

Abstrakt

β -Arrestin se řadí do rodiny proteinů, které mají velký vliv nejen na signalizaci GPCR, ale jeho role je i u membránových kanálů, dále má své vlastní signální kaskády nebo jako tzv. "scaffold" protein atd. V této práci jsme si dali za cíl studovat roli β -arrestinu na chování MOR v plazmatické membráně, signalizaci MOR a vliv na funkci AC. Jeho roli jsme zkoumali za pomoci siRNA metody, díky které se sníží exprese obou izoform β -arrestinu. Dále jsme se zaměřili na zkoumání role β -arrestinu2 v komunikaci mezi MOR a TRPV1 kanálem, kdy tyto dva receptory jsou důležitou součástí přenosu bolesti. K tomuto účelu jsme použili buňky HEK293 stabilně exprimující MOR-YFP nebo transientně transfektované TRPV1-CFP.

Zjistili jsme, že obě izoformy β -arrestinu mají vliv na laterální mobilitu MOR v plazmatické membráně a umlčení jedné nebo druhé izoformy β -arrestinu zabrání změně difúze MOR v plazmatické membráně vyvolané agonisty MOR. Zajímavé je, že umlčení β -arrestinu1 snižuje internalizaci MOR vyvolanou endogenním agonistou endomorfinem-2. Na druhou stranu umlčení β -arrestinu2 nemělo téměř žádný efekt na internalizaci MOR vyvolanou endomorfinem-2. Obě izoformy navíc vykazují odlišný vliv na inhibici AC vyvolanou agonisty MOR. Aktivita AC indukovaná forskolinem byla zvýšena v buňkách s nedostatkem β -arrestinu2 a potlačena umlčením β -arrestinu1. Kromě toho jsme pozorovali důležitou roli $G_{\alpha s}$ v produkci cAMP vyvolané forskolinem v buňkách, kterým chybí obě formy β -arrestinu. Poprvé jsme prokázali možnou interakci β -arrestinu1 s AC aktivovanou isoprenalinem.

V další části našeho zkoumání jsme se zaměřili na úlohu β -arrestinu2 v komunikaci mezi MOR-TRPV1. Pozorovali jsme, že knockdown β -arrestinu2 anuluje účinek agonistů MOR nebo TRPV1 na vyvolání změn laterální pohyblivosti jednoho nebo druhého receptoru. Kromě toho byla hladina β -arrestinu2 v plazmatické membráně snížena po aktivaci MOR nebo TRPV1 v buňkách exprimujících oba receptory. β -Arrestin2 hraje důležitou roli v MOR indukované fosforylaci ERK1/2 v buňkách exprimujících TRPV1.

V poslední části naší studie jsme se zabývali možnou spoluprací mezi TRPV1 a TLR4 v plazmatické membráně a pozorovali jsme potenciální vzájemné ovlivňování mezi TLR4 a TRPV1 po aktivaci TRPV1.

Celkově naše studie poukazuje na rozdíly mezi izoformami β -arrestinu v signalizaci MOR a modulaci aktivity AC a také že β -arrestin2 je důležitým mediátorem v komunikaci mezi MOR a TRPV1.

Klíčová slova: β -arrestin, μ -opioidní receptor, TRPV1 receptor, TLR4 receptor, signalizace, adenylát cykláza, laterální pohyblivost receptoru