

***A REKOMBINÁNS VANILLOID RECEPTOR (VR1)
MŰKÖDÉSÉNEK ÉS SZABÁLYOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA
HETEROLÓG EXPRESSZIÓS RENDSZEREKBE***

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:
Lázár József

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi adjunktus



**DEBRECEN
2003**

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	3
<i>Kapszaicin-szenzitív neuronok.....</i>	<i>3</i>
<i>A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa.....</i>	<i>3</i>
<i>A vanilloid receptor (VR1).....</i>	<i>4</i>
<i>A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja</i>	<i>6</i>
<i>A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában.....</i>	<i>8</i>
<i>A neurotrophinok és jelentőségük.....</i>	<i>9</i>
<i>A neurotrophinok és a szenzoros neuronokon expresszáldó VR1 kapcsolata.....</i>	<i>11</i>
PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	13
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
<i>A patkány VR1-t expresszáldó heterológ expressziós rendszerek elkészítése.....</i>	<i>14</i>
<i>Antitestek</i>	<i>15</i>
<i>Western (immuno) blot analízis.....</i>	<i>16</i>
<i>Immuncitokémia</i>	<i>18</i>
<i>Intracelluláris kalciummérés</i>	<i>18</i>
<i>Valós idejű konfokális mikroszkópia.....</i>	<i>20</i>
EREDMÉNYEK	21
I. A VR1 FUNKCIONÁLIS TULAJDONSÁGAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA KÜLÖNBÖZŐ EXPRESSZIÓS RENDSZEREK BEN	21
<i>A VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben a kapszaicin hatékonyabb 1,8 mM extracelluláris kalcium oldatban.</i>	<i>21</i>
<i>A VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben az RTX által kiváltott sejtválaszok nagyon hasonlóak 1,8 mM és 0 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatokban</i>	<i>26</i>
<i>Az indukálható VR1/CHO expressziós rendszerben az RTX hatástalan kalcium mentes extracelluláris oldatban.....</i>	<i>30</i>
<i>A VR1/C6 stabil expressziós rendszerben, a kapszaicin és az RTX csak Ca^{2+}-tartalmú extracelluláris oldatban volt hatásos.....</i>	<i>33</i>
<i>A VR1eGFP/cos-7 tranziens és a VR1/CHO indukálható expressziós rendszerekben a membránba épült VR1 részben nyitott állapotban lehet.....</i>	<i>36</i>
II. A VR1 MŰKÖDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA KÜLÖNBÖZŐ NEUROTROPHINOKKAL	38
<i>A rVR1/C6 sejtek neurotrophin receptor készlete.....</i>	<i>38</i>
<i>A neurotrophinok hatása a VR1 működésére</i>	<i>39</i>
<i>A tirozin-kináz útvonal gátlásának következménye neurotrophinok VR1-t befolyásoló hatására ..</i>	<i>41</i>
MEGBESZÉLÉS	44
I. A KÜLÖNBÖZŐ EXPRESSZIÓS RENDSZEREK BEN ELŐÁLLÍTOTT REKOMBINÁNS PATKÁNY VR1 ELTÉRŐ TULAJDONSÁGOKKAL BÍR.....	44
II. AZ ÖSSZES NEUROTROPHIN SZENZITIZÁLJA A STABILAN TRANSZFEKTÁLT REKOMBINÁNS PATKÁNY VR1-ET C6 SEJTEK BEN	49
ÖSSZEFOGLALÁS	52
KÖZLEMÉNYEK	53
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	55
IRODALOMJEGYZÉK.....	56

BEVEZETÉS

Kapszaicin-szenzitív neuronok

A primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportja, melyek sejtteste a spinális hátsó gyöki (DRG) és trigeminális szenzoros ganglionokban helyezkedik el, a kapszaicin (Holzer, 1991, Szállási és Blumberg, 1999) és rokon vegyületeikkel (pl.: reziniferatoxin (RTX), melyet az *Euphorbia resinifera* tejnedvéből izoláltak (Hergenhahn és mtsai, 1975)) szemben mutatott szelektív érzékenysége alapján a "kapszaicin-szenzitív neuronok" elnevezést kapta (Szolcsányi, 1982). A sejteknek kettős funkciójuk van. Afferensként, centrális nyúlványaikon keresztül szenzoros információt szállítanak a központi idegrendszerbe, míg efferens működésükként (aktiválódásuk után) perifériás nyúlványaikban raktározott neuropeptideket (mint pl. a P-anyag (SP), a calcitonin génkapcsolt peptid (CGRP) és egyéb neuroaktív peptidek (Holzer, 1988)) szabadítanak fel lokálisan. A felszabadult anyagok más sejteken – pl. keratinocytákon, hízósejteken, makrofágokon, glia sejteken hatva – résztvesznek a lokális trófikus, vazoregulatórikus és immunomodulatórikus folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet (Geppeti és Holzer, 1996).

A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa

A kapszaicin és rokon vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő, bár gyakran egymástól függetlenül is megjelenő, továbbá az adott anyag hatását individuálisan is reprezentáló folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolása után azonnal kifejlődő excitáció. Ennek keretében a kapszaicin megnöveli a sejtmembrán permeabilitását elsősorban Ca^{2+} -ra és Na^{+} -ra, mely ionok sejtbe áramlása azok depolarizációjához vezet (Bevan és mtsai,

1993), továbbá megváltoztatja a sejt feszültség-vezérelt K^+ -, Na^+ - (Petersen és mtsai, 1987), valamint a Ca^{2+} -csatornáinak (Docherty és mtsai, 1991) aktivitását. A sejtek ezen változásait követi a kapszaicin által kiváltott második jellemző folyamat, a deszenzitizáció, melynek két formája különíthető el a szenzoros neuronokon. Az első az ún. farmakológiai deszenzitizáció, ahol kapszaicin hosszantartó vagy ismételt adagolását követően a sejtek elvesztik kapszaicin iránti érzékenységüket (homológ deszenzitizáció) (Szolcsányi, 1977; Winter és mtsai, 1990). A második az ún. funkcionális deszenzitizáció vagy defunkcionalizáció, amely során a sejtek nemcsak kapszaicin, hanem egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránt is érzéketlenné válnak (heterológ deszenzitizáció) (Jancsó, 1960, Holzer, 1991). Feltételezik, hogy míg a homológ deszenzitizációt a sejten belül megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$), illetve az általa kiváltott folyamatok hozzák létre, addig a heterológ deszenzitizáció a neuropeptid raktárak kiürülésének, a depolarizáció következtében kialakuló megváltozott membrán sajátosságoknak, valamint a kalcium által kiváltott intracelluláris károsodásnak köszönhető (Jancsó és mtsai, 1984, Docherty és mtsai, 1991, James és mtsai, 1993). Fontos megemlíteni, hogy a kapszaicin elég nagy koncentrációban, valamint elég hosszú ideig alkalmazva, a sejteken a harmadik jellegzetes folyamatot, a neurotoxicitást váltja ki, mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, valamint ennek következtében kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood és mtsai, 1988, Winter és mtsai, 1990, Holzer, 1991).

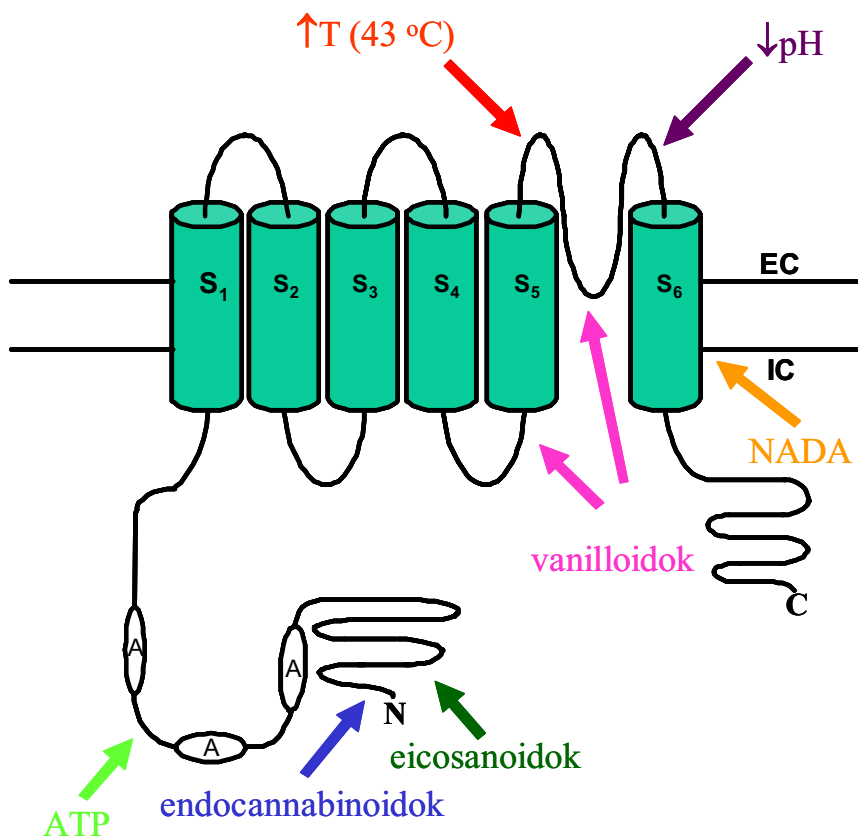
A vanilloid receptor (VR1)

Már Jancsó (1968) is felvetette olyan, úgynevezett "fájdalom receptor" meglétének szükségszerűségét, mely bizonyítaná a szenzoros neuronok kapszaicin-

szelektivitását. A vizsgálatokhoz szükséges technikai eszköztár fejlődése (patch-clamp technika, intracelluláris ionmérés) később lehetővé tette, hogy meghatározzák a kapszaicin funkcionális támadáspontját, amely egy nem-specifikus, feszültség-független kationcsatornának bizonyult (Wood és mtsai, 1988, Winter és mtsai, 1990, Oh és mtsai, 1996). Kiderült továbbá az is, hogy a csatorna nagyfokú Ca^{2+} permeabilitást mutat, így aktivációja következményeként jelentősen megemelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bleakman és mtsai, 1990, Cholewinski és mtsai, 1993).

A molekuláris biológiai technikák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően végül 1997-ben megtörtént az első kapszaicin-érzékeny specifikus molekula, a vanilloid (kapszaicin) receptor (VR1) molekuláris karakterizálása (Caterina és mtsai, 1997), először patkány species cDNS könyvtárát felhasználva. A patkány VR1 egy 2514 nukleotidból, azaz 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje, mely 6-transzmembrán doménnel rendelkezik (Caterina és mtsai, 1997) (1. ábra). Struktúrális sajátosságai alapján a VR1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető (Caterina és Julius, 2001). Ezen receptorokat a non-szelektív kationcsatornák nagycsaládjába sorolják, melynek tagjai a TRP és vanilloid családon (TRPC, TRPM és TRPV) kívül a hiperpolarizáció aktivált csatornák (HCN) és ciklikus-nukleotid kapuzott csatornák (CNG) is. Ezen besorolás alapján a VR1-t a szakirodalomban TRPV1 receptornak nevezik. Közös jellemzőjük, hogy mind 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkeznek, és valószínűleg tetramer formában vannak jelen a membránban (Kedei és mtsai, 2001, Benham és mtsai, 2002). A VR1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy számos kötő és szabályozóhellyel bír, mint pl. az intracelluláris N-terminális szakaszon megtalálható 3 db ankyrin-szerű domén (mint potenciális

protein kináz A foszforilációs helyek) (Caterina és mtsai, 1997, Kwak és mtsai, 2000, Kedei és mtsai, 2001), az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a kapszaicint és ultrapotens analógját, a RTX-t felismerő) kötőhely, vagy az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez és mtsai, 2000, Jordt és mtsai, 2000, Welch és mtsai, 2000). Kimutatták, hogy hasonlóan a szenzoros neuronokon megtalálható VR-hoz, a klónozott VR1 is funkcionális, nem-specifikus, főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis (relatív permeabilitása Ca^{2+} -ra nézve $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ közelítőleg 10) csatornaként működik (Caterina és mtsai, 1997).



1. ábra A VR1 szerkezete és működését befolyásoló molekulák

A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja

A VR1 aktiválódása után kialakuló komplex sejtfolyamatsor vizsgálata során az egyik legfontosabb cél, a különféle vanilloid vegyületek heterogenitásának

megállapításán túl (Szállási és Blumberg, 1999, Ács és mtsai, 1997), a VR1-mediált jelenségek extracelluláris kalciumkoncentrációtól ($[Ca^{2+}]_e$) való függésének elemzése volt. Főként a patch-clamp technika alkalmazása során kiderült, hogy a vanilloid vegyületek által kiváltott membránáramok jellegzetességei csak kismértékben (Tominaga és mtsai, 1998, Vellani és mtsai, 2001), míg a tachyphylaxis (deszenzitizáció) tulajdonságai, a legtöbb kísérletes elrendezésben, jelentősen függték $[Ca^{2+}]_e$ -től (Koplas és mtsai, 1997, Docherty és mtsai, 1996, Liu és mtsai, 1998).

Ezen nagyszámú kísérlet ugyanakkor nem szolgáltatott egyértelmű választ a VR1-mediált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés $[Ca^{2+}]_e$ -től való függését illetően. Számos munkacsoport arra a következtetésre jutott, hogy a nociceptív neuronokban található VR1 kizárólag a sejtek felszíni membránjába épül be; azaz a kapszaicin csak az extracelluláris térben lévő kalcium jelenlétében képes az $[Ca^{2+}]_i$ megemelésére (Cholewinski és mtsai, 1993, García-Hirschfeld és mtsai, 1995, Savidge és mtsai, 2001). Ezzel szöges ellentétben, a legújabb eredmények azt sugallják, hogy a receptor-csatorna nemcsak a felszíni, hanem különféle, intracelluláris kalciumraktárakként működő struktúrák (pl. endoplazmatikus retikulum, ER) membránjába is (funkcionálisan) beépülhet, azaz a VR1-mediált sejtválaszok kalciummentes közegben is kiválthatók (Oláh és mtsai, 2001a, Oláh és mtsai, 2001b, Eun és mtsai, 2001).

A VR1 molekuláris biológiai leírása megsokszorozta azon erőfeszítéseket, melyek a VR1, mint ioncsatorna karakterizálását tűzték ki célul. Számos eltérő heterológ expressziós rendszert használtak a kutatók a receptor molekuláris és farmakológiai tulajdonságainak feltérképezéséhez, valamint a receptor aktiválódás által kiváltott celluláris mechanizmusok leírására annak érdekében, hogy megfelelő eszközt találjanak a VR1-t célzó gyógyszerkutatásokhoz. Ezen rendszerekben nyert

adatok ugyanakkor – azon túlmenően, hogy nem adtak választ az intracelluláris kalcium-válasz fent bemutatott kalcium függésével kapcsolatban – eltérő eredményeket szolgáltattak a receptor vanilloid vegyületek iránti érzékenységet és sejten belüli lokalizációját illetően. Például a kapszaicin $[Ca^{2+}]_i$ -t növelő hatása VR1-et expresszáló kínai hörcsög ovárium (CHO) és embrionális humán vesesejteken (HEK) nagymértékben függött az $[Ca^{2+}]_e$ -től (Caterina és mtsai, 1997, Savidge és mtsai, 2001, Jerman és mtsai, 2000). Ezzel szemben Oláh és mtsai (2001a, 2001b) kimutatták, hogy a zöld fluoreszcens proteinnel jelölt VR1-et (VR1eGFP) expresszáló sejteken az RTX alkalmazása az $[Ca^{2+}]_i$ növekedését és intracelluláris organelumok (ER és magmembrán) károsodását idézte elő kalcium-mentes közegben is. Bebizonyították azt is, hogy a VR1eGFP nemcsak a plazmamembránban, hanem az ER membránban is megtalálható, melyet Wisnowskey és mtsai (2003) is igazoltak.

A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában

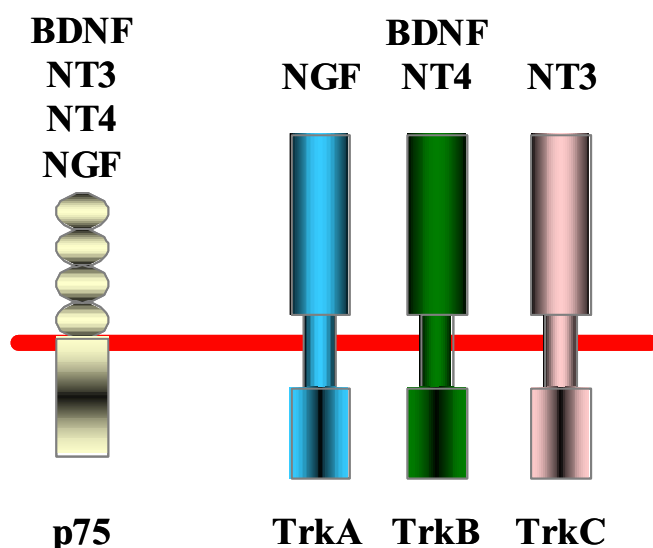
A VR1 molekuláris biológiai leírását követően elvégzett nagyszámú kísérletnek köszönhetően kiderült az is, hogy ezen receptort nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő (azaz endogén), főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni. Ezek közül a VR1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető az alacsony küszöbű ($\sim 43^\circ\text{C}$) hőmérséklet emelkedés, valamint a pH csökkenése (acidózis) (Caterina és mtsai, 1997, Tominaga és mtsai, 1998) (1. ábra). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladásos mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a VR1 működésének pozitív befolyásolására (Hwang és mtsai, 2000, Tominaga és

mtsai, 2001, Premkumar, 2001, Hwang és Oh, 2002, Di Marzo és mtsai, 2002). Ezen ágensek egyrészt direkt módon (azaz a VR1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a VR1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezen anyagok a VR1 hőérzékenységi küszöbét csökkentik, azaz a VR1 már fiziológiás hőmérsékleten is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hyperalgesia) (Tominaga és mtsai, 1998, Caterina és mtsai, 2000). A VR1 szerepét bizonyítja a fenti folyamatokban a VR1 knock-out egerekkel végzett kísérletek eredménye is, miszerint ezen állatokban (a természetesen hiányzó vanilloid-érzékenység mellett) főként a termális hyperalgesia jelensége hiányzik (Caterina és mtsai, 2000). Mindezek alapján a VR1 a különféle (pl. kémiai, termális) nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekinthető.

A neurotrophinok és jelentőségük

A neurotrophinok családjába számos anyag tartozik, így az idegi növekedési faktor (NGF), az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF), valamint a különféle neurotrophinok (NT3, NT4) (Lewin és Barde, 1996). Ezen faktorokat leginkább a különféle neuronféleségek termelik, azonban megtalálható egyéb non-neurális sejttypusban is, mint pl. a lymphoid sejtekben, keratinocytákban, glia sejtekben, hízósejtekben (Acheson és mtsai, 1991, Lewin és Barde, 1996, Botchkarev és mtsai, 1999). A neurotrophinok eltérő érzékenységgel kötődhetnek membránreceptoraikhoz, így a tirozin kináz aktivitással bíró TrkA, -B és -C, valamint a p75 neurotrophin receptorokhoz (Kaplan és Miller, 1997) (2. ábra). Míg a p75 receptorhoz mindegyik

neurotrophin nagyon hasonló érzékenységgel kötődhet, addig a növekedési faktorok kapcsolódása a Trk receptorokhoz eltérő affinitást mutat: az NGF leginkább a TrkA, a BDNF és az NT4 a TrkB, az NT3 pedig a TrkC receptorhoz kötődik (Hefti, 1997, Kaplan és Miller, 1997, Huang és Reichardt, 2003). A Trk receptorok aktiválódása a



2. ábra A neurotrophin receptorok és ligandjaik

tirozin-kináz receptorhoz kapcsolt intracelluláris enzimaszkádot indít be, míg a p75 receptor aktiválódása megemeli a sejten belüli ceramid szintet, így transzkripciós faktorok (pl. NFκB) működését szabályozza (Dobrowsky és mtsai, 1994, Kaplan és Miller, 1997). Megállapították azt is, hogy az adott neurotrophin celluláris hatásait nagymértékben megszabja a célsejtek (azaz neuronok és egyéb sejtek) membránjában található neurotrophin receptorok mintázata (Lewin és Barde, 1996, Kaplan és Miller, 1997).

Számos neuronféleség (szensoros neuronok, motoneuronok, vegetatív neuronok) embrionális fejlődéséhez, valamint neuronális differenciálódásához elengedhetetlenül szükséges a trófikus faktorként viselkedő neurotrophinok (leginkább az NGF és a BDNF) jelenléte (Snider, 1994, Davies, 1996, Lewin és

Barde, 1996). Kimutatták, hogy ezen faktorok szabályozó szerepe a posztnatális életben központi jelentőségű a neuronális túléléshez, ezen kívül a perifériás axonok sérülését követő regenerációhoz, specifikus markerek expressziójához, valamint az adott neurontípusra jellemző funkcionális tulajdonságok kialakulásához (Snider, 1994, Davies, 1996, Lewin és Barde, 1996). Megállapították emellett, hogy számos neurotrophin képes egyéb, non-neurális szövettípus (pl. szív, vese, bőr) morfogenezisét, újraépülését, valamint az adott szövetben található sejtek proliferációját és apoptózist is befolyásolni (Donovan és mtsai, 1996, Huber és mtsai, 1996, Botchkarev és mtsai, 1999).

A neurotrophinok és a szenzoros neuronokon expresszáldó VR1 kapcsolata

A szenzoros neuronok, így a kapszaicin-érzékeny nociceptív neuronok *in vivo* és *in vitro* fejlődéséhez ugyancsak szükséges a neurotrophinok jelenléte (Kirstein és Farinas, 2002). NGF-knock out egerekben például (Snider, 1994, Crowley és mtsai, 1994) jelentősen lecsökkent a hő- és fájdalomérző szenzoros afferens neuronok száma (a szimpatikus ganglionok csökkent száma mellett). Bebizonyosodott az is, hogy DRG szenzoros neuron kultúrákban a kapszaicin-érzékenység, valamint a VR1 kifejeződése ugyancsak jelentős mértékben függ a neurotrophinok (meglehetősen magas koncentrációban való) jelenlététől (Winter és mtsai, 1988, Crowley és mtsai, 1994, Winston és mtsai, 2001).

A legújabb kutatási eredmények ugyanakkor a neurotrophinok egy újabb, a trófikus hatással párhuzamosan érvényesülő, de attól sokkal gyorsabban (perceken belül) kialakuló akut hatását is feltételezik a nociceptív szenzoros afferens neuronok vonatkozásában (Shu és Mendell, 1999a). Amint azt a korábbi fejezetekben bemutattuk, a szöveti gyulladás folyamata a szenzoros neuronok szenzitizációját

okozza, mely a leginkább hőingerekre vonatkozó gyulladásos hyperalgesia jelenségét váltja ki. Bebizonyosodott, hogy az NGF szisztémás vagy bőrbe injektálása szenzoros hyperalgesiát vált ki (Lewin és mtsai, 1993), valamint az is, hogy számos neurotrophin (pl. NGF, BDNF) szintje lokálisan megemelkedik a gyulladásos területeken (Weskamp és Otten, 1987, Shu és Mendell, 1999a). Mivel a gyulladás során kialakult hyperalgesia jelentős mértékben kivédhető NGF-ellenes blokkoló antitestekkel (Lewin és mtsai, 1994), számos munkacsoport feltételezte a neurotrophinok központi szerepét a gyulladásos hyperalgesia mechanizmusában, mely hatás (a trófikus hatásnál sokkal gyorsabban) a nociceptív neuronok aktiválásán keresztül valósulhat meg. Ezen hipotézist alátámasztó kísérletekben kimutatták, hogy pl. a bőrben a gyulladás során a különféle sejtekből (keratinocyták, fibroblasztok) felszabaduló neurotrophinok (Woolf és mtsai, 1997) vagy közvetett módon (azaz pl. hiszósejtek degranulációja révén) (Mazurek és mtsai, 1986, Shu és Mendell, 1999a) vagy közvetlenül (azaz ezen neuroncsoporton kifejeződő TrkA receptoraikhoz kötődve) (McMahon és mtsai, 1994, Shu és Mendell, 1999b, Shu és mtsai, 1999, Chuang és mtsai, 2001) válthatják ki a nociceptív szenzitizáció jelenségét. Ezen utóbbi feltételezést igazolja az a megfigyelés is, miszerint tenyésztett patkány DRG neuronokon az NGF jelentős mértékben felerősítette a kapszaicin által kiváltott sejtfolyamatokat (Shu és Mendell, 1999b, Shu és Mendell, 2001). Úgy tűnik tehát, hogy a fájdalom kialakulásának egyik központi integrátor molekulája (azaz a VR1), valamint a neurotrophinok, mint potenciális gyulladásos mediátorok akut (azaz szenzitizáló) hatása között szoros kapcsolat lehetséges.

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Mint azt fentebb bemutattuk, a VR1 molekuláris biológiai leírása – habár megsokszorozta azon erőfeszítéseket, melyek a VR1 ioncsatorna karakterizálását tűzték ki célul – nem adtak választ a VR1-mediált intracelluláris kalciumválasz kalcium-függését, a VR1 különféle vanilloid vegyületek iránti érzékenységet, valamint a receptor sejten belüli lokalizációját illetően.

Ezért munkánk során először három különböző heterológ expressziós rendszert (tranziens, indukálható, stabil) hoztunk létre a patkány VR1 működésének vizsgálatára. Ezen rendszerek összehasonlítása során:

- Vizsgálni kívántuk különféle vanilloid vegyületek (kapszaicin, RTX) hatását a sejtek intracelluláris kalciumhomeosztázisára;
- Elemeztük továbbá a specifikus VR1-mediált sejtválaszok kinetikai paramétereit, valamint $[Ca^{2+}]_e$ -től való függését;
- Tanulmányoztuk emellett a VR1 szubcelluláris lokalizációját, valamint a különféle sejtkompartmentekbe beépült receptorok funkcionális jellemzőit.

Munkánk második részében különféle neurotrophin vegyületek (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) hatását elemeztük a VR1 működésére VR1/C6 sejt rendszerben:

- A sejtek neurotrophin receptor készletének meghatározása után vizsgáltuk a vegyületek hatását (szenzitizáció, aktiváció) a kapszaicin által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ válaszra;
- Tanulmányoztuk továbbá a neurotrophinok hatásában potenciálisan résztvevő jelátviteli útvonalak szerepét.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A patkány VR1-t expresszáló heterológ expressziós rendszerek elkészítése

A tranziens expressziós rendszer előállításához üveg fedőlemezen tenyésztett cos-7 sejteket transzfektáltunk 1-2 µg VR1eGFP plazmiddal vagy kontrollként használt üres vektorral (peGFP plazmid), LipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) transzfekciós reagens felhasználásával, a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően (VR1eGFP/cos-7 sejtek). A vektort a már korábban leírt módon (Oláh és mtsai, 2001) készítettük: a VR1 receptort kódoló mRNS-t patkányok hátsógyöki ganglionjából nyertük, majd RT-PCR felhasználásával kettősszálú DNS-t állítottunk elő, melyet pEGFP-N3 vektorba (Clontech, Palo Alto, CA, USA) inzertáltunk különböző restrikciós enzimek felhasználásával. A transzfektált sejteket további 48 órán át 10% borjúsavóval, 2 mM glutaminnal és antibiotikumokkal (50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1,25 µg/ml fungizon; mind Biogal, Debrecen, Magyarország) kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA) tápoldatban, a VR1 hőaktivációját elkerülendő, 35 °C-on (Caterina és mtsai, 1997, Oláh és mtsai, 2001) tenyésztettük, majd a sejteken intracelluláris kalciummérést végeztünk.

Az indukálható expressziós rendszert a már korábban leírtaknak megfelelően hoztuk létre (Szállási és mtsai, 1999). A patkány VR1 cDNS-ét szubklónoztuk pUHG102-3 plazmidba (Clontech) és ezt követően pTet Off regulátor plazmiddal (Clontech) már stabilan transzfektált CHO sejtekbe vittük be (VR1/CHO sejtek). Ezekben a sejtekben tetraciklin jelenlétében a pUHG plazmid kódoló régiója nem íródik át mRNS-sé, tehát a VR1 termelődése gátolt. Ezért a VR1/CHO sejteket 10% borjúsavót, 2 mM glutamint, antibiotikumokat, valamint 2 µg/ml tetraciklint tartalmazó Ham F-12 médiumban tenyésztettük (mind Sigma). A sejteket 48 órával a

kísérletek kezdete előtt indukáltuk a tápoldat tetraciklin-mentes Ham F-12 médiumra változtatásával. Az így indukált sejteket egy éjszakán át 37 °C-on, majd azt követően 35 °C-on tenyésztettük. Az expresszió hatékonyságának vizsgálatát Western blot technikával végeztük (lásd 3. ábra).

A stabil expressziós rendszer előállításához a korábban előállított metallothionein promótert tartalmazó p ϵ MTH vektorba (Oláh és mtsai, 1994) inzertáltuk a rekombináns patkány VR1 DNS-ét (Oláh és mtsai, 2001). Ezt a vektort (2-4 μ g) transzfektáltuk ezután C6 patkány glióma sejtekbe (VR1/C6 sejtek). A transzfekciót követően a sejteket 10 % FCS-t és 750 μ g/ml G418-t (Geneticin, Gibco, Parsley, UK) tartalmazó DMEM tápoldatban szelektáltuk 12-18 napon át, majd különálló kolóniákat szedtünk, melyeket 500 μ g/ml G418-t tartalmazó DMEM oldatban tenyésztettük tovább 35 °C-on. A rekombináns expresszió hatékonyságát szintén Western blottal ellenőriztük (lásd 3. ábra).

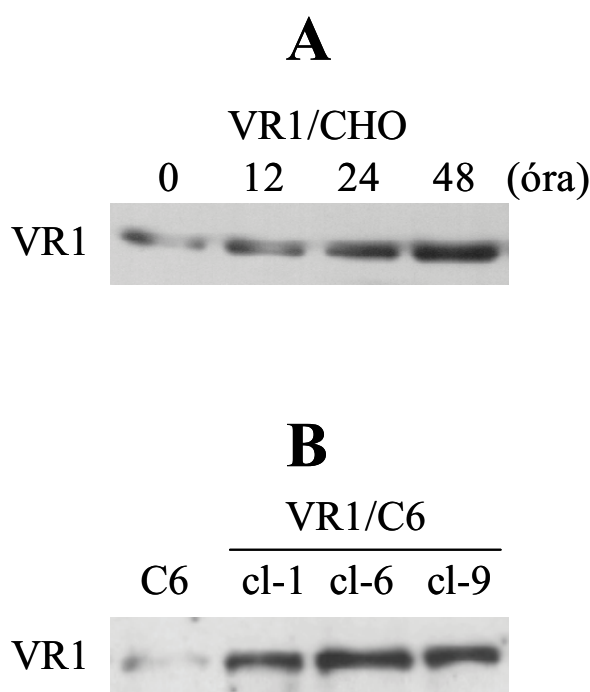
Antitestek

A sejteken található neurotrophin receptorok kimutatásához specifikus, nyúlban termeltetett elsődleges antitesteket alkalmaztunk. A nyúlban termeltetett anti-TrkA, -B és -C a Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), míg az anti-p75 a Sigma terméke. A Western blot alkalmazása során másodlagos antitestként kecskében termeltetett nyúl IgG-ellenes, torma-peroxidázzal konjugált antitestet (Bio-Rad, München, Németország), míg az immunhisztokémiai jelölés során nyúl IgG-ellenes, ugyancsak kecskében termeltetett fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-konjugált másodlagos antitestet (Vector Laboratories Inc., CA, USA) használtunk.

Western (immuno) blot analízis

A Western blot analízist a laborunkban már régóta alkalmazott protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998, Boczán és mtsai, 2000, Papp és mtsai., 2003) a következő módon végeztük. A sejteket hideg foszfát-pufferrel (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20 μ M leupeptin, pH 7.4 (Sigma)) homogenizáltuk, végül jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Az így nyert lizátum proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, a fehérjetartalmat 2 mg/ml-re állítottuk be (a minta végtérfogatában 5 % β -merkaptoetanol, 10 % glicerin, 2% SDS, 0.062 M TRIS, 20 mM dithiothreitol, 0.002% brómfenolkék volt; mind Sigma), majd 10 perces főzéssel denaturáltuk, végül felhasználásig -20°C -on tároltuk. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), mintánként 20-30 μ g proteint, választottunk szét 7,5 %-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad, Wien, Austria) transzferáltuk, 2x45 percen keresztül, 100 V konstans feszültséggel. A membrán szabad kötőhelyeit 5 % sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5 % tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5 %-os tej-PBS-ben hígított elsődleges, patkány VR1 (1:500) (3. ábra) vagy neurotrophin receptor (1:250) ellenes antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át. A membránok 30 perces mosását (PBST, 0,1 % Tween-20 PBS-ben Sigma) követően azokat kecskében termeltetett nyúl ellenes, másodlagos, torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:1000) 45 percen keresztül végeztük az inkubálást. Újabb, PBST-ben elvégzett mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel (Amersham, Little Chalfont, UK) tettük láthatóvá, amit röntgenfilmen rögzítettünk (AGFA, Brussels, Belgium).

A 3. ábra indukálható és stabil rendszerben a VR1 expressziójának reprezentatív eredményét mutatja. A Western blot analízishez VR1/CHO sejtekből 0, 12, 24, és 48 órával az indukció után, azaz a tetraciklin tápoldatból történő elvonása után, gyűjtöttünk mintákat. A 3. ábra A részén látható, hogy a VR1 expressziója időfüggően növekedett a tetraciklin elvonást követően, ezért a sejteket az indukció után 48 órával használtuk a kalciumméréshez. Szintén Western blot-ot végeztünk



3.ábra A VR1 expressziós fokának meghatározása VR1/CHO és VR1/C6 sejtekben.

A sejteket lízispufferben learattuk, majd azonos protein mennyiségeket választottunk szét SDS-PAGE-sel. A Western immuno blottot kecskében termeltetett VR1 ellenes antitesttel végeztük az “Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. *A panel:* a VR1/CHO sejteket tetraciklin-mentes tápoldatban indukáltuk és az indukciót követő 0, 12, 24, és 48 órában gyűjtött mintákat Western blot vizsgálatnak vetettük alá. *B panel:* VR1 expressziót üres vektorral transzfektált C6 sejtekben (C6) és három különböző nagy VR1 szintű VR1/C6 klónban (cl) vizsgáltuk.

VR1/C6 sejteken és üres pMTH vektorral transzfektált sejteken. Látható a 3. ábra B részén, hogy a VR1 expressziója többszöröse a klónokban, mint a kontroll C6 sejtekben.

Immuncitokémia

A VR1/C6 sejteket fedőlemezen szélesztettük, a megfelelő konfluencia elérése után PBS-el négyszer mostuk és 4 °C-os acetonnal öt percig fixáltuk. Ezt követően a sejteket szobahőmérsékletű blokkoló oldattal (0,6 % Triton X-100 (Sigma), 1 % borjú szérum albumin (Sigma) PBS-ben oldva, pH 7,4) 30 percig permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd a megfelelő, neurotrophin receptor ellenes (1:50 arányban blokkoló oldatban hígított) antitesttel két órán keresztül nedveskamrában inkubáltuk szobahőmérsékleten. A lemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd a következő lépésben FITC-konjugált nyúl IgG-ellenes antitesttel (hígítás 1:460 PBS-ben) végeztük az immunreakciót. Végül a mintákra 4', 6-diaminido-2-fenilindol-t (DAPI) tartalmazó fedőanyagot (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) helyeztünk, majd a sejtekről fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokyo, Japan) segítségével felvételeket készítettünk.

Intracelluláris kalciummérés

A fedőlemezeire szélesztett sejteket 5 µM kalcium érzékeny fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM) 90 percig inkubáltuk 35 °C-on, tenyésztőoldatban. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japan) tárgyasztalára helyeztük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan

készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva egy fotoelektron-sokszorozóval. Az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk. Meghatároztuk a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadosokat ($R=F_{340}/F_{380}$). Felhasználva a disszociációs konstans (K_D), a minimális (R_{min}) és maximális (R_{max}) ráció értékeket, valamint az emittált fluoreszcencia hányados értékeit nulla ($F_{380}[0]$) és a festéket szaturáló ($F_{380}[Ca]$) kalciumkoncentrációknál, a $[Ca^{2+}]_i$ az alábbi képlet segítségével számolható:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{380}[0] / F_{380}[Ca]).$$

Kalibrációs kísérleteinkben a K_D -t 76 nmol/l-nek találtuk $R_{min} = 0,42$, $R_{max} = 8,6$ és $F_{380}[0]/F_{380}[Ca] = 15,3$ értékek mellett.

Kísérleteink során a sejteket állandóan mostuk kalcium tartalmú (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g glükóz, (mind Sigma) pH 7,4) vagy kalcium mentes ($CaCl_2$ helyett 1 mM EGTA (Sigma)) Tyrode oldatban, lassú perfúzióval. A vizsgált anyagokat (kapszaicin (Sigma), RTX és kapszazepin (Alexis, San Diego, Ca, USA), thapsigargin (Tocris, Ballwin, Mo, USA), NGF (Upstate, Lake Placid, NY, USA), BDNF, NT-3 és NT-4 (Promega, Madison, WI, USA)) a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. Kísérleteinket szobahőmérsékleten (22-23 °C) végeztük.

A tranziensek kinetikai paramétereit, azaz: a kiváltott tranziens maximális amplitúdóját, az agonisták adagolásának kezdetétől az amplitúdó maximumáig eltelt időt (time to peak, TTP) és a felszállószárra illesztett egyenes meredekségét (rate of rise, ROR) az intézetben kifejlesztett program segítségével határoztuk meg. Az így kapott adatok matematikai analízisét Origin (Microcal Software, Inc., Northampton,

MA, USA) táblázatkezelő programmal végeztük. A tranzienseket bemutató ábrákon a fluoreszcencia hányadosokat tüntettük fel az idő függvényében.

Valós idejű konfokális mikroszkópia

Az 1-2 μg VR1eGFP plazmida transzfektált üveg fedőlemezen további 48 órát tenyésztett cos-7 sejteket MRC-1024 Bio-Rad konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Oláh és mtsai, 2001a, Oláh és mtsai, 2001b). A kiválasztott sejteket az x - y síkban szkenneltük 1 másodpercen át 30 s-onként, 0,2 μm -es lépésekkel, a z tengely mentén.

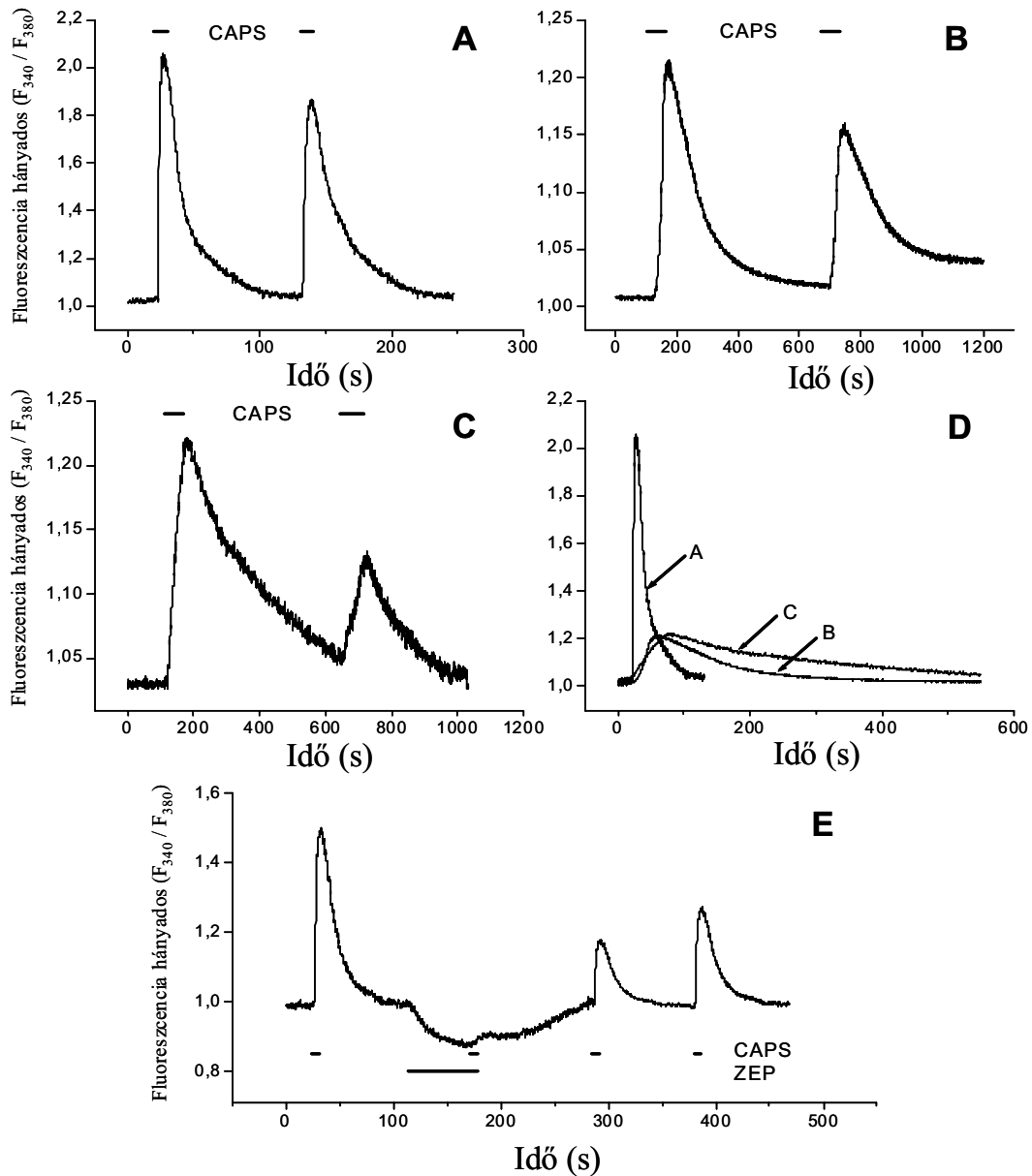
EREDMÉNYEK

I. A VR1 funkcionális tulajdonságainak összehasonlítása különböző expressziós rendszerekben

A VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben a kapszaicin hatékonyabb 1,8 mM extracelluláris kalcium oldatban.

Először a kapszaicinnak a sejtek kalciumháztartására gyakorolt hatását vizsgáltuk Ca^{2+} -tartalmú és -mentes extracelluláris oldatban. A kontroll (üres pEGFP vektorral transzfektált) cos-7 sejtek nem válaszoltak kapszaicin adagolására semmilyen típusú $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel sem Ca^{2+} -mentes, sem 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -ú Tyrode-oldatban (nem mutatva). Ezzel szemben, amint az 4. ábrán látható, a kapszaicin 1 μM -os koncentrációban megnövelte az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t a VR1eGFP/cos-7 sejtekben mind 1,8 mM és 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban. Szignifikáns különbségeket találtunk azonban mind a válaszoló sejtek számában, mind pedig a válasz kinetikájában a különböző kalciumkoncentrációjú külső oldatokban.

1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban a VR1eGFP/cos-7 sejtek 79 %-a ($n = 42/53$) válaszolt szignifikáns $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel kapszaicin kezelésre (I. táblázat). Ezek a tranziensek kinetikai paramétereik alapján két csoportba sorolhatók. Az első csoportba – “gyors” tranziensek (4. ábra A és D) – a kapszaicinre válaszoló sejtek 69 %-a ($n = 29/42$) tartozott. Ezek a tranziensek az amplitúdó maximumát gyorsan elérték (124 ± 29 nM a nyugalmi szint felett), a maximumig eltelt idő (time to peak, TTP) $14,9 \pm 1$ s, illetve a felszállószár meredeksége (rate of rise, ROR) $16,6 \pm 5$ nM/s volt (minden érték átlag $\pm$ SEM). A “gyors” válaszok 66 %-ánál ($n = 19/29$) a kapszaicin adagolás befejezése után a tranziens visszatért a kiindulási szint közelébe (a maximum elérése után az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a kialakult amplitúdó 30%-a alá csökkent vissza),



4. ábra Kapszaicin hatása a *VR1eGFP/cos-7* sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ra.

Az üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket 5 μ M fura 2-AM-el feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást, majd annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). Az 1 μ M kapszaicin (CAPS) hatását 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ (A és B panel) és kalcium mentes (C panel) oldatban mértük. A különböző oldatokban kapszaicinnal kiváltott transziensek eltérő paramétereinek jobb összehasonlíthatósága végett az A-C paneleken szereplő első $[Ca^{2+}]_i$ növekedéseket ugyanazon az idő és hányados tengelyeken mutatjuk be a D panelen. Az E panel az 5 μ M kapszazepin (ZEP) kapszaicinre kifejtett szignifikáns és kimosható gátló hatását mutatja 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban. A transziensek kinetikai paramétereit az I. táblázatban foglaltuk össze.

	Kapszaicin (1 μ M)			RTX (1 nM)		
$[Ca^{2+}]_e$	1,8 mM		0 mM	1,8 mM	0 mM	
Válaszó sejt	79%		46%	42%	48%	
Tranziens típusa	gyors (69%)	lassú (31%)	lassú (100%)	lassú (100%)	gyors (33%)	lassú (67%)
Amplitúdó (nM)	124 $\pm$ 29	31 $\pm$ 11	28,6 $\pm$ 6	68 $\pm$ 16	65 $\pm$ 22	44 $\pm$ 14
Maximumig eltelt idő (TTP, s)	14,9 $\pm$ 1	63 $\pm$ 10	66 $\pm$ 11	133 $\pm$ 23	15,7 $\pm$ 3	166 $\pm$ 21
Merekség (ROR, nM/s)	16,6 $\pm$ 5	1,1 $\pm$ 1	0,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 1	7,1 $\pm$ 3	0,36 $\pm$ 0,2
Tachyphylaxis (% csökkenés)	24 $\pm$ 11	40,8 $\pm$ 8	44 $\pm$ 12	100	41 $\pm$ 11	100
Átlagos tachyphylaxis	27,3 $\pm$ 9 %		N/A	N/A	79 $\pm$ 13 %	

I. táblázat. Kapszaicinnel és RTX-nal VR1eGFP/cos-7 sejteken kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek kinetikai paramétereinek összefoglalása

A bemutatott paramétereket az “Anyagok és módszerek” fejezetnek megfelelően határoztuk meg. Minden értéket számos mérésből számított átlag $\pm$ SEM alakban tüntettünk fel. N/A nem alkalmazható.

míg 34 %-ánál (n = 10/29) csak kismértékű volt a csökkenés. A sejteken vizsgáltuk az ismételt kapszaicin adagolás hatására kialakult válasz csökkenést (tachyphylaxis) is.

A statisztikai számításokat elvégezve kiderült, hogy ismételt adagolás hatására a második tranziens amplitúdója 24 $\pm$ 11 %-kal (átlag $\pm$ SEM) kisebb, mint az első volt.

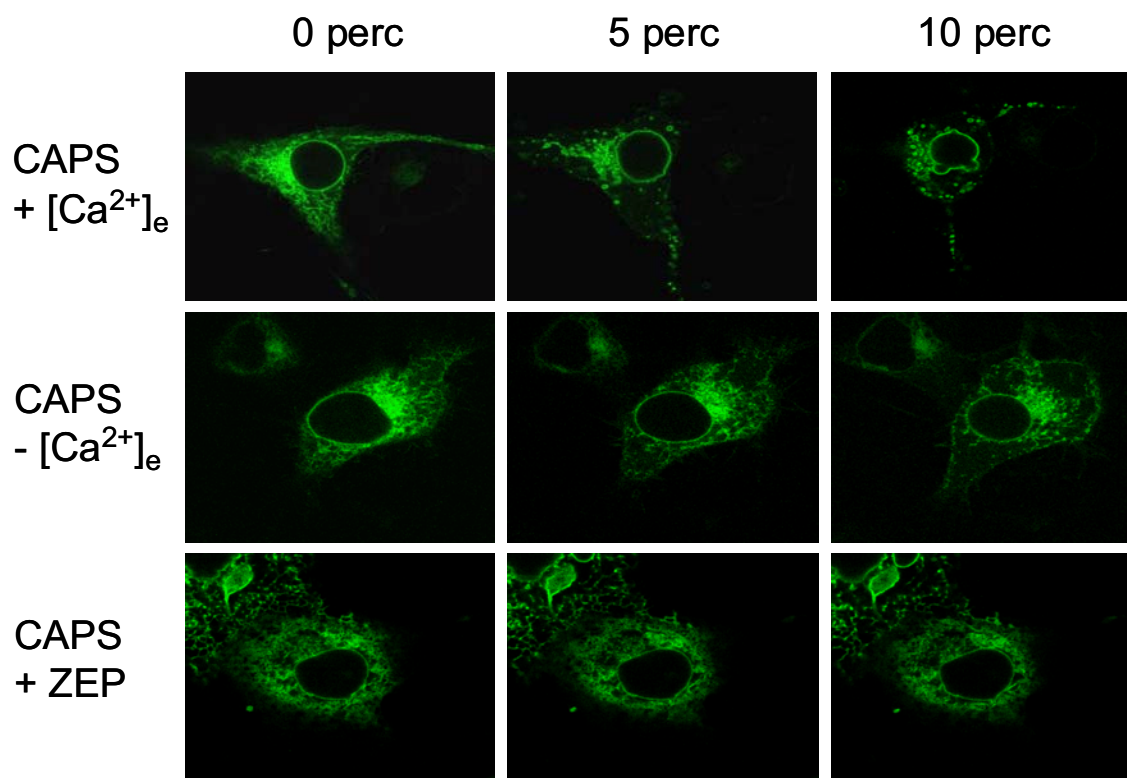
A második csoportba – “lassú” tranziensek – a kapszaicinre válaszoló VR1eGFP/cos-7 sejtek 31%-a ($n = 13/42$) tartozott (4. ábra B és D). Ezek a tranziensek sokkal kisebb amplitúdójúak (31 ± 11 nM) és lassabbak voltak (TTP: 63 ± 10 s és ROR: $1,1 \pm 1$ nM/s (minden érték átlag $\pm$ SEM)). A “gyors” tranziensekhez hasonlóan, a kapszaicinre válaszoló sejtek kb. 2/3-ánál (62%, $n = 8/13$) visszatért az $[Ca^{2+}]_i$ változás a nyugalmi érték közelébe. Ugyanakkor a “lassú” tranziensek esetén sokkal kifejezettebb tachyphylaxist tapasztaltunk ($40,8 \pm 8$ %, átlag $\pm$ SEM).

Megvizsgáltuk a kapszaicin vanilloid receptoron kifejtett hatásának specifikusságát kapszazepinnel, mely a kapszaicin kompetitív gátlószere a VR1-on (Bevan és mtsai, 1992, Kwak és mtsai, 1998). Amint azt a 4. ábra E része mutatja, 5 μ M kapszazepin jelentősen és egyben reverzibilis módon gátolta a kapszaicinnal kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ válaszokat. A kapszaicin hatására VR1eGFP/cos-7 sejteken megfigyelhető $27,3 \pm 9$ %-os átlagos tachyphylaxissal szemben, a kapszazepin $91,6 \pm 4$ %-kal (átlag $\pm$ SEM, $n = 15$) gátolta az ismételt kapszaicin adagolással kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek amplitúdóját.

Ca^{2+} -mentes oldatban a kapszaicin csak a VR1eGFP/cos-7 sejtek 46 %-án ($n = 25/54$) (I. táblázat) hozott létre $[Ca^{2+}]_i$ növekedést, ugyanakkor mindegyik lassú és kis tranziens volt (4. ábra C és D rész) a következő paraméterekkel: maximális amplitúdó $28,6 \pm 6$ nM, TTP: 66 ± 11 s és az ROR: $0,4 \pm 0,1$ nM/s (minden érték átlag $\pm$ SEM). A vanilloid kezelés befejezése után a tranziensek nagy többsége (84 %, $n = 21/25$) visszatért a nyugalmi szint közelébe, ugyanakkor a kapszaicin ismételt alkalmazása jelentős csökkenést okozott az amplitúdó maximumában (44 ± 12 % csökkenés az első kapszaicin adagolás hatására létrejött tranzienshez képest, átlag $\pm$ SEM).

Már korábban kimutatták (Oláh és mtsai, 2001a), hogy VR1eGFP-t expresszáló cos-7 sejtekben az RTX alkalmazása speciális morfológiai változásokat

hoz létre a különböző intracelluláris membránokban. Ezért az eGFP jelölés nyújtotta lehetőséget kihasználva tanulmányoztuk a kapszaicin hatásának hasonlóságait és különbségeit Ca^{2+} -t tartalmazó és -mentes oldatban valós idejű konfokális mikroszkópiával (5. ábra).



5. ábra. A kapszaicin hatása a VR1eGFP/cos-7 sejtek membránstruktúrájára.

A VR1eGFP/cos-7 sejteket zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk konfokális mikroszkóppal. A felvételeket ezután az “Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően készítettük el. Az 1 μM kapszaicin (CAPS) adagolása a 0. percben kezdődött és a kísérlet alatt folyamatosan zajlott. A kapszaicin hatását 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (felső sor) és Ca^{2+} -mentes (középső sor), míg az 5 μM kapszazepin (ZEP) 5 perces előkezelésének hatását (alsó sor) vizsgáltuk. Jól látható a kapszaicin erőteljesebb hatása 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban. A bemutatott reprezentatív ábrák több megegyező eredményű kísérletből származnak.

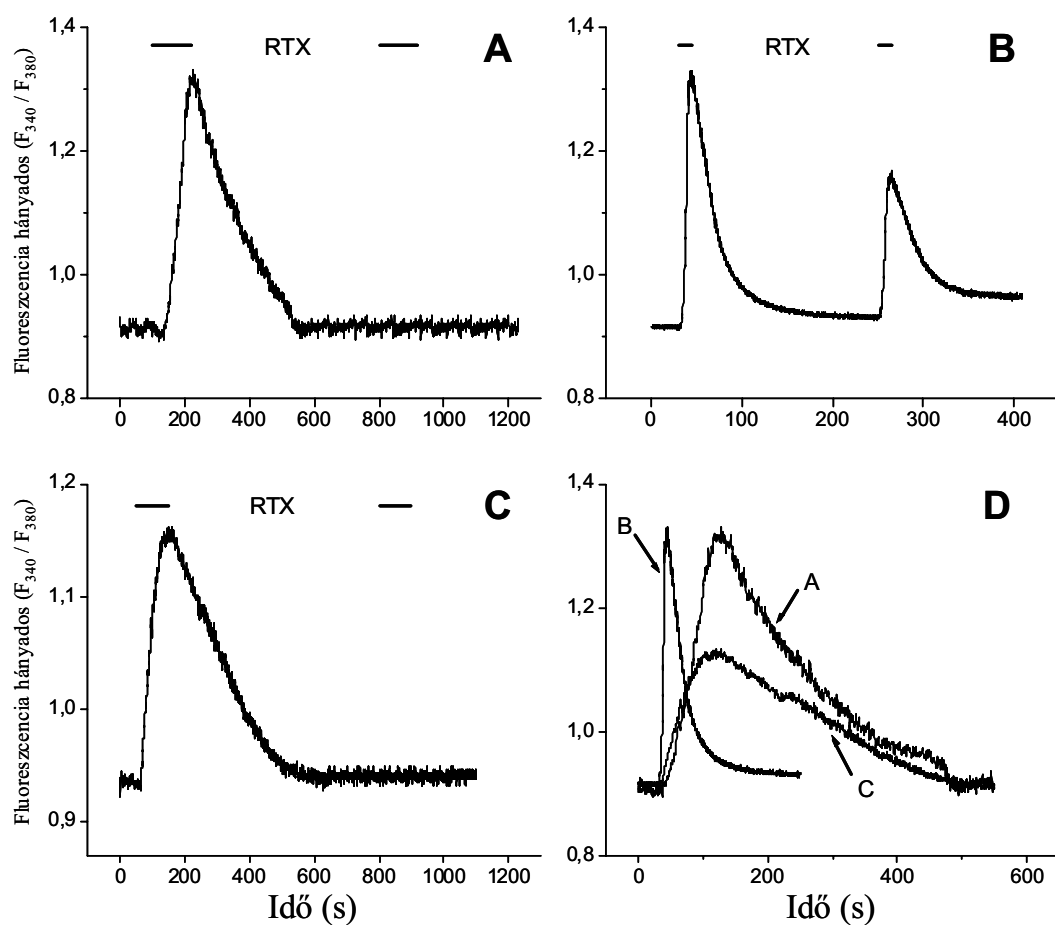
Amint a felvételeken látható, jelentős különbségek tapasztalhatók a kapszaicin hatásában az $[\text{Ca}^{2+}]_e$ függvényében. Ca^{2+} -tartalmú oldatban 1 μM kapszaicin az intracelluláris membránok, mint pl. ER és magmembrán hólyagosodását és feldarabolódását okozza (5. ábra felső sor) VR1eGFP/cos-7 sejteken. Mint ahogy várható volt (Oláh és mtsai, 2001a), a hatás kifejlődéséhez 5-10 percre van szükség,

ugyanis a vanilloid vegyületek indukálta sejtszintű változások sokkal lassabb kinetikájúak (perces hatás), mint a kalcium válaszok (másodperces hatás). Ca^{2+} -mentes oldatban a kapszaicin (5. ábra középső sor) sokkal kevésbé kifejezett intracelluláris elváltozásokat okozott, bár az ER roncsolódása szembetűnő volt, a magmembrán károsodása alig látható. VR1eGFP/cos-7 sejtek 10 perces előinkubálása 5 μM kapszazepinnel (ami önmagában nem okozott változásokat a sejtek integritásában, nincs mutatva) hatékonyan kivédte az 1 μM kapszaicin okozta sejtszintű változásokat (5. ábra alsó sor). Megállapíthattuk tehát, hogy a konfokális mikroszkópos felvételek azt a feltételezést erősítették, hogy a kapszaicin hatása VR1eGFP/cos-7 sejteken jelentősen függ az extracelluláris kalcium koncentrációtól.

A VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben az RTX által kiváltott sejtválaszok nagyon hasonlóak 1,8 mM és 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatokban

A következő kísérletekben a kapszaicin ultrapotens analógjának, az RTX-nek a kalcium-homeosztázisra és morfológiai tulajdonságokra kifejtett hatását vizsgáltuk. Amint a 6. ábra mutatja, 1 nM RTX, a kapszaicinhez hasonlóan növelte a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t mind 0 mM, mind 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban, bár jelentős különbségek voltak az RTX által kiváltott tranziensek esetében is a különféle Ca^{2+} tartalmú oldatokban.

1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban az RTX a vizsgált VR1eGFP/cos-7 sejtek 42%-ában ($n = 27/64$) növelte meg az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ koncentrációt. Ellentétben a kapszaicin alkalmazásakor kapott adatokkal (5. ábra), az összes kiváltott tranziens lassú (6. ábra A és D) és a következő paraméterekkel volt jellemezhető (I. táblázat): maximális amplitúdó 68 ± 16 nM, TTP: 133 ± 23 s és ROR: $1,9 \pm 1$ nM/s (az összes érték átlag $\pm$ SEM). Habár a sejtek 52%-ában ($n = 14/27$) az RTX adagolást követően az $[\text{Ca}^{2+}]_i$



6. ábra RTX hatása a VR1eGFP/cos-7 sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ra.

Üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket 5 μ M fura 2-AM-el feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást és annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). Az 1 nM RTX hatását 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ (A panel) és kalcium mentes (B és C panel) oldatban mértük. A különböző oldatokban RTX-nal kiváltott tranziensek eltérő paramétereinek jobb összehasonlíthatósága végett az A-C paneleken szereplő első $[Ca^{2+}]_i$ növekedéseket ugyanazon az idő és hányados tengelyeken mutatjuk be a D panelen. A tranziensek kinetikai paramétereit az I. táblázatban foglaltuk össze.

visszatért a nyugalmi érték közelébe, egy sejten sem tudtunk kiváltani újabb választ RTX ismételt alkalmazásával (100 %-os tachyphylaxis).

Ca^{2+} -mentes oldatban a VR1eGFP/cos-7 sejtek mintegy felében (48%) ($n = 33/69$) volt az RTX képes $[Ca^{2+}]_i$ tranzienszt létrehozni. Kinetikai adatok alapján a tranzienseket két csoportra lehetett itt is osztani (I. táblázat). Az első csoportba, az

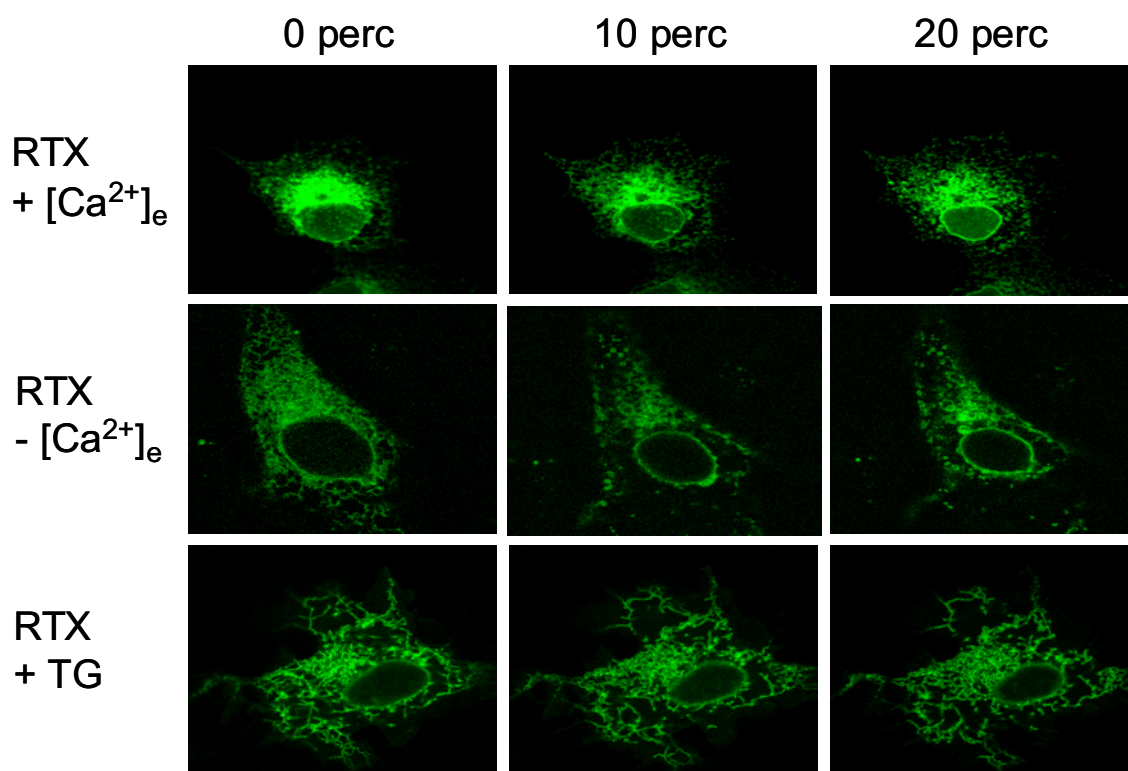
úgynevezett “gyors” tranziensek közé, az RTX-re válaszoló sejtek 33 %-a ($n = 11/33$) volt sorolható (6. ábra B és D panel); a maximális amplitúdó 65 ± 22 nM, a TTP: $15,7 \pm 3$ s és a ROR: $7,1 \pm 3$ nM/s (összes érték átlag $\pm$ SEM) volt. Azon sejtek esetén, ahol a tranziens visszatért a nyugalmi szint közelébe (55% a “gyors” típusú tranziensekből, $n = 6/11$), az ismételt RTX adagolás jelentős tachyphylaxist okozott (41 ± 11 % csökkenés az első adagolás hatására létrejött tranzienshez képest, átlag $\pm$ SEM).

A második csoportba az RTX adagolásra “lassú” tranzienssel (67 %, $n = 22/33$) válaszoló sejtek tartoztak (6. ábra C és D rész), a válaszok maximális amplitúdója 44 ± 14 nM, TTP: 166 ± 21 s és ROR: $0,36 \pm 0,2$ nM/s (összes érték átlag $\pm$ SEM) volt (I. táblázat). Habár ebben a csoportban a sejtek nagy részénél az $[Ca^{2+}]_i$ visszatért a kiindulási érték közelébe, az ismételt RTX adagolással egyáltalán nem tudtunk kiváltani tranzienszt, tehát a tachyphylaxis maximálisnak bizonyult.

Az intracelluláris kalciumraktárakba beépült VR1eGFP fúziós protein funkcionális szerepének tisztázása érdekében vizsgáltuk az intracelluláris kalciumraktárak kiürítésének hatását az RTX indukálta válaszokra thapsigargin (TG) felhasználásával, mely az ER Ca-ATP-áz molekula gátlószere (Thastrup, 1990). Mivel az RTX által létrehozott tranziensek Ca^{2+} -mentes oldatban jelentős tachyphylaxist mutattak (79 ± 13 % átlagos tachyphylaxis az RTX adagolásra válaszoló sejteken, átlag $\pm$ SEM, I. táblázat), ezért nem tudtuk mérni a TG hatását RTX-nal ismételten kiváltott tranziensen. Összehasonlítottuk tehát az RTX-nal kiváltható tranziensek amplitúdóját kontroll, valamint 50 nM TG-nal 5 percig előkezelt sejteken. Megállapítottuk, hogy míg a vizsgált sejtek $57,4 \pm 14$ nM (átlag $\pm$ SEM) átlagos amplitúdójú $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel válaszoltak RTX kezelésre kontroll körülmények között, addig a TG előkezelés után csak minimális választ kaptunk

(átlagos amplitúdó $3,6 \pm 2$ nM, átlag $\pm$ SEM, $n = 20$). Ennek megfelelően megállapítottuk, hogy az ER Ca^{2+} tartalmának kiürítése jelentősen, mintegy 93 %-kal gátolta az RTX-nal kiváltható $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziens amplitúdóját Ca^{2+} -mentes oldatban.

Hasonlóan a kapszaicinhez, megvizsgáltuk az RTX adagolás morfológiai hatását VR1eGFP-t expresszáló cos-7 sejteken. Ahogy az a 7. ábrán látható (felső és középső sorok), 1 nM RTX hasonló hatással hozta létre az intracelluláris membránok felbomlását Ca^{2+} -mentes és Ca^{2+} -ot tartalmazó Tyrode oldatban, mely jelentősen eltér a kapszaicin esetén kapott eredménytől. Meg kell jegyezni, hogy az RTX sokkal lassabban fejtette ki hatását, mint a kapszaicin (maximális hatás csak 15-20 perc



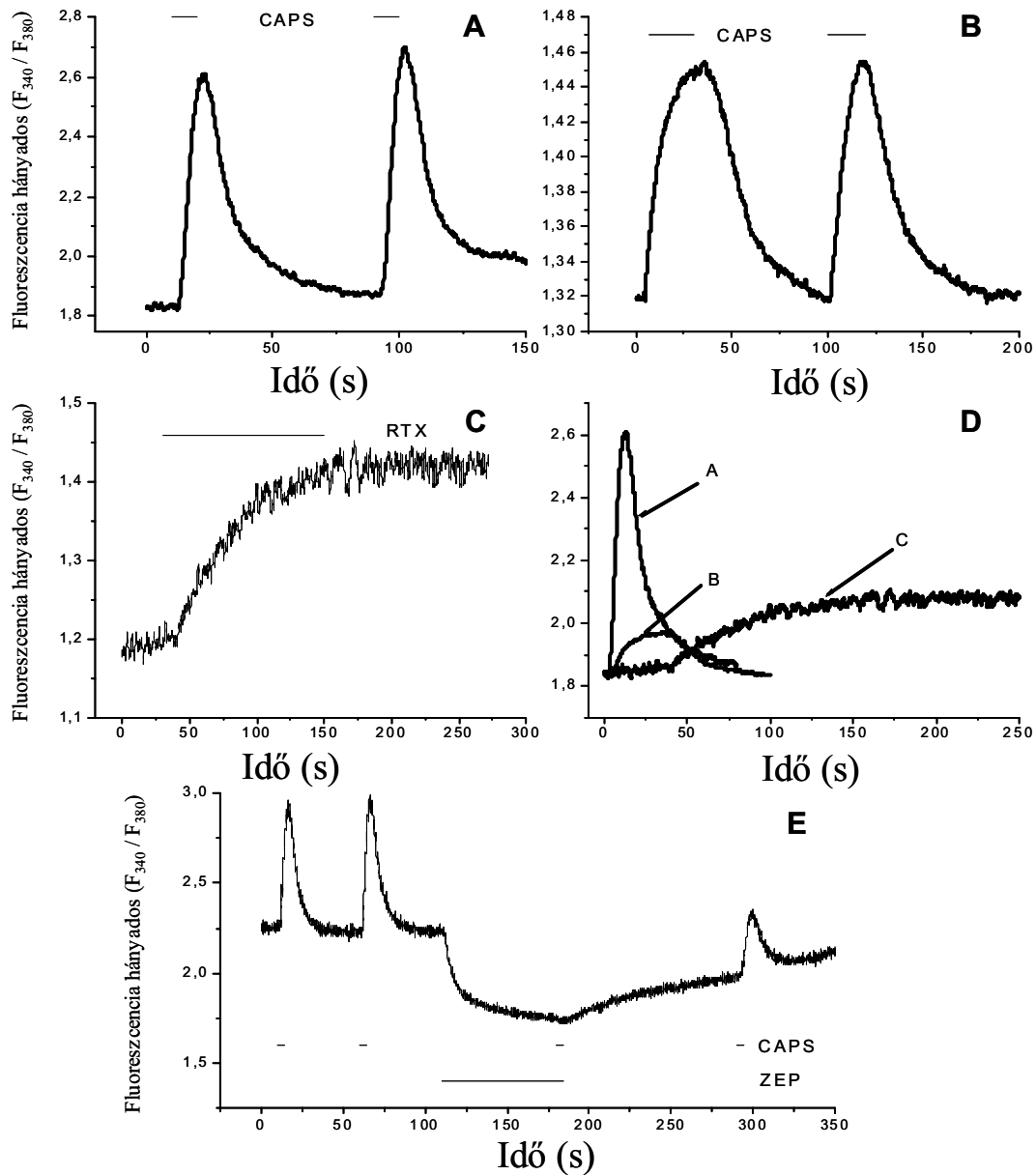
7. ábra Az RTX hatása a VR1eGFP/cos-7 sejtek membránstruktúrájára.

A VR1eGFP/cos-7 sejteket zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk konfokális mikroszkóppal. A felvételeket ezután az “Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően készítettük el. Az 1 nM RTX adagolása a 0. percben kezdődött és a kísérlet alatt folyamatosan zajlott. Az RTX hatását 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (felső sor) és Ca^{2+} -mentes (középső sor), míg az 50 nM thapsigargin (TG) 5 perces előkezelésének hatását (alsó sor) szintén Ca^{2+} -mentes oldatban vizsgáltuk. Jól látható az RTX hasonló hatása mindkét oldatban. A bemutatott reprezentatív ábrák több, megegyező eredményű kísérletből származnak.

elteltével látható). Ugyanakkor megállapítottuk azt is, hogy a sejtek 5 perces előinkubálása 50 nM TG-nal (tehát az intracelluláris kalciumraktárak kiürítése) nagymértékben – de nem teljesen – meggátolta az RTX által kiváltott intracelluláris morfológiai válaszokat (7. ábra alsó sor). A részleges hatás valószínűleg a TG $[Ca^{2+}]_i$ -ra kifejtett hatásával magyarázható (Thastrup és mtsai, 1987). A kalciumkoncentráció mérésekkel megegyezően, ezek az adatok szintén a VR1eGFP intracelluláris kalciumraktárakba épülését és működését támasztják alá cos-7 sejtekben. Ezen kívül úgy tűnik, hogy a kapszaicin kezelésnél tapasztaltakkal szemben az RTX hatása sokkal kevésbé függ az $[Ca^{2+}]_e$ -től.

Az indukálható VR1/CHO expressziós rendszerben az RTX hatástalan kalcium mentes extracelluláris oldatban

Ca^{2+} -tartalmú oldatban 1 μ M kapszaicin a VR1/CHO sejtek 66%-ában ($n = 66/100$) (II. táblázat) hozott létre $[Ca^{2+}]_i$ tranzienseket. Az összes tranziens “gyors” volt és a cos-7 sejtekhez viszonyítva nagy maximális amplitúdóval – 183 ± 29 nM – rendelkezett, a többi kinetikai paraméter TTP: $12,9 \pm 3$ s és ROR: 59 ± 12 nM/s volt (összes érték átlag $\pm$ SEM) (8. ábra A és D). Ezzel szemben Ca^{2+} -mentes oldatban a sejteknek csak 25%-a válaszolt ($n = 15/60$) (II. táblázat) kapszaicin adagolásra. Ezek is mind “lassú” tranziensek voltak, melyek a következő paraméterekkel rendelkeztek: a maximális amplitúdó 28 ± 4 nM, TTP: 49 ± 14 s és ROR: $7,5 \pm 1$ nM/s (összes érték átlag $\pm$ SEM) (8. ábra B és D). Mindkét külső oldatban a sejtek többségében a tranziensek teljesen visszatértek a kezdeti értékre (8. ábra A és B); így vizsgálható volt az ismételt kapszaicin adagolás hatása. Szemben a VR1eGFP/cos-7 sejtek esetében tapasztaltakkal (4. ábra), a VR1/CHO sejteknél egyik oldatban sem kaptunk



8. ábra. Kapszaicin és RTX hatása a VR1/CHO sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ra.

Az üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket 5 μ M fura 2-AM-el feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást és annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). Az 1 μ M kapszaicin (CAPS) hatását 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ (A panel) és kalcium mentes (B panel), Ugyanakkor az 1 nM RTX hatását 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ (C panel) oldatban mértük. A különböző oldatokban kapszaicinnal és RTX-nal kiváltott transziensek eltérő paramétereinek jobb összehasonlíthatósága végett az A-C paneleken szereplő első $[Ca^{2+}]_i$ növekedéseket ugyanazon az idő és hányados tengelyeken mutatjuk be a D panelen. Az E panel az 5 μ M kapszazepin (ZEP) kapszaicinre kifejtett szignifikáns és kimosható gátló hatását mutatja 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban. A transziensek kinetikai paramétereit a II. táblázatban foglaltuk össze.

	Kapszaicin (1 μ M)		RTX (1 nM)
$[Ca^{2+}]_e$	1,8 mM	0 mM	1,8 mM
Válaszoló sejtek	66%	25%	16%
Tranziens típusa	gyors (100%)	lassú (100%)	lassú (100%)
Amplitúdó (nM)	183 $\pm$ 29	28 $\pm$ 4	47 $\pm$ 19
Maximumig eltelt idő (TTP, s)	12,9 $\pm$ 3	49 $\pm$ 14	144 $\pm$ 28
Meredekség (ROR, nM/s)	59 $\pm$ 12	7.5 $\pm$ 1	3,5 $\pm$ 1
Tachyphylaxis (% csökkenés)	-23 $\pm$ 13*	4,5 $\pm$ 6	N/A

II. táblázat. *Kapszaicinnel és RTX-nal VR1/CHO sejteken kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek kinetikai paramétereinek összefoglalása*

A bemutatott paramétereket az “Anyagok és módszerek” fejezetnek megfelelően határoztuk meg. Az RTX hatástalan volt 0 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban. A csillaggal jelölt negatív tachyphylaxis a második kapszaicin által kiváltott tranziens növekedését jelzi az elsőhöz viszonyítva (lásd még a szöveget). Minden értéket számos mérésből számított átlag $\pm$ SEM alakban tüntettünk fel. N/A nem alkalmazható.

tachyphylaxist ismételt kapszaicin adagolásra (II. táblázat). Inkább, különösen 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban, a második kapszaicin adagolás nagyobb Ca-válaszokat hozott létre (a második kapszaicin alkalmazás hatására létrejött válasz mintegy 20%-kal nagyobb volt az elsőhöz képest, II. táblázat).

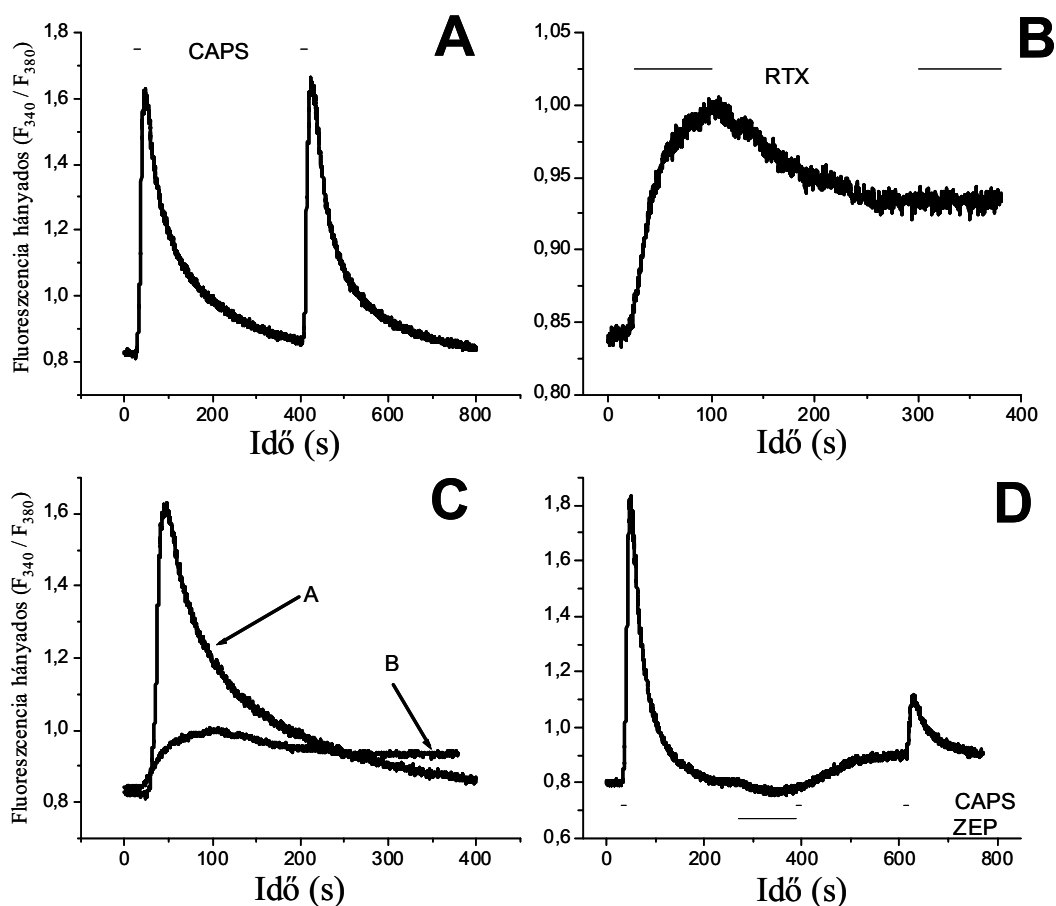
Érdekes volt az a jelenség (és eltért a VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben tapasztaltaktól, 6. ábra és I. táblázat), hogy a VR1/CHO indukálható expressziós rendszerben 1 nM RTX teljesen hatástalannak tűnt Ca^{2+} -mentes oldatban (II. táblázat). Sőt még 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban is csak a sejtek 16%-a ($n = 8/50$) válaszolt RTX-re $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel. Az összes ilyen tranziens “lassú” típusúnak bizonyult, az átlagos maximális amplitúdó 47 ± 19 nM, a TTP: 144 ± 28 s és az ROR: $3,5 \pm 1$ nM/s volt (összes érték átlag $\pm$ SEM) (8. ábra C és D), ugyanakkor nem tudtuk vizsgálni az ismételt RTX adagolás hatását, mivel a kiváltott tranziensek soha nem tértek vissza a kiindulási érték közelébe.

A VR1 kompetitív antagonistájának, a kapszazepinnek az adagolásával vizsgáltuk a kapszaicin és RTX specifikusságát az indukálható rendszerben. A sejtek 2 perces előinkubálása 5 μM kapszazepinnel teljesen kivédte a kapszaicin további adagolásának hatását Ca^{2+} -tartalmú oldatban (a gátlószer reverzibilis hatása látható a 8. ábra E részén). Mivel RTX-nal nem tudtunk ismételt választ kiváltani, ezért meghatároztuk az RTX válaszok amplitúdóját kontroll és kapszazepin előkezelt esetben. Ekkor a kontroll sejteken a maximális amplitúdó 47 ± 19 nM (átlag $\pm$ SEM, II. táblázat) volt, míg kapszazepin előkezelt sejteken az RTX-nek praktikusán nem volt hatása ($3,8 \pm 3$ nM, átlag $\pm$ SEM, $n = 8$).

A VR1/C6 stabil expressziós rendszerben, a kapszaicin és az RTX csak Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldatban volt hatásos.

Ca^{2+} -tartalmú oldatban vizsgálva a VR1/C6 sejteket a kapszaicin hatása hasonlóan bizonyult a VR1/CHO sejtek vizsgálatakor tapasztaltakhoz (III. táblázat). Az összes vizsgált sejt ($n = 99$) “gyors” $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranzienssel válaszolt 1 μM kapszaicin adagolására (maximális amplitúdó 117 ± 19 nM, TTP: $12,1 \pm 8$ s és ROR: $25,7 \pm 5$

nM/s, az összes érték átlag $\pm$ SEM) (9. ábra A és C), melyek mind visszatértek a nyugalmi kalciumszintre a kapszaicin adagolás befejezése után. Hasonlóan a VR1/CHO sejtekhez, a VR1/C6 sejteken sem tapasztaltunk tachyphylaxist a kapszaicin ismételt alkalmazása során (III. táblázat). Ugyanakkor ellentétben a



9. ábra Kapszaicin és RTX hatása a VR1/C6 sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ra.

Az üveg fedőlemezen tenyésztett sejteket 5 μ M fura 2-AM-el feltöltöttük és 10 Hz frekvenciával rögzítettük a 340 és 380 nm-es hullámhosszakon történő gerjesztés hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitást és annak hányadosát képeztük (F_{340}/F_{380}). Az 1 μ M kapszaicin (CAPS, *A panel*) és az 1 nM RTX (*B panel*) hatását 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban mértük. A kapszaicinnal és RTX-nal kiváltott transziensek eltérő paramétereinek jobb összehasonlíthatósága végett az A-B paneleken szereplő első $[Ca^{2+}]_i$ növekedéseket ugyanazon az idő és hányados tengelyeken a *C panel* mutatjuk be. Az 5 μ M kapszazepin (ZEP) kapszaicinre kifejtett szignifikáns és kimosható gátló hatását mutatja 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban a *D panel*. A transziensek kinetikai paramétereit a III. táblázatban foglaltuk össze.

VR1/CHO indukálható rendszerrel tapasztaltakkal, a VR1/C6 sejteken kapszaicinnal nem tudunk semmilyen választ kiváltani Ca^{2+} -mentes oldatban ($n = 56$).

Az RTX hatásának vizsgálata VR1/C6 sejteken feltűnően hasonló eredményt hozott, mint a VR1/CHO indukálható rendszer esetén (III. táblázat). Vagyis 1 nM

	Kapszaicin (1 μM)	RTX (1 nM)
$[\text{Ca}^{2+}]_e$	1,8 mM	1,8 mM
Válaszoló sejtek	100%	28%
Tranziens típusa	gyors (100%)	lassú (100%)
Amplitúdó (nM)	117 ± 19	$29,2 \pm 4$
Maximumig eltelt idő (TTP, s)	$12,1 \pm 8$	75 ± 13
Meredekség (ROR, nM/s)	$25,7 \pm 5$	$7,3 \pm 2$
Tachyphylaxis (% csökkenés)	$-9,5 \pm 5^*$	N/A

III. táblázat. *Kapszaicinnal és RTX-nal VR1/C6 sejteken kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziensek kinetikai paramétereinek összefoglalása*

A bemutatott paramétereket az “Anyagok és módszerek” fejezetnek megfelelően határoztuk meg. A kapszaicin és az RTX hatástalan volt 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban. A csillaggal jelölt negatív tachyphylaxis a második kapszaicin által kiváltott tranziens növekedését jelzi az elsőhöz viszonyítva (lásd még a szöveget). Minden értéket számos mérésből számított átlag $\pm$ SEM alakban tüntettünk fel (N/A nem alkalmazható).

RTX csak kalcium tartalmú külső oldatban volt hatásos és a sejteknek csak mintegy 28 %-ában ($n = 19/68$) váltott ki “lassú” és kis tranzienseket a következő paraméterekkel: maximális amplitúdó $29,2 \pm 4$ nM, TTP: 75 ± 13 s és ROR: $7,3 \pm 2$ nM/s (az összes érték átlag $\pm$ SEM) (9. ábra B és C panel). A 9. ábra B részén is látható, hogy az RTX ismételt adagolása nem hozott létre további változást az $[Ca^{2+}]_i$ -ban. Mivel ezen tranziensek csak részben tértek vissza (ha egyáltalán visszatértek) a kiindulási $[Ca^{2+}]_i$ szintjére, ezért az első RTX alkalmazás után nem tudtuk vizsgálni a tachyphylaxis jelenségét és elvégezni annak statisztikai jellemzését. A kapszazepin hatását szintén vizsgáltuk ebben a rendszerben. Az indukálható rendszernél tapasztaltakhoz hasonlóan az 5 μ M kapszazepinnel 2 percig folytatott előkezelés teljesen, ugyanakkor visszafordíthatóan meggátolta a kapszaicin hatását (9. ábra D rész). Mivel ezen sejteken az RTX ismételt adagolásának hatása nem vizsgálható, ezért meghatároztuk az RTX-nal kiváltott válaszok maximális amplitúdóját kontroll és kapszazepin előkezelt sejteken. Míg a gátlószerral nem kezelt VR1/C6 sejteken a kiváltott Ca-válasz átlagos maximális amplitúdója $29,2 \pm 4$ nM (átlag $\pm$ SEM, II. táblázat), addig a gátlószerral előkezelt sejteken az RTX teljesen hatástalan maradt ($n = 10$).

A VR1eGFP/cos-7 tranziens és a VR1/CHO indukálható expressziós rendszerekben a membránba épült VR1 részben nyitott állapotban lehet

A kontroll és VR1 receptort expresszáló sejtek különböző tulajdonságait megvizsgálva 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ oldatban egy újabb érdekes jelenségre lettünk figyelmesek. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a VR1eGFP/cos-7 (tranziens) és VR1/CHO (indukálható) rendszerekben, de nem a VR1/C6 stabil rendszerben a felszíni membránba épült VR1 részben nyitott állapotban lehet. Azt tapasztaluk

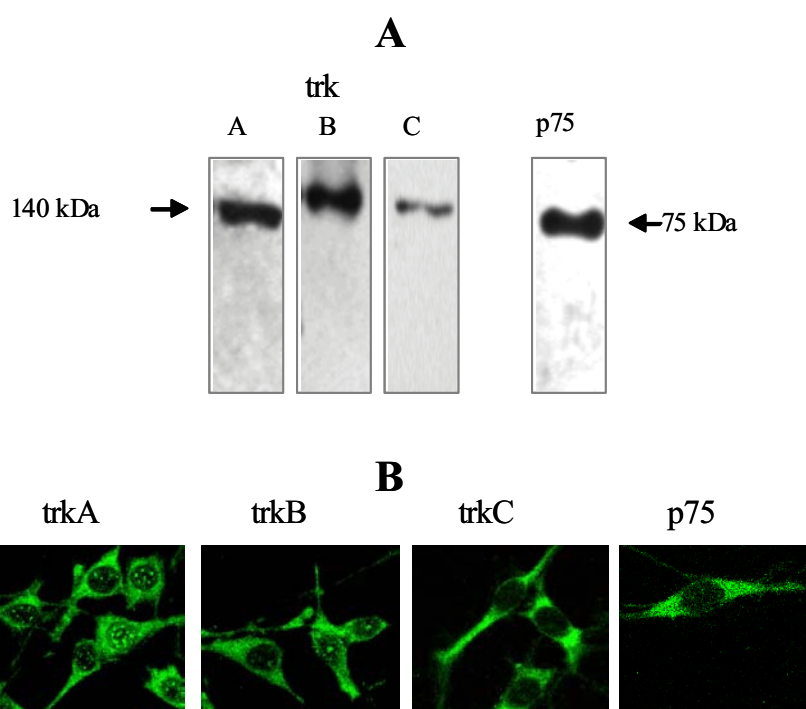
ugyanis, hogy az üres peGFP vektorral transzfektált sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja $60,2 \pm 5$ nM ($n = 15$), míg ez az érték a VR1eGFP/cos-7 sejtekben 148 ± 24 nM ($n = 53$) (az összes érték átlag $\pm$ SEM) volt. Az előbbi megfigyeléshez hasonlóan a VR1/CHO sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja is sokkal magasabb (185 ± 29 nM, átlag $\pm$ SEM, $n = 100$) volt a kontroll CHO sejtekéhez képest (76 ± 15 nM, átlag $\pm$ SEM, $n = 25$). Ugyanakkor a stabil rendszerben nem tapasztaltunk ilyen eltéréseket a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ban, kontroll C6 sejtekben 46 ± 5 nM (átlag $\pm$ SEM, $n = 17$), míg VR1/C6 sejtekben $52,2 \pm 8$ nM (átlag $\pm$ SEM, $n = 99$).

A VR1 receptor szerepét támasztja alá a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése esetén VR1eGFP/cos-7 és VR1/CHO sejtekben a kapszazepin adagolással tapasztalt jelenség. Amint a 4. és 8. ábrák E részein látható, a kapszazepin, az 1 μ M kapszaicin hatásának gátlásán kívül, jelentősen csökkentette a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t a VR1eGFP/cos-7 tranziens és a VR1/CHO indukálható expressziós rendszerekben. Az adatok statisztikai analízise bebizonyította, hogy ez a csökkenés VR1eGFP/cos-7 sejteken 78 ± 13 nM (átlag $\pm$ SEM, $n = 15$), míg VR1/CHO sejteken 110 ± 13 nM (átlag $\pm$ SEM, $n = 8$) volt. Hasonló kapszazepin kezelés a VR1/C6 sejteken csak $7,8 \pm 2$ nM (átlag $\pm$ SEM, $n = 17$) csökkenést okozott a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ban (9. ábra D), mégis hatékonyan gátolta a kapszaicin hatását. Fontos megjegyeznünk, hogy a kontroll, üres vektorral transzfektált cos-7, CHO, vagy C6 sejtek 2 perces inkubálása 5 μ M kapszazepinnel soha nem hozott létre 10 nM-nál nagyobb $[Ca^{2+}]_i$ csökkenést (az adat nincs bemutatva).

II. A VR1 működésének szabályozása különböző neurotrophinokkal

A rVR1/C6 sejtek neurotrophin receptor készlete

Az előbb ismertetett kísérleteinkben már megállapítottuk, hogy a VR1/C6 sejtek azért is különlegesen jó vizsgálati alanyok, mert 1 μ M kapszaicin rövid idejű adagolása során, 1,8 mM kalcium koncentrációjú Tyrode-oldatban, gyors, ismételhető, és ami a számunkra legfontosabb, tachyphylaxist (azaz ismétlés hatására csökkenő amplitúdót) alig mutató tranziensek alakulnak ki, így tehát bizonyos anyagok hatása a vanilloid receptor működésére objektíven vizsgálható.



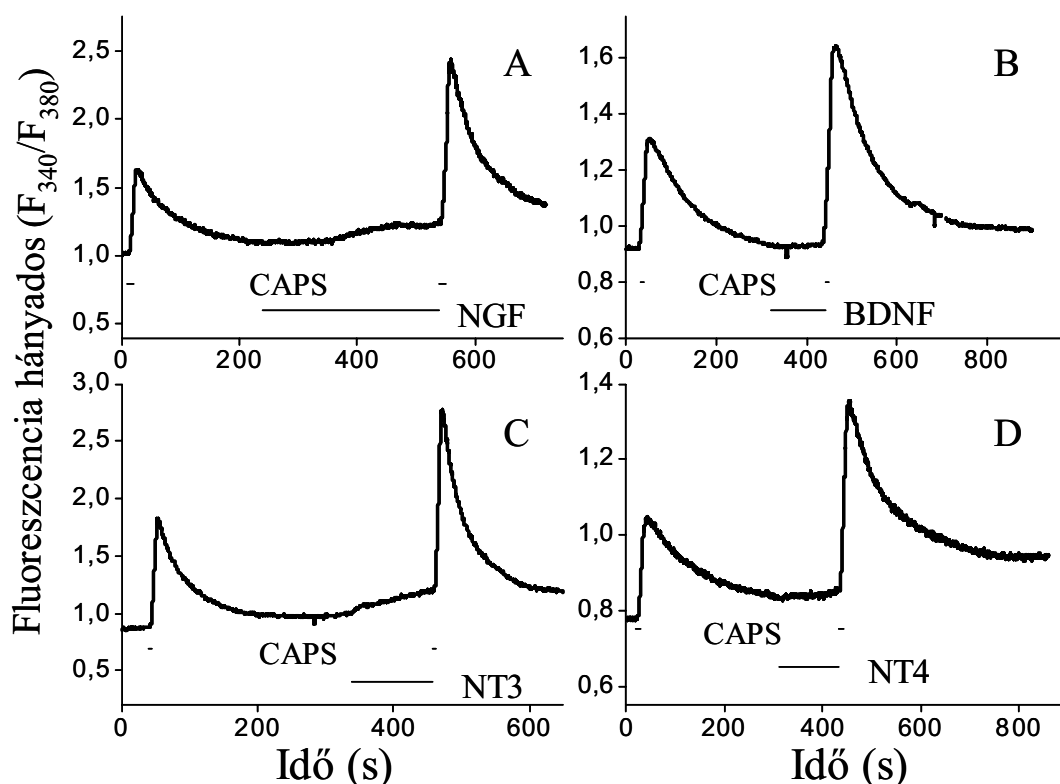
10. ábra *A neurotrophin receptorok kifejeződése rVR1-C6 sejtekben*

A) A tenyésztőedényben növényő sejteket lízis-pufferben learattuk, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva nyúlban termelt megfelelő neurotrophin receptor ellenes elsődleges antitestekkel és kecskében termelt torna-peroxidáz-konjugált, nyúl IgG-ellenes másodlagos antitesttel Western blottot végeztünk. **B)** A fedőlemezen növényő sejteket acetonos fixálást követően Triton X-100-at tartalmazó oldattal permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd nyúlban termelt megfelelő neurotrophin receptor ellenes elsődleges antitestekkel festettük. Másodlagos antitestként fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált (FITC, zöld fluoreszcencia) antitesteket alkalmaztunk, majd a lemezek fedését követően fluoreszcens mikroszkóppal (63x objektív) felvételeket készítettünk. Mind a Western blot, mind az immunfluoreszcens jelölést bemutató ábrák az adott receptorokra vonatkoztatva legalább 3-3 megismételt (és hasonló eredményt mutató) kísérlet egyikét reprezentálják.

Habár más szerzők már vizsgálták a C6 sejtek neurotrophin receptorainak kifejeződését (Hutton és mtsai, 1992), kísérleteinkben először azt határoztuk meg, hogy a VR1/C6 glióma sejtek milyen neurotrophin receptor mintázattal rendelkeznek. Western blot technika felhasználásával kapott eredményeink azt mutatták (10. ábra A), hogy az eddig felfedezett neurotrophin receptorok közül az összes, azaz a TrkA, -B és -C, valamint a p75 is expresszálódik a sejtekben. Ezen tapasztalatainkat az elsődleges specifikus antitestek után fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt másodlagos antitestek felhasználásával készült immunhisztokémiai kísérleteink is megerősítették (10. ábra B.). Ugyanakkor látható az is, hogy a VR1 stabil overexpressziója nem változtatta meg a korábban már leírt neurotrophin receptor mintázatot.

A neurotrophinok hatása a VR1 működésére

A neurotrophinok hatásának vizsgálatai során először 5-10 másodpercig alkalmazott 1 μ M koncentrációjú kapszaicinnal 2 db ún. kontroll Ca-tranzienst váltottunk ki (melyek közül az ábrákon a jobb áttekinthetőség kedvéért csak a második kontroll tranzienst btüntettük fel), majd 2-5 percig 100 ng/ml NGF-ral, illetve 50-50 ng/ml BDNF-ral, NT-3-mal vagy NT-4-gyel kezeltük a sejteket, végül ismételtén 1 μ M koncentrációjú kapszaicinnal, a kontroll tranzienssel azonos idejű ún. teszt Ca-tranzienst idéztünk elő. A kezelések után a felvett regisztrátumokon elemeztük a kontroll és teszt Ca-tranziensek amplitúdóit, melyeket a kapszaicin adagolás megkezdésekor mért alapvonal (nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$) és a kapszaicin hatására kialakuló maximális válasz különbségeként értelmeztünk, a kontroll tranziens amplitúdóját 100 %-nak véve.



11. ábra A neurotrofinok hatása a kapszaicin által kiváltott Ca-tranziensekre *rVR1-C6* sejteken

A sejteket a fluoreszcens kalcium-érzékeny fura-2 AM festékkel feltöltöttük, majd 1,8 mM kalciumkoncentrációjú Tyrode-oldatban vizsgáltuk 100 ng/ml NGF (*A panel*), valamint 50-50 ng/ml BDNF (*B panel*), NT3 (*C panel*) és NT4 (*D panel*) hatását az 1 μ M kapszaicin adagolásakor kifejlődő Ca-válaszokra. Az ábrán a fluoreszcencia hányadosokat (F_{340}/F_{380}) tüntettük fel.

Amint a 11. ábrán is látható, az összes neurotrofin jelentősen, ugyanakkor egymástól eltérő mértékben, megnövelte a teszt kapszaicin tranziens amplitúdóját a kontrollhoz viszonyítva. Több sejten kapott eredményeinket statisztikailag elemezve megállapítottuk (IV. táblázat), hogy az NGF kezelés 83 ± 17 %-kal ($n=28$), a BDNF adagolás 104 ± 19 %-kal ($n=14$), az NT3 alkalmazása 71 ± 16 %-kal ($n=15$), míg az NT4 kezelés 68 ± 11 %-kal ($n=16$) (az összes érték átlag $\pm$ SEM formában megadva) növelte a kiváltható választ. Érdekességgé tapasztaltuk, hogy a neurotrofinokkal való kezelés során a legtöbb sejten a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szint kisebb-nagyobb

mértékben megemelkedett. Megvizsgálva ugyanakkor a különféle sejtekben kapott változásokat kiderült, hogy ezen jelenség megléte, hiánya, illetve mértéke nem befolyásolta a neurotrophinok pozitív hatását. Ezen eredményünk alapján feltételezhető volt tehát, hogy a neurotrophinok jelentős szereppel bírhatnak a VR1 kapszaicin iránti érzékenységének szabályozásában, azaz szenzitizációjában.

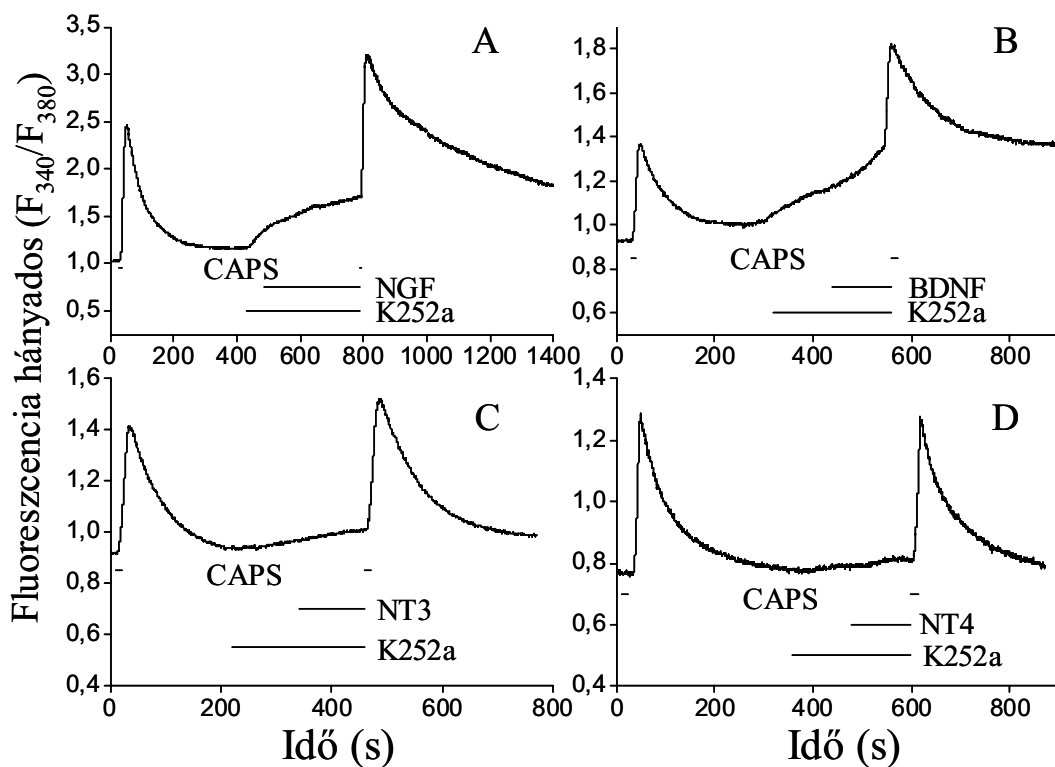
Neurotrophin	Hatás VR1/C6 sejteken Tyrode-oldatban		Hatás VR1/C6 sejteken 50 nM K252a jelenlétében	
	<i>Amplitúdó növekedés</i>	<i>Esetszám</i>	<i>Amplitúdó „növekedés”</i>	<i>Esetszám</i>
NGF (200 ng/ml)	83 ± 17 %	n=28	-7 ± 5 %	n=13
BDNF (50 ng/ml)	104 ± 19 %	n=14	8 ± 6 %	n=8
NT3 (50 ng/ml)	71 ± 16 %	n=15	-6 ± 4 %	n=11
NT4 (50 ng/ml)	68 ± 11 %	n=16	-2 ± 5 %	n=9

IV. táblázat *A neurotrophinok hatása Tyrode-oldatban és K252 jelenlétében a kapszaicin által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdójára*

A neurotrophinokkal való kezelések után kapszaicinnal kiváltott teszt Ca-tranziensek amplitúdóit hasonlítottuk össze a kontroll (azaz a kezelés előtt felvett) kapszaicin-indukálta Ca-tranziensek amplitúdójával, a kontroll válaszok amplitúdóját 100 %-nak véve. Az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel.

A tirozin-kináz útvonal gátlásának következménye neurotrophinok VR1-t befolyásoló hatására

Annak kiderítésére, hogy a neurotrophinok hatása specifikusan, azaz a neurotrophin receptorokon keresztül zajlik-e le, valamint, hogy mely receptorok vehetnek részt a VR1 szenzitizációjában, további kísérleteket folytattunk. A sejteken



12. ábra A K252a anyag hatása a neurotrophinok által kiváltott VR1 szenzitizációra VR1/C6 sejteken

A sejteket a fluoreszcens kalcium-érzékeny fura 2-AM festékkel feltöltöttük, majd 1,8 mM kalciumkoncentrációjú Tyrode-oldatban vizsgáltuk 50 nM K252a anyag hatását a 100 ng/ml NGF (A), valamint 50-50 ng/ml BDNF (B), NT3 (C) és NT4 (D) által kiváltott, az 1 μ M kapszaicin adagolásakor kifejlődő Ca-válaszok szenzitizációjára. Az ábrán a fluoreszcencia hányadosokat (F_{340}/F_{380}) tüntettük fel.

először kontroll Ca-válaszokat váltottunk ki kapszaicinnel, majd a tirozin-kináz útvonal gátlószert, 50 nM K252a anyagot (Hashimoto, 1988, Knusel és Hefti, 1992) 2-5 percen keresztül adagoltuk. Azután úgy végeztük el a fent részletezett 2-5 perc hosszú neurotrophin kezelést (NGF: 100 ng/ml, BDNF-NT3-NT4: 50-50 ng/ml), hogy a neurotrophinok alkalmazásakor az inhibitor is folyamatosan jelen volt, majd végezetül kapszaicinnel teszt Ca-tranzienseket váltottunk ki. A 12. ábrán látható, hogy a K252a anyag hatásosan és szinte teljes mértékben kivédte a összes neurotrophin VR1-et szenzitizáló hatását, azaz a 11. ábrán bemutatott jelentős amplitúdónövekedés

a K252a anyag alkalmazásakor nem volt kimutatható. Statisztikailag összehasonlítva a kontroll és teszt Ca-tranziensek amplitúdóját az NGF esetében 7 ± 5 %-os csökkenést, a BDNF esetében 8 ± 6 %-os növekedést, az NT3 esetében 6 ± 4 %-os csökkenést, míg a NT4 esetében 2 ± 5 %-os csökkenést tapasztaltunk (az összes érték átlag $\pm$ SEM formában megadva) a teszt kapszaicin adagolás által kiváltott Ca-válaszok amplitúdójában K252a anyag jelenlétében (IV. táblázat). Látható az ábrán az is, hogy – hasonlóan a neurotrofinok esetében a 11. ábrán bemutatott jelenségekhez – a K252a anyag több sejtben önmaga is megemelte a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t, mely jelenség kifejlődése azonban nem befolyásolta a gátlószer hatékonyságát. Eredményeink arra utalnak tehát, hogy a neurotrofinok VR1-t szenzitizáló hatása specifikus, azaz valamely tirozin-kináz útvonalhoz kapcsolt Trk receptor(ok)on keresztül megvalósuló folyamatként értelmezhető.

MEGBESZÉLÉS

I. A különböző expressziós rendszerekben előállított rekombináns patkány VR1 eltérő tulajdonságokkal bír

Jelen kísérleteink első fázisában célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a különböző (tranziens, indukálható, stabil) expressziós rendszerekben előállított patkány VR1 funkcionális tulajdonságait. Eredményeink azt mutatják, hogy a VR1 által létrehozott $[Ca^{2+}]_i$ -válaszok vanilloid vegyületek iránti érzékenysége és extracelluláris kalciumtól való függése jelentősen eltér a különböző rendszerekben.

Korábbi eredményekhez hasonlóan (Oláh és mtsai, 2001a és b) kimutattuk, hogy a GFP-taggel jelölt cos-7 sejtekben előállított VR1 mind sejt felszíni, mind intracelluláris membránstruktúrákban (kalciumraktárakban) funkcionálisan jelen van (5. és 7. ábra). Az intracellulárisan beépült VR1 működőképes volt (4. és 6. ábra), ugyanis a kapszaicin és RTX $[Ca^{2+}]_i$ növekedést és a sejten belüli membránok károsodását okozta még $[Ca^{2+}]_e$ hiányában is, továbbá, ezt a hatást meggátolta a kalciumraktárak kiürítése thapsigarginnal. Ugyanakkor jelentős különbséget tapasztaltunk a két vanilloid vegyület hatékonyságában a külső oldat kalcium tartalmát illetően. Amíg a kapszaicin hatása erősen függött az $[Ca^{2+}]_e$ -től, addig az RTX egyformán hatásosnak bizonyult Ca^{2+} -tartalmú és -mentes oldatban. Ezek az adatok összhangban vannak a VR1-et expresszáló HEK 293 sejtek vizsgálatával nyert adatokkal (Marshall és mtsai, 2003), ahol az RTX igen, de a kapszaicin nem volt képes az $[Ca^{2+}]_i$ növelésére Ca^{2+} -mentes külső oldatban.

VR1eGFP/cos-7 sejteken a vanilloidok által kiváltott tranziensekben jelentős különbségeket mutattunk ki; gyors és lassú válaszokat tudtunk regisztrálni kapszaicinnal mind 1,8 mM Ca^{2+} -tartalmú és -mentes, illetve RTX-nal Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban (I. táblázat). Mivel ezek a jelenségek csak VR1eGFP/cos-7 tranziens

expressziós rendszerben voltak megfigyelhetők, az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a tranziens jellegnek és az eltérő transzfekciós hatásfoknak köszönhetően az egyes sejtekben a VR1 szintje eltérő lehet, így ez okozhatja, hogy ugyanaz a vanilloid vegyület a VR1-et eltérő szinten expresszáló sejteken különböző kalciumválaszokat hoz létre. Ez a feltételezésünk összhangban van azokkal a korábbi molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálati eredményekkel, melyekben azt tapasztalták, hogy a szenzoros neuronokon, illetve a rekombináns rendszerekben különböző multimer struktúrákként (Kedei és mtsai, 2001) megjelenő VR1 csatorna eredményezheti az azonos vanilloid vegyületekre adott eltérő válaszokat (Liu és Simon, 1996), azaz a heterogenitást.

Az általunk vizsgált három rendszer közül a stabil (VR1/C6) rendszerben homogén válaszok voltak megfigyelhetők. Ezen sejtekben, hasonlóan a szenzoros neuronokon tapasztaltakhoz (Cholewinski és mtsai, 1993, García-Hirschfeld és mtsai., 1995, Savidge és mtsai, 2001), a kapszaicin és az RTX csak Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldatban volt hatásos (9. ábra, III. táblázat). Ráadásul, a kapszaicinnal vagy RTX-nal kapott válaszok tulajdonságai nagyon homogének voltak; az összes vizsgált sejten a kapszaicin gyors, az RTX lassú $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést hozott létre, mely szintén jól tükrözi az előbb említett két vegyület közötti korábban leírt farmakokinetikai különbségeket (Szállási és Blumberg, 1999, Maggi és mtsai, 1990). Ezen adatok azt sugallják, hogy a VR1 expressziója a VR1/C6 sejtekben a rekombináns vektor által jól szabályozott módon megy végbe, mely hasonló körülményeket teremt a VR1 tulajdonságainak vizsgálatához.

Az indukálható rendszerben (VR1/CHO sejtek) a vanilloidokkal kiváltott Ca^{2+} -válaszok nagyon hasonlítottak a VR1/C6 sejteken kapott adatokhoz. 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ oldatban a kapszaicin gyors, míg az RTX lassú tranzienseket váltott ki. Ugyanakkor, a

hasonlóságok mellett, különbségeket is tapasztaltunk az indukálható és stabil rendszerek összehasonlításakor. A VR1/CHO sejtekben a kapszaicin (ellentétben a RTX-nal) még Ca^{2+} -mentes oldatban is kiváltott Ca-tranzienseket, habár megjegyzendő, hogy a kapszaicin csak a sejtek jóval kisebb hányadán volt hatékony (25% a 66%-hoz viszonyítva 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -ban, II. táblázat), továbbá a válaszok sokkal kisebbek és lassabbak voltak. Természetesen további vizsgálatok szükségesek még az intracelluláris membrán strukturákban expresszálandó VR1 vélelmezett helyének egyértelmű tisztázására (a kereskedelembe csak a VR1 intracelluláris régiója ellen termeltetett antitestek kaphatók, így az immuncitokémiai vizsgálatokhoz elkerülhetetlen a sejtek permeabilizálása, mely befolyásolhatja a kapott eredményt). Adataink ugyanakkor megegyeznek Tóth és mtsai (2002) által közöltekkel, miszerint a thapsigargin előkezelés teljesen kivédi a kapszaicin által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranzienseket VR1/CHO sejtekben, mely további bizonyítéka a VR1 intracelluláris membránokba épülésének ebben a rendszerben (ugyanakkor valószínűleg ez kisebb mértékű, mint az a VR1eGF/cos-7 sejtekben látható).

A “legváratlanabb” eredményünk mégis az volt, hogy – a korábban a szenzoros neuronokon (Szállási és Blumberg, 1999) tapasztalt adatokhoz viszonyítva – a kapszaicin ismételt adagolásának hatására nem tapasztaltunk tachyphylaxist a VR1/C6 és VR1/CHO rendszerben (8. és 9. ábra, II. és III. táblázat). Mivel a tachyphylaxis összetett folyamatában a szenzoros neuronokon (Holzer, 1991, Szállási és Blumberg, 1999, Docherty és mtsai, 1996, Liu és Simon, 1998) szerepe lehet a VR1 csatornadenzitás csökkenésének a vanilloid vegyületek ismételt vagy hosszantartó adagolásának hatására (Szállási és Blumberg, 1999), feltételezzük, hogy ezen expressziós rendszerek stabil vagy részlegesen stabil volta hozzájárulhat a tachyphylaxis hiányához. Ezen túlmenően, mivel a gazdasejtekben kimutatott

(Brismar, 1995, Verkhatsky és Kettenmann, 1996) kifinomult kalcium homeosztatis és jelátviteli (kináz, foszfataz) mechanizmusok eltér(het)nek a szenzoros neuronokéitól, így a VR1 ezen rendszerek általi szabályozása jelentősen különbözhet. Mindemellett az a jelenség, hogy a kapszaicin ismételt adagolásának hatására létrejött tranziensek amplitúdója csaknem megegyezett VR1/C6 és VR1/CHO sejteken, lehetővé teszi ezen sejtek használatát a VR1-et gátló és szenzitizáló anyagok tulajdonságainak meghatározására farmakológiai és gyógyszerfejlesztési vizsgálatokban (lásd alább).

Közismert tény, hogy az RTX a kapszaicin ultrapotens analógja (Szállási és Blumberg, 1989). Néhány in vivo és in vitro válasz tekintetében ugyanakkor az RTX alig bizonyult hatékonyabbnak (vagy teljesen hatástalan volt) a kapszaicinhez viszonyítva (Holzer, 1991, Szállási és Blumberg, 1999). Ezen utóbbi megfigyelés tűnik igaznak az indukálható és a stabil rekombináns expressziós rendszerben (vagyis VR1/CHO és VR1/C6 sejtekben), ahol az RTX csak kis és lassú tranzienseket tudott létrehozni, ráadásul a vizsgált sejteknek sokkal kisebb hányadában, mint azt a kapszaicinnél megfigyelhettük (II. és III. táblázat). Ezen eredményeink megerősítik a már korábban közölt adatokat, melyek szerint a kapszaicin relatív hatékonysága sokkal nagyobb a rekombináns (HEK293 sejtekben expresszált) VR1-on, mint a szenzoros neuronokon természetesen megjelenő csatornán (Szállási és mtsai, 1999), míg az RTX sokkal hatékonyabbnak mutatkozott a tenyésztett idegsejteken, mint a rekombináns expressziós rendszerben előállított receptorokon (Shin és mtsai, 2001).

Természetesen nagy jelentőségű lenne azon tényezők azonosítása, amelyek hozzájárulnak a különböző expressziós rendszerek vizsgálatokor tapasztalt eltérésekhez (sejten belüli elhelyezkedés, kalciumfüggés, a különböző vanilloidok iránti érzékenység). Kísérletes adataink, valamint irodalmi hivatkozások alapján úgy

tűnik, hogy a rekombináns vektor sajátságai (Oláh és mtsai, 2001a és b, Eun és mtsai, 2001, Wisnoskey és mtsai, 2003, Jahnel és mtsai, 2001), a gazdasejt funkcionális tulajdonságai (pl. kalciumhomeosztázis) (Caterina és mtsai, 1997, Tominaga és mtsai, 1998, Oláh és mtsai, 2001a és b, Jerman és mtsai, 2000, Jahnel és mtsai, 2001), az expresszió típusa (pl. tranziens vagy stabil) (Vellani és mtsai, 2001), a receptor glikozilációjának mértéke illetve sztöchiometriai eltérések (Kedei és mtsai, 2001, Jahnel és mtsai, 2001), valamint a kalciumkoncentráció változásának megállapításához használt módszer érzékenysége egyaránt hozzájárulhatnak a rendszerek eltérő tulajdonságaihoz. A felhasznált módszerek jelentőségét alátámasztják azok a tények is, hogy a szerzők többsége, akik kimutatták a VR1 mediált válaszok akár kalciumtól való függését (Cholewinski és mtsai, 1993, García-Hirschfeld és mtsai, 1995, Savidge és mtsai, 2001), akár függetlenségét (Oláh és mtsai, 2001a és 2001b, Eun és mtsai, 2001), továbbá a VR1 csatorna kizárólagos sejtfelszíni vagy sejtfelszíni és intracelluláris elhelyezkedését, nagyon hasonló mintázatot találtak az endogén VR1-t expresszáló szenzoros neuronokon. Bár néhány esetben a heterológ expressziós rendszerekben a VR1 funkcionális tulajdonságait meghatározó különböző paraméterek hozzájárulása még tisztázásra szorul, eredményeink a heterológ expressziós rendszerek jelentőségének növekedésére utalnak a VR1 sejtszintű funkciójának meghatározásában, ugyanakkor óvatosságra intenek ezen eredmények más rendszerekkel, például szenzoros neuronokon kapott eredményekkel való összevetésében.

II. Az összes neurotrophin szenzitizálja a stabilan transzfektált rekombináns patkány VR1-et C6 sejtekben

Kísérleteink második részében azt vizsgáltuk, hogy a különféle neurotrophin vegyületek (NGF, BDNF, NT3 és NT4), melyek legtöbbször jelenléte szükséges a szenzoros neuronok fejlődéséhez és funkcionális tulajdonságaik kialakulásához (Snider, 1994, Davies, 1996, Lewin és Barde, 1996), milyen akut hatással bírnak a rekombináns patkány VR1 működésére stabil expressziós rendszerben (VR1/C6 sejtek). Megállapítottuk, hogy a neurotrophinok mindegyike egyaránt képes volt a VR1 jelentős szenzitizációjára, azaz a receptor kapszaicin iránt mutatott érzékenységeinek fokozására. Mivel a neurotrophinok hatásukat eltérő neurotrophin receptorokon keresztül fejtik ki (Kaplan és Miller, 1997), továbbá az összes eddig leírt neurotrophin receptort kimutattuk az általunk használt rendszerben (10. ábra), eredményeink arra utalnak, hogy a VR1-t szenzitizáló hatás a legtöbb neurotrophin receptoron keresztül megvalósulhat.

Természetesen kíváncsiak voltunk arra is, hogy az előforduló neurotrophin receptorok közül mely(ek) vehet(nek) részt a szenzitizáció mechanizmusában. K252a – mely irodalmi adatok szerint a tirozin-kináz (azaz esetünkben a Trk útvonal) gátlószere (Hashimoto, 1988, Knusel és Hefti, 1992) – jelenlétében vizsgálva a neurotrophinok hatását megállapítottuk, hogy az anyag hatásosan és szinte teljes egészében felfüggesztette az összes neurotrophin szenzitizáló hatását. Mivel az irodalomban nem találtunk utalást a K252a anyagnak a p75 neurotrophin receptorhoz kötött jelátviteli útvonalat befolyásoló hatásáról, eredményeink azt valószínűsítik, hogy a neurotrophinok a VR1-t szenzitizáló hatásukat a Trk receptorokon keresztül fejtik ki.

A neurotrophinok különböző affinitást mutatnak Trk receptoraikhoz (Hefti, 1997, Kaplan és Miller, 1997, Huang és Reichardt, 2003); az NGF leginkább a TrkA, a BDNF és az NT4 a TrkB, az NT3 pedig a TrkC receptorhoz kötődik. Mivel kísérleteinkben az összes neurotrophin aktívnak bizonyult a szenzitizáció vonatkozásában, így az összes Trk receptor (azaz a TrkA, -B és -C) közreműködése feltételezhető a folyamatban. Azt is kimutattuk ugyanakkor, hogy a különféle neurotrophin vegyületek eltérő hatékonysággal növelték meg a VR1 kapszaicin iránt mutatott érzékenységet (IV. táblázat): a több sejten kapott mérési eredmények statisztikai vizsgálata egy BDNF>>NGF>NT3>NT4 hatásereőség-sorrendet állapított meg. Habár természetesen további kísérletek szükségeltetnek a neurotrophinok hatásának pontos farmakológiai leírásához (dózis-hatás görbék), úgy tűnik, hogy a VR1/C6 sejten a TrkB (azon belül is a BDNF-ral való aktiválás) jelentheti a legkifejezettebb szenzitizáló hatást. Ezt a feltételezést erősítheti azon megfigyelésünk is, miszerint a Western blot kísérletekben kapott eredmények proteinre normálásával a TrkB receptor expresszióját találtuk a legkifejezettebbnek a VR1/C6 sejtekben (10. ábra A).

A natív VR1-t expresszáló nociceptív szenzoros neuronok leginkább a TrkA és -B neurotrophin receptorokat expresszálják, ugyanakkor nem található meg membránjukban a TrkC receptor (McMahon és mtsai, 1994). Ennek megfelelően az NGF, BDNF vagy NT4 bőrbe való injektálása termális hyperalgesiát vált ki, míg a NT3 hatástalan a folyamatban (Shu és Mendell, 1999a, Shu és mtsai, 1999). Kísérleti eredményeinket összevetve a szenzoros neuronokon tapasztaltakkal megállapítható, hogy az általunk használt heterológ expressziós rendszerben – hasonlóan a natív VR1 esetéhez – mind a TrkA, mind a TrkB receptor aktiválása jelentős szenzitizációt okozott. Emellett rendszerünkben megtalálható a TrkC receptor (mely hiányzik a

DRG nociceptív neuronjaiból), amelynek aktiválódása hasonló pozitív hatással bír a kapszaicin érzékenységre. Úgy tűnik tehát, hogy amennyiben expresszálódik egy adott Trk receptor altípus, a VR1 szenzitizációja kifejlődhet aktiválódása után. Ezt erősítheti azon irodalmi megfigyelés, miszerint a különféle Trk receptorok által beindított jelátviteli útvonalak jelentős konvergenciát mutatnak (Lewin és Barde, 1996).

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Kísérleteinkben három különböző, a patkány rekombináns VR1-et kifejező heterológ expressziós rendszerben vizsgáltuk a kapszaicin és a RTX hatását az intracelluláris sejtfolymatokra. Megállapítottuk, hogy a VR1 mindhárom rendszerben funkcionális Ca^{2+} -permeabilis csatornaként viselkedik.
2. Bebizonyosodott ugyanakkor azt is, hogy a VR1-mediált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -válaszok amplitúdója és kinetikai paraméterei, a VR1 agonisták iránt mutatott érzékenysége, valamint a receptor szubcelluláris lokalizációja jelentős különbségeket mutat a három sejtes rendszerben.
3. A tranziens expressziós rendszerben (VR1eGFP/cos-7 sejtek) a kapszaicin hatékonyabbnak bizonyult Ca^{2+} -tartalmú, mint Ca^{2+} -mentes oldatban, míg az RTX egyforma hatékonysággal fejtette ki hatását. A VR1 agonisták ismételt adagolásakor minkét anyag esetében jelentős tachyphylaxis fejlődött ki. Kimutattuk azt is, hogy ezen rendszerben a VR1 nemcsak a sejtfelszíni, de különféle, intracelluláris Ca^{2+} -raktárakként funkcionáló struktúrák membránjába is beépült.
4. Az indukálható (VR1/CHO sejtek) és a stabil (VR1/C6 sejtek) rendszerekben, extracelluláris kalcium jelenlétében, a kapszaicin nagy amplitúdójú és tachyphylaxist nem mutató, míg az RTX kismértékű intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -válaszokat váltott ki. Kalcium-mentes oldatban kizárólag a kapszaicin volt képes az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelésére (az is csak a VR1/CHO sejtekben), míg az RTX hatástalannak bizonyult.
5. A VR1/C6 stabil expressziós rendszerben az összes vizsgált neurotrophin (NGF, BDNF, NT3, NT4) – habár eltérő mértékben de – jelentősen fokozta a VR1 kapszaicin iránti érzékenységét (szenzitizáció), mely hatás feltehetően a tirozin kináz (Trk) receptorokon keresztül valósult meg.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

- 1) **Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P. M., and Bíró T.** (2003): Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various heterologous expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**:2228-2240. **IF: 5,259**
- 2) **Lázár J., Szabó T., Marincsák R., Kovács L., Blumberg P. M., and Bíró T.** (2003): Sensitization of recombinant vanilloid receptor-1 by various neurotrophic factors. *Life Sci. (in press)* **IF: 1,824**

További in extenso közlemények:

- 3) **Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., and Kovács L.** (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* **102**:55-62 **IF: 2,283**
- 4) **Papp H., Czifra G., Lázár J., Boczán J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L., and Bíró T.** (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **12**: 24-48 **IF: 2,303**

Idézhető előadáskivonatok:

- 1) **Bíró T., Papp H., Lázár J., Czifra G., and Kovács L.** (2000): Distinct roles of protein kinase C isozymes in regulating proliferation and differentiation of HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **115**(3): 548
- 2) **Bíró T., Papp H., Czifra G., Lázár J., and Kovács L.** (2001): Endogenous activation of protein kinase C regulates proliferation and differentiation in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **117**(2): 502
- 3) **Bíró T., Papp H., Bodó E., Lázár J., Czifra G., and Kovács L.** (2002): Modification of protein kinase C alters proliferation and differentiation of immortalized human keratinocytes. *Rev. Oncol.* **4**(1):82
- 4) **Szentandrassy N., Gönczi M., Papp H., Lázár J., Kovács L., Bíró T., and L. Csernoch** (2002): Stretch activated channels and their regulation by protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **119**(3): 746

- 5) **Lázár J.**, Czifra G., Papp H., Marincsák R., Papp L., Kovács L., and Bíró T. (2002): Protein kinase C regulates the sensitivity of recombinant rat vanilloid receptor to capsaicin. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 13
- 6) Papp H., Bodó E., **Lázár J.**, Czifra G., Kovács L., and Bíró T. (2002): Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 348
- 7) Czifra G., Papp H., **Lázár J.**, Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2002): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 278
- 8) Bíró T., Papp H., Bodó E., **Lázár J.**, Czifra G., Kovács L., Gáspár K., Juhász I., and Kovács L. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 195
- 9) Bodó E., Géczy T., **Lázár J.**, Kovács L., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Bíró T. (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 823
- 10) Czifra G., Papp H., **Lázár J.**, Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2003): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Neuromuscular Disord.* **13(7-8)**: 621

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A következő sorokban köszönetemet fejezem ki azoknak, akik valamilyen módon segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében.

Először is **Dr Kovács László** professzor úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának szeretném köszönetemet kifejezni, amiért lehetővé tette számomra, hogy az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában végezzem kísérleteimet, illetve biztosította az ehhez szükséges anyagi háttérrel.

Ezúton szeretném megköszönni **Dr Bíró Tamásnak**, témavezetőmnek munkám során nyújtott útmutatásait, szakmai és baráti tanácsait, valamint türelmét az absztraktok és egyéb értekezések javításához.

Ugyancsak hálával tartozom **Papp Helgának** és **Czifra Gabriellának** tanácsaikért és segítségükért.

Nagyon köszönöm **Dr Vargáné Kis Ibolyának**, a sejttenyésztő laboratórium asszisztensének munkámat segítő tevékenységét és mindenre kiterjedő figyelmét.

Végül, de nem utolsósorban, az **Élettani Intézet valamennyi** külön meg nem nevezett **munkatársának** köszönöm munkám során nyújtott bármilyen segítségét.

IRODALOMJEGYZÉK

- Acheson, A., Barker, P.A., Alderson, R.F., Miller, F.D., Murphy, R.A. (1991): Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* **7**, 265-275
- Ács, G., Bíró, T., Ács, P., Modarres, S., Blumberg, P.M. (1997): Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. *J. Neurosci.* **17**, 5622-5628
- Benham C.D., Davis J.B., Randall A.D., (2002): Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* **42**, 873-888
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S.J., & Yeats, J.C. (1992): Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 544-552
- Bevan, S.J., Docherty, R.J., Wood, J. (ed), (1993): Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the study of pain*. PP27-44, Academic Press, New York
- Bleakman, D., Bronson, J.R., Miller, R.J. (1990): The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol.* **101**, 423-431
- Bíró T., Szabó I., Hunyadi J., Kovács L. and Csernoch L. (1998): Distinct subpopulations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch. Dermatol. Res.* **290**: 270–276
- Boczán, J., Boros, S., Mechler, F., Kovács, L., Bíró, T. (2000): Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* **99**, 96-104
- Botchkarev, V.A., Metz, M., Botchkareva, N.V., Welker, P., Lommatzch, M., Renz, M., Paus, R. (1999): Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as „epitheliotrophins” in murine skin. *Lab. Invest.* **76**, 557-572
- Brismar, T. (1995): Physiology of transformed glial cells. *Glia* **15**: 231–243
- Caterina, J.M., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., 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-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306-313
- Caterina, J.M., Julius, D. (2001): The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.* **24**, 487-517

- Cholewinski, A., Burgess, G.M., Bevan, S. (1993): The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **55**, 1015-1023
- Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Schelton, D.L., Levinson, A.D., Philips, H.S. (1994): Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001-1011
- Davies, A.M. (1996): The neurotrophic hypothesis: where does it stand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**, 389-394
- Di Marzo V., Blumberg P.M. and Szállási Á. (2002): Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 372–379
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V., Hannun Y. (1994): Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265**, 1569-1599
- Docherty, R.J., Robertson, B., Bevan, S. (1991): Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience* **40**, 513-521
- Docherty, R.J., Yeats, J.C., Bevan, S., Boddeke, H.W. (1996): Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflügers Arch.* **431**, 828-837
- Donovan, M.J., Hahn, R., Tessarollo, L., Hempstead, B.L. (1996): Identification of the essential nonneural function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat. Genet.* **14**, 210-213
- Eun S.Y., Jung S.J., Park Y.K., Kwak J., Kim S.J. and Kim J. (2001): Effects of capsaicin on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 1114–1120
- Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J.M., Ferrer-Montiel, A. (2000): Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 32552-32558
- García-Hirschfeld J., López-Briones L.G., Belmonte C. and Valdeolmillos M. (1995): Intracellular free calcium responses to protons and capsaicin in cultured trigeminal neurons. *Neuroscience* **67**: 235–243
- Geppetti, P., Holzer, P. (1996): *Neurogenic inflammation*. Boca Raton, CRC Press
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450

- Hashimoto, S. (1988): K-252a, a potent protein kinase inhibitor, blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth and changes in the phosphorylation of proteins in PC12h cells. *J. Cell Biol.* **107**, 1531-1539
- Hefti, F. (1997): Pharmacology of the neurotrophic factors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 239-267
- Hergenhahn M., Adolph W. and Hecker E. (1975): Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. *Tetrahedron Lett.* **19**: 1595–1598
- Holzer, P. (1988): Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739-768
- Holzer, P. (1991): Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* **43**, 143-200
- Huang, E.J. és Reichardt, L.F. (2003): Trk receptors: roles in neuronal signal transduction *Annu. Rev. Bioshem.* **72**, 609-42
- Huber, L.J, Hempstead, B., Donovan, M.J. (1996): Neurotrophins and neurotrophin receptors in human fetal kidney. *Dev. Biol.* **179**, 369-381
- Hutton, L.A., deVellis, J., Perez-Polo, J.R. (1992): Expression of p75NGFR TrkA, and TrkB mRNA in rat C6 glioma and type I astrocyte cultures. *J. Neurosci. Res.* **32**, 375-383
- Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., Oh, U. (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6155-6160
- Hwang, S.W. és Oh, U. (2002): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Current Opinion in Pharmacology* **2**, 235-242
- Jahnel R., Dreger M., Gillen C., Bender O., Kurreck J. and Hucho F.(2001): Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5489–5496
- James, I.F., Ninkina, N.N., Wood, J. (1993): The capsaicin receptor. In *Capsaicin in the study of pain*. Wood J (ed), PP83-04, Academic Press, New York.
- Jancsó, N. (1960): Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull Millard Fillmore Hosp.* **7**, 53-77
- Jancsó, N. (1968): Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying functional pain receptors. In *Pharmacology of pain*. Lim RKS (ed), PP33-55, Pergamon Press, Oxford.

- Jancsó, G., Karcusú, S., Király, E., Szebeni, A., Tóth, L., Bácsy, E., Joó, F., Párducz, A. (1984): Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res.* **295**, 211-216
- Jerman J.C., Brough S.J., Prinjha R., Harries M.H., Davis J.B., Smart D. (2000): Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 916–922
- Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius, D. (2000): Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 8134-8139
- Kaplan, D.R., Miller, F.D. (1997): Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 213-221
- Kedei, N., Szabó, T., Lile J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., Blumberg, P.M. (2001): Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 28613-28619
- Kirstein, M. és Farinas, I. (2002): Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1787-1802
- Knusel, B., Hefti, F. (1992): K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J. Neurochem.* **59**, 1987-1996
- Koplas, P.A., Rosenberg, R.L. and Oxford, G.D. (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **17**: 3525–3537
- Kwak, J.Y., Jung, J.Y., Hwang, S.W., Lee, W.T., & Oh, U. (1998): A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience* **86**, 619-626
- Kwak, J., Wang, M.H., Hwang, S.W., Kim, T.Y., Lee, S.Y., Oh, U. (2000): Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J. Neurosci.* **20**, 8298-8304
- Laemmli, UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lewin, G.R., Ritter, A.M., Mendell, L.M. (1993): Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci.* **13**, 2136-2148
- Lewin, G.R., Rueff, A., Mendell, L.M. (1994): Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1903-1912
- Lewin, G.R., Barde, Y-A. (1996): Physiology of the neurotrophins. *Annu.Rev. Neurosci.* **19**, 289-317

- Liu, L., and Simon, S.A. (1996): Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca^{2+} dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* **75**: 1503–1514
- Liu, L., and Simon, S. (1998): The influence of removing extracellular Ca^{2+} in the tachyphylaxis responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res.* **809**: 246–262
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Tramontana, M., Amann, R., Giuliani, S. and Santicioli, P. (1990): Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral endings of primary sensory neurons. *Neuroscience* **37**: 531–539
- Marshall, I.C., Owen, D.E., Cripps, T.V., Davis, J.B., McNulty, S., Smart, D. (2003): Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 172–176
- Mazurek, N., Weskamp, G., Erne, P., Otten, U. (1986): Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. *FEBS Lett.* **198**, 315–320
- McMahon, S.B., Armanini, M.P., Ling, L.H., Phillips, H.S. (1994): Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* **12**, 1161–1171
- Oh, U., Hwang, S.W., Kim, D. (1996): Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **16**, 1659–1667
- Oláh, Z., Lehel, C., Jakab, G. and Anderson, W.B. (1994): A cloning and epsilon-epitope-tagging insert for the expression of polymerase chain reaction-generated cDNA fragments in Escherichia coli and mammalian cells. *Anal. Biochem.* **221**: 94–102
- Oláh, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R.D., Caudle, R.M., Blumberg, P.M., Iadarola M.J. (2001a): Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **276**:11021–11030
- Oláh, Z., Karai, L. and Iadarola, M.J. (2001b): Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *J. Biol. Chem.* **276**: 31163–31170
- Papp, H., Czifra, G., Lázár, J., Boczán, J., Gönczi, M., Csernoch, L. et al. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **12**: 1–14
- Petersen, M., Pierau, F.-K., Weyrich, M. (1987): The influence of capsaicin on membrane currents in dorsal root ganglion neurones of guinea-pig and chicken. *Pflügers Arch.* **409**, 403–410

- Premkumar, L.S. (2001): Interaction between vanilloid receptors and purinergic metabotropic receptors: pain perception and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6537-6539.
- Savidge, J.R., Ranasinghe, S.P. and Rang, H.P. (2001): Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1. *Neuroscience* **102**: 177–184
- Shin, J.S., Wang, M.H., Hwang, S.W., Cho, H., Cho, S.Y., Kwon, M.J. (2001): Differences in sensitivity of vanilloid receptor 1 transfected to human embryonic kidney cells and capsaicin-activated channels in cultured rat dorsal root ganglion neurons to capsaicin receptor agonists. *Neurosci. Lett.* **299**: 135–139
- Shu, X.Q., Mendell, L.M. (1999a): Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7693-7696
- Shu, X.Q., Mendell, L.M. (1999b): Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci. Lett.* **274**, 159-162
- Shu, X.Q., Llinas, A., és Mendell, L.M. (1999): Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study *Pain* **80**, 463-470
- Shu, X.Q., Mendell, L.M. (2001): Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J Neurophysiol.* **86**, 2931-2938
- Snider, W.D. (1994): Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-638
- Szállási, Á. Blumberg, P.M. (1989): Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* **30**: 515–520
- Szállási, Á. Blumberg, P.M. (1999): Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **51**: 159–211
- Szállási, Á., Szabó, T., Bíró, T., Modarres, S., Blumberg, P.M., Krause, J.E. (1999a): Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on at DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 428–434
- Szállási, Á., Blumberg, P.M., Annicelli, L.L., Krause, J.E. and Cortright, D.N. (1999b): The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol. Pharmacol.* **56**: 581–587
- Szolcsányi, J. (1977): A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* **73**, 251-259

- Szolcsányi, J. (1982): Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of experimental pharmacology*. Milton AS (ed) Springer. (Berlin) **60**, 437-478
- Thastrup, O. (1990): Role of Ca^{2+} -ATPases in regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions* **29**: 8–15
- Thastrup, O., Föder, B. and Scharff, O. (1987): The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 654–660
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius D. (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-543
- Tominaga, M., Wada, M., Masu, M. (2001): Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 6951-6956
- Tóth A., Kedei N., Szabó T., Wang Y. and Blumberg P.M. (2002): Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 777–782
- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A. (2001): Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* **534**, 813-825
- Verkhatsky, A. Kettenmann, H. (1996): Calcium signaling in glial cells. *Trends Neurosci.* **19**: 346–352
- Welch, J.M., Simon, S.A., Reinhart, P.H. (2000): The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 13889-13894.
- Weskamp, G. és Otten, U. (1987): An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J. Neurochem.* **48**, 1779-1786
- Winston, J., Toma, H., Shenoy, M., Pasricha, P.J. (2001): Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain* **89**, 181-186
- Winter, J., Forbes, C., Sternberg, J., Lindsay, R.M. (1988): Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to capsaicin. *Neuron* **1**, 973-981
- Winter, J., Dray, A., Wood, J.N., Yeats, J.C., Bevan, S. (1990): Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* **520**, 131-140

- Wisnoskey B.J., Sinkins W.G. and Schilling W.P. (2003): Activation of vanilloid receptor type I (TRPV1 channel) in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca^{2+} entry. *Biochem. J.* **372**: 517–528
- Wood, J.N., Winter, J., James, I.F., Rang, H.P., Yeats, J., Bevan, S. (1988): Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* **8**, 3208-3220
- Woolf, C.J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., Poole, S. (1997): Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 417-424