

A CB₁ és a CB₂ kannabinoid receptorok működésének vizsgálata

Doktori tézisek

Soltész-Katona Eszter

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hunyady László, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Sántha Péter, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Liliom Károly, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, DsC, professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Makara Judit, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens

Budapest, 2022.

Bevezetés

Az endokannabinoid rendszer számos fiziológiai folyamatban vesz részt: sejt szinten szabályozza a sejtek szaporodását, differenciálódását, a sejtek túlélését és az apoptózist különböző szövetekben, például zsírszövetben, hámsejtben, csontban, vérben, nemi mirigyekben, valamint az agyban. Az endokannabinoidok szintetizálódnak a központi idegrendszerben, és szabályozzák a fájdalomérzékelést, a motoros funkciókat, a tanulást, az emlékezetet, a termogenezist, a alvási ciklusokat, a szinaptikus plaszticitást, az érzelmi viselkedést, a stresszreakciót, az étvágyat, a reprodukív funkciókat és a szexuális viselkedést. Az agy mellett az endokannabinoidok szintetizálódhatnak és működhetnek a perifériás szövetekben is szinte mindenhol a szervezetben.

A két legismertebb kannabinoid receptor a CB₁R és CB₂R is fontos terápiás célpont. A CB₁ receptor már több mint 30 éve kutatott farmakológiai szempontból is, és már számos szintetikus liganduma létezik.

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

A keringési rendszer szempontjából 1995-ben mutatták ki először, hogy *in vitro* (nyúl agyi artériákon) a kannabinoidok vazorelaxációt okoznak. Azóta számos tanulmányban látjuk, hogy ha kannabinoidokat vagy endokannabinoidokat használnak izolált artériákon, akkor ezek az anyagok az érellenállás változását eredményezik. A legtöbb esetben vazorelaxáció az eredmény, bár vazokonstriktor válaszok is megfigyelhetők. A kannabinoidok

modulálják a vazóaktív vegyületek, köztük az acetilkolin, a metoxamin, az angiotenzin II és az U46619 (tromboxán agonista) hatását is. A jelenség magyarázataként számos hatásmechanizmust javasoltak, ideértve a receptor aktiválását, a káliumcsatorna aktiválását, a kalciumcsatorna gátlását és a vazóaktív mediátorok, például a kalcitonin génnel rokon peptid, a prosztanoidok, az NO, az endotheliális eredetű hiperpolarizáló faktor és a hidrogén-peroxid termelését. Az endokannabinoidok gyakran megfigyelt vazorelaxáns hatásáért részben a CB₁R aktiválása közvetíti. Az irodalom nem egységes a kannabinoidok vasorelaxáns hatásában, de lehetséges, hogy a kannabinoid agonisták funkcionális szelektivitást fejezhetnek ki a CB₁R-okon, oly módon, hogy egyesek hatékonyabban indítják el a relaxációhoz vezető mechanizmusokat - például a Ca²⁺-csatorna gátlása és a káliumcsatorna-aktiváció révén -, mint mások. Egyes kannabinoidok vaszkuláris hatásait metabolikus termékeik közvetítik.

A CNR2 génnel eddig viszonylag kevesen foglalkoztak, annak ellenére, hogy a CB₂R jelentősége, és a CB₂R polimorfizmusainak jelentősége is több pszichiátriai kórképben felmerült. A CB₂R cDNS 188-189 pozíciójában azonosított missense polimorfizmusában dinukleotid megfordulás történt AAGG területen (rs2501432), és ez a változás a fehérjében glutamin-arginin aminosav cserét eredményez a 63. aminosav pozícióban (Q63R). Az aminosav csere következménye, hogy egy töltetlen aminosavval pozitív töltésűvé válik, amely hatással lehet az első intracelluláris citoplazmatikus hurok struktúrájára, különböző módon befolyásolva ezzel a CB₂R immunmoduláló funkcióját. Egyes kutatások beszámolnak a CB₂R-Q63R receptorok szerepéről a depresszióban, az alkoholizmusban valamint skizofréniában is. Ezen túl néhány a perifériás betegséggel is összefüggésbe hozták, mint például a myasthenia

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

Célkitűzések

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

Vizsgálataim első felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

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

Vizsgálataim második felében a kérdéseink az alábbiak voltak:

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

Módszerek

Sejtkultúra és transzfecció - HEK 293T sejtvoval

HEK 293T sejtvoalat 100 IU/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomocinnel és 10% fõtális borjúsérummal kiegészített DMEM médiumban tartottuk fent 37 °C-on 5% CO₂-tartalom mellett. A BRET kísérletekhez a sejteket szuszpenzióban transzfeccióltuk OptiMEM médiumban Lipofectamine 2000. A koprecipitációs kísérletekhez szintén szuszpenzióban transzfeccióltunk Ca-foszfát precipitáció módszerével.

Primer aorta simaizom sejtek

Hím Wistar patkányokból pentobarbithallal történő anesztézia után kivettük az aortát. Miután Ca²⁺ tartalmú jéghideg Krebs médiumban (119 mM NaCl, 4,7 KCl mM, 2,5 CaCl₂ mM · 2H₂O, 1,17 mM MgSO₄ · 7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄ mM, 0,027 mM EDTA, 10,5 mM glükóz) megmostuk, vékony hegyű csipesszel eltávolítottuk a zsíros kötöszövetet. Darabolás után kollagenázzal emésztettük, a továbbiakban 37 °C-os CO₂ termosztátban tartottuk.

Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

A BRET mérésekhez Varioskan Flash Multimode Reader típusú készüléket használtunk, 480 nm-es (Rluc) és 530 nm-es (mVenus) hullámhosszú szűrökkel. A mérések elején sejt-permeábilis cöleterazin *h* szubsztátot adtunk a sejtekhez 5 µM végső koncentrációban. A BRET-hányadost az 530/485 nm hullámhosszokon mért fényintenzitások hányadosaként határoztuk meg. A BRET-eredmények legalább három független kísérlet átlagából kerültek meghatározásra. A BRET görbék elkészítéséhez

először az ingerelt sejteken mért BRET-hányadosokból kivontuk a nem ingerelt, kontroll sejteken mért értékeket, majd ezen eredményből kivontuk az ingerlés előtti értékek átlagát. Ezáltal a görbéken az ingerlésre kapott BRET-jel változásokat a csupán vivőanyagot kapott sejtek eredményeire normalizáltan, a stimulálást megelőző BRET-jelhez képesti különbségként ábrázoltuk.

Konfokális mikroszkópia és képanalízis

A CB₂R-ok lokalizációjának meghatározásához L10-el jelölt Cerulean-t használtunk plazmamembrán markerként és YFP-vel jelölt CB₂R izoformákat transzfektáltuk Ca-foszfát precipitáció módszerével. A kísérlet elején a sejteket JWH-133-al (10 µM) kezeltük 1 órán át. Ezután 3x mostuk a sejteket hideg PBS-el, majd fixáltuk 4% Pfa-val jégen 15 percig. Konfokális mikroszkópos képeket Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettünk. A sejteket cellpose neurális hálózaton alapuló algoritlussal detektáltuk és a sejt kontúrt folyamatosan csökkentve a sejt belseje felé meghatároztuk a fluoreszcenciát egyre csökkenő körvonalak mentén.

Precipitációs mérések - BirA biotin ligáz alkalmazása

HEK-293T sejtekbe a CB₂R-BirA fúziós fehérjét kifejező plazmiddal transzfektáltuk. Másnap a sejtek médiumát 100 µM biotin koncentrációjú komplett DMEM-re cseréltük, és ezzel egy időben a sejtek egyik felét 1 µM szelektív CB₂R agonista JWH-133-mal, a másik felét a vivőanyaggal kezeltük. A sejtek lizátumának felülúszóját NeutrAvidinnel fedett agaróz gyöngyökkel egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk folyamatos forgatás mellett. Másnap mosás után a fehérjék eluálásához 100 µM biotin koncentrációjú, redukáló 1x

mintapufferben főztük a gyöngyöket 95 °C-on, 15 percig. A hőkezelés után a mintákat 12000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszó oldatokat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Glo szenzor próba

HEK-293T sejteket transzfektáltunk 6 lyukú lemezeken jelöletlen CB2R plazmidokkal és GloSensor™-al, Opti-MEM® mediumban Lipofectamine 2000™ reagenssel. 6 óra múlva a sejtek médiumát lecseréltük friss DMEM-re. Másnap lecseréltük a médiumot szintelen HBSS pufferra, ami 1 mM luciferint és 0,1% BSA-t tartalmazott. Ebben az oldatban szobahőmérsékleten, két órán át, sötétben tartva töltöttük fel a sejteket luciferinnel. Ezután megmértük a biolumineszcenciát VarioSkan Flash készülékkel. A mérés során JWK-133 és 2-AG agonistákkal stimuláltuk a sejteket növekvő koncentrációban. A cAMP jelet az endogén β_2 -adrenerg receptorokat ingerelve váltottuk ki. Az ISO-indukált cAMP-termelés gátlásának elemzéséhez összehasonlítottuk a biolumineszcenciákat 7 perccel az ISO hozzáadása után.

Western blot

A kísérletek során alkalmazott antitestek: GRK 2, GRK 3, β -arresztin2. A biotinizáció mértékét minden kísérletben az egyes mintákban Alexa670-el konjugált sztreptavidin festéssel tettük láthatóvá, Azure 700 fluoreszcencia tartományban előhívva a membránt.

Az izolált aorta simaizomsejteken: Az CB₁R-gátló O2050-el 10 percig előkezelt VSMC-eket Ang II-vel stimuláltuk 5 percig 6-lyukú lemezeken. Az

kinyert fehérjéket PVDF membránokra vittük át, és ERK, foszfo-ERK antitestekkel festettük másnap reggelig. A vizualizációt ECL reagenssel indítottuk el. Az előhívott filmeket beszkeneltük és ImageJ szoftverrel elemeztük.

Immunfestés és fluoreszcencia mikroszkópia

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

Kalcium-jel mérése

A VSMC-eket ($1,5 \times 10^5$ sejt/well) Fura2/AM fluoreszcens festékkel töltöttük sötétben szobahőmérsékleten: a sejtekhez módosított Krebs oldatot adtunk (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,7 mM MgSO₄, 10 mM glukóz, 10 mM Na-Hepes; pH 7,4), amit a BRET méréseknél is használtunk, és kiegészítettük 200 µM szulfipirazonnal. A mérés előtt a sejteket 10 percig kezeltük CB₁R gátlóval vagy MAGL gátlóval. A mérés során stimuláltuk a sejteket AngII-vel. Inverter mikroszkópot használtunk, ami 40x-es immerziós

olajos objektívvel és Cascade II kamerával volt felszerelve. A gerjesztési hullámhosszt egy xenon lámpához csatlakoztatott monokromator állította be. 5 másodpercenként készítettünk egy képet. A fluoreszcencia méréséhez a háttérből kivont felvételekből 340/380 nm arányszámot számítottak ki. Az adatok elemzéséhez MetaFluor szoftvert használtunk.

Miográfia

Patkányok mellkasi aortáit és az egérek hasi aortáit eltávolítottuk, és hideg Krebs-oldatba helyeztük (119 mM NaCl, 4,7 KCl mM, 2,5 CaCl₂ mM · 2H₂O, 1,17 mM MgSO₄ · 7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄ mM, 0,027 mM EDTA, 10,5 mM glükóz). Aorta gyűrűket (3-4 mm) többkamrás izometrikus miográf rendszerre helyeztük fel. A miográfok szervfürdőiben Krebs-oldattal (37 ° C, 5% CO₂ és 95% O₂, pH 7,4) végeztük az egész kísérletet. Az érgyűrűket 30 percig ekvilibráltattuk, és pihentettük, közben folyamatosan módosítva a feszítést. Amikor elérték az 5 mN előfeszítési erőt referencia összehúzódásokat váltottunk ki hiperkalémiás (124 mM) oldattal. Farmakológiai agonistákat vagy kumulatív koncentrációban adtuk a kádakba, vagy egyetlen adagban, szubmaximális koncentrációban adtuk. Az inhibitorokat 10 perccel az agonisták előtt alkalmaztuk. Az értágító agonistákkal történő kezelés előtt az ereket előfeszítettük Phe hozzáadásával. Az endotélium épségét Ach-al teszteltük, amely minden szegmenst 90–100% -kal ellazított. Az adatokat a KCl oldattal elvégzett referencia összehúzódásra normalizáltuk.

Nyomás-videó arteriográfia

A gracilis és a koronária erek vizsgálatához kis méretüknél fogva (gracilis kb. 120 μm) nyomás arteriográf rendszert használtunk. A kis ereket

izolálás után hideg Krebs-oldatba helyezük. A koronária erek esetében érzéstelenítés alatt a patkányok mellkasát kinyitottuk és a szívet tettük a Krebs-oldatba, majd izoláltuk a bal elülső leszálló koszorúérből elágazó arteriolát. Minden állatból egy szegmenst preparáltunk és mértünk. Az ér szakaszt mikrokanülökkel mindkét végén kanulálva Krebs-oldattal töltött nyomás-mikroarteriográfia kamra szövetfürdőjébe tettük. A kísérlet elején az ereket 30-60 percig hagytuk egyensúlyba kerülni 50 Hgmm intraluminális nyomással. A kanulált ereket video-mikroszkóppal tettük láthatóvá, és a belső átmérőt fotózás után mértük.

Statisztikai analízis

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

Eredmények

CB₁R vizsgálatok primer simaizom sejteken:

Eredményeink szerint AngII stimuláció hatására létrejön a szomszédos sejtekben a CB₁R jelátvitel, a BRET jel csökkenéséből arra következtetünk, hogy a G-fehérje alegységek eltávolodnak egymástól. Ez az aktiváció megakadályozható volt AM251 CB₁R antagonistá előkezeléssel. Amikor a primer simaizom sejteket használtuk és az endogén AT₁R stimuláltuk, akkor is létrejött a parakrin transzaktiváció AngII hatására.

Az AngII stimuláció a primer simaizomsejtekben a citoplazmatikus kalciumszint meredek emelkedését idézte elő, amit egy lassabb lengés követett. A CB₁R -ok O2050 általi gátlása megnövelte az AngII-indukált kalcium jel fenntartott fázisát. A MAG-lipáz gátló használata, mely fenntartja a 2-AG szintet a sejtekben, megrövidített a kalcium jelet, így a méréseknél egy gyorsabb lecsengést tapasztaltunk.

A CB₁R antagonistá hatása a AT₁R ingerlésével kiváltott ér összehúzóásra izolált ér gyűrűkön:

Az AngII minden esetben érszűkítő hatású volt, ami egér aortákon leellenőrizve AT₁R-függőnek bizonyult. Az O2050 előkezelés szignifikánsan növelte az AngII hatásra létrejövő érszűkületeket patkány és egér gracilis arteriolákon aortákat vizsgálva és patkány koronária arteriolákon végzett kísérletekben is. Vizsgálatunkban CB₁R KO egereken is megnéztük az AngII és O2050 hatását, és azt tapasztaltuk, hogy a CB₁R KO egerek aortájában növekedett az AngII kiváltotta érszűkület, az O2050-nek már nyilvánvalóan nem volt hatása CB₁R hiányában. A THL, jól ismert DAG lipáz gátlószerrel történő előkezelés szignifikánsan nagyobb ér összehúzóást okozott AngII

stimulus hatására. A JZL184 a MAG lipáz irreverzibilis szelektív gátlószere - mely jelentősen gátolja az endokannabinoid 2-AG lebomlást anélkül, hogy az anandamid mennyiségét befolyásolná - szignifikánsan csökkentette az AngII által kiváltott vazokonstriktiót. Az izolált simaizomsejtekből 2-AG mérést is végeztünk, hogy lássuk AngII stimulus hatására valóban felszabadul ez az endokannabinoid a sejtekből. A THL előkezelés csökkentette a 2-AG keletkezését, míg a JZL184 növelte mind a bazális mind az AngII kezelésre létrejövő 2-AG szintet.

A CB₂R és polimorfizmusainak vizsgálata - kapcsolata a β -arresztin2-vel és a GRK fehérjékkel:

A három receptor (VT, Q63R, L133I) agonista stimulációja a Venus-al jelölt β -arresztin2 plazmamembrán transzlokációját eredményezte, lefűződött intracelluláris vezikulákban nem láttunk β -arresztin2-t. Vizuálisan nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a receptor altípusok között, így a β -arresztin2 kötődés mértékének számszerűsítése érdekében valós idejű biolumineszcencia rezonancia energia transzfer (BRET) méréseket hajtottunk végre. Mindkét agonista (JWH-133, 2-AG) esetén azt tapasztaltuk, hogy a Q63R mutáns megnövekedett β -arresztin2-kötésre képes, mely különbség a nagyobb koncentrációknál jobban érvényesül. Továbbá a vad típusú receptorhoz képest csökkent β -arresztin2-kötést mértünk az L133I receptor esetében mindkét agonista használatát követően. A BRET kísérletek eredményeihez hasonlóan BirA közelségi-jelölés módszerével végzett kísérletekben a Q63R-CB₂R-BirA stimuláció emelkedett, az L133I-CB₂R-BirA stimuláció pedig a β -arresztin2-Venus jel csökkenéséhez vezetett a vad típusú receptorokhoz képest.

A GFKR-okhoz való β -arresztin2 kötődését a GRK-ok szabályozzák. Annak tesztelésére, hogy a CB₂R mutációi befolyásolják-e a GRK kötést, közelségi biotin-jelölő kísérleteket hajtottunk végre. A receptorok stimulálása után az endogén, biotinilált GRK2 és GRK3 fehérjéket, valamint a β -arresztin2-t lehúztuk és Western-blot segítségével detektáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a receptorok JWH-133-mal történő stimulálására endogén β -arresztin2-t kötnek, mely anti- β -arresztin2 antitesttel kimutatható volt. Az endogén GRK2 és GRK3 mintákban a fehérjék szintén feldúsultak JWH-133 hatására, mutatva a fehérjék kölcsönhatását az aktivált receptorral. A stimulációnak csak a GRK2 esetében volt szignifikáns a hatása. Mindkét vizsgált GRK fehérje kötésére a CB₂R mutációinak is szignifikáns hatása volt, a Q63R erősebben kötődött a GRK2 és GRK3 fehérjékhez mint a többi CB₂ receptor.

A CB₂ receptor és polimorfizmusainak G-fehérje kötés vizsgálata, és cAMP jelgátlásának mérése:

BRET mérésekben az alap aktivitást az inverz AM630 agonistával végzett kezeléssel határoztuk meg, és JWH-133-at vagy 2-arachidonoil-glicerint (2-AG) alkalmaztunk agonistaként. Nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típushoz képest a mutáns receptorok agonista által kiváltott koncentráció-válasz görbéi között. Azonban a Q63R mutáns bazális aktivitása alacsonyabb volt a vad típusú és az L133I mutat CB₂R-okhoz képest.

A CB₂R mutánsok endogén expresszált G-fehérjékkel történő aktivitásának teszteléséhez Glo szenzort használtunk. A cAMP jelet a sejtekben az endogén expresszált β 2-adrenerg receptorok izoproterenollal történő stimulálásával hoztuk létre, ezzel egyidejűleg aktiváltuk G_{i/o}-aktiváló

CB₂R-okat. A korábbi eredményekhez hasonlóan nem észleltünk különbséget a vad típusú és a mutáns CB₂ receptorok között. Ebből arra következtettünk, hogy a Q63R és L133I mutációknak nincs szignifikáns hatása a CB₂R G-fehérje aktivitásra.

A CB₂ receptor és polimorfizmusainak intracelluláris eloszlása:

A mutáns receptorok intracelluláris eloszlásának vizsgálatához sárga fluoreszcens fehérje (YFP)-jelölt CB₂R-eket expresszáltunk HEK 293T sejtekben. Konfokális mikroszkópos felvételek készítése után a sejteket cellpose algoritmussal azonosítottuk. Elemeztük a teljes fluoreszcenciát és a sejtek széléhez viszonyított receptor fluoreszcenciák intenzitásának eloszlását. Azt tapasztaltuk, hogy receptorok hasonló expresszióval és sejten belüli eloszlással rendelkeztek, erősebb intenzitás-csúcsokat mértünk a sejtek széle közelében. A sejtekben található receptorok hasonló membrán expressziója arra utal, hogy a β -arresztin2 kötődésében észlelt különbségeket nem a megváltozott intracelluláris eloszlás okozza. Amikor a sejteket 1 órán át JWH-133-mal stimuláltuk, az eloszlási profil jelentősen megváltozott: mind a vad típusú, mind a Q63R mutáns receptorok alacsonyabb fluoreszcenciával láthatóak a sejtmembránban és magasabb fluoreszcenciával a citoplazmában. Az L133I mutáció esetében azonban az eloszlás változása nem volt szignifikáns.

A CB₂ receptor és polimorfizmusainak hatása a receptor internalizációra:

BRET mérésekkel megállapítottuk, hogy a stimuláció hatására a receptorok eltávolodnak a plazmamembránról. Az internalizációs mintázat megfeleltethető a mutáns receptorokkal megfigyelt β -arresztin2 kötődési

mintázatoknak. Vagyis a CB₂R-Q63R, amely erősebben kapcsolódik a β-arresztin2-hez, szintén kissé fokozta a membránból való lefűződését és ezzel együtt a receptor megjelenését a Rab5 és Rab7 fehérjékkel jelezhető endoszómákban. A CB₂R-L133I, amely gyengébben kapcsolódik a β-arresztin2-hez, lassabb internalizációt mutatott és lassabban jelent meg mind a négy típusú endoszómában. Mivel a hosszan tartó stimuláció után a mutáns receptorok egyértelműen intracelluláris eloszlását mutatnak, ezért megvizsgáltuk a G-fehérje aktivitását 2 órán át tartó JWH-133-mal történő kezelés után. Ehhez G₁₁ BRET szenzorral végeztünk kísérletet β-arresztin2-t is expresszáltatva a HEK 293T sejtekben. Ebben a beállításban az L133I mutáns fokozott G-fehérje választ adott, míg a Q63R kisebb aktivációt mutatott a vad típusú receptorhoz képest. Ez az eredmény korrelál a mutáns receptorok internalizációjában és a sejten belüli eloszlásban megfigyelt különbségekkel.

A CB₂ receptorok szerkezeti változásai:

Molekuláris dinamikai szimulációkban a CB₂R-Q63R esetében nem tapasztaltunk jelentős szerkezeti átrendeződést, bár az arginin sztérikusan nagyobb a glutaminhoz képest, és jelenléte növeli a receptor citoplazmatikus oldalán a pozitív töltések számát. A 133-as pozícióban lévő izoleucin a harmadik spirál külső oldalán helyezkedik el, és γ2 -szénatomjának helyzete a második intracelluláris hurkot kicsit elmozdítja a citoplazma felé.

Következtetések

Az endokannabinoid receptorok jelátvitelének vizsgálatakor aortából izolált simaizom sejteken BRET mérésekkel kimutattuk, hogy az endogén Gq kapcsolt AT_1R ingerlése parakrin módon aktiválja a CB_1 receptorokat. Ennek a transzaktivációnak a jelét láttuk a kalcium méréseknél is, amikor az O2050 CB_1R antagonistája növelte az AngII kiváltotta kalcium-jel fenntartott fázisát, és a JZL184 MAGL gátlószer jelenlétében a kalcium-jel gyorsabban csökkent.

Rágcsáló arteriolákon, és aortákon is megmutattuk, hogy CB_1R függő módon az O2050 alkalmazása növeli az AngII kiváltotta ér összehúzódást. Az endokannabinoid rendszer más pontjait gátolva is ezzel szinkronban lévő megfigyeléseket kaptunk a miográfus kísérletekben. A DAGL gátló alkalmazása növelte az AngII kiváltotta ér összehúzódást, míg a MAGL gátló használata csökkentette azt.

Megállapítottuk, hogy a két CB_2R misszensz mutáció, a Q63R és az L133I befolyásolja a receptor β -arresztin2 kötési képességét. A CB_2R -Q63R esetben erősebb β -arresztin2 kötést mértünk, míg a CB_2R -L133I esetben gyengébbet. A β -arresztin2 kötéssel korrelált a receptorok GRK kötése is. A G-fehérje kötésben csak az 2 órán át tartó JWH-133 ingerlésnél találtunk különbséget.

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

A receptorok szerkezetének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a

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

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Szekeres M, Nádasy GyL, Turu G, **Soltész-Katona E**, Tóth ZSE, Balla A, Catt KJ, Hunyady L (2012)

Angiotensin II induces vascular endocannabinoid release, which attenuates its vasoconstrictor effect via CB1 cannabinoid receptors

J Biol Chem 7;287(37):31540-50. IF: 4,651

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

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

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

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

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

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

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

Biased coupling to β -arrestin of two common variants of the CB₂ cannabinoid receptor

Front Endocrinol DOI: 10.3389/fendo.2021.714561 IF: 5,555

(*megosztott elsőszerezős közlemény)