

Ph.D. tézis összefoglaló

**CB<sub>2</sub> CANNABINOID ÉS  $\mu$ -OPIOID RECEPTOROK  
KÖLCSÖNHATÁSA KÜLÖNBÖZŐ AGYI  
RÉGIÓKBAN**

PÁLDY ESZTER



Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők:  
Prof. Dr. Borsodi Anna, Dr. Benyhe Sándor

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ  
Biokémia Intézet, Opioid receptor kutató csoport

SZEGED

2008

## BEVEZETÉS

A máknövény opiát hatóanyagai és az indiai kenderből származó kannabinoidok sok más növényi eredetű szedatívum, narkotikum, euforikum, hallucinogén és stimuláns mellett már évezredek óta ismert és használt élvezeti szerek. Hatásaikat specifikus receptorokon keresztül fejtik ki ( $\mu$ -,  $\delta$ - és  $\kappa$ -opioid valamint  $CB_1$  és  $CB_2$  kannabinoid), amelyek a G-protein kapcsolt receptor nagycsaládba sorolhatók. Ezen receptorok hét transzmembrán régióval rendelkező membránfehérjék (7TM-GPCR) melyek közös sajátossága, hogy a hatóanyag kötő egység (a receptor) és az effektor egység közötti funkcionális kapcsolatot a heterotrimer G-fehérje teremti meg. Köztudott tény, hogy az opioid receptorok az endogén és exogén ligandumaikkal együtt kulcsfontosságú szerepet töltenek be a fájdalomérzet sejt- és molekuláris szintű szabályozásában. Az utóbbi években számos tudományos publikáció jelent meg a kannabinoidok lehetséges fájdalomcsillapító hatásairól is. Új kísérletes módszereknek és a különböző receptor- vagy enzimhiányos „knockout” állatorzsek létrehozásának köszönhetően ma már jelentős mennyiségű információ áll rendelkezésünkre a fájdalomérzet valamint a tolerancia és a dependencia molekuláris mechanizmusaival kapcsolatban.

### *CB<sub>2</sub> kannabinoid receptorok*

Az első tanulmányok a kannabinoid receptorok felfedezését követően ( $CB_1$ , 1990;  $CB_2$ , 1993) megállapították, hogy az ún.

„neuronális”  $CB_1$  kannabinoid receptorok elsősorban az idegrendszerben vannak jelen, ezzel ellentétben a „perifériás”  $CB_2$  kannabinoid receptorok szinte kizárólag az immunrendszer sejtjeiben fordulnak elő. Az utóbbi években azonban több olyan publikáció látott napvilágot melyben neuronális lokalizációjú  $CB_2$  receptorokat írtak le a központi idegrendszerben. Az érintett területek jelentős részében - mint például az előagyú kéreg, a thalamikus magvak, a periaqueductális szürkeállomány és egyéb agytörzsi régiók -  $\mu$ -opioid receptorok is nagy számban fordulnak elő. A  $CB_1$  kannabinoid és a  $\mu$ -opioid receptorok kolokalizációját és dimerizációját számos tudományos közlemény támasztja alá, azonban a  $CB_2$  receptorok neuronális szerepéről és más rendszerekkel (mint például az opioid) való kölcsönhatásairól még keveset tudunk.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki a  $CB_2$  kannabinoid és a  $\mu$ -opioid receptor közötti lehetséges kölcsönhatások feltárását az agy különböző régióiban. Vizsgálatainkat az alábbi pontok alapján terveztük:

1. Vad típusú valamint  $CB_1$  receptor hiányos egerek egyszeri intraperitoneális (i.p.) kezelése endogén kannabisz agonistával (noladin éter, NE) önmagában, valamint  $CB_2$  receptor specifikus antagonistával (SR144528) együtt adva.

2. Ezen *in vivo* kezeléseket követően a  $\mu$ -opioid receptorok mRNA expressziójának vizsgálata Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR) technikával mind a vad típusú mind pedig a CB<sub>1</sub> „knockout” egerek előagyí és agytörzsi régióiban.

3. Funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési tesztekkel a  $\mu$ -opioid receptorok G-fehérje aktivációjának meghatározása az *in vivo* kezeléseket követően a vad típusú és a CB<sub>1</sub> „knockout” egerek előagyában és agytörzsében.

4.  $\mu$ -Opioid receptor specifikus radioligandummal ([<sup>3</sup>H]DAMGO) és kompetitív leszorítási kísérletek alkalmazásával az a NE és az SR144528 kannabinoidoknak a  $\mu$ -opioid receptorhoz való affinitásainak vizsgálata vad típusú és CB<sub>1</sub> receptor hiányos egér előagyban és agytörzsben.

5. NE és SR144528 kannabinoidok *in vitro* alkalmazását követően a  $\mu$ -opioid receptorok G-fehérje aktivációjának meghatározása funkcionális [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési tesztekkel előagyban és agytörzsben CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> „knockout” egereken.

## MÓDSZEREK

### *Állatok és kezelések*

A vad típusú és a CB<sub>1</sub> kannabisz receptor hiányos egereket (forrás: Dr. K. Ledent, Brussels, Belgium) a Humán Morfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetben, SOTE, Budapest egyszeri alkalommal, intraperitoneálisan (i.p.) endogén kannabisz agonistával (noladin ether, NE) (1mg/kg) kezeltük. A kombinált kezelés esetében CB<sub>2</sub> (SR144528) kannabisz receptor antagonistát (0.1mg/kg) injektáltunk 30 perccel a noladin ether kezelés előtt. A kezeléseket követően az egerek agyát kipreparáluk és három részre osztottuk (előagy, kisagy és agytörzs). A CB<sub>2</sub> „knockout” egéragyak Dr. A. Zimmer laboratóriumából származnak (Bonn, Németország).

### *Quantitative Real-Time PCR vizsgálatok*

Kezeletlen vad típusú és CB<sub>2</sub> knockout, kezelt vad típusú illetve kezelt CB<sub>1</sub> knockout egerek előagyából és agytörzséből RNS-t preparáltunk. Az RNS mintát Revertaid H-Minus Kit segítségével cDNE-é irtuk át. Az így nyert cDNS-ben kvantitatív real-time PCR-el vizsgáltuk a  $\mu$ -opioid receptorok expressziós szintjét. Az expressziós rátákat Pfaffl szerint elemeztük. A statisztikai analízist GraphPad InStat 3.06 software programmal végeztük.

### *Radioligand-receptor kötési vizsgálatok*

Radioligand kötési kísérleteket vad típusú valamint CB<sub>1</sub> receptor „knockout” előagi és agytörzsi membránokon végeztük. A

leszorításos vizsgálatokhoz  $\mu$ -opioid receptor specifikus agonistát ( $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ ) és jelöletlen ligandokat (DAMGO, noladin éter, SR144528) használtunk. A reakciót minden esetben a membrán frakció hozzáadásával indítottuk. A receptor-ligand komplex radiaktivitását folyadék scintillációs számlálóban mértük. A nem specifikus kötést jelöletlen naloxon jelenlétében határoztuk meg. Eredményeinket GraphPad Prism 3.0 software programmal értékeltük. A statisztikai analízist GraphPad InStat 3.06 software programmal végeztük.

#### *$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötési vizsgálatok*

A vad típusú valamint a  $\text{CB}_1$  és a  $\text{CB}_2$  receptor hiányos állatok előagyából és agytörzséből készült membránfrakciókat 60 percen át inkubáltuk  $30^\circ\text{C}$ -on Tris-EGTA pufferben (pH 7,4). A puffer tartalmazott  $20\text{ MBq}/0,05\text{ cm}^3$   $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -t (0,05 nM),  $30\ \mu\text{M}$  GDP-t és az *in vivo* kísérletekben DAMGO-t növekvő koncentrációban ( $10^{-10} - 10^{-5}\text{ M}$ ), az *in vitro* kísérletekben DAMGO-t növekvő koncentrációban ( $10^{-10} - 10^{-5}\text{ M}$ ) valamint noladin éter és/vagy SR144528-at  $10^{-6}\text{ M}$  koncentrációban. A nem-specifikus kötést  $10\ \mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S-el meghatároztuk majd kivontuk. A  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  radioaktivitását folyadék scintillációs számlálóban mértük. Eredményeinket GraphPad Prism 3.0 software programmal értékeltük. A statisztikai analízist GraphPad InStat 3.06 software programmal végeztük.

## EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

### *Előagy*

1. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy vad típusú és CB<sub>1</sub> receptor hiányos egér előagyban akut i.p. noladin éter kezelést követően csökken a  $\mu$ -opioid receptorok gén expressziója és G-fehérje aktivációja. Ez a gátlás CB<sub>2</sub> kannabisz antagonistá (SR144528) előkezeléssel felfüggeszthető.

2. Előagyban a noladin éter *in vitro* is csökkenti a  $\mu$ -opioid receptor agonista DAMGO hatásfokát a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési tesztekben és ez a csökkenés SR144528 jelenlétében gátolható.

Mivel a vad típus és a CB<sub>1</sub> knockout között semmilyen különbséget nem tapasztaltunk sem *in vivo* sem pedig *in vitro*, kizárhatjuk a CB<sub>1</sub> receptorok szerepét ezen hatások kialakításában.

3. A leszorításos kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a noladin éter nagyon kis affinitással kötődik a  $\mu$ -receptorokhoz a jelöletlen DAMGO affinitásához képest.

Eredményeink azt mutatják, hogy egér előagyban az i.p. injektált endogén kannabinoid noladin éter gátolja a  $\mu$ -receptorok génexpresszióját és G-fehérje aktivációját. Valószínűsíthetjük, hogy a megfigyelt gátlások a CB<sub>2</sub> kannabinoid receptorokon keresztül mennek végbe.

## Agytörzs

4. Vad típusú és CB<sub>1</sub> receptor hiányos egér agytörzsben nem mértünk változást sem a  $\mu$ -receptorok génexpressziójában sem pedig a G-fehérje aktivációjában akut i.p. noladin éter kezelést követően. *In vitro* noladin éter kezelés után sem tapasztaltunk statisztikailag releváns eltérést a kontrollhoz képest a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési tesztekben.

Ezen megfigyelésekből valószínűsíthető, hogy a noladin éternek a  $\mu$ -opioid receptor aktivációjára kifejtett hatása a vizsgált régiótól függően változik.

Kombinált NE kísérleteink során szignifikáns gátlást tapasztaltunk az SR144528 előkezelést követően mind *in vivo* mind pedig *in vitro*. Felmerült tehát a kannabinoid antagonistá önnálló hatása is. A CB<sub>2</sub> antagonistá  $\mu$ -opioid receptorokra kifejtett gátló hatásának kimutatátása egyszeri i.p. kezeléseket végeztünk a vad típusú és a CB<sub>1</sub> receptor hiányos állatokon SR144528-al önmagában.

5. CB<sub>2</sub> antagonistá SR144528 egyszeri i.p. kezelése után szignifikáns gátlást tapasztaltunk mind a génexpressziós, mind pedig a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési tesztek során a  $\mu$ -opioid receptorokon a vad típusú és a CB<sub>1</sub> receptor knockout egér agytörzsben.

6. Ezt a gátlást CB<sub>2</sub> vad típusú egér agytörzsben *in vitro* is megfigyeltük, azonban a CB<sub>2</sub> knockout agytörzsben semmilyen változást nem láttunk a kontrollhoz képest.

7. Kompetíciós kísérletekkel igazoltuk, hogy az SR144528 hatása a  $\mu$ -opioid receptorok aktivitására nem a  $\mu$ -opioid receptor által mediált folyamat.



Vizsgálatainkból összegzésképpen elmondhatjuk, hogy egér agytörzsben a CB<sub>2</sub> receptor antagonistá SR144528 a CB<sub>2</sub> receptorokon keresztül gátló hatást fejt ki a  $\mu$ -opioid receptorok génexpressziójára és G-fehérje aktivációjára.

Ma már köztudott tény, hogy az opioid és a kannabinoid rendszer szoros kölcsönhatásban áll egymással és ezen interakciókat részben receptoraik aktivitásainak módosításával érik el. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy az agy különböző régióiban erre a kapcsolatra nem csak a CB<sub>1</sub> típusú kannabinoid receptorok képesek, hanem a korábban „perifériásnak” hitt CB<sub>2</sub> kannabinoid receptorok is. Ezzel egy lépéssel közelebb kerültünk e két komplex rendszer közös működésének pontosabb megismeréséhez. Mivel mindkét rendszernek szerepe van a fájdalom percepció módosításában eddigi ismereteink összessége lehetővé teheti új, előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező fájdalomcsillapítók tervezését. Fontos megjegyezni azonban, hogy e két rendszer közötti kölcsönhatások sokfélesége valamint a receptor és/vagy régió függő válaszok sokasága mindenképpen óvatosságra int.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek Prof. Dr. Borsodi Annának és Dr. Benyhe Sándornak bátorításukért és a munkám elvégzéséhez nyújtott biztos szakmai és anyagi háttér megteremtéséért.

Köszönettel tartozom szerzőtársaimnak és kollégáimnak együttműködésükért. Külön köszönetet érdemel Canjavec Zsuzsa, akinek önzetlen segítsége és emberségessége példa értékű volt számomra.

Szeretnék köszönetet mondani a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének, a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak valamint a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért Alapítványnak a doktori munkám befejezéséhez szükséges anyagi támogatásért.

### PHD TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Paldy, E.,** Bereczki, E., Santha, M., Wenger, T., Borsodi, A., Zimmer, A. & Benyhe, S. (2008). CB(2) cannabinoid receptor antagonist SR144528 decreases mu-opioid receptor expression and activation in mouse brainstem: role of CB(2) receptors in pain. *Neurochem Int* aug 29. ahead of print. (IF:2,975)

2. **Paldyova, E.**, Bereczki, E., Santha, M., Wenger, T., Borsodi, A. & Benyhe, S. (2008). Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits  $\mu$ -opioid receptor activity *via* CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem Int* 52, 321-328. (IF: 2,975)

3. **Paldyova, E.**, Bereczki, E., Santha, M., Wenger, T., Borsodi, A. & Benyhe, S. (2007). Altered gene expression and functional activity of opioid receptors in the cerebellum of CB1 cannabinoid receptor knockout mice after acute treatments with cannabinoids. *Acta Biol Hun* 58, 113-129. (IF: 0,447)

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Kolarovszki-Sipiczki, Z., Gaspar, R., Ducza, E., **Paldy, E.**, Benyhe, S., Borsodi, A. & Falkay, G. (2007). Effect of alpha-adrenoceptor subtype-selective inverse agonists on non-pregnant and late-pregnant cervical resistance in vitro in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 42-7. (IF: 2,038)

2. Gaspar, R., Ducza, E., Mihalyi, A., Marki, A., Kolarovszki-Sipiczki, Z., **Paldy, E.**, Benyhe, S., Borsodi, A., Foldesi, I. & Falkay, G. (2005). Pregnancy-induced decrease in the relaxant effect of terbutaline in the late-pregnant rat myometrium: role of G-protein activation and progesterone. *Reproduction* 130, 113-22. (IF: 2,962)

3. Gaspar, R., Kolarovszki-Sipiczki, Z., Ducza, E., **Paldy, E.**, Benyhe, S., Borsodi, A. & Falkay, G. (2005). Terbutalin increases the rat cervical resistance of the pregnant rat uterus in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371, 61-71. (IF: 2,161)

4. Minorics, R., Ducza, E., Marki, A., **Paldy, E.** & Falkay, G. (2004). Investigation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in the pregnant rat uterus. *Mol Reprod Dev* 68, 463-468. (IF: 2,538)

### **FONTOSABB KIVONATOK**

1. **E. Páldy**, A. Higuera-Matas, M. Miguéns, G. Tóth, T. Wenger, A. Borsodi, G.L. Montoya, O. Olías, C. García-Lecumberri & E. Ambrosio. Cerebral distribution of endomorphin-2 binding sites in CB1 knockout male and female mice: an autoradiography study. Spanish Society on Cannabinoid Research, Madrid, Spain, 2008. 27-29 November. (poszter)

2. A. Borsodi, **E. Páldyová**, E. Bereczki, M. Sántha, T. Wenger, L. Rocha & S. Benyhe. Altered mu-opioid receptor activity caused by brainstem CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors. 13<sup>th</sup> NIDA International Forum, San Juan, Puerto Rico, 2008. 13-17 June. (poszter)

3. **E. Páldyová**, E. Bereczki, M. Sántha, T. Wenger, A. Borsodi & S. Benyhe. The CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor antagonist SR144528, inhibits MOR gene expression and DAMGO induced G-protein activation in mouse brainstem. European Opioid Conference, EOC-ENC Join Meeting, Ferrara, Italy, 2008. 8-11 April. (poszter)

4. **E. Páldyová**, T. Wenger, A. Borsodi & S. Benyhe. Inhibition of  $\mu$ -opioid receptor functional activity after *in vitro* noladin ether treatment in mice forebrain. Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma, Budapest, Magyarország, 2007. június 1-2. (poszter)

5. **E. Páldyová**, T. Wenger, S. Benyhe & A. Borsodi. Attenuation of opioid receptor G-protein activation after acute treatment by CB1 cannabinoid agonist noladin ether. C.I.N.P. Workshop, Addiction and Eating Disorders – Neurobiology and Comorbides, Brno, Czech Republic, 2007. 26-29 April. (poszter)

6. **E. Páldyová**, E. Bereczki, M. Sántha, T. Wenger, A. Borsodi & S. Benyhe. Altered gene expression and functional activity of  $\mu$ -opioid receptors after acute noladin ether treatment in the cerebellum of CB1 cannabis receptor knockout mice. MITT XI. Konferenciája, Szeged, Magyarország, 2007. január 25-27. (poszter)

7. **E. Páldyová**, T. Wenger, S. Benyhe & A. Borsodi. G-protein activation by cannabinoid and opioid ligands. 15<sup>th</sup> Annual Symposium on the Cannabinoids, Clearwater Beach, Florida, USA, 2005. 24-27 June. (poszter)