

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dócs Klaudia**

**A 2-AG degradációjában résztvevő mechanizmusok  
vizsgálata a gerincvelő hátsó szarvában, és CB1 receptort  
túlermelő sejt kultúrában**

**DEBRECENI EGYETEM  
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2018**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A 2-AG degradációjában résztvevő mechanizmusok  
vizsgálata a gerincvelő hátsó szarvában, és CB1 receptort  
túltermelő sejt kultúrában**

**Dócs Klaudia**

**Témavezető: Dr. Antal Miklós**



**DEBRECENI EGYETEM  
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2018**

# 1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	Tartalomjegyzék	3
2.	Rövidítések jegyzéke	6
3.	Bevezető	9
4.	Elméleti áttekintés	11
4.1	Az endokannabinoid rendszer a központi idegrendszer egyes területein és a periférián	11
4.1.1.	Kannabinoidok és kannabimimetikus vegyületek	11
4.1.2.	Az endokannabinoid ligandok metabolizmusa	12
4.1.2.1.	Az anandamid szintézise	13
4.1.2.2.	Az anandamid lebontása	14
4.1.2.3.	A 2-AG szintézise	16
4.1.2.4.	2-AG legfontosabb hidrolitikus lebontó útvonala	18
4.1.2.5.	A 2-AG további hidrolitikus lebontó útvonalai	19
4.1.2.6.	A 2-AG inaktiválásának oxidatív útvonalai	20
4.1.2.7.	A 2-AG izomerizációja	22
4.1.3.	Kannabinoid receptorok	23
4.1.3.1.	CB <sub>1</sub> receptoemandr	23
4.1.3.2.	CB <sub>2</sub> receptor	26
4.1.3.3.	TRPV1	26
4.1.4.	Az endokannabinoid rendszer szerepe a szinaptikus plaszticitás különböző formáinak kialakításában	27
4.1.4.1.	Az endokannabinoid-mediált rövid szinaptikus gátlás	28
4.1.4.2.	Endokannabinoid-mediált hosszú távú depresszió	32
4.1.5.	Az endokannabinoid rendszer szerepe a gliasejtek működésének szabályozásában	32

4.2	Az endokannabinoid rendszer a gerincvelő felületes hátsó szarvában	34
6.1	Kísérleti állatok és a szöveti metszetek előkészítése	38
6.2	Sejtkultúra és transzfekció	38
6.3	Plazmid konstrukció	39
6.4	Western blot analízis	39
6.5	Egyszeres immunhisztokémiai jelölés fénymikroszkópos vizsgálatokhoz	40
6.6	Kettős immunhisztokémiai jelölés konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz	40
6.7	Immuncitokémia	41
6.8	Immunfluoreszcens jelölések vizsgálata konfokális mikroszkóppal	42
6.9	Az MGL és a különböző axonális és glia markerek kolokalizációjának kvantitatív elemzése.	42
6.10	Elektronmikroszkópos vizsgálatok	43
6.11	A 2-AG izomerizációja vizes oldatban	44
6.12	A 2-AG és az 1-AG mennyiségi meghatározása LC-MS-sel	44
6.13	Ca <sup>2+</sup> mérések	45
7.1	Az MGL immunreaktivitás megoszlása a gerincvelő hátsó szarvában	46
7.2	Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja nociceptív primer afferensek axonterminálisainak markereivel	47
7.3	Az MGL kolokalizációja a glutamáterg és GABAerg interneuronok axonterminálisainak markereivel	48
7.4	6.4 Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja az asztrociták és mikroglia sejtek markereivel	50
7.5	Az MGL immunreaktivitás ultrastrukturális megoszlása	51
7.6	A 2-AG spontán 1-AG-vá alakul vizes oldatban	53
7.7	A CB <sub>1</sub> overexpressziója COS7 sejtekben	54
7.8	A 2-AG CB <sub>1</sub> -en kifejtett biológiai hatását az 1-AG alig módosítja	55

7.9	Az 1-AG aktiválja a CB <sub>1</sub> -et, és koncentráció-függő módon növeli a sejtek intracelluláris Ca <sup>2+</sup> koncentrációját	57
7.10	A 2-AG koncentráció esésével párhuzamosan felhalmozódó 1-AG ellensúlyozza a CB <sub>1</sub> mediált Ca <sup>2+</sup> tranziensek gyengülését	60
8.1	MGL az axonterminálisokon	63
8.2	MGL a glia sejteken	65
8.3	Az acilmigráció szerepe a 2-AG degradációjában	67
9	Összefoglalás/Summary	72
10	Irodalomjegyzék	75
11	Tárgyszavak/Key words	93
12	Köszönetnyilvánítás	94
13	Függelék	95

## 2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG - 2-arachidonil-glicerin  
1-AG - 1(3)-arachidonil-glicerin  
AA - arachidonsav  
ABHD4 -  $\alpha/\beta$ -hidroláz 4  
BAPTA - 1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav  
bazális RER - bazális receptor-asszisztált endokannabinoid felszabadítás  
CaER -  $\text{Ca}^{2+}$ -asszisztált endokannabinoid felszabadítás  
cAMP - ciklikus adenzin monofoszfát  
CB<sub>1</sub> - 1-es típusú kannabinoid receptor  
CB<sub>2</sub> - 2-es típusú kannabinoid receptor  
CD11b - differenciációs klaszter molekula 11b  
CGRP - kalcitonin gén-relációs peptid  
COX – ciklooxigenáz  
DAB - 3, 3'-diaminobenzidin  
DGL $\alpha$  - diacilglicerín-lipáz  $\alpha$   
DSE - a serkentés depolarizációval kiváltott csökkenése  
DSI - depolarizáció-indukált gátláscsökkenés  
eCB-LTD – endokannabinoid-mediált hosszú távú depresszió  
eCB-STD - endokannabinoid-mediált rövid szinaptikus gátlás  
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav  
EGTA - bis-aminoetil-glikoléter-tetraecetsav  
EPSC- serkentő posztszinaptikus áram  
FAAH - zsírsavamid-hidroláz  
GC/MS - gázkromatográfia-tömegspektroszkópia  
GDE1 - glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1  
GFAP - gliális fibrilláris savas fehérje  
GIRK - G-protein kapcsolt befelé egyenirányító K<sup>+</sup> csatorna  
GPCR - G-protein kapcsolt receptor  
HBSS - Hank-féle sóoldat

IB4 - izolektin B4  
IPSC - gátló posztszinaptikus áram  
LC-MS - folyadékromatográfia-tömegspektrometria  
lizo-PI - 2-arachidonil-lizofoszfamidil-inozitol  
lizo-PLC - lizofoszfamidil-inozitol szelektív foszfolipáz C  
mAChR - muszkarin típusú acetilkolin receptor  
MAPK - mitogén-aktivált protein kináz  
MGL - monoacilglicerol-lipáz  
mGluR - metabotróp glutamát receptor  
NAE - N-aciletanolamin  
NAPE - N-acil-foszfamidil-etanolamin  
NAPE-PLD - NAPE-szelektív foszfolipáz D  
NarPE - N-arachidonil-foszfamidiletanolamin  
PB - foszfát puffer  
PGD<sub>2</sub>-G - prosztaglandin D<sub>2</sub> glicerín észter  
PGE<sub>2</sub>-EA - prosztaglandin E<sub>2</sub> etanolamid  
PGE<sub>2</sub>-G - prosztaglandin E<sub>2</sub> glicerín észter  
PGG<sub>2</sub> - prosztaglandin endoperoxid  
PGH<sub>2</sub> - prosztaglandin H<sub>2</sub>  
PGH<sub>2</sub>-G - prosztaglandin H<sub>2</sub> glicerín észter  
PLA1 - foszfolipáz-A1  
PLA2 - foszfolipáz-A2  
PLC - foszfolipáz C  
PLC $\beta$  - foszfolipáz  $\beta$   
PMSF - fenilmetilszulfonil fluorid  
PPAR $\alpha$  - peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor  
PTPN22 - nem-receptor 22 típusú protein tirozin foszfatáz  
PVDF - polivinilidén-fluorid  
RFP - piros fluoreszcens fehérje  
SDS - nátrium dodecyl szulfát  
SDS - PAGE - nátrium dodecyl szulfát – poliakrilamid - gél elektroforézis

SHIP1 - Src homológia 2 domént tartalmazó inozitol-5-foszfátáz 1

SRM - szelektált reakció monitorozás

TFA - trifluorecetsav

TPBS - trisz-foszfát pufferezt izotóniás sóoldat

TRIS - trisz-(hidroximetil)-amino-metán

TRPV1 - tranziens receptor potenciál vanilloid-1 ioncsatorna

VGAT - vezikuláris GABA transzporter

VGLUT2 - vezikuláris glutamát transzporter 2

WIN - WIN55,212-2

$\Delta$ 9-THC - delta-9-tetrahidrokannabinol

### 3. BEVEZETŐ

„Egy növény segítségével, amely évezredek óta előttünk hevert, egy felbecsülhetetlen jelentőségű új élettani rendszert fedeztünk fel.” Az idézet Raphael Mechoulamtól származik, aki 1964-ben felfedezte a különböző *Cannabis* fajok pszichoaktív hatásaiért felelős delta-9-tetrahidrokannabinolt ( $\Delta^9$ -THC), s akinek úttörő munkássága nyomán a kannabinoidokkal foglalkozó kutatások az idegtudományok egyik legvirágzóbb területévé váltak.

A THC-ről nagyon korán kiderült, hogy hidrofób természete miatt vízben szinte oldhatatlan, lipidekben azonban kiválóan oldódik, ezért sokáig úgy hitték, hogy a hatását nem specifikus módon, azaz nem valamilyen receptorhoz kötődve fejt ki, hanem csupán a sejtmembránba beoldódva, és annak fluiditását módosítva idéz elő biológiai hatást (Lawrence és mtsa., 1975). A THC receptorát végül 1990-ben Matsuda és mtsai. klónozták sikeresen, és 1. típusú kannabinoid receptornak ( $CB_1$ ) nevezték el (Matsuda és mtsai., 1990). A receptor azonosításától kezdve valószínűsítették, hogy az emlősökben található  $CB_1$  elsősorban nem a növényi kannabinoidok hatását hivatott közvetíteni, majd ezek után számos kutatócsoport kezdte a fitokannabinoidok endogén megfelelőjét keresni. Az elsőként azonosított endokannabinoid ligandot, melynek izolálására 1992-ben került sor, leírói a szanszkrit „ananda” - vagyis belső gyönyör - szó alapján anandamidnak nevezték el (Devane és mtsai., 1992). Ezt követte 1995-ben a 2-arachidonil-glicerin (2-AG), mely mai ismereteink szerint az anandamid mellett a másik legfontosabb endogén kannabinoid ligand (Mechoulam és mtsai., 1995). Az elmúlt csaknem 30 év endokannabinoid kutatásainak eredményeként mára nemcsak az endokannabinoidok által közvetített intercelluláris kommunikáció molekuláris eszköztárát ismerhettük meg egyre jobban, hanem az endokannabinoid rendszer kulcsfontosságú szerepét is a legkülönbözőbb életfolyamatok szabályozásában, illetve számtalan betegség patogenezisében. Ezért, bár a marijuana (a hippimozgalomnak köszönhetően) elsősorban rekreációs drokként vált általánosan ismertté, a kannabinoidok lassan elfoglalták a helyüket a gyógyászatban, mint például a megemelkedett intraokuláris nyomás (Nucci és mtsai., 2007), az atopiás dermatitis (Bíró és mtsai., 2009) és számos további kórkép humán terápiájában is. Morfológiai, fiziológiai és farmakológiai módszerekkel sikerült azt is bizonyítani, hogy a fiziológiás és patológiás fájdalomfeldolgozás is endokannabinoidfüggő, perifériás, gerincvelői és szupraspinális szinten egyaránt (Agarwal és mtsai., 2007; Drew és mtsai., 2008; Herkenham és mtsai., 1991; Pertwee 2001).

A gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozás kannabinoidfüggő modulálásának háttérében feltételezhetően egy meglehetősen összetett mechanizmus húzódik: ugyanis a CB<sub>1</sub> bár változó mértékben, de a gerincvelői fájdalomfeldolgozásban elsődlegesen szerepet játszó felületes hátsó szarv serkentő és gátló axonterminálisain éppúgy, mint asztrocitáin és mikroglia sejtjein kimutatható (Hegyi és mtsai., 2009). Az anandamid és 2-AG szintézisében részt vevő két legfontosabb enzim, a NAPE-szelektív foszfolipáz D (NAPE-PLD) és a diacilglicerol-lipáz- $\alpha$  (DGL $\alpha$ ) ugyancsak jelen van nem csak dendriteken, de gliasejteken is (Hegyi és mtsai., 2012). A CB<sub>1</sub> aktivációját, és így a kannabinoid rendszer hatásának erősségét ugyanakkor önmagában nem az endokannabinoidok mobilizálása határozza meg, hanem az endogén kannabinoidok szintézisének és lebontásának egymáshoz való aránya állítja be. Kísérleteink kezdetekor azonban az irodalomban semmilyen adat nem állt rendelkezésre az endokannabinoidok lebontását végző enzimek gerincvelői expressziójáról. Ezért, tekintettel a 2-AG jelpálya jelentőségére a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozás szabályozásában, jelen értekezés témájául két, a 2-AG koncentrációjának csökkentésében szerepet játszó mechanizmus vizsgálatát választottuk. A 2-AG lebontásáért elsősorban felelős enzim, a monoglicerol-lipáz (MGL) gerincvelői expressziójának leírása mellett vizsgáltuk a 2-AG régóta ismert spontán molekuláris átrendeződésének szerepét a 2-AG-függő jelátvitelben.

## 4. ELMÉLETI ÁTTEKINTÉS

### 4.1 *Az endokannabinoid rendszer a központi idegrendszer egyes területein és a periférián*

Az endokannabinoid rendszer egy meglepően összetett, ligandjait, receptorait és a ligandok metabolizmusában részt vevő enzimeket tekintve egyaránt diverz, lipid alapú jelátviteli apparátus, amely számos fiziológias és patofiziológias folyamat szabályozásában meghatározó szerepet játszik (Gertsch és mtsai., 2010). A dolgozat az alábbiakban csupán az endokannabinoid rendszer legfontosabb, idegrendszeri modulációs folyamatokban részt vevő molekuláris összetevőinek rövid bemutatására vállalkozik a jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján.

#### 4.1.1. *Kannabinoidok és kannabimimetikus vegyületek*

Definíció szerint a kannabinoidok a *Cannabis sativa L.* terpenofenolos vegyületei, melyek képesek kötődni a kannabinoid receptorokhoz. Sok éven keresztül a THC volt az egyetlen ismert növényi eredetű kannabinoid, mely képes volt a CB<sub>1</sub> közvetlen aktiválására. Később kiderült, hogy számos, nem a Cannabis nemzetségbe tartozó növényből izolált vegyület is képes a CB<sub>1</sub>-gyel interakcióba lépni. Ezeket a vegyületeket fitokannabinoid néven foglaljuk össze, megkülönböztetendő az állati szövetekben fiziológiásan is jelen levő endokannabinoidoktól, melyek közös vonása, hogy szintén képesek aktiválni a CB<sub>1</sub>-et. A természetben előforduló kannabimimetikus vegyületek mellett számos mesterségesen, kémiai úton előállított molekula képes a kannabinoid receptorok aktiválására. A szintetikus kannabinoidok talán legismertebb képviselője a CB<sub>1</sub> agonista WIN55,212-2 (WIN).

A CB<sub>1</sub> felfedezése (Matsuda és mtsai., 1990) megnyitotta az utat a kannabinoid receptorok endogén ligandjainak azonosítását célzó kísérletek előtt. A feltételezett ligand azonosításhoz az egyik kiindulópont az volt, hogy más neurotranszmitterekhez hasonlóan valószínűleg az endogén kannabinoid is Ca<sup>2+</sup>-függő módon szabadul fel. Ezt a premisszát követve Howlett és mtsai. 1992-ben kimutatták, hogy egy, az A23187 Ca<sup>2+</sup> ionofór hatására felszabaduló vegyület, a [3H] CP-55940 radiojelölt ligand CB<sub>1</sub>-ről való disszociációját idézi elő (Evans és mtsai., 1992). Ezzel a felfedezéssel egyidejűleg Raphael Mechoulam és munkacsoportja másféle stratégiát választott az endokannabinoid ligand azonosítására. Feltételezték, hogy a keresett ligand, hasonlóképpen a THC-hez, hidrofób jellegű, ezért disznó agyból izolált mintákból szerves oldószerekkel kioldották

az összes lipidtermészetű molekulát, és az így kinyert zsírokat kromatográfiás módszerekkel vizsgálták. Ezzel sikerült izolálni egy vegyületet, amelyet a tömegspektrometriás mérések alapján az arachidonsav etanolamidjaként azonosítottak, és amely nagyon alacsony koncentrációban is képes volt aktiválni a CB<sub>1</sub>-et. Ezt a vegyületet anandamidnak nevezték el (Devane és mtsai., 1992).

Az anandamidot a központi idegrendszer szinte valamennyi területén sikerült kimutatni valamennyi vizsgált emlősben (Felder és mtsai., 1996). A 90-es évek közepére több, egymástól független munkacsoport is feltételezte, hogy az anandamid nem az egyetlen endokannabinoid ligand, hiszen számos más, szerkezetileg nagyon hasonló arachidonsav származék fordul elő az emlős szervezetben, amelyek szerkezeti hasonlóságukból kiindulva szintén kötődhetnek a kannabinoid receptorokhoz (Freund és mtsai., 2003). Végül az egyik ilyen rokonvegyületről, a 2-AG-ról kiderült, hogy az agyban a koncentrációja magasabb, mint az anandamidé, és a CB<sub>1</sub>-en kívül a másik kannabinoid receptorhoz, a CB<sub>2</sub>-höz is körülbelül azonos affinitással kötődik, ráadásul, az anandamiddal ellentétben, a 2-AG a CB<sub>1</sub> teljes agonistája (Freund és mtsai., 2003; Sugiura és mtsai., 1995). A 2-AG jelenlétét az anandamidhoz hasonlóan a központi idegrendszernek tulajdonképpen valamennyi vizsgált területén sikerült kimutatni (Stella és mtsai., 1997; Sugiura és mtsai., 1995). A 2-AG mellett, annak nagyon közeli, szerkezetileg csaknem azonos rokon vegyületét, az 1(3)-arachidonil-glicerint (1-AG) is mindig sikerült azonosítani az idegszövetben (Kondo és mtsai., 1998).

A 2-AG és az anandamid mellett számos további endokannabinoid ligandot azonosítottak, például az oleoil-etanolamidot, a palmitoil-etanolamidot, a virodhamint, az N-arachidonil-dopamint vagy a noladin-étert. Ezek mindegyike képes aktiválni a kannabinoid receptorokat, és egyre több kísérletes eredmény támasztja alá ezeknek a ligandoknak a szerepét különböző fiziológiás és patológiás folyamat háttérében. Az elérhető irodalmi adatok alapján jelentőségük mégis eltölpül az anandamidé és a 2-AG-é mellett (Di Marzo és mtsai., 1998).

#### ***4.1.2. Az endokannabinoid ligandok metabolizmusa***

A két legalaposabban tanulmányozott endokannabinoid ligand, az anandamid és a 2-AG bioszintetikus útvonala több hasonlóságot is mutat egymással: mindkettő membrán foszfolipid prekursorból keletkezik enzimatis hasítás illetve hidrolízis által (Schmid és mtsai., 1990, 1996), és az inaktiválásukért elsődlegesen hidrolitikus enzimek felelősek. Habár a két ligand metabolikus útvonalai között előfordulnak átfedések, mind a szintézisükért, mind pedig a lebontásukért felelős

elsődleges enzimek különbözőek. Ebből adódóan egymástól függetlenül is termelődhetnek, így a mennyiségük a szervezetben egymástól függetlenül változhat (Pertwee 2004). Két közös tulajdonságon azonban osztozik a 2-AG és az anandamid. Egyrészt, a klasszikus neurotranszmitterekkel ellentétben egyik ligand sem tárolódik szinaptikus vezikulákban, hanem megfelelő stimulus hatására „on demand”, vagyis szükség szerint termelődik (Di Marzo és mtsai., 1998), másrészt a metabotróp glutamát receptorok aktivációja önállóan, vagy intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedésével egybekötve mindkét endokannabinoid szintézisét indukálja (Brenowitz és mtsa., 2003; Kim és mtsai., 2002).

#### **4.1.2.1. Az anandamid szintézise**

Az anandamid az N-aciletanolaminok (NAE) családjába tartozik, s már az azonosítását megelőzően Schmid és mts. kiderítették, hogy a szintézise foszfolipid-függő módon, az N-acil-foszfatidil-etanolaminok (NAPE) enzimatis hidrolízisével történik (1. ábra) (Schmid és mtsai., 1990, 1996). A reakció terminális lépését katalizáló enzim a NAPE-PLD, amelyet több tulajdonsága is megkülönböztet a többi PLD-től: hiányzik a transzfoszfatidilációs képessége (Petersen és mtsa., 1999), a működése  $Ca^{2+}$ -függő (Ueda és mtsai., 2001), és az aktivitását fokozzák a poliaminok (Liu és mtsai., 2002). Az enzim klónozását követően ráadásul az is kiderült, hogy a cink-metallohidroláz szuperfamilia béta-laktamáz domént tartalmazó tagja (Okamoto és mtsai., 2004). Azt, hogy a NAPE-PLD az anandamid szintézisében meghatározó szerepet játszhat, elsőként az az eredmény sugallta, hogy az enzim expressziós mintázata a központi idegrendszerben nagyon hasonló az anandamid prekursorának, az N-arachidonil-foszfatidil-etanolaminnak (NArPE), illetve magának az anandamidnak az előfordulásához a legtöbb agyterületen (Berrendero és mtsai., 1999). A NAPE-PLD és az anandamid kapcsolatából kiindulva, az anandamid-mediált kannabinoid jelátvitel vizsgálata során az enzim expresszióját a központi idegrendszer számos területén kimutatták, például a törzsdúcokban, és az agykéregben is (Hegyí és mtsai., 2012; Morishita és mtsai., 2005; Nyilas és mtsai., 2008; Reguero és mtsai., 2014).

A NAPE-PLD génkiütött egereken végzett tanulmányok ugyanakkor nagyban megváltoztatták az anandamid szintézisével kapcsolatos elméleteket. Cravatt és mtsai. a NAPE ill. NAE mennyiségét mérték NAPE-PLD génkiütött állatokból származó mintákon és azt tapasztalták, hogy csak a telített, illetve egyszeresen telítetlen NAPE-k és NAE-k mennyisége

mutat szignifikáns csökkenést, viszont sem a többszörösen telítetlen NAPE-k, sem NAE-k, mint pl. az anandamid mennyisége nem változott drámaian (Leung és mtsai., 2006). Ezek az eredmények meggyőzően demonstrálták, hogy az anandamid szintézisének több alternatív útvonala is létezik, amelyek részt vehetnek akár az elsődlegesen a NAPE-PLD által szintetizált anandamid mennyiségének kiegészítésében, akár az anandamid szintézis pótlására a NAPE-PLD hiányában vagy működésének zavarában. Az egyik ilyen útvonal mentén a NAPE prekursorból lizo-NAPE keletkezik a foszfolipáz-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) vagy  $\alpha/\beta$ -hidroláz 4 (ABHD4) szerin hidroláz enzimek révén, amelyből az ABHD4 és a glicerofoszfodiészteráz (GDE1) enzim közreműködésével több lépésben keletkezik anandamid (Parsons és mtsa., 2015). Érdeemes azonban megjegyezni, hogy sem a GDE1 génkiütött állatokban, sem pedig NAPE-PLD-GDE1 kettős génkiütött állatokban nem mutatkozik szignifikáns csökkenés a NAE mennyiségében (Simon és mtsa., 2010), ami azt jelzi, hogy további biokémiai útvonalak is részt vehetnek az anandamid szintézisében, és kompenzálhatják e két szintetizáló enzim működésének hiányát. Az egyik lehetséges mechanizmus az a több lépésből álló enzimikus útvonal lehet, amelyben a NAPE prekursorból több lépésben a nem-receptor 22 típusú protein-tirozin-foszfátáz (PTPN22) vagy az Src-homológia 2 domént tartalmazó inozitol-5-foszfátáz 1 (SHIP1) defoszforilációjával keletkezik anandamid (Di Marzo és mtsa., 2015) (1. ábra).

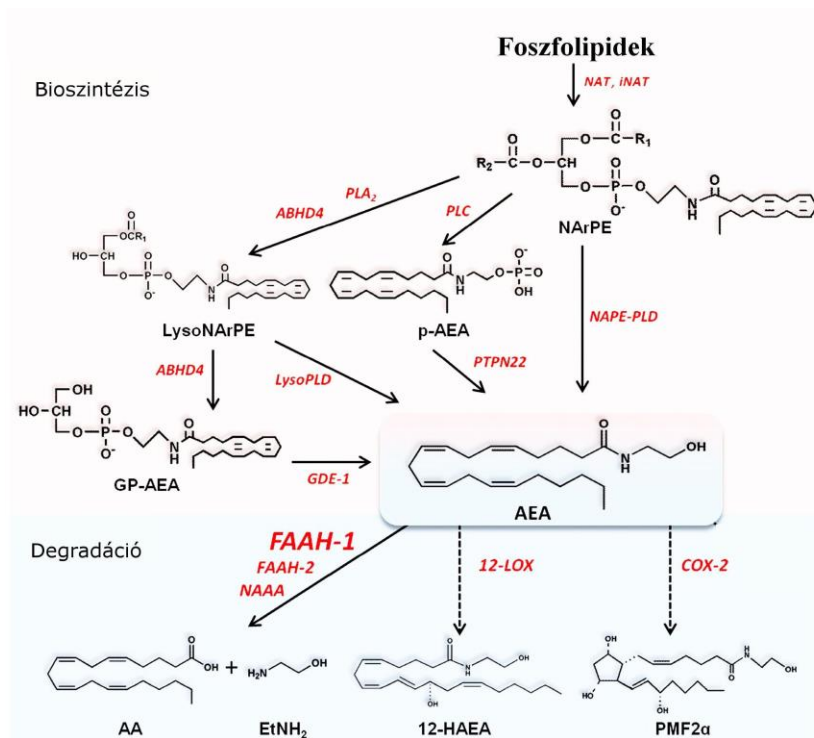
#### **4.1.2.2. Az anandamid lebontása**

A 80-as évek közepén sikerült először azonosítani egy enzimet patkányok mikroszóma frakciójában, amely a NAE-kat etanolaminná és zsírsavvá bontja (Schmid és mtsai., 1985). Az enzimet zsírsavamid-hidroláznak (FAAH) nevezték el, és enzimikus tulajdonságai közül a legfontosabb, hogy a telített- és telítetlen zsírsavakat, továbbá a rövid és hosszú szénláncú NAE-kat hidrolizálja úgy, hogy az egyszeresen, illetve többszörösen telítetlen zsírsavakat részesíti előnyben (1. ábra) (Cravatt és mtsai., 1996).

A FAAH cDNS-ének klónozásával kiderült, hogy az egér és patkány FAAH aminosavszekvenciája 91%-os homológiát mutat, illetve hogy ez a szekvencia 80%-ban megegyezik a humán FAAH szekvenciájával. Ennek megfelelően a humán és a rágcsálók által expresszált FAAH mind szubsztrátspecifitását, mind pedig az enzim inhibitoraira való érzékenységét illetően nagy hasonlóságot mutat (Giang és mtsa., 1997). In situ hibridizációs kísérletek jelentős számú FAAH-t expresszáló sejtet azonosítottak a neocortexben, a

hippocampusformációban, az amygdalában és a kisagy területén (Thomas és mtsai., 1997), de a tüdőben, vesében, májban és a gonádokban is (Pertwee 2004). A központi idegrendszerben a FAAH elsősorban poszt-szinaptikusan, a neuronok szomatodendritikus kompartmentjén expresszálódik (Gulyas és mtsai., 2004).

A FAAH aktivitásának és az endokannabinoid szignalizációban betöltött szerepének tisztázását nagyban elősegítette a szintetikus FAAH inhibitorok felfedezése, melyek közül az URB-597 bizonyult az egyik lepotensebb, szelektív gátlószernek (Fegley és mtsai., 2005). Adagolása patkányokon végzett kísérletek során a központi idegrendszer számos területén jelentősen megemelte az anandamid mennyiségét (Kathuria és mtsai., 2003). A FAAH gátlás következtében megemelkedő anandamid koncentráció CB<sub>1</sub>-mediált analgetikus hatását gyulladáscsökkentő fájdalom modellekben is igazolták (Jayamanne és mtsai., 2006).



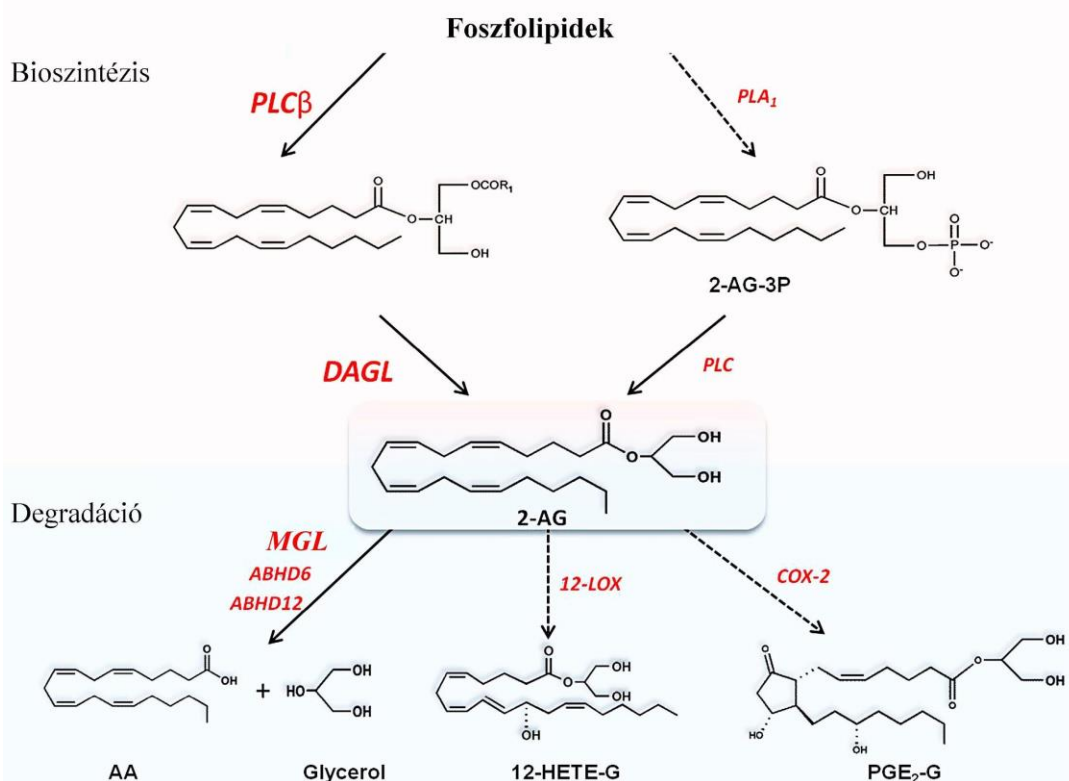
**1. ábra: Az anandamid metabolizmusa. Az anandamid szintézise és lebontása számos bonyolult útvonalon keresztül történhet. (Fezza és mtsai., 2014)** PLC - foszfolipáz-C, PLA<sub>2</sub> - foszfolipáz A2, NAPE-PLD - NAPE-szelektív foszfolipáz D, GDE1 - glicerofoszfodiészteráz, 12-LOX – 12-lipoxigenáz, COX2 - ciklooxigenáz 2, NAPE - N-arachidonil-foszfatidiletanolamin, PTPN22 - nem-receptor 22 típusú protein tirozin foszfatáz, FAAH-1/2 - zsírsavamid-hidroláz 1/2, AEA – anandamid, 12-HAEA – 12-hidroxi-anandamid, EtNH<sub>2</sub> – etilamin

#### 4.1.2.3. A 2-AG szintézise

Az arachidonil-glicerinek termelését élő szervezetben már a 80-as évek elején felfedezték trombin stimulált trombocitákban (Prescott és mtsai., 1983), majd később több kutatócsoportnak is sikerült ezt kimutatni trombocita eredetű növekedési faktorról kezelt Swiss 3T3, illetve bradikinin-stimulált hátsó gyöki ganglionsejtekben (Gammon és mtsai., 1989; Hasegawa-Sasaki, 1985). Ebben az időben azonban még nem sejtették, hogy ez a molekula számos receptor endogén ligandjának szerepét tölti be. A 2-AG, mint endokannabinoid ligand termelődését először a '90-es évek végén sikerült kimutatni ionomicin stimulált N18TG2A sejtekben (Bisogno és mtsai., 1997). Nem sokkal ezt követően az is kiderült, hogy a 2-AG termelését az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedése fokozza (Kondo és mtsai., 1998).

A 2-AG szintézisének „klasszikus” útvonala a foszfolipáz C (PLC), ill. a diacilgliceril-lipáz (DGL) enzimek konszekutív aktivitását foglalja magába, melynek során membrán foszfolipidekből PLC általi hidrolízissel először diacilglicerin keletkezik, melyet az sn-1-szelektív DGL hasít 2-AG-vá (2. ábra). A DGL membrán asszociált enzim, melynek két izoformája ismert, a DGL- $\alpha$  és a DGL- $\beta$ . Mindkét izoforma  $Ca^{2+}$ -függő és a szerin hidrolázokra jellemző katalitikus triáddal rendelkezik. A  $\beta$ -izoforma az  $\alpha$ -nak trunkált paralógja, ennek ellenére mindkét enzim egy rövid intracelluláris N-terminussal és négy transzmembrán doménnel rendelkezik. A DGL szubsztrátspecificitása máig sem teljesen ismert, annyi azonban bizonyos, hogy míg a  $\beta$ -izoforma az egyszeresen telítetlen zsírsavakat részesíti előnyben, addig az  $\alpha$ -izoforma minden zsírsavat ugyanolyan affinitással hidrolizál (Bisogno és mtsai., 2003). Az enzim két izoformája sejten belül különböző lokalizációt mutat: az  $\alpha$ -izoforma plazma membránnal asszociált míg a  $\beta$ -izoforma lipidcseppekben található. Mindkét izoformáról kimutatták a neuritfejlődésben betöltött szerepüket, azonban lokalizációjuk különbözőségéből adódóan minden bizonnyal két különböző útvonalon keresztül: a DGL- $\alpha$  a 2-AG-mediált endokannabinoid szignalizáció révén, míg a DGL- $\beta$  egy egyelőre még ismeretlen útvonalon keresztül járul hozzá a neurit fejlődéshez. Ezt támasztja alá, hogy az enzim mindkét izoformájának csendesítése a neurit növekedését gátolja (Jung és mtsai., 2005). A DGL- $\beta$  2-AG termelésben betöltött szerepéről felnőttkorban keveset tudunk. Tanimura és mtsai. a 2-AG mennyiségében, illetve a kannabinoid-mediált retrográd szinaptikus gátlásban történő változásokat vizsgálták DGL- $\alpha$  és DGL- $\beta$  génkiütött egerekben. Azt találták,

hogy a DGL- $\alpha$  génkiütött egerek agyában mind a bazális 2-AG mennyisége mind a stimulus-függő módon felszabaduló 2-AG mennyisége jelentősen csökkent. Az endokannabinoid-mediált szinaptikus gátlás is teljesen hiányzott a kisagy, hippocampus és a striatum területén. Ugyanez a DGL- $\beta$  génkiütött egerekben nem volt megfigyelhető (Tanimura és mtsai., 2010). Purkinje sejtekben kimutatták, hogy a DGL- $\alpha$ -val ellentétben a DGL- $\beta$  expressziója felnőtt korban a sejtek szómájában figyelhető meg, nagyon alacsony azonban a dendritekben (Suárez és mtsai., 2008). Ugyanakkor Zhao és mtsi. a nucleus cochlearis dorsalisban mindkét izoforma kifejeződését kimutatták (Zhao és mtsai., 2009). Ez arra utalhat, hogy a  $\beta$ -izoforma szerepe a 2-AG termelésében bizonyos agyterületekre korlátozódik.



**2. ábra: 2-AG szintézisének és lebontásának sémás ábrája. A 2-AG termelése több egymástól független mechanizmussal is történhet, melyek közül legfontosabb a DAGL által katalizált útvonal. (Fezza és mtsai., 2014).** PLC $\beta$  - foszfolipáz-C $\beta$ , PLA $_1$  - foszfolipáz A1, DAGL - diacilglicerol lipáz, MGL - monoacilglicerol lipáz, LOX - lipoxigenáz, COX2 - ciklooxygenáz 2, AA - arachidonsav, 12-HETE-G - 12-hidrozieikozatetraenoilsav, PGE $_2$ -G - prosztaglandin E $_2$ -glicerinszter

A 2-AG szintézisének egy alternatív útvonalán a foszfatidil-inozitolt preferáló foszfolipáz A1 (PLA1) révén 2-arachidonil-lizofoszfatidil-inozitol (lizo-PI) köztes termék keletkezik, melyet a lizofoszfatidil-inozitol szelektív foszfolipáz C (lizo-PLC) alakít át 2-AG-vá (2. ábra). Ennek az

útvonalnak a relevanciája az endokannabinoid szintézisben vitatott, hiszen mind a DAG, mind pedig a 2-AG több metabolikus útvonalnak is a köztes terméke, így nem törvényszerű, hogy minden bioszintetikus útvonal, ami 2-AG termeléshez vezet, egyúttal része a fiziológias kannabinoid szignalizációnak is (Muccioli, 2010).

#### **4.1.2.4. 2-AG legfontosabb hidrolitikus lebontó útvonala**

Több évvel az endokannabinoid rendszer elemeinek azonosítása előtt fedezték fel a lipidek metabolizmusának egyik kulcsenzimét, a monoacil-glicerol lipázt, melyről már a kezdeti kísérletek kimutatták az egy acilsoporttal konjugált glicerinszármazékokkal szembeni preferenciáját (Tornqvist és mtsa., 1976). Jelenlegi ismereteink szerint az MGL által katalizált hidrolízis a 2-AG lebontásának legáltalánosabb módja (2. ábra), s ezzel egyidejűleg az endokannabinoid szignalizáció modulálásának legfontosabb szereplője. Az MGL működését fiziológias és patológias folyamatokban egyaránt vizsgálták. A hírnevét annak köszönheti, hogy farmakológiai gátlása a fájdalomérzékelés erőteljes csökkenéséhez vezet (Mulvihill és mtsa., 2013).

*Az MGL általános jellemzése.* Az MGL egy 303 aminosavból álló, a szerin-hidrolázok családjába tartozó enzim, melynek katalitikus triádját a konzervált Ser-122, Asp-239 és His-269 aminosavak alkotják (Karlsson és mtsai., 1997). Az MGL-t kódoló gén szekvenciája erőteljes fajok közötti homológiát mutat: a humán MGL cDNS-e 84% illetve 85%-ban homológ az egér, valamint a patkány MGL cDNS-ével (Karlsson és mtsai., 2001).

*Az MGL expressziója.* Az MGL mRNS-ének vizsgálatakor megállapították, hogy több agyi területen is expresszálódik, kiváltképpen azokon a területeken, ahol a CB<sub>1</sub> is erőteljes expressziót mutat, így például a hippocampusban, az agykéregben vagy a kisagyban (Dinh és mtsai., 2002a, 2002b). Erőteljes MGL expresszió figyelhető meg a központi idegrendszer mellett több perifériás szervben is, így például a vesében vagy a herékben, májban, szívben vagy az ovariumban (Karlsson és mtsai., 1997). Az MGL szubcelluláris megoszlása és aktivitása szövettípustól függően változó. Míg az agyban és a zsírszövetben az MGL aktivitása megegyezik citoszolikus és membránfrakciókban (Bisogno és mtsai., 1997; Goparaju és mtsai., 1999; Sakurada és mtsa., 1981), addig vörösvértestekben vagy a pancreas sejteiben az MGL aktivitás elsősorban a

plazmamembránnal gazdagított frakciókban figyelhető meg (Konrad és mtsai., 1994; Somma-Delpéro és mtsai., 1995). Ezek az adatok azt mutatják, hogy az MGL membrán asszociált formában is jelen lehet, de nem integráns membránfehérje, melyet alátámaszt az MGL transzmembrán doménjeinek hiánya is (Pertwee 2004).

**Az MGL farmakológiai sajátosságai.** Az MGL 2-AG lebontásában betöltött szerepének megismeréséhez az MGL gátlók felfedezésével kerültünk közelebb. Az MGL potens és szelektív gátlójának, a JZL184-nek az adagolását követően az MGL aktivitása 85%-kal csökkent, a 2-AG koncentrációja pedig 8-10-szeresére nőtt az agyban, míg az anandamid koncentrációjában változás nem történt. Ezért a JZL alkalmazásával lehetőség nyílik az MGL 2-AG lebontásában betöltött szerepének szelektív vizsgálatára (Long és mtsai., 2009).

#### **4.1.2.5. A 2-AG további hidrolitikus lebontó útvonalai**

Annak ellenére, hogy a 2-AG lebontásának meghatározó részét az MGL végzi, a 2-AG további bontó enzimek szubsztrátja is lehet (2. ábra). Az ABHD6 az  $\alpha/\beta$ -hidrolázok családjába tartozó membrán protein, melyeknek katalitikus triádját a konzervált S246-D333-H372 aminosav szekvenciák alkotják. Kimutatták, hogy neurontenyészetben az ABHD6 mind mRNS, mind fehérje szinten jelen van, és posztszinaptikusan helyezkedik el. Jelenlétét glutamáterg és GABAerg neuronok dendritjén egyaránt igazolták (Marrs és mtsai., 2010), méghozzá az aktív centrumával az intracelluláris tér felé irányultan. Ennek alapján feltételezhető, hogy az ABHD6 a 2-AG szintézisének helyén hivatott az intracelluláris 2-AG mennyiségét szabályozni (Navia-Paldanius és mtsai., 2012). A 2-AG lebontásában részt vevő, szintén az  $\alpha/\beta$ -hidrolázok családjába tartozó ABHD12 érdekessége, hogy erőteljes expresszióját a mikrogliaiban, makrofágokban és oszteoklaszt sejtekben mutatták ki. Mivel a központi idegrendszerben a mikroglia sejtek kannabinoid receptora a CB<sub>2</sub>, feltételezik, hogy az ABHD12 a CB<sub>2</sub>-mediált kannabinoid szignalizációt felügyeli mikrogliaiban (Pertwee 2004).

Szövet- és sejtípustól függően a különböző bontó enzimek megoszlása és részvétele a 2-AG lebontásában változó. Míg a központi idegrendszerben az MGL felelős az összes (nem csupán a szinaptikusan felszabaduló) 2-AG 85%-nak a hidrolíziséért, addig a makrofágokban ez elsődlegesen az ABHD12 feladata (Fiskerstrand és mtsai., 2010; Savinainen és mtsai., 2012). Az ABHD6 neuronokban posztszinaptikusan, a CB<sub>1</sub>-gyel szemben helyezkedik el, és a 2-AG

mennyiségét még a ligand felszabadulása előtt szabályozza. Emiatt, bár az agyban az ABHD6 a 2-AG lebontásának mindössze 4%-áért felelős, szerepet játszik a 2-AG felhalmozódásának, és így a ligand hatékonyságának szabályozásában (Marrs 2010). Szelektív gátlása ennek megfelelően a CB<sub>1</sub>-függő hosszú távú depresszió (LTD) kialakulását facilitálja (Savinainen és mtsai., 2012).

#### 4.1.2.6. A 2-AG inaktiválásának oxidatív útvonalai

*A ciklooxygenázok.* Az endokannabinoidok hidrolitikus lebontása mellett további mechanizmusok is részt vesznek a 2-AG eltávolításában. Ezek közül talán a legfontosabb a 2-AG oxidációja a ciklooxygenázok aktivitása révén (2. ábra). A ciklooxygenázoknak (COX) három formája ismert: a leggyakrabban előforduló COX-1, továbbá különböző faktorok, így például pirogének, növekedési hormonok vagy citokinek által indukálható COX-2, valamint a COX-1 splice variánsának tartott COX-3. A COX-1 konstitutív expressziója több szövetben is megfigyelhető és szerepe van számos fiziológiás folyamatban, például az emésztőtraktus mukózájának védelmében, makrofágok differenciációjában vagy a trombocita aktivációban, ezért a COX-1-et háztartási enzimként tartják számon (O'Neill és mtsai., 1993). Ezzel szemben a COX-2 bazális expressziója néhány kivételtől eltekintve (vese, gerincvelő, agykéreg, hypothalamus, hippocampus) nagyon alacsony, viszont számos patológiás folyamat hatására megfigyelhető az enzim megnövekedett aktivitása (Hinz és mtsai., 2002; Vandevoorde és mtsai., 2007).

A kb. 600 aminosavból álló COX izozimek egymással 60%-os szekvencia azonosságot mutatnak, és mindkét enzimben fellelhető ugyanaz a négy funkcionális domén: egy amino-terminális, egy dimerizációs, egy membrán-kötő és egy katalitikus domén (Bayly és mtsai., 1999; Kurumbail és mtsai., 1996). Az enzimek katalitikus doménje kb. 480 aminosav hosszú és két aktív hellyel rendelkezik: egy endoperoxidáz és egy COX aktív hellyel. Mindkét enzim elsődleges szubsztrátja az arachidonsav, melynek C(15)-ös atomjához a COX aktív hely két O-atomot köt, amivel első lépésben prosztaglandin endoperoxid (PGG<sub>2</sub>), majd az enzim peroxidáz aktivitása révén prosztaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) keletkezik (Vandevoorde és mtsai., 2007).

A COX enzimek jellegzetessége, hogy az arachidonsavon kívül más zsírsavszármazékok oxidációjára is képesek. Ismert ugyanis, hogy COX-2 jelenlétében anandamidból és 2-AG-ból is prosztaglandinok keletkeznek, anandamidból prosztaglandin E<sub>2</sub> etanolamid (PGE<sub>2</sub>-EA), míg a 2-AG-ból elsősorban prosztaglandin E<sub>2</sub> glicerín észter (PGE<sub>2</sub>-G), továbbá prosztaglandin H<sub>2</sub> glicerín

észter (PGH<sub>2</sub>-G) és prosztaglandin D<sub>2</sub> glicerín észter (PGD<sub>2</sub>-G) keletkezik. Az anandamid és 2-AG COX-2 által katalizált oxidációja során keletkező különböző metabolitok sejt- és szövetspecifikus arányban termelődnek, így a különböző prosztaglandin receptorok eltérő hatékonyságú aktiválása következtében saját biológiai aktivitásprofillal rendelkeznek (Vandevoorde és mtsa., 2007).

**A lipoxigenázok.** A lipoxigenázok (LOX) a monomer ferroprotein család tagjai, melyek a többszörösen telítetlen zsírsavak hidroperoxidokká történő régió- és sztereospecifikus átalakítását katalizálják. Ezek az enzimek növényi és emlős szervezetekben is kimutathatók, azonban a növényekben betöltött hasznos szerepével szemben (növekedés szabályozása, patogénnel szembeni védekezés, sebgyógyulás) a humán LOX enzimeket számos betegség, többek között a diabetes mellitus, számos kardiovaszkuláris kórkép és krónikus gyulladás kialakulásával hozták összefüggésbe (Dobrian és mtsai., 2011). Az emberi szervezetben 6 LOX altípust azonosítottak: ezek az 5-LOX, e-LOX-3, trombocita-típusú 12-LOX, 12(R)-LOX, 15-LOX-1 és 15-LOX-2 (Boyington és mtsai., 1993; Sigal és mtsai., 1988; Yoshimoto és mtsa., 2002).

A LOX enzimek szubsztrátja, a COX-hoz hasonlóan nem csak az arachidonsav, hanem annak származékai, többek között a két legfontosabb endokannabinoid ligand is lehet (Rouzer és mtsa., 2011). A reakcióban részt vevő LOX izoenzimektől függően különböző bioaktív lipidek, így leukotriének, lipoxinok vagy hidroperoxieikozá-tetraenoilsav (HPETE) származékok keletkeznek. A leukotriének közismert gyulladásos mediátorok, melyek hatásait részben egy specifikus G-fehérje kapcsolt receptoreszalád, a leukotrién receptorok, részben a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (PPAR $\alpha$ ) közvetíti (Vandevoorde és mtsa., 2007). A gyulladásos és allergiás reakciók, kardiovaszkuláris és bizonyos neuropszichiátriai kórképek mellett a leukotriének elsősorban az asztma patogenezisében játszott kiemelkedő szerepük miatt érdemelnek említést (Bäck és mtsai., 2014). Ezzel szemben a lipoxinok a gyulladás természetes eliminálásáért felelősek (Chandrasekharan és mtsa., 2015). Érdemes megemlíteni, hogy míg a 15-LOX esetében a 2-AG és az arachidonsav (AA) azonos affinitással képes az enzimhez kötődni, addig a 12-LOX az AA-t preferálja a 2-AG-val szemben (Kozak és mtsai., 2002; Moody és mtsai., 2001; van Zadelhoff és mtsai., 1998).

#### 4.1.2.7. A 2-AG izomerizációja

A 2-AG enzimatiskus inaktiválása mellett egy viszonylag egyszerű kémiai jelenség is alapvetően befolyásolja a 2-AG koncentrációját a felszabadulását követően, ez pedig a 2-monoglicerolokra általánosan jellemző termodinamikai instabilitás, melynek következtében a 2-AG vizes közegben hajlamos spontán molekuláris átrendeződésre: a molekula arachidonil csoportja a glicerin 2. szénatomjáról az 1. szénre vándorol. Ez az acilvándorlásként is ismert folyamat egy termodinamikailag stabilabb új molekula, az 1-AG létrejöttét eredményezi, és a 2-AG mennyisége az 1-AG-hoz viszonyítva 1:9 aránynál stabilizálódik (Martin, 1953). Habár az acilvándorlás alapvetően befolyásolhatja a 2-AG koncentrációját a különböző szövetekben, általánosan elfogadott, hogy a 2-AG által mediált jelátvitel terminálását enzimatiskus folyamatok végzik (Muccioli, 2010; Savinainen és mtsai., 2012). A 2-AG lebontását végző enzimek expressziója azonban erőteljesen sejt- és szövetspecifikus. A központi idegrendszerben például a 2-AG döntő hányadát az MGL hidrolizálja, miközben a makrofágokban a ligand bontását szinte kizárólag az ABHD12 végzi (Fiskerstrand és mtsai., 2010; Muccioli, 2010). A hidrolázok szubsztrát specificitása ráadásul eltérő: míg az MGL közel azonos affinitással rendelkezik az 1-AG és 2-AG iránt, addig az ABHD6 és ABHD12 az 1-AG-t preferálja a 2-AG-val szemben (Navia-Paldanius és mtsai., 2012). Mindezek következtében a 2-AG eltávolításának sebességét az enzimatiskus lebontás és az izomerizáció feltehetően együttesen határozza meg. A központi idegrendszer számos, a 2-AG jelpálya által erőteljesen szabályzott régiójában azonban alig áll rendelkezésre adat a CB<sub>1</sub> és a 2-AG-t bontó enzimek egymáshoz viszonyított elhelyezkedéséről. Így például semmit sem tudunk arról, hogy az MGL megjelenik-e egyáltalán a gerincvelő felületes hátsó szarvában, miközben a CB<sub>1</sub> erőteljes expresszióját itt már korábban leírták (Farquhar-Smith és mtsai., 2000; Hegyi és mtsai., 2009).

A centrális szinapszisok működésének szabályozásában betöltött központi szerepe, illetve az intercelluláris kommunikációban játszott szerepe miatt a 2-AG szöveti mennyiségét számos kutatócsoport tanulmányozta korábban. A 2-AG kvantitatív analízise során kapott adatokat azonban nem csak az adott sejt vagy szövet típusa, hanem a kísérletes módszerek és a mintaelőkészítés, sőt az adatok interpretációja is nagyban befolyásolja. Számos közlemény ugyanis a 2-AG mennyiségét a 2-AG és az 1-AG mennyiségeinek összegeként adja meg amiatt, hogy a monoglicerolszármazékok izomerizációját egyes kísérletek során mintaelőkészítési műtermékként azonosították (Ferrer és mtsai., 2003; Hohmann és mtsa., 2006; Van Sickle és

mtsai., 2005). Mindezek magyarázatként szolgálhatnak arra, hogy a központi idegrendszerben, még adott agyterületen belül is, a 2-AG-nak a különböző kutatócsoportok által meghatározott koncentrációja akár 2 nagyságrenddel is különbözhet (Hohmann és mtsa., 2006).

A 2-AG izomerizációjának jelentőségét mutatja, hogy több kutatócsoport is kimutatta az 1-AG biológiai aktivitását. Irodalmi adatok alapján az 1-AG a CB<sub>1</sub>-en keresztül hatva az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció növekedéséhez vezet (Sugiura és mtsai., 1999), de az 1-AG képes a TRPV1 aktiválására is (Zygmunt és mtsai., 2013). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 2-AG izomerizációjával egy új biológiailag aktív molekula keletkezik, mely képes ugyanazokat a receptorokat aktiválni, mint a saját prekursora.

#### **4.1.3. Kannabinoid receptorok**

Az 1980-as évek végéig tartotta magát a THC nem specifikus hatásmechanizmusainak elmélete, miszerint a THC zsíroldékonyságának következtében képes beoldódni a sejtmembránba, ezáltal befolyásolva annak biofizikai tulajdonságait. A szintetikus THC analógok, illetve triciklikus és biciklikus kannabinoid származékok előállítására, illetve ezeknek a vegyületeknek a biológiai aktivitásprofilja vezetett arra a felismerésre, hogy a kannabinoidok valamilyen receptorhoz kötődve, specifikus módon váltják ki a hatásaikat (Devane és mtsai., 1988; Melvin és mtsa., 1987). Röviddel ezután autoradiográfiai vizsgálatok segítségével Herkenham és mtsai. kimutatták, hogy a kannabinoid kötő receptorok száma megközelíti a GABA és a glutamát kötő receptorok számát az agyban (Herkenham és mtsai., 1990). Mára azonban nem csupán az derült ki, hogy a CB<sub>1</sub> a központi idegrendszer egyik legelterjedtebb G-protein kapcsolt receptora (Katona mtsa., 2008), hanem az is, hogy a kannabinoidok további receptorokat is képesek aktiválni, többek között a GPR55 vagy a TRPV1 receptort (Pacher és mtsai., 2006), ami nagyban hozzájárul a kannabinoidok aktivitásprofiljának szélesítéséhez.

##### **4.1.3.1. CB<sub>1</sub> receptor**

A kannabinoidok központi idegrendszeri hatásainak közvetítésében a CB<sub>1</sub> játssza a legfontosabb szerepet, amit többek között az is bizonyít, hogy a CB<sub>1</sub>-et kódoló gén kiütésével a kannabinoidok alkalmazását követően jellemzően kialakuló reakciók, pl. a kannabinoid indukált

csökkent motoros aktivitás vagy antinocicepció, szinte teljesen eltűnnek (Ledent és mtsai., 1999; Zimmer és mtsai., 1999).

Az első autoradiográfias vizsgálatok a kannabinoid kötőhelyeket elsősorban a substantia nigra pars reticulatában, a corpus striatumban, a gyrus dentatusban, továbbá a gyrus cinguli területén azonosították (Herkenham és mtsai., 1990). Később a nagyobb feloldású, immunhisztokémiai módszereken alapuló morfológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a központi idegrendszer területén a CB<sub>1</sub> feltűnően heterogén expressziós mintázatot mutat, amely azonban egybevág a kannabinoidok szenzoros, motoros és kognitív működésekre gyakorolt hatásait közvetítő területekkel. Ennek megfelelően erőteljes CB<sub>1</sub> expressziót írtak le az agykéreg számos területén, a hippocampusban, a törzsdúcokban, a kisagyban és a gerincevelő fájdalomfeldolgozással kapcsolatos területein is (Egertová és mtsa., 2000; Hegyi és mtsai., 2009; Katona és mtsai., 1999; Tsou és mtsai., 1998; 2004), ugyanakkor roppant alacsony szintű expresszió figyelhető meg a kardiovaszkuláris és respiratorikus rendszerek működését szabályozó agytörzsi területeken (Herkenham és mtsai., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992). Minden vizsgált idegrendszeri struktúrában - az agykéregtől a kisagyon át - a neuronok axonterminálisain, azaz preszinaptikusan találták (Herkenham és mtsai., 1990; Katona és mtsai., 2000; Kawamura és mtsai., 2006; Marsicano és mtsa., 1999).

A CB<sub>1</sub> G-fehérje kapcsolt receptor, melynek jelátvittele a G-fehérje típusától és alegységeitől függően többféle útvonalon keresztül megvalósulhat. A kapcsolt G fehérjétől függően a CB<sub>1</sub> aktiválása a következő hatásokban nyilvánulhat meg.

*Az adenilát cikláz aktivitásának modulálása.* Neuroblasztóma sejteken, majd később számos sejttypusban, is kimutatták, hogy CB<sub>1</sub> aktiváció az adenilát-cikláz aktivitásának gátlásához vezet (Howlett and Fleming, 1984), melynek háttérében a G<sub>i/o</sub> proteinek érintettsége igazolódott (Howlett és mtsai., 1986). Pertussis toxinnal kezelt sejtekben azonban azt is kimutatták, hogy a CB<sub>1</sub> aktiválása az adenilát cikláz aktivitásának fokozódását idézheti elő, ami arra utal, hogy bizonyos körülmények között a CB<sub>1</sub> G<sub>s</sub> fehérjéhez kapcsolódik, melynek következménye a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) mennyiségének növekedése (Felder és mtsa., 1998; Kearn és mtsai., 2005). Ez arra utal, hogy a CB<sub>1</sub> G<sub>i/o</sub>- és G<sub>s</sub>-kötő kettős természete az adenilát-cikláz aktivitását különbözőképpen módosíthatja, elsősorban az adott sejtre jellemző adenilát-cikláz izotípustól függően (Furuyama és mtsai., 1993; Maneuf és mtsa., 1997; Rhee és mtsai., 1998).

*Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció szabályozása.* Asztrocitákban a neuronokból felszabaduló endokannabinoidok hatására aktiválódó  $CB_1$  az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedését is indukálja, amely egy speciális neuron-asztrocita kommunikációhoz teremti meg a hátteret, hiszen a gliotranszmisszió feltételezések szerint minden ismert gliotranszmitter esetében  $Ca^{2+}$ -függő (Navarrete és mtsa., 2008). A gliotranszmisszió  $Ca^{2+}$ -függő mivoltát cáfoló eredményektől függetlenül (McCarthy és mtsai 2018) ez a folyamat  $G_q$  fehérjén keresztül aktivált PLC működése révén valósul meg. Ezt a mechanizmust  $CB_1$ -gyel transzfektált HEK293 sejtek (Braioliu 2011) mellett asztrocitákon (Navarrete és mtsa., 2008) is leírták.

*Ioncsatornák működésének módosítása.* A  $CB_1$  aktivációja  $G_{i/o}$  útvonalon keresztül idézi elő a G-protein kapcsolt, befelé egyenirányító  $K^+$  csatornák (GIRK) aktivitásának fokozódását (Mackie és mtsai., 1995). A 90-es évek végén Straiker és mtsai. retina bipolaris sejtjeiben kimutatták, hogy  $CB_1$  aktivációt követően csökken az L-típusú feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák aktivitása (Straiker és mtsai., 1999). CA1 hippocampális neuronokban kimutatták, hogy szintetikus  $CB_1$  agonista adagolása az M-áram gátlásához vezet (Schweitzer és mtsai., 2000). Ezzel párhuzamosan több munkacsoport is bebizonyította, hogy a kannabinoid aktiváció az N-típusú és a P/Q-típusú csatornákra is hasonló hatással van (Azad és mtsai., 2008; Brown és mtsai., 2004; Mackie és mtsa., 1992; Mackie és mtsai., 1995; Pan és mtsai., 1996; Twitchell és mtsai., 1997). Ennek megfelelően a neuronokban elsőként leírt preszinaptikus gátlás hátterében a  $CB_1$  rövid ideig tartó aktiválása húzódik, amely a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatorna működésének gátlásával éri el a neurotranszmisszió átmeneti csökkenését (Henry és mtsa., 1995; Mackie és mtsa., 1992; Mackie és mtsai., 1995). A THC által kiváltott, illetve az endokannabinoidokhoz köthető kognitív, szenzoros és motoros hatások többsége valószínűleg a preszinaptikus gátlás ilyen formáján keresztül valósulnak meg (Huestis és mtsai., 2001).

*A mitogén-aktivált protein kináz útvonal aktiválása.* A  $CB_1$  percekken vagy akár órákon át tartó aktivációja számos sejtípus, többek között a neuronok génexpressziós profiljának változásához vezethet (Marsicano és mtsai., 2003). A G-protein kapcsolt receptorok aktivációját gyakran követi a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád útvonalak aktiválódása. Ennek következménye lehet számos kináz, például az ERK1/2, c-Jun N-terminális kináz, a p38 MAPK vagy az ERK5

aktiválódása. Ezeken révén a sejtek proliferációja és differenciálódása egyaránt szabályozható (Turu és mtsa., 2010).

#### **4.1.3.2. CB<sub>2</sub> receptor**

A CB<sub>2</sub> egy 360 aminosavból álló G-protein kapcsolt receptor, melynek aminosav szekvenciája 44%-ban egyezik meg a CB<sub>1</sub> aminosav szekvenciájával. A CB<sub>2</sub> megoszlását és funkcióját tekintve korántsem olyan nagy az egyetértés, mint az volt 30 évvel ezelőtt. Eleinte, mint periférián expresszálódó receptort mutatták ki makrofágokon (Munro és mtsai., 1993), majd RT-PCR, in situ hibridizációs és immunhisztokémiai vizsgálatok egyaránt igazolták a jelenlétét a központi idegrendszer területén is, elsősorban mikrogliá sejteken (Gong és mtsai., 2006; 2004). Ma már ismert, hogy nem csupán az immunrendszer sejtjeire korlátozódik a CB<sub>2</sub> jelenléte, hanem neuronokon is expresszálódik (Gong és mtsai., 2006).

A CB<sub>1</sub>-hez hasonlóan a CB<sub>2</sub> is képes az adenilát cikláz és a MAP kináz aktivitás módosítására. CB<sub>2</sub>-vel transzfektált sejtvonalon végzett kísérletekben kimutatták, hogy CB<sub>2</sub> aktiváció adenilát cikláz gátlást és a cAMP koncentrációjának csökkenését okozza, amely hatás pertussis toxin érzékenysége a G<sub>i/o</sub> jelátviteli útvonal érintettségét mutatja (Bayewitch és mtsai., 1995; Slipetz és mtsai., 1995). Egyes sejt típusokon, többek között tüdő endotél sejtekben az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció növekedését figyelték meg CB<sub>2</sub> aktiválódását követően (Zoratti és mtsai., 2003). A CB<sub>1</sub>-gyel ellentétben azonban a CB<sub>2</sub> nem kötődik G<sub>s</sub> fehérjéhez (Felder és mtsa., 1998). A MAPK szignáltranszdukciós kaszkád három fő útvonalán keresztül hathatnak: az ERK, a JNK és a p38 útvonalakat is aktiválhatják (Howlett és mtsai., 2002). A CB<sub>2</sub> aktivációjának anti-inflammatorikus hatását is kimutatták, neuroinflammáció során a CB<sub>2</sub> aktivációja csökkentette a nitrogén monoxid és TNF $\alpha$  termelést (Ehrhart és mtsai., 2005).

#### **4.1.3.3. TRPV1**

A TRPV1, vagy vanilloid receptor-1 a tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád tagja, melyet 1997-ben klónoztak először (Caterina és mtsai., 1997). A TRPV1 egy Ca<sup>2+</sup> permeábilis, nem szelektív kation csatorna, melyet elsősorban a 42°C feletti hőmérséklet, protonok illetve az endokannabinoid ligandok közül az anandamid is aktiválhat. Korábban leírták, hogy a kapszaicin-érzékeny primer szenzoros neuronokon, melyek a CB<sub>1</sub>-et és a TRPV1-et együttesen fejezik ki, az

anandamid hatása kettős lehet: a CB<sub>1</sub>-en keresztül gátló, míg TRPV1-en keresztül serkentő hatás kifejtésére képes. Fiziológias körülmények között a TRPV1 aktivációja Na<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> beáramlását, és K<sup>+</sup> kiáramlását idézi elő primer szenzoros neuronokban. Ezek az áramok depolarizálják a TRPV1-et expresszáló neuronokat aktiválva ezzel a feszültség-függő ion csatornákat, mely megnöveli az akciós potenciálok kialakulásának esélyét, Ca<sup>2+</sup> beáramlását, illetve a Ca<sup>2+</sup>-függő transzmitter felszabadulás lehetőségét (Eun és mtsai., 2001, Marshall és mtsai., 2003, Karai és mtsai., 2004).

Jelentőségét mindenekelőtt a szöveti károsodásból fakadó fájdalmas ingerek érzékelésében, illetve a termális hiperalgézia kialakulásában játszott meghatározó szerepe adja (Caterina és mtsa., 2001; Caterina és mtsai., 2000). Fontos azonban megjegyezni, hogy a TRPV1 a központi idegrendszer számos területén, többek között a gerincvelő hátsó szarvában is expresszálódik (Guo és mtsai., 1999), ahol a hőmérséklet növekedése vagy a savas pH fiziológias körülmények között nem aktiválhatja, ami a receptor további, endogén ligandjainak, az endovanilloidoknak a jelentőségét emeli ki. Az endovanilloid ligandok között tartjuk számon az N-arachidonil-dopamin mellett az anadamidot is, amely – a CB<sub>1</sub> és a TRPV1 ligandjaként - kiemelt szerepet játszik az endokannabinoid és az endovanilloid rendszer működésének integrálásában, hiszen elsődlegesen mindkét receptor az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációt szabályozza. (Starowicz és mtsai., 2007).

#### ***4.1.4. Az endokannabinoid rendszer szerepe a szinaptikus plaszticitás különböző formáinak kialakításában***

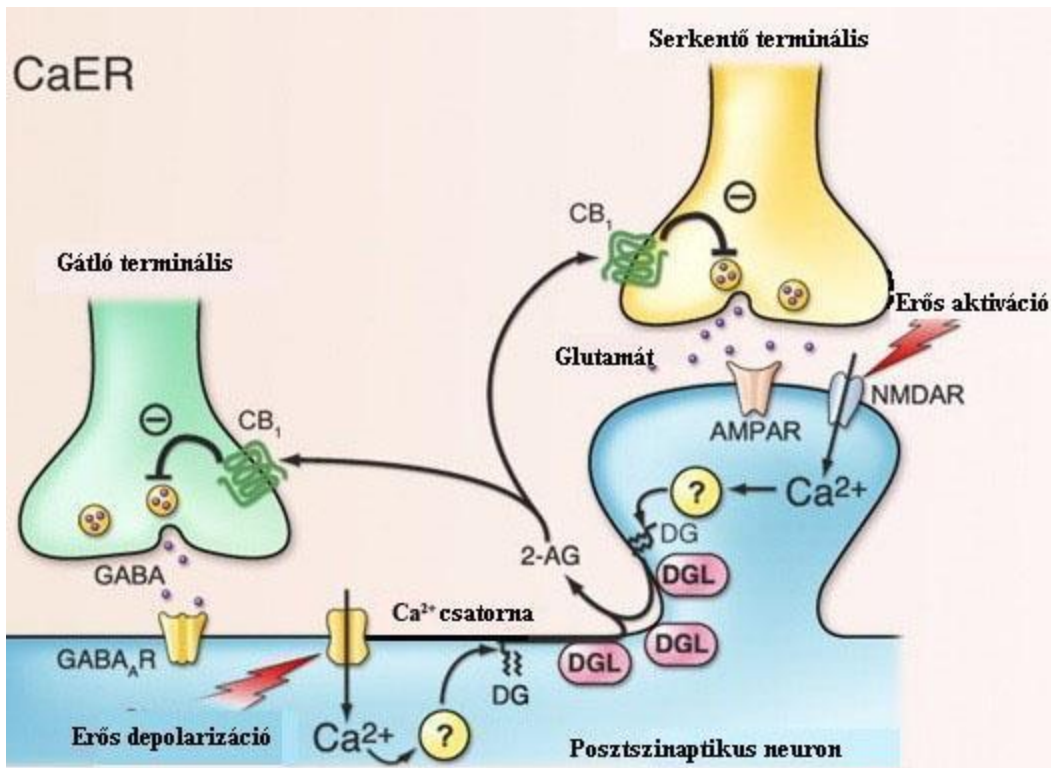
A szinaptikus plaszticitási folyamatoknak az időbeli lefutásuk alapján két formáját különböztetjük meg: a rövid távú (néhány 10 milliszekundumtól néhány percig tartó) és a hosszú távú (néhány perctől pár óráig tartó) plaszticitást. A 2000-es évek elejére általánosan elfogadottá vált, hogy az endokannabinoidok által mediált retrográd szinaptikus jelátvitel kiemelt szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás számos formájának kialakításában. Ennek felismerésében mérföldkőnek számított a retrográd jelátvitel egy egyedülálló, lassú, Ca<sup>2+</sup>-függő módjának felfedezése, melyet a 90-es évek elején két kutatócsoportnak egymástól függetlenül sikerült leírni. Llano és mts. a kisagy Purkinje sejtjeiben, míg Pitler és Alger a hippocampus CA1 sejtjeiben figyelték meg, hogy elnyújtott posztszinaptikus depolarizációt követően a posztszinaptikus IPSC-k (gátló posztszinaptikus áram) kialakulása átmenetileg csökken, melynek hátterében a GABAerg neurotranszmisszió preszinaptikus gátlása húzódott meg (Llano és mtsai., 1991; Pitler és mtsa.,

1994). A rövid távú szinaptikus plaszticitásnak ezt a formáját depolarizáció-indukált gátláscsökkenésnek (DSI) nevezték el (Alger és mtsa., 1995). Mindkét esetben kimutatták, hogy a DSI kialakulásához a posztzinaptikus dendrit intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának növekedése szükséges, mely egy retrográd jelátviteli molekula termeléséhez vezet, ami a preszinaptikus terminálison hatva átmenetileg felfüggeszti a GABA felszabadítását. Amíg azonban az mGluR antagonistá MCPG semmilyen hatással sincs a DSI kialakulására, addig az teljesen eltűnik a  $\text{CB}_1$  antagonistá SR141716A, AM251 vagy AM281 adagolását követően (Wilson és mtsa., 2001), bizonyítva, hogy a DSI háttérében egy endokannabinoid-mediált jelenség áll. A DSI-t gerincvelői glicinerg neuronok esetében is sikerült igazolni, mellyel a gátlás gátlása, vagyis diszinhibíció érhető el (Zeilhofer és mtsai 2009, Christie és mtsai 2001)

Kreitzer és mts. azt is kimutatták, hogy a kisagyban a serkentő szinaptikus neurotranszmisszió is retrográd szabályozás alatt áll. Kísérleteikben mind a parallel rostok, mind pedig a kúszó rostok által kiváltott EPSC-k (serkentő posztzinaptikus áram) csökkenését figyelték meg posztzinaptikus depolarizációt követően. A korábban már leírt DSI-hez való hasonlósága miatt a jelenséget a serkentés depolarizációval kiváltott csökkenésének (DSE) nevezték el. A  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor BAPTA (1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav) adagolását követően a DSE gyakorlatilag teljesen eltűnt, bizonyítva, hogy a DSE kialakulásához is megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció szükséges (Kreitzer és mtsa., 2001). A DSE-t a gerincvelőben is sikerült kimutatni ahol a substantia gelatinosaában WIN és anandamid adagolását követően csökkentette a glutamáterg neuronok spontán szinaptikus aktivitásának frekvenciáját (Urban és mtsai 2001)

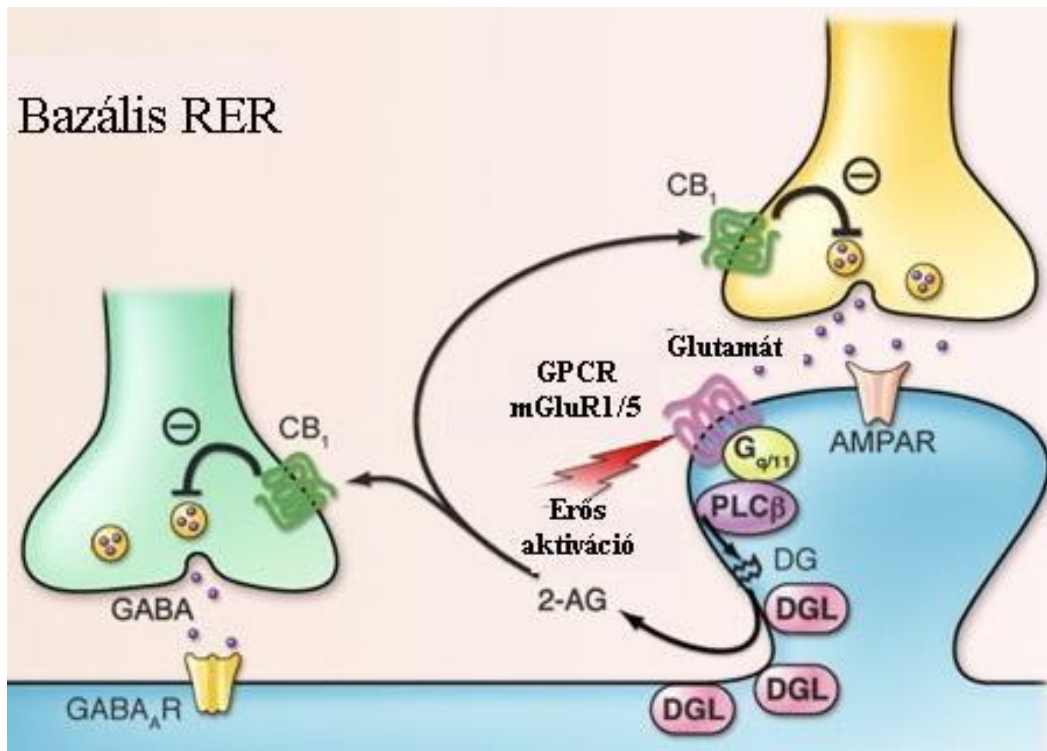
#### **4.1.4.1. Az endokannabinoid-mediált rövid szinaptikus gátlás**

Az eCB-STD-t számos agyterületen vizsgálták, és több, egymástól részben vagy teljesen független mechanizmust is sikerült igazolni a háttérében. A DSI/DSE kialakulásához vezet a posztzinaptikus  $\text{Ca}^{2+}$  mikromoláris koncentrációra történő növekedése. Ezt a folyamatot  $\text{Ca}^{2+}$ -asszisztált endokannabinoid felszabadításnak (CaER) hívják, és a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák vagy NMDA receptorok aktiválódása vezet az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedéséhez. Ennek következtében a DGL- $\alpha$  segítségével 2-AG termelődik, mely a preszinaptikus  $\text{CB}_1$  aktiválásán keresztül függeszti fel a neurotranszmitter felszabadulást (3. ábra) (Kano és mtsai., 2009).



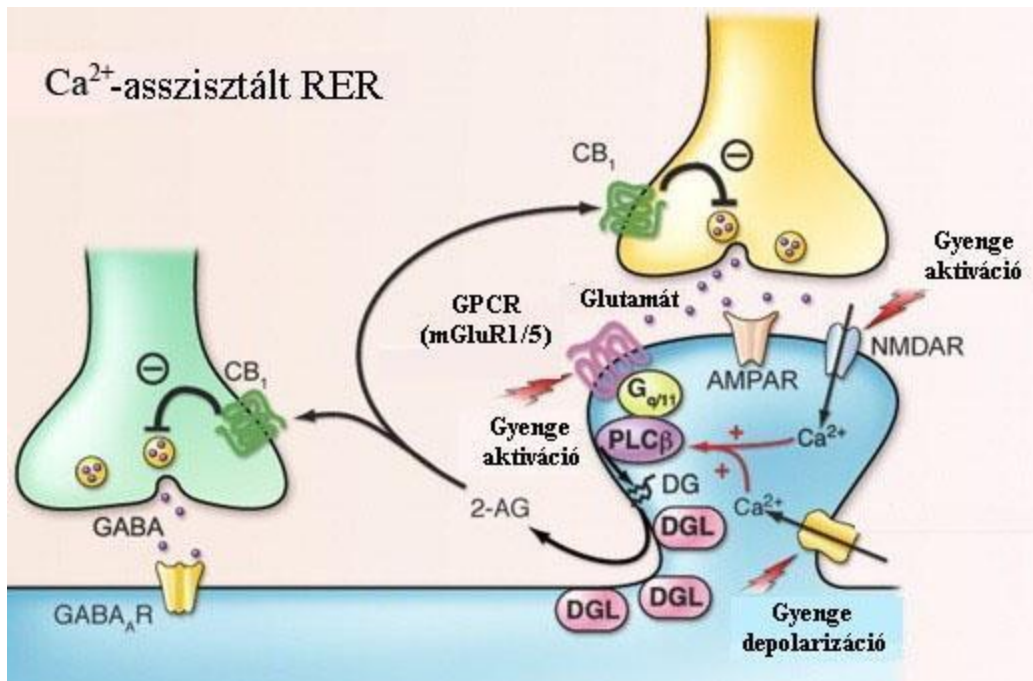
**3. ábra: CaER mechanizmusa. A posztszinaptikus dendrit erőteljes depolarizációjának hatására kinyílnak a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák, ami intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedéshez és 2-AG termeléséhez vezet. (Kano és mtsai., 2009)**

Az eCB-STD-nek egy másik formája ugyanakkor rezisztens BAPTA adagolásra, azaz a kialakulása nem feltételezi az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedését. Ebben az esetben a metabotróp glutamát receptorok (mGluR1/5), illetve a muszkarin típusú acetilkolin receptorok (mAChR) szerepét bizonyították elsőként (Galante és mtsa., 2004). Mivel a G-protein kapcsolt receptorok aktiválása az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedése nélkül is képes endokannabinoid termelés kiváltására, az eCB-STD ezen formáját bazális receptor-asszisztált endokannabinoid felszabadításnak (bazális RER) nevezték el (Kano és mtsai., 2009). A G-protein kapcsolt receptorok közül többek között az mGluR 1/5, az M1/M3 muszkarin típusú ACh receptorok, oxytocin receptorok és az orexin receptorok képesek bazális RER-t létrehozni. Ezen receptorok mindegyike a foszfolipáz  $\beta$  (PLC $\beta$ ) aktivitását fokozza a  $\text{G}_{q/11}$  útvonalon keresztül, mely a DGL- $\alpha$  aktiválásához és 2-AG termeléséhez vezet (4. ábra) (Kano és mtsai., 2009).



4. ábra: “Bazális RER”. A  $G_{q/11}$  típusú receptorok aktiválása  $PLC\beta$  útvonalon keresztül képes a 2-AG termelés kiváltására. (Kano és mtsai., 2009)

Az endokannabinoidok felszabadításának egy további módja, amikor egy gyenge posztszinaptikus  $G_{q/11}$  aktiváció és egy enyhe (szubmikromoláris) intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedés egyszerre figyelhető meg. Ebben az esetben a  $PLC\beta$  egyfajta koincidencia detektorként integrálja  $G_{q/11}$  receptorok aktiválódásából és az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció növekedéséből származó szignálokat, így kiváltva a  $Ca^{2+}$ -asszisztált RER-nek nevezett plaszticitási formát (5. ábra) (Kano és mtsai., 2009).



**5. ábra: Ca<sup>2+</sup>-asszisztált RER. Enyhe intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció növekedés és a G<sub>q/11</sub> típusú receptor gyenge aktiválása együttesen vezet 2-AG termeléshez. (Kano és mtsai., 2009)**

A kisagyban a parallel rostok depolarizációja, az mGluR1 receptorok aktivációja és a rostok elektromos stimulációja mind képesek a kúszó rostokból Purkinje sejtek irányába történő serkentő neurotranszmisszió csökkentésére, ezt a hatást a CB<sub>1</sub> antagonisták gátolja (Maejima és mtsai., 2001). Érdeemes megjegyezni, hogy ebben az esetben a DSE heteroszínaptikus mechanizmusáról beszélünk. Azonban a parallel rostok elektromos ingerlése képes a parallel rostokból a Purkinje sejtek felé történő serkentő neurotranszmisszió gátlására is, mely a DSE homoszinaptikus formáját jelenti (Brown és mtsai., 2003). További kísérletek azonban azt is kimutatták, hogy a parallel rostok elektromos stimulációja képes a spontán IPSC-k tartós csökkentésére a Purkinje sejtekben. Ennek a jelenségnek a háttérében is az mGluR1 receptor aktivációjának következtében termelődő 2-AG áll, melyből jól látszik, hogy a DSI szintén heteroszínaptikus formája az eCB-STD-nek, tehát a GABAerg axonterminálisok működésének CB<sub>1</sub>-függő modulációja ugyancsak serkentő posztzínaptikus neuron aktivációját feltételezi (Galante és mtsai., 2004).

#### 4.1.4.2. Endokannabinoid-mediált hosszú távú depresszió

Az endokannabinoidok felszabadulását követően különböző molekuláris mechanizmusok képesek a szinaptikus transzmisszió hosszantartó modulálására (eCB-LTD) is. Habár az eCB-STD kialakulásában szerepet játszó valamennyi mechanizmus szerepet játszhat a szinapszisok működésének hosszantartó modulálásában is (Bender és mtsai., 2006; Ito, 2001; Kreitzer és mtsai., 2005; Nevian és mtsai., 2006; Robbe és mtsai., 2002), számos olyan szignálútvonalról igazolódott, hogy specifikusan az eCB-LTD kiváltásában játszik szerepet. Mind a serkentő mind pedig a gátló szinapszisok esetében bizonyították a  $G_{i/o}$  protein  $\alpha$  alegységének jelentőségét, mely a cAMP/PKA útvonal gátlásán keresztül az aktív zóna RIM1 $\alpha$  fehérjéjének defoszforilációjához, és ennek következtében a neurotransmitter felszabadulás csökkenéséhez vezet (Chevalyre és mtsai., 2007). Fontos megjegyezni, hogy a cAMP/PKA útvonal gátlása a preszinaptikusan található feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák poszttranszlációs módosításának változtatása, illetve ennek következtében a  $Ca^{2+}$  beáramlás csökkentése révén is eCB-LTD kialakulásához vezethet (Mato és mtsai., 2008).

#### 4.1.5. Az endokannabinoid rendszer szerepe a gliasejtek működésének szabályozásában

A  $CB_1$  számos központi idegrendszeri terület (Tipold és mtsai., 2017), így a nucleus accumbens (Rodriguez és mtsai., 2001), a hippocampus (Navarrete és mtsai., 2008, 2010), illetve a gyrus cinguli és amygdala asztrocitáin (Moldrich és mtsai., 2000), továbbá a gerincvelő felületes hátsó szarvának asztrocitáin (Hegyi és mtsai., 2009) is expresszálódik. A  $CB_1$  asztrocitákban az ERK és PKB szignálútvonalakat aktiválva befolyásolja a sejtek differenciálódását és túlélését (Gómez Del Pulgar és mtsai., 2002), növeli a sejtek általános anyagcseréjét, és ezen keresztül az agy energiaháztartására is hatással van (Blázquez és mtsai., 1999). A centrális szinapszisok működésének szempontjából kiemelt jelentőségű lehet, hogy a  $CB_1$  asztrocitákban a  $G_q$  útvonalat is képes aktiválni, ami az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedéséhez vezet (Navarrete és mtsai., 2014). Tekintettel arra, hogy a gliotranszmisszió  $Ca^{2+}$ -függő folyamat lehet (Volterra és mtsai., 2014), a  $CB_1 - G_q - PLC$  jelpálya fontos szerepet játszhat az asztrogliá és a neuronok közötti kétirányú kommunikáció megvalósításában. A kannabinoid rendszer részvételét a neuronok és asztrociták közötti reciprok jelátvitelben igazolták már többek között a hippocampusban, ahol a neuronális eredetű endokannabinoidok aktiválják az asztrocitákon található  $CB_1$ -t, amelyek

válaszként  $\text{Ca}^{2+}$ - függő módon glutamátot szabadítanak fel, ami a közelben levő neuronok működésére hathat (Navarrete és mtsa., 2010; Navarrete és mtsai., 2014).

Mivel az asztrociták részvétele a szinaptikus transzmisszió modulálásában, illetve ezen keresztül egy sor élettani és patológiás folyamat, mint pl. az epilepszia vagy a krónikus fájdalom kialakulásának hátterében tettenérhető. Emiatt az asztrociták endokannabinoid rendszere, illetve a kannabinoid-mediált glia-neuron interakciók feltételezhetőleg szerepet játszanak a központi idegrendszeri információfeldolgozás szabályozásában (Navarrete és mtsai., 2014).

## 4.2 *Az endokannabinoid rendszer a gerincvelő felületes hátsó szarvában*

*Kannabinoid ligandok és szintézisük a gerincvelőben.* Laboratóriumunk korábbi munkáiból ismert, hogy a két legfontosabb endokannabinoid ligand szintéziséért felelős enzim megtalálható a gerincvelő felületes hátsó szarvában, ám megoszlási mintázatuk nagyban eltér egymástól: míg a DGL- $\alpha$  expressziója a gerincvelő I-II laminájára korlátozódik, addig a NAPE-PLD homogén megoszlást mutat. Ugyanakkor mindkét enzimről elmondható, hogy a neuronok szomatodendritikus kompartmentje mellett gliasejtek nyúlványain is jelentős mennyiségben fordulnak elő, azaz a gerincvelő hátsó szarvában valószínűleg mind a neuronok, mind a gliasejtek képesek lehetnek anandamid és 2-AG mobilizálására (Hegyi és mtsai., 2012). A kannabinoid ligandok gerincvelői mennyiségét gázkromatográfiás-tömegspektroszkópos (GC/MS) módszerrel igazolták. Fiziológias körülmények között az anandamid 20-27 pmol/g (DiMarzo és mtsai., 2000), a 2-AG pedig 430 pmol/g mennyiségben fordul elő a gerincvelőben (Huang és mtsai., 1999). Semmilyen adat nem áll azonban rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a neuronok és a gliasejtek milyen arányban vesznek részt az endokannabinoidok szintézisében. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy patológias körülmények között, például neuropátiás fájdalom modellben mindkét ligand mennyisége megemelkedik a gerincvelőben (DiMarzo és mtsai., 2007).

*Kannabinoid receptorok a gerincvelőben.* A kannabinoidok hatását közvetítő receptorok CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> és TRPV1 expresszióját korábbi vizsgálatok ugyancsak megerősítették. A CB<sub>1</sub>-t a gerincvelő felületes hátsó szarvában változó arányban ugyan, de a primer afferensek és a gerincvelői interneuronok axonterminálisain éppúgy megtalálták, mint a gliasejteken (Farquhar-Smith és mtsai., 2000; Salio és mtsai., 2002). A CB<sub>2</sub> gerincvelői expresszióját fiziológias és kóros körülmények között is elsősorban mikroglia sejteken sikerült igazolni (ODonell és mtsai., 2003), de irodalmi adatok alátámasztják a CB<sub>2</sub> neuronális lokalizációját is (Racz és mtsai., 2008). Ráadásul a 2-AG és az anandamid hatásait a CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> mellett a TRPV1 is közvetítheti, melynek expresszióját a primer afferensek centrális nyúlványain és gerincvelői asztrocitákon egyaránt bizonyították (Spicarova és mtsai., 2008, 2014; Chen és mtsai. 2009; Hegyi és mtsai., 2009). Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy kannabinoid felszabadulást követően a CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> és TRPV1 receptorok aktivációja is feltételezhető, ami a receptorok a megoszlásának megfelelően a primer afferensek egy populációjának boutonjait, a serkentő és gátló interneuronok axonterminálisainak egy részét, de a gliasejtek működését is befolyásolhatja.

*A kannabinoidok lebontása a gerincvelőben.* Az endokannabinoid-mediált szignalizáció befejezését a ligandok lebontását katalizáló enzimek végzik. Fiziológias körülmények között mind a 2-AG, mind az anandamid lebontásának meghatározó mechanizmusa a hidrolitikus degradáció, amelyet a 2-AG esetén nagyrészt az MGL, kisebb részben az ABHD6 és ABHD12, anandamid esetén pedig elsősorban a FAAH katalizál. Az endokannabinoidok bontásában ezenkívül különböző oxidázok, így a COX-2 és a lipoxigenázok is részt vesznek, azonban az oxidatív lebontás jelentősége valószínűleg patológias körülmények között emelkedik meg. Munkánk kezdetekor az endokannabinoidok gerincvelői szintű oxidatív lebontásáról számos adat állt rendelkezésre (Groppelt-Struebe és mtsai., 1997; Hoffmann és mtsai., 2000; Campolo és mtsai., 2013; Gregus és mtsai., 2013), azonban a 2-AG és anandamid hidrolízisében szerepet játszó hidrolázok gerincvelői expressziójáról jóformán semmit nem tudtunk.

*A kannabinoidok szerepe a neurotranszmisszióra és a fájdalomfeldolgozásra a gerincvelőben.* A kannabinoid ligandok és receptorok jelenléte mellett nem meglepő, hogy akár kísérletesen adagolva, akár a neuronok működésének stimulációjával “termeltetve”, a kannabinoidok befolyásolják a szinaptikus transzmissziót. Már a 2000-es évek elején kimutatták, hogy a kannabinoidok gátolják a primer afferensek általi glutamát felszabadítást és csökkentik a spontán EPSC-k frekvenciáját a gerincvelő felületes hátsó szarvában (Morrisset és mtsai., 2001, Urban és mtsai., 2001), csökkentve ezáltal az A $\delta$  és C-rostok által kiváltott neuronális aktivitást (Kelly és mtsai., 2001). Ennek megfelelően a primer afferensek alacsony frekvenciájú stimulációja, és a gerincvelői interneuronok egyidejű depolarizációja endokannabinoid felszabadulást okoz, amely a CB<sub>1</sub> aktivációjával csökkenti a fájdalomérzékelést, méghozzá a gerincvelői glutamaterg nociceptív szinapszisokban kiváltott LTD-n keresztül által (Kato és mtsai., 2012). Ugyanakkor az endogén kannabinoidok mobilizációja CB<sub>1</sub>-függő módon csökkenti a gerincvelői gátló interneuronok axonterminálisainak működését is, ami a GABAerg és glicinerg neurotranszmisszió diszinhibícióján keresztül a hiperalgéria kialakulásában játszik szerepet (Pernia-Andrade és mtsai., 2009). Mindez jól mutatja, hogy a kannabinoid jelátvitelben szerepet játszó molekulák lokalizációja alapvetően befolyásolja az endokannabinoid ligandok felszabadulását követő reakcióknak a jellegét, hiszen attól függően alakul ki antinociceptív vagy pronociceptív hatás, hogy a CB<sub>1</sub> serkentő vagy gátló axonterminálisokon aktiválódik.

Az endokannabinoidok antinociceptív hatásában számos munkacsoport meglátta a terápiás potenciált. A CB<sub>1</sub> közvetlen aktiválása intrathecalisan alkalmazott WIN-nel erőteljesen mérsékli

gyulladásos, neuropátiás és csonttumoros fájdalom modellekben kialakuló hiperalgéziát és allodiniát egyaránt (Agarwal és mtsai., 2007; Zhu és mtsai., 2009; Cui és mtsai., 2011). A 2-AG - CB<sub>1</sub> jelátvitel fokozása az MGL gátló JZL184 alkalmazásával ugyancsak csökkenti a mechanikai és hideg allodiniát mind neuropátiás, mind gyulladásos fájdalom modellben. (Wilkerson és mtsai., 2012, Woodhams és mtsai., 2012; Guindon és mtsai., 2013). A 2-AG és az anandamid hidrolízisének egyidejű gátlása MGL-FAAH duál inhibitor JZL195-tel szinte teljesen megszünteti a perifériás gyulladással indukált fájdalmat (Lau és mtsai., 2014). A biztató eredményeket azonban beárnyékolja, hogy a neuropátiás fájdalom kezelésére kifejlesztett FAAH inhibitornak, a BIA 10-2474-nak az első humán alkalmazása során fázis 1. klinikai vizsgálatban 90 résztvevő önkéntes közül öten szenvedtek maradandó agykárosodást (Kaur és mtsai., 2016).

*A gerincvelői endokannabinoid rendszerrel kapcsolatos nyitott kérdések.* Bár a kannabinoidok hatása a szinaptikus transzmisszióra, illetve a fájdalomfeldolgozásra látszólag jól ismert, a különböző fiziológiás illetve patológiás állapotokban lokálisan felszabaduló endokannabinoidok hatása nagyon különbözhet a szisztémásan adott farmakonoknak, azaz az endokannabinoid jelátvitel globális módosításainak hatásától. Mindez a gerincvelő felületés hátsó szarvára leszűkítve is rengeteg, az endokannabinoid rendszerrel kapcsolatos kérdést vet fel, amelyek megnehezítik a mesterségesen bevitt hatóanyagok által kiváltott hatások mechanizmusának pontos értelmezését, és az így előidézett mellékhatások okának tisztázását is. Nem ismert többek között, hogy a gerincvelőben felszabaduló endokannabinoid ligandok antinociceptív hatását milyen mechanizmusok állítják le, ugyanis jóformán semmit sem tudunk arról, hogy az ebben résztvevő hidrolázok és oxidázok milyen sejteken és milyen mennyiségben vannak jelen a gerincvelő felületés hátsó szarvában. Nem ismert továbbá, hogy a különböző patomechanizmusú krónikus fájdalom állapotok kialakulása milyen változásokat vált ki az gerincvelői endokannabinoid rendszerben, azaz hogy változik-e akár a szintézisben, akár a lebontásban, akár a hatások közvetítésében részt vevő molekulák expressziója, és ha igen, milyen sejteken figyelhetők meg ezek a változások, és mindezek hogy járulnak hozzá a fájdalomfeldolgozás szabályozásának felborulásához. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása közelebb vihetne annak megértéséhez, hogy a kannabinoid-mediált jelátviteli folyamatok hogyan vesznek részt a fiziológiás fájdalom feldolgozásában, illetve ezeknek a plaszticitása hogyan járul hozzá a krónikus fájdalom indukciójához és fenntartásához.

## 5. CÉLKITŰZÉSEK

A 2-AG mediált jelátvitel leállításának lehetséges mechanizmusairól a gerincvelő hátsó szarvának vonatkozásában alig tudunk valamit. Ezért kísérleteink kezdetekor célunk az volt, hogy megvizsgáljuk:

- a 2-AG degradációjáért elsődlegesen felelősnek gondolt enzimnek, az MGL-nek a megoszlását a gerincvelő felületes hátsó szarvában és kifejeződését annak sejtípusain és az ott végződő axonterminálisokon

Mivel az MGL expressziója az axonterminálisokon és a gerincvelő hátsó szarvának sejtjein nagyon csekély mértékűnek mutatkozott, felvetődött a kérdés hogy a 2-AG inaktiválása valóban főleg enzimatikus úton történik e. A 2-AG-ról köztudott volt az izomerizációs képessége, kevés adat szolgált azonban a keletkező 1-AG-ról. Ezért egy egyszerű modellrendszerben, CB<sub>1</sub>-et expresszáló COS7 sejteken vizsgálni kívántuk

- a 2-AG izomerizációjának kinetikáját
- a 2-AG-ból keletkező 1-AG biológiai aktivitását, továbbá azt,

hogy a 2-AG izomerizációjával keletkező 1-AG befolyásolja-e a 2-AG – CB<sub>1</sub> jelátviteli útvonal működését

## 6. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 6.1 *Kísérleti állatok és a szöveti metszetek előkészítése*

A kísérleteket kilenc felnőtt patkányon (Wistar-Kyoto, 250-300 g, Gödöllő, Magyarország), két vad-típusú és egy MGL génkiütött egéren (Schlosburg és mtsai. 2010, Ken Mackie által a rendelkezésünkre bocsátva) végeztük. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által kiadott protokoll alapján végeztük, melyek megfeleltek az Európai Unió előírásainak. Az állatok nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg, i.p.) történő mély altatását követően Tyrode oldattal, majd pedig 0,1 M foszfát pufferben (PB, pH 7,4) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. A perfúziót követően a gerincvelő L3-L5 lumbális szegmentumait eltávolítottuk, négy órán keresztül az eredeti fixáló oldatban utófixáltuk, majd 0,1 M PB-ben feloldott szacharóz 10%-os majd pedig 20%-os oldatába merítettük, amíg le nem süllyedt. Ezt követően a sejtmembrán átjárhatóságának növelése érdekében a gerincvelők lumbális szegmenseit folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd szobahőmérsékletű 0,1 M PB-be merítettük. Ezt követően a mintákat 8%-os agarba ágyasztuk, majd vibrotóm segítségével 50 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

### 6.2 *Sejtkultúra és transzfekció*

A COS7 sejteket (forrás: ATCC, a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete által fenntartva) 10%-os borjú szérummal (Sigma-Aldrich, USA), 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2 mM glutaminnal kiegészített DMEM (Gibco, USA) táptalajon növesztettük 90%-os konfluenciáig ( $10^4$  sejt/cm<sup>2</sup>) 5% CO<sub>2</sub> és 95% oxigén keverékében 37°C-on. Az elektroporációt megelőzően a 75 cm<sup>2</sup> területű tenyésztő flaskák aljára letapadt sejteket Trypsin-etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA) kezeléssel felválasztottuk, centrifugáltuk (900 x g 10 min) és DMEM-ben reszuszpendáltuk ( $1.9 \times 10^5$  sejt/ml). Ezt a sejtszuspenziót alkalmaztuk a CB<sub>1</sub>/piros fluoreszcens fehérje (RFP) kotranszfekcióhoz (4 µg/ml RFP plazmid) és a kontroll RFP transzfekcióhoz (4 µg/ml RFP plazmid) is. Az elektroporációt egy ECM830 típusú elektroporátorral végeztük (BTX, Harvard Apparatus, USA) 2 mm átmérőjű egyszerhasználatos pipettával (Modell szám: 620, BTX, Harvard Apparatus, USA) a következő protokoll szerint: 220 V, két 500 µs hosszúságú impulzus 1 másodperces intervallumokkal.

### **6.3 Plazmid konstrukció**

A CB<sub>1</sub> COS7 sejtvonalba történő overexpressziójához pcDNA3-CB<sub>1</sub> típusú emlős expressziós vektort használtunk (Mary Abood ajándéka, Addgene plazmid # 13391, (Abood és mtsai., 1997). A transzfekció sikerességét egy, a pcDNA3-CB<sub>1</sub> plazmid CMV promótere által ellenőrzött CMV-Brainbow-1.0 H (Joshua Sanes ajándéka, Addgene plazmid #18720) típusú, RFP-t kódoló expressziós vektor koexpressziójával ellenőriztük (Livet és mtsai., 2007).

### **6.4 Western blot analízis**

A Western blot analízishez az állatok lumbális gerincvelői szegmentumait eltávolítottuk, majd szonikáltuk 20 mM koncentrációjú Tris lízis pufferben, amely a következő proteáz gátlókat tartalmazta: EDTA (4,0 mM), bis-aminoetil-glikoléter-tetraecetsav (EGTA, 2,5 mM), fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF, 0,002 mM) benzamidin (0,013 mM), pepstatin A (0,004 mM), szójabab tripszin inhibitor (0,001 mM), leupeptin (0,001 mM) és aprotinin (0,001 mM). A szonikált mintákból a sejtörmelékeket centrifugálással (1,500 g, 10 min, 4 °C) eltávolítottuk, majd ezt követően a felülúszót újra centrifugáltuk (12,000 g, 20 min, 4 °C). A pellet újraszuszpendálásához 1% Triton X-100 és 0,1 % nátrium dodecil szulfátot (SDS) tartalmazó lízis puffert használtunk, majd az így előkezelt mintát 10 % SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, és elektroforetikusan polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át. Ezt követően a membránokat 10%-os borjú szérum albuminnal blokkoltuk és anti-MGL (Frontier, 1:200) antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A következő napon torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl szekunder antitesttel (DAKO, 1:1000) kezeltük a membránokat (4 óra, szobahőmérsékleten), végül 3, 3'-diaminobenzidin (DAB) kromogénnel vizualizáltuk a specifikus sávokat.

A COS7 sejtekből származó mintákat a Western blot és nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid-gél elektroforézis (SDS PAGE) analízishez a következőképpen készítettük elő: proteáz inhibitorokkal (4 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 2 nM PMSF, 26 µM benzamidin, 8 µM pepstatin A, 2 µg/ml szójabab tripszin inhibitor, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin) kiegészített 20mM trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) (pH 7,4) lízis pufferben szonikáltuk. A sejtörmelékeket centrifugálással eltávolítottuk (10 perc, 1500 g, 4 °C) majd a felülúszót újból centrifugáltuk (20 perc, 12,000 g, 4 °C). Ezt követően a pelletet 1% TRITON-X-100 és 0,1% SDS-t tartalmazó lízis pufferben reszuszpendáltuk. A mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A minták protein koncentrációjának megállapítására a detergens kompatibilis BCA protein assayt használtuk (Pierce, Rockford, USA). A mintákat redukáló ágenssel kiegészített pufferben (50 µg protein/sáv) feloldottuk, majd 10% SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk (Laemmli, 1970). Az így elválasztott fehérjéket PVDF membránra vezettük át (Millipore, Bedford, USA).

A membránokat TTBS (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7,5, 0.05% Tween-20) oldatban feloldott 10%-os borjú szérum albuminnal blokkoltuk (Sigma). Ezt követően a membránokat CB<sub>1</sub> elleni antitesttel (1:1000, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA, Cat. No: 10006590) inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. A membránokat alaposan mostuk TTBS oldattal, majd anti-nyúl IgG-HRP másodlagos antitesttel (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) inkubáltuk. Az általunk vizsgált fehérjét jelölő sávokat DAB (Sigma) kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

### ***6.5 Egyszeres immunhisztokémiai jelölés fénymikroszkópos vizsgálatokhoz***

Az MGL gerincvelői eloszlásának vizsgálatára, ill. az MGL ellenes antitest specificitásának igazolására egyszeres immunfestést végeztünk patkány, továbbá vad típusú és MGL génkiütött egerek gerincvelőjéből származó mintákon. Ehhez az úszó metszeteket 10%-os normál kecske szérummal blokkoltuk 50 percig, ezt követően nyúlban termeltetett anti-MGL (higítás: 1:30, katalógus sz.: MGL-Rb-Af200, Frontier Science Co., Ishikari, Hokkaido, Japan) antitesttel inkubáltuk 48 órán át 4 °C-on, majd kecskében termeltetett, biotinilált anti-nyúl-IgG (higítás: 1:200, katalógus sz.: PK-4001, Vector Labs., Burlingame, California, USA) antitesttel 12 órán át 4 °C-on. Végül avidin-biotinált tormaperoxidázzal (higítás: 1:100, Vector Labs., Burlingame, California, USA) 5 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket, majd a reakciót DAB (katalógus sz.: D-5637, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) kromogénnel tettük láthatóvá. Az antitestek higítása 10 mM trisz-foszfát pufferelt izotóniás sóoldattal (TPBS, pH 7.4) történt, melyhez 1%-os normál kecskeszérumot (katalógus sz.: S-1000, Vector Labs, Burlingame, California, USA) adtunk. A reakciót követően a metszeteket tárgylemezre helyeztük és Permout neutrális médiummal lefedtük.

### ***6.6 Kettős immunhisztokémiai jelölés konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz***

Az úszó metszeteket először 10% normál kecske szérummal blokkoltuk 50 percig, majd elsődleges antitestek keverékével inkubáltuk, amely a nyúlban termeltetett anti-MGL mellett az alábbi markerek egyikét tartalmazta:

**Táblázat 1: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során felhasznált elsődleges antitestek listája**

<b>Elsődleges antitest neve</b>	<b>Hígítás, katalógus szám, gyártó</b>
tengerimalacban termeltetett anti-kalcitonin gén-relációs peptid ( <b>CGRP</b> )	1:2,000, katalógus sz.: T5027, Peninsula Labs, San Carlos, California, USA
biotinilált izolektin B4 ( <b>IB4</b> )	1:2,000, katalógus sz.: I21414, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
tengerimalacban termeltetett anti-vezikuláris glutamát transzporter 2 ( <b>VGLUT2</b> )	1:2,000, katalógus sz.: AB2251, Millipore, Temecula, California, USA
tengerimalacban termeltetett anti-vezikuláris GABA transzporter ( <b>VGAT</b> )	1:600, katalógus sz.: 131004, Synaptic Systems, Göttingen, Németország
egérben termeltetett anti-gliális fibrilláris savas fehérje ( <b>GFAP</b> )	1:1,000, katalógus sz.: MAB3402, Millipore, Temecula, California, USA
egérben termeltetett anti- <b>CD11b</b>	1:500, katalógus sz.: MCA275G, AbD Serotec, Oxford, UK

A metszeteket a pimer antitestek oldatával 2 napig 4 °C-on inkubáltuk, majd 1% normál kecske szérummal való mosást követően 2 órán keresztül szekunder antitestekkel inkubáltuk, melyeket az elsődleges antitesteknek megfelelően az alábbiak közül választottunk ki:

**Táblázat 2: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során felhasznált másodlagos antitestek listája**

<b>Másodlagos antitest neve</b>	<b>Hígítás, katalógus szám, gyártó</b>
Alexa Fluor 488-cal konjugált kecske – anti-nyúl IgG (GAR 488)	(1:1,000, katalógus sz.: A11034, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)
Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske – anti-tengerimalac IgG (GAGp 555)	(1:1,000, katalógus sz.: A21435, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)
Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske – anti-egér IgG (GAM 555)	(1:1,000, katalógus sz.: A21422, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)
Alexa Fluor 555-tel konjugált streptavidin	(1:1,000, katalógus sz.: S11225, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)

Az antitesteket 1%-os normál kecske szérumban hígítottuk. A reakció végeztével a metszeteket PBS-ben mostuk (3x15 min), majd tárgylemezre szedtük és Vectashilddel (katalógus sz.: H-1000, Vector Labs, Burlingame, California, USA) fedtük le.

## **6.7 Immuncitokémia**

A transzfektált COS7 sejteket 24 lyukú sejtenyésző edényeken növesztettük, majd 0,1 M foszfát pufferben oldott 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk 10 percig. Ezt követően a sejteket

30 percig 10% normál kecske szérummal kezeltük, melyet a sejtek CB<sub>1</sub> elleni elsődleges antitesttel történő kezelése követett (2 óra, 1:2000, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA, katalógus sz.: 10006590). Alapos mosás után a sejteket Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (1:1000, Invitrogen) inkubáltuk 1 órán keresztül, mostuk 15 percen keresztül, majd Vectashield-DAPI-val lefedtük. Az inkubálás összes lépését szobahőmérsékleten végeztük. A fluoreszcensen jelölt COS7 sejtekről Olympus IX-81 inverz mikroszkópra épített differential spinning disc-kel (DSD2, Andor Technology) illetve Andor Zyla 5,5 sCMOS típusú kamerával felvételeket készítettünk. Ehhez egy 60x PlanApo N olaj-immersiós objektívet (NA: 1,40) használtunk, majd az így elkészített képeket Adobe Photoshop CS5 szoftverrel elemeztük.

### ***6.8 Immunfluoreszcens jelölések vizsgálata konfokális mikroszkóppal***

A z-tengely mentén, az egyes rétegek közti 0,5  $\mu\text{m}$  vastagságú átfedéssel 1  $\mu\text{m}$  vastagságú, 11 optikai szeletből álló sorozatfelvételt készítettünk egy Olympus FV1000 típusú konfokális mikroszkóppal annak érdekében, hogy axiálisan a felvétel közepén található, átlagosan 5  $\mu\text{m}$  átmérőjű axonterminálisok illetve az MGL immunreaktív foltok közötti kapcsolat az x, y és z tengelyek mentén egyaránt egyértelműen megítélhető legyen. A fényképezéshez 60x nagyítású olaj-immersiós objektívet (NA: 1.42) használtunk nagy figyelmet fordítva arra, hogy a konfokális mikroszkóp beállításai (lézer erősség és intenzitás, konfokális apertúra mérete, gyorsítófeszültség) az optikai szeletek készítése során azonosak maradjanak, valamint ügyelve arra, hogy az immunreaktív foltokhoz tartozó pixelek ne legyenek túltelítettek. Az így elkészített felvételek szerkesztése Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével történt.

### ***6.9 Az MGL és a különböző axonális és glia markerek kolokalizációjának kvantitatív elemzése.***

Három állat lumbális gerincvelőjének három-három véletlenszerűen kiválasztott metszetén, mindkét oldali hátsó szarvában (összesen 18 mérési terület) elvégeztük az MGL és a korábban felsorolt markerek kolokalizációjának elemzését a következők szerint: első lépésben meghatároztuk a hátsó szarv I-II. lamina helyzetét a gerincvelői keresztmetszeten, a fehérállomány-szürkeállomány határától kezdődő, 150  $\mu\text{m}$  szélességű, dorzoventrális kiterjedésű területnek megfelelően. Az általunk vizsgálni kívánt terület kiválasztását pontosító kritériumok a következők: (a) a gerincvelő hátsó szarva és a hátsó köteg határa beazonosítható az immunfestés

intenzitása alapján, (b) a II. ill. III. lamina határa előzetes ultrastrukturális leírások alapján, a mielinizált axonok hiánya (II. lamina) vagy jelenléte (III. lamina) alapján azonosítható (Molander és mtsai., 1984). Ezen a területen belül egy 10x10-es standard négyzethálót jelöltünk ki a felületes hátsó szarv középső részére (az egyes négyzetek éleinek hossza 5  $\mu\text{m}$ , a négyzetháló teljes mérete tehát 50x50  $\mu\text{m}$ ). Ennek megfelelően a kvantitatív analízisnél csak azokat az immunreaktív foltokat vettük figyelembe, melyek a négyzetrács élein helyezkedtek el. Tekintettel arra, hogy az MGL-t jelölő immunreaktív foltok átmérője minden esetben alulmaradt az axonterminálisok és különösen a gliasejtek méretéhez képest, a kolokalizáció megítélése nem volt lehetséges a hagyományos, a mindkét csatornában egyaránt pozitív pixelek számszerűsítésén alapuló módszerek (pl. Pearson koefficiens) segítségével. Ezért minden kettős immunfluoreszcens jelölés esetén, a fentebb leírtaknak megfelelően meghatározott mérési területen, a négyzetrácson elhelyezkedő és az adott markerre pozitív immunreaktív profilokat egyesével megvizsgáltuk, hogy azoknak bármelyik részlete mutat-e átfedést a másik markerrel. Az így kapott adatokból átlagot és standard hibát (standard error of the mean) számoltunk.

### ***6.10 Elektronmikroszkópos vizsgálatok***

Az MGL celluláris megoszlásának vizsgálatára a 4.5 pontban leírt immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk. A metszeteket nyúl ellen termeltetett anti-MGL elsődleges antitesttel inkubáltuk 48 órán keresztül 4 °C-on, majd kecskében termeltetett, biotinilált anti-nyúl antitesttel további 12 órán át szintén 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket avidin-biotinált tormaperoxidáz komplexszel inkubáltuk 5 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a reakciót DAB kromogén reakcióval tettük láthatóvá.

Az így előkészített metszeteket 0,5%-os ozmium-tetroxid oldattal utófixáltuk 45 percig, majd víztelenítést követően Durcupan ACM gyantába ágyasztuk (katalógus sz.: 44610, Sigma, St. Louis, Missouri, USA). A további feldolgozásra kiválasztott metszeteket műgyantába újraágyasztuk, ultravékony metszeteket készítettünk belőlük, melyeket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. Az így előkészített metszeteket JEOL 1010 elektronmikroszkóp (Akishima, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk, és Veleta 4MP TEM kamerával (EMSIS, Münster, Németország) felvételeket készítettünk.

### **6.11 A 2-AG izomerizációja vizes oldatban**

A 2-AG izomerizációjának analizisét korábban leírt módszerek alapján (Higuchi és mtsai., 2010; Zhang és mtsai., 2010; Zoerner és mtsai., 2012), a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén és Növénytani Tanszékén dolgozó kollaborációs partnereink végezték, néhány módosítással: 0,625 µg/mL anandamidot tartalmazó 250 µl HBSS-t 2-AG-val (Cayman Chemical) vagy 1-AG-val (Cayman Chemical) „spike”-oltak, melyet acetonitrilben oldottak fel (végső koncentráció 0,25 µg/mL) majd 37 °C-on inkubáltak 1,25; 2,5; 5 és 10 percen keresztül. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben tartották a feldolgozásig. A 0 perces mintákat a folyékony nitrogénes fagyasztást követően „spike”-olták 2-AG-val. A minta előkészítés során a fagyasztott mintákhoz 10 µl trifluoecetsavat (TFA) és 1000 µl *n*-hexánt adtak, majd 1400 rpm-mel való rázatás közben felolvasztották. Ezzel az endokannabinoidokat közvetlenül az olvadásukat követően szerves fázisba vitték. A bázis-katalizált izomerizációt TFA hozzáadásával állították le. Ezt követően a fázisokat 13000 g-n 1 percig tartó centrifugálással választották el. A szerves fázis 800 µl-ét tartalmazó aliquotot vákuumban szárazra párolták, majd újra feloldották 40 µl 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilben. Ezt követően a folyadékkromatográfia-tömegspektrometriai (LC-MS) vizsgálatokhoz ebből az oldatból 20 µl-t injektáltak. A kísérletet háromszor ismételték meg.

### **6.12 A 2-AG és az 1-AG mennyiségi meghatározása LC-MS-sel**

A 2-AG és 1-AG mennyiségében és arányaiban történő változásait egy YMC-Triart C<sub>18</sub> (100 mm x 3,0 mm, 1,9 µm, 12nm, YMC Co., Ltd, Kyoto 600-8106, Japán) típusú kromatográfias oszlopon vizsgálták, Accela HPLC (Thermo Electron Corp, San Jose, CA, USA) rendszert használva, 0,1% (V/V) hangyasavat tartalmazó víz (A) -0,1% (V/V) hangyasavat tartalmazó acetonitril (B) gradienssel: 0 – 2 min: 60% B, 2 – 7 min: 60 – 90 % B, 7 – 13 min : 90% B. Az elválasztás 30 °C -on történt (kolonna hőmérséklet). Az LC rendszert egy Thermo LTQ XL tömegspektrométerhez (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, USA) kapcsolták, pozitív módú HESI ionizációt alkalmazva. Az ESI paraméterek a következők voltak: porlasztó feszültség: 5 kV, forrás hőmérséklet: 280 °C, kapilláris hőmérséklet: 300 °C, porlasztógáz áram: 25 arb N<sub>2</sub>, segédgáz áramlás: 8 arb N<sub>2</sub>.

A mennyiségi meghatározás SRM (szelektált reakció monitorozás) módban történt, amikor is a referencia tömegspektrumokkal azonos spektrumokat kaptak. Az 1-AG és 2-AG

esetében a 379-287, az anandamid esetében a 348-287 átmenetet használták. Az 1-AG és a 2-AG retenciós idő alapján megkülönböztethető egymástól a fenti módszerrel. A kvantifikálás ötpontos kalibrációs egyenes segítségével történt. Belső standardként minden minta extrakció előtt anandamidot adtak a mintához. Minden vizsgált anyag esetében a visszanyerés 85% fölött volt, ami jó összhangban van a Zoerner és mtsai. (Zoerner és mtsai., 2012) által közölt eredményekkel.

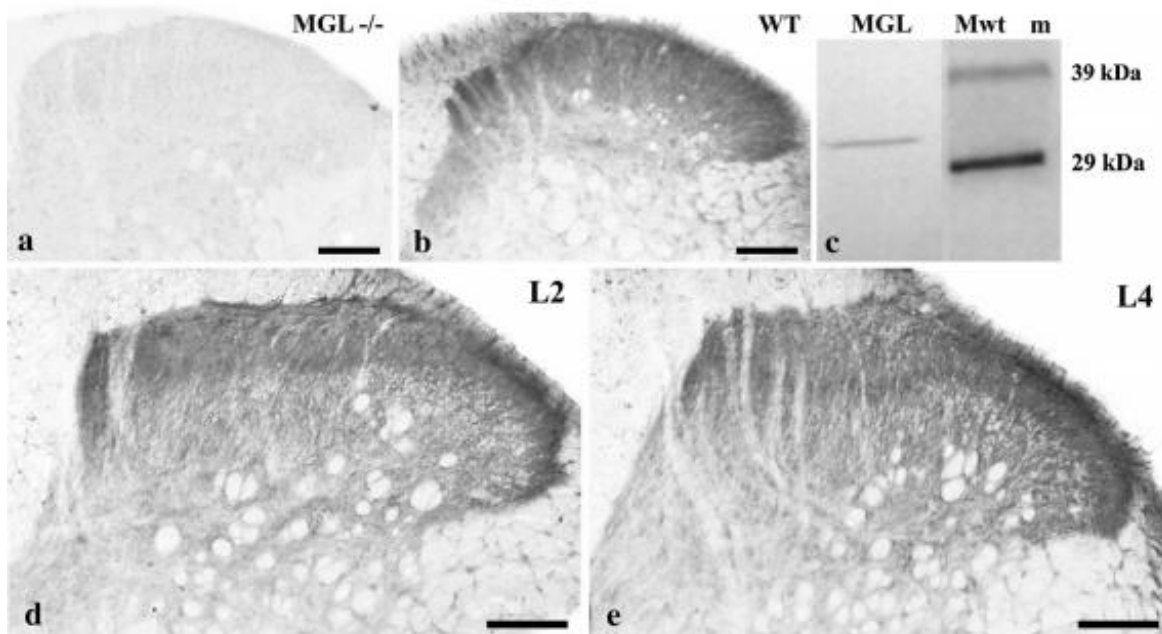
### **6.13 $Ca^{2+}$ mérések**

A  $Ca^{2+}$  méréseket megelőzően a transzfektált COS7 sejteket 1  $\mu$ M 0,01% pluronic F127-et tartalmazó Fluo-8-AM  $Ca^{2+}$  indikátor festékkel inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A  $Ca^{2+}$  méréseket egy Olympus IX-81 inverz mikroszkópon végeztük, egy differential spinning dischez (DSD2, Andor Technology) kapcsolt Andor Zyla 5.5 sCMOS típusú kamera segítségével. Andor iQ3 szoftver használatával másodpercenkénti 15 felvétel sebességgel, 10x objektívvel (NA:0.25) 540x306 pixel felbontású képeket készítettünk (1400x790  $\mu$ m látótérben 200-250 sejt). A Fluo-8 festék gerjesztését 488 nm-en, az emittált fényt pedig 510 nm felett detektáltuk. A kísérletek minden esetben megegyező mérési paraméterek mellett történtek (megvilágítás intenzitása, expozíciós idő, kiolvasási idő, sebesség). A fluoreszcencia intenzitás változásait az RFP-vel jelölt, éles kontúrral rendelkező COS7 sejteken vizsgáltuk, a sejtek teljes sejt felszínét szabadkézzel kijelölve. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változásait a fluoreszcencia intenzitásnak az alapvonalhoz viszonyított változása alapján ítéltük meg ( $\Delta F/F_0$ , ahol  $F_0$  a kezdeti fluoreszcencia intenzitás értéke). A fluoreszcencia intenzitás változását az alkalmazott ligandra adott válasznak tekintettük, amennyiben az alkalmazását követően az adott sejten mért  $\Delta F/F_0$  érték legalább 5 egymást követő felvételen magasabb volt, mint az alapvonal szórásának háromszorosa. A  $\Delta F/F_0$  értékeket a Microsoft Excel 2013 programban számoltuk ki (Microsoft), a görbe alatti területeket pedig OriginPro 8.0 szoftverrel (Originlab, Northampton, MA) határoztuk meg. A statisztikai analízisekhez két-mintás nem parametrikus Mann-Whitney U tesztet használtunk. A különbségeket  $p < 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 7. EREDMÉNYEK

### 7.1 Az MGL immunreaktivitás megoszlása a gerincevelő hátsó szarvában

Az MGL gerincevelői megoszlásának vizsgálatára elvégzett peroxidáz alapú immunreakció erőteljes MGL immunreaktivitást mutatott a gerincevelő lumbális szakaszában, ahol ez mindenekelőtt a gerincevelő hátsó szarvának I. ill. II. laminájában volt megfigyelhető. A II. lamina belső része mutatta a legerősebb festődést, de a pontozott megjelenésű immunreakció a felületes hátsó szarv többi részén is erőteljesnek bizonyult. Míg a vad típusú egér, ill. a patkány gerincevelőjében határozott, megoszlásában és intenzitásában hasonló MGL immunreaktivitás figyelhető meg, addig az MGL génkiütött egér gerincevelőjéből származó mintán a specifikus immunfestődés teljesen hiányzik, ami az antitest specificitását igazolja. Ezt erősíti a Western blot analízis eredménye is, ahol az immunfestés csak egy, az MGL fehérje molekulatömegének megfelelő 33 kDa molekulásúlyú sávot eredményezett (6. ábra).



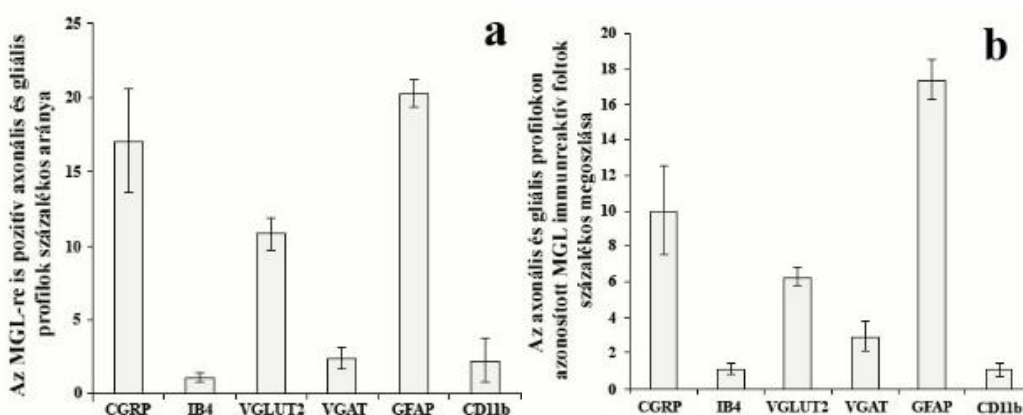
**6. ábra:** Az MGL elleni primer antitest specificitásának tesztelése és az MGL immunreaktivitás megoszlása a gerincevelő hátsó szarvában. MGL immunreaktivitás vad típusú (b) és MGL génkiütött egerekben (a). A vad típusú állat gerincevelőjéből származó mintán erőteljes MGL elleni immunreakció figyelhető meg a gerincevelő felületes hátsó szarvában, míg ez teljesen hiányzik az MGL génkiütött állat gerincevelői metszetein. Az MGL elleni antitest specificitását a Western blot analízis is igazolja, amelynél csak egy sáv figyelhető meg 33 kDa molekulásúlynál, ami az MGL molekulatömegének felel meg (c). Az MGL expressziója patkány L2 (d) és L4 (e) gerincevelői szegmenseiből származó szöveteken. Lépték: 100  $\mu$ m

## 7.2 Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja nociceptív primer afferensek axonterminálisainak markereivel

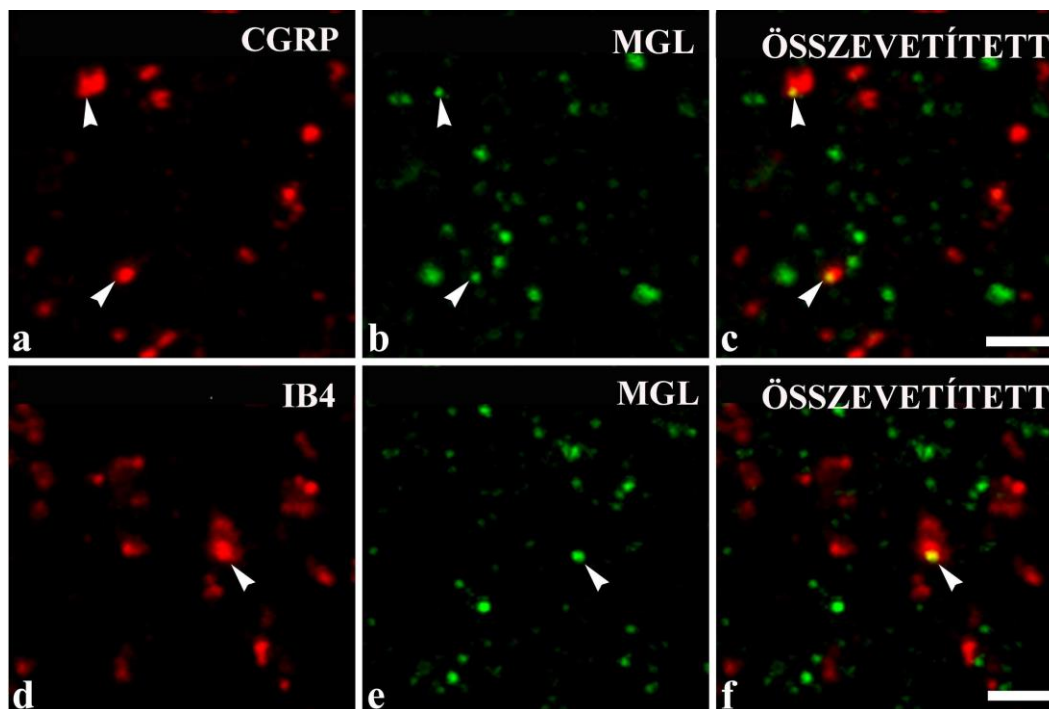
A gerincvelő hátsó szarvának I-II. laminája a perifériáról érkező szenzoros ingerületeket főleg a nociceptív primer afferensektől fogadja (Ribeiro-da-Silva és mtsa., 2008), amelyek neurotranszmitterként glutamátot szabadítanak fel. Ezeknek a primer afferenseknek egy populációja azonban a glutamát mellett neuropeptidek, többek között CGRP felszabadítására is képes, így ezeknek a peptiderg primer afferenseknek a terminálisai a CGRP jelenléte alapján azonosíthatók. A nociceptív primer afferensek másik csoportjának glycoalyxa izolektin-B4 kötő képességgel rendelkezik, ezek az ún. nem-peptiderg primer afferensek csoportját alkotják (Willis és mtsa., 2004).

A vizsgálataink során a négyzetháló vonalain azonosított 225 CGRP immunreaktív folt  $17,0 \pm 3,5$  % volt MGL pozitív is, míg 387 MGL immunfestett profilból  $10,0 \pm 2,5$ % bizonyult CGRP-re is pozitívivnak. (7,8. ábra)

Erőteljes IB4 kötődés volt megfigyelhető a gerincvelői hátsó szarv II laminájának belső részében, ám annak ellenére, hogy ezen a területen a legintenzívebb az MGL elleni immunreakció, rendkívül alacsony kolokalizációt találtunk a két marker között. A 964 IB4 pozitív folt csupán  $1,1 \pm 0,3$  %-a volt MGL-re is pozitív, míg az 1090 MGL immunreaktív folt csupán  $1,1 \pm 0,3$  %-a volt IB4-ra is pozitív (7, 8. ábra).



7. ábra: Az MGL, ill. a különböző axonális és gliális markerek kolokalizációját mutató hisztogram. a.) Az MGL-re is pozitív axonális és gliális profilok százalékos aránya. b.) Az axonális és gliális profilokon azonosított MGL immunreaktív foltok százalékos aránya. Az adatok. Az oszlopokon átlag és  $\pm$  sztenderd hiba látható.



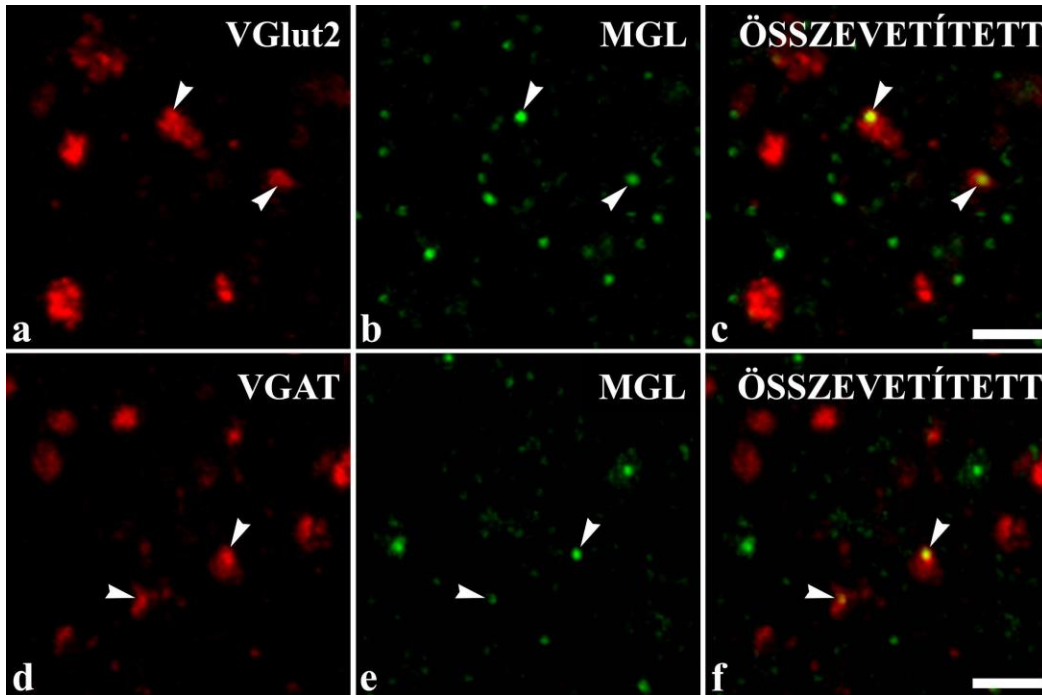
**8. ábra:** Az MGL kolokalizációja primer afferensek axonterminálisainak markereivel. Az 1  $\mu\text{m}$  vastagságú konfokális optikai szeleteken láthatók az MGL (zöld szín; b, e) és a peptiderg (piros szín; a) ill. nem peptiderg (piros szín; d) primer afferensek axonterminálisait jelölő reakciók. Az összevetített képeken a sárga keverék szín alapján megfigyelhető az MGL kolokalizációja a peptiderg (c) és nem peptiderg (f) axonterminálisok markereivel (nyílhegyek). Lépték: 2  $\mu\text{m}$

### *7.3 Az MGL kolokalizációja a glutamáterg és GABAerg interneuronok axonterminálisainak markereivel*

Mivel Alvarez és mtsai. azt találták, hogy dorzális rizotómiát követően a VGLUT2 immunreaktivitás érintetlen marad a gerincvelő hátsó szarvában (Alvarez és mtsai., 2004), azaz döntően nem a primer afferensek axonterminálisaihoz kötődik, ezért a gerincvelő hátsó szarvi serkentő interneuronok axonterminálisainak a jelölésére a VGLUT2 elleni immunreakciót alkalmaztuk. Ugyanakkor mind a GABAerg, mind a glicinerg gátló interneuronok axonterminálisai expresszálják a vezikuláris GABA transzportert (VGAT, vezikuláris gátló aminosav transzporterként, VIAAT-ként is ismert) (Chaudhry és mtsai., 1998), így a VGAT ideális markere a gátló interneuronok axonterminálisainak.

A VGLUT2 elleni immunreakció erőteljes, pontszerű jelölődést mutatott az I. ill II. laminákban, ahol a 751 VGLUT2 immunreaktív foltból  $10,7 \pm 1,0$  % mutatott MGL pozitivitást, míg a megszámlolt 1251 MGL immunfestett profil  $6,3 \pm 0,5$  %-a volt VGLUT2 pozitív is (7,9. ábra).

Korábbi eredményeket igazolva a VGAT homogén immunfestődést mutatott a gerincevelő felületes hátsó szarvában (Polgar and Todd 2008). Az MGL-el való kolokalizációjának vizsgálata során azt találtuk, hogy a 609 VGAT-ot jelző jelölés csupán  $2,4 \pm 0,7$  %-a volt MGL pozitív is, és az 524 MGL immunreaktív folt mindössze  $2,9 \pm 0,8$  %-a köthető VGAT-tal jelölt gátló axonterminálisokhoz (7,9. ábra).



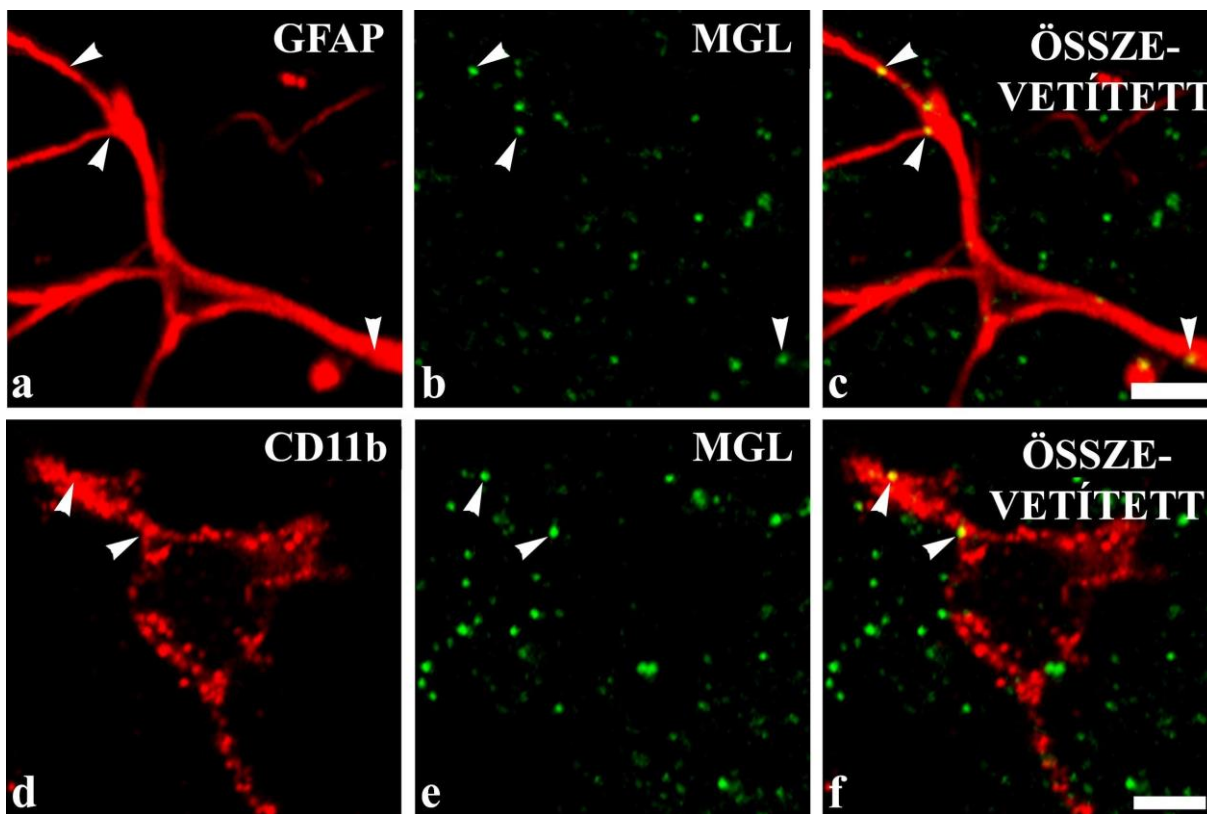
**9. ábra:** Az MGL kolokalizációja az interneuronok axonterminálisainak markereivel. Az 1  $\mu\text{m}$  vastagságú konfokális optikai szeleteken látható az MGL (zöld szín; b, e) és a serkentő (piros szín; a) ill. gátló (piros szín; d) interneuronok axonterminálisait jelölő immunreakció. Az összevetített képeken nyílhegyek jelölik az MGL kolokalizációját (sárga keverék szín) a serkentő (c) és gátló (f) axonterminálisok markereivel. Lépték: 2  $\mu\text{m}$

#### **7.4 6.4 Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja az asztrociták és mikroglia sejtek markereivel**

Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy a gerincvelő hátsó szarvának gliasejtjei expresszálják az endokannabinoid rendszer molekuláris eszköztárának számos komponensét (Hegyi és mtsai., 2009, 2012). Navarrete és Araque azt is igazolták, hogy a neuronok által termelt endokannabinoidok képesek az asztrocitákon található CB<sub>1</sub> aktiválására, melynek következtében a gliasejtekből felszabaduló glutamát visszahat a neuronokra, azok NMDA receptorait aktiválva (Navarrete és mtsa., 2008). Primer mikroglia tenyészetekben mind a FAAH mind pedig az MGL kifejeződését igazolták (Witting és mtsai. 2004), de a gyrus dentatus asztrocitáiban (Uchigasima és mtsai. 2011) és a kisagy Bergman glia sejtjeiben (Tanimura és mtsai. 2012) is kimutatták a jelenlétét. Ezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy megtalálható-e az MGL a gerincvelői gliasejteken.

Korábbi adatokkal egybehangzóan azt találtuk, hogy a gerincvelő hátsó szarvában mind az asztrociták, mind a mikroglia sejtek specifikus markere erőteljesen expresszálódik. A GFAP immunreaktivitás alapján azonosított 674 asztrocita profiloknak  $20,2 \pm 0,9$  %-a mutatott MGL pozitivitást, míg a megszámlolt 794 MGL-t jelölő immunreaktív folt  $17,4 \pm 1,1$  %-át sikerült asztrocitákon azonosítani (7,10. ábra).

Az asztrocitáktól eltérően szinte teljes szegregációt találtunk az MGL és a mikrogliaikat jelölő CD11b immunreaktivitás között. A megszámlolt 455 CD11b immunreaktív profilnak mindössze  $2,3 \pm 1,4$  %-a volt MGL pozitív is, illetve az 1245 MGL immunreaktív foltból csupán  $1,0 \pm 0,4$  % volt mikroglia sejtekhez köthető (7,10. ábra).



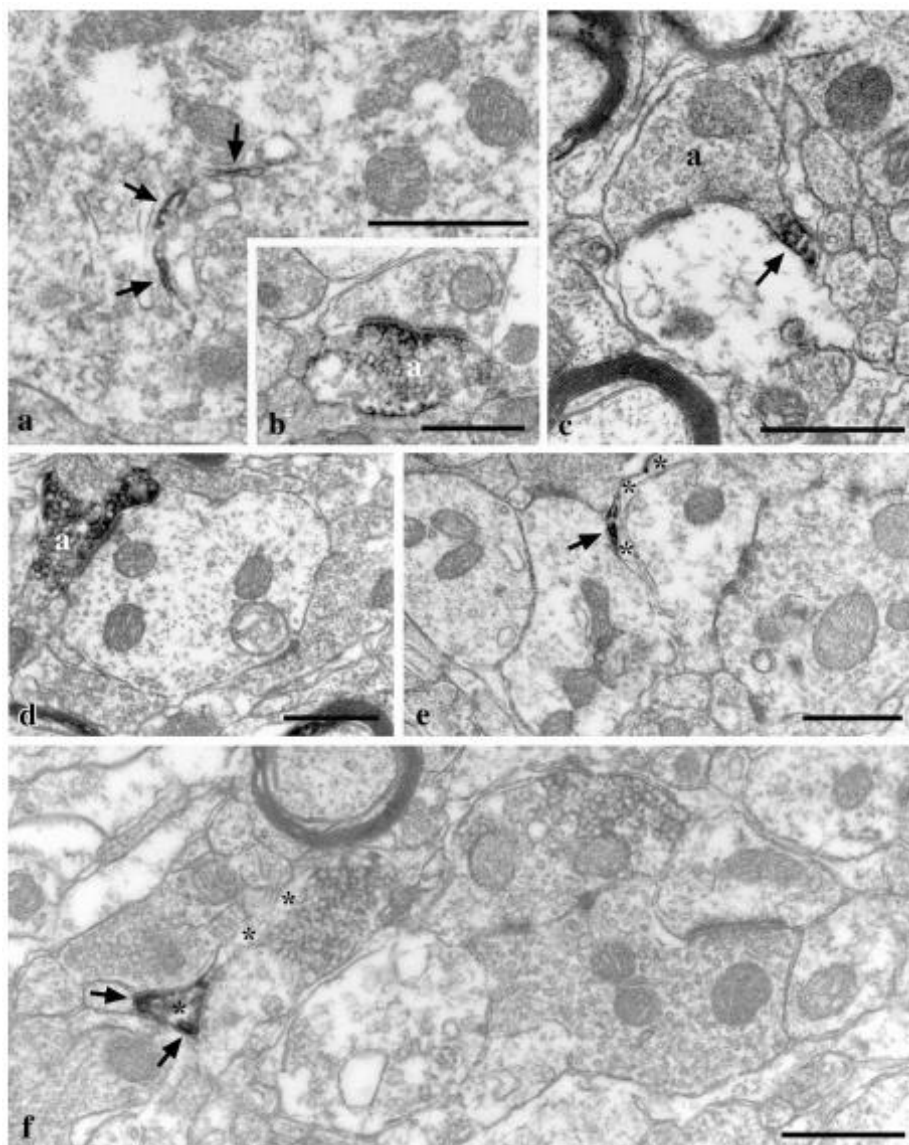
**10. ábra:** Az MGL kolokalizációja az asztrociták és mikroglia sejtek markereivel. Az 1  $\mu\text{m}$  vastagságú konfokális optikai szeleteken látható az MGL (zöld szín; b, e) és az asztrocitákat jelölő GFAP, (piros szín; a), ill. a mikroglia sejteket (piros szín; d) jelölő CD11b immunreakció. Az összevetített képeken a keverék szín (sárga) megjelenése mutatja az MGL kolokalizációját (nyílhegyek) a gliasejtekkel (c, f). Lépték: 2  $\mu\text{m}$

### 7.5 Az MGL immunreaktivitás ultrastrukturális megoszlása

Az MGL sejtípusfüggő expressziójának meghatározása után az enzim szubcelluláris elhelyezkedését vizsgáltuk elektronmikroszkópos módszerekkel, DAB alapú immunhisztokémiai reakciót követően. A központi idegrendszer más területeihez hasonlóan az MGL-t jelölő immunprecipitátum mindenekelőtt az axonokban (11b-d. ábra, "a" jelölés) és a glia sejtek nyúlványaiban (11e-f. ábra) sikerült azonosítani, de ugyanakkor a neuronok perikaryonjában (11a. ábra) is találtunk jelölést. Az MGL immunjelölést, sejtípustól függetlenül, a sejt plazmamembránjának szoros közelségében, a sejtmembrán belső felszínén figyeltük meg. Az axonterminálisokban az immunprecipitátumot mindig a szinaptikus kapcsolatok közvetlen közelében találtuk, míg a neuronok perikaryonjaiban az MGL-t jelző DAB csapadékot

citoplazmatikus membránokhoz asszociáltak, melyek az endoplazmás retikulum ill. Golgi készülék membránjára emlékeztetnek (11a. ábra)

A glianyúlványokban megfigyelt MGL jelölés erőteljes kompartmentalizációt mutatott, az immunprecipitátum jellemzően a glianyúlványok kisebb területein koncentrált, ugyanakkor, nem tudtuk azt megállapítani, hogy az immunprecipitátum asztrocitákon vagy mikroglia sejtek nyúlványain található-e, mert elektronmikroszkóppal ezek a képletek egymástól nem különböztethetők meg (11. ábra).

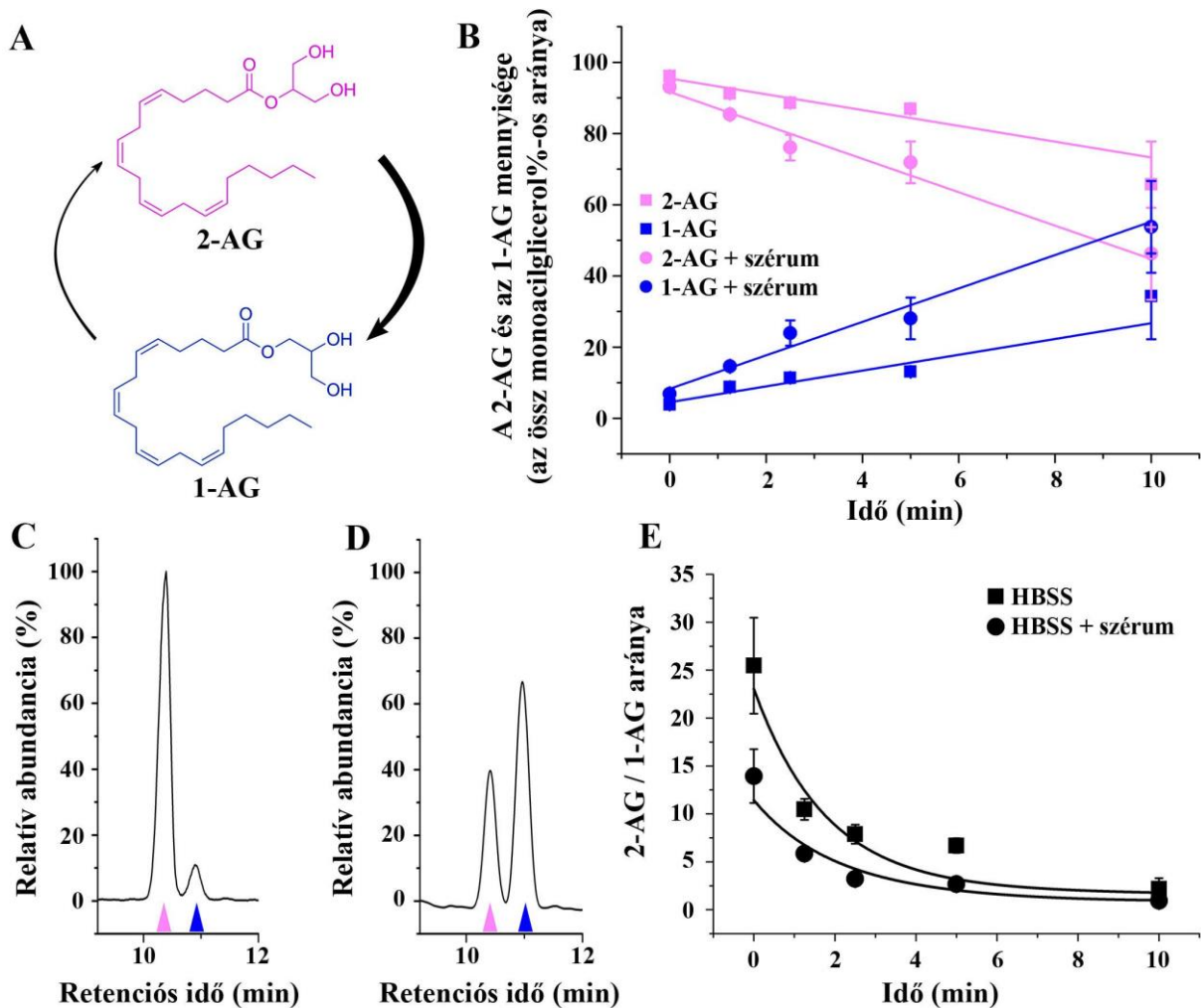


**11. ábra: Az MGL immunreaktivitás ultrastrukturális megoszlása neuronokban és glia sejtekben. MGL-t feltüntető immunprecipitátum megfigyelhető neuronok perikaryonjaiban (a), axon terminálisokban (b-d), továbbá a csillaggal jelölt glia sejtekben (e, f, nyíl). Lépték: 500 nm**

## 7.6 A 2-AG spontán 1-AG-vá alakul vizes oldatban

A 2-AG átrendeződését vizes közegben 1-AG-vá (12A. ábra) számos korábbi tanulmány dokumentálta. Saját *in vitro* kísérleteink körülményeinek a lehető legjobb szimulálása érdekében Hank-féle pufferelt sóoldattal (HBSS) 2-AG-val „spike”-oltunk (a mintában feltételezett komponens standard oldatából adunk a mintához), és a dekompozíciós görbét LC-MS segítségével 37 °C-on határoztuk meg. A folyadék-folyadék extrakció és az injekció során fellépő pontatlanságok kiszűrésére anandamidot használtunk belső standardként, a 2-AG-val ellentétben ugyanis az anandamid a mintaelőkészítés és analízis során végig stabil marad (Zoerner és mtsai., 2012). Az anandamidhoz tartozó csúcs nem változott az idő függvényében.

Más, RPMI médiumot használó kutatócsoportok által írt közleményekkel (Rouzer és mtsai., 2002) megegyezően a 2-AG gyorsan átalakul 1-AG-vá HBSS-ben is (12B. ábra). Az átalakulás féléletideje  $16,16 \pm 3,74$  perc (szérum nélkül, extrapolált) és  $8,81 \pm 2,51$  min (szérummal). A különbségek fakadhatnak a médiumból, és a 2-AG kezdeti koncentrációjából, hiszen Rouzer és mts. (Rouzer és mtsai., 2002)  $2 \mu\text{g/mL}$ -t használtak ( $5 \mu\text{M}$ -al egyenlő), míg a mi kísérletes beállításainkkal az oldat koncentrációja megközelítette a sejtek vizsgálatokor alkalmazott koncentrációt ( $0,6 \text{ mM}$ ). Az LC-MS kromatogramon az 1-AG-nak és a 2-AG-nak megfelelő csúcsok aránya jelentősen változik 2 perc alatt (12C-E. ábra). Hozzá kell azonban tennünk, hogy a mi kísérleteink sejt- illetve biológiai membránoktól mentes, tiszta fiziológiás oldatokkal végeztük, melyek csökkentették a minta előkészítésre szükséges időt illetve az izomerizációs műtermékek létrejöttét. Ez a megközelítés különbözik azoktól publikációktól, melyekben a 2-AG-t és az 1-AG-t a biológiai mintákból hosszadalmas tisztítási lépésekkel izolálták, melyek megnövelik a poszt-izolációs műtermékek kialakulását (Ferrer és mtsai., 2003; Suplita és mtsai., 2006).

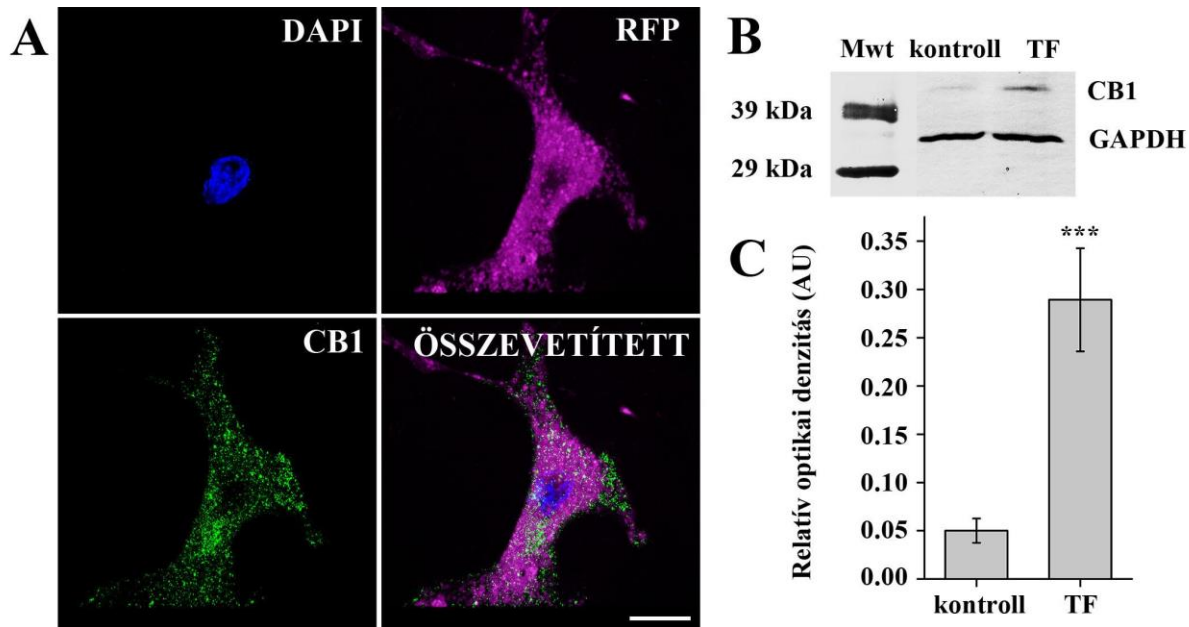


12. ábra: A 2-AG izomerizációja HBSS-ben. (A) A 2-AG és az 1-AG szerkezete és izomerizációja. (B) A 2-AG (magenta nyíl) és az 1-AG (kék nyíl) mennyiségének változása az idő előrehaladtával szérumentes (négyzetek) ill. szérummal dúsított (körök) HBSS oldatban. (C-D) A 2-AG (magenta nyíl) és az 1-AG (kék nyíl) szérummal dúsított HBSS oldatban történő szétválását reprezentáló kromatogramok az izomerizáció 0. (C) és 10. (D) percénél. (E) Az acilmigráció következtében a 2-AG és az 1-AG arányában történő változás szérummal dúsított (kör) illetve szérumentes (négyzet) HBSS oldatban.

### 7.7 A CB<sub>1</sub> overexpressziója COS7 sejtekben

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a 2-AG izomerizációját 1-AG-vá, illetve az acilvándorlás következményeit a 2-AG sejtekre kifejtett hatásának tekintetében, egy egyszerű *in vitro* modellt hoztunk létre, melyhez COS7 sejtekbe pcDNA3 CB<sub>1</sub> plazmid vektort juttattunk be elektroporáció segítségével. A sejtekben a CB<sub>1</sub> overexpresszióját 5-7 passzálást követően

immuncitokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük. A CB<sub>1</sub>-et jelölő immunreaktív foltok az RFP-t expresszáló sejtek membránjában, ill. citoplazmájában is megfigyelhetők (13. ábra). A CB<sub>1</sub> mennyiségének meghatározására Western blot analízist végeztünk, amely igazolta, hogy a kontroll (nem transzfektált) COS7 sejtekhez viszonyítva a CB<sub>1</sub> expressziója a transzfektált sejtekben 5.6-szorosára emelkedik.

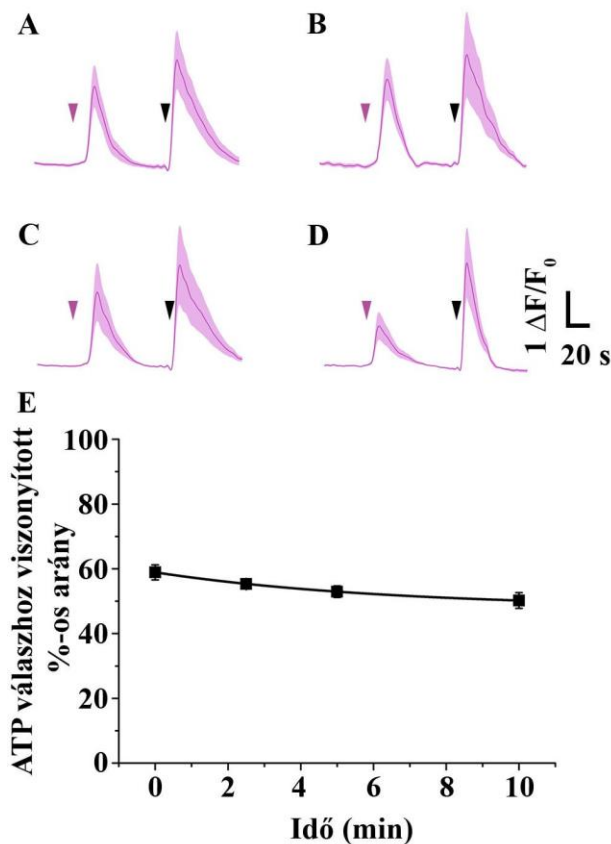


**13. ábra:** A CB<sub>1</sub> expressziójának igazolása transzfektált COS7 sejtekben. A CB<sub>1</sub> elleni immunfestés erőteljes CB<sub>1</sub> expressziót mutat az RFP pozitív sejtekben (A). Western blot analízis igazolja a CB<sub>1</sub> fokozott expresszióját a transzfektált sejtekben (TF) a kontroll sejtekhez viszonyítva (B). A denzitometriás vizsgálat ötszörösen megnövekedett CB<sub>1</sub> expressziót mutat a transzfektált sejtekben (C).

### 7.8 A 2-AG CB<sub>1</sub>-en kifejtett biológiai hatását az 1-AG alig módosítja

Mivel a 2-AG izomerizációjának következtében a mennyisége HBSS-ben fokozatosan csökken, ez a folyamat befolyásolhatja a 2-AG hatásosságát. Ennek vizsgálatára a CB<sub>1</sub>-gyel transzfektált COS7 sejteket fluoreszcens Ca<sup>2+</sup> indikátor festékekkel töltöttük meg, majd vizsgáltuk az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció változásait csökkenő koncentrációjú 2-AG adagolását követően. A CB<sub>1</sub>-gyel transzfektált sejteket RFP pozitivitásuk alapján szelektáltuk. Minden Ca<sup>2+</sup> mérés végén 180 μM ATP-t adtunk a sejtekhez az életképességük igazolására. Az egyes sejtek által adott maximális válasznak az ATP által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziens görbe alatti területét (AUC) vettük. A sejtek kannabinoidokra adott Ca<sup>2+</sup> válaszána AUC értékeit a maximális válasz

százalékaként kifejezett értéként adtuk meg. A sejteket csak egyszer kezeltük kannabinoid liganddal, hogy elkerüljük a CB<sub>1</sub> deszenzitizációját. Ezekkel a kísérleti beállításokkal a sejteket először 1 μM koncentrációjú 2-AG-val kezeltük, melyet vagy rögtön a megfelelő koncentrációjú 2-AG oldat elkészítését követően („0-perces” kísérlet), vagy az oldat 2.5, 5, ill. 10 perces szobahőmérsékleten történő előinkubálása után adtuk a sejtekhez. Ahogy azt a 14. ábra és a 3. táblázat is mutatja, a frissen elkészített 2-AG oldat a sejtekben az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció erőteljes tranziens emelkedését váltja ki. A „0-perces” kísérletben kapott AUC értékekkel szinte azonos értékek jellemzőek azokra a sejtekre, melyekhez a 2-AG oldatát 2.5 perccel az elkészítését követően adtuk hozzá, és csak kis változás figyelhető meg a sejtek Ca<sup>2+</sup> válaszában a 2-AG további 2.5 perces előinkubálásával is. Tíz perccel a 2-AG oldat elkészítését követően is csak elhanyagolható különbség figyelhető meg a sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációjában a “0-perces” kísérlethez viszonyítva. Annak ellenére tehát, hogy a 2-AG izomerizáció féléletideje a kísérleteinkben 8.8 perccnek adódott, eredményeink alapján az acilvándorlás miatt folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG-t tartalmazó oldatok által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek görbe alatti területei nem különböztek egymástól szignifikánsan (14. ábra).



**14. ábra: A 2-AG hatékonyságának időbeli változása. A COS7 sejtekben 1 μM 2-AG által kiváltott átlagos Ca<sup>2+</sup> tranziensek átlagait ábrázoló görbe közvetlenül (A), vagy 2.5 (B), 5 (C) és 10 (D) perccel a 2-AG oldat elkészítését követően. A 2-AG izomerizációjának előrehaladtával is csak kis mértékben változik a Ca<sup>2+</sup> tranziensek AUC értéke. Az egyes mérési pontok a 2-AG által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek görbe alatti területeinek átlagai ± SEM értékeket ábrázolnak (E).**

**3. táblázat: A különböző ideig előinkubált 2-AG oldat által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek görbe alatti területeinek értéke (átlag ± SEM) CB<sub>1</sub>-gyel transzfektált COS7 sejteken**

Idő (min)	AUC (az ATP válasz %-os aránya)	<i>n</i>
0	58.92±2.326	150
2.5	55.3±1.025	141
5	52.96±1.777	139
10	50.22±2.434	137

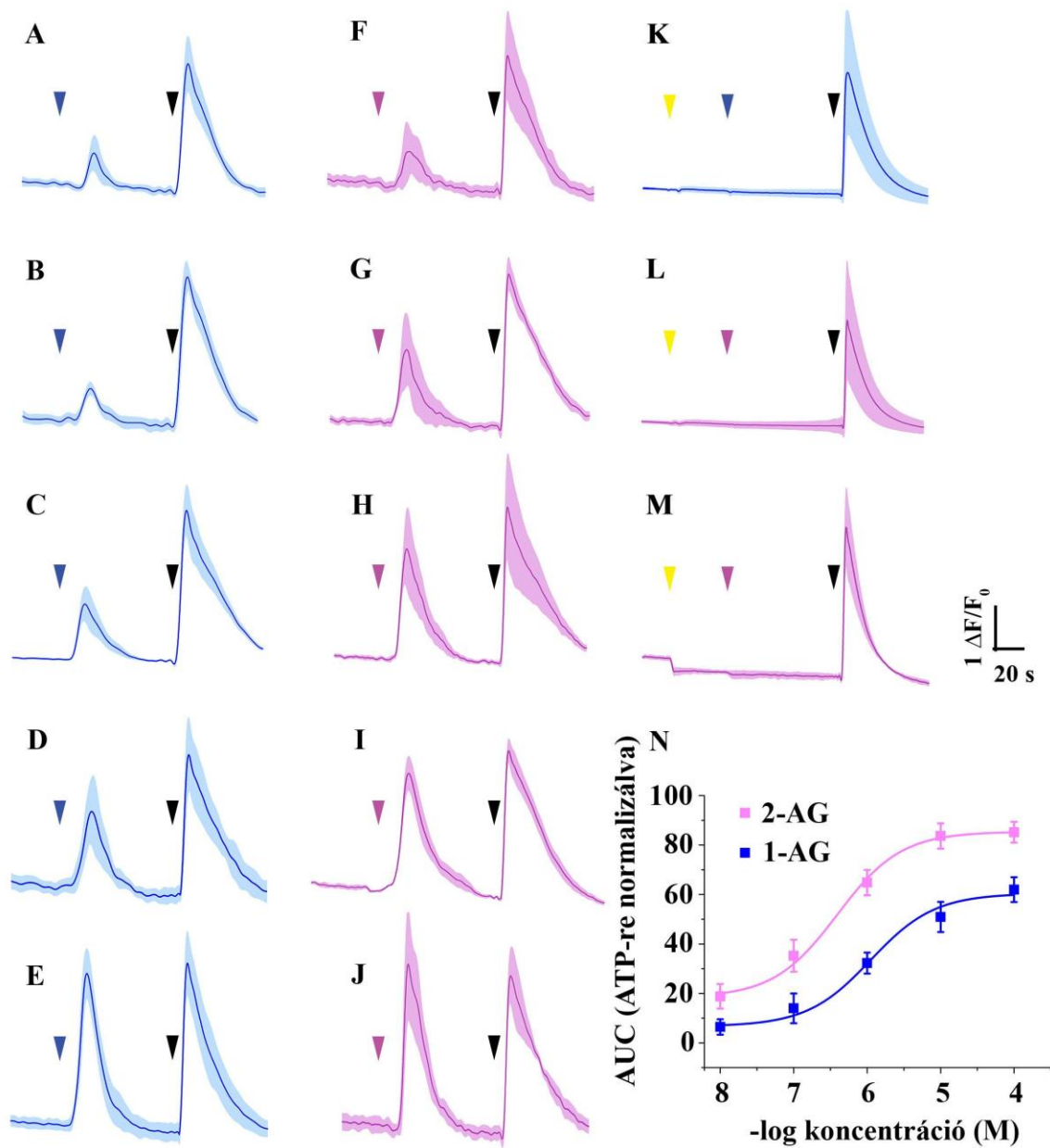
### **7.9 Az 1-AG aktiválja a CB<sub>1</sub>-et, és koncentráció-függő módon növeli a sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációját**

Kísérleteinkben legelőször azt vizsgáltuk, hogy képes-e az 1-AG a CB<sub>1</sub> aktiválására. Ezért a CB<sub>1</sub>-gyel transzfektált COS7 sejteket 10 nM-tól 100 µM-ig terjedő koncentrációjú 1-AG oldattal kezeltük, és vizsgáltuk, hogy megfigyelhető-e bármilyen változás az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációjában az adott koncentrációjú 1-AG hatására. Ahogy az a 15A-E ábrán és 4. táblázatban látható, az 1-AG képes Ca<sup>2+</sup> tranzienszt kiváltani a transzfektált COS7 sejtekben, melynek amplitúdója az 1-AG koncentrációjától függ.

Hogy összehasonlítsuk a két izomer hatásosságát és hatékonyságát, megismételtük a kísérletet, ezúttal azonban a sejteket 2-AG-val kezeltük, melyhez az 1-AG esetében is alkalmazott növekvő koncentráció skálát használtunk. Korábbi eredményeknek megfelelően (Sugiura és mtsai., 1999) a 2-AG már nanomolos koncentrációban is képes volt Ca<sup>2+</sup> tranziens kiváltására (15F-J ábra). Az 1- ill. 2-AG koncentráció-hatás görbéjéből azonban jól látszik (15N ábra, 4. táblázat), hogy a 2-AG hatékonysága (ED=0,35 µM) egy nagyságrenddel magasabb, mint az 1-AG-é (ED=4,67 µM).

Annak bizonyítására, hogy az 1-AG, ill. 2-AG által indukált Ca<sup>2+</sup> tranziensek a CB<sub>1</sub> aktiválása következtében alakulnak ki, a szelektív CB<sub>1</sub> antagonistát AM251-t alkalmaztuk. Az 5 µM AM251 előkezelést követően a 10 µM 1-AG adagolásával a sejtek 99,37 ± 0.51%-ban nem sikerült Ca<sup>2+</sup> tranzienszt kiváltani, ami alátámasztja, hogy az 1-AG CB<sub>1</sub> aktiválásán keresztül emeli

az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt (15K ábra). Az AM251 alkalmazása szinte teljesen kivédte a 2-AG által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek kialakulását (15L ábra), ugyanakkor az AM251 előkezelés ellenére a sejtek  $2,33 \pm 0,89$  %-a továbbra is válaszolt  $1 \mu\text{M}$  2-AG-ra. Ezekben a sejtekben az AM251 ugyan mérsékelte a kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek amplitúdóját, de nem védte ki teljesen a sejtek 2-AG-ra adott válaszát. Az AM251 előinkubálás a sejtek  $6,16 \pm 0,91$  százalékában az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció csökkenését okozta (15M ábra). Ez a jelenség valószínűleg a bazális endokannabinoid tónus gátlásának eredménye lehet, de az AM251, mint a  $\text{CB}_1$  inverz agonistája, a konstitutív  $\text{CB}_1$  aktivitás mérséklésén keresztül hasonló hatást válthat ki. Ezért az alapvonal AM251 által indukált esése vélhetően szintén  $\text{CB}_1$ -függő, de a jelenség hátterében nem zárhatók ki más mechanizmusok, mint például az adenzin  $\text{A}_1$  receptorok AM251 általi gátlásának szerepe sem.



15. ábra: 1-AG, ill. 2-AG által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek  $\text{CB}_1$ -gyel transzfektált COS7 sejteken. Az 1-AG által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek átlaga  $10^{-8}$  (A),  $10^{-7}$  (B),  $10^{-6}$  (C),  $10^{-5}$  (D) ill.  $10^{-4}$  (E) M 1-AG adagolását követően (kék nyíl). A  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek átlaga, melyet  $10^{-8}$  (F),  $10^{-7}$  (G),  $10^{-6}$  (H),  $10^{-5}$  (I) ill.  $10^{-4}$  (J) M koncentrációjú 2-AG adagolása vált ki (magenta nyíl). 5  $\mu$ M AM251 előkezelés (sárga nyíl) kivédi a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek kialakulását 10  $\mu$ M 1-AG (K, kék nyíl) és 1  $\mu$ M 2-AG (L, magenta nyíl) alkalmazása esetén. Az 5  $\mu$ M AM251 (sárga nyíl) több sejtnél is kiváltja az alaponvonal hirtelen csökkenését (M). Ezekben a sejtekben 1  $\mu$ M 2-AG (magenta nyíl) sem volt képes az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelésére. Az 1-AG és a 2-AG standard koncentráció-hatás görbéje (N). Minden adatpont a különböző koncentrációjú 1-AG (A-E) és 2-AG (F-J) által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek AUC értékeinek átlagait mutatja.

**4. táblázat: Az 1-AG és 2-AG által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek görbe alatti területeinek értékei (átlag ± SEM, 180 μM ATP-re adott válaszra normalizálva)**

Koncentráció	2-AG		1-AG	
	AUC (az <i>n</i> ATP válasz %-os aránya)	<i>n</i>	AUC (az <i>n</i> ATP válasz %-os aránya)	<i>n</i>
10 nM	18.81±4.99	133	6.45±3.12	129
100 nM	35.24±6.45	137	13.98±5.99	130
1 μM	64.84±5.11	145	32.26±4.24	134
10 μM	83.67±5.12	160	50.91±6.11	137
100 μM	85.19±4.23	159	61.99±5.01	144

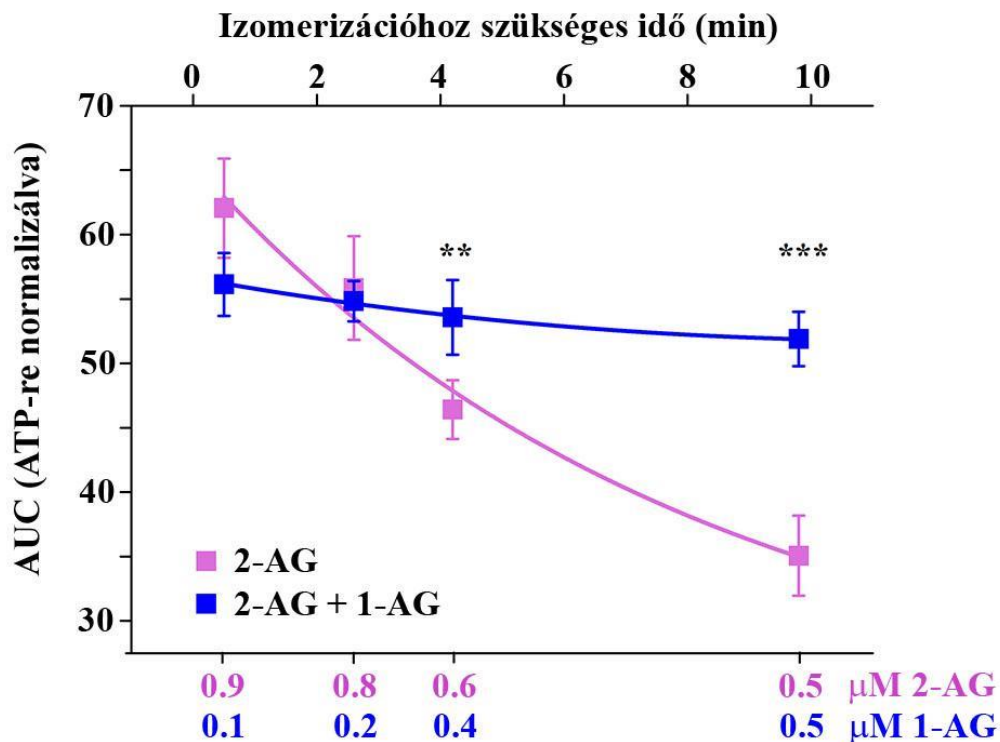
### ***7.10 A 2-AG koncentráció esésével párhuzamosan felhalmozódó 1-AG ellensúlyozza a CB<sub>1</sub> mediált Ca<sup>2+</sup> tranziensek gyengülését***

Kísérleteinkben először azt vizsgáltuk, hogy egy 10 perces időskálán hogyan változik a két izomer aránya. Méréseink alapján a 2-AG 1-AG-hoz viszonyított aránya 0.5, 2.6, 4.2 és 9.8 perccel a 2-AG HBSS-ben való feloldását követően 9:1, 8:2, 6:4 és 5:5. Ennek modellezésére a COS7 sejteket vagy a 2-AG csökkenő koncentrációjú oldatával (0.9, 0.8, 0.6, 0.5 μM) kezeltük, vagy egy olyan keverékkel, amely ugyanilyen koncentrációjú 2-AG mellett, annak csökkenő koncentrációjának megfelelően, az izomerizációt tükrözőnővekvő koncentrációjú 1-AG-t (0.1, 0.3, 0.4, 0.5 μM) is tartalmazott. A 2-AG korábban felvett koncentráció-válasz görbéjének (16. ábra) megfelelően a 2-AG koncentrációjának fokozatos csökkenését a Ca<sup>2+</sup> tranziensek gyengülése követte. Meglepő módon az 1-AG hatását a 2-AG által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensekre nagyban befolyásolta a két izomer relatív koncentrációja. Habár a 0.1 μM koncentrációjú 1-AG hatása a 0.9 μM koncentrációjú 2-AG-val szemben gyengén antagonisztikusnak bizonyult, méréseink alapján az 1-AG hatása a koncentrációjának fokozatos növekedésével additívvá válik, és mérsékli a 2-AG mennyiségének csökkenése miatt várható csillapodást az indukált Ca<sup>2+</sup> tranziensek amplitudójában. A csökkenő koncentrációjú 2-AG és növekvő koncentrációjú 1-AG párok koncentráció-hatás görbéjének esése meglepően jól utánozta a 2-AG által kiváltott Ca<sup>2+</sup> válaszok időfüggő, de nem szignifikáns változásait (16. ábra, 5. táblázat). Eredményeink azt is mutatják,

hogy az 1-AG hatása a 2-AG által kiváltott Ca<sup>2+</sup> válaszokra 0.8 μM 2-AG és 0.2 μM 1-AG aránynál neutrálisak, amely számításaink szerint 2.3 perccel az izomerizáció kezdetét követően áll be (16. ábra).

**5. táblázat: A 2-AG-ra és az 1-AG-val kombinációban alkalmazott 2-AG-ra kialakuló Ca<sup>2+</sup> tranziensek görbe alatti területeinek értékei (a 180 μM ATP-re adott válaszra standardizálva)**

Koncentráció		AUC (az ATP válasz %-os aránya)	<i>n</i>
2-AG (μM)	1-AG (μM)		
0.9	0	62.05±3.85	152
	0.1	56.13±2.44	142
0.8	0	55.85±4.02	150
	0.2	54.83±1.56	144
0.5	0	46.41±2.28	147
	0.5	53.57±2.9	145
0.1	0	35.07±3.12	145
	0.9	51.89±2.12	148



16. ábra: A 2-AG, ill. 2-AG és 1-AG különböző arányú keverékeinek hatása az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációra. Minden adatpont a kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek AUC értékeinek átlagát ábrázolja, 180  $\mu\text{M}$  ATP-re adott válasz százalékában kifejezve. A csökkenő 2-AG koncentráció a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek csökkenését eredményezi (magenta). Ezt a hatást az 1-AG koncentrációjának növelése kompenzálja. Az 1-AG alacsony koncentrációkban gyenge kompetitív antagonistaként viselkedik, de a hatása a koncentrációjának növekedésével additívnek bizonyul (kék). A felső abszcisszán az adott 2-AG/1-AG keverékek kialakulásához szükséges idő látható (a 9. E ábrához felhasznált adatokból számolva)

## 8. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során a 2-AG lebontását végző MGL megoszlását vizsgáltuk a gerincevelő felületes hátsó szarvában, illetve a 2-AG izomerizációjának mechanizmusát vizsgáltuk, mint a 2-AG inaktivációjának egy esetleges módját. Azt találtuk, hogy az MGL mindenekelőtt a felületes laminák peptiderg primer afferenseinek és interneuronjainak axonterminálisain fejeződik ki (Dócs és mtsai 2015). Ezen kívül azt is elmondhatjuk, hogy a 2-AG izomerizációja nem tekinthető valódi inaktivációs folyamatnak, hiszen a keletkező 1-AG képes a CB<sub>1</sub> aktivációjára (Dócs és mtsai 2017).

### 8.1 MGL az axonterminálisokon

A 2-AG szintézisét a posztszinaptikus neuronokban glutamaterg axonterminálisok aktivitása indukálja. A felszabadulás helyétől a 2-AG retrográd neurotranszmitterként visszafelé diffundál s a preszinaptikusan elhelyezkedő CB<sub>1</sub>-hez kötődve mind a serkentő mind a gátló neurotranszmissziót szabályozza. A 2-AG ezzel a mechanizmussal a retrográd szinaptikus depresszió két formáját, a DSE-t és a DSI-t váltja ki (Hashimoto és mtsai. 2008, Kano és mtsai. 2009, Pan és mtsai. 2009, Straiker és mtsai. 2009, Straiker és mtsa., 2009, Szabo és mtsai. 2006). A 2-AG által mediált jelátvitelt az aktivitásfüggő bioszintézis és az azt követő enzimatisz degradáció egyensúlya szigorúan szabályozza. A központi idegrendszerben a 2-AG lebontásának meghatározó hányadát végző MGL-t (Beltramo és mtsai., 2000, Cravatt és mtsai. 2001, Blankman és mtsai. 2007, Hashimoto és mtsai. 2007, Vandevoorde és mtsa., 2007, Pan és mtsai. 2009, Murataeva és mtsai. 2014) a preszinaptikus axonterminálisok citoplazmájában írták le korábban (Straiker és mtsai. 2009, Dinh és mtsai. 2002, Gulyás és mtsai. 2004), ennek megfelelően az MGL elhelyezkedése ideális a preszinaptikus CB<sub>1</sub>-hez kötődő 2-AG bontására. Mindez arra utal, hogy a 2-AG MGL általi hidrolízise szinapszis specifikus módon történik azokban az axonterminálisokban, amelyben a 2-AG a CB<sub>1</sub> aktiválásán keresztül a neurotranszmitter felszabadulást gátolja.

Az MGL expressziója a központi idegrendszer számos területén heterogén mintázatot mutat. A kisagyban például erőteljes MGL expresszió figyelhető meg a parallel rostok terminálisiban, azonban ez annak ellenére sem mondható el a kúszórostok, valamint a kosár- és csillagsejtek axonterminálisairól, hogy bővelkednek CB<sub>1</sub>-ben (Ohno-Shosaku és mtsai., 2012). Ez a heterogenitás figyelhető meg a gyrus dentatusban is, ahol az MGL a CB<sub>1</sub> pozitív és CB<sub>1</sub> negatív

GABA-erg interneuronok axonterminálisaiban egyaránt kimutatható. Érdekes módon az MGL-t annak ellenére sem sikerült kimutatni a serkentő moharostok terminálisain, hogy CB<sub>1</sub>-et expresszálnak, illetve a DGLa erőteljes expressziója figyelhető meg a posztszinaptikus szemcsesejtek dendrittüskéin (Uchigashima és mtsai., 2011). Eredményeink megerősítik a CB<sub>1</sub> és az MGL expressziójának részleges disszociációjára vonatkozó korábbi adatokat.

A CB<sub>1</sub> jelenlétét igazolták nemcsak az agyban, de a gerincvelőben is, melynek hátsó szarva a fájdalommal kapcsolatos ingerek feldolgozásának egyik legfontosabb központja. Kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy a CB<sub>1</sub> jelen van a peptiderg primer afferensek axonterminálisainak több mint felén, és a nem peptiderg primer afferensek axonterminálisainak több mint 20 %-án. A serkentő interneuronok axonterminálisainak egyharmada és a gátló interneuronok axonterminálisainak kb. 20 %-a ugyancsak expresszál CB<sub>1</sub>-et (Hegyi és mtsai., 2009). Jelen kísérleteink során azt találtuk, hogy a peptiderg primer afferensek axonterminálisainak csupán 17 %-a és a serkentő interneuronok axonterminálisainak csupán 10 %-a mutatott MGL pozitívítást. A nem peptiderg primer afferensek, illetve a gátló interneuronok axonterminálisain pedig csak rendkívül csekély százalékában sikerült MGL-t azonosítani. Ezek a morfológiai adatok azt mutatják, hogy az MGL a gerincvelő felületes hátsó szarvának CB<sub>1</sub>-et hordozó axonterminálisainak csak töredékében expresszálódik, ráadásul szinte teljesen hiányzik a nem peptiderg primer afferensek és gátló interneuronok axonterminálisáiból. Ebből arra következtethetünk, hogy a 2-AG mediált retrográd jelátvitel intenzitása és időbeli lefutása a gerincvelőhátsó szarvának CB<sub>1</sub> pozitív axonterminálisain az MGL jelenlététől vagy hiányától függően nagyon változatos lehet. Ezért a 2-AG felszabadulás előidézhetheti a rövid ideig tartó DSE kialakulását az MGL-t tartalmazó szinapszisokban, azaz a peptiderg primer afferensek és serkentő interneuronok axonterminálisainak egy részén. Ugyanakkor a CB<sub>1</sub> expresszió alapján a gátló interneuronok axonterminálisainak nagyjából 20 %-ban alakulhat ki a 2-AG mediált DSI. Ezekben az axonterminálisokban a 2-AG, a bontását végző MGL hiánya miatt, valószínűleg egy időben elhúzódó szabályozási mechnizmust aktiválhat. Azokban az axonterminálisokban, melyek CB<sub>1</sub> pozitívak ugyan, de MGL-t nem fejeznek ki a 2-AG lebontása történhet oxidatív enzimek, például a COX-2 és a LOX által.

## 8.2 MGL a glia sejteken

Korábbi tanulmányok már bizonyították az MGL jelenlétét a gliasejteken, többek között a kisagy radiális glia sejtjein, a gyrus dentatus és a hypothalamus asztrocitáin, csakúgy, mint tenyésztett mikroglia sejteken. Ebből következik, hogy a neuronok mellett a gliasejtek is képesek a 2-AG lebontására (Stella, 2009; Walter és mtsai., 2003; Walter és mtsai., 2004). Az asztrociták a szinaptikus kontaktusokkal való szoros kapcsolatuk miatt hatékonyan képesek szabályozni a neurotranszmitterek extracelluláris koncentrációját, részben fizikai diffúziós barrier kialakításával, részben a neurotranszmitterek felvételével (Piet és mtsai. 2004, Gordon és mtsai. 2009, Tasker és mtsai. 2012, Di és mtsai. 2013). Ezért az asztrociták a 2-AG extracelluláris megoszlásának dinamikus szabályozásában is részt vehetnek (Di és mtsai. 2013).

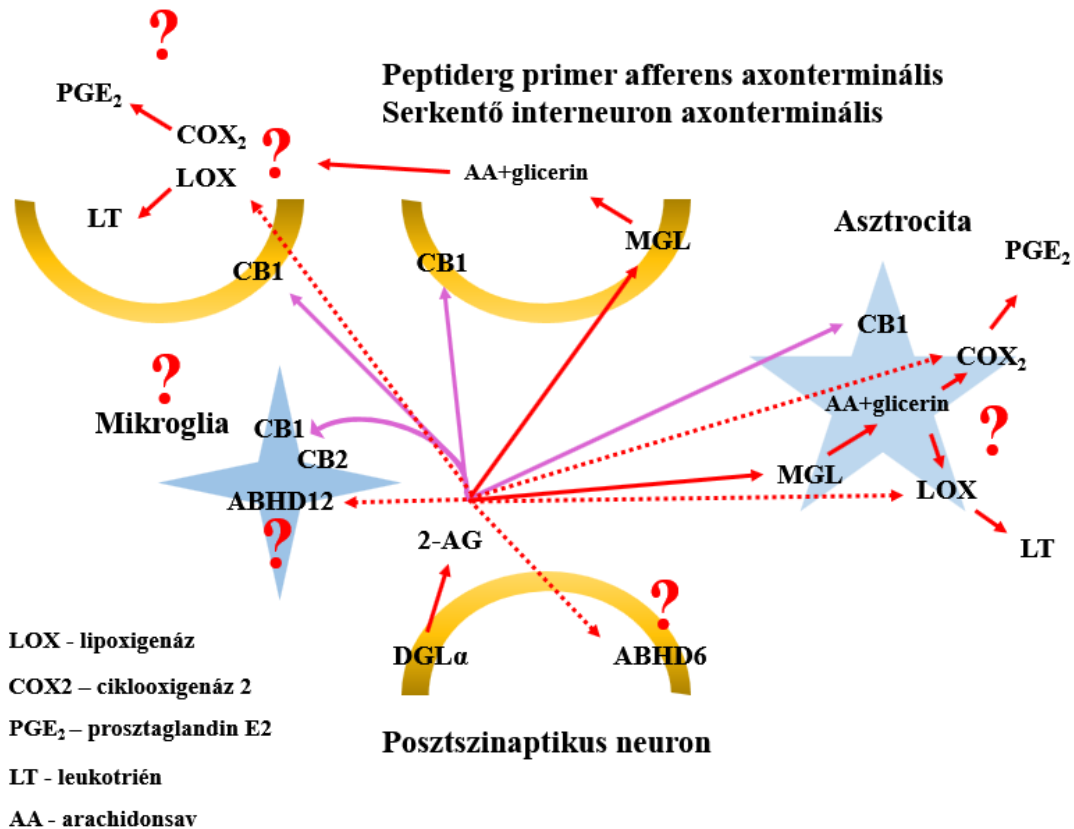
Eredményeink alapján, hasonlóképpen a gyrus dentatus és hypothalamus asztrocitáihoz a gerincvelő felületes hátsó szarvában található asztrociták egy populációja MGL-t expresszál, ugyanakkor a mikroglia sejtek esetében ez nem figyelhető meg (17. ábra). Ezért az asztrocitáknak a szinapszisokkal való szoros közelsége befolyásolhatja a stimulus-függő módon felszabaduló 2-AG mennyiségét az extracelluláris közegben. Ez különösen igaz azokra a primer afferens- és serkentő interneuronok axonterminálisaira, melyek CB<sub>1</sub>-et is hordoznak, és aktivációjuk posztzinaptikusan 2-AG felszabadulást okozhat (Di és mtsai., 2013). Az asztrociták funkcionális változásainak következtében változhat a pufferelő képességük is, melynek következtében a 2-AG távolabb diffundálhat a felszabadulásának helyétől és heteroszínaptikusan hathat (Di és mtsai., 2013; Kano és mtsai., 2009; Ohno-Shosaku és mtsai., 2012; Uchigashima és mtsai., 2011). Emiatt bár az MGL expressziója heterogén és az axonterminálisoknak, illetve az asztrocitáknak csupán egy populációjára korlátozódik, az MGL valószínűleg hatékonyan szabályozza a 2-AG szignalizációt a gerincvelő felületes hátsó szarvában hasonlóan a kisagyhoz, gyrus dentatushoz és hypothalamushoz (Uchigashima és mtsai. 2011, Tanimura és mtsai. 2012, Di és mtsai. 2013). A 2-AG-mediált retrográd neurotranszmisszió leírását a gerincvelő felületes hátsó szarvában további tényezők bonyolítják. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a DGL $\alpha$  erőteljesen expresszálódik a gerincvelői asztrocitákon és mikroglia sejteken (Hegyí és mtsai. 2012). Ezért a glia sejtek aktivációja, illetve az ennek következtében a sejtekben megemelkedő intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció, ami krónikus fájdalomban általános jelenség (Cao és mtsai., 2008, Graeber és mtsai., 2010, Scholz és mtsai., 2007), az asztrociták és a mikroglia sejtek is felszabadíthatnak 2-

AG-t, ami tovább erősítheti a 2-AG tónusos hatásait a gerincvelő fájdalomfeldolgozó neuronhálózatára.

Érdeemes megjegyezni, hogy a mikroglia sejtek az asztrociták és a neuronok mellett fontos szerepet játszanak a gerincvelői endokannabinoid rendszer működésében, hiszen  $CB_1$ -et expresszálnak és 2-AG felszabadításra is képesek (Hegyi és mtsai., 2009, 2012). Korábbi irodalmi adatokkal összhangban ugyanakkor az MGL expresszióját a mi munkacsoportunknak sem sikerült bizonyítani a mikroglia sejteken. Bár a kísérleteink nem terjedtek ki további, a 2-AG lebontását végző enzim vizsgálatára, feltételezzük, hogy a 2-AG degradációját a gerincvelői mikrogliaiban - BV-2 sejtekhez hasonlóan - az ABHD6 végzi (Marrs és mtsai., 2010; Muccioli és mtsai., 2007). Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy az asztrociták és mikroglia sejtek különböző szerepet játszanak a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozás kannabinoid-mediált szabályozásában, és a különböző gliasejtek részvétele a patológiás fájdalom indukciójában és fenntartásában a 2-AG eltérő lebontási mechanizmusai miatt szintén nagyon különböző lehet. Eredményeink alapján az asztrociták erőteljesebben szabályozhatják a 2-AG-mediált jelátvitelt a II. belső laminában mint a felületes hátsó szarv I. és II. külső laminájában, mivel a II. belső laminában talált erőteljesebb MGL immunreaktivitás az asztrocita nyúlványok MGL expressziójában megmutatkozó lamina-specifikus eltéréseket is tükrözheti.

A gerincvelő hátsó szarvának spontán hálózati aktivitásának, illetve a fájdalomfeldolgozó neuronhálózatok működésének 2-AG-mediált endokannabinoid kontrolljáról továbbra is keveset tudunk. A gerincvelői asztrociták részvétele a 2-AG extracelluláris koncentrációjának, illetve a glutamáterg és GABAerg szinapszisok közötti heteroszínaptikus jelátvitelnek a szabályozásában arra utal, hogy az asztrociták fontos szerepet játszanak a színaptikus transzmisszió finomhangolásában, illetve a gerincvelői hátsó szarv hálózati aktivitásának szabályozásában. Asztrocitákban a  $CB_1$  aktiváció az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedését okozza, amely a rendelkezésre álló irodalom egy része alapján gliotranszmisszióhoz vezet. Az egyik asztrocita eredetű gliotranszmitter a glutamát, amely képes a neuronokon található NMDA receptorok aktivációjára, és lassú befelé irányuló áramok kialakítására. Ezt a gerincvelő felületes hátsó szarvában található neuronokon is kimutatták (Nie és mtsai., J Neurophysiol 2010). A hasonló mechanizmussal felszabaduló, asztrocita eredetű glutamát aktiválhatja a preszínaptikus I-mGluR receptorokat is a közelben levő axonterminálisokon. (Navarrete és mtsai., Neuron 2010).

**Nem peptiderg primer afferens axonterminális**  
**Gátló interneuron axonterminális**



17. ábra: Az MGL expressziója a gerincvelő felületes hátsó szarvában és lebontásának alternatív útvonalai. A gerincvelő felületes hátsó szarvában az MGL főként peptiderg primer afferens és serkentő interneuron axonterminálison és asztrocitákon fejeződik ki (piros folytonos nyíl). A nem peptiderg primer afferensek és gátló interneuronok axonterminálisain és mikroglia sejteken feltételezhetően más enzim felelős a 2-AG inaktivációjáért (piros szaggatott nyíl).

### 8.3 Az acilmigráció szerepe a 2-AG degradációjában

Az endokannabinoidok nagyon elterjedt jelátviteli molekulák, melyek szerepét fiziológias és patológias folyamatokban is kimutatták. Habár az endokannabinoid rendszer működését szinte minden szervben és szövettípusban tanulmányozták (Kano és mtsai., 2009; Maccarrone és mtsai., 2015), a kannabinoid jelátvitel számos kérdését nem sikerült eddig megnyugtatóan tisztázni (Piomelli, 2014). Ezek közül az egyik a 2-AG koncentrációját csökkentő és hatását befejező komplex folyamatok közé tartozik, tekintve, hogy a leginkább tanulmányozott enzimatisz utvonala mellett a 2-AG, mint a 2-monoglicerol család tagja, termodinamikailag instabil

molekulaként hajlamos az acilvándorlásra, melynek eredményeként 1-AG keletkezik (Martin, 1953). Ez a jelenség nagyban megnehezíti a 2-AG biológiai mintákból történő mennyiségi kimutatását (Astarita és mtsa., 2009; Pastor és mtsai., 2014; Vogeser és mtsa., 2007), és komplikálja a 2-AG CB<sub>1</sub>-en kifejtett hatásának értelmezését (Zygmunt és mtsai., 2013). Fontos megjegyezni, hogy az acil migráció bármilyen protonos oldószerben (vizet is beleértve) végbemehet, sőt fiziológiás pH mellett a jelenlévő OH-csoport katalizálja a reakciót (Rouzer és mtsai., 2002). Ezért feltételezzük, hogy a 2-AG izomerizációja 1-AG-vá perces időskálán történik minden vizes oldatban, beleértve az általunk használtat is. Ezen túlmenően, a 2-AG átalakulását a fehérjék jelenléte fokozza, amely katalitikus felületként szolgál meggyorsítva a reakciós időt. Mivel a szervezetben szinte minden intra- vagy extracelluláris folyadék tartalmaz fehérjét, az acil migráció *in vivo* is releváns lehet.

A kísérleteinkben a 2-AG 1-AG-vá alakulásának kinetikáját vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy az izomerizáció viszonylag gyors folyamat, mely HBSS-ben 37 °C-on 16.16 perces, míg 10% szérumot tartalmazó HBSS-ben 8.8 perces felezési idővel megy végbe. Habár a kísérleteinket sejtmertes fiziológiás oldatban végeztük, ezek az eredmények mégis utalhatnak a 2-AG izomerizációjának biológiai relevanciájára sejtes rendszerekben is, hiszen a 2-AG-t degradáló hidrolázok sejtsűrűségtől függően 19-28 perces felezési idővel bontják a 2-AG-t (Di Marzo és mtsai., 1999). Ezért az acilvándorlás és ennek következtében az 1-AG kialakulása akár kétszer gyorsabban is végbemehet, mint az enzimatis inaktiváció. Fontos megjegyezni, hogy eredményeink - azaz a közegben megjelenő és felhalmozódó 1-AG - nem kérdőjelezi meg az idézett folyóirat (DiMarzo és mtsai. 1999) 2-AG hidrolízisére vonatkozó állításait, hiszen a vizsgált hidrolázok egyformán fogadják el az 1- és 2-monoglicerolokat, és a katabolizmusuk ugyanazon végtermékek, azaz arachidonsav és glicerol kialakulásához vezet (Di Marzo és mtsai., 1999; Tornqvist és mtsa., 1976). Olyan endokannabinoid-mediált jelátviteli folyamatokban azonban, amelyekben a 2-AG szignalizáció féléletideje rövidebb, mint az izomerizáció, a keletkező 1-AG mennyisége és hatása valószínűleg elhanyagolható. Ez a helyzet állhat fenn a 2-AG által mediált retrográd szinaptikus transzmisszió esetében is, ahol a depolarizáció indukált rövid plazmicitási folyamatok (DSE és DSI) féléletideje 15-40 másodperc közé esik (Kano és mtsai., 2009).

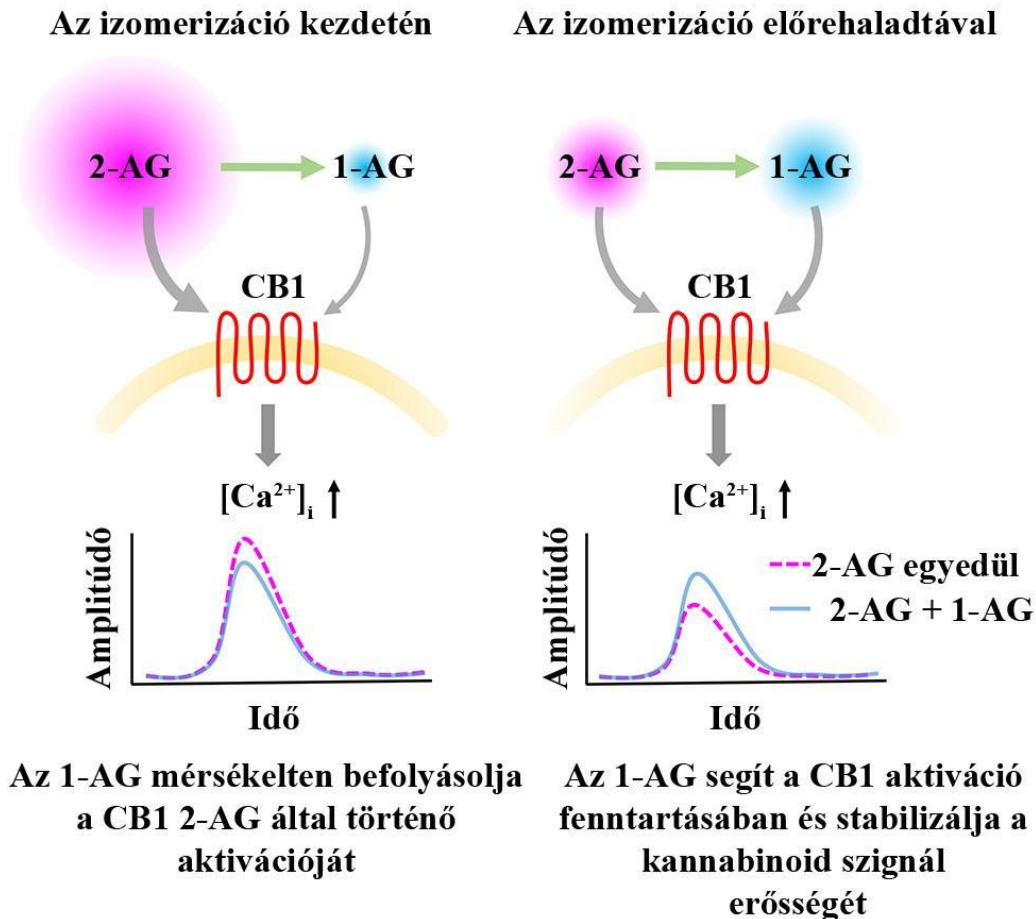
Korábbi tanulmányok alapján a 2-AG izomerizációja mindenképp a pH-tól és részben a közeg ionos összetételétől függ, ezekben a kísérletekben azonban a mi méréseinknél gyorsabb

acilvándorlást találtak: szérumentes közegben az izomerizáció féléletidejét 10 percen, szérummal dúsított RPMI táptalajban 2.3 percen határozták meg 37 °C-on. Habár a jelen és korábbi vizsgálatok eredményei közötti különbséget nem tudjuk teljes mértékben magyarázni, feltételezzük, hogy a gyorsabb acilvándorlás háttérében az alapvetően gazdagabb RPMI táptalaj állhat. Az általunk leírt, valamivel lassabb kémiai átalakulás ugyanakkor továbbra is azt mutatja, hogy a monoacil-glicerineket lebontó enzimek jelenléte ellenére a 2-AG vizes közegbe történő felszabadulása 1-AG kialakulásához, és valószínűleg átmeneti felhalmozódásához is vezet, emiatt az 1-AG esetleges hatását, vagy éppen inaktivitása a CB<sub>1</sub>-en egyaránt fontos biológiai következményekkel járhat. Ahogy a 2-AG arachidonilcsoportja a glicerin második szénatomjáról az első pozícióban levőre vándorol, nem csak a 2-AG koncentrációja csökken folyamatosan, de ezzel egyidejűleg az 1-AG koncentrációja emelkedik, és ez a folyamat addig tart, amíg el nem éri a 2-AG és 1-AG közti egyensúlyt 1:9 aránynál. A 2-AG izomerizációjának biológiai következményeit azonban szinte lehetetlen a rendelkezésre álló irodalom alapján megítélni, ugyanis az 1-AG biológiai aktivitását vizsgáló kísérletes munkák ellentmondásos eredményeket közölnek. Több kutatócsoport úgy találta, hogy az 1-AG biológiailag inaktív molekula (Weis és mtsai., 2010; Zoerner és mtsai., 2012), sőt a kannabinoid receptorok egyikéhez sem kötődik (van der Stelt és mtsai., 2002), amiből feltételezhető, hogy a 2-AG izomerizációja valódi inaktivációt jelent. Ezzel szemben azonban olyan adatok is rendelkezésre állnak, melyek szerint az 1-AG egy biológiailag aktív molekula, amely a CB<sub>1</sub>-en hatva megnöveli az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációt NG108-15 sejtekben (Sugiura és mtsai., 1999), sőt a TRPV1 receptor aktiválására is képes (Zygmunt és mtsai., 2013). Ezért az acilvándorlás és az ennek következtében keletkező 1-AG hatással lehet az endokannabinoid szignalizációra, akár úgy, hogy elősegíti a 2-AG hatásának befejezését, de akár egy olyan új molekula létrejöttét is eredményezheti, amely a prekursorához hasonlóan ugyanazokat a receptorokat képes aktiválni. Ez utóbbi forgatókönyv egy, a biológiában elég szokatlan mechanizmus lenne, így ugyanis a CB<sub>1</sub> aktivációja és a kannabinoidokra adott válasz erőssége a két izomer relatív koncentrációjától, illetve hatékonyságától és hatásosságától függne. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, hogy van-e az 1-AG-nak CB<sub>1</sub>-mediált biológiai hatása, és azt találtuk, hogy az 1-AG dóziszfüggő módon átmenetileg növeli a COS7 sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációját, ami korábbi tanulmányokkal összhangban (Sugiura és mtsai., 1999) azt mutatja, hogy az 1-AG valóban bioaktív molekula mely képes a CB<sub>1</sub> aktiválására. Méréseink alapján az 1-AG EC<sub>50</sub> értéke egy nagyságrenddel magasabb, mint a 2-AG-é, illetve a

2-AG által kiváltott maximális válasz is nagyobb a CB<sub>1</sub>-gyel transzfektált COS7 sejteken, azaz a 2-AG hatékonysága és hatásereősége is magasabb. Ennek megfelelően az 1-AG a CB<sub>1</sub> parciális agonistájának tekinthető, így a 2-AG izomerizációja nem tekinthető nem-enzimatis inaktivációs folyamatnak, hiszen egy új, bioaktív molekula kialakulásához vezet. Hozzá kell azonban tennünk, hogy fiziológias körülmények között, sejtes környezetben és különösen a 2-AG hidrolitikus enzimeinek jelenlétében az 1-AG mennyisége valószínűleg sosem ér el olyan magas koncentrációt, amely képes maximális válasz kiváltására.

A 2-AG felszabadulását követő acilmigráció mégis egy különleges helyzetet teremthet, melyben a monoacilglicerol koncentráció viszonylag állandó, azonban a két izomer aránya gyorsan változik, hiszen a 2-AG-t a fokozatosan keletkező 1-AG helyettesíti, így a két ligand versenghet a CB<sub>1</sub> ligandkötő helyeiért. Ezért a következőkben ennek a folyamatnak a következményeit vizsgáltuk olyan oldatok készítésével, melyben a két ligand aránya tükrözi a mennyiségükben végbemenő változásokat az idő függvényében. Az idő előrehaladtával a 2-AG által indukált Ca<sup>2+</sup> tranziensek amplitúdója fokozatosan, de nem szignifikáns mértékben csökkent. Ezt a folyamatot meglepően pontosan utánozták az izomerek mesterségesen előállított keverékei, melyek az izomerizáció előrehaladtának egyes időpontjait voltak hivatottak tükrözni. Ugyanakkor mindkét kísérlet eredményei nagyban eltértek attól az erőteljes és szignifikáns csökkenéstől, melyet a pontosan kimért, csökkenő mennyiségű 2-AG-val kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensek amplitúdójában tapasztaltunk. Ez arra enged következtetni, hogy a keletkező 1-AG elfedi az izomerizáció miatt csökkenő 2-AG koncentráció biológiai következményeit. Ugyanakkor az 1-AG parciális agonistaként viselkedve, a 2-AG maximális hatásának nagyjából 60%-ánál rögzíti a CB<sub>1</sub>-függő Ca<sup>2+</sup> tranziensek amplitúdóját. Emiatt a felhalmozódó 1-AG döntő szerepet játszhat a kannabinoid szignál erősségének stabilizálásában. Ez megmagyarázhatja, hogy a 2-AG termodinamikai instabilitása miért nincs szembeűnő hatással az olyan kísérletes felállásokban, melyeknek időtartama 5-10 perc vagy még hosszabb (Griebel és mtsai., 2015; De Luca és mtsai., 2014; Stanley és mts., 2014; Szabo és mtsai., 2006).

Az 1-AG CB<sub>1</sub>-en keresztül kifejtett biológiai hatása, valamint az, hogy az 1-AG képes a 2-AG viszonylag gyors átalakulásának következményeit kompenzálni (18. ábra), egy olyan mechanizmusra utalhatnak, amely segít a 2-AG hatását és talán egy endokannabinoid tónust is fenntartani.



**18. ábra:** A 1-AG hatása a 2-AG mediált CB<sub>1</sub> aktivációra és az ennek következtében kialakuló Ca<sup>2+</sup> tranziensekre. Az izomerizáció kezdetekor (baloldal) az 1-AG koncentrációja alacsony, és gyengén antagonisztikus hatású a 2-AG által indukált CB<sub>1</sub> aktivációra. Az izomerizáció előrehaladtával (jobb oldal) a 2-AG helyét azonban fokozatosan az 1-AG veszi át, így a CB<sub>1</sub> 1-AG általi aktivációja egyre kifejezettebb, így az 1-AG hatása kompenzálja a Ca<sup>2+</sup> tranzienseknek a 2-AG csökkenő koncentrációja miatti gyengülését.

Eredményeink értelmezésének azonban megvannak a korlátai. Kísérleteinket transzfektált sejteken végeztük, melyek a sejtek fiziológiáját, metabolizmusát, sejtek közötti kapcsolatait és extracelluláris közegét tekintve a legtöbb *in vivo* körülménytől alapvetően különbözhetnek. Ráadásul a monoacilglicerolokat hidrolizáló enzimek a két izomer arányát valószínűleg erőteljesen képesek befolyásolni. Az MGL ugyanis mindkét izomert egyformán elfogadja szubsztrátként, azonban az ABHD6 és ABHD12 az 1-AG-t preferálja a 2-AG-val szemben (Navia-Paldanius és mtsai., 2012). Ezért ezen enzimek esetlegesen eltérő expressziója különböző sejtípusokon és szövetekben az 1-AG 2-AG-hoz viszonyított arányát különbözőképpen módosíthatja. Az izomerizáció *in vivo* jelentőségét ezen felül a 2-AG-nak az alapvetően vízbázisú extracelluláris

közegbe történő felszabadítása kevésbé ismert folyamat (Bisogno és mtsai., 1997; Di Marzo és mtsai., 2005; Sugiura and Waku, 2000), melyet a 2-AG sejtmembránba való beoldása és abban a vándorlása laterális diffúzióval nagyban bonyolít, hiszen lassíthatja vagy akár teljesen meg is akadályozhatja az acilvándorlást (Hurst és mtsai., 2010; Makriyannis és mtsai., 2005). Mindezek alapján a gyors endokannabinoid-mediált jelátvitel, mint például a homoszinaptikus retrográd neurotransmisszió esetén valószínűleg a 2-AG szerepe meghatározó. A kannabinoidok elnyújtott biológiai hatásai kapcsán azonban, mint amilyen a tónusos kannabinoid receptor aktiváció (Sagar és mtsai., 2010), az 1-AG részvétele a kannabinoid jelátvitel erősségének stabilizálásában és a kannabinoid receptor aktiváció fenntartásában kiemelten fontos lehet. Ez utóbbi esetben felmerül a kérdés, hogy vajon a két izomerrel történő hosszantartó inkubálás előidézheti-e a CB<sub>1</sub> különböző mértékű deszenzitizációját, tovább bonyolítva ezzel az izomerizáció végkimenetelét.

Tekintettel arra, hogy az MGL-t hordozó szinapszisok és gliasejtek aránya elmarad a CB<sub>1</sub>-et expresszálókétól, feltételezzük, hogy a kannabinoid kontroll alatt álló, de MGL-t nem tartalmazó sejtekben a 2-AG lebontásáért más mechanizmus felelős. A 2-AG lebontásában az MGL mellett további enzimek is részt vesznek (Marrs és mtsai., 2010; Muccioli, 2010), így például a COX-2 illetve a LOX, valamint az ABHD6/12 és a FAAH. Jelenleg azonban semmilyen adat nem áll rendelkezésre ezen enzimek gerincvelői expressziójáról. Ezért azoknak a szinapszisoknak és gliasejteknek az esetében, amelyeket a 2-AG - CB<sub>1</sub> jelpálya szabályoz, de MGL-t nem expresszálnak, saját és irodalmi adatok alapján sem tudunk nyilatkozni arról, hogy milyen mechanizmus felelős a 2-AG eltávolításáért (Dócs és mtsai. 2015) (17. ábra). Fontos azonban megjegyezni, hogy különböző enzimek érintettsége esetében az endokannabinoidok hatása is különböző lehet. Ez különösen az oxidatív enzimek esetében lehet érdekes, ahol a 2-AG inaktivációjával bioaktív metabolitok keletkezhetnek, melyek számos patológiás folyamatban tölthetnek be fontos szerepet.

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS / SUMMARY

A nociceptív információfeldolgozásért felelős neuronhálózatok megfelelő működését számos mechanizmus szabályozza, többek között az endokannabinoid rendszer is. Ezt bizonyítja az endokannabinoid rendszer komponenseinek a jelenléte a fájdalomfeldolgozásban érintett idegrendszeri területeken, így a gerincvelő felületes hátsó szarvában is. Laboratóriumunk korábbi eredményei alapján a 2-AG hatását közvetítő  $CB_1$  és a szintéziséért felelős enzim jelenléte is kimutatható a gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban, ezzel szemben kevés adat áll rendelkezésünkre a lebontásáért felelős enzim, az MGL gerincvelői szintű expressziójáról. Ezért kísérleteink egyik célja az MGL celluláris és ultrastrukturális megoszlásának vizsgálata volt rágcslók gerincvelőjének felületes hátsó szarvában, immunhisztokémiai módszerek segítségével, fény- és elektronmikroszkópos szinten egyaránt.

Eredményeink alapján a peptiderg primer afferensek közel 20%-a és a serkentő interneuronok axonterminálisainak 10%-a volt MGL pozitív. Ezen túlmenően az asztrociták 20%-ában figyelhető meg az MGL jelenléte a gerincvelő I. ill. II. laminájában. Eredményeink ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a gerincvelő neuronális és gliális elemei közül a nem peptiderg primer afferensek és gátló interneuronok axonterminálisain illetve a mikroglia sejteknek csupán kevesebb mint 3%-án mutatható ki az MGL. Ez meglepő adat ha figyelembe vesszük, hogy ezen képletek jelentős részében  $CB_1$  expresszió figyelhető meg, tehát valószínűleg endokannabinoid kontroll alatt állnak, ám ebben az esetben a 2-AG hatásának terminálásáért minden bizonnyal más enzim felelős.

A 2-AG eliminálásában ugyanakkor nem elhanyagolható a 2-AG termodinamikai instabilitása, melynek következtében a 2-AG hajlamos a spontán molekuláris átrendeződésre, tehát a molekula arachidonil csoportja a glicerin 2. szénatomjáról az 1. szénre vándorol. Ezt a folyamatot acilvándorlásnak hívjuk és következtében egy termodinamikailag stabilabb molekula, az 1-AG keletkezik. Az acilvándorlás az endokannabinoid szignalizáció egyik befolyásoló tényezője lehet, hiszen az így keletkező 1-AG támogatja a 2-AG eliminációját ha nincs biológiai aktivitása. Azonban az 1-AG a 2-AG-hez való szerkezeti hasonlósága miatt aktiválhatja a  $CB_1$ -t, ebben az esetben a 2-AG izomerizációja az endokannabinoid rendszer működésének egy szokatlan finomhangolását jelentheti, melyben a 2-AG indukált válasz erősségét és időbeli lefutását a keletkező 1-AG által kiváltott szignalizáció befolyásolhatja. Ezért további kísérleteinkben  $CB_1$ -gyel transzfektált COS7 sejteken vizsgáltuk, hogy mutat-e biológiai aktivitást az 1-AG, és ha igen, hatással van-e az izomerizáció miatt folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG hatásaira az egyidejűleg növekvő koncentrációjú 1-AG.

Eredményeink azt mutatják, hogy az 1-AG a  $CB_1$  aktiválásán keresztül  $Ca^{2+}$  tranzienszt indukál, tehát az 1-AG bioaktív metabolitnak, illetve a  $CB_1$  agonistájának tekinthető. Fontos azonban megjegyezni, hogy a 2-AG-nak megfelelő hatás eléréséhez egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációjú 1-AG szükséges, azaz az izomerizációval keletkező 1-AG gyengébb agonista. Kísérleteinkből kiderült továbbá, hogy alacsony koncentrációban az 1-AG a 2-AG kompetitív antagonistájaként viselkedik, a fokozatosan növekvő koncentrációjú 1-AG azonban additív hatásának bizonyult, ugyanis a folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG mellett kialakuló 1-AG hatékonyan kompenzálta a 2-AG mérséklődő biológiai hatásait.

Eredményeink azt mutatják, hogy a 2-AG izomerizációjával kialakuló 1-AG bioaktív ligandnak tekinthető, és elsősorban időben elhúzódó, tónusos kannabinoid dependens biológiai jelenségek kialakításához járul hozzá. Mivel az MGL gerincvelői expressziója a vártnál kisebb mértékűnek mutatkozott és az acilvándorlás sem járul hozzá a 2-AG mediált jelátviteli folyamatok terminálásához, feltételezzük, hogy a gerincvelő felületes hátsó szarvában további 2-AG bontó enzimek is fontos szerepet játszhatnak a 2-AG degradációjában.

The proper functioning of the nociceptive pain processing pathway is regulated by certain mechanisms, among others by the endocannabinoid system. This is supported by the presence of the components of the endocannabinoid system in the regions of the central nervous system responsible for pain processing, also in the dorsal horn of the spinal cord, the first relay station of the pain pathway. Our earlier studies demonstrated the presence of the cannabinoid receptor type-1 (CB1) and the synthesising enzyme of 2-AG, the diacylglycerol-lipase  $\alpha$  (DGL $\alpha$ ) in the superficial laminae of the spinal dorsal horn, however, less is known about the spinal expression of monoacylglycerol-lipase (MGL), the enzyme responsible for the degradation of 2-AG. Therefore our aim was first to study the cellular and ultrastructural distribution of the MGL in the superficial laminae of spinal dorsal horn in rodents by immunohistochemical studies at the light- and electron microscopic level.

Our results suggest, that nearly 20% of the peptidergic primary afferent axon terminals, 10% of the axon terminals of excitatory interneurons and 20% of astrocytes are positive for MGL in laminae I. and II. However, the presence of MGL can be demonstrated in less than 3% of the axon terminals of non-peptidergic primary afferents and inhibitory interneurons and also microglial cells. This is a surprising finding if we consider the presence of CB1 in the majority of these structures which suggests, that they are under cannabinoid control. In this case, for the termination of the action of 2-AG has to be mediated by a different mechanism than the enzymatic route via MGL.

In the elimination of 2-AG we have to consider the thermodynamical instability of 2-AG, by which it is prone to spontaneous molecular rearrangement, during which the arachidonoil moiety of the molecule moves from the 2. carbon atom to the 1. carbon atom. This process is known as acylmigration and catalyses the formation of a thermodynamically more stable molecule, 1-AG. In this way acylmigration can be a modulator of endocannabinoid signalling, since it can support the elimination of 2-AG signalling if it doesn't have biological activity. However, due to the structural similarity of 1-AG to 2-AG it can activate CB1, in this way the isomerization of 2-AG can be a fine modulator of the endocannabinoid signalling, where the strength and duration of 2-AG induced responses can be influenced by the forming 1-AG.

Therefore in our further experiments we studied the biological activity of 1-AG in COS-7 cell line, transfected with CB1 and also examined if the continuously accumulating 1-AG can affect the 2-AG signaling. Our results suggest, that 1-AG generates Ca<sup>2+</sup> transients through a CB1-dependent manner, therefore it can be considered as a bioactive metabolite and the agonist of CB1. It is important to note however, that one order of magnitude higher concentration of 1-AG is necessary to evoke the same response as 2-AG does, so 1-AG is a weaker agonist of the CB1 receptor. Our results further demonstrate, that in low concentration 1-AG is a competitive antagonist of 2-AG, but the continuously increasing concentration of 1-AG seems to have an additive effect, since besides the decreasing concentration of 2-AG the forming 1-AG effectively compensated the weakening effects of 2-AG.

Our results indicate, that 1-AG, that is formed during the isomerisation of 2-AG is a bioactive ligand and is primarily responsible for the mediation of long lasting endocannabinoid-mediated processes. Because the spinal expression of MGL is lower than the expected, and the acylmigration is not a true inactivation process of 2-AG signalling we have to assume, that in the superficial laminae of the spinal dorsal horn other degradative routes serve for the termination of 2-AG mediated endocannabinoid signalling.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

**Abood, M.E., Ditto, K.E., Noel, M.A., Showalter, V.M., and Tao, Q. (1997).** Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* *53*, 207–214.

**Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C.E., Brenner, G.J., Rubino, T., Michalski, C.W., Marsicano, G., Monory, K., et al. (2007).** Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat. Neurosci.* *10*, 870–879.

**Alger, B.E., and Pitler, T.A. (1995).** Retrograde signaling at GABA<sub>A</sub>-receptor synapses in the mammalian CNS. *Trends Neurosci.* *18*, 333–340.

**Alvarez, F.J., Villalba, R.M., Zerda, R., and Schneider, S.P. (2004).** Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J. Comp. Neurol.* *472*, 257–280.

**Astarita, G., and Piomelli, D. (2009).** Lipidomic analysis of endocannabinoid metabolism in biological samples. *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* *877*, 2755–2767.

**Azad, S.C., Kurz, J., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., and Rammes, G. (2008).** Activation of CB1 specifically located on GABAergic interneurons inhibits LTD in the lateral amygdala. *Learn. Mem.* *15*, 143–152.

**Bäck, M., Powell, W.S., Dahlén, S.-E., Drazen, J.M., Evans, J.F., Serhan, C.N., Shimizu, T., Yokomizo, T., and Rovati, G.E. (2014).** Update on leukotriene, lipoxin and oxoecosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 3551–3574.

**Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R., and Vogel, Z. (1995).** The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.* *375*, 143–147.

**Bayly, C.I., Black, W.C., Léger, S., Ouimet, N., Ouellet, M., and Percival, M.D. (1999).** Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *9*, 307–312.

**Bender, V.A., Bender, K.J., Brasier, D.J., and Feldman, D.E. (2006).** Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* *26*, 4166–4177.

- Berrendero, F., Sepe, N., Ramos, J.A., Di Marzo, V., and Fernandez-Ruiz, J.J. (1999).** Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33, 181–191.
- Bíró, T., Tóth, B.I., Haskó, G., Paus, R., and Pacher, P. (2009).** The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 411–420.
- Bisogno, T., Sepe, N., Melck, D., Maurelli, S., De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (1997).** Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem. J.* 322 ( Pt 2), 671–677.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.-J., et al. (2003).** Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* 163, 463–468.
- Blázquez, C., Sánchez, C., Daza, A., Galve-Roperh, I., and Guzmán, M. (1999).** The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J. Neurochem.* 72, 1759–1768.
- Boyington, J.C., Gaffney, B.J., and Amzel, L.M. (1993).** The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* 260, 1482–1486.
- Brenowitz, S.D., and Regehr, W.G. (2003).** Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J. Neurosci.* 23, 6373–6384.
- Brenowitz, S.D., and Regehr, W.G.** Cellular/Molecular Calcium Dependence of Retrograde Inhibition by Endocannabinoids at Synapses onto Purkinje Cells.
- Brown, S.P., Safo, P.K., and Regehr, W.G. (2004).** Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* 24, 5623–5631.
- Caterina, M.J., and Julius, D. (2001).** The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487–517.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997).** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000).** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306–313.
- Chandrasekharan, J.A., and Sharma-Walia, N. (2015).** Lipoxins: nature’s way to resolve inflammation. *J Inflamm Res* 8, 181–192.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Danbolt, N.C., Osen, K.K., Edwards, R.H., and Storm-Mathisen, J. (1998).** The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 18, 9733–9750.
- Chevaleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Südhof, T.C., and Castillo, P.E. (2007).** Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron* 54, 801–812.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., and Gilula, N.B. (1996).** Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988).** Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605–613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992).** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949.
- Di, S., Popescu, I.R., and Tasker, J.G. (2013).** Glial control of endocannabinoid heterosynaptic modulation in hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* 33, 18331–18342.
- Dinh, T.P., Freund, T.F., and Piomelli, D. (2002a).** A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121, 149–158.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002b).** Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10819–10824.
- Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A., Chakrabarti, S.K., and Nadler, J.L. (2011).** Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* 50, 115–131.

**Drew, G.M., Mitchell, V.A., and Vaughan, C.W.** Glutamate spillover modulates GABAergic synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey via metabotropic glutamate receptors and endocannabinoid .... Soc Neuroscience.

**Egertová, M., and Elphick, M.R. (2000).** Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.

**Ehrhart, J., Obregon, D., Mori, T., Hou, H., Sun, N., Bai, Y., Klein, T., Fernandez, F., Tan, J., and Shytle, R.D. (2005).** Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J. Neuroinflammation* 2, 29.

**Evans, D.M., Johnson, M.R., and Howlett, A.C. (1992).** Ca<sup>2+</sup>-dependent release from rat brain of cannabinoid receptor binding activity. *J. Neurochem.* 58, 780–782.

**Farquhar-Smith, W.P., Egertová, M., Bradbury, E.J., McMahon, S.B., Rice, A.S., and Elphick, M.R. (2000).** Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 510–521.

**Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., and Piomelli, D. (2005).** Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 352–358.

**Felder, C.C., and Glass, M. (1998).** Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 179–200.

**Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggin, R.M., Koppel, G.A., et al. (1996).** Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393, 231–235.

**Ferrer, B., Asbrock, N., Kathuria, S., Piomelli, D., and Giuffrida, A. (2003).** Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1607–1614.

**Fezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E., Feole, M., and Maccarrone, M. (2014).** Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* 19, 17078–17106.

**Fiskerstrand, T., H'mida-Ben Brahim, D., Johansson, S., M'zahem, A., Haukanes, B.I., Drouot, N., Zimmermann, J., Cole, A.J., Vedeler, C., Bredrup, C., et al. (2010).** Mutations in

ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 410–417.

**Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003).** Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system

**Freundt-Revilla J., Kegler K., Baumgärtner W., Tipold A. (2017)**

Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system

PlosOne, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181064>

**Furuyama, T., Inagaki, S., and Takagi, H. (1993).** Distribution of type II adenylyl cyclase mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 19, 165–170.

**Galante, M., and Diana, M.A. (2004).** Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production. *J. Neurosci.* 24, 4865–4874.

**Gammon, C.M., Allen, A.C., and Morell, P. (1989).** Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurochem.* 53, 95–101.

**Gertsch, J., Pertwee, R.G., and Di Marzo, V. (2010).** Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? *Br. J. Pharmacol.* 160, 523–529.

**Giang, D.K., and Cravatt, B.F. (1997).** Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2238–2242.

**Gómez Del Pulgar, T., De Ceballos, M.L., Guzmán, M., and Velasco, G. (2002).** Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 36527–36533.

**Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006).** Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071, 10–23.

**Goparaju, S.K., Ueda, N., Taniguchi, K., and Yamamoto, S. (1999).** Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 57, 417–423.

**Griebel, G., Pichat, P., Beeské, S., Leroy, T., Redon, N., Jacquet, A., Françon, D., Bert, L., Even, L., Lopez-Grancha, M., et al. (2015).** Selective blockade of the hydrolysis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol impairs learning and memory performance while producing antinociceptive activity in rodents. *Sci. Rep.* *5*, 7642.

**Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boscia, F., and Freund, T.F. (2004).** Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 441–458.

**Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X., and Elde, R. (1999).** Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 946–958.

**Hasegawa-Sasaki, H. (1985).** Early changes in inositol lipids and their metabolites induced by platelet-derived growth factor in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *Biochem. J.* *232*, 99–109.

**Hegyi, Z., Kis, G., Holló, K., Ledent, C., and Antal, M. (2009).** Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *30*, 251–262.

**Hegyi, Z., Holló, K., Kis, G., Mackie, K., and Antal, M. (2012).** Differential distribution of diacylglycerol lipase-alpha and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* *60*, 1316–1329.

Henry, D.J., and Chavkin, C. (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* *186*, 91–94.

**Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990).** Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 1932–1936.

**Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991).** Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* *11*, 563–583.

**Herkenham, M., Lynn, A.B., and Johnson, M.R.** Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *Soc Neuroscience.*

**Higuchi, S., Irie, K., Nakano, T., Sakamoto, Y., Akitake, Y., Araki, M., Ohji, M., Furuta, R., Katsuki, M., Yamaguchi, R., et al. (2010).** Reducing acyl migration during purification of 2-arachidonoylglycerol from biological samples before gas chromatography mass spectrometry analysis. *Anal. Sci.* 26, 1199–1202.

**Hinz, B., and Brune, K. (2002).** Cyclooxygenase-2--10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 367–375.

**Hohmann, A.G., and Suplita, R.L. (2006).** Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 8, E693–708.

**Howlett, A.C., and Fleming, R.M. (1984).** Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26, 532–538.

**Howlett, A.C., Qualy, J.M., and Khachatrian, L.L. (1986).** Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 29, 307–313.

**Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002).** International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.

**Huestis, M.A., Gorelick, D.A., Heishman, S.J., Preston, K.L., Nelson, R.A., Moolchan, E.T., and Frank, R.A. (2001).** Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 322–328.

**Hurst, D.P., Grossfield, A., Lynch, D.L., Feller, S., Romo, T.D., Gawrisch, K., Pitman, M.C., and Reggio, P.H. (2010).** A lipid pathway for ligand binding is necessary for a cannabinoid G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 17954–17964.

**Ito, M. (2001).** Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol. Rev.* 81, 1143–1195.

**Jayamanne, A., Greenwood, R., Mitchell, V.A., Aslan, S., Piomelli, D., and Vaughan, C.W. (2006).** Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br. J. Pharmacol.* 147, 281–288.

**Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009).** Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.

**Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., and Holm, C. (1997).** cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase.

Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* 272, 27218–27223.

**Karlsson, M., Reue, K., Xia, Y.R., Lusis, A.J., Langin, D., Tornqvist, H., and Holm, C. (2001).** Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene* 272, 11–18.

**Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., et al. (2003).** Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* 9, 76–81.

**Katona, I., and Freund, T.F. (2008).** Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14, 923–930.

**Katona, I., Sperlách, B., Sík, A., Káfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999).** Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19, 4544–4558.

**Katona, I., Sperlách, B., Maglóczy, Z., Sántha, E., Köfalvi, A., Czirják, S., Mackie, K., Vizi, E.S., and Freund, T.F. (2000).** GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100, 797–804.

**Kaur R., Sidhu P., Singh S. (2016)** What failed BIA 10-2474 Phase I clinical trial? Global speculations and recommendations for future Phase I trials. *J Pharmacol Pharmacother.* 7(3), 120–126

**Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2006).** The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* 26, 2991–3001.

**Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., and Glass, M. (2005).** Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* 67, 1697–1704.

**Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., and Alger, B.E. (2002).** Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 10182–10191.

**Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., and Sugiura, T. (1998).** 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as

one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA<sup>2+</sup>-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* 429, 152–156.

**Konrad, R.J., Major, C.D., and Wolf, B.A. (1994).** Diacylglycerol hydrolysis to arachidonic acid is necessary for insulin secretion from isolated pancreatic islets: sequential actions of diacylglycerol and monoacylglycerol lipases. *Biochemistry* 33, 13284–13294.

**Kozak, K.R., Gupta, R.A., Moody, J.S., Ji, C., Boeglin, W.E., DuBois, R.N., Brash, A.R., and Marnett, L.J. (2002).** 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J. Biol. Chem.* 277, 23278–23286.

**Kreitzer, A.C., and Malenka, R.C. (2005).** Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J. Neurosci.* 25, 10537–10545.

**Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001).** Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29, 717–727.

**Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., et al. (1996).** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384, 644–648.

**Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

**Lawrence, D.K., and Gill, E.W. (1975).** The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol. Pharmacol.* 11, 595–602.

**Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., et al. (1999).** Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401–404.

**Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2006).** Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 45, 4720–4726.

**Liu, Q., Tonai, T., and Ueda, N. (2002).** Activation of N-acyl ethanolamine-releasing phospholipase D by polyamines. *Chem Phys Lipids* 115, 77–84.

**Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2007).** Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56–62.

- Llano, I., Leresche, N., and Marty, A. (1991).** Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6, 565–574.
- Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavón, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., et al. (2009).** Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* 5, 37–44.
- De Luca, M.A., Valentini, V., Bimpisidis, Z., Cacciapaglia, F., Caboni, P., and Di Chiara, G. (2014).** Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Self-Administration by Sprague-Dawley Rats and Stimulation of in vivo Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens Shell. *Front. Psychiatry* 5, 140.
- Maccarrone, M., Bab, I., Biró, T., Cabral, G.A., Dey, S.K., Di Marzo, V., Konje, J.C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., et al. (2015).** Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 277–296.
- Mackie, K., and Hille, B. (1992).** Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3825–3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., and Mitchell, R. (1995).** Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552–6561.
- Mailleux, P., and Vanderhaeghen, J.J. (1992).** Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48, 655–668.
- Makriyannis, A., Tian, X., and Guo, J. (2005).** How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77, 210–218.
- Maneuf, Y.P., and Brotchie, J.M. (1997).** Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *Br. J. Pharmacol.* 120, 1397–1398.
- Marrs, W.R., Blankman, J.L., Horne, E.A., Thomazeau, A., Lin, Y.H., Coy, J., Bodor, A.L., Muccioli, G.G., Hu, S.S.-J., Woodruff, G., et al. (2010).** The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* 13, 951–957.

- Marsicano, G., and Lutz, B. (1999).** Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 4213–4225.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., et al. (2003).** CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* *302*, 84–88.
- Martin, J.B. (1953).** The Equilibrium between Symmetrical and Unsymmetrical Monoglycerides and Determination of Total Monoglycerides. *J. Am. Chem. Soc.* *75*, 5483–5486.
- Di Marzo, V., and Wang, J. (2015).** The endocannabinoidome: The world of endocannabinoids and related mediators.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998).** Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* *21*, 521–528.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J.A., and Kunos, G. (1999).** Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur. J. Biochem.* *264*, 258–267.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., and Bisogno, T. (2005).** The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 147–185.
- Mato, S., Lafourcade, M., Robbe, D., Bakiri, Y., and Manzoni, O.J. (2008).** Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca<sup>++</sup> channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* *54*, 87–94.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990).** Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* *346*, 561–564.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., and Compton, D.R. (1995).** Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 83–90.
- Melvin, L.S., and Johnson, M.R. (1987).** Structure-activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. *NIDA Res Monogr* *79*, 31–47.
- Molander, C., Xu, Q., and Grant, G. (1984).** The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J. Comp. Neurol.* *230*, 133–141.

- Moldrich, G., and Wenger, T. (2000).** Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21, 1735–1742.
- Moody, J.S., Kozak, K.R., Ji, C., and Marnett, L.J. (2001).** Selective Oxygenation of the Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol by Leukocyte-Type 12-Lipoxygenase<sup>†</sup>. *Biochemistry* 40, 861–866.
- Morishita, J., Okamoto, Y., Tsuboi, K., Ueno, M., Sakamoto, H., Maekawa, N., and Ueda, N. (2005).** Regional distribution and age-dependent expression of N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in rat brain. *J. Neurochem.* 94, 753–762.
- Muccioli, G.G. (2010).** Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* 15, 474–483.
- Muccioli, G.G., Xu, C., Odah, E., Cudaback, E., Cisneros, J.A., Lambert, D.M., López Rodríguez, M.L., Bajjalieh, S., and Stella, N. (2007).** Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J. Neurosci.* 27, 2883–2889.
- Mulvihill, M.M., and Nomura, D.K. (2013).** Therapeutic potential of monoacylglycerol lipase inhibitors. *Life Sci.* 92, 492–497.
- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993).** Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2008).** Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883–893.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2010).** Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113–126.
- Navarrete, M., Díez, A., and Araque, A. (2014).** Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 369, 20130599.
- Navia-Paldanius, D., Savinainen, J.R., and Laitinen, J.T. (2012).** Biochemical and pharmacological characterization of human  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J. Lipid Res.* 53, 2413–2424.
- Nevian, T., and Sakmann, B. (2006).** Spine Ca<sup>2+</sup> signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J. Neurosci.* 26, 11001–11013.
- Nucci, C., Gasperi, V., Tartaglione, R., Cerulli, A., Terrinoni, A., Bari, M., De Simone, C., Agrò, A.F., Morrone, L.A., Corasaniti, M.T., et al. (2007).** Involvement of the endocannabinoid

system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2997–3004.

**Nyilas, R., Dudok, B., Urbán, G.M., Mackie, K., Watanabe, M., Cravatt, B.F., Freund, T.F., and Katona, I. (2008).** Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J. Neurosci.* 28, 1058–1063.

**O’Neill, G.P., and Ford-Hutchinson, A.W. (1993).** Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 330, 156–160.

**Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto, Y., and Kano, M. (2012).** Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist* 18, 119–132.

**Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. (2004).** Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* 279, 5298–5305.

**Pacher, P., Bátkai, S., and Kunos, G. (2006).** The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 389–462.

**Pan, X., Ikeda, S.R., and Lewis, D.L. (1996).** Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca<sup>2+</sup> channels in a neuronal expression system. *Mol. Pharmacol.* 49, 707–714.

**Parsons, L.H., and Hill, M.N. (2015).** International review of neurobiology - Endocannabinoids (Academic Press).

**Pastor, A., Farré, M., Fitó, M., Fernandez-Aranda, F., and de la Torre, R. (2014).** Analysis of ECs and related compounds in plasma: artifactual isomerization and ex vivo enzymatic generation of 2-MGs. *J. Lipid Res.* 55, 966–977.

**Pertwee, R.G.** Cannabinoid receptors and pain. Elsevier.

**Petersen, G., and Hansen, H.S. (1999).** N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D lacks the ability to transphosphatidylate. *FEBS Lett.* 455, 41–44.

**Piomelli, D. (2014).** More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 228–234.

**Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1994).** Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13, 1447–1455.

- Prescott, S.M., and Majerus, P.W. (1983).** Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J. Biol. Chem.* *258*, 764–769.
- Reguero, L., Puente, N., Elezgarai, I., Ramos-Uriarte, A., Gerrikagoitia, I., Bueno-López, J.-L., Doñate, F., and Grandes, P. (2014).** Subcellular localization of NAPE-PLD and DAGL- $\alpha$  in the ventromedial nucleus of the hypothalamus by a preembedding immunogold method. *Histochem. Cell Biol.* *141*, 543–550.
- Rhee, M.H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., and Vogel, Z. (1998).** Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J. Neurochem.* *71*, 1525–1534.
- Ribeiro-da-Silva, A., and De Koninck, Y. (2008).** Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, (Elsevier), pp. 279–310.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., and Manzoni, O.J. (2002).** Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 8384–8388.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K., and Pickel, V.M. (2001).** Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* *21*, 823–833.
- Rouzer, C.A., and Marnett, L.J. (2011).** Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem. Rev.* *111*, 5899–5921.
- Rouzer, C.A., Ghebreselasie, K., and Marnett, L.J. (2002).** Chemical stability of 2-arachidonoylglycerol under biological conditions. *Chem Phys Lipids* *119*, 69–82.
- Sagar, D.R., Staniaszek, L.E., Okine, B.N., Woodhams, S., Norris, L.M., Pearson, R.G., Garle, M.J., Alexander, S.P.H., Bennett, A.J., Barrett, D.A., et al. (2010).** Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a rat model of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheum.* *62*, 3666–3676.
- Sakurada, T., and Noma, A. (1981).** Subcellular localization and some properties of monoacylglycerol lipase in rat adipocytes. *J. Biochem.* *90*, 1413–1419.

- Savinainen, J.R., Saario, S.M., and Laitinen, J.T. (2012).** The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 267–276.
- Schmid, H.H., Schmid, P.C., and Natarajan, V. (1990).** N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog. Lipid Res.* 29, 1–43.
- Schmid, H.H., Schmid, P.C., and Natarajan, V. (1996).** The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chem Phys Lipids* 80, 133–142.
- Schmid, P.C., Zuzarte-Augustin, M.L., and Schmid, H.H. (1985).** Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J. Biol. Chem.* 260, 14145–14149.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005).** Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329–332.
- Sigal, E., Grunberger, D., Craik, C.S., Caughey, G.H., and Nadel, J.A. (1988).** Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* 263, 5328–5332.
- Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2010).** Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol. Biosyst.* 6, 1411–1418.
- Slipetz, D.M., O’Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., and Metters, K.M. (1995).** Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 48, 352–361.
- Somma-Delpéro, C., Valette, A., Lepetit-Thévenin, J., Nobili, O., Boyer, J., and Vérine, A. (1995).** Purification and properties of a monoacylglycerol lipase in human erythrocytes. *Biochem. J.* 312 ( Pt 2), 519–525.
- Stanley, C.P., and O’Sullivan, S.E. (2014).** Cyclooxygenase metabolism mediates vasorelaxation to 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in human mesenteric arteries. *Pharmacol. Res.* 81, 74–82.
- Starowicz, K., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007).** Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol. Ther.* 114, 13–33.
- Stella, N. (2009).** Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 244–253.

- Stella, N., Schweitzer, P., and Piomelli, D. (1997).** A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773–778.
- Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H.J., and Maguire, G. (1999).** Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14565–14570.
- Sugiura, T., and Waku, K. (2000).** 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108, 89–106.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995).** 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., et al. (1999).** Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J. Biol. Chem.* 274, 2794–2801.
- Suplita, R.L., Gutierrez, T., Fegley, D., Piomelli, D., and Hohmann, A.G. (2006).** Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. *Neuropharmacology* 50, 372–379.
- Szabo, B., Urbanski, M.J., Bisogno, T., Di Marzo, V., Mendiguren, A., Baer, W.U., and Freiman, I. (2006).** Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J. Physiol. (Lond.)* 577, 263–280.
- Thomas, E.A., Cravatt, B.F., Danielson, P.E., Gilula, N.B., and Sutcliffe, J.G. (1997).** Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 50, 1047–1052.
- Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1976).** Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 251, 813–819.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998).** Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.
- Turu, G., and Hunyady, L. (2010).** Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 75–85.

- Twitchell, W., Brown, S., and Mackie, K. (1997).** Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43–50.
- Uchigashima, M., Yamazaki, M., Yamasaki, M., Tanimura, A., Sakimura, K., Kano, M., and Watanabe, M. (2011).** Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 31, 7700–7714.
- Ueda, N., Liu, Q., and Yamanaka, K. (2001).** Marked activation of the N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phosphodiesterase by divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 1532, 121–127.
- van Zadelhoff, G., Veldink, G.A., and Vliegthart, J.F. (1998).** With anandamide as substrate plant 5-lipoxygenases behave like 11-lipoxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 33–38.
- Vandevorde, S., and Lambert, D.M. (2007).** The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers* 4, 1858–1881.
- Vogeser, M., and Schelling, G. (2007).** Pitfalls in measuring the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol in biological samples. *Clin Chem Lab Med* 45, 1023–1025.
- Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014).** Astrocyte Ca<sup>2+</sup> signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 327–335.
- Walter, L., and Stella, N. (2003).** Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia* 44, 85–90.
- Walter, L., Dinh, T., and Stella, N. (2004).** ATP induces a rapid and pronounced increase in 2-arachidonoylglycerol production by astrocytes, a response limited by monoacylglycerol lipase. *J. Neurosci.* 24, 8068–8074.
- Weis, F., Beiras-Fernandez, A., Hauer, D., Hornuss, C., Sodian, R., Kreth, S., Briegel, J., and Schelling, G. (2010).** Effect of anaesthesia and cardiopulmonary bypass on blood endocannabinoid concentrations during cardiac surgery. *Br. J. Anaesth.* 105, 139–144.
- Willis, W.D., and Coggeshall, R.E. (2004).** Chemical anatomy of dorsal root ganglion cells. In *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*, (Boston, MA: Springer US), pp. 103–154.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001).** Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.

**Yoshimoto, T., and Takahashi, Y. (2002).** Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 245–262.

**Zhang, M.-Y., Gao, Y., Btsh, J., Kagan, N., Kerns, E., Samad, T.A., and Chanda, P.K. (2010).** Simultaneous determination of 2-arachidonoylglycerol, 1-arachidonoylglycerol and arachidonic acid in mouse brain tissue using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 45, 167–177.

**Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., and Bonner, T.I. (1999).** Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5780–5785.

**Zoerner, A.A., Batkai, S., Suchy, M.-T., Gutzki, F.-M., Engeli, S., Jordan, J., and Tsikas, D. (2012).** Simultaneous UPLC-MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extraction. *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 883-884, 161–171.

**Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R., and Graier, W.F. (2003).** Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1351–1362.

**Zygmunt, P.M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D.A., Simonsen, C., Jönsson, B.A.G., Blomgren, A., Birnir, B., Bevan, S., Eschalier, A., et al. (2013).** Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* 8, e81618.

(2004). *Cannabinoids* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer).

## 11. TÁRGYSZAVAK/KEY WORDS

endokannabinoidok, 2-AG, 1-AG, gerincvelő felületés hátsó szarva, izomerizáció, monoacilglicerín lipáz, 2-AG lebontás

endocannabinoids, 2-AG, 1-AG, superficial spinal dorsal horn, isomerisation, monoacil glycerol, 2-AG inactivation

## **12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A doktori disszertációm több éves kutatómunka eredménye. Ezúton is szeretnék köszönetet mondani a Debreceni Egyetem Anatómiai Intézet azon dolgozóinak, akik bármilyen formában részt vettek a kísérletes munkámban, segítettek az előrejutásom, támogattak nehéz időkben. Szeretném továbbá megköszönni a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék és Növénytani Tanszékén dolgozó kollaborációs partnereinknek a szakmai segítséget.

## 13. FÜGGELÉK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/25/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dócs Klaudia  
Neptun kód: DFAZTG  
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dócs, K.**, Mészár, Z. M., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Holló, K., Antal, M., Hegyi, Z.: The Ratio of 2-AG to Its Isomer 1-AG as an Intrinsic Fine Tuning Mechanism of CB1 Receptor Activation. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1-13, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2017.00039>  
IF: 4.555 (2016)
2. **Dócs, K.**, Hegyi, Z., Holló, K., Kis, G., Hegedűs, K., Antal, M.: Selective axonal and glial distribution of monoacylglycerol lipase immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Brain Struct. Funct.* 220 (5), 2625-2637, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-014-0813-x>  
IF: 5.618





### További közlemények

3. Balázs, A., Mészár, Z. M., Hegedűs, K., Kenyeres, A., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Antal, M.: Development of putative inhibitory neurons in the embryonic and postnatal mouse superficial spinal dorsal horn.  
*Brain Struct. Funct.* 222 (5), 2157-2171, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-016-1331-9>  
IF: 4.698 (2016)
4. Holló, K., Ducza, L., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Hegedűs, K., Bakk, E., Papp, I., Kis, G., Mészár, Z. M., Bardóczy, Z., Antal, M.: Interleukin-1 receptor type 1 is over-expressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant induced inflammatory pain.  
*J. Neuroinflammation.* 14 (1), 1-18, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0902-x>  
IF: 5.102 (2016)
5. Javdani, F., Holló, K., Hegedűs, K., Kis, G., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Kasugai, Y., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Antal, M.: Differential expression patterns of K+/Cl- cotransporter 2 in neurons within the superficial spinal dorsal horn of rats.  
*J. Comp. Neurol.* 523 (13), 1967-1983, 2015.  
IF: 3.331

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 23,304**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,173**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.01.25.

