonló elven működő FRET alapú szenzorokkal tapasztaltaknak [72, 116]. Azonban míg az elsőként leírt  $\alpha_{2a}$  adrenerg és parathormon alapú szenzorok nagyon gyors, 50-1000 ms-ig terjedő féléletidővel ( $\tau$ ) leírható kinetikával aktiválódtak, az AT<sub>1</sub>R-BS aktivációs kinetikája ( $\tau \sim 25$  s) ennél lényegesen lassabb volt. Az eltérő kinetika háttérében több magyarázat is elképzelhető. A FRET alapú szenzorokkal végzett vizsgálatoknál nagyon nagy agonista koncentrációt alkalmaztak, hogy a ligand-receptor kapcsolat létrejöttéhez szükséges időt minimalizálják. Ez a mi kísérleti felállásunkban nem volt megoldható. Szintén elképzelhető, hogy az egyes receptorok más-más kinetikával aktiválódnak: az AT<sub>1</sub> receptorhoz hasonló B<sub>2</sub> bradykinin receptor alapú szenzor a mi eredményeinkhez hasonló aktivációs kinetikát mutat [117]. További lehetőség, hogy az AT<sub>1</sub>R-BS nem a receptor aktiváció korai fázisának megfelelő konformáció változást detektálja, hanem egy későbbi folyamatot. E lehetőség ellen szól azonban, hogy az AT<sub>1</sub>R-BS aktivációs kinetikája még mindig lényegesen gyorsabb a receptor- $\beta$ -arresztin2 kapcsolat létrejötténél ( $\tau \sim 100$  s).

Az AT<sub>1</sub>R-BS-t dimerizációs rendszerünkben alkalmazva követhetővé váltak a nem stimulált alegységben létrejövő konformációváltozások. Ebben az esetben egy korai BRET jel emelkedést tapasztaltunk (*14. ábra*), szemben a szenzor direkt aktiválásakor látható BRET jel csökkenéssel. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a dimeren belüli allosztérikus interakciók hatására létrejövő receptor konformáció eltér a

közvetlen stimulálás hatására létrejövő konformációtól. Eredményink összhangban vannak Lohse és munkatársai megfigyeléseivel, melyek szerint az  $\alpha_{2a}$  adrenerg receptor bioszenzor által létrehozott FRET jel csökkenés gátolt, amennyiben a szenzorral dimert képző  $\mu$  opioid receptort is stimulálták [72]. Meglepő jelenség volt, hogy a BRET jel emelkedés gyorsabban jött létre, mint az AT<sub>1</sub>R-BS közvetlen stimulálása esetén tapasztalható BRET jel csökkenés. Bár egyértelmű magyarázatot nem találtunk e jelenségre, elképzelhető, hogy az AT<sub>1</sub>R-BS aktivációs kinetikája lassabb a vad típusú AT<sub>1</sub>R-énál (a hármas IC hurokba illesztett YFP befolyásolhatja a receptor aktiválódás mechanizmusát), így a vad típusú receptor aktiválásán keresztül létrejövő konformáció változás gyorsabban jön létre a közvetlen stimulálásnál tapasztalhatónál.

Egy további, az AT<sub>1</sub>R homodimeren belüli allosztérikus interakciókra utaló hatás a ligand disszociációs kísérletekkel kimutatott negatív kooperatív agonistakötés. Fontos megjegyezni, hogy e kísérleteinket 4°C-on végeztük, így itt a jelátvitel szerepe gyakorlatilag elhanyagolható. Bár az utóbbi időben alternatív magyarázatok is napvilágot láttak, a negatív kooperatív ligand kötés legelfogadottabb magyarázata a receptorok dimerizációja és a dimeren belüli allosztérikus interakció. A jelöletlen angiotenzin II hatására létrejövő fokozott jelölt agonista disszociáció (15. ábra) háttérben elképzelhető lenne az újrakötődés („rebindig”) gátlása: a disszociáció után a jelölt ligand visszakötődhet a receptorhoz, amit a nagy koncentrációjú jelöletlen ligand meggátolna. E feltételezés ellen szól, hogy a DRY/AAY mutáns receptor esetén nem észleltük a disszociáció fokozódását jelöletlen ligand jelenlétében. Egy másik elképzelés szerint a negatív kooperatív ligand kötés háttérben nem a dimerizáció, hanem a heterotrimer G-fehérjékért való kompetíció áll. Kísérleteinkben a DRY/AAY mutáns receptor nagy affinitással kötötte a <sup>125</sup>I-tel jelölt angiotenzin II-t, ami arra utal, hogy e receptor is képes interakcióba lépni a heterotrimer G-fehérjékkel, csak a G-fehérje aktiválási mechanizmusa károsodott. E receptor esetében azonban nem tapasztaltuk a negatív kooperativitást, ami arra utal, hogy nem a G-fehérjékért való versengés áll a látott hatások háttérben.

Kísérletsorozatunk legérdekesebb eredménye a fentebb leírt hatások teljes hiánya abban az esetben, ha a stimulált receptor tartalmazta a DRY/AAY mutációt. A DRY szekvencia a rodopszin családba tartozó GPCR-ok egyik leginkább konzervált szekvenciája, mely alapvető szerepet játszik a receptor aktiválódás mechanizmusában.

A DRY szekvenciát érintő mutációk a különböző GPCR-okban a konstitutív aktivitástól a receptor teljes inaktiválódásáig változatos hatásokat hoznak létre. Az AT<sub>1</sub> receptor esetében jól ismert, hogy e mutáns nem képes heterotrimer G-fehérjét aktiválni, de közel normális  $\beta$ -arresztin2 kötéssel rendelkezik. Eredményeinkre, melyek szerint a DRY szekvencia hiánya gátolja a dimeren belüli interakciókat, többféle magyarázat elképzelhető, melyek közül a legkézenfekvőbb, hogy az aktivált alegység teljesen aktív konformációja szükséges az allosztérikus hatásokhoz. Elképzelhető emellett az is, hogy a dimeren belüli interakciókat a heterotrimer G fehérje közvetíti, így a DRY mutáns receptor nem képes azokat létrehozni. E magyarázat összhangban van az LTB<sub>4</sub> leukotrién receptor esetében leírtakkal [73], ahol a nem stimulált alegység konformációja különböző volt heterotrimer G-fehérje hiányában és jelenlétében. A DRY szekvenciának a dimeren belüli interakciók létrejöttében betöltött szerepét a röntgenkristallográfiával meghatározott receptor térszerkezetek vizsgálata is felvetette [118].

Az AT<sub>1</sub>R homodimer vizsgálatával nyert eredményinket összefoglalva elmondható, hogy igazoltuk, hogy a receptor egyik alegységének stimulálása a másik alegység megváltozott konformációjához, csökkent affinitású agonistakötéséhez, valamint a  $\beta$ -arresztin2-vel létrejövő közvetlen interakciójához vezet, mely hatások háttérben nagy valószínűséggel a dimer alegységei között létrejövő allosztérikus interakciók állnak. A fenti hatások elmaradnak, amennyiben a stimulált alegység a DRY/AAV mutációt hordozza, ami arra utal, hogy az alegységek közötti interakcióhoz szükséges a stimulált receptor teljesen aktív konformációja és/vagy G-fehérje aktiválása, ezáltal az intradimerikus kölcsönhatás háttérben álló molekuláris mechanizmusra is egy lehetséges magyarázatot adtunk.

További kísérleteinkben a V<sub>2</sub> vazopresszin receptor egyéb GPCR-okkal való dimerizációját vizsgáltuk kvantitatív BRET mérések segítségével. E kísérleti felállítás, bár az utóbbi időben több kritikát is kapott [27-29], továbbra is a GPCR-ok dimerizációjának kimutatására leggyakrabban alkalmazott módszerek egyike. A receptorok közti közvetlen interakció kimutatása alapvető fontosságú a GPCR-ok dimerizációjának kimutatása szempontjából, hiszen a különböző funkcionális adatok a legtöbb esetben csak közvetve igazolják a dimerizáció fennállását.

Kísérleteink során telítési kvantitatív BRET görbéket kaptunk az összes vizsgált receptor pár esetében (16. ábra). Bár a mért maximális BRET értékekben különbséget találtunk (1. táblázat), a BRET<sub>50</sub> értékek elemzése arra utal, hogy a V<sub>2</sub> receptor hasonló affinitással képes homodimerizálni, és heterodimert képezni a vizsgált AT<sub>1</sub>R, β<sub>2</sub>AdR és CB<sub>1</sub>R receptorokkal. Kísérleteink során egyedül a V<sub>2</sub>R-RLuc – citoplazmatikus Venus interakció esetén kaptunk a nem-specifikus interakciónak megfelelő lineáris összefüggést. A citoplazmatikus Venus (vagy egyéb fluoreszcens fehérje) gyakran alkalmazott negatív kontroll a GPCR-ok dimerizációját vizsgáló kBRET kísérletekben, kezdve a módszert leíró közleménytől [21] egészen napjainkig [119]. Könnyen belátható azonban, hogy a citoplazmatikusan expresszálódó fluoreszcens fehérjéknek csak kis hányada van a plazmamembrán közelében, ezáltal a BRET jel létrejöttében szerepet játszó „effektív” akceptormennyiség lényegesen kisebb a mért fluoreszcencia alapján meghatározott teljes akceptormennyiségnél. E jelenség magyarázza azt, hogy egy plazmamembrán receptor és egy citoplazmatikus fehérje között mindig lapos, lineáris vagy igen magas BRET<sub>50</sub> értékkel jellemezhető kBRET görbét kapunk.

A kBRET görbék korrekt elemzéséhez elengedhetetlen, hogy a donorral jelölt receptor mennyisége ne változzon a fokozott akceptor expresszió következtében. Saját kísérleteinkben ezt nem sikerült megvalósítani (16. ábra), az akceptor expresszió emelkedése minden konstrukció pár esetén a donor expresszió csökkenéséhez vezetett. Fontos kérdés, hogy ez csak a mi kísérleti rendszerünkben volt-e így, vagy esetleg egy általános jelenség a kBRET kísérletek esetén. Maga a kBRET esetén alkalmazott ábrázolási mód is gyanúra ad okot, hogy nem csak a mi kísérleteinkben áll fenn ez a probléma: a kBRET kísérletek során mért BRET jelet az akceptor/donor hányados függvényében ábrázolják, ami állandó donormennyiség mellett csak egy fölösleges komplikáló tényezőt jelentene. A kBRET kísérleteket leíró közlemények nagy részében nem esik szó arról, hogy a donormennyiség valóban állandó maradna, a szerzők többnyire megelégszenek azzal, hogy a donort kódoló plazmid mennyiségét állandóan tartották. A kBRET módszert leíró eredeti közlemény ugyan megemlíti, hogy voltak változások a donor expresszióban [21], de tekintettel arra, hogy a BRET jelet az akceptor/donor hányados függvényében ábrázolták, ennek nem tulajdonít jelentőséget.

További kísérleteink annak feltérképezésére irányultak, hogy milyen hatások lehetnek a változó donormennyiségeknek a kBRET görbék lefutására. Monte Carlo



szimulációkkal igazoltuk, hogy amennyiben a donormennyiség az akceptormennyiség növekedésével párhuzamosan csökken (18. ábra), mind a specifikus, mind a nem-specifikus interakciók telítési kBRET görbéket eredményeznek, hasonló BRET<sub>50</sub> értékkel. Ez könnyen a dimerizációs állapot téves megítéléséhez vezethet. Szimulációs eredményeink alapján a dimerizáció jobban elkülöníthető a nem-specifikus interakcióktól, ha nemcsak az akceptorral, hanem a donorral jelölt receptor expresszióját is változtatjuk, és a mért BRET jelet az akceptor expresszió függvényében ábrázoljuk. Ebben az ábrázolási módban a nem-specifikus interakció alacsony meredekségű egyenest eredményez, ahol a donor expresszió mennyisége nem befolyásolja a BRET jel mértékét (17. ábra). Ez az elsőre talán meglepő eredmény könnyen magyarázható. A mért BRET jelünk az egyes donor molekulák BRET jeleinek átlaga. Nem-specifikus interakció esetén az egyes donor molekulák BRET jelei attól függenek, hogy mennyi időt töltenek az akceptorok molekuláris közelségében. Az akceptormennyiség fokozódása értelemszerűen növeli ezt az időt, így mind az egyedi donor molekulák BRET értékét, mind a mért BRET értéket fokozza. A donorszám növelése azonban nem befolyásolja egy adott donor molekulának az akceptorok molekuláris közelségében eltöltött időtartamát, így a mért BRET jelet sem. Specifikus interakció esetén a görbék telítési kinetikát mutatnak, és a donor expresszió fokozása a görbe ellapulásához vezet, ami megfelel annak, hogy egy adott akceptormennyiség esetén kevesebb donor alkot párt akceptorral, ha a donorszám magas.

Szimulációval kapott eredményeinket egy indukálható dimerizációs rendszerben validáltuk. Bár a kBRET módszer validálására már számos módszert alkalmaztak (mint például ismertén interakcióba nem lépő illetve interakcióba lépő fehérjéket), tudomásunk szerint a mi kísérleteink az elsők, ahol a módszer használhatóságát egy indukálható dimerizációs rendszerben vizsgálták. E rendszer egyértelmű előnye, hogy a specifikus és nem-specifikus interakciók egyazon fehérjepárral vizsgálhatóak. Kísérleti eredményeink szép egyezést mutattak a szimulációval kapottakkal (20. ábra).

A továbbiakban a fent beállított, módosított kBRET módszerrel vizsgáltuk a rodopszin családba tartozó V<sub>2</sub> vazopresszin és a glutamát receptor családba tartozó CaSR kalcium érzékelő receptor egyéb GPCR-okkal való dimerizációját. Kísérleteink megerősítették a CaSR receptorok már korábban leírt homodimerizációját [120-124], valamint a V<sub>2</sub>R homodimerizációját és heterodimerizációját a V<sub>1a</sub> receptorral [89, 125-

128]. Fontos megjegyezni, hogy a klasszikus kBRET kísérleteink a  $V_2$  receptor hasonló mértékű homodimerizációját, illetve az  $AT_1R$ ,  $\beta_2AdR$  és  $CB_1R$  receptorokkal való heterodimerizációját mutatták, míg a módosított módszerünk igazolta, hogy a heterodimerizáció nem áll fenn e receptorokkal. A klasszikus és módosított kBRET kísérletek eredményei közti különbségek jól mutatják, hogy a klasszikus kBRET kísérletek, a donor expresszió csökkenése miatt könnyen téves következtetésekhez vezethetnek. Eredményeink arra utalnak, hogy a (vizsgált) G-fehérjéhez kapcsolt receptorokra általánosan jellemző a homodimerizáció, illetve megerősítik a dimerizáció specifikus jellegét, hiszen a vizsgált 13 receptor-receptor interakció közül csak három bizonyult valódi dimerizációnak.

A módosított kvantitatív BRET méréseket kidolgozó kísérleteink eredményit összefoglalva elmondható, hogy szimulációs és kísérletes módszerekkel igazoltuk, hogy a klasszikus kBRET mérések téves eredményhez vezethetnek abban az esetben, ha a donorral jelölt receptor expresszióját nem sikerül állandó szinten tartani. Az általunk módosított módszer segítségével azonban változó donor expresszió esetén is elkülöníthetők egymástól a specifikus és nem-specifikus interakciók.

## 7. Következtetések

Ph.D. munkám során különféle GPCR-ok dimerizációjának kimutatásával, és a dimerizáció funkcionális következményeinek vizsgálatával foglalkoztam. A kísérleti eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

- Kvantitatív BRET mérésekkel megerősítettük, hogy az AT<sub>1</sub> angiotenzin receptor homodimereket alkot.
- Létrehoztunk egy olyan BRET alapú bioszenzort, mely segítségével közvetlenül tudtuk detektálni az AT<sub>1</sub> receptor konformációjának megváltozását.
- Igazoltuk, hogy az AT<sub>1</sub>R homodimer egyik alegységének stimulálása a másik alegység csökkent agonista kötési affinitásához, megváltozott konformációjához és  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez vezet
- Eredményeink alapján megállapítható, hogy az AT<sub>1</sub> receptor homodimeren belüli interakciók létrejöttéhez szükséges a stimulált alegység konzervált DRY motívumának épsége.
- Szimulációs illetve kísérletes módszerekkel igazoltuk, hogy a GPCR-ok dimerizációjának vizsgálatában leggyakrabban alkalmazott kvantitatív BRET módszer téves eredményekhez vezethet, amennyiben az energia donorral jelölt receptor expresszióját nem sikerül szigorúan állandó szinten tartani.
- Beállítottunk egy olyan, módosított kvantitatív BRET módszert, mely segítségével pontosabban elkülöníthető a receptorok dimerizációja a nem-specifikus interakcióktól.
- Az általunk beállított módszer segítségével megerősítettük a V<sub>2</sub> vazopresszin és a CaSR kalcium érzékelő receptor homodimerizációját, valamint a V<sub>2</sub> és V<sub>1a</sub> vazopresszin receptor heterodimerizációját. Eredményeink alapján a receptorok dimerizációja specifikus folyamat, hiszen a V<sub>2</sub>R és a CaSR receptorok nem dimerizáltak a vizsgált AT<sub>1</sub>R, AT<sub>2</sub>R,  $\beta_2$ AdR és CB<sub>1</sub>R receptorokkal.

## 8. Összefoglalás

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációja alapvető szerepet játszik a receptorok ligandkötésében, aktív konformációjának kialakításában illetve a receptoroknak a különböző effektor fehérjékkel (heterotrimer G-fehérjék, arresztinek) létrejövő kapcsolatában. A dimerizáció a jelátvitelt befolyásoló hatásai révén fontos élettani, kórélettani szerepet játszhat, valamint a receptor dimerek új farmakológiai célpontokat is jelenthetnek.

Kísérleti munkánk során az AT<sub>1</sub>R homodimerben mint modellrendszerben vizsgáltuk a dimer alegységei között létrejövő interakciók funkcionális következményeit. Igazoltuk, hogy a dimer egyik alegységének aktiválása a másik alegység megváltozott agonista kötési affinitásához, eltérő receptor konformációjához és  $\beta$ -arresztin2 kötéséhez vezet. Eredményink alapján a dimeren belüli interakciók létrejöttéhez szükséges az aktivált receptor alegység konzervált DRY szekvenciájának megléte.

További kísérleteinkben egy olyan, BRET alapú módszert állítottunk be, mely segítségével a klasszikus kvantitatív BRET módszernél nagyobb pontossággal különíthető el a valódi dimerizáció a nem-specifikus interakcióktól. Monte Carlo szimulációk és egy indukálható dimerizációs rendszer segítségével igazoltuk, hogy a klasszikus kBRET módszer fals pozitív eredményekhez vezethet, amennyiben az energia donorral jelölt receptor mennyiségét nem sikerül állandó szinten tartani, illetve hogy változó donormennyiség esetén a BRET jelnek az akceptormennyiség függvényében való ábrázolása előnyösebb a megszokott akceptor/donor arány függvényében való ábrázolásnál. A módosított módszer segítségével igazoltuk a V<sub>2</sub> vazopresszin receptor homodimerizációját, a CaSR kalcium érzékelő receptor homodimerizációját, a V<sub>1a</sub> és V<sub>2</sub> vazopresszin receptorok heterodimerizációját, valamint azt, hogy az általunk vizsgált V<sub>2</sub> és CaSR receptorok nem képeznek heterodimereket az AT<sub>1</sub> és AT<sub>2</sub> angiotenzin, a  $\beta_2$  adrenerg és CB<sub>1</sub> cannabinoid receptorokkal.

## 9. Summary

Dimerization of G Protein-coupled Receptors (GPCRs) plays a fundamental role in the ligand binding and activation of these receptors, and also influences the interactions with different effector proteins (heterotrimeric G-Proteins, arrestins). Dimerization, by modifying the signaling of receptors, is assumed to have important physiological and pathophysiological roles, and selective targeting of GPCR dimers can lead to new pharmacological therapies.

In our experimental work we investigated the functional consequences of intradimeric interactions in the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor homodimer, as a model system. We have shown that activation of one protomer of the dimer leads to different ligand binding affinity, different conformation and  $\beta$ -arrestin2 binding of the other protomer. Our results suggest that these intradimeric interactions require the conserved DRY sequence of the activated receptor.

In an other set of experiments, we developed a new Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) based method, with which we could detect the dimerization of GPCRs more specific than with the current gold standard method, quantitative BRET. We have shown with Monte Carlo simulations and experimentally in an inducible dimerization system that the current quantitative BRET method can lead to false positive results, when the amount of energy donor labeled receptor is not held strictly constant. We also showed that when donor expression is not constant, it is preferable to plot BRET ratio as a function of acceptor expression instead of the currently used acceptor/donor ratio based plotting. With our new method we confirmed the homodimerization of V<sub>2</sub> vasopressin and CaSR calcium sensing receptors, and also the heterodimerization between V<sub>1a</sub> and V<sub>2</sub> vasopressin receptors. We also showed that the investigated V<sub>2</sub> and CaSR receptors do not form heterodimers with AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> angiotensin,  $\beta$ <sub>2</sub> adrenergic and CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Fredriksson R, Schioth HB. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*, 2005. 67(5): 1414-25.
2. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(6): 1256-72.
3. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*, 2006. 1(8): 761-82.
4. Ferre S, Franco R. Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10(1): 1-5.
5. Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(25): 6380-8.
6. Kobilka B, Schertler GF. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. 29(2): 79-83.
7. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007. 450(7168): 383-7.
8. Wu H, Wang C, Gregory KJ, Han GW, Cho HP, Xia Y, Niswender CM, Katritch V, Meiler J, Cherezov V, Conn PJ, Stevens RC. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, 2014. 344(6179): 58-64.
9. Vauquelin G. MB. *G Protein-coupled Receptors*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Anglia, 2007: 77-86.
10. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*, 2011. 36(9): 457-69.
11. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 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*, 2003. 100(19): 10782-7.

12. Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ. Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. 52: 179-97.
13. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*, 2014.
14. Prezeau L, Rives ML, Comps-Agrar L, Maurel D, Kniazeff J, Pin JP. Functional crosstalk between GPCRs: with or without oligomerization. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10(1): 6-13.
15. Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*, 1996. 271(27): 16384-92.
16. Cvejic S, Devi LA. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem*, 1997. 272(43): 26959-64.
17. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 1999. 399(6737): 697-700.
18. Szidonya L, Cserzo M, Hunyady L. Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol*, 2008. 196(3): 435-53.
19. Salim K, Fenton T, Bacha J, Urien-Rodriguez H, Bonnert T, Skynner HA, Watts E, Kerby J, Heald A, Beer M, Mcallister G, Guest PC. Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem*, 2002. 277(18): 15482-5.
20. Marullo S, Bouvier M. Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28(8): 362-5.
21. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): 44925-31.
22. De La Fuente M, Noble DN, Verma S, Nieman MT. Mapping human protease-activated receptor 4 (PAR4) homodimer interface to transmembrane helix 4. *J Biol Chem*, 2012. 287(13): 10414-23.

23. Martinez-Munoz L, Barroso R, Dyrhaug SY, Navarro G, Lucas P, Soriano SF, Vega B, Costas C, Munoz-Fernandez MA, Santiago C, Frade JM, Franco R, Mellado M. CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(19): E1960-9.
24. Mcmillin SM, Heusel M, Liu T, Costanzi S, Wess J. Structural basis of M3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation. *J Biol Chem*, 2011. 286(32): 28584-98.
25. Springael JY, Le Minh PN, Urizar E, Costagliola S, Vassart G, Parmentier M. Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol*, 2006. 69(5): 1652-61.
26. Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G, Costagliola S. Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J*, 2005. 24(11): 1954-64.
27. Drinovec L, Kubale V, Nohr Larsen J, Vrecl M. Mathematical models for quantitative assessment of bioluminescence resonance energy transfer: application to seven transmembrane receptors oligomerization. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. 3: 104.
28. James JR, Oliveira MI, Carmo AM, Iaboni A, Davis SJ. A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods*, 2006. 3(12): 1001-6.
29. Kufareva I, Stephens B, Gilliland CT, Wu B, Fenalti G, Hamel D, Stevens RC, Abagyan R, Handel TM. A novel approach to quantify G-protein-coupled receptor dimerization equilibrium using bioluminescence resonance energy transfer. *Methods Mol Biol*, 2013. 1013: 93-127.
30. Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 2006. 281(37): 27109-16.
31. Fung JJ, Deupi X, Pardo L, Yao XJ, Velez-Ruiz GA, Devree BT, Sunahara RK, Kobilka BK. Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J*, 2009. 28(21): 3315-28.



32. Patowary S, Alvarez-Curto E, Xu TR, Holz JD, Oliver JA, Milligan G, Raicu V. The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochem J*, 2013. 452(2): 303-12.
33. Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, Roux T, Bazin H, Bourrier E, Lamarque L, Breton C, Rives ML, Newman A, Javitch J, Trinquet E, Manning M, Pin JP, Mouillac B, Durroux T. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol*, 2010. 6(8): 587-94.
34. Meyer BH, Segura JM, Martinez KL, Hovius R, George N, Johnsson K, Vogel H. FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): 2138-43.
35. Calebiro D, Rieken F, Wagner J, Sungkaworn T, Zabel U, Borzi A, Cocucci E, Zurn A, Lohse MJ. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(2): 743-8.
36. Kasai RS, Suzuki KG, Prossnitz ER, Koyama-Honda I, Nakada C, Fujiwara TK, Kusumi A. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol*, 2011. 192(3): 463-80.
37. Chen Y, Wei LN, Muller JD. Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(26): 15492-7.
38. Dalal RB, Digman MA, Horwitz AF, Vetri V, Gratton E. Determination of particle number and brightness using a laser scanning confocal microscope operating in the analog mode. *Microsc Res Tech*, 2008. 71(1): 69-81.
39. Golebiewska U, Johnston JM, Devi L, Filizola M, Scarlata S. Differential response to morphine of the oligomeric state of mu-opioid in the presence of delta-opioid receptors. *Biochemistry*, 2011. 50(14): 2829-37.
40. Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Mol Pharmacol*, 2013. 84(4): 630-42.

41. Dorsch S, Klotz KN, Engelhardt S, Lohse MJ, Bunemann M. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods*, 2009. 6(3): 225-30.
42. Gavalas A, Lan TH, Liu Q, Correa IR, Jr., Javitch JA, Lambert NA. Segregation of family A G protein-coupled receptor protomers in the plasma membrane. *Mol Pharmacol*, 2013. 84(3): 346-52.
43. Porrello ER, Pflieger KD, Seeber RM, Qian H, Oro C, Abogadie F, Delbridge LM, Thomas WG. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell Signal*, 2011. 23(11): 1767-76.
44. Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002. 9(4): 789-98.
45. Navarro G, Carriba P, Gandia J, Ciruela F, Casado V, Cortes A, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal*, 2008. 8: 1088-97.
46. Ohashi K, Kiuchi T, Shoji K, Sampei K, Mizuno K. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *Biotechniques*, 2012. 52(1): 45-50.
47. Harikumar KG, Dong M, Cheng Z, Pinon DI, Lybrand TP, Miller LJ. Transmembrane segment peptides can disrupt cholecystokinin receptor oligomerization without affecting receptor function. *Biochemistry*, 2006. 45(49): 14706-16.
48. Hu J, Thor D, Zhou Y, Liu T, Wang Y, Mcmillin SM, Mistry R, Challiss RA, Costanzi S, Wess J. Structural aspects of M(3) muscarinic acetylcholine receptor dimer formation and activation. *FASEB J*, 2012. 26(2): 604-16.
49. Knepp AM, Periole X, Marrink SJ, Sakmar TP, Huber T. Rhodopsin forms a dimer with cytoplasmic helix 8 contacts in native membranes. *Biochemistry*, 2012. 51(9): 1819-21.

50. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000. 289(5480): 739-45.
51. Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010. 330(6007): 1066-71.
52. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 2012. 485(7398): 321-6.
53. Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang XP, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*, 2012. 485(7398): 327-32.
54. Huang J, Chen S, Zhang JJ, Huang XY. Crystal structure of oligomeric beta1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. 20(4): 419-25.
55. Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 2003. 421(6919): 127-8.
56. Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem*, 2003. 278(24): 21655-62.
57. Filizola M, Weinstein H. The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *FEBS J*, 2005. 272(12): 2926-38.
58. Simpson LM, Taddese B, Wall ID, Reynolds CA. Bioinformatics and molecular modelling approaches to GPCR oligomerization. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10(1): 30-7.
59. Milligan G. The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10(1): 23-9.

60. White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, 1998. 396(6712): 679-82.
61. Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem*, 2004. 279(32): 33390-7.
62. Hansen JL, Theilade J, Haunso S, Sheikh SP. Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation. *J Biol Chem*, 2004. 279(23): 24108-15.
63. Abd Alla J, Reeck K, Langer A, Streichert T, Quitterer U. Calreticulin enhances B2 bradykinin receptor maturation and heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 387(1): 186-90.
64. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 1980. 255(15): 7108-17.
65. Ferre S, Casado V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse MJ, Milligan G, Pin JP, Guitart X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev*, 2014. 66(2): 413-34.
66. Springael JY, Urizar E, Costagliola S, Vassart G, Parmentier M. Allosteric properties of G protein-coupled receptor oligomers. *Pharmacol Ther*, 2007. 115(3): 410-8.
67. Chabre M, Deterre P, Antonny B. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. 30(4): 182-7.
68. Harikumar KG, Wootten D, Pinon DI, Koole C, Ball AM, Furness SG, Graham B, Dong M, Christopoulos A, Miller LJ, Sexton PM. Glucagon-like peptide-1 receptor dimerization differentially regulates agonist signaling but does not affect small molecule allostery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(45): 18607-12.
69. Dietis N, Rowbotham DJ, Lambert DG. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Br J Anaesth*, 2011. 107(1): 8-18.

70. Hiller C, Kuhhorn J, Gmeiner P. Class A G-protein-coupled receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. *J Med Chem*, 2013. 56(17): 6542-59.
71. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. 31(3): 124-30.
72. Vilardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol*, 2008. 4(2): 126-31.
73. Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin JP, Baneres JL. Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J*, 2006. 25(24): 5693-702.
74. Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK. Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J Biol Chem*, 2009. 284(39): 26732-41.
75. Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(18): 7682-7.
76. Whorton MR, Jastrzebska B, Park PS, Fotiadis D, Engel A, Palczewski K, Sunahara RK. Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem*, 2008. 283(7): 4387-94.
77. Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol*, 2009. 5(9): 688-95.
78. Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation*, 2003. 108(13): 1611-8.
79. Karip E, Turu G, Supeki K, Szidonya L, Hunyady L. Cross-inhibition of angiotensin AT1 receptors supports the concept of receptor oligomerization. *Neurochem Int*, 2007. 51(5): 261-7.
80. Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'dowd BF, George SR. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique

- pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(2): 654-9.
81. Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, Nobrega JN, Liu F. Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med*, 2010. 16(12): 1393-5.
  82. Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N, Devi LA. AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J*, 2011. 30(12): 2350-63.
  83. Turu G, Varnai P, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L. Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 2009. 284(25): 16914-21.
  84. Abdalla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*, 2000. 407(6800): 94-8.
  85. Abdalla S, Lothar H, El Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 2001. 7(9): 1003-9.
  86. Hansen JL, Hansen JT, Speerschneider T, Lyngso C, Erikstrup N, Burstein ES, Weiner DM, Walther T, Makita N, Iiri T, Merten N, Kostenis E, Sheikh SP. Lack of evidence for AT1R/B2R heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 cells: how common is the AT1R/B2R heterodimer? *J Biol Chem*, 2009. 284(3): 1831-9.
  87. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, 2000. 275(22): 17201-10.
  88. Tsukamoto H, Sinha A, Dewitt M, Farrens DL. Monomeric rhodopsin is the minimal functional unit required for arrestin binding. *J Mol Biol*, 2010. 399(3): 501-11.

89. Terrillon S, Barberis C, Bouvier M. Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(6): 1548-53.
90. Sartania N, Appelbe S, Padiani JD, Milligan G. Agonist occupancy of a single monomeric element is sufficient to cause internalization of the dimeric beta2-adrenoceptor. *Cell Signal*, 2007. 19(9): 1928-38.
91. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM. Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacol Rev*, 2011. 63(4): 1001-19.
92. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J*, 2007. 21(10): 2455-65.
93. Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, Ong E, Lim M, Maillet E, Junek M, Cahill CM, Harkany T, Devi LA. Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal*, 2010. 3(131): ra54.
94. Sun Y, Huang J, Xiang Y, Bastepe M, Juppner H, Kobilka BK, Zhang JJ, Huang XY. Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J*, 2007. 26(1): 53-64.
95. Novi F, Scarselli M, Corsini GU, Maggio R. The paired activation of the two components of the muscarinic M3 receptor dimer is required for induction of ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): 7476-86.
96. Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini GU, Cotecchia S, Maggio R. Paired activation of two components within muscarinic M3 receptor dimers is required for recruitment of beta-arrestin-1 to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2005. 280(20): 19768-76.
97. Rovira X, Pin JP, Giraldo J. The asymmetric/symmetric activation of GPCR dimers as a possible mechanistic rationale for multiple signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. 31(1): 15-21.
98. Khelashvili G, Dorff K, Shan J, Camacho-Artacho M, Skrabanek L, Vroiling B, Bouvier M, Devi LA, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Milligan G, Neubig RR, Palczewski K, Parmentier M, Pin JP, Vriend G, Campagne F, Filizola M.

- GPCR-OKB: the G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base. *Bioinformatics*, 2010. 26(14): 1804-5.
99. Borroto-Escuela DO, Brito I, Romero-Fernandez W, Di Palma M, Oflijan J, Skieterska K, Duchou J, Van Craenenbroeck K, Suarez-Boomgaard D, Rivera A, Guidolin D, Agnati LF, Fuxe K. The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(5): 8570-90.
  100. Rivero-Muller A, Chou YY, Ji I, Lajic S, Hanyaloglu AC, Jonas K, Rahman N, Ji TH, Huhtaniemi I. Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(5): 2319-24.
  101. Szidonya L, Supeki K, Karip E, Turu G, Varnai P, Clark AJ, Hunyady L. AT1 receptor blocker-insensitive mutant AT1A angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73(10): 1582-92.
  102. Balla A, Toth DJ, Soltesz-Katona E, Szakadati G, Erdelyi LS, Varnai P, Hunyady L. Mapping of the localization of type 1 angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *J Biol Chem*, 2012. 287(12): 9090-9.
  103. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 2002. 20(1): 87-90.
  104. Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 2002. 296(5569): 913-6.
  105. Erdelyi LS, Balla A, Patocs A, Toth M, Varnai P, Hunyady L. Altered agonist sensitivity of a mutant v2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Endocrinol*, 2014. 28(5): 634-43.
  106. Toth DJ, Toth JT, Gulyas G, Balla A, Balla T, Hunyady L, Varnai P. Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 9): 2185-97.



107. Gyombolai P, Boros E, Hunyady L, Turu G. Differential beta-arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. 372(1-2): 116-27.
108. Turu G, Szidonya L, Gaborik Z, Buday L, Spat A, Clark AJ, Hunyady L. Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors. *FEBS Lett*, 2006. 580(1): 41-5.
109. Toke J, Czirjak G, Patocs A, Enyedi B, Gergics P, Csakvary V, Enyedi P, Toth M. Neonatal severe hyperparathyroidism associated with a novel de novo heterozygous R551K inactivating mutation and a heterozygous A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007. 67(3): 385-92.
110. Woo J, Von Arnim AG. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Plant Methods*, 2008. 4: 23.
111. Varnai P, Toth B, Toth DJ, Hunyady L, Balla T. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem*, 2007. 282(40): 29678-90.
112. Fallahi-Sichani M, Linderman JJ. Lipid raft-mediated regulation of G-protein coupled receptor signaling by ligands which influence receptor dimerization: a computational study. *PLoS One*, 2009. 4(8): e6604.
113. Woolf PJ, Linderman JJ. Self organization of membrane proteins via dimerization. *Biophys Chem*, 2003. 104(1): 217-27.
114. Abdalla S, Lothar H, Langer A, El Faramawy Y, Quitterer U. Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell*, 2004. 119(3): 343-54.
115. Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M, Spat A, Catt KJ, Hunyady L. The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology*, 2003. 144(6): 2220-8.
116. Vilardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(7): 807-12.

117. Chachisvilis M, Zhang YL, Frangos JA. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(42): 15463-8.
118. Audet M, Bouvier M. Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell*, 2012. 151(1): 14-23.
119. Wilson PC, Lee MH, Appleton KM, El-Shewy HM, Morinelli TA, Peterson YK, Luttrell LM, Jaffa AA. The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist [Sar1,Ile4,Ile8]-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers. *J Biol Chem*, 2013. 288(26): 18872-84.
120. Jensen AA, Hansen JL, Sheikh SP, Brauner-Osborne H. Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur J Biochem*, 2002. 269(20): 5076-87.
121. Jiang Y, Minet E, Zhang Z, Silver PA, Bai M. Modulation of interprotomer relationships is important for activation of dimeric calcium-sensing receptor. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): 14147-56.
122. Khan MA, Conigrave AD. Mechanisms of multimodal sensing by extracellular Ca(2+)-sensing receptors: a domain-based survey of requirements for binding and signalling. *Br J Pharmacol*, 2010. 159(5): 1039-50.
123. Pidasheva S, Grant M, Canaff L, Ercan O, Kumar U, Hendy GN. Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(14): 2200-9.
124. Ray K, Hauschild BC, Steinbach PJ, Goldsmith PK, Hauache O, Spiegel AM. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *J Biol Chem*, 1999. 274(39): 27642-50.
125. Cottet M, Albizu L, Perkovska S, Jean-Alphonse F, Rahmeh R, Orcel H, Mejean C, Granier S, Mendre C, Mouillac B, Durroux T. Past, present and future of vasopressin and oxytocin receptor oligomers, prototypical GPCR models to study dimerization processes. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10(1): 59-66.

126. Granier S, Terrillon S, Pascal R, Demene H, Bouvier M, Guillon G, Mendre C. A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *J Biol Chem*, 2004. 279(49): 50904-14.
127. Loison S, Cottet M, Orcel H, Adihou H, Rahmeh R, Lamarque L, Trinquet E, Kellenberger E, Hibert M, Durroux T, Mouillac B, Bonnet D. Selective fluorescent nonpeptidic antagonists for vasopressin V(2) GPCR: application to ligand screening and oligomerization assays. *J Med Chem*, 2012. 55(20): 8588-602.
128. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(4): 677-91.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Szalai B**, Barkai L, Turu G, Szidonya L, Várnai P, Hunyady L. Allosteric interactions within the AT1 angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 84(4): 477-485

**IF: 4,576**

**Szalai B**, Hoffmann P, Prokop S, Erdélyi L, Várnai P, Hunyady L. Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e109503

**IF: 3,234**

**Szalai B**, Hoffmann P, Prokop S, Erdélyi L, Várnai P, Hunyady L. Correction: Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e156824

### Egyéb közlemény:

Szekeres M, Turu G, Orient A, **Szalai B**, Süpeki K, Cserző M, Várnai P, Hunyady L. Mechanisms of angiotensin II-mediated regulation of aldosterone synthase expression in H295R human adrenocortical and rat adrenal glomerulosa cell. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 302(2): 244-253

**IF: 3,503**

## 12. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Hunyady Lászlónak szeretnék köszönetet mondani, hogy tudományos diákkörös hallgatóként bekapcsolódhattam a laboratóriumában folyó tudományos munkába, majd PhD hallgatóként is munkacsoportjába fogadott. Köszönöm neki, hogy bevezetett a tudományos munka világába, és témavezetőként mindenben támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Szidonya Lászlónak, hogy TDK témavezetőként bevezetett a kísérletes munka rejtelmeibe, és Dr. Várnai Péternek, aki bár hivatalosan csak rövid ideig, hatodéves orvostanhallgató koromban volt TDK témavezetőm, de azóta is folyamatosan figyelemmel kíséri munkámat, és kérdéseimmel bármikor fordulhatok hozzá. Köszönöm Dr. Cserző Miklósnak, hogy az általa tartott kiváló kurzussal felkeltette érdeklődésemet a különféle bioinformatikai módszerek iránt, és azóta is türelemmel válaszolja meg az ilyen irányú kérdéseimet.

Szeretném megköszönni Dr. Spät András professzor úrnak, hogy az Élettani Intézet korábbi igazgatójaként, és Dr. Ligeti Erzsébet professzorasszonynak, hogy a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként támogatták munkámat.

Köszönöm Oláh Ilona, Rácz Judit, Szabolcsi Kata és Schulcz Mártonné Anikó kiváló asszisztensi munkáját, mellyel jelentősen megkönnyítették kísérleti munkámat. Köszönöm TDK hallgatóimnak, Dr. Barkai Lászlónak, Dr. Hoffmann Péternek és Prokop Susanne-nak a kísérletek elvégzésében nyújtott hatalmas segítséget, valamint azt, hogy őket tanítva én is sokat tanulhattam. Köszönöm a Hunyady és a Várnai labor valamennyi munkatársának, külön kiemelve Dr. Erdélyi Lászlót, Dr. Gulyás Gergőt, Dr. Gyombolai Pált, Dr. Tóth Andrást, Dr. Tóth Dánielt, Dr. Tóth Józsefet és Dr. Turu Gábort, a hasznos szakmai konzultációkat, a kellemes labor légkört és a sokszor felejthetetlen közös konferenciákat. Köszönettel tartozom az Élettani Intézet minden munkatársának azért a barátságos légkörért, amely jelentősen megkönnyítette a kutatói munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, akik biológia tanárként és fizikusként már kisgyermekként a tudományok világa felé irányították érdeklődésemet, valamint egész családomnak és barátaimnak a töretlen támogatást, és köszönöm Titanillának, hogy mindennek igazán értelmet adott.