

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A TRPV1 ioncsatorna aktivitását befolyásoló egyes regulátorok vizsgálata érzőneuronokon

Dr. Jenes Ágnes

Témavezetők: Dr. Nagy István, Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
1.1. Tranziens receptor potenciál csatornák	5
1.2. Primer érzőneuronok	18
1.3. Célkitűzések	25
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
2.1. Kísérleti állatok	26
2.2. Primer érzőneuronok tenyésztése	26
2.3. Alkalmazott anyagok	26
2.4. RNS izolálása	27
2.5. cDNS átírás és polimeráz láncreakció (RT-PCR)	27
2.6. Immuncitokémia	28
2.7. Western blot	29
2.8. Anandamidfelszabadulás vizsgálata	30
2.9. Az anandamid mennyiségi meghatározása	30
2.10. Kobalt akkumuláció vizsgálata	32
2.11. Fluoreszcens Ca^{2+} -koncentrációmérés	33
2.12. Árammérés	34
2.13. Statisztikai módszerek	35
3. EREDMÉNYEK	36
3.1. Anandamid termelődik primer érzőneuronokban	36
3.2. A NAPE stimulálja az elsődleges érzőneuronokat	40
3.3. A patkány hátsógyöki gangliontenyészet neuronjainak egy-egy csoportja egyszerre fejez ki TRPV1-et és anandamidszintézisben résztvevő enzimeket	45
3.4. A TRPV1b kifejeződésének szerepe megkérdőjelezhető az érzékenység fokozásában gyulladásos körülmények között	46
4. MEGBESZÉLÉS	51
4.1. Anandamidtermelő enzimek jelenléte és működése elsődleges érzőneuronokban	51
4.2. Az endogén anandamid hatásai	53
4.3. A patkány TRPV1b splice variánsa	55
4.4. Gyulladásos mediátorok okozta változások	56
5. ÖSSZEFOGLALÁS	58
6. ABSTRACT	59
7. IRODALOMJEGYZÉK	60
8. TÁRGYSZAVAK	83
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87
10. FÜGGELÉK	88

Rövidítések jegyzéke

ABHd4: α/β -hidroláz 4

AM: acetoximetilészter

ANOVA: variancia analízis (analysis of variance)

ATP: adenzin-trifoszfát

$[Ca^{2+}]_i$: intracelluláris szabad kalciumionkoncentráció

CaMKII: kalmodulinfüggő protein kináz II

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CB1: kannabinoid receptor-1

cDNS: dezoxiribonukleinsav másolat (komplementer dezoxiribonukleinsav)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNS: dezoxiribonukleinsav

DRG: hátsógyöki ganglion (dorsal root ganglion)

EGTA: etilénlikol-tetraecetsav

GAPDH: gliceralehid-3-foszfát dehidrogenáz

GDE1: glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

Inpp5: inozitol 5' foszfatáz

KO: génhiányos, génkiütött (knockout)

mRNS: hírvivő ribonukleinsav (messenger RNS)

NAPE: *N*-acilfoszfatidiletanolamin

NAPE-PLD: *N*-acilfoszfatidiletanolamin foszfolipáz D

NGF: idegnövekedési faktor (nerve growth factor)

PAM: point accepted mutation (evolúciós távolság mértékegysége: 1 PAM az az idő, ami alatt két kezdetben azonos szekvencia között 1% eltérés alakul ki)

PBS: foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)

PCR: polimeráz láncreakció

PGE₂: prosztaglandin E₂

PIP₂: foszfoinozitol-bisz-foszfát

PKA: protein kináz A

PKC: protein kináz C

PLC: foszfolipáz C

PTPn22: protein tirozin foszfatáz nem-receptor típus 22

RT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció

RNS: ribonukleinsav

sPLAG1b: 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂

TRIS: tris(hidroximetil)aminometán

TRP: tranziens receptor potenciál

TRPA: tranziens receptor potenciál ankirin alcsalád

TRPA1: tranziens receptor potenciál ankirin transzmembrán protein 1

TRPC: tranziens receptor potenciál klasszikus / kanonikus alcsalád

TRPM: tranziens receptor potenciál melasztatin alcsalád

TRPML: tranziens receptor potenciál mukolipin alcsalád

TRPN: tranziens receptor potenciál nem mechanoreceptor alcsalád

TRPP: tranziens receptor potenciál policisztin alcsalád

TRPV: tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád

TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1 / vanilloid receptor 1 / kapszaicin receptor

VR1: vanilloid receptor 1 (=TRPV1)

WB: western blot

WT: vad típusú (wild type)

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

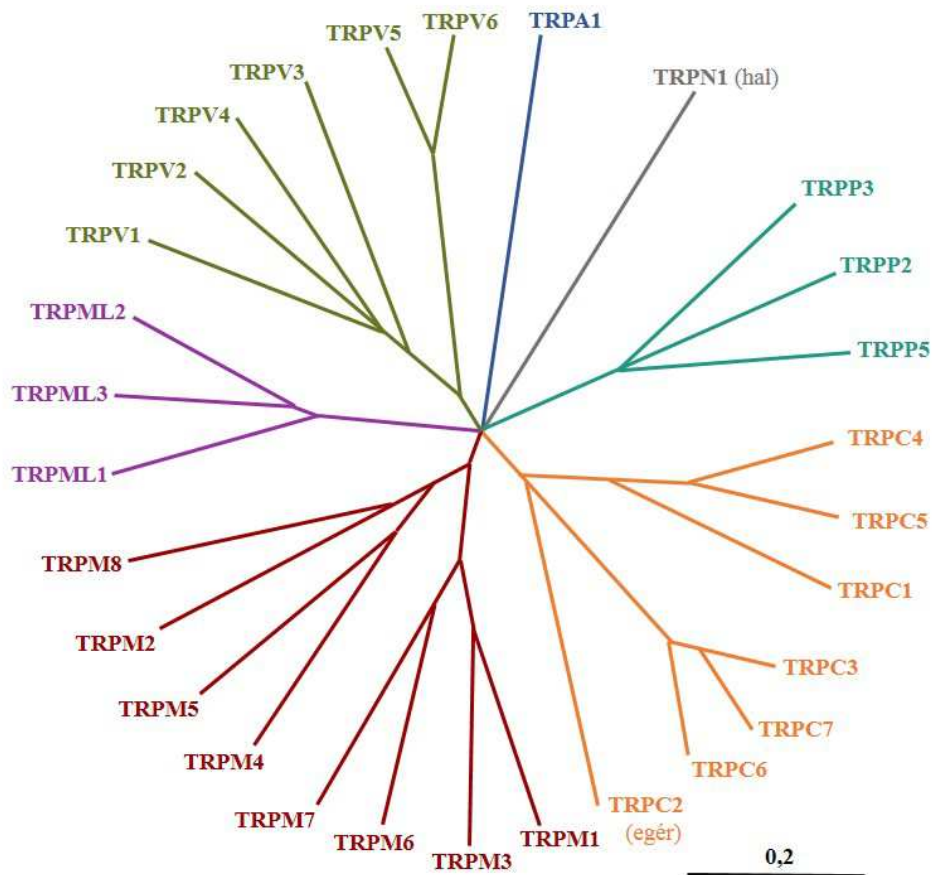
1.1. Tranziens receptor potenciál csatornák

A tranziens receptorpotenciál (TRP) gén család integráns membránfehérjéket kódol, melyek ioncsatornaként működnek. A fehérjék egy mutáns ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) retinájában leírt fényérzékeny receptorral való szekvencia és szerkezeti hasonlóság alapján kerülnek a TRP családba, így többségüknek a tranziens receptorpotenciálhoz valójában nincs köze, csupán a nevében (Cosens és Manning, 1969). A TRP csatornák az élesztőktől a gerincesekig a legtöbb fajban, szinte minden szövetben megtalálhatóak, ingerelhető és nem ingerelhető sejteken egyaránt. Szerteágazó élettani folyamatokban vesznek részt, különféle ingerek (feromonok, ízek, hőmérséklet, fájdalom) érzékelésétől kezdve, az izomkontrakciókon keresztül az ionháztartás szabályozásáig.

A TRP családon belül az alábbi alcsaládokat különíthetjük el: klasszikus vagy kanonikus (TRPC), vanilloid (TRPV), melasztatin (TRPM), policisztin (TRPP), mukolipin (TRPML), ankirin (TRPA), melyek tagjai emberben is előfordulnak, valamint TRPN (NOMPC-szerű) alcsalád, melynek tagjait eddig csak gerinctelenekben és halakban írták le (1. ábra).

A legtöbb TRP nem-szelektív kationcsatorna, csak néhány jellemezhető kifejezetten magas kalciumszelektivitással (pl. TRPV5 és TRPV6; Owsianik és munkatársai 2006), egy-kettő pedig még az erősen hidrált Mg^{2+} ionokat is átengedi (pl. TRPM7; Schmitz és munkatársai 2003). Kapuzásuk is igen változatos, endogén és exogén ligandok kötése, feszültség vagy hőmérsékletváltozás is nyithatja őket. Az aktivált TRP csatorna depolarizálja a sejtmembránt, melynek következtében feszültségfüggő ioncsatornák nyílnak, az intracelluláris kalciumkoncentráció változását eredményezve. A TRP nemcsak a plazmamembránban, hanem a magmembrán és a mitokondrium kivételével az összes többi sejtalkotó membránján is működik, így az endoszómák, lizoszómák és egyéb sejten belüli organellek funkcióját befolyásolja (Dong és munkatársai 2010).

TRP gének mutációinak szerepe, megváltozott mennyiségű vagy funkciójú fehérjék jelenléte, TRP ioncsatornák módosult aktivitása gyanítható különböző patológiás állapotok, többek között neurodegeneratív betegségek (Selvaraj és munkatársai 2012, Peduslo és munkatársai 2009), vázrendszeri diszpláziák (Rock és munkatársai 2008, Auer-Grumbach és munkatársai 2010), vesebetegségek (Grantham 1993, Winn és munkatársai 2005) és fájdalom szindrómák (Kremeyer és munkatársai 2010) kialakításában, a TRP kutatások ezáltal lehetőséget nyújthatnak ezek kezelésének megoldására.



1. ábra. A TRP csatornák humán filogenetikai fája. A szekvenciák homológia analízise alapján a TRP csatornák hét alcsaládot alkotnak. Mivel emberben a *TRPC2* pszeudogén, a TRPN csatornák pedig emlősökben nincsenek jelen, a különböző színekkel jelölt alcsaládok közötti kapcsolatok bemutatásához egér *TRPC2* (ENSMUSP00000102562) és hal *TRPN1* (ENSDARP00000093955) került feltüntetésre. Az evolúciós távolságot jelölő skála 0,2 PAM egység. (Forrás: Nilius és Owsianik, 2011)

1.1.1. TRPV1

A kapszaicin receptora, melyet azonosítói vanilloid receptor 1-nek neveztek el (Caterina és munkatársai, 1997), az International Union of Pharmacology (IUPHAR) nevezéktana szerint – a TRP családdal való szerkezeti rokonság felismerése (Clapham és munkatársai 2001, 2003) alapján – ma tranziens receptor potenciál vanilloid 1 névre hallgat.

Elektrofiziológiai és biofizikai vizsgálatok igazolták, hogy a TRPV1 egy nem-szelektív kationcsatorna, amely a különböző kationokra az 1. táblázatban összefoglalt permeabilitási értékeket mutatja (1. táblázat).

Az adatok közül kiemelendő, hogy a TRPV1 igen jelentős permeabilitást mutat Ca^{2+} -ra, ami egyrészt a kapszaicinnel kiváltott válaszok kísérletes detektálása, másrészt a válaszok celluláris hatásai miatt fontos.

ion	a TRPV1 relatív permeabilitása
Na^+	1
K^+	~ 1
Cs^+	~ 1
Mg^{2+}	4,99
Ca^{2+}	9,6

1. táblázat. A TRPV1 ioncsatorna Na^+ -permeabilitáshoz viszonyított relatív permeabilitása az egyes kationokra. Monovalens kationok között a csatorna „nem válogat”, divalensekre a permeabilitása nagyobb. Kalciumpermeabilitása jóval meghaladja a nem-specifikus kationcsatornák átlagos kalciumpermeabilitását, csak néhány olyat ismerünk (NMDA típusú glutamátreceptor, $\alpha 7$ nikotin típusú acetilkolinreceptor), amelynek még ennél is nagyobb. (Caterina és munkatársai 1997 alapján)

A TRPV1-et endogén és exogén fizikai és kémiai stimulusok széles spektruma képes stimulálni. Exogén ligandja, a kapszaicin után megtalálták első endogén ligandját, az anandamidot is (Caterina és munkatársai 1997), további fontos endogén aktivátorai a hőmérséklet emelkedése, és a pH acidotikussá válása.

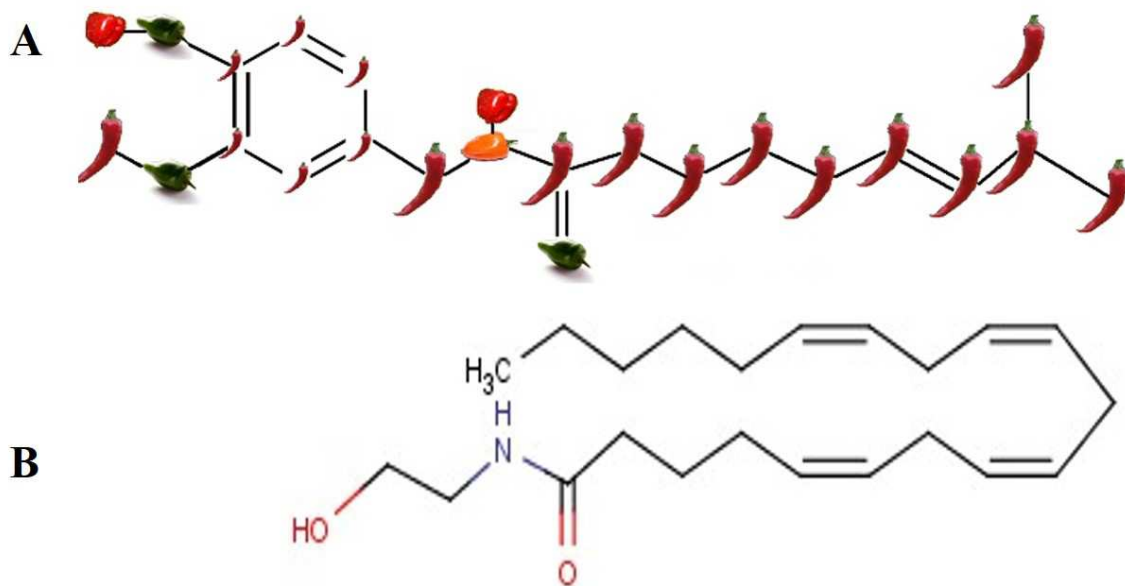
A TRPV1 aktiválásának következménye a csatorna nyitvatartási valószínűségének fokozása, mely kationok beáramlását, a membrán depolarizációját eredményezi (Wood és munkatársai 1988, Dray 1992, Caterina és munkatársai 1997). Ingerelhető sejtek – többek között a neuronok – membránján való kifejeződés esetén mindez együtt jár akciós potenciálok generálásával és továbbításával (Caterina és munkatársai 1997).

1.1.1.1. A TRPV1 aktiválása

Polimodális fájdalomérzőként a TRPV1 számos fájdalmat keltő ligand, protonok és 43°C feletti hőmérséklet hatását integrálja (Nagy és munkatársai 2004).

1.1.1.1.1. Exogén ligandok

A TRPV1 sokféle exogén – különösen növényi eredetű – liganddal aktiválható. Az első ismert, és máig az egyik leggyakrabban alkalmazott agonistája az erőspaprika csípősségeért felelős kapszaicin (transz-8-metil-N-vanillil-6-nonenamid, 2. ábra; Caterina és munkatársai 1997). A kapszaicinhez hasonlóan egyéb vanilloidokra is reagál, többek között a feketebors (*Piper nigrum*) csípősségét adó piperinre (McNamara és munkatársai 2005), egy marokkói kutyatejféleiben (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxinra (Szállási és munkatársai 1999), a gyömbérből (*Zingiber officinale*) kivonható gingerolra (Iwasaki és munkatársai 2006) vagy az eugenolra (Yang és munkatársai 2012), ami a szegfűszegben (*Eugenia caryophyllata*), a fahéjban (*Cinnamomum zeylanicum*), és a bazsalikomban (*Ocimum gratissimum*) is megtalálható.



2. ábra. A kapszaicin (A) és az anandamid (B) szerkezeti képlete. A kapszaicin képletében a szénatomot piros fűszerpaprika helyettesíti, az oxigénatom helyén zöldpaprika áll, a nitrogénatomot narancssárga paprika jelöli, végül az oxigénhez vagy a nitrogénhez kötött hidrogénatom jele a piros kaliforniai paprika. (Forrás: Dan Tandberg MD [A], Devane és munkatársai 1992 [B])

Nemcsak vanilloidok, hanem egyéb növényi hatóanyagok is képesek a TRPV1 aktiválására, más kötőhelyeken. Így például a fokhagymában (*Allium sativum*) lévő allicin (Macpherson és munkatársai 2005), a mustárban és a wasabiban lévő allil-izotiocianát is hat – a TRPA1 mellett – a TRPV1-re (Everaerts és munkatársai 2011), sőt, a TRPV1 reagál a kámforra (*Cinnamomum camphora*) kérgéből kivont, jellegzetes illatú kámforra (Xu és munkatársai 2005, Moqrich és munkatársai 2005), amely általi aktiválás után a deszenzitizáció (1.2.1. alfejezet, 4. bekezdés) nagyobb mértékű, mint a kapszaicin általi aktiválást követően (Xu és munkatársai 2005).

Az etanol 0,1% és 3% közötti koncentrációban fokozza a TRPV1 egyéb aktivátorai (kapszaicin, protonok, hő) által kiváltott válaszait (Trevisani és munkatársai 2002), az ioncsatorna hőküszöbének csökkentésével. A TRPV1-et kifejező érzőneuronok alkohol hatására így akár testhőmérsékleten is aktiválódnak, ami magyarázza, miért okoz égő érzést a magas alkoholtartalmú italok fogyasztása, és miért hiányzik ez az égő érzés, amikor ugyanezeket az italokat jéggel fogyasztják.

A természetes, főként növényi hatóanyagokon kívül számtalan mesterséges ligand használatos a TRPV1 farmakológiai befolyásolására. Közülük néhány több TRP csatornát is stimulál, pl. a 2-aminoetil-difenilborinát a TRPV1-et, TRPV2-t és TRPV3-at is (Chung és munkatársai 2004), mások viszonylag szelektívek a TRPV1-re, pl. az olvanil (Iida és munkatársai 2003).

1.1.1.1.2. Protonok

Az extracelluláris protonkoncentráció növekedése csökkenti a TRPV1 receptor hőküszöbét (Tominaga és munkatársai, 1998), de a TRPV1 protonérzékenysége önmagában is elég lehet a csatorna megnyílásához (Jordt és munkatársai, 2000). A TRPV1 fiziológiás pH-n 43°C fölötti hőmérsékleten aktiválódik csak, míg 6 alatti pH-n már szobahőmérsékleten is.

Érdekes módon, nemcsak a savas, hanem az alkalikus pH is aktiválja a csatornát, de a protonkoncentráció csökkenése az intracelluláris oldalon hat (Dhaka és munkatársai 2009). Ezek alapján feltételezhető, hogy a TRPV1 fontos szerepet játszik mind a sejten kívüli, mind a sejten belüli pH érzékelésében és fenntartásában.

1.1.1.1.3. Hőmérséklet

A TRP csatornák többsége érzékeny különféle fizikai stimulusokra, mint például a hőmérséklet vagy a nyomás változására (Nilius és Appendino 2011). A TRPV1 volt az első molekula, amelyről leírták, hogy specifikusan a hőmérséklet növekedésére válaszol (Caterina és munkatársai 1997). Úgy tűnik, hogy a TRPV1 *in vivo* tónusosan aktív, és molekuláris hőmérőként működik (Gavva és munkatársai 2007). Sőt, egyes feltételezések szerint a

TRPV1 elsődleges feladata az állandó testhőmérséklet biztosítása (Gavva és munkatársai 2007). Ez az elmélet mindenesetre magyarázza, hogy miért csökkenti a kapszaicin vagy a reziniferatoxin a testhőmérsékletet, és nem sok reményt hagy arra, hogy hipertermiát nem okozó antagonistát találjunk (Holzer 2008).

A TRPV1 hőszenzora alkalmat nyújt a receptornak a fájdalmas hőingerek detektálására (Liu és munkatársai 2003). 45 °C körüli hőmérséklet elérése már kifejezett emelkedést idéz elő a TRPV1-et kifejező sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjában (Caterina és munkatársai 1997), ugyanis az emelt hőmérséklet nyújtja a TRPV1 csatorna nyitvatartási idejét (Trevisani és munkatársai 2002).

Elgondolkodtató, hogy hogyan képes a TRPV1 egyszerre biztosítani az állandó (37 °C körüli) testhőmérsékletet, és közben felelni a fájdalmasan magas (43 °C feletti) hőre. Egyelőre keveset tudunk a mechanizmusról, szóba jöhetnek különböző splice variánsok, poszt-transzlációs módosítások (specifikus foszforilációs helyek), de akár a TRPV1 kapuzási tulajdonságait szabályozó szövet-specifikus mediátorok is.

1.1.1.1.4. Feszültség

A TRP csatornák jelentős része feszültségfüggést mutat, különösen azok, melyek érzőműködésekben játszanak szerepet (Nilius és munkatársai 2005, Voets és munkatársai 2004). A TRPV1-et kezdetben nem tartották feszültségfüggőnek (Caterina és munkatársai 1997), mivel a feszültségfüggő káliumcsatornákra jellemző, a feszültséget érzékelő pozitív töltésű lizin- és arginingazdag molekulareszek a TRPV1 S4 transzmembrán szegmensén nincsenek jelen. Később arra utaló eredmények születtek, hogy a karboxi-terminális (1.1.1.2. alfejezet) hőmérsékletet és feszültséget is érzékel (Vlachova és munkatársai 2003), de a hőérzékeny régió és a feszültségszenzor a molekula különböző részein helyezkedik el (Brauchi és munkatársai 2006).

1.1.1.1.5. Endogén ligandok

A TRPV1-re ható endogén ligandoknak két fő csoportját különböztetjük meg. Az egyik csoportba azok az endogén vegyületek tartoznak, melyek az exogén ligandokhoz hasonlóan a TRPV1-hez kötődve növelik a csatorna nyitvatartási valószínűségét. Az endogén TRPV1 aktivátorok másik csoportját azok az intracelluláris jelátvivő molekulák alkotják, amelyek főként bizonyos aminosavak foszforilálásával más TRPV1-et aktiváló ligandok hatékonyságát fokozzák, azaz szenzitizálják a receptort. A két csoport persze nem teljesen átfedésmentes, az anandamida például korábban ligandként tekintettek, ma egyre több adat utal intracelluláris jelátvivő szerepére.

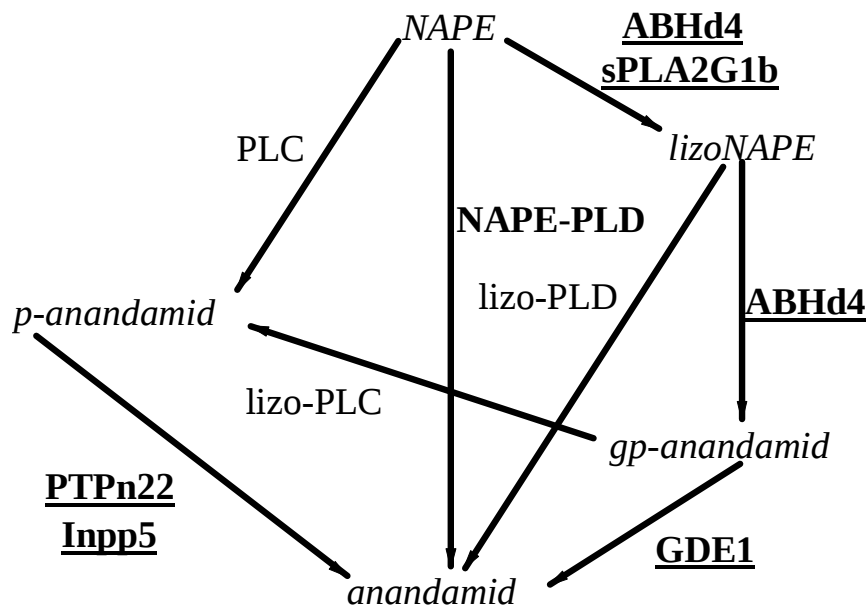
A szervezetben termelődő endogén ligandok közül az endokannabinoid anandamidot (*N*-arachidonoil-etanolamin, AEA, 2. ábra) írták le először (Caterina és munkatársai 1997), de TRPV1-et stimuláló hatással bír az oleol-etanolamin (Ahern 2003), az *N*-arachidonoil-dopamin (NADA; Huang és munkatársai 2002, Tóth és munkatársai 2003), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE; Hwang és munkatársai 2000), vagy a lizofoszfatidsav (LPA; Nieto-Posadas és munkatársai 2011) is.

Anandamid

Az anandamid (2. ábra) egy endogén lipid (Devane és munkatársai 1992), melynek élettani és patológiás folyamatok széles spektrumában tulajdonítunk szerepet, részben az idegrendszerben, részben azon kívül (Di Marzo és Petrosino 2007, Ligresti és munkatársai 2009, Bisogno és Di Marzo 2010). Az anandamid több különböző fehérjével is kölcsönhatásba lép (Goodfellow és Glass 2009), ám a hatásainak többségét a CB1 és a TRPV1 receptorok közvetítik (Matsuda és munkatársai 1990, Devane és munkatársai 1992, Caterina és munkatársai 1997, Zygmunt és munkatársai 1999, Di Marzo és Petrosino 2007, Bisogno és Di Marzo 2010). Szerteágazó hatásai közül kiemelendő a nociceptív primer érzőneuronok működésének szabályozása, mely szintén a CB1 és a TRPV1 receptorok közvetítésével valósul meg (Ligresti és munkatársai 2009, Di Marzo és De Petrocellis 2010). Az anandamid valószínűleg ugyanahhoz a kötőhelyhez kapcsolódva fejti ki hatásait, mint a kapszaicin (Jordt és Julius 2002).

Különféle szövetek egyes sejtípusai – köztük a primer érzőneuronok – anandamidot termelnek (Di Marzo és munkatársai 1994, 1996, Carrier és munkatársai 2004, van der Stelt és munkatársai 2005, Vellani és munkatársai 2008). Az elsődleges érzőneuronokban anandamid termelését indukálja a TRPV1 aktiválás következményeként megemelkedő intracelluláris kalciumszint (Caterina és munkatársai 1997), az aktivált protein kináz A és az aktivált protein kináz C egyaránt (Vellani és munkatársai 2001, van der Stelt és munkatársai 2005). Anandamidtermelés több lépésben, több különböző enzimátikus útvonalon létrejöhet (3. ábra), melyek egy része Ca^{2+} -ot igényel, más része Ca^{2+} -tól függetlenül is működik (Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004, Liu és munkatársai 2006, Simon és Cravatt 2008). Az anandamid termelésének sebességmeghatározó lépése a 20:4-NAPE előállítása a kalciumfüggő N-aciltranszferáz által (Cadas és munkatársai 1996, Di Marzo és munkatársai 1994). A 20:4-NAPE ezután különböző anandamidszintetizáló enzimek közös szubsztrátja. Legalább hat olyan enzimet ismerünk, mely közreműködhet az anandamid szintézisében (Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004, Liu és munkatársai

2006, 2008, Simon és Cravatt 2008), közülük legismertebb az *N*-acilfoszfatidiletanolamin foszfolipáz D (NAPE-PLD, 3. ábra), mely az egyetlen ismert Ca^{2+} -függő anandamidtermelő enzim (Okamoto és munkatársai 2004, Ueda és munkatársai 2013). Tudjuk, hogy a primer érzőneuronok egy csoportja rendelkezik NAPE-PLD-vel (Nagy és munkatársai 2009). A primer érzőneuronok azonban képesek anandamidtermelésre extracelluláris Ca^{2+} hiányában is (Vellani és munkatársai 2008), ami arra utal, hogy a NAPE-PLD által katalizált, Ca^{2+} -függő útvonalon kívül léteznie kell legalább egy Ca^{2+} -független útvonalnak is ezekben a sejtekben.



3. ábra. Az anandamidszintézis fontosabb ismert útvonalainak vázlata. Eddig hat anandamidtermelésben résztvevő enzimet azonosítottak (félkövér betűk). Míg a NAPE-PLD csak Ca^{2+} jelenlétében termel anandamidot, addig a többi enzim (aláhúzott betűk) – melyek kifejeződését jelen munkában vizsgáltuk – Ca^{2+} -tól függetlenül működik. A szubsztrátokat dőlt betűk jelölik. Rövidítések: NAPE-PLD: *N*-acilfoszfatidiletanolamin foszfolipáz D, GDE1: glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1, ABHd4: α/β -hidroláz 4, PTPn22: protein tirozin foszfatáz nem-receptor típus 22, sPLA2G1b: 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂, Inpp5: inozitol 5' foszfatáz, NAPE: *N*-acilfoszfatidiletanolamin, PLC: foszfolipáz C, p-anandamid: foszfo-anandamid, gp-anandamid: glicerofoszfo-anandamid.

Az anandamid az integráns membránfehérje zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH) aktivitásának köszönhetően gyorsan lebomlik (Basavarajappa 2007, Di Marzo 2008), ezáltal hatása korlátozott. Az anandamidhatás nyújtására szelektív FAAH

inhibitorok alkalmazásával történnek kísérletek (Cravatt és Lichtman 2003, Pattipati és munkatársai 2010, Starowicz és munkatársai 2013).

Foszfolipidek

A membrán foszfolipidjei közvetlenül aktiválhatják a TRPV1-et (Karashima és munkatársai 2008, Kim és munkatársai 2008, Stein és munkatársai 2006). Kiemelt jelentőségű a PIP_2 , mely a sejtmembrán legnagyobb mennyiségben előforduló savas foszfolipidje. A membrán PIP_2 szintje gyorsan változhat a különböző PLC izoformák és foszfatidilinozitol kinázok/foszfatazok hatására, módosítva ezzel a TRPV1 aktivitását is (Voets és Nilius 2007). A TRPV1-hez történő közvetlen kötődésen (Prescott és Julius 2003, Chuang és munkatársai 2001, Brauchi és munkatársai 2007) kívül a PIP_2 foszfolipáz C általi hasításával keletkező DAG (Woo és munkatársai 2008), és IP_3 (Ahern és munkatársai 2005) is befolyásolja a csatorna működését, valamint számos membrán-kötött enzim szintén befolyásolható a PIP_2 szinttel, így közvetve, vagy közvetlenül hat a TRPV1 működésére (Kim és munkatársai 2008). Érdekes módon, maga a hatás még nem tisztázódott, egyes eredmények a TRPV1 aktivitás csökkenését (Chuang és munkatársai 2001), mások épp annak a fokozódását (Liu és munkatársai 2005, Stein és munkatársai 2006) támasztják alá PIP_2 jelenlétében.

Intracelluláris jelátvivők

Az intracelluláris jelátvivő anyagokkal való ingerelhetőség miatt a TRPV1 aktivitása összefügghet más – különösen tirozin kináz aktivitású, valamint G-fehérjéhez kötött – receptorok aktivitásának változásával (Nagy és munkatársai 2004). Az aktív G-fehérjéhez kötött receptorok csökkentik a TRPV1 hőküszöbét, és érzékenyítik más ligandokra (Tominaga és munkatársai 2001, Vellani és munkatársai 2001, Cesare és McNaughton 1996, Lopshire és Nicol 1998). Ez a szabályozási mód kifejezetten fontos gyulladásos körülmények között, amikor a gyulladásos mediátorok, többek között az idegnövekedési faktor, a bradikinin, a szerotonin, a hisztamin és a prosztaglandinok felszaporodnak, majd receptorukat aktiválva a TRPV1-et szenzitizálják. A TRPV1 gyulladásos mediátorok általi szenzitizálásában szerepe lehet a tirozin kináz, protein kináz A, és protein kináz C függő útvonalaknak is (Cesare és munkatársai 1999, Premkumar és Ahern 2000, Vellani és munkatársai 2001), továbbá endogén ligandoknak, mint az anandamid vagy a 12-HPETE (Shin és munkatársai 2002, Vellani és munkatársai 2008).

A PKA útvonal kiemelt jelentőségű a gyulladással járó hiperalgédia kialakulásában (Levine és Taiwo 1990). A prosztaglandinok, különösen a PGE_2 növeli a sejten belüli cAMP szintet, ennek következtében fokozza a PKA aktivitását (Taiwo és munkatársai 1989, Taiwo

és Levine 1990), a PKA-mediált foszforiláció pedig nélkülözhetetlennek tűnik ahhoz, hogy a TRPV1 aktiválható legyen (Bhave és munkatársai 2002, Mahmud és munkatársai 2009).

1.1.1.1.6. A jelek integrálása

Az, hogy a TRPV1 különböző érzeteket integrál, a hétköznapi életben is megfigyelhető. A ligandok érzékelése bizonyos esetekben összetéveszthető lehet hőérzetekkel. Ezért tűnik a csípős gulyásleves forróbbnak, illetve a forró leves még csípősebbnek (angol nyelven ez még szemléletesebb: „hot” chili pepper).

Az integrálás molekuláris alapjai még tisztázatlanok. Jelenleg két fontosabb elméletet támogatnak, illetve cáfolnak a kísérleti eredmények. Bernd Nilius és munkacsoportja szekvenciális modellje szerint mindenféle stimulus valójában a csatorna feszültségfüggését tolja el az élettani szempontból érdektelen feszültségtartományból egy releváns feszültségre (Nilius és Voets 2005). Bár számos poszt-transzlációs módosítás és ligandkötés bizonyítottan a hőérzékenységet változtatja meg, ez nem ellenkezik a szekvenciális modellel, hiszen maga a hőérzékenység is a feszültségfüggéshez köthető (Gunthorpe és munkatársai 2000, Vlachova és munkatársai 2003).

Ezzel ellentétben Latorre és munkatársai allosztérikus modellje alapján – bár az egyes szenzorok befolyásolhatják egymást – minden szenzor közvetlen kapcsolatban áll a TRPV1 kapuzásával, így a stimulusok egymástól függetlenül nyitják a csatornát (Latorre és munkatársai 2007).

1.1.1.2. A TRPV1 szerkezete

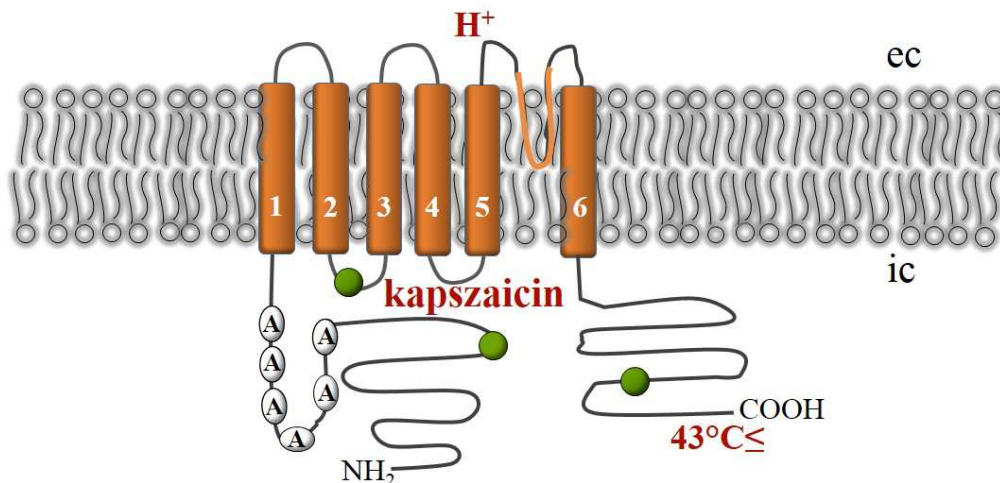
A 839 aminosavból felépülő, 95 kDa tömegű TRPV1 fehérje tetramer formában alkot funkcionális, nem-specifikus kationcsatornát (Kedei és munkatársai 2001, Benham és munkatársai 2002).

A homotetramer TRPV1 csatorna alegységei hat transzmembrán doménből szerveződnek, intracellulárisan elhelyezkedő amino- és karboxi-terminálissal (4. ábra). A receptor működését befolyásoló ingerek a fehérje különböző pontjain hoznak létre konformációváltozást, amely a receptort érzékenyítheti, a kationcsatorna megnyílásához vezethet, vagy éppen ellenkezőleg, gátolhatja a működését.

A kapszaicin, az anandamid és egyéb vanilloidok kötőhelye intracellulárisan helyezkedik el (Welch és munkatársai 2000), kialakításában a 2-es és a 4-es transzmembrán domének, a 2-es és 3-as domént összekötő intracelluláris hurok, a 4-es és 5-ös domént összekötő intracelluláris hurok, valamint az amino- és a karboxi-terminális is részt vesz (Jordt és Julius 2002, Gavva és munkatársai 2004, Chou és munkatársai 2004, Lee és munkatársai 2011). A ligandkötés a csatorna megnyílását okozza (Jordt és Julius 2002).

A receptor extracelluláris proton-érzékenységeért két, negatívan töltött glutamátcsoporthoz felelős az 5. és 6. doméneket összekötő szakaszon (Jordt és munkatársai 2000), míg a sejten belüli alkalotikus pH felismerésében az amino-terminálisnak lehet szerepe (Dhaka és munkatársai 2009). A megváltozott hőmérsékletet a karboxi-terminális érzékeli, annak lehasításával a csatorna hőérzékenysége elvész (Vlachova és munkatársai 2003, Brauchi és munkatársai 2007). Szintén a karboxi-terminálishoz köthető a tetramer kialakításának szabályozása a TRP domén révén (Garcia-Sanz és munkatársai 2004), valamint PIP₂ kötőhely is található itt (Brauchi és munkatársai 2007), egyelőre tisztázatlan hatással.

Több lehetséges protein kináz A, protein kináz C és kalmodulinfüggő protein kináz II (CaMKII) foszforilációs helyet kimutattak a karboxi- és amino-terminálison, valamint az első intracelluláris hurkon is. Közülük egyes helyek foszforilálása a receptor hőre adott válaszait növeli (Rathee és munkatársai 2002), másoké a kapszaicinre adott válaszokat fokozza (Numazaki és munkatársai 2002).



4. ábra: A homotetramer TRPV1 ioncsatorna egy alegységének sematikus szerkezete a membránban. A transzmembrán domének narancssárga oszlopokként jelölve, 1-6 számozással. A láthatóság kedvéért a pórusformáló hurok is narancssárga. Bordó színnel tüntettem fel a TRPV1 fő ligandjait (kapszaicin, proton, 43°C feletti hőmérséklet) azokon a helyeken, ahová kötődnek. A zöld pontok kiemelt PKA foszforilációs helyek. A: ankirin domén, H⁺: proton, ec: extracelluláris oldal, ic: intracelluláris oldal, NH₂: amino-terminális, COOH: karboxi-terminális. (Nagy és munkatársai 2014 alapján)

Az amino-végen hat ankirin domén ismétlődik, melyek kalmodulin és ATP kötésével a TRPV1 Ca^{2+} -függő deszenzitizációját szabályozzák (Koplas és munkatársai 1997). Emellett az amino-terminális további protein kináz A támadáspontokat nyújt, melyek foszforilálása a TRPV1 kapszaicin-stimulációt követő deszenzitizációját gátolja (Bhave és munkatársai 2002, Mohapatra és Nau 2005).

1.1.1.3. A TRPV1 előfordulása

A TRPV1 kulcsszerepet játszik egy jól meghatározható elsődleges érzőneuronpopuláció, a polimodális nociceptorok (1.2. alfejezet, 2. bekezdés) fájdalmas termikus és kémiai stimulusok detektálásában (Caterina és munkatársai 2000), és nagymértékben hozzájárul a gyulladás által kiváltott termális hiperalgédia kifejlődéséhez és fenntartásához (Davis és munkatársai 2000). Az alábbiakban ismertetett eredményeink ezen nociceptorok TRPV1 receptorainak működéséről nyújtanak további információkat, azonban érdemes megemlíteni, hogy a TRPV1 számos egyéb idegi struktúrán és nem-neuronális sejtfeleségen is kifejeződik.

Már a receptor klónozásával egyidőben leírták a TRPV1 mRNS jelenlétét a vesében (Caterina és munkatársai 1997), azóta többen vizsgálják szerepét a humán húgyhólyag simaizmában, epiteliális és intersticiális sejtjeiben (Birder és munkatársai 2001, Ost és munkatársai 2002, Lazzeri és munkatársai 2004). Az erek átmérőjét a perifériás idegekre és a vaszkuláris simaizomsejtekre egyaránt hatva befolyásolja (Kark és munkatársai 2008). A TRPV1 a gyomor nyálkahártyájának sejtjein kivédheti az alkohol és a savas közeg okozta sejtpusztulást (Kato és munkatársai 2003), a korábbi hiedelmekkel ellentétben a kapszaicin a TRPV1-en keresztül nemhogy fokozná a gyomorfekély kialakulásának kockázatát, hanem valószínűleg védő szerepe van (Luo és munkatársai 2012). TRPV1 a légutakban is kimutatható, stimulálása bronchokonstrikció kiváltására képes (Ellis és munkatársai 1997), valamint fokozza a gyulladáskeltő citokinek (IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$) termelését és felszabadulását (Reilly és munkatársai 2005).

1.1.2. A TRPV1 splice variánsai

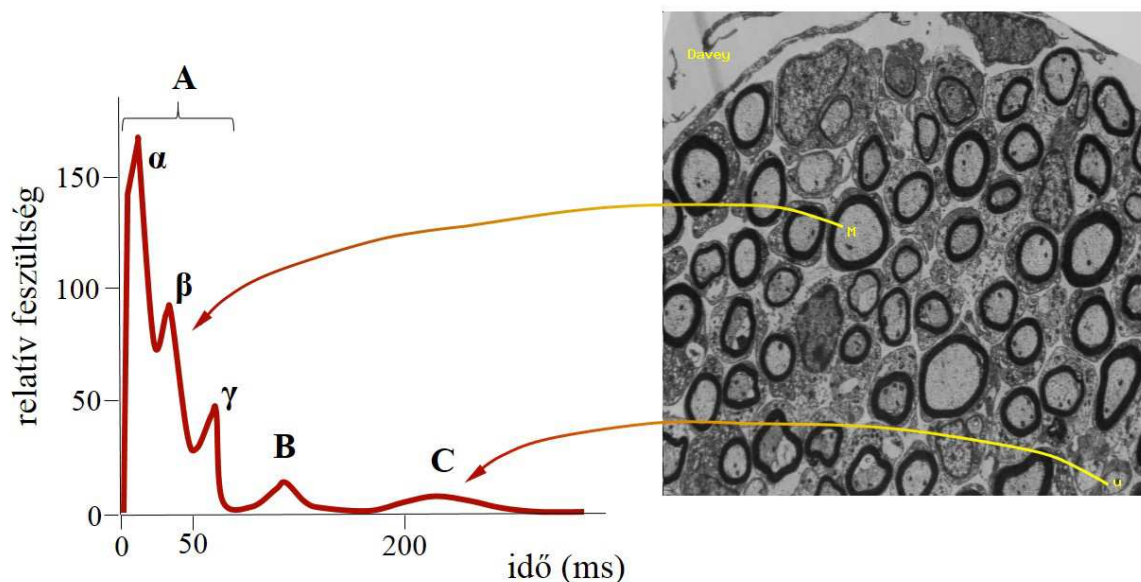
A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 molekulák saját maguk (homotetramerként), vagy TRPV1 splice variánsokkal, esetleg a tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád más tagjaival együtt (heterotetramerként) formálják a nem-szelektív kationcsatorna TRPV1-et (Caterina és munkatársai 1997, Cheng és munkatársai 2007, Hellwig és munkatársai 2005, Lu és munkatársai 2005, Vos és munkatársai 2006, Wang és munkatársai 2004). Az ioncsatornák működésének szabályozásában fontos mechanizmus az alegységek összetételének változása.

A TRPV1 legismertebb splice variánsai a VR.5'sv, mely a hátsógyöki ganglionokban kifejezett TRPV1 kb. 5%-a, a TRPV1b, és a TRPV1var, melyeket szintén kimutattak DRG-ban (Schumacher és Eilers 2010), és melyek mindegyike csökkent TRPV1 válaszokat eredményez. Amikor a TRPV1 egyik splice variánsa, a TRPV1b együtt fejeződik ki a TRPV1-gyel heterológ rendszerekben, akkor a ligandok, pl. kapszaicin hatására a csatorna csökkent aktivitása tapasztalható (Lu és munkatársai 2005, Vos és munkatársai 2006, Wang és munkatársai 2004).

A TRPV1-et kifejező sejtek közül a nociceptív primer érzőneuronokat általában elsőként említik (Caterina és munkatársai 1997, White és munkatársai 2011a). Ezekben a neuronokban a TRPV1 ioncsatornának alapvető szerep jut a perifériás gyulladásos folyamatok jelzésében a központi idegrendszer felé, majd a gyulladással járó hő hiperalgésia és viszcerális hiperreflexia kialakulásában és fenntartásában (Caterina és munkatársai 2000, Charrua és munkatársai 2007, Davis és munkatársai 2000). A TRPV1 és a TRPV1b molekulák együttes kifejeződése a primer érzőneuronokon, és a TRPV1b heterológ rendszerekben leírt gátló hatása a csatorna válaszkészségére (Lu és munkatársai 2005, Vos és munkatársai 2006, Wang és munkatársai 2004) arra utal, hogy a TRPV1 ioncsatorna összetételének változása hozzájárulhat a receptor érzékenységének fokozásához is gyulladásos körülmények között. Ennek megfelelően, kísérleteinkben *in vitro* "gyulladást utánozó közeg" hatását vizsgáltuk a TRPV1 ioncsatorna válaszkészségére, valamint a TRPV1 és TRPV1b mRNS és fehérje szintjeinek lehetséges módosulására.

1.2. Primer érzőneuronok

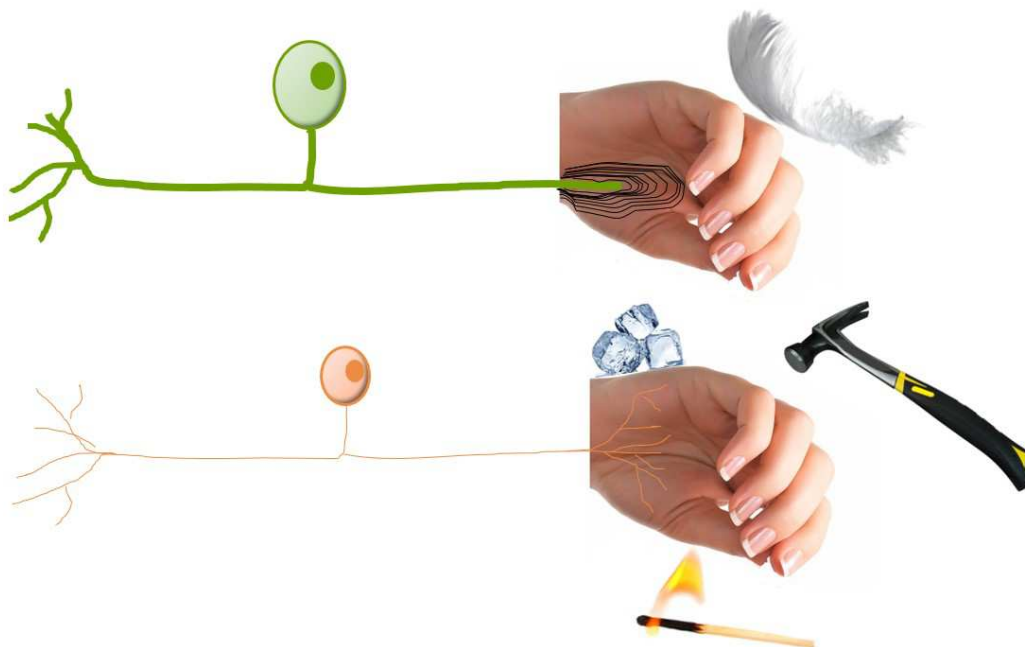
A primer, más néven elsődleges érzőneuronok a testi és zsigeri szöveteket érő mechanikai, kémiai vagy hőingerek felfogására, feldolgozására és az ingerületeknek a központi idegrendszerbe juttatására specializálódott idegsejtek. Egyik fő nyúlványuk a perifériás szövetekben, a másik a gerincvelő hátsó szarvában ágazódik el, sejttestük a spinális hátsógyöki (DRG), valamint az V. (TRG), VII., IX. és X. agyidegek érző ganglionjaiban helyezkedik el. Ugyan az érzőneuronok egy részének a perifériás nyúlványa specializálódott szöveti struktúrákkal, úgynevezett érző végkészülékekkel áll kapcsolatban, az ingerek felfogása – mind ezekben a sejtekben, mind az érző végkészülékekkel kapcsolatban nem lévő (szabad idegvégződésű) sejtekben – a sejtek membránjában kifejeződő receptoroktól függ.



5. ábra. Perifériás ideg keresztmetszetének elektronmikroszkópos képe a különböző vezetési sebességet mutató sematikus rajzzal. Az elektronmikroszkópos felvétel fekete, gyűrűszerű képletei a Schwann-sejtek által formált mielinhüvelynek felelnek meg, bennük a világosszürke képletek az idegsejtek nyúlványai. Mielinhüvely nélküli sejtek (u) is láthatók. A vastagon mielinizált, M-mel jelölt nyúlvány átmérője kb. 12 μm . A perifériás idegekről elvezethető akciós potenciál komponensei a különböző vezetési sebességű rostokból származnak. A mielinhüvely jelenléte növeli a vezetési sebességet. (Az elektronmikroszkópos kép forrása: D.F. Davey, Department of Physiology, University of Sydney)

Bár az elsődleges érzősejtek mind morfológiai, mind élettani és farmakológiai vonatkozásban heterogén csoportot alkotnak, a csoportok morfológiája, valamint élettani és farmakológiai tulajdonságai összefüggnek. A nagy átmérőjű sejtek gyors ingervezetésű (vastagon mielinizált) A β rostokkal rendelkeznek, amelyek alacsony erősségű elektromos, hő és mechanikai ingerekkel aktiválhatóak. Ezzel ellentétben, a kis átmérőjű érzőneuronok rostjai lassú ingerületvezetésű, úgynevezett A δ (vékony velőshüvellyel borított) és C (velőshüvely nélküli) rostok, amelyek erős ingerekkel hozhatók csak ingerületbe (5. ábra). Mivel az erős ingerek ($\sim 50^{\circ}\text{C}$ feletti vagy $\sim 10^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérséklet, 50 kg/cm^2 feletti nyomás) fájdalmat váltanak ki, ezért ezeket a sejteket a már említett fájdalomérző sejteknek (polimodális nociceptoroknak) nevezzük (Nagy 2004).

Amíg a nagy átmérőjű, nem fájdalomérző neuronok csak egyfajta ingerrel (vagy meleggel, vagy hűvös ingerrel, vagy tapintással) aktiválhatók, addig a fájdalomérző sejtek túlnyomó többsége valamennyi ingerrel (forró, hideg, erős mechanikai és kémiai inger) ingerületbe hozható (6. ábra), azaz polimodális sejt. A legtöbb polimodális érzőneuron válaszol az erőspaprika csípősségéért felelős anyagra, a kapszaicinre (2. ábra). Hasonlóan a forróhoz, hideghez, erős mechanikus ingerléshez, valójában a kapszaicin is fájdalmat vált ki, amelyet leggyakrabban égő érzésként jellemzünk.



6. ábra. Az elsődleges érzőneuronok két típusának rajza. Nyomást érzékelő, Vater-Pacini testhez kapcsolódó, vastagon mielinizált axonú érzőneuron (zöld), valamint polimodális – szélsőséges hidegre, forróra, erős mechanikai ingerre aktiválódó –, velőshüvely nélküli érzőneuron (narancssárga).

1.2.1. Kapszaicinérzékeny neuronok

A már említett kapszaicin (2. ábra) a közönséges paprika (*Capsicum annuum*) csípős ízéért felelős vegyület. A fűszerként használt paprikák csípősségét hagyományosan a Scoville-féle organoleptikus teszttel (SHU egység) mérik, a magyarok kedvelt cseresznyepaprikája pl. 1000-5000 SHU csípős, míg a világ egyik legcsípősebb csilije, a Dorset Naga akár 1,5 millió SHU erősséget is elér (azaz oldatát másfélmilliószorosra kell hígítani ahhoz, hogy már ne érezzük csípősnek). A tiszta kapszaicin csípőssége 15-16 millió SHU körül mozog, az egyáltalán nem csípős paprikáink (pl. a paradicsompaprika, vagy a kaliforniai paprika) pedig nem tartalmazzak kapszaicint.

A kapszaicin élettani hatásainak első vizsgálatai állatokon és emberen (Hőgyes 1878a, 1878b), a nociceptív neuronokon kiváltott hatások tanulmányozása (Jancsó és Jancsóné 1949, Pórszász és Jancsó 1959), és a „kapszaicin receptor” első leírása (Szolcsányi és Jancsó-Gábor 1975) is magyar kutatók érdeme. A receptort expresszázó gén azonosítása és a receptor szerkezetének megismerése jóval később, David Julius nevéhez köthető, aki munkacsoportjával klónoztta a molekulát a hátsógyöki ganglionok sejtjeiből (Caterina és munkatársai 1997).

A kapszaicin és a rokon vanilloid vegyületek (pl. a reziniferatoxin, a piperin, a zingeron, vagy az eugenol) hatásmechanizmusa a primer érzőneuronokon három fázisra különíthető el. A kapszaicin-adagolás azonnali hatása excitáció, melynek során a kapszaicin receptora, nem-specifikus kationcsatorna lévén depolarizálja a membránt (Marsh és munkatársai 1987, Wood és munkatársai 1988, Bevan és munkatársai 1992). A kezdeti excitáció *in vivo* gyulladásos mediátorok helyi felszabadulásával jár, melyet égő jellegű fájdalom érzése kísér.

Az excitációt követően homológ és heterológ deszenzitizáció figyelhető meg. A kapszaicinhatásnak kitett sejtek érzéketlenné válnak vanilloidokra (homológ deszenzitizáció; Pórszász és Jancsó 1959), sőt, a csökkent érzékenység kiterjed egyéb fájdalomkeltő anyagokra is (heterológ deszenzitizáció; Jancsó 1949, 1967, Szállási és Blumberg 1999). A TRPV1 csatorna megnyílásával növekszik az $[Ca^{2+}]_{ic}$, majd a Ca^{2+} kalmodulinhoz kötődve aktiválja a calcineurint és a CaMKII-t, amelyek általi defoszforilálás, illetve foszforilálás a TRPV1 deszenzitizálásához szükséges (Numazaki és munkatársai 2003, Rosenbaum és munkatársai 2004, Lishko és munkatársai 2007). A deszenzitizáció tehát jelentős mértékben kalciumfüggő folyamat, Ca^{2+} hiányában elmarad (Koplas és munkatársai 1997). Másrészt a protein kináz A aktivitása éppen a deszenzitizáció ellen hat, fokozza a kapszaicinnal, anandamiddal és protonokkal szembeni érzékenységet (Mohapatra és Nau 2005, Di Marzo és

munkatársai 2002, Bhave és munkatársai 2003). A TRPV1 kalciumfüggő deszenzitizációját így a kalcineurin általi defoszforilálás és a különböző kinázok általi foszforilálás egyensúlya szabályozza (Jung és munkatársai 2004, Cortright és Szállási 2004, Docherty és munkatársai 1996, Mohapatra és Nau 2005, Mandadi és munkatársai 2004).

A kapszaicin harmadik hatása a szert csak viszonylag magas koncentrációban, elég tartósan alkalmazva fejlődik ki. Ez a hatás pedig neurotoxicitás, nevezetesen a kapszaicinérzékeny neuronok szelektív elpusztítása (Jancsó és munkatársai 1977, 1985), mely a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, valamint ennek következtében a kalciumfüggő proteázok fokozott aktivitásának tulajdonítható (Wood és munkatársai 1988, Winter és munkatársai 1990, Chard 1995, Szállási és Blumberg 1999).

1.2.2. Kapszaicinérzékeny neuronok a terápia célpontjában

A nociceptív primer érzőneuronoknak kulcsfontosságú szerepe van különféle fájdalmas állapotok kialakításában és fenntartásában (Nagy és munkatársai 2004). Éppen ezért ezeknek a sejteknek a receptorai – kiemelt jelentőséggel a TRPV1 – potenciális terápiás célpontok, többek között a gyulladással járó termális hiperalgécia, a csontdaganatok okozta fájdalmak vagy a szívinfarktussal járó mellkasi fájdalom csökkentésére (White és munkatársai 2011b).

A kapszaicin első terápiás felhasználása valószínűleg a csípőspaprikával egykorú. Kémiai szerkezete ugyan csak 1919 óta ismert (Nelson 1919), a népi gyógyászatban már évszázadok óta alkalmazzák ízületi és izomfájdalmak, övsömör okozta fájdalmak csillapítására. A cayenne paprikából főzött tea segít orrdugulás esetén, a cayenne és gyömbér keveréke a cipőbe szórva melegen tartja a lábat. A szépségiparból sem hiányozhat, a paprikakrémes testtekerccselés keringést fokozó hatásával állítólag csökkenti a cellulitot, a kapszaicin a metabolikus ráta növelésével pedig hasznos lehet fogyókúrázóknak (Ludy és munkatársai 2012). A TRPV1 metabolikus hatásáról azonban ellentmondásos eredmények vannak: a TRPV1 hiányos fiatal egerek még emelt zsírtartalmú táplálkozás mellett sem híznak (Motter és Ahern 2008), az idősödő TRPV1 hiányos egerek azonban túlsúlyosak (Wanner és munkatársai 2011).

A fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásának remélt, szelektíven a kapszaicinérzékeny érzőneuronok működését befolyásoló szer kifejlesztésekor alapvető szempont, hogy a molekula milyen mértékben izgat, deszenzitizál, illetve neurotoxikus. Terápiásan egyaránt ígéretesnek bizonyulhatnak a kapszaicin receptorát gátló szerek, valamint olyan parciális agonisták is, melyek serkentő hatása elhanyagolható a deszenzitizációt

előidéző hatáshoz képest. Sőt, olyan megközelítésekkel is egyre gyakrabban találkozunk, melyek támadáspontja valamely más, a TRPV1 aktivitását közvetve befolyásoló molekula, például a kannabinoid 1 (CB1) receptor.

Csak néhányat említenék a klinikai kipróbálásig eljutott TRPV1 antagonisták közül: ABT-102 (Abbott), SB-705498 (GSK), AMG-517 (Amgen), MK2295 (Merck/Neurogen), and GRC-6211 (Lilly/Glenmark; Kym és munkatársai 2009). Közülük néhány kiesett a vizsgálatok köréből nemkívánatos mellékhatások miatt (az AMG-517 például hipertermiát válthat ki), mások várhatóan hamarosan megjelenhetnek kereskedelmi forgalomban is (hozzá kell tenni, hogy ehhez hasonló – és eddig be nem teljesített – jóslatokat már évekkel ezelőtt is olvashattunk; pl. Rami és Gunthorpe 2004). Az SB-705498 hatóanyagú orrspray például allergiás rhinitis kezelésében lehet hasznos (Bareille és munkatársai 2013), az MK2295 fájdalomcsillapítóként jelenhet meg (Trevisani és Szállási 2010). Azt azért érdemes szem előtt tartani, hogy a hipertermia kockázata minden TRPV1 antagonistára esetén fennáll, valamint a hőküszöb csökkenése miatt alkalmazásuk sérülésveszéllyel járhat.

A TRPV1 agonisták klinikai felhasználhatósága szintén intenzíven tanulmányozott terület (Ueda és munkatársai 2013b, Noto és munkatársai 2009). Az már a kutatások kezdetén kiderült, hogy a kapszaicin szisztémás adagolásakor bradycardia, vérnyomásesés és felületes légzés (Bezold-Jarisch reflex) lép fel (Szállási és Blumberg 1999), így lokálisan alkalmazható készítmények (krémek, tapaszok, orrcseppek, intraartikulárisan adható oldatok) fejlesztése lett a cél. Külsőleg alkalmazható kapszaicinkrémek jelenleg is recept nélkül kaphatóak, bár kapszaicintartalmuk meglehetősen alacsony (Zostrix 0,025% kapszaicintartalommal, Axsain 0,075% kapszaicintartalommal). Ezeket az alacsony (1% alatti) kapszaicintartalmú készítményeket leginkább oszteoartritiszes betegek fájdalmaira, illetve cukorbeteg perifériás neuropátiás tüneteinek enyhítésére ajánlják, de eredményességük nem kellően megalapozott (Derry és Moore 2012). A hatásosnak mutakozó nagy koncentrációjú (8%) kapszaicin viszont lényegében csak szoros orvosi felügyelet mellett adható a kezdeti szinte elviselhetetlen égő érzés miatt (Derry és munkatársai 2013). Így aztán a kapszaicin helyett olyan TRPV1 agonistáktól várunk megoldást, melyek kezdeti aktiváló, majd későbbi deszenzitizáló hatásának aránya a kapszaicinnál kedvezőbb. A kámfor például erőteljesebben deszenzitizálja a TRPV1-et, hatása továbbá kiegészül a TRPA1 gátlásával (Fajardo és munkatársai 2008). A TRPA1 – hasonlóan a TRPV1-hez – hozzájárul a gyulladásához társuló fájdalom kialakításához, ez lehet a magyarázata a kámfor jól ismert, és széles körben alkalmazott fájdalomcsillapító hatásának (Xu és munkatársai 2005, Fajardo és munkatársai 2008).

Szintetikus TRPV1 agonistákkal (legtöbbször szintetikus kapszaicinnal) is egyre gyakrabban találkozhatunk. Az Anesiva által fejlesztett ALGRX-4975 (AdleaTM) ízületi fájdalmak csökkentésére ígéretes szer, a Winston Laboratories intranazális készítménye, a WN1001 (Civamide) klaszter típusú és migrénes fejfájás csillapításában tűnik hatásosnak, NGX-4010 (Qutenza) tapaszt HIV fertőzöttek polineuropátiájára tesztelik.

A TRPV1 aktivitásának módosítása a CB1 receptor felőli megközelítéssel szintén intenzíven tanulmányozott terület. A hátsógyöki ganglionok nagy részén TRPV1 és CB1 receptor is kifejeződik (Agarwal és munkatársai 2007, Ahluwalia és munkatársai 2000, Amaya és munkatársai 2006, Binzen és munkatársai 2006, Mitirattanakul és munkatársai 2006). Míg a TRPV1 aktiválás depolarizációval, Ca^{2+} -áramok megjelenésével jár, addig a CB1 aktiválás csökkenti a Ca^{2+} -csatornák áramait (Caterina és munkatársai 1997, Mackie és Hille 1992, Mackie és munkatársai 1995, Millns és munkatársai 2001, Nagy és Rang 1999). Ennek megfelelően, a TRPV1 stimulálása fokozza, a CB1 stimulálása gátolja az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedését, következményesen a neurotranszmitterek felszabadítását a primer érzőneuronokban (Millns és munkatársai 2001, Olah és munkatársai 2001, Oshita és munkatársai 2005).

A CB1 receptor endogén ligandja, az anandamid gátolja a TRPV1-mediált teljes-sejt áramokat primer érzőneuronokon (Sántha és munkatársai 2010). Hátsógyöki gangliontenyészetben végzett kobaltfelvétel vizsgálatok (Mahmud és munkatársai 2009) alapján nagy a valószínűsége, hogy az anandamid hatása CB1-en keresztül valósul meg, hiszen a kannabinoid-mediált gátlás felfüggeszthető volt a CB1 antagonistá rimonabanttal (200 nM). Az aktív CB1 hatása a TRPV1-re a gyulladásos mediátorokéval (1.1.2.2. fejezet, "endogén ligandok" rész) ellentétesen képzelhető el. Az aktív CB1 csökkenti a cAMP szintet, ezzel gátolja a PKA aktivitást, így csökken a TRPV1 foszforilálása, és csökken a TRPV1 aktivitása is. Mindez kiválóan alátámasztja azt a feltételezést, hogy az anandamid a kannabinoid rendszer közvetítésével gátolja a TRPV1-et kifejező, fájdalomérző neuronok aktivitását, így a terápiás célból megnövelt anandamidszintnek fájdalomcsillapító hatása lehet.

Ezt használják ki a FAAH inhibitorok alkalmazásával az endokannabinoid rendszer aktivitásának növelésére (és a TRPV1 aktivitás gátlására) irányuló törekvések (Cravatt és Lichtman 2003, Pattipati és munkatársai 2010, Starowicz és munkatársai 2013). Miközben a FAAH farmakológiai gátlásával sikeresen csökkenthető a krónikus fájdalom számos állatkísérletes modellben (Roques és munkatársai 2012), a klinikai kipróbálások eddig nem sok sikerrel jártak (Huggins és munkatársai 2012). A sikertelenséget magyarázhatja az anandamid hatásának koncentrációfüggése: 1 μM alatti koncentrációban a CB1 receptoron

keresztüli neurotranszmitter leadás gátlása dominál, míg 1 μ M fölött a TRPV1-mediált stimulálás kerül előtérbe (Morisset és Urbán 2001, Nemeth és munkatársai 2003, Engel és munkatársai 2011). Tovább árnyalja a képet, hogy patológiás állapotok módosíthatják az anandamidhatást. A gyulladásos mediátorok általi TRPV1-szenzitizálás az anandamid fokozott stimuláló hatását eredményezi a TRPV1-en (Dinis és munkatársai 2004b, Singh Tahim és munkatársai 2005). A TRPV1 érzékenyítése részben PKA és PKC általi foszforilálás útján történik (Premkumar és Ahern 2000, De Petrocellis és munkatársai 2001, Bhave és munkatársai 2002, 2003), de a PKA és PKC fokozott aktivitása egyúttal a CB1 receptor válaszkészségét is csökkenti (Garcia és munkatársai 1998, Huang és munkatársai 2002). A TRPV1 és CB1 érzékenységeinek növekedésével, illetve csökkenésével összhangban úgy tűnik, hogy az anandamid nem tudja a gátolni a TRPV1-mediált kationbeáramlást gyulladásos mediátorok jelenlétében (Mahmud és munkatársai 2009).

1.3. Célkitűzések

A Ca^{2+} -függő módon termelt anandamid TRPV1 aktiválásával stimulálja a primer érzőneuronokat, a Ca^{2+} -független enzimek által termelt anandamid szerepe azonban eddig ismeretlen volt. Ennek megfelelően, munkánkban a következő célokat tűztük ki:

- a Ca^{2+} -független anandamidtermelésre alkalmas enzimek azonosítása és működésének leírása patkány hátsógyöki ganglionjaiból tenyésztett primer érzőneuronokban
- az azonosított Ca^{2+} -független enzimek által termelt anandamid TRPV1-et kifejező sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata, hiszen korábbi eredmények arra utalnak, hogy ez az endokannabinoidként ismert lipid megoldást jelenthet a fájdalom csökkentésére, ugyanis az aktivált CB1 receptor gátló hatást fejt ki a TRPV1-re. Az azonban tisztázatlan kérdés volt, hogy az elsődleges érzőneuronok által termelt anandamidnak – a CB1 receptor által közvetített hatáson túl – milyen közvetlen hatása van a TRPV1 csatorna aktivitására, így összességében hogyan változtatja meg a polimodális nociceptorok aktivitását, ingerelhetőségét.

A TRPV1 és annak splice variánsai együtt kifejeződve általában módosult érzékenységet, megváltozott aktivitást mutatnak a homotetramer TRPV1 csatornához képest. Céljaink:

- *in vitro* “gyulladást utánzó közeg” hatásának vizsgálata a TRPV1 ioncsatorna válaszkészségére
- a TRPV1 és egyik splice variánsa, a TRPV1b mRNS és fehérje szintjeinek vizsgálata “gyulladást utánzó közeg” hatására
- összefüggés keresése a TRPV1 és a TRPV1b mennyiségének változása és az ioncsatorna gyulladásos körülmények hatására fokozódó érzékenysége között

2. Anyagok és módszerek

2.1. Kísérleti állatok

A bemutatásra kerülő kísérletekben Sprague-Dawley patkányokat, valamint vad típusú C57BL/6 x129SvJ (WT) és TRPV1^{-/-} (C57BL/6 x129SvJ eredetű, TRPV1 knock out, KO) egereket használtunk. Az állatok elaltatásában és a szervek kivételében a Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals (US Public Health Service, NIH Publication No. 85-23, 1985), és a Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Pain, 16: 109-110, 1983) ajánlásait követtük, az alkalmazott protokollokat az Egyetem Állatetikai Tanácsa jóváhagyta.

A kísérletekhez összesen 94 hím, 80-200 g tömegű Sprague-Dawley patkányt, valamint 5 vad típusú és 6 TRPV1 KO egeret áldoztunk fel.

2.2. Primer érzőneuronok tenyésztése

A kísérleti állatot izoflurán belélegeztetésével túlaltattuk, aszeptikus körülmények között a gerinccsatornát teljes hosszában megnyitottuk. A hátsógyöki ganglionokat az első nyaki szegmenstől a hatodik lumbális szegmensig kipreparáltuk, Ham's F12 tenyésztőoldatba gyűjtöttük. A ganglionokat 2000 U/ml IV-es típusú kollagenáz (Worthington Biochemical Corp., NJ, USA) jelenlétében, 37 °C-on, három órán keresztül emésztettük, majd az emésztőoldat eltávolítása után a sejteket triturálással egymástól szétválasztottuk. Penicillinnel (50 IU/ml, Invitrogen), streptomycinnel (50 µg/ml, Invitrogen), glutaminnal (1 mM, Invitrogen), mesterséges szérummal (Ultrosor G, 2%, BioSeptra SA, Franciaország) és idegi növekedési faktorról (NGF, 50 ng/ml, Promega, UK) szupplementált Ham's F12 tápoldatban, poly-DL-ornitinnel (Sigma) bevont üveg fedőlemezekben tenyésztettük a sejteket 24 vagy 48 órán át. A konfokális mikroszkópon végzett kísérleteinkhez a sejteket poly-DL-ornitinnel bevont üvegaljú petri-csészében (ibidi GmbH, Martinsried, Németország) tenyésztettük.

2.2.1. Érzőneuronok tenyésztése gyulladásos mediátorok jelenlétében

Tenyésztéseink egy részét a tenyésztés teljes időtartama alatt (a tenyésztés kezdetétől 48 óra elteltéig) gyulladásos mediátorok jelenlétében tartottuk. A Ham's F12 tenyésztőoldathoz a már említett szupplementeken kívül 10 µM prosztaglandin E₂-t (PGE₂, Sigma) és 10 µM bradikinint (BK, Sigma) adtunk.

2.3. Alkalmazott anyagok

Kísérleteinkben a következő anyagokat alkalmaztuk: NAPE, kapszaicin (500 nM, Tocris, UK); anandamid (1µM és 30 µM között, Tocris, UK), rimonabant (200 nM, NIH,

USA), mustárolaj (50 μ M, Sigma), ionomycin (5 μ M, Sigma). A NAPE törzsoldatot etanol és Tocrisolve 1:1 arányú keverékében, az anandamid törzsoldatot etanolban, a kapszaicin, rimonabant, mustárolaj és ionomycin törzsoldatokat DMSO-ban oldottuk. A DMSO-t legalább 2000-szeresre, az etanolt legalább 1000-szeresre hígítva alkalmaztuk. Kontroll kísérleteinkben egyetlen oldószer (az anyagok oldásához alkalmazott legnagyobb koncentrációjában) sem váltott ki választ.

2.4. RNS izolálása

Az RNS izolálását QIA shredder oszlopok, valamint RNeasy Mini Kit, RNeasy Protect Mini Kit vagy RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, UK) segítségével végeztük a gyártó ajánlásai szerint.

2.5. cDNS átírás és polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RNS-ből történő cDNS átíráshoz SuperScript II cDNS szintézis reagenseket (Invitrogen) használtunk. A reverz transzkripciót követően a következő gének felsokszorozására tervezett primerekkel dolgoztunk: NAPE-PLD (NM_199381.1), glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1 (GDE1, NM_198779.1), α/β -hidroláz 4 (ABHD4, NM_001108866.1), protein tirozin foszfátáz, nem-receptor típus 22 (PTPn22, NM_001106460.1), 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂ (sPLA2G1b, NM_031585.1), inozitol 5' foszfátáz (Inpp5, NM_019311.1), TRPV1 (NM_031982.1) és háztartási génként, gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH, NC_005103). A primerek szekvenciáit (Eurofins MWG Operon, Németország), a kapcsolódási (annealing) hőmérsékleteket és a termékek várható méretét a 2. táblázat foglalja össze.

A cDNS-hez primereket, 1,5 mM MgCl₂-ot, 1 $\times$ Green Go-Taq Reaction puffert (Promega), 0,2 mM deoxinukleotid mixet (Promega), és 1,25 U Go-Taq DNS polimerázt (Promega) adtunk, majd 30 (GAPDH esetén csak 25) cikluson keresztül amplifikáltuk. A ciklusok 0,5 perc denaturációból (95 °C), 1 perc bekötődésből (a 2. táblázatban szereplő hőmérsékleten), valamint 1 perc végső elongációból (72 °C) álltak, melyek kivitelezése thermal cycler-ben történt (Eppendorf-Mastercycler Personal, Eppendorf, UK).

A TRPV1/TRPV1b cDNS amplifikálása ettől kissé eltérő közegben történt: 1,5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,2 mM deoxinukleotid mix és 1,25 U Go-Taq Flexi DNA polimeráz (Promega, UK) jelenlétében, 8.3 pH értéken.

A PCR termékeket 2% agaróz gélen elektroforézissel különítettük el, és etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

enzim	szekvencia	hőmérséklet (°C)	a termék várható mérete (bp)
GDE1	F: TGCAGAAGGATTTTGTCTCC	57	298
	R: TTGGGGTAAACTGTGGCTA		
ABHd4	F: CAAAGCCATGATGGAGTCCT	57	244
	R: GATCTCCTCCACCACAGCAT		
PTPn22	F: CATTGAAGACCCCAGGAAAA	61	202
	R: CAAGTTGATGGTGGGTTCTCT		
sPLA2G1b	F: ACTGCTACAATCAGGCCAAG	57	292
	R: GTGCGGTGCAGAAATAAGAC		
Inpp5	F: TACACACCTCTCACCCACCCA	57	160
	R: GCTGGTGAGGTTCTTCAAGC		
TRPV1	F: TGGAGGTGGCAGATAACACA	59	500 / 325
	R: CCTTCCACAGGCCGATAGTA		
GAPDH	F: ACCCATCACCATCTTCCA	57	380
	R: CATCACGCCACAGCTTTCC		

2. táblázat. A RT-PCR során alkalmazott primerek forward (F) és reverz (R) szekvenciái, kapcsolódási hőmérsékletek és a termékek várható mérete. GDE1: glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1, ABHd4: α/β -hidroláz 4, PTPn22: protein tirozin foszfatáz nem-receptor típus 22, sPLA2G1b: 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂, Inpp5: inozitol 5' foszfatáz, GAPDH: gliceraldehid-3-foszfat dehidrogenáz

2.5.1. Patkány TRPV1b szekvenálása

Az RT-PCR termékeket elektroforézist követően az agaróz gélről QIAquick Gel extrakció kit (Qiagen, UK) és mikrocentrifuga segítségével a gyártó ajánlása szerint kinyertük. A szekvenálást ABI Prism automata szekvenáló rendszerben (Applied Biosystems 3100 16-capillary Genetic analyzer, Japán) az előzőleg RT-PCR-hoz is használt primerekkel végeztük (2. táblázat).

2.6. Immuncitokémia

A kitapadt sejteket PBS-ben mostuk, majd 0,1 M PBS-ben oldott 4% paraformaldehiddel fixáltuk (pH 7,4). Permeabilizálást (0,3% Triton-X 100), és blokkolást (10% normál szarv szérum) követően a sejteket a primer antitestekkel 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk, másnap a jeleket szekunder antitestekkel vizualizáltuk (a primer és szekunder antitestek listája, alkalmazásának részletei a 3. táblázatban kerültek összefoglalásra). A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (Vector Laboratories, UK). A sejteket Leica DMR

fluoreszcenciás mikroszkóppal vizsgáltuk, a sejtekről Hamamatsu CCD kamera segítségével, QWIN szoftvercsomag (Leica, UK) alkalmazásával felvételeket készítettünk.

enzim	gyártó	elsődleges antitest hígítása	másodlagos antitest	másodlagos antitest hígítása
GDE1	Santa Cruz	1:500	AF-568 DAR IgG	1:1000
ABHd4	Santa Cruz	1:200	AF-568 DAG IgG	1:3000
PTPn22	ProteinTech Group	1:500	AF-568 DAR IgG	1:1000
sPLA2G1b	Millipore	1:150	AF-568 DAM IgG	1:1000
Inpp5	Santa Cruz	1:150	AF-568 DAM IgG	1:1000
TRPV1	Neuromics	1:2000	AF-488 DAGP IgG	1:10000
TRPV1	A. Avelino	1:2000	AF-488 DAR IgG	1:10000
NeuN	Millipore	1:1000	AF-488 DAM IgG	1:1000

3. táblázat. Az immuncitokémia során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek gyártója, típusa és a hígításuk. AF-568: Alexa Fluor 568, AF-488: Alexa Fluor 488, DAR: nyúl IgG ellen számarban termeltetett antitest, DAG: kecske IgG ellen számarban termeltetett antitest, DAM: egér IgG ellen számarban termeltetett antitest, DAGP: tengerimalac IgG ellen számarban termeltetett antitest

2.7. Western blot

A sejteket proteáz inhibitor koktéllal (Sigma) szupplementált NP40 sejtlízis pufferben (Invitrogen), jégen homogenizáltuk, a fehérjék membránból történő preparálásához pedig ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kitet (Fermentas, Burlington, Canada) használtunk. A fehérjetartalmat BCA Protein Assay Reagenssel (Pierce Biotechnology, IL, USA) határoztuk meg.

A fehérjéket négyszeres koncentrációjú NuPAGE LDS pufferben (Invitrogen) 70 °C-on, 10 percig denaturáltuk, aztán NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gélen (Invitrogen) frakcionáltuk, majd iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen) alkalmazásával PVDF membránra blottoltuk.

5% tejporban történő blokkolást követően a membránokat a primer antitestekkel inkubáltuk TRPV1 ellen kecskében termeltetett poliklonális antitesttel (Santa Cruz, San Diego, CA), 1:200 hígításban, szobahőmérsékleten, 2 órán át. A vizualizáláshoz torna peroxidázzal konjugált, kecske IgG ellen számarban termeltetett másodlagos antitestet (1:10000, Santa Cruz) és Western blotting luminal reagenst (Santa Cruz, UK) használtunk. Az újabb antitest-jelölés (nyúlban termeltetett anti- β -aktin, loading kontrollként, 1:1000, Cell Signaling, MA, USA) előtt a membránokat 0,5% Tween-20-szal (pH 3,0) kiegészített 0,2 M glicin „stripping” pufferrel letisztítottuk („strippeltük”). A képeket a Syngene GeneTools szoftverével analizáltuk.

2.8. Anandamidfelszabadulás vizsgálata

A tenyészeteket kétszer mostuk HBSS-HEPES pufferben (mmol/l: NaCl 111, KCl 3, $MgCl_2$ 0,49, $CaCl_2$ 1,27, glükóz 5,5, $MgSO_4$ 0,4, KH_2PO_4 0,44, Na_2HPO_4 0,33, HEPES 10, 100 nM MAFP, pH 7,4), majd 5 percig inkubáltuk HBSS-HEPES pufferben, vagy HBSS-HEPES pufferben oldott Tocrisolve-ban (Tocris; 1%), 20:4-NAPE-ben (30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M), vagy kapszaicinben (100 nM). Néhány kísérletet $CaCl_2$ hiányában és 10 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA, Sigma) hozzáadásával végeztünk. Minden mosás és inkubáció 37 °C-on történt, kivéve, ahol az eredmények fejezetben külön jeleztük a szobahőmérsékletet.

A felülúszókat ezután jégen gyűjtöttük, ahonnan a lipidek vagy azonnal extrakcióra kerültek, vagy további felhasználásig a felülúszókat -80 °C-on tartottuk. A felülúszó eltávolítását követően a sejteket azonnal felkapartuk, majd jéghideg sejt-lízis pufferbe helyeztük, BCA Protein Assay Reagens segítségével történő fehérjemeghatározás céljából.

Néhány kísérletben csak az adott fedőlemezen tenyésztett sejtek 10%-át használtuk fehérjemeghatározáshoz, 90%-ot metanolban tároltunk az anandamid kimutatásához.

Kontrollként HBSS-HEPES pufferben oldott 100 μ M 20:4-NAPE anandamidtartalmát mértük meg szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on történő, 5 perctől 5 óráig terjedő állást követően.

2.9. Az anandamid mennyiségi meghatározása

Az anandamid jelenlétét a felülúszóban elsőként vékonyréteg kromatográfiával mutattuk ki. Ehhez két patkányból származó 12 fedőlemeznnyi (6 kontroll, és 6 100 μ M 20:4-NAPE-pel kezelt) sejttenyészet felülúszójából extraháltuk a lipideket etilacetáttal. Az etilacetátot ezután folyamatos N_2 -áramoltatás alatt elpárologtattuk, majd a lipideket

acetonitrilben feloldottuk. A mintákat TLC szilika gélen (60 F254; Merck, UK) választottuk el. A mozgó fázis kloroform, etanol és víz 70:27:3 arányú keveréke volt. A lipideket kálium-permanganáttal vizualizáltuk.

Vizsgálataink legkritikusabb, legnehezebben megvalósítható lépése a vélhetően nanogramnyi mennyiségben termelődő anandamid mennyiségi meghatározása. Három olyan laborral sikerült munkakapcsolatot teremtenünk, ahol némileg különböző módszerekkel ugyan, de képesek voltak a mérések kivitelezésére. A különböző laborokból kapott eredmények összevethetőségének ellenőrzése érdekében a kísérletek egy részéből származó mintákat a három labor ismételtén vizsgálta, a kísérletek többségéhez azonban egy labor (egy mérési módszere) tartozik. Az eredmények fejezetben az adott kísérleteknél így mindig jeleztük, hogy azt éppen melyik módszerrel („A”, „B”, „C” protokoll) mérték.

2.9.1. „A” protokoll

Etilacetátos extrakciót, N₂-es bepárlást, majd acetonitrilben történő visszaoldást követően az anandamid mennyiségének meghatározása ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tandem elektropray tömegspektrometria (UHPLC-ESI-MS/MS) módszerrel történt Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 30 mm) oszlopon (Waters, UK) és Acquity UPLC BEH C₁₈ VanGuard előtétoszlopon (Waters, UK). A kolonnatér hőmérséklete 60 °C volt a mérések során az alkalmazott Shimadzu Nexera UHPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Japan) készüléken. A mozgó fázis A (0,1% hangyasavat tartalmazó víz) és B (0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril) komponensből állt, a következő gradiens program szerint: a 0. percben 2% B; 1,8 perctől 2,3 percig 95% B; 2,31 percnél 2% B, majd a 3. percnél 2% B. A mintatér hőmérséklete 4 °C volt a mérések során. A vegyületeket (a kromatográfia során elválasztandó anyagokat) tandem elektropray tömegspektrometriával detektálták pozitív ion módban (API 4000, ABSciex, CA, USA), MRM módban (többszörös reakciómonitorozás) m/z 348,5>62,0 és m/z 348,5>91,052 átmeneteken az anandamid, valamint m/z 260,420>116,200 átmeneten propranolol esetén, melyet belső standardként alkalmaztak. Az anandamidkoncentrációkat a belső standardra (Analyst 1.5.1, ABSciex) adott relatív válaszokból számolták.

2.9.2. „B” protokoll

A felülúszó lipidjeit szilárd fázisú extrakcióval nyerték ki. A felülúszókhoz, pufferekhez és sejtmintes kontrollokhoz okta-deuterált anandamidot (2,5 pmol/ml, Cayman Chemicals) adtak, és kondicionált Oasis HLB (1 cc, 30 mg) oszlopokra (Waters) vitték fel. Az

oszlopokat 40% metanollal mosták, majd 1 ml acetonitrillel (Fisher Scientific, UK) eluálták a mintákat. Az eluátumokat bepárlás után 80 µl acetonitrilben vették fel. Az anandamid mennyiségi meghatározását UHPLC-ESI-MS/MS módszerrel végezték Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm) oszlopon (Waters), 40 °C-on, Acquity UHPLC rendszeren (Waters). A mozgó fázis A (0,1% hangyasavat és 5% acetonitrilt tartalmazó 2 mM ammónium-acetát vizes oldata) és B (0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril) komponensből állt, a következő gradiens program szerint: az első 0,5 percben 20% B; 2,5 perctől 3,5 percig 100% B; majd a 4. percre visszacsökkentve 20% B-re. A mintatartó teret végig 4 °C-on tartották. A vegyületeket elektropray ionizációs tömegspektrometriával detektálták pozitív ion módban (Quattro Premier tandem mass spectrometer, Waters), MRM módban (többszörös reakciómonitorozás) m/z 348,25>61,85 átmeneten anandamid, és m/z 356,4>63,0 átmeneten okta-deuterált anandamid esetén, melyet belső standardként alkalmaztak. Az anandamid koncentrációkat a belső standardra (Quanlynx, Waters) adott relatív válaszokból számolták.

2.9.3. „C” protokoll

A sejtek és a felülúszó együttes anandamidtartalmának mérésére alkalmazott módszer. A mintákat azonos térfogatú kloroform/metanol 1:1 arányú keverékében 5 pmol okta-deuterált anandamiddal (Cayman Chemicals) kezelték, majd egy percig ultrahangos fürdőben szonikálták. A vizes fázist azonos térfogatú kloroformmal kétszer extrahálták. Három összegyűjtött szerves fázist liofilizálták, mini szilika oszlopokon tisztították. Az anandamidot tartalmazó szilika oszlop frakciókat folyadék kromatográfia/légköri nyomású kémiai ionizáló tandem tömegspektrometriai (APCI-LC/MS/MS) módszerrel elemezték. A mérést SIM módban (egy kiválasztott ion monitorozása), 356 és 348 m/z értékeken (rendre deuterált anandamid, illetve anandamid) Shimadzu LCMS-2020 quadrupole MS-hez kötött Shimadzu HPLC készülékkel (LC-10ADVP) Shimadzu Scientific Instruments) végezték.

2.10. Kobalt akkumuláció vizsgálata

A fedőlemezre letapadt sejteket „A” pufferben (mmol/l: NaCl 57,5, KCl 5, MgCl₂ 2, HEPES 10, glükóz 12, szacharóz 139, pH 7.4) mostuk, majd kobalt-felvétel pufferben („A” puffer 5 mM CoCl₂-dal) oldott 20:4-NAPE-pel (100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) vagy kapszaicinnel (500 nM) inkubáltuk 5 percig 37 °C-on. A kontroll kobalt-felvétel puffer egyéb vegyszert nem tartalmazott. A TRPV1 szerepének vizsgálatakor a TRPV1 antagonistá kapszazepin (5 µM), a CB1 szerepének vizsgálatakor a CB1 antagonistá rimonabant (200 nM) jelenlétében inkubáltuk a sejteket a kezelést megelőző két percben, illetve a vizsgált agonista

a kezelés teljes időtartama alatt (további 5 perc) jelen volt a kobalt-felvétel pufferben. A sejtekbe felvett kobaltból 2,5% β -merkaptóetanollal (Sigma) csapadékot képeztünk. A sejteket 70% etanolban fixáltuk, végül a fedőlemezeket glicerollal fedve tárgylemezre fordítottuk. Leica fénymikroszkóphoz kapcsolt számítógépen QWin programcsomag (Leica) alkalmazásával felvételeket készítettünk, melyeken fedőlemezenként legalább 100 sejtet véletlenszerűen kiválasztva az átlagos színintenzitást ImageJ programmal (NIH, USA) elemeztük.

2.11. Fluoreszcens Ca^{2+} -koncentrációmérés

A sejtek kalciumhomeosztázisának vizsgálatára két fluoreszcens módszert alkalmaztunk. A kísérleteket részben Fura-2 acetoximetilészterrel (Fura-2 AM, 5 μM ; Molecular Probes, OR, USA) töltött sejteken PTI (PTI, NJ, USA) rendszeren, részben Fluo-4 acetoximetilészterrel (Fluo-4 AM, 10 μM) töltött sejteken Zeiss LSM 5 LIVE konfokális mikroszkópon végeztük.

2.11.1. Fluoreszcens Ca^{2+} -koncentrációmérés egyedi sejteken

A sejteket 2 mM probenecid (Molecular Probes) jelenlétében, 37 °C-on, 60 percig inkubáltuk 5 μM Fura-2 AM-et tartalmazó HEPES-pufferelt sóoldatban (mmol/l): NaCl, 122; KCl, 3,3; CaCl_2 , 1,3; MgSO_4 , 0,4; KH_2PO_4 1,2; HEPES, 25; glükóz, 10; pH 7,3. A festékkel feltöltődött sejteket tartalmazó tárgylemezt perfúziós kádban rögzítettük, a kádat folyamatosan külső oldattal (mmol/l: NaCl 160; KCl 2,5; CaCl_2 1; MgCl_2 2; HEPES 10; glükóz 10; pH 7,3) áramoltattuk (2 ml/min, Warner Instrument Corp., UK). A következő tesztoldatokat manuálisan adagoltuk a sejtekre: 20:4-NAPE (50 μM), kapszaicin (1 μM), anandamid (30 μM) mustárolaj (50 μM ; Sigma) és KCl (50 mM). A tesztoldatokat 30-90 másodpercig hagytuk a sejtek környezetében, majd a külső oldat átáramoltatásával kimostuk. A TRPV1 szerepének vizsgálatakor a TRPV1 antagonistá kapszazepin (5 μM), a CB1 szerepének vizsgálatakor a CB1 antagonistá rimonabant (200 nM) jelenlétében inkubáltuk a sejteket a 20:4-NAPE és kapszazepin, 20:4-NAPE és rimonabant, valamint kapszaicin és kapszazepin, kapszaicin és rimonabant kezelést megelőző 60 másodpercben. Kizárólag KCl-érzékeny sejteket értékeltünk, valamint fedőlemezenként csak egy látóteret. Néhány kísérlet végén ionomicint (5 μM , Sigma) is adagoltunk. A mérések során a sejteket 37 °C-on tartottuk, kivéve azokban az esetekben, ahol kifejezetten a hőmérsékletkülönbségek hatását vizsgáltuk. Ezeket az Eredmények fejezetben jeleztük.

A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -ot kötött Fura-2 AM abszorpciós maximuma eltér a Ca^{2+} -ot nem kötött festékétől, így a két különböző abszorpciós maximumnak (340 és 380 nm) megfelelő hullámhosszon gerjesztve a sejteket, a két hullámhosszon való gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámolható (Grynkiewicz és munkatársai 1985). A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezése biztosította (Delta ScanTM, Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA). Az emittált fényt 510 nm-en detektáltuk. A jeleket 1 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, ezt a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből. A regisztrátumokat számítógéppel rögzítettük, ImageMaster 5.0 programmal (PTI) értékeltük.

2.11.2. Fluoreszcens Ca^{2+} -koncentrációmérés konfokális mikroszkóppal

A poly-DL-ornitinnel bevont üvegaljú petri-csészében tenyésztett sejteket 37 °C-on inkubáltuk 10 μM Fluo-4 AM-et tartalmazó Ham's F12 tenyésztőoldatban, amit 60 perc elteltével a következő összetételű külső oldatra cseréltünk (mmol/l): NaCl 160; KCl 2,5; CaCl_2 1; MgCl_2 2; HEPES 10; glükóz 10; pH 7,3. A tesztoldatokat (20:4-NAPE 50 μM , kapszaicin 1 μM és KCl 50 mM), valamint az antagonistákat (kapszazepin 5 μM , rimonabant 200 nM) az előző pontban (2.12.2.) részletezettekhez hasonlóan adagoltuk, a sejteket 37 °C-on vagy szobahőmérsékleten tartva.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció változására utaló fluoreszcenciaintenzitás változásokat Zeiss LSM 5 LIVE konfokális mikroszkóppal követtük.

2.12. Árammérés

Axopatch 200B erősítő és Digidata 1200 jelátalakító (Molecular Devices, UK) segítségével feszültség-clamp körülmények között teljes-sejt áramokat mértünk 15-30 μm átmérőjű tenyésztett érzőneuronokon. A pipettákat (4-6 M Ω) boroszilikát üvegkapillárisból húztuk DMZ pipetta-húzón (DMZ, Németország), és a következő összetételű oldattal töltöttük fel (mmol/l): NaCl 5, KCl 150, MgCl_2 2, HEPES 10, EGTA 1; pH 7.4. A külső oldat összetétele a következő volt (mmol/l): NaCl 150, KCl 5, MgCl_2 2, CaCl_2 2, HEPES 10, glükóz 10; pH 7,4. A méréseket 37 °C-on végeztük. A szereket egy 0,5 mm belső átmérőjű műanyag csövön keresztül adagoltuk a külső oldathoz, kb. 100 μm távolságra a vizsgált sejttől.

A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 8.0 szoftvert (Molecular Devices, USA) alkalmaztunk, 1 kHz adatgyűjtési frekvenciával és 5 kHz szűréssel. A kísérletek során a sejteket -60 mV-os tartópotenciálon tartottuk.

A sejteket akkor tekintetük anandamidra vagy kapszaicinre érzékenynek, ha a szer adagolásával egyidejűleg az áram változása meghaladta az 50 pA-t.

2.13. Statisztikai módszerek

Az ismételt kísérletekből származó adatokat átlagoltuk. Az átlagok közötti különbségeket Student-féle t-próbával, egytényezős vagy többtényezős varianciaelemzéssel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Amikor az ANOVA a csoportok inhomogenitását mutatta, a csoportok különbözőségét páronként Fisher-féle egzakt teszttel vizsgáltuk meg. A különféle szerek adagolására válaszoló neuronok arányát szintén Fisher-féle egzakt teszttel hasonlítottuk össze. A bemutatásra kerülő adatoknál átlag±standard hiba értékeket tüntettünk fel. A különbséget $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak. Az n értékek az esetszámokat (tenyészetek száma western blot, immuncitokémia, anandamidfelszabadulás, kobalt akkumuláció és qPCR esetén, látóterek száma Ca^{2+} -koncentrációmérések, végül sejtek száma árammérés és Ca^{2+} -koncentrációmérések esetén) jelentik. Minden egyes tenyészet egyetlen állat ganglionjaiból készült.

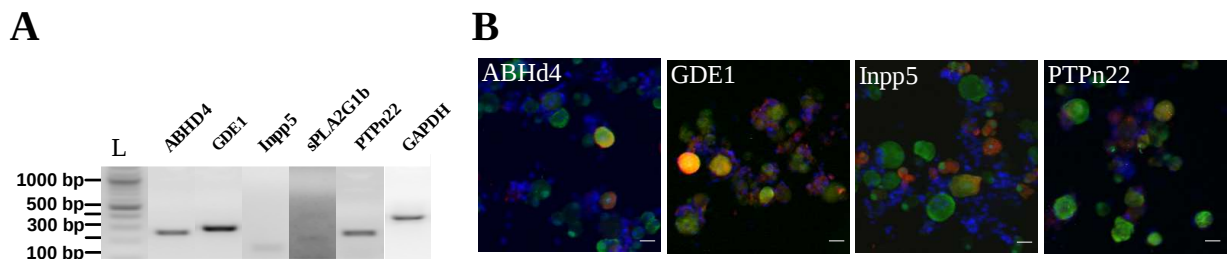
3. Eredmények

3.1. Anandamid termelődik primer érzőneuronokban

3.1.1. A primer érzőneuronok több anandamidszintetizáló útvonallal rendelkeznek

Patkány hátsógyöki ganglionokból tenyésztett primer érzőneuronok RT-PCR vizsgálata azt mutatta, hogy minden olyan enzim génje jelen van a sejtekben, amelynek szerepe ismert az aciletanolaminok, köztük az anandamid szintézisében (7A ábra). A termékek mérete jól korrelált a várt méretekkel. Mennyiségük változó volt, legtöbbnek a GDE1 expresszióját találtuk, legalacsonyabbnak a PTPn22-é bizonyult (7A ábra).

Következő lépésben az enzimek expresszióját immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az érzőneuronok szubpopulációin ABHd4, GDE1, Inpp5 és PTPn22 fejeződik ki (7B ábra). Neuronális markerrel (NeuN) együtt festve azt találtuk, hogy míg az Inpp5 és a PTPn22 csak idegsejteken van jelen, addig a GDE1 és az ABHd4 különféle nem-neurális sejteken is megtalálható (7B ábra).



7. ábra. A Ca^{2+} -független anandamidtermelő útvonalak enzimjeinek kifejeződése tenyésztett érzőneuronokban (A) Reprezentatív kép a polimeráz láncreakció gélen megjelent termékeiről. Az "L" a létrát jelöli. A termékek a DRG tenyészetből izolált teljes RNS reverz transzkripciója során kapott cDNS-re specifikus primerek segítségével felsokszorozott DNS szakaszok. Bár mind az öt ismert Ca^{2+} -független, anandamid termelésére alkalmas enzim mRNS-e jelen van az érzőneuronokban, mennyiségük változó. Legnagyobb mennyiségben a GDE1 mRNS-ét tudtuk kimutatni, legalacsonyabb szintűnek PTPn22 bizonyult. (B) Reprezentatív képek a Ca^{2+} -független anandamidtermelő enzimek ellen termeltetett antitestekkel (piros), és a neuronokat specifikusan felismerő NeuN (zöld) antitesttel jelölt érzőneuronokról. A DAPI (kék) a sejtmagokat jelöli. Az ABHd4, GDE1, Inpp5 és PTPn22 elleni antitestek specifikus jelet adtak a sejtek egy-egy alcsoportján, a sPLA2G1b elleni antitesttel azonban nem jelölődtek neuronok. A GDE1 és az ABHd4 elleni antitestek a neuronokon kívül néhány nem-idegi sejthez is kötődtek. A skála 25 μm -nek felel meg.

A sPLA2G1b elleni antitest nem jelölt neuronokat a tenyészetben, annak ellenére, hogy az antitest a pozitív kontrollként alkalmazott hasnyálmirigy metszeten a várt jelölést eredményezte.

3.1.2. A NAPE anandamidtermelést indukál a tenyésztett érzőneuronokban

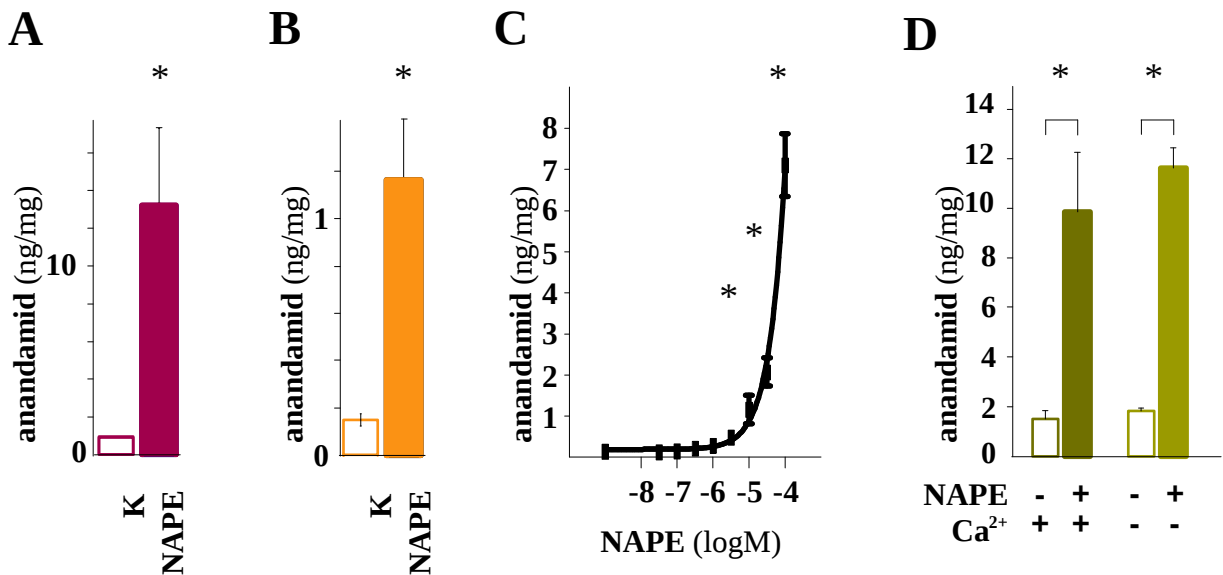
Miután több olyan enzim jelenlétét kimutattuk az érzőneuronokban, melyekről tudjuk, hogy szerepet játszhatnak az anandamid szintézisében, megvizsgáltuk, hogy ténylegesen betöltik-e ezt a szerepet, azaz termelnek-e anandamidot a patkány hátsógyöki ganglionokból készült tenyészetekben. Az összes ismert, anandamidot szintetizáló útvonal közös szubsztrátja a 20:4-NAPE (3. ábra; Leung és munkatársai 2006, Simon és Cravatt 2008, 2010, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004, Ueda és munkatársai 2013). Feltételeztük, hogy amennyiben a sejtek funkcionális enzimekkel rendelkeznek, exogén 20:4-NAPE adásakor anandamidot fognak termelni. Első lépésben ezt a feltételezett anandamidtermelést ellenőriztük vékonyréteg kromatográfiával. A tenyészetek felülúszóiban 5 percig tartó 100 μ M 20:4-NAPE kezelés hatására anandamid jelent meg (8. ábra). Az anandamidon kívül egy másik lipid is megjelent a kromatogramon, melyről migrációja és nagy mennyisége alapján úgy gondoljuk, hogy maga a 20:4-NAPE.

Anandamid kialakulását követően egy sor más lipid termelődhet, köztük 18:1 lizofoszfatidsav (18:1-LPA), melynek endovanilloid tulajdonságára nemrég derült fény (Nieto-Posadas és munkatársai 2011). Vékonyréteg kromatográfiával azonban nem találtunk 18:1-LPA-t sem a kezelt, sem a kezeletlen sejtek felülúszóiban.

A különböző körülmények közötti 20:4-NAPE kezelések okozta anandamidtermelés mennyiségi meghatározása előtt meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy az anandamidot valóban a tenyésztett idegsejtek termelik, nem pedig pusztán az oldatban spontán végbemenő reakcióról van szó (melyről irodalmi adat sajnos nem állt rendelkezésre). Ehhez szobahőmérsékletű, valamint 37 °C-os, sejtmentes pufferben tartottunk 100 μ M 20:4-NAPE-t, és időnként megmértük, keletkezett-e a pufferben anandamid. Csekély mennyiséget sikerült ugyan a sejtmentes pufferből kimutatni, de még a legmagasabb koncentráció is mintegy ötvened része volt annak, amit sejtek kezelésekor mértünk. A sejtmentes pufferben mért anandamid mennyisége mellesleg nem mutatott összefüggést sem a hőmérséklettel, sem a 20:4-NAPE pufferben tartásának időtartamával (legmagasabb koncentrációt [0,15 ng/ml] 5 perc elteltével mértünk, 37 °C-on, legalacsonyabbat [0,023 ng/ml] 2,5 óra után, szintén 37 °C-on).

Egymástól független kísérletekben, két különböző módszerrel mérve erősítettük meg a vékonyréteg kromatográfia eredményét: 5 percig tartó, 37 °C-on történő, 100 μ M 20:4-NAPE kezelés szignifikáns anandamidtartalom növekedést idéz elő a sejtenyészetek felülúszóiban. Az "A" protokoll szerint mérve a felülúszó anandamidtartalma $0,02 \pm 0,001$ ng/ml-ről ($0,04 \pm 0,04$ ng/mg protein) $9,6 \pm 2,6$ ng/ml-re ($12,55 \pm 5,5$ ng/mg protein) nőtt ($n=3$). A sejtek kezelése 20:4-NAPE nélküli kontroll oldattal (Tocrisolve) nem változtatott az anandamid mennyiségén ($0,006 \pm 0,004$ ng/ml, fehérjemennyiségre normalizálva $0,01 \pm 0,01$ ng/mg; $n=3$).

A "B" protokoll alapján mérve 100 μ M 20:4-NAPE kezelés a méréshatár alatti értékről $13,26 \pm 4,4$ ng/mg protein értékre növelte az anandamid koncentrációját 37 °C-on ($n=4$; 8A ábra), míg szobahőmérsékleten ez az anandamidtermelés egy nagyságrenddel kisebb volt (8B ábra). A 20:4-NAPE által indukált anandamidtermelés koncentrációfüggőnek bizonyult ("A" protokoll, 8C ábra). A legalacsonyabb 20:4-NAPE koncentráció, amely már szignifikáns anandamidtermelést okozott, 1 μ M volt.



8. ábra. 20:4-NAPE adagolással kiváltott Ca²⁺-független anandamidtermelés tenyésztett primer érzőneuronokban. (A) 5 percen keresztül, 37°C-on, 100 μ M 20:4-NAPE jelenlétében (NAPE) inkubálva a DRG tenyészetet a felülúszó anandamidkoncentrációja szignifikánsan nő a 20:4-NAPE-t nem tartalmazó kontroll oldatban (K) történő inkubáláshoz képest. A mennyiségi meghatározást lipidextrakciót követően UHPLC-ESI-MS/MS módszerrel végezték ("B" protokoll, $n=4$). (B) 5 percen keresztül, 100 μ M 20:4-NAPE jelenlétében (NAPE) inkubálva a DRG tenyészetet a felülúszó anandamidkoncentrációja szobahőmérsékleten is szignifikánsan nő a 20:4-NAPE-t nem tartalmazó kontroll oldatban (K) történő inkubáláshoz képest ($n=3$). (C) A DRG tenyészetek 20:4-NAPE-inkubálása 30 nM és 100 μ M közötti koncentrációtartományban koncentrációfüggően emeli a felülúszó anandamidtartalmát ($n=3$ minden mérési ponton). (D) A kalciummegvonás nem változtatja meg sem a bazális, sem a 100 μ M 20:4-NAPE hatására megnövekedett anandamidkoncentrációt ($n=3$ minden mérési ponton, * szignifikáns eltérés).

3.1.3. A NAPE által indukált anandamidszintézis kalciumfüggése

Az anandamid Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független útvonalakon is szintetizálódik (Leung és munkatársai 2006, Simon és Cravatt 2008, 2010, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004, Ueda és munkatársai 2013). Annak eldöntésére, hogy a 20:4-NAPE Ca^{2+} -függő vagy Ca^{2+} -független útvonalakat aktivál-e, Ca^{2+} jelenlétében és Ca^{2+} hiányában is kezeltük a sejteket 100 μM 20:4-NAPE-vel. Önmagában a Ca^{2+} jelenléte nem befolyásolta a felülúszó anandamidkoncentrációját (rendre $0,62 \pm 0,4$ ng/mg protein; $n=3$, és $0,98 \pm 0,1$ ng/mg protein; $n=3$; 8D ábra). 100 μM 20:4-NAPE kezelés szignifikánsan, egyenlő mértékben növelte az anandamidkoncentrációt Ca^{2+} jelenlétében ($9,57 \pm 2,6$ ng/mg protein; $n=3$) és annak hiányában is ($11,47 \pm 0,9$ ng/mg protein; $n=3$; 8D ábra).

Az, hogy a 20:4-NAPE hatására Ca^{2+} hiányában is ugyanannyi anandamid termelődik, mint Ca^{2+} jelenlétében, meglepő eredmény, hiszen ismert, hogy a tenyésztett érzőneuronok egy része, többek között a nociceptív sejtek képesek Ca^{2+} -függő anandamidszintézisre (van der Stelt és munkatársai 2005). Ellenőrzésként, hogy a mi tenyészetünk is mutatja ezt a tulajdonságot, a sejtekre 5 percre 100 nM kapszaicint adagoltunk, mely TRPV1 csatornákon keresztül Ca^{2+} influxot hoz létre a nociceptív sejtek többségében (Caterina és munkatársai 1997, Nagy és Rang 1999, Wood és munkatársai 1988). A kapszaicinkezelés 0,13 ng/mg proteinre emelte a felülúszó anandamidtartalmát ($n=2$), amely ugyan számottevően alacsonyabb, mint ami 20:4-NAPE hatására mérhető, de alátámasztja, hogy legalább néhány nociceptív sejt Ca^{2+} -függetlenül termel anandamidot.

3.1.4. A termelt anandamid egy része a sejtekben marad

Felmerült a kérdés, hogy a sejtekben termelt anandamid kikerül-e teljes egészében az extracelluláris térbe, azaz a felülúszóban a teljes termelt mennyiséget határozzuk-e meg. A kérdés tisztázására a „C” protokoll alkalmazásával elkezdtük az anandamid mennyiségi meghatározását sejtekből is (a továbbiakban a felülúszón kívül a tenyészet sejtjeinek 90%-át is erre használtuk, a maradék 10%-ot az összes fehérje mennyiségének megállapítására tartottuk fenn). A sejtek és a felülúszó összes anandamidkoncentrációja 0,09 ng/mg proteinről 100 μM 20:4-NAPE hatására 28,03 ng/mg proteinre ($n=2$) nőtt. Ez a csak felülúszóból kimutatott mennyiség nagyjából háromszorosa, ami legegyszerűbben azzal magyarázható, hogy a sejtek által termelt anandamid kétharmada sejten belül marad.

Mindezen eredmények azt bizonyítják, hogy a tenyésztett érzőneuronok egy szubpopulációja 20:4-NAPE jelenlétében anandamidot termel. Munkánk további részében

arra igyekeztünk választ kapni, hogy a termelt anandamidnak milyen hatásai vannak egyik fontosnak tartott célpontjára, a TRPV1 receptorra.

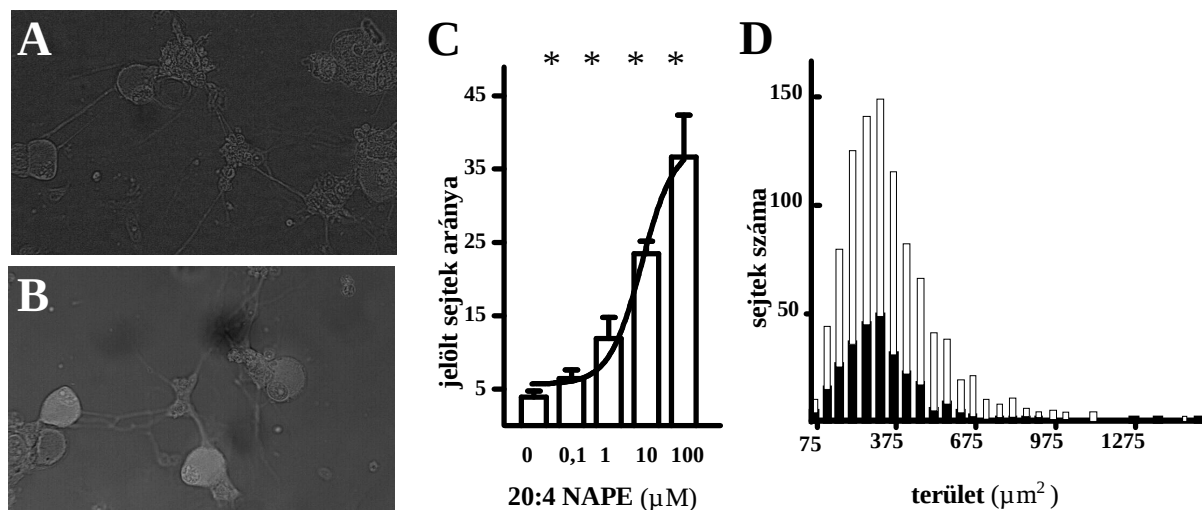
3.2. A NAPE stimulálja az elsődleges érzőneuronokat

3.2.1. NAPE jelenlétében kobalt akkumulálódik a tenyésztett érzőneuronokban

Ismert, hogy érzőneuronokon a TRPV1 receptorok stimulálása exogén anandamiddal kobalt akkumulációt eredményez (Sathianathan és munkatársai 2003, Singh-Tahim és munkatársai 2005, Mahmud és munkatársai 2009). A következőekben megvizsgáltuk, hogy az endogén anandamidnak is van-e ilyen hatása.

Kobaltot tartalmazó kontroll pufferben a neuronok $3,9 \pm 1\%$ -a mutatott kobalt jelölődést (9A ábra, $n=10$). Kapszaicin (500 nM) hatására a kobalttal jelölt sejtek aránya szignifikánsan nőtt ($37,5 \pm 3\%$, $n=10$; 9B ábra). Hasonlóan, a 20:4-NAPE hatására a kobalttal jelölt sejtek aránya szignifikánsan nőtt, mely hatás koncentrációfüggőnek bizonyult (9C ábra). A legalacsonyabb 20:4-NAPE koncentráció, amely még szignifikáns kobalt akkumulációt okozott, $0,1 \mu\text{M}$ volt ($6,4 \pm 1\%$, $n=4$). Többségében kisméretű neuronok jelölődtek (9D ábra).

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy 20:4-NAPE hatására kobaltpermeábilis ioncsatornák aktiválódnak, melyeket elsősorban kisméretű neuronok expresszálnak.

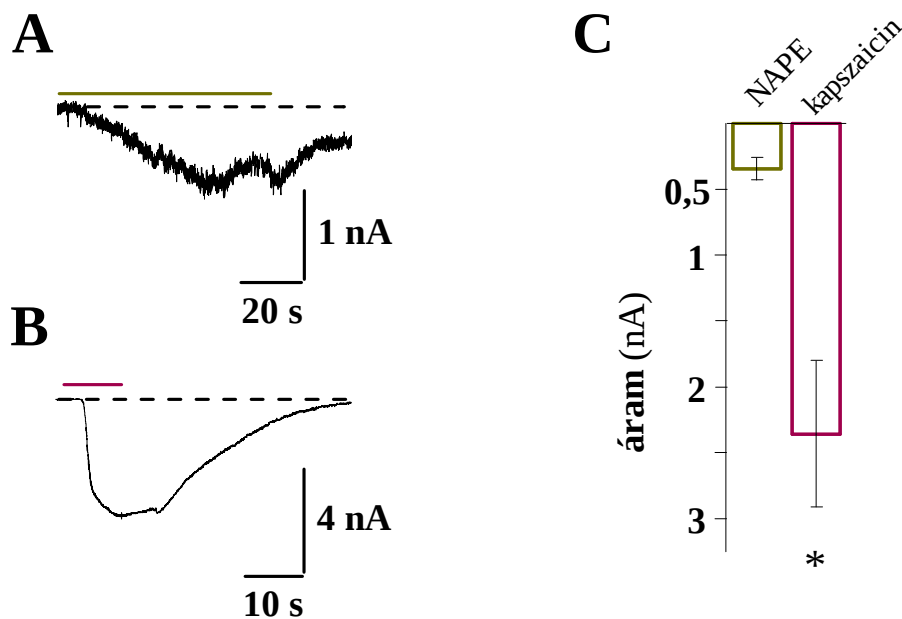


9. ábra. 20:4-NAPE adagolása kobaltfelvételt indukál a tenyésztett primer érzőneuronok egy részében. (A-B) Reprezentatív képek tenyésztett érzőneuronokról 5 mM CoCl_2 -ot tartalmazó kontroll (A), illetve 100 μM 20:4-NAPE-et is tartalmazó (B) pufferben történő ötperces inkubálást követően. A kobaltot felvett sejtek világosak. (C) A kobaltot felvett sejtek aránya 100 nM és 100 μM közötti tartományban az alkalmazott 20:4-NAPE koncentrációjától függ ($3 \leq n \leq 9$ az egyes pontokon, * szignifikáns eltérés). (D) A 20:4-NAPE által indukált kobaltfelvétel (fekete oszlopok) túlnyomó többségében a kis átmérőjű sejteket érinti. A fehér oszlopok a kobalttal nem jelölt sejteket képviselik.

3.2.2. A NAPE inward áramot hoz létre az érzőneuronok egy csoportjában

Annak megerősítésére, hogy a 20:4-NAPE valóban stimulálja a sejteket, teljes-sejt áramokat regisztráltunk a tenyésztett primer érzőneuronokon. Teljes sejt konfigurációban összesen 22 sejt inward áramát regisztráltuk 50 μ M 20:4-NAPE hatására (10A ábra). Outward árammal egyetlen sejt sem reagált. Néhány neuron inward árama még a 20:4-NAPE adagolás befejezése után is emelkedett. Éppen emiatt, a válaszok csúcsamplitudóját (ami $-0,41 \pm 0,1$ nA-nek adódott, $n=22$), mindig az adagolás időtartama alatt határoztuk meg.

A NAPE-re válaszoló sejtek közül 9 esetben megvizsgáltuk 500 nM kapszaicin hatását is, és mind a 9 esetben kaptunk választ (10B ábra), melyek amplitudója szignifikánsan nagyobb volt ($-2,36 \pm 0,6$, $n=9$), mint a NAPE-re adott válaszoké ($-0,35 \pm 0,1$ nA, $n=9$, Student-féle t-teszt, $p=0,002$; 10C ábra). A NAPE-re és kapszaicinre egyaránt reagáló sejteken kívül 27 olyat találtunk, mely csak kapszaicinre válaszolt, NAPE-re nem. Az oldószerekre egyetlen sejt sem válaszolt ($n=11$).



10. ábra. 20:4-NAPE adagolása inward áramot hoz létre a tenyésztett primer érzőneuronok egy részében. (A) 60 másodpercig tartó 50 μ M 20:4-NAPE adagolásakor regisztrált tipikus áram. (B) Az (A) regisztrátumon látható neuron 500 nM kapszaicin adására is reagál. (C) A kapszaicin (500 nM) szignifikánsan nagyobb áramot vált ki, mint a 20:4-NAPE (NAPE, 50 μ M, $n=9$, * szignifikáns eltérés).

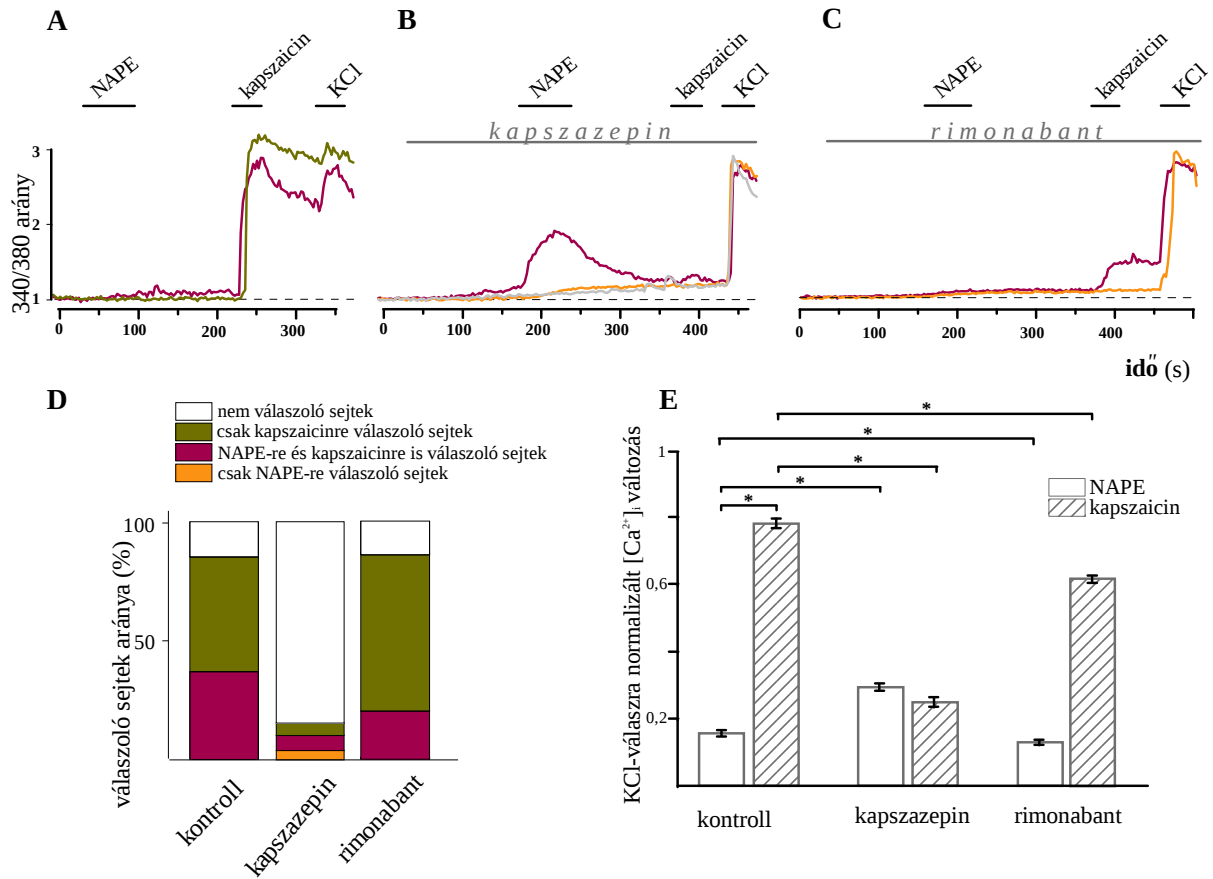
3.2.3. NAPE hatására az érzőneuronok intracelluláris kalciumkoncentrációja nő

Az endogén anandamid intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatásait 50 μM 20:4-NAPE adagolásával vizsgáltuk. Kontrollként a NAPE oldószerét (etanol és Tocrisolve), kapszaicint (1 μM) és KCl-ot (50 mM) alkalmaztunk.

Az oldószer adagolása 343 KCl-ra válaszoló sejt közül egyben sem váltott ki választ, kapszaicinre azonban 224 neuron reagált.

Egy percen keresztül tartó 20:4-NAPE adagolás hatására az 546 KCl-ra reagáló sejt közül 189-ben (35%, $n=6$) növekedett az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (11. ábra). Minden sejt, amely válaszolt 20:4-NAPE-re, kapszaicinre is érzékeny volt. Azokon a neuronokon kívül, melyek NAPE-re és kapszaicinre is reagáltak, az 545 sejtől további 273 válaszolt csak kapszaicinre (50%, $n=6$; 11D ábra). Így a kapszaicinre érzékeny sejtek aránya a teljes populációban összesen 85%-nak adódott ($n=6$), ami szignifikánsan magasabb annál, mint amit előzetes NAPE-adagolás nélküli kapszaicinhatásnál tapasztaltunk (343-ból 224 sejt, $n=4$). A 20:4-NAPE hatására kialakuló válaszok (a KCl-válaszra normalizálva) kisebbek voltak, mint a kapszaicinre adottak (NAPE / KCl = $0,15 \pm 0,01$, $n=189$, kapszaicin / KCl = $0,78 \pm 0,02$, $n=189+273=462$; 11E ábra). A 20:4-NAPE hatására lassabban alakult ki válasz, mint kapszaicin hatására (11A-C ábra).

Annak vizsgálatára, hogy a TRPV1 milyen szerepet tölt be a NAPE és a kapszaicin által kiváltott válaszok kialakításában, 5 μM kapszazepin adagolása után mértük a 20:4-NAPE (50 μM), majd a kapszaicin (1 μM) hatását. Ilyen körülmények között a 403 KCl-ra reagáló sejt közül 26 adott választ 20:4-NAPE-re és kapszaicinre is (6,45%, $n=5$; 11B,D ábra). A kapszaicin további 21 sejtben hozott létre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést, a NAPE pedig további 16 sejtben, azaz megjelentek NAPE-re igen, de kapszaicinre nem reagáló neuronok. A NAPE-re érzékeny sejtek aránya kapszazepin jelenlétében a teljes populációban mindössze 10%-nak adódott (403 neuron közül 42, $n=5$; 11D ábra), míg az összes kapszaicinérzékeny sejt aránya 12% (403 neuron közül 47, $n=5$; 11D ábra). Kapszazepin jelenlétében a NAPE-re és a kapszaicinre válaszoló sejtek aránya is szignifikánsan kisebb volt, mint kapszazepin nélkül (Fisher-féle egzakt teszt, $p < 0,0001$, 11D ábra). Elgondolkodtató, hogy a neuronok egy csoportja a kapszazepin adagolása közben (kb. 30 s elteltével) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést mutatott (11B ábra). Ugyanezekben a sejtekben 20:4-NAPE hatására is emelkedett az $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Kapszazepin hatására emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t korábban leírtak már különféle daganatos sejtvonalakban (Teng és munkatársai 2004, Huang és munkatársai 2006), de tenyésztett érzőneuronokban még nem. A jelenség további vizsgálata folyamatban van.



11. ábra. 20:4-NAPE adagolása növeli az érzőneuronok egy részének $[Ca^{2+}]_i$ -ját. (A-C) Reprezentatív görbék patkány tenyésztett érzőneuronok $[Ca^{2+}]_i$ -változásairól 20:4-NAPE (50 μ M), kapszaicin (1 μ M), valamint KCl (50 mM) adagolása közben. Néhány mérést 5 μ M kapszazepin (B) vagy 200 nM rimonabant (C) folyamatos jelenlétében végeztünk. (A) A neuronok egy része lassú $[Ca^{2+}]_i$ -növekedéssel válaszol 60 s-ig tartó NAPE adására, közülük mind válaszol kapszaicinre is (zöld görbe). Néhány kapszaicinérzékeny neuron azonban nem reagál NAPE adásakor (bordó görbe). (B) NAPE adására kapszazepin jelenlétében is lassú $[Ca^{2+}]_i$ -növekedéssel válaszol a sejtek egy része (narancssárga görbe), de többségük nem reagál kapszaicinre. Néhány sejtben a kapszazepinadagolás hatására enyhe $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés indul el (szürke görbe). (C) Rimonabant jelenlétében is megfigyelhető néhány neuron $[Ca^{2+}]_i$ -növekedése NAPE hatására (zöld görbe), de a kapszaicinérzékeny neuronok többsége NAPE-re nem válaszol (bordó görbe). (D) Az oszlopdiagram az agonistákra válaszoló neuronok arányát szemlélteti különböző körülmények között ($3 \leq n \leq 6$). A kapszazepin szignifikánsan csökkenti a kapszaicinre reagáló sejtek arányát. (E) Az oszlopdiagram a KCl-válaszokra normalizált, agonisták hatására jelentkező $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat foglalja össze kontroll oldatban, valamint kapszazepin és rimonabant jelenlétében (* szignifikáns eltérés, $96 \leq n \leq 455$).

A CB1 receptor szerepét a 20:4-NAPE által kiváltott válaszok kialakításában 200 nM rimonabant előkezeléssel vizsgáltuk (11C ábra). Rimonabant jelenlétében a 20:4-NAPE adagolására 498 KCl-érzékeny sejtől 105 reagált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel (21%, n=6; 11D ábra). Ez az arány szignifikánsan kisebb volt a rimonabant nélkül mért eredményektől (Fisher-féle egzakt teszt, $p < 0,0001$). A kapszaicinre válaszoló sejtek arányát azonban a rimonabant nem befolyásolta (498 neuron közül 421, 85%, Fisher-féle egzakt teszt, $p = 1$, 11D ábra). Az átlagos 20:4-NAPE-, és az átlagos kapszaicinválaszok amplitudóját a rimonabant szignifikánsan csökkentette (20:4-NAPE / KCl = $0,12 \pm 0,01$, Student-féle t-teszt, $p = 0,02$, kapszaicin / KCl = $0,61 \pm 0,02$, Student-féle t-teszt, $p < 0,0001$, 11E ábra).

Eredményeink arra utalnak, hogy a 20:4-NAPE okozta serkentő hatás függ a TRPV1-től, továbbá a 20:4-NAPE nem indukál CB1 által mediált gátlást.

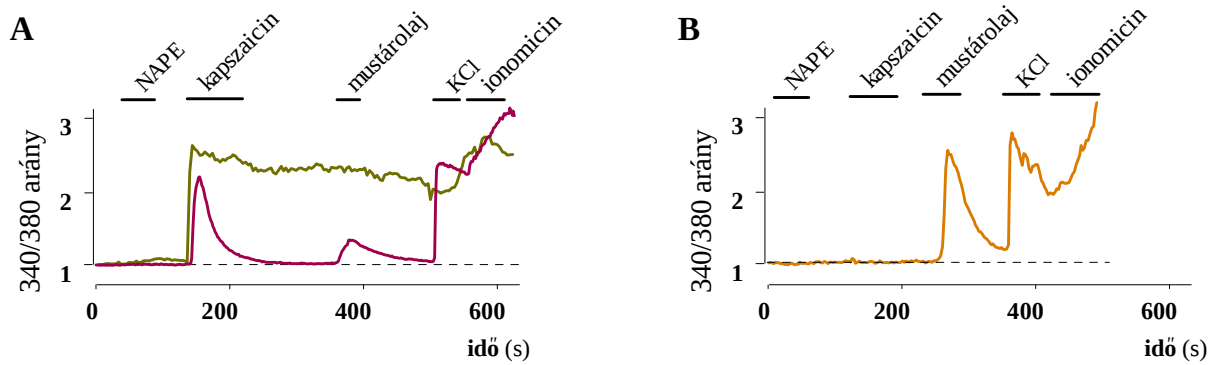
3.2.4. A NAPE indukálta $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés egér érzőneuronokban TRPV1-függő

Az a megfigyelés, hogy a 20:4-NAPE serkenti a TRPV1 agonista anandamid termelődését, valamint, hogy a 20:4-NAPE-re reagáló neuronok kapszaicinérzékenyek arra utal, hogy a 20:4-NAPE anandamid közvetítésével aktiválja a TRPV1-et. A TRPV1 20:4-NAPE-hatások közvetítésében betöltött szerepének megerősítésére kísérleteinket vad típusú és TRPV1 knock out egerekből tenyésztett érzőneuronokon folytattuk. A 20:4-NAPE-et 50 μ M koncentrációban alkalmaztuk.

68 sejt közül 10 mutatott $[Ca^{2+}]_i$ növekedést 20:4-NAPE adagolást követően (12A ábra). A patkányból tenyésztett neuronokhoz hasonlóan minden 20:4-NAPE-re érzékeny sejt válaszolt kapszaicinre (1 μ M) is, és a NAPE által kiváltott válaszok lassabban aktiválódtak, mint a kapszaicin által kiváltott válaszok (12A ábra). A WT egérből tenyésztett 68 neuron közül 32 csak kapszaicinre reagált, NAPE-re nem (47%; 12A ábra).

Ellentétben a WT egerek tenyészteteiben talált 20:4-NAPE-érzékeny neuronokkal, a KO egerekből származó hátsógyöki gangliontenyészetek egyetlen sejtje (n=59) sem reagált 20:4-NAPE-re (12B ábra). A vártak megfelelően, a KO egerekből származó hátsógyöki gangliontenyészetek egyetlen sejtje sem reagált kapszaicinre sem (12B ábra). Mustárolajra azonban 59 esetből 22-ben kaptunk választ (12B ábra), bizonyítva, hogy a tenyészet sejtjei válaszképesek olyan ligandra, melynek receptorával rendelkeznek.

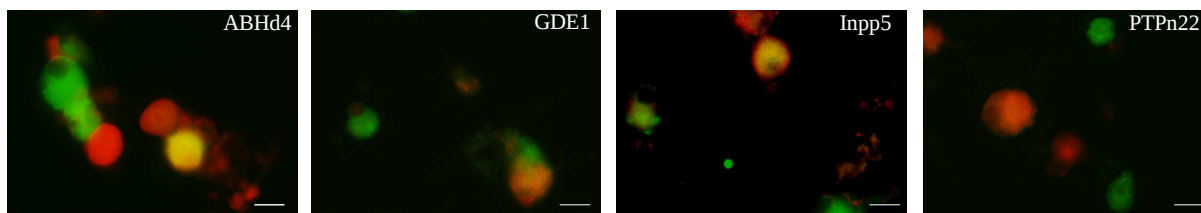
Ezzel megerősítést nyert, hogy a 20:4-NAPE általi hatások, melyek nagy valószínűséggel anandamid közvetítésével valósulnak meg, TRPV1-függőek.



12. ábra. Reprezentatív regisztrátumok vad típusú és TRPV1 KO egerek érzőneuronjainak 20:4-NAPE adagolására adott $[Ca^{2+}]_i$ változásáról. A tenyészetekre adagolt szerek koncentrációi: 20:4-NAPE 50 μ M, kapszaicin 1 μ M, mustárolaj 50 μ M, KCl 50 mM, ionomcin 5 μ M. A vad típusú (A) neuronok egy része válaszol NAPE adásakor (zöld görbe), melyek mindegyike válaszol kapszaicinre is. A kapszaicinre válaszolóknak viszont vannak olyanok, amelyek NAPE-re nem reagálnak (bordó görbe). TRPV1 KO egerekből (B) tenyésztett neuronok egyike sem ad választ sem NAPE, sem kapszaicin adására (narancssárga görbe).

3.3. A patkány hátsógyöki gangliontenyészet neuronjainak egy-egy csoportja egyszerre fejez ki TRPV1-et és anandamidszintézisben résztvevő enzimeket

A felülűszóban mérhető anandamid koncentrációja (~10 nM) nagyságrendekkel kisebb, mint az exogén anandamid érzőneuronokon hatásos koncentrációja (Ahluwalia és munkatársai 2003, Evans és munkatársai 2004, Fischbach és munkatársai 2007, Singh-Tahim és munkatársai 2005, Zygmunt és munkatársai 1999). Így jogosan merül fel a kérdés, hogy akkor mégis hogyan fejtheti ki az endogén anandamid a hatását. Azt feltételezzük, hogy a primer érzőneuronok által termelt anandamid autokrin úton hat, így lokálisan elég nagy koncentrációt érhet el a TRPV1 aktiválásához. Annak ellenőrzéseként, hogy hipotézisünknek adottak-e az anatómiai alapjai, kombinált immunfestéseket (13. ábra, 4. táblázat) végeztünk a TRPV1 és az egyes Ca^{2+} -független anandamidtermelő enzimek együttes kifejeződésének vizsgálatára. A TRPV1 elleni és a vizsgált enzimek elleni antitestekkel végzett kettős immunfestésekkel kiderült, hogy a GDE1-et, ABHD4-et és INPP5-öt expresszáló érzőneuronok jelentős hányada kifejezi a TRPV1-et is (13. ábra). A PTPN22 immunpozitív sejtek közül alig néhány mutat TRPV1 jelölődést (13. ábra).



13. ábra. A tenyésztett érzőneuronok egy-egy csoportja egyszerre fejez ki TRPV1-et és anandamidszintézisben résztvevő enzimeket. A tenyésztett érzőneuronokat együtt inkubáltuk TRPV1 elleni (zöld), valamint ABHd4, GDE1, Inpp5 vagy PTPn22 elleni (piros) antitestekkel (3. táblázat). A sárga színben megjelenő sejtek a két vizsgált molekula egyszerre történő kifejezésére utalnak. A skála 25 μ m-t jelöl.

	ABHd4	GDE1	Inpp5	PTPn22	sPLA2G1b
Enzimet expresszáló sejtek (%)	29,8 $\pm$ 2	40,3 $\pm$ 10	44,1 $\pm$ 2	48,5 $\pm$ 10	n.k.
TRPV1-et expresszáló sejtek (%)	50,6 $\pm$ 4	46,6 $\pm$ 3	56,2 $\pm$ 5	42,4 $\pm$ 2	n.a.
TRPV1-et expresszáló sejtek közül az enzimet is expresszálók (%)	23,1 $\pm$ 9	25,9 $\pm$ 3	64,9 $\pm$ 11	17,9 $\pm$ 8	n.a.
Enzimet expresszáló sejtek közül TRPV1-et is expresszálók (%)	13,3 $\pm$ 5	21,8 $\pm$ 4	51,3 $\pm$ 8	16,4 $\pm$ 5	n.a.

4. táblázat. Patkány hátsógyöki ganglionjaiból tenyésztett elsődleges érzőneuronok TRPV1-et és kalciumfüggetlen anandamidszintézisben résztvevő enzimeket külön-külön, valamint együtt expresszáló hányada (3-3 tenyészetből számolt arányok). n.k.: nem kimutatható, n.a.: nincs adat, ABHd4: α/β -hidroláz 4, GDE1: glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1, Inpp5: inozitol 5' foszfatáz, PTPn22: protein tirozin foszfatáz nem-receptor típus 22, sPLA2G1b: 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂

3.4. A TRPV1b kifejeződésének szerepe megkérdőjelezhető az érzékenység fokozásában gyulladásos körülmények között

3.4.1. A tenyésztett érzőneuronok TRPV1-et és TRPV1b-t egyaránt kifejeznek

A TRPV1b-ből részben (Lu és munkatársai 2005) vagy teljes mértékben (Schumacher és munkatársai 2000, Xue és munkatársai 2001) hiányzik a 7-es exon. Így a 7-es exont „körülvevő” primerpárunk a vártak megfelelően két különböző terméket sokszorozott fel, egy nagyobb, valószínűleg a teljes hosszúságú TRPV1-nek megfelelő, ~500 bázispárból álló,

valamint egy kisebb, valószínűleg a TRPV1b-nek megfelelő ~325 bázispárból álló terméket (14. ábra).

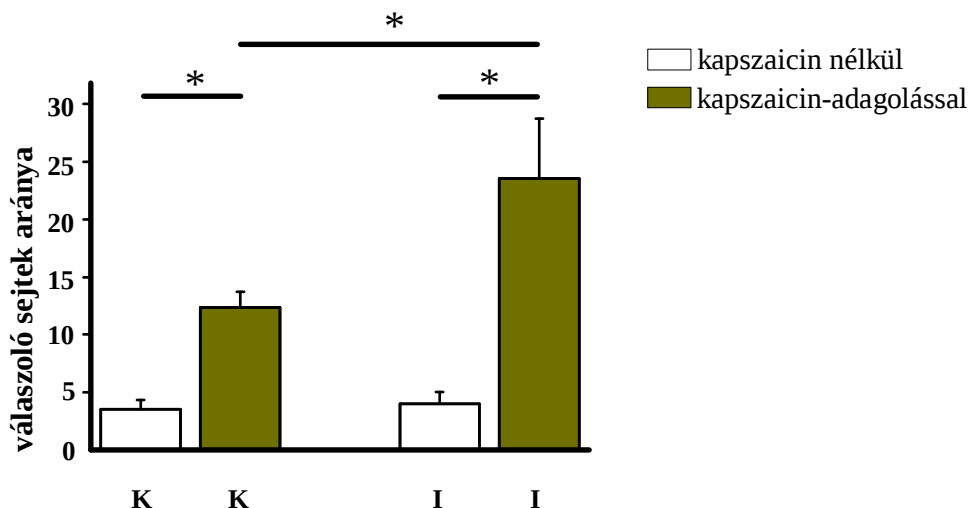


14. ábra. Reprezentatív kép a TRPV1 7-es exonja köré tervezett primerpár segítségével felszaporított, 325 és 500 bp méretű PCR termékekről.

A DNS szekvenálás igazolta, hogy a két termék két különböző szekvenciának felel meg. A nagyobb termék szekvenciája azonos annak az RT-PCR terméknek a szekvenciájával, amit a teljes hosszúságú TRPV1 (NM_031982, NCBI) jelenlétében vártunk, míg a kisebb, 322 bázispárból álló szekvencia szintén a *trpv1* gén része, a *trpv1* géntől 180 bázispárral (éppen a teljes 7-es exonnal) kevesebb. A termékek a kontroll és a gyulladásos környezetben tartott tenyészetekben megegyeznek.

3.4.2. A BK és PGE₂ jelenlétében tenyésztett érzőneuronok fokozottan érzékenyek kapszaicinre

Kapszaicinmentes kobaltfelvétel pufferben alig néhány neuron jelölődött a kontroll és a gyulladásos közegben tartott tenyészetekben is ($1,4 \pm 1\%$, $n=4$ kontroll, valamint $1,9 \pm 1\%$, $n=4$ gyulladásos tenyészet, 15. ábra). A jelölt sejtek aránya kapszaicinmentes pufferben nem különbözött egymástól szignifikánsan a kontroll és a gyulladásos közegben tartott tenyészetek között.

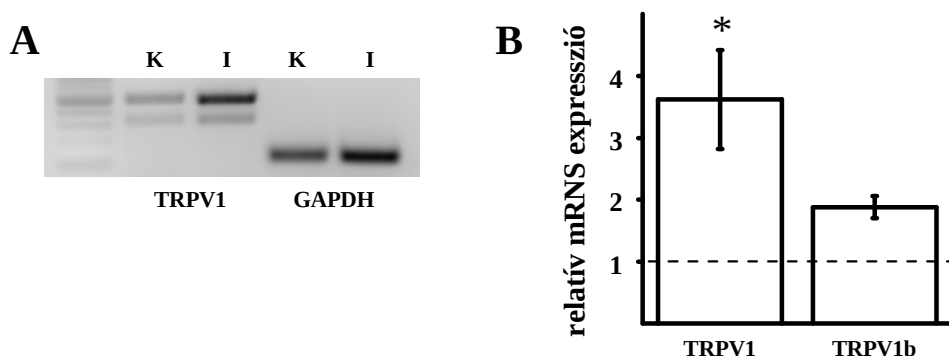


15. ábra. Kobaltot felvett sejtek aránya kapszaicinmentes pufferben (fehér oszlopok) és kapszaicin hatására (zöld oszlopok), kontroll körülmények között (K) és gyulladásos mediátorok jelenlétében (I). (* szignifikáns eltérés)

30 nM kapszaicin hozzáadása a kobaltfelvétel pufferhez szignifikánsan növelte a jelölt sejtek arányát a kontroll ($11,1 \pm 2\%$; $n=4$) és a gyulladásos tenyészetekben ($23,4 \pm 5,7\%$; $n=4$, 15. ábra) is, továbbá kapszaicin hatására a gyulladásos közegben tartott tenyészetekben szignifikánsan több sejt jelölődött, mint kontroll tenyészetekben.

3.4.3. A BK és PGE_2 jelenlétében tenyésztett érzőneuronok TRPV1 mRNS szintje nő, de a TRPV1b mRNS expressziója nem módosul

A TRPV1 és TRPV1b mRNS expresszióját kontroll, valamint BK és PGE_2 tartalmú tápoldatban tenyésztett sejtekben RT-PCR módszerrel vizsgáltuk két független kísérlet-sorozatban (16. ábra). A cDNS mennyiségi kontrolljaként β -aktint alkalmazva a TRPV1 és a TRPV1b mRNS szemikvantitatív meghatározását elvégezve a gyulladásos kultúrákban a TRPV1 kifejeződését szignifikánsan nagyobbak találtuk ($362 \pm 80\%$, $n=4$, 16. ábra), mint kontrollban, míg a TRPV1b expressziója nem emelkedett ($188 \pm 18\%$, $n=4$, 16. ábra). Ez összességében szignifikáns növekedést eredményezett a TRPV1/TRPV1b mRNS expresszió arányában, a kontroll tenyészetekben megfigyelt $1,07 \pm 0,2$ ($n=4$) értékről a gyulladásos közegben tartott tenyészetekben $1,86 \pm 0,18$ ($n=4$) értékre nőtt.



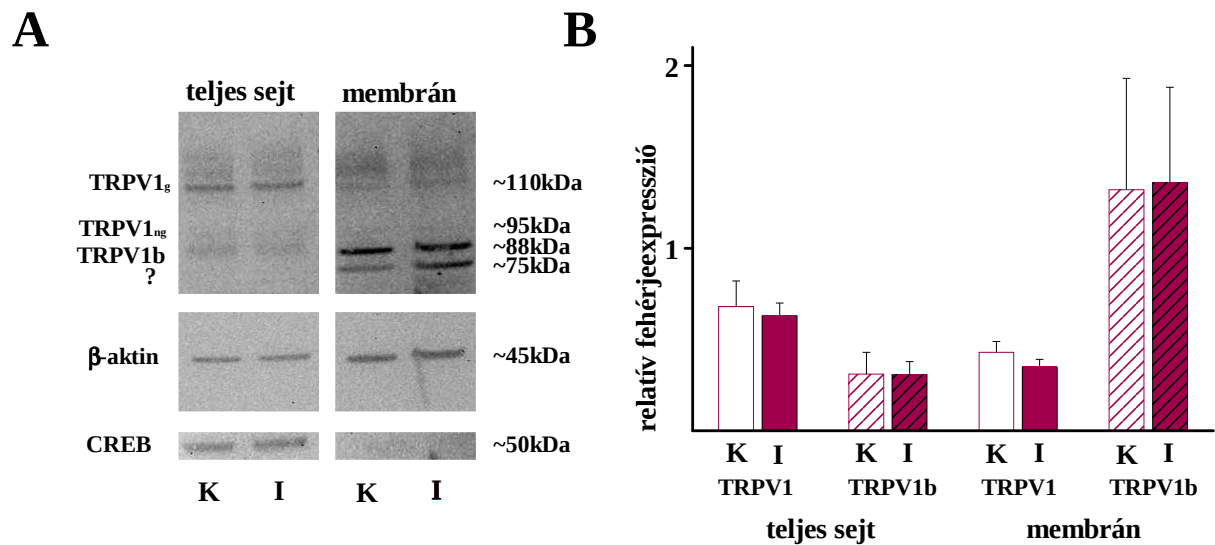
16. ábra. Reprezentatív képek PCR termékekről (A) és relatív mRNS expresszió (B) kontroll (K) és gyulladásos körülmények között tartott (I) tenyészetekben.

A kísérletet GAPDH belső kontrollal megismételve hasonló eredményt kaptunk, gyulladásos mediátorok hatására a TRPV1 mRNS kifejeződése 278%-ra ($n=2$), míg a TRPV1b mRNS kifejeződése 184%-ra ($n=2$) nőtt.

3.4.4. A BK és PGE_2 jelenlétében tenyésztett érzőneuronok TRPV1 és TRPV1b fehérje expressziója nem változik

A TRPV1 elleni antitest a teljes sejt lizátumokból izolált fehérje western blot vizsgálatakor két egyértelműen elkülöníthető (~ 110 kDa és ~ 88 kDa méretű) sávot jelölt, valamint egy harmadik, alig látható (~ 95 kDa) sávot (17A ábra). Membránfrakcióból történő

izoláláskor ezeken kívül egy negyedik sáv (~75 kDa) is megjelent (17A ábra). A fent említett összes sáv kontroll és gyulladásos közegben tenyésztett sejtekből izolált fehérjék western blotján is látszik. A 110 kDa körüli és a 95 kDa körüli fehérjék irodalmi adatok alapján (Jahnel és munkatársai 2001, Rosenbaum és munkatársai 2002) a teljes hosszúságú TRPV1 teljesen glikozilált, illetve a teljes hosszúságú TRPV1 nem-glikozilált formájának felelhet meg. A ~88 kDa méretű fehérje valószínűleg a TRPV1b (Vos és munkatársai 2006), a ~75 kDa fehérje viszont vélhetően csak a membránfrakciók preparálásakor keletkező melléktermék, hiszen a teljes sejt lizátumból hiányzik (17A ábra).



17. ábra. A TRPV1 és a TRPV1b kifejeződése kontroll és gyulladásos körülmények között. Az ábra „A” része teljes sejt lizátumból (baloldali) és membránfrakcióból (jobb oldali) készült reprezentatív western blotokat mutat. Minden blot baloldali mintái kontroll tenyészetek (K), jobb oldali mintái a gyulladásos mediátorok jelenlétében tenyésztett sejtek (I). Az ábra „B” része a western blotok alapján meghatározott relatív fehérjemennyiségeket foglalja össze, az első négy oszlop a teljes sejt lizátumokban, a második négy oszlop a membránfrakciókban. A fehér szín a kontroll, a bordó a gyulladásos mediátorok jelenlétében tartott tenyészeteket jelöli, az egyszínű oszlopok a TRPV1, míg a vonalkázott oszlopok a TRPV1b mennyiségére utalnak.

A kifejezetten gyenge megjelenése miatt a 95 kDa körüli fehérje mennyiségét nem határoztuk meg, így a továbbiakban csak a TRPV1 és a TRPV1b mennyiségi változásait vizsgáltuk. Jelentős különbséget találtunk a teljes sejt lizátumok és a membránfrakciók TRPV1 és a TRPV1b expressziója között (17B ábra). Meglepő módon, a gyulladásos mediátorok nem okoztak szignifikáns változásokat sem a teljes sejt lizátumból izolált TRPV1

(kontroll/gyulladásos arány $0,9 \pm 0,1$, $n=3$), sem a TRPV1b (kontroll/gyulladásos arány $1,12 \pm 0,3$, $n=3$) mennyiségében (17B ábra). Hasonló eredményre jutottunk a membránfrakciók vizsgálatakor is. Bár a TRPV1 némileg kevesebbnek (a kontroll $81 \pm 22\%$ -a, $n=3$), a TRPV1b valamivel többnek (a kontroll $135 \pm 42\%$ -a, $n=3$) adódott a gyulladásos közegben tartott tenyészetekben, a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak (17B ábra).

4. Megbeszélés

4.1. Anandamidtermelő enzimek jelenléte és működése elsődleges érzőneuronokban

Vizsgálataink kezdetéig öt kalciumfüggetlen enzim szerepét valószínűsítették az anandamid termelésében (Leung és munkatársai 2006, Simon és Cravatt 2008, 2010, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004). Munkánkban ezek közül négy fehérje (ABHd4, GDE1, Inpp5 és PTPn22) kifejeződését mutattuk meg tenyésztett primer érzőneuronokon. Az ötödik enzim, a sPLA2G1b jelenlétét is kimutattuk mRNS szinten, erről azonban úgy tűnik, nem íródik át az antitestünkkel detektálható mennyiségű fehérje. Immunfestéseink továbbá azt mutatták, hogy az említett enzimek közül a GDE1 és az ABHd4 nemcsak neuronokon, hanem nem-neurális sejteken is expresszálódik. Azt találtuk, hogy az összes ismert útvonal közös szubsztrátja, a 20:4-NAPE (Di Marzo és munkatársai 1994, Leung és munkatársai 2006, Simon és munkatársai 2008, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Sun és munkatársai 2004), és a $[Ca^{2+}]_i$ -t növelő TRPV1 agonista kapszaicin (Caterina és munkatársai 1997, Nagy és Rang 1999, Valente és munkatársai 2010) anandamidtermelést idéz elő. Akár a felülúszókban, akár a sejtekben mért anandamid koncentrációjában lényeges eltéréseket találtunk attól függően, hogy a termelődést 20:4-NAPE vagy kapszaicin adagolásával váltottuk-e ki. Mindez arra utal, hogy a patkány hátsógyöki ganglionokból tenyésztett sejtekben jelenlévő anandamid szintézisében szereplő enzimek több útvonalat alkotnak, melyek stimulus-függő módon termelhetnek anandamidot. Az enzimek idegi, valamint nem-idegi sejtek közötti eloszlása alapján továbbá úgy gondoljuk, hogy bár nem-idegi sejtek is termelhetnek esetleg anandamidot, az említett endokannabinoid/endovanilloid túlnyomó többsége a primer érzőneuronokból származik.

A sejteket nem tartalmazó felülúszóhoz adagolt 20:4-NAPE nem eredményez anandamidtermelést, továbbá a sejtekre adagolt 20:4-NAPE hatására termelődő anandamid nagyobb mennyiségben mutatható ki a felülúszóból és a sejtekből együtt mérve, mint csak a felülúszóból mérve. Mindez egyrészt arra utal, hogy a NAPE átjut a membránon/beépül a membránba, és az anandamidszintézis a sejtekben történik, másrészt arra, hogy a sejtekben termelt anandamid egy része a sejtekben marad. Ezzel összhangban, az összes ismert anandamidtermelő enzim intracelluláris, átmenetileg asszociálódik a membránhoz, ahol a membrán NAPE-jait alakítja át (Cadas és munkatársai 1996, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Simon és Cravatt 2008, Sun és munkatársai 2004, Ueda és

munkatársai 2013). Legvalószínűbb tehát, hogy az általunk kimutatott anandamidszintézis során a sejtekre adagolt 20:4-NAPE beépül a sejtmembránba, ahol az intracelluláris enzimek a membránhoz asszociálódva átalakítják azt.

A 100 μM 20:4-NAPE hatására termelődő anandamid mennyisége (~ 38 pmol/5 perc/mg fehérje) hasonló nagyságrendben mozog, mint az agyhomogenizátumokban átalakított 20:4-NAPE-é (akár ~ 40 pmol/perc/mg fehérje, Leung és munkatársai 2006, Simon és Cravatt 2008, 2010). Az általunk mért, 100 nM kapszaicin hatására termelődő anandamid mennyisége (~ 100 fmol/ ~ 7000 sejt) továbbá jól összevethető a felülúszó és a sejtek anandamidtartalmával thapsigargin adagolását követően (~ 60 fmol/25000 sejt; van der Stelt és munkatársai 2005). Fontos megemlíteni, hogy adatainkat több, független mérésből gyűjtöttük, és a mennyiségi meghatározásokat három különböző laboratórium is elvégezte egymástól függetlenül, némileg eltérő módszereket alkalmazva. Eredményeik kismértékben különböznek ugyan egymástól (főleg a legalacsonyabb, bazális koncentrációk tekintetében), összességében mégis megnyugtatóan konzisztens eredményeket adnak, mind a 20:4-NAPE, mind a kapszaicin hatására termelt anandamid mennyiségéről.

Az anandamid szintézisét az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozza, elsősorban a 20:4-NAPE-t előállító N-aciltranszferáz által, mely kalciumfüggő enzim (Cadas és munkatársai 1996, Di Marzo és munkatársai 1994). Ha ezt a sebességmeghatározó lépést áthidaljuk – esetünkben a 20:4-NAPE adagolásával – az anandamidszintézis egyetlen további kalciumfüggő lépése a NAPE-PLD által katalizált 20:4-NAPE hasítás (3. ábra; Cadas és munkatársai 1996, Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Simon és Cravatt 2008, Sun és munkatársai 2004, Ueda és munkatársai 2013). Kalcium hiányában a NAPE-PLD aktivitása elhanyagolható, még akkor is, ha a szubsztrát jelen van (Ueda és munkatársai 2001, Wang és munkatársai 2006), miközben az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése önmagában is elég az anandamidtermeléshez (Di Marzo és munkatársai 1994, van der Stelt és munkatársai 2005). Bár a 20:4-NAPE adagolása valamelyest emeli az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, a kalcium eltávolítása az extracelluláris térből nem változtatja meg a termelt anandamid mennyiségét, ezért úgy gondoljuk, hogy ez a növekedés az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban nem elég a NAPE-PLD aktiválásához. Más szóval, a 20:4-NAPE adagolásakor megjelenő anandamidot nem a NAPE-PLD termeli, hanem kalciumfüggetlen útvonalak. Az általunk kimutatott enzimek jelenléte tehát funkcionális útvonal(ak) kialakulásában is megmutatkozik, bár egyelőre nem tudjuk, hogy pontosan melyek ezek.

4.2. Az endogén anandamid hatásai

A 20:4-NAPE kobaltbeáramlást, kalciumbeáramlást és membránon átfolyó áramot indukál a tenyésztett érzőneuronok egy csoportjában. A 20:4-NAPE kis átmérőjű sejtekben okozott kobaltbeáramlást, mely sejtek többsége TRPV1-et expresszáló fájdalomérző neuron (Caterina és munkatársai 1997, Nagy 2004, Guo és munkatársai 1999, Jancsó és munkatársai 1977, Michael és Priestley 1999, Nagy és Rang 1999). Kontroll körülmények között minden egyes sejt, amely 20:4-NAPE adagolására kalciumbeáramlással illetve inward árammal válaszolt, válaszolt kapszaicinre is. A válaszoló sejtek arányát 5 μ M kapszazepin – mely ebben a koncentrációban alig hat bármi más receptorra, mint a TRPV1 (Docherty és munkatársai 1997) – szignifikánsan csökkentette. Továbbá, TRPV1 KO egerekből izolált neuronok közül egyetlen egy sem reagált 20:4-NAPE-re, míg a vad típusúak közül igen. Mindezen eredményeink arra utalnak, hogy a 20:4-NAPE által kiváltott hatásokat TRPV1 közvetíti.

Néhány eredmény arra enged következtetni, hogy a 20:4-NAPE által okozott TRPV1 aktiválás közvetve, anandamidtermelés útján valósul meg. Először is, a 20:4-NAPE által kiváltott anandamidtermelés és a 20:4-NAPE által kiváltott ionáramok is a szubsztrát koncentrációjától függenek. Másodszor, a kapszaicinre válaszoló, azaz TRPV1-et expresszáló sejteknek csak egy része érzékeny 20:4-NAPE-re. A TRPV1-et expresszáló sejteknek ez a korlátozott érzékenysége összhangban van a TRPV1 és az anandamidtermelő enzimek koexpressziós mintázatával. Harmadszor, szobahőmérsékleten a 20:4-NAPE nem okoz kalciumbeáramlást, míg a kapszaicin, ami közvetlenül kötődik a TRPV1-hez (Jordt és munkatársai 2002), igen. Végül, a 20:4-NAPE szignifikánsan lassabb válaszokat hoz létre, mint a kapszaicin által kiváltott válaszok. Bár néhány neuronban gyorsabb válaszokat indukált a 20:4-NAPE, mint a többiben, még ezek a „gyors” válaszok is lényegesen lassabbak voltak, mint a kapszaicin által kiváltottak. Ezek persze mind közvetett bizonyítékok, de összességében mind ugyanarra utalnak: a folyamathoz szükséges a szubsztrát jelenléte, az enzimek jelenléte, megfelelő hőmérséklet, ahol az enzimek aktívak, és elegendő idő a termék elkészítéséhez. Az anandamidon kívül egyéb, 20:4-NAPE eredetű metabolitok részvétele az érzőneuronok (20:4-NAPE adására történő) aktiválásában igen valószínűtlen, hiszen a vékonyréteg kromatográfia semmilyen más lipid jelenlétét nem igazolta, mint az anandamid és maga a 20:4-NAPE.

A vizsgált enzimek persze nem kizárólagosan anandamid termelésére specializálódnak, egész más „célal” is lehetnek a sejtben (Liu és munkatársai 2006, 2008, Okamoto és munkatársai 2004, Simon és Cravatt 2008, Sun és munkatársai 2004, Ueda és

munkatársai 2013). Másrészt, több olyan enzim is szerepet játszhat az anandamid szintézisében, melyet jelenleg még nem azonosítottak, így pillanatnyilag lehetetlen arról nyilatkozni, hogy a sejtek mekkora hányada rendelkezik az anandamid előállításához szükséges teljes enzimrendszerrel. Funkcionális méréseink alapján mindenesetre úgy gondoljuk, hogy a kapszaicinérzékeny sejteknek kb. fele képes kalciummentes közegben anandamidot termelni.

Lévén a felülszóban mért anandamidkoncentráció lényegesen alacsonyabb, mint a TRPV1 aktiválásához szükséges exogén anandamidkoncentráció (Ahluwalia és munkatársai 2003, Evans és munkatársai 2004, Fischbach és munkatársai 2007, Singh-Tahim és munkatársai 2005, Zygmunt és munkatársai 1999), a kalciumfüggetlen útvonalakon termelt anandamid valószínűleg autokrin módon hat, hasonlóan a kalciumfüggő úton termelthez (van der Stelt és munkatársai 2005). Azon kívül, hogy a termelt anandamid aktiválja a TRPV1-et, úgy tűnik, hogy szenzitizálja is. A kapszaicinérzékeny sejtek aránya ugyanis 60%-ról 80%-ra nőtt előzetes 20:4-NAPE adagolás hatására, továbbá a kapszaicinre és NAPE-re is válaszoló sejtek között gyakoribb volt a nem, vagy csak lassan visszatérő nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ kapszaicin adagolása után, mint a csak kapszaicinre válaszoló sejtek között.

Az exogén anandamid CB1 receptor aktiválása által, közvetve gátolja a primer érzőneuronok TRPV1-válaszait (Ahluwalia és munkatársai 2000, Fischbach és munkatársai 2007, Mahmud és munkatársai 2009). Ezzel szemben, a CB1 receptor antagonistá rimonabant gátolta a 20:4-NAPE-re válaszoló sejtek arányát és a válaszok amplitudóját egyaránt. Ebből arra következtethetünk, hogy a 20:4-NAPE hatására kalciumfüggetlen enzimek által termelt anandamid és az exogén anandamid hatása nem minden ponton egyezik meg (az exogén anandamid CB1-mediált gátló hatást vált ki, az endogén anandamid viszont nem). Az exogén anandamid TRPV1 aktivitásra kifejtett hatását is befolyásolja azonban az anandamid koncentrációja és a CB1 receptor elérhetősége. Egy μM feletti koncentrációban adott anandamid nagyobb válaszokat vált ki TRPV1-et és CB1-et együtt kifejező HEK293 sejtekben, mint csak TRPV1-gyel rendelkezőkben (Hermann és munkatársai 2003). Ennek megfelelően, az anandamid serkentő hatása rimonabanttal gátolható DRG tenyészetekben (Selvarajah és munkatársai 2012). Az anandamidhoz hasonlóan, a kapszaicin is kevésbé hat, ha a CB1 receptor gátlás alatt áll (Selvarajah és munkatársai 2012), vagy ha a CB1 receptor nincs jelen (Fioravanti és munkatársai 2008). A CB1 KO egereken megfigyelt eredményekhez (Fioravanti és munkatársai 2008) hasonlóan azt találtuk, hogy a rimonabant csökkenti a kapszaicin által kiváltott válaszok amplitudóját, de nem csökkenti a kapszaicinre reagáló sejtek arányát. Így aztán a 20:4-NAPE-re reagáló sejtek arányának – rimonabant általi –

csökkentése megfelel a CB1 receptor feltételezett, TRPV1-et bizonyos körülmények között folyamatosan érzékenyítő hatásának (Fioravanti és munkatársai 2008, Hermann és munkatársai 2003). A primer érzőneuronokban TRPV1-et aktiváló, de CB1-mediált gátlást nem indukáló hatás tekintetében tehát az 1 μM feletti koncentrációjú exogén anandamid és az 50 μM 20:4-NAPE adagolásakor kalciumfüggetlen útvonalakon termelt endogén anandamid hatása hasonló.

Összefoglalva, megmutattuk, hogy a primer érzőneuronok egy része legalább egy kalciumfüggetlen útvonalon képes 20:4-NAPE-ből anandamidot termelni; az exogén 20:4-NAPE-ből (majdnem) kizárólag kalciumfüggetlen útvonalakon termelődik anandamid; az exogén 20:4-NAPE-ből kalciumfüggetlen útvonalakon termelt anandamid autokrin úton, a TRPV1 receptorra hatva stimulálja a neuronokat. Ezt a hatást összevetve az exogén anandamid hatásával (Ahluwalia és munkatársai 2003, Evans és munkatársai 2004, Fischbach és munkatársai 2007, Mahmud és munkatársai 2009, Sántha és munkatársai 2010) nyilvánvaló, hogy ennek a fontos lipid mediátornak a viselkedését számtalan tényező befolyásolja.

4.3. A patkány TRPV1b splice variánsa

A TRPV1 gén 7-es exonját közrefogó primerekkel felsokszorozott két RT-PCR terméket szekvenálva azt kaptuk, hogy a nagyobb termék tökéletesen megfelel a patkány TRPV1 mRNS-ének (Caterina és munkatársai 1997), míg a kisebb termék éppen 180 bázispárral (a 7-es exonnal; Hellwig és munkatársai 2005) kevesebb ennél. Ez a splicing különbözik a korábban patkányban leírt TRPV1b variánstól, viszont hasonlít az emberi TRPV1b-hez (Lu és munkatársai 2005).

TRPV1 β elnevezéssel ismert az a splice variáns, melynek a 7-es exonjából 60 bázispár hiányzik (Wang és munkatársai 2004). Sem a TRPV1b, sem a TRPV1 β nem mutatja a TRPV1-re jellemző vanilloid és pH érzékenységet, és a hőre adott válaszaik is gyengébbek (Lu és munkatársai 2005, Vos és munkatársai 2006, Wang és munkatársai 2004). A teljes hosszúságú TRPV1-gyel együtt kifejeződve a TRPV1b és a TRPV1 β is csökkenti az ioncsatorna válaszkészségét, a variánsok kifejeződésével arányos mértékben (Vos és munkatársai 2006; Wang és munkatársai 2004). Mindezek alapján a patkány hátsógyöki ganglionból felsokszorozott kisebb RT-PCR terméket TRPV1b homológoknak tartjuk.

Eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV1 és a TRPV1b mRNS is fehérjére íródik át tenyésztett érzőneuronokban. A TRPV1 elleni antitestünk által felismert ~88 kD méretű fehérje aminosavszekvenciáját nem vizsgáltuk. A TRPV1b fehérje közvetlen, egyértelmű

azonosítása sem történt meg, hiszen egyelőre nem áll rendelkezésre antitest kifejezetten ennek a splice variánsnak a felismerésére. Irodalmi adatok (Vos és munkatársai 2006) és a TRPV1b mRNS mérete alapján azonban feltételezzük, hogy a TRPV1 elleni antitestünk által felismert ~88 kD méretű fehérje a TRPV1b.

4.4. Gyulladásos mediátorok okozta változások

A gyulladásos folyamatokban termelt és felszabadított számtalan mediátor közül a fájdalom kialakításában és fenntartásában nagy valószínűséggel a BK és a PGE₂ játsszák az egyik legfontosabb szerepet (Ma és Quirion 2007). Mind a BK, mind a PGE₂ a TRPV1 gyors foszforilációját okozza, mely az ioncsatorna hőküszöbének szignifikáns csökkenéséhez vezet (Cesare és munkatársai 1999, Chuang és munkatársai 2001, Liang és munkatársai 2001, Lopshire és Nicol 1998, Sugiura és munkatársai 2002). Ismert, hogy a különféle TRPV1 agonisták a csatorna kapuzási mechanikáját együtt befolyásolják (Latorre és munkatársai 2007, Voets és munkatársai 2004), ez a hőküszöbcsökkenés fokozza a TRPV1 által közvetített válaszokat, beleértve a kapszaicin okozta kobaltbeáramlást is (Cesare és munkatársai 1999, Chuang és munkatársai 2001, Liang és munkatársai 2001, Lopshire és Nicol 1998, Singh Tahim és munkatársai 2005, Sugiura és munkatársai 2002). Azt találtuk, hogy primer érzőneuron tenyészetekben a BK és a PGE₂ fokozza a *trpv1* átírását, bár a TRPV1 és a TRPV1b mRNS szintje nem egyenlő mértékben növekszik. Korábbi kísérletek viszont nem igazoltak fokozott *trpv1* átírást *in vivo* (Charrua és munkatársai 2008). Az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok közötti ellentmondásos eredményeket magyarázhatja a gyulladásos szövetekben valószínűleg felszaporodó mediátorok (Ma és Quirion 2007, Woolf és Ma 2007) és a kísérleteinkben a gyulladásos körülményeket modellező környezet közötti különbség, de indokolhatja a gyulladásos mediátorok hatásának kitett primer érzőneuronok *in vivo* és *in vitro* eltérő aránya is.

A BK- és PGE₂-indukált TRPV1 mRNS szint növekedés ellenére a TRPV1 fehérje mennyiségében nem tudtunk változást kimutatni sem teljes sejt lizátumban, sem membránfrakcióban. A növekedés hiánya talán a TRPV1 aktivitás-függő fokozott turnover számlájára írható. A fokozott aktivitás miatti gyorsabb turnover igen valószínű az alkalmazott gyulladásos mediátorok (BK- és PGE₂) jelenlétében, mert a TRPV1 hőküszöbét mind a BK, mind a PGE₂ 37 °C alá csökkenti (Cesare és munkatársai 1999, Chuang és munkatársai 2001, Liang és munkatársai 2001, Lopshire és Nicol 1998, Sugiura és munkatársai 2002).

Miközben a TRPV1 fehérje szintje nem emelkedett, a kapszaicin-indukált, azaz TRPV1 közvetített kobaltbeáramlás szignifikánsan fokozódott a gyulladásos mediátorok

jelenlétében tenyésztett sejtekben a kontroll tenyészetek sejteihez képest. A legvalószínűbb magyarázatnak a TRPV1 ioncsatorna érzékenységének fokozódására így a BK- és PGE₂-indukált poszttranszlációs módosítás tűnik (Cesare és munkatársai 1999, Chuang és munkatársai 2001, Liang és munkatársai 2001, Lopshire és Nicol 1998, Mahmud és munkatársai 2009, Soneji és munkatársai 2010, Sugiura és munkatársai 2002). Az is elképzelhető, hogy a BK és a PGE₂ expozíció megváltoztatja a TRPV1 és a TRPV1b alegységek arányát az egyes összeszerelt csatornáknál anélkül, hogy a TRPV1 vagy a TRPV1b összmenyisége változna. Így előfordulhat, gyulladásos körülmények között inkább TRPV1 homotetramerek és TRPV1b homotetramerek szerelődnek össze, míg kontroll körülmények között nagyobb arányban jelennek meg TRPV1/TRPV1b heterotetramerek. Azaz a gyulladásos mediátorok jelenlétében nagyobb számban előforduló teljes válaszkészségű TRPV1 homotetramerek fokozott kapszaicinválaszokat alakíthatnak ki anélkül, hogy a TRPV1 fehérje mennyisége változna. Ennek alátámasztására nyilvánvalóan további vizsgálatok szükségesek, melyek jelen pillanatban a TRPV1b-re specifikus antitest hiánya miatt nem kivitelezhetőek. A csökkent aktivitást létrehozó TRPV1b splice variáns nagy mennyiségben történő kifejeződése a membránfrakcióban mindenesetre arra utal, hogy a TRPV1b-nek igenis szerepe lehet a TRPV1 ioncsatorna aktivitásának szabályozásában, és az alegységösszetétel módosulása hozzájárulhat a kapszaicinreceptor gyulladásos környezetben megfigyelhető fokozott válaszkészségéhez.

5. Összefoglalás

Az értekezés az endogén anandamid, valamint exogén gyulladásos mediátorok (bradykinin (BK) és prosztaglandin E_2 (PGE_2)) elsődleges érzőneuronokra gyakorolt hatásainak vizsgálata során kapott eredményeket foglalja össze.

Az arachidonoil-etanolamid (anandamid) számos hatása közül kiemelhető a fájdalom kialakulásában betöltött szerepe, mind központi, mind perifériás idegrendszeri támadáspontokon. Anandamidtermelés Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független útvonalakon is történhet. Megmutattuk, hogy patkány elsődleges érzőneuronjai Ca^{2+} -mentes közegben is képesek anandamidtermelésre, leírtuk a Ca^{2+} -független enzimek jelenlétét a már ismert Ca^{2+} -függő NAPE-PLD mellett. Az anandamidtermelő enzimek közös szubsztrátjának, az 1,2-dioloil-sn-gliceró-3-foszfóetanolamin-N-arachidonoilnak (NAPE-nek) az adagolásakor anandamid termelődik. Megvizsgáltuk, hogy a termelt anandamid TRPV1-mediált serkentő hatást fejt ki a primer érzőneuronokra, mely serkentést a kannabinoid 1 receptor egyidejű aktiválása nem gátolja. A vizsgált neuronok egy része együtt fejezi ki a TRPV1-et és az anandamidtermelésre alkalmas enzimeket. Ezek alapján eredményeink arra utalnak, hogy a primer érzőneuronok által Ca^{2+} -független útvonalakon termelt anandamid inkább stimuláló, mint gátló hatást fejt ki ezekre a sejtekre, és a hatás valószínűleg elsősorban autokrin.

A TRPV1 központi szereppel bír a gyulladással járó hő hiperalgémia létrejöttében. A TRPV1 egyik splice variánsa, a TRPV1b a TRPV1 ioncsatorna működését csökkentő, a természetben is előforduló inhibitorikus alegység. A TRPV1 és a TRPV1b mRNS- és fehérjeexpresszióját vizsgáltuk kontroll körülmények között és gyulladásos mediátorok ($10 \mu M$ BK és $10 \mu M$ PGE_2) jelenlétében tenyésztett patkány primer érzőneuronokon annak megállapítására, hogy a TRPV1 és a TRPV1b expressziójában bekövetkező változások hozzájárulhatnak-e az ioncsatorna gyulladásban megfigyelhető fokozott válaszkészségéhez. A primer érzőneuronok mind TRPV1-et, mind TRPV1b-t kifejeznek mRNS és fehérje szinten egyaránt. A TRPV1b mRNS-e pontosan a teljes 7-es exon hiányában különbözik a TRPV1 mRNS-től. Az érzőneuronok TRPV1 válaszkészsége szignifikánsan nőtt, amikor a sejteket BK és PGE_2 jelenlétében tenyésztettük. Ezzel egyidejűleg a TRPV1 mRNS mennyisége is nőtt, fehérje szintje azonban nem változott. A BK és PGE_2 jelenléte továbbá nem módosította sem a TRPV1b mRNS, sem a TRPV1b fehérje expresszióját.

6. Abstract

In this work, we investigated the regulatory effects of endogenous anandamide and exogenous inflammatory mediators (bradykinin (BK) and prostaglandin E₂ (PGE₂)) on the activity of primary sensory neurons.

The endogenous lipid agent N-arachidonylethanolamine (anandamide), among other effects, has been shown to be involved in nociceptive processing both in the central and peripheral nervous systems. Anandamide is thought to be synthesised by several enzymatic pathways both in a Ca²⁺-sensitive and Ca²⁺-insensitive manner, and rat primary sensory neurons produce anandamide. Here, we show that cultured rat primary sensory neurons express Ca²⁺-insensitive enzymes implicated in the synthesis of anandamide, and that application of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-arachidonoyl (NAPE), the common substrate of the anandamide-synthesising pathways, results in anandamide production. We also show that anandamide, which has been synthesised in primary sensory neurons following the application of NAPE induces transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1)-mediated excitatory effect that is not inhibited by concomitant activation of the cannabinoid type 1 receptor. We show that subpopulations of TRPV1-expressing primary sensory neurons also express some of the putative Ca²⁺-insensitive anandamide-synthesising enzymes. Together, these findings indicate that anandamide synthesised by primary sensory neurons via a Ca²⁺-insensitive manner has an excitatory rather than an inhibitory role in primary sensory neurons and that excitation is mediated predominantly through autocrine signalling.

TRPV1 plays a pivotal role in the development of inflammatory heat hyperalgesia. The splice variant of the TRPV1 molecule, TRPV1b has been suggested to be a naturally-occurring inhibitory subunit of the TRPV1 ion channel. We assessed TRPV1 and TRPV1b mRNA and protein expression, as well as capsaicin-induced TRPV1 activity in cultured rat PSN grown for 2 days in control or in an inflammation-associated milieu created by adding 10 µM BK and 10 µM PGE₂ to the medium to find whether alterations in TRPV1 and TRPV1b expression could contribute to the increased responsiveness of the TRPV1 ion channel in inflammation. We found that both TRPV1 and TRPV1b mRNA and protein are expressed in PSN and that TRPV1b mRNA lacks the entire exon 7. Culturing neurons in the presence of BK and PGE₂ significantly increases TRPV1 responsiveness and TRPV1 mRNA expression. However, the presence of BK and PGE₂ does not alter TRPV1b mRNA, and TRPV1 and TRPV1b protein expression.

7. Irodalomjegyzék

Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C.E., Brenner, G.J., Rubino, T., Michalski, C.W., Marsicano, G., Monory, K., Mackie, K., Marian, C., Batkai, S., Parolaro, D., Fischer, M.J., Reeh, P., Kunos, G., Kress, M., Lutz, B., Woolf, C.J., Kuner, R.: Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat. Neurosci.* 10, 870-879, 2007.

Ahern, G.P.: Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J. Biol. Chem.* 278, 30429-30434, 2003.

Ahern, G.P., Brooks, I.M., Miyares, R.L., Wang, X.B.: Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J. Neurosci.* 25, 5109-5116, 2005.

Ahluwalia, J., Urban, L., Bevan, S., Nagy, I.: Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2611-2618, 2003.

Ahluwalia, J., Urban, L., Capogna, M., Bevan, S., Nagy, I.: Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100, 685-688, 2000.

Amaya, F., Shimosato, G., Kawasaki, Y., Hashimoto, S., Tanaka, Y., Ji, R., Tanaka, M.: Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain* 124, 175-183, 2006.

Auer-Grumbach, M., Olschewski, A., Papic, L., Kremer, H., McEntagart, M.E., Uhrig, S., Fischer, C., Frohlich, E., Balint, Z., Tang, B., Strohmaier, H., Lochmüller, H., Schlotter-Weigel, B., Senderek, J., Krebs, A., Dick, K.J., Petty, R., Longman, C., Anderson, N.E., Padberg, G.W., Schelhaas, H.J., van Ravenswaaij-Arts, C.M., Pieber, T.R., Crosby, A.H., Guelly, C.: Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nat. Genet.* 42 (2), 160-164, 2010.

Bareille, P., Murdoch, R.D., Denyer, J., Bentley, J., Smart, K., Yarnall, K., Zieglmayer, P., Zieglmayer, R., Lemell, P., Horak, F.: The effects of a TRPV1 antagonist, SB-705498, in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 51 (7), 576-584, 2013.

Basavarajappa, B.S.: Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein. Pept. Lett.* 14, 237-246, 2007.

Benham, C.D., Davis, J.B., Randall, A.D.: Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 42 (7), 873-888, 2002.

Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., Yeats, J.C.: Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107, 544-552, 1992.

Bhave, G., Hu, H.J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.: Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (21), 12480-12485, 2003.

Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.: cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721-731, 2002.

Binzen, U., Greffrath, W., Hennessy, S., Bausen, M., Saaler-Reinhardt, S., Treede, R.D.: Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 142, 527-539, 2006.

Birder, L.A., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Kiss, S., Nealen, M.L., Burke, N.E., Dineley, K.E., Watkins, S., Reynolds, I.J., Caterina, M.J.: Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13396-13401, 2001.

Bisogno, T., Di Marzo, V.: Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 564-573, 2010.

Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E., Latorre, R.: A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J. Neurosci.* 26, 4835-4840, 2006.

Cadas, H., Schinelli, S., Piomelli, D.: Membrane localization of N-acylphosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *Lipid. Mediat. Cell. Signal.* 14, 63-70, 1996.

Carrier, E.J., Kearn, C.S., Barkmeier, A.J., Breese, N.M., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, S.L., Campbell, W.B., Hillard, C.J.: Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 65, 999-1007, 2004.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D.: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313, 2000.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D.: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824, 1997.

Cesare, P., Dekker, L.V., Sardini, A., Parker, P.J., McNaughton, P.A.: Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23, 617-624, 1999.

Cesare, P., McNaughton, P.: A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 15435-15439, 1996.

Chard, P.S., Bleakman, D., Savidge, J.R., Miller, R.J.: Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 65 (4), 1099-1108, 1995.

Charrua, A., Cruz, C.D., Cruz, F., Avelino, A.: Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. *J. Urol.* 177, 1537-1541, 2007.

Charrua, A., Reguenga, C., Paule, C.C., Nagy, I., Cruz, F., Avelino, A.: Cystitis is associated with TRPV1b-downregulation in rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* 19, 1469-1472, 2008.

Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C.L., Zheng, J.: Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J. Gen. Physiol.* 129, 191-207, 2007.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D.: Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411, 957-962, 2001.

Chung, M.K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M.J.: 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J. Neurosci.* 24 (22), 5177-5182, 2004.

Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., Julius, D.: International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* 55 (4), 591-596, 2003.

Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strübing, C.: The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2 (6), 387-396, 2001.

Cortright, D.N., Szállási, Á.: Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* 271, 1814-1819, 2004.

Cosens, D.J., Manning, A.: Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224 (5216), 285-287, 1969.

Cravatt, B.F., Lichtman, A.H.: Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (4), 469-475, 2003.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A., Sheardown, S.A.: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187, 2000.

De Petrocellis, L., Harrison, S., Bisogno, T., Tognetto, M., Brandi, I., Smith, G.D., Creminon, C., Davis, J.B., Geppetti, P., Di Marzo, V.: The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 77 (6), 1660-1663, 2001.

Derry, S., Moore, R.A.: Topical capsaicin (low concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 9:CD010111.
doi: 10.1002/14651858.CD010111., 2012.

Derry, S., Sven-Rice, A., Cole, P., Tan, T., Moore, R.A.: Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD007393. doi: 10.1002/14651858.CD007393.pub3. 2013.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R.: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949, 1992.

Dhaka, A., Uzzell, V., Dubin, A.E., Mathur, J., Petrus, M., Bandell, M., Patapoutian, A.: TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J. Neurosci.* 29:153-158, 2009.

Di Marzo, V.: Endocannabinoids: Synthesis and degradation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160, 1-24, 2008.

Di Marzo, V., Blumberg, P.M., Szállási, Á.: Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 372-379, 2002.

Di Marzo, V., De Petrocellis, L.: Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* 17, 1430-1449, 2010.

Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Sepe, N., Buono, A.: Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem. J.* 316, 977-984, 1996.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-691, 1994.

Di Marzo, V., Petrosino, S.: Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 129-140, 2007.

Dinis, P., Charrua, A., Avelino, A., Yaqoob, M., Bevan, S., Nagy, I., Cruz, F.: Anandamide-evoked activation of Vanilloid Receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J. Neurosci.* 24, 11253-11263, 2004b.

Docherty, R.J., Yeats, J.C., Bevan, S., Boddeke, H.W.: Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 431, 828-837, 1996.

Dong, X., Wang, X., Xu, H.: TRP Channels of Intracellular Membranes. *J. Neurochem.* 113 (2), 313-328, 2010.

Dray, A.: Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. *Biochem. Pharmacol.* 44 (4), 611-615. Review. 1992.

Ellis, J.L., Sham, J.S., Undem, B.J.: Tachykinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155 (2), 751-755, 1997.

Engel, M.A., Izydorczyk, I., Mueller-Tribbenese, S.M., Becker, C., Neurath, M.F., Reeh, P.W.: Inhibitory CB1 and activating/desensitizing TRPV1-mediated cannabinoid actions on CGRP release in rodent skin. *Neuropeptides* 45, 229-237, 2011.

Everaerts, W., Gees, M., Alpizar, Y.A., Farre, R., Leten, C., Apetrei, A., Dewachter, I., van Leuven, F., Vennekens, R., de Ridder, D., Nilius, B., Voets, T., Talavera, K.: The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr. Biol.* 21, 316-321, 2011.

Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C., Viana, F.: TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J. Neurosci.* 28 (31), 7863-7875, 2008.

Fioravanti, B., De Felice, M., Stucky, C.L., Medler, K.A., Luo, M.C., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Malan, T.P., Yamamura, H.I., Ossipov, M.H., King, T., Lai, J., Porreca, F., Vanderah, T.W.: Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. *J. Neurosci.* 28, 11593-11602, 2008.

Fischbach, T., Greffrath, W., Nawrath, H., Treede, R.D.: Effects of anandamide and noxious heat on intracellular calcium concentration in nociceptive drg neurons of rats. *J. Neurophysiol.* 98, 929-938, 2007.

Garcia, D.E., Brown, S., Hille, B., Mackie, K.: Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 18, 2834-2841, 1998.

Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A.: Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J. Neurosci.* 24, 5307-53014, 2004.

Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N. Jr, Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., Kuang, R., Le, A., Tamir, R., Wang, J., Youngblood, B., Zhu, D., Norman, M.H., Magal, E., Treanor, J.J., Louis, J.C.: The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.* 27, 3366-3374, 2007.

Goodfellow, C.E., Glass, M.: Anandamide receptor signal transduction. *Vitam. Horm.* 81, 79-110, 2009.

Grantham, J.J.: Polycystic kidney disease: hereditary and acquired. *Adv. Intern. Med.* 38, 409-420, 1993.

Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Prinjha, R.K., Davis, J.B., Randall, A.: Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* 525(3):747-759, 2000.

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

Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M.: Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* 118, 917-928, 2005.

Hermann, H., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Schiano-Moriello, A., Lutz, B., Di Marzo, V.: Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 607-616, 2003.

Hőgyes, E.: Adatok a paprika (*Capsicum annum*) élettani hatásához. *Orvosi Hetilap.* 1878a.

Hőgyes, E.: Beitrage zur physiologischen Wirkung der Bestandtheile des Capiscum annum (Spanischer Pfeffer). *Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* 9, 117-130, 1878b.

Holzer, P.: The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor. *Br. J. Pharmacol.* 155, 1145-1162, 2008.

Huang, J.K., Cheng, H.H., Huang, C.J., Kuo, C.C., Chen, W.C., Liu, S.I., Hsu, S.S., Chang, H.T., Lu, Y.C., Tseng, L.L., Chiang, A.J., Chou, C.T., Jan, C.R.: Effect of capsazepine on cytosolic Ca(2+) levels and proliferation of human prostate cancer cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 567-574, 2006.

Huang, R.F., Huang, S.M., Lin, B.S., Hung, C.Y., Lu, H.T.: N-Acetylcysteine, vitamin C and vitamin E diminish homocysteine thiolactone-induced apoptosis in human promyeloid HL-60 cells. *J. Nutr.* 132, 2151-2156, 2002.

Huggins, J.P., Smart, T.S., Langman, S., Taylor, L., Young, T.: An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* 153, 1837-1846, 2012.

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.: Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (11), 6155-6160, 2000.

Iida, T., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., Fushiki, T., Yazawa, S., Watanabe, T., Tominaga, M.: TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology* 44 (7), 958-967, 2003.

Iwasaki, Y., Morita, A., Iwasawa, T., Kobata, K., Sekiwa, Y., Morimitsu, Y., Kubota, K., Watanabe, T.: A nonpungent component of steamed ginger—[10]-shogaol—increases adrenaline secretion via the activation of TRPV1. *Nutr. Neurosci.* 9 (3-4), 169-178, 2006.

Jahnel, R., Dreger, M., Gillen, C., Bender, O., Kurreck, J., Hucho, F.: Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur. J. Biochem.* 268, 5489-5496, 2001.

Jancsó, M., Jancsó, M.: Érzőidegvégződés deszenzibilizálása. *Kísérletes Orvostudomány* 2, 15, 1949.

Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A.: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270, 741-743, 1977.

Jancsó, G., Király, E., Joó, F., Such, G., Nagy, A.: Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neuroscil. Lett.* 59 (2), 209-214, 1985.

Jordt, S.E., Julius, D.: Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108, 421-430, 2002.

Jordt, S.E., Tominaga, M., Julius, D.: Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8134-8139, 2000.

Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., Oh, U.: Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* 279, 7048-7054, 2004.

Karashima, Y., Prenen, J., Meseguer, V., Owsianik, G., Voets, T., Nilius, B.: Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate manipulators. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 457 (1), 77-89, 2008.

Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pasztor, E.T., Erdei, N., Czikora, A., Papp, Z., Édes, I., Pórszász, R., Tóth, A.: Tissue-specific regulation of microvascular diameter: Opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.* 73 (5), 1405-1412, 2008.

Kato, S., Aihara, E., Nakamura, A., Xin, H., Matsui, H., Kohama, K., Takeuchi, K.: Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem. Pharmacol.* 66 (6), 1115-1121, 2003.

Keddi, N., Szabó, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., Blumberg, P.M.: Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 276 (30), 28613-28619, 2001.

Kim, A.Y., Tang, Z., Liu, Q., Patel, K.N., Maag, D., Geng, Y., Dong, X.: Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. *Cell* 133 (3), 475-485, 2008.

Koplas, P.A., Rosenberg, R.L., Oxford, G.S.: The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17, 3525-3537, 1997.

Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J.J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S., Woods, C.G., Jones, N.G., Paterson, K.J., Fricker, F.R., Villegas, A., Acosta, N., Pineda-Trujillo, N.G., Ramírez, J.D., Zea, J., Burley, M.W., Bedoya, G., Bennett, D.L., Wood, J.N., Ruiz-Linares, A.: A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66(5):671-680, 2010.

Kym, P.R., Kort, M.E., Hutchins, C.W.: Analgesic potential of TRPV1 antagonists. *Biochem. Pharmacol.* 78, 211-216, 2009.

Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., Vargas, G.: ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42(4-5):427-438, 2007.

Lazzeri, M., Vannucchi, M.G., Zardo, C., Spinelli, M., Beneforti, P., Turini, D., Faussone-Pellegrini, M.S.: Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur. Urol.* 46 (6), 792-798, 2004.

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

Liang, Y.F., Haake, B., Reeh, P.W.: Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J. Physiol.* 532, 229-239, 2001.

Ligresti, A., Petrosino, S., Di Marzo, V.: From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (3), 321-331, 2009.

Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., Gaudet, R.: The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905-918, 2007.

Liu, B., Hui, K., Qin, F.: Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys. J.* 85, 2988-3006, 2003.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.Y., Kunos, G.: A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13345-13350, 2006.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., Razdan, R.K., Kunos, G.: Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54, 1-7, 2008.

Liu, B., Zhang, C., Qin, F.: Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 4835-4843, 2005.

Lopshire, J.C., Nicol, G.D.: The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J. Neurosci.* 18, 6081-6092, 1998.

Lu, G., Henderson, D., Liu, L., Reinhart, P.H., Simon, S.A.: TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Mol. Pharmacol.* 67, 1119-1127, 2005.

Ludy, M.J., Moore, G.E., Mattes, R.D.: The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chem. Senses* 37 (2), 103-121, 2012.

Luo, X.J., Liu, B., Dai, Z., Yang, Z.C., Peng, J.: Stimulation of calcitonin gene-related peptide release through targeting capsaicin receptor: a potential strategy for gastric mucosal protection. *Dig. Dis. Sci.* 58 (2), 320-325, 2012.

Ma, W., Quirion, R.: Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 307-320, 2007.

Mackie, K., Hille, B.: Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3825-3829, 1992.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R.: Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552-6561, 1995.

Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S., Patapoutian, A.: The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* 15, 929-934, 2005.

Mahmud, A., Sántha, P., Paule, C.C., Nagy, I.: Cannabinoid 1 receptor activation inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated cationic influx into rat cultured primary sensory neurons. *Neuroscience* 162, 1202-1211, 2009.

Mandadi, S., Numazaki, M., Tominaga, M., Bhat, M.B., Armati, P.J., Roufogalis, B.D.: Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35, 471-478, 2004.

Marsh, S.J., Stansfeld, C.E., Brown, D.A., Davey, R., McCarthy, D.: The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience* 23 (1), 275-289, 1987.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I.: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564, 1990.

McNamara, F.N., Randall, A., Gunthorpe, M.J.: Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br. J. Pharmacol.* 144 (6), 781-790, 2005.

Michael, G.J., Priestley, J.V.: Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J. Neurosci.* 19, 1844-1854, 1999.

Millns, P.J., Chapman, V., Kendall, D.A.: Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br. J. Pharmacol.* 132 (5), 969-971, 2001.

Mitirattanakul, S., Ramakul, N., Guerrero, A.V., Matsuka, Y., Ono, T., Iwase, H., Mackie, K., Faull, K.F., Spigelman, I.: Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. *Pain* 126, 102-114, 2006.

Mohapatra, D.P., Nau, C.: Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 13424-13432, 2005.

Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., Patapoutian, A.: Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307 (5714), 1468-1472, 2005.

Morisset, V., Urbán, L.: Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 86:40-48, 2001.

Motter, A.L., Ahern, G.P.: TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. *FEBS Lett.* 582 (15), 2257-2262, 2008.

Nagy, B., Fedonidis, C., Photiou, A., Wahba, J., Paule, C.C., Ma, D., Buluwela, L., Nagy, I.: Capsaicin-sensitive primary sensory neurons in the mouse express N-Acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D. *Neuroscience* 161, 572-577, 2009.

Nagy, I.: *Anesthetic Pharmacology: Physiologic Principles and Clinical Practice*, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, 2004.

Nagy, I., Sántha, P., Jancsó, G., Urbán, L.: The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol* 500, 351-369, 2004.

Nagy, I., Rang, H.P.: Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J. Neurosci.* 19, 10647-10655, 1999.

Naidu, P.S., Kinsey, S.G., Guo, T.L., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H.: Regulation of Inflammatory Pain by Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (1), 182-190, 2010.

Nelson, E.K.: The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *J. Am. Chem. Soc.* 41 (7), 1115-1121, 1919.

Németh, J., Helyes, Z., Thán, M., Jakab, B., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Concentration-dependent dual effect of anandamide on sensory neuropeptide release from isolated rat tracheae. *Neurosci. Lett.* 336, 89-92, 2003.

Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D., Rosenbaum, T.: Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat. Chem. Biol.* 8, 78-85, 2011.

Nilius, B., Appendino, G.: Tasty and healthy TR(i)Ps. The human quest for culinary pungency. *EMBO Rep.* 12, 1094-1101, 2011.

Nilius, B., Owsianik, G.: The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12 (3), 218, 2011.

Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T.: Gating of TRP channels: a voltage connection? *J. Physiol.* 567 (1), 35-44, 2005.

Nilius, B., Voets, T.: TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers. Arch.* 451, 1-10, 2005.

Noto, C., Pappagallo, M., Szállási, Á.: NGX-4010, a high-concentration capsaicin dermal patch for lasting relief of peripheral neuropathic pain. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10, 702-710, 2009.

Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M.: Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8002-8006, 2003.

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M.: Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* 277, 13375-13378, 2002.

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

Oláh, Z., Szabó, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R.D., Caudle, R.M., Blumberg, P.M., Iadarola, M.J.: Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 276, 11021-11030, 2001.

Oshita, K., Inoue, A., Tang, H.B., Nakata, Y., Kawamoto, M., Yuge, O.: CB(1) cannabinoid receptor stimulation modulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 activities in calcium influx and substance P Release in cultured rat dorsal root ganglion cells. *J. Pharmacol. Sci.* 97 (3), 377-385, 2005.

Ost, D., Roskams, T., Van Der Aa, F., De Ridder, D.: Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J. Urol.* 168 (1), 293-297, 2002.

Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B.: Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 685-717, 2006.

Poduslo, S.E., Huang, R., Huang, J., Smith, S.: Genome screen of late-onset Alzheimer's extended pedigrees identifies TRPC4AP by haplotype analysis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 150B (1), 50-55, 2009.

Porszász, J., Jancsó, M.: Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 16, 299-306, 1959.

Premkumar, L.S., Ahern, G.P.: Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408, 985-990, 2000.

Prescott, E.D., Julius, D.: A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300, 1284-1288, 2003.

Rami, H.K., Gunthorpe, M.J.: The therapeutic potential of TRPV1 (VR1) antagonists: clinical answers await. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 1, 97-104, 2004.

Rathee, P.K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G.K., Wang, S.Y., Nau, C., Kress, M.: PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J. Neuroscience* 22, 4740-4745, 2002.

Reilly, C.A., Johansen, M.E., Lanza, D.L., Lee, J., Lim, J.O., Yost, G.S.: Calcium-dependent and independent mechanisms of capsaicin receptor (TRPV1)-mediated cytokine production and cell death in human bronchial epithelial cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19 (4), 266-275, 2005.

Rock, M.J., Prenen, J., Funari, V.A., Funari, T.L., Merriman, B., Nelson, S.F., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Reyno, S., Quadrelli, R., Vaglio, A., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., Ikegawa, S., Nagai, T., Rimoin, D.L., Nilius, B., Cohn, D.H.: Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat. Genet.* 40 (8), 999-1003, 2008.

Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., Wurm, M.: Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 292-310, 2012.

Rosenbaum, T., Awaya, M., Gordon, S.E.: Subunit modification and association in VR1 ion channels. *BMC Neurosci.* 3, 4, 2002.

Sántha, P., Jenes, Á., Somogyi, Cs., Nagy, I.: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated currents in rat cultured primary sensory neurons. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 97, 149-159, 2010.

Sathianathan, V., Avelino, A., Charrua, A., Sántha, P., Matesz, K., Cruz, F., Nagy, I.: Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2477-2486, 2003.

Schmitz, C., Perraud, A.L., Johnson, C.O., Inabe, K., Smith, M.K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A., Scharenberg, A.M.: Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell* 114, 191-200, 2003.

Schumacher, M.A., Eilers, H.: TRPV1 splice variants: structure and function. *Front Biosci.* 15, 872-882, 2010.

Schumacher, M.A., Moff, I., Sudanagunta, S.P., Levine, J.D.: Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. Loss of N-terminal domain suggests functional divergence among capsaicin receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 275, 2756-2762, 2000.

Selvaraj, S., Sun, Y., Watt, J.A., Wang, S., Lei, S., Birnbaumer, L., Singh, B.B.: Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *J. Clin. Invest.* 122 (4), 1354-1367, 2012.

Shin, H.J., Gye, M.H., Chung, K.H., Yoo, B.S.: Activity of protein kinase C modulates the apoptosis induced by polychlorinated biphenyls in human leukemic HL-60 cells. *Toxicol. Lett.* 135, 25-31, 2002.

Simon, G.M., Cravatt, B.F.: Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 283, 9341-9349, 2008.

Simon, G.M., Cravatt, B.F.: Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol. Biosyst.* 6, 1411-1418, 2010.

Singh-Tahim, S., Sántha, P., Nagy, I.: Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 136, 539-548, 2005.

Soneji, N.D., Paule, C.C., Mlynarczyk, M., Nagy, I.: Effects of cannabinoids on capsaicin receptor activity following exposure of primary sensory neurons to inflammatory mediators. *Life Sci.* 87, 162-168, 2010.

Starowicz, K., Makuch, W., Korostynski, M., Malek, N., Slezak, M., Zychowska, M., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Cristino, L., Przewlocka, B., Di Marzo, V.: Full Inhibition of Spinal FAAH Leads to TRPV1-Mediated Analgesic Effects in Neuropathic Rats and Possible Lipoxygenase-Mediated Remodeling of Anandamide Metabolism. *PLoS One* 8 (4), e60040., 2013.

Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F., Gordon, S.E.: Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 128 (5), 509-522, 2006.

Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., Mizumura, K.: Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88, 544-548, 2002.

Sun, Y.X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., Ueda, N.: Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem. J.* 380, 749-756, 2004.

Szállási, Á., Blumberg, P.M.: Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51 (2), 159-212, 1999.

Szállási, A., Szabó, T., Bíró, T., Modarres, S., Blumberg, P.M., Krause, J.E., Cortright, D.N., Appendino, G.: Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at

native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. Br. J. Pharmacol. 128 (2), 428-434, 1999.

Szolcsányi, J., Jancsó-Gábor, A.: Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain producing potency of pungent agents. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 25, 1877-1881, 1975.

Taiwo, Y.O., Bjerknes, L.K., Goetzl, E.J., Levine, J.D.: Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 32, 577-580, 1989.

Taiwo, Y.O., Levine, J.D.: Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res.* 537, 372-374, 1990.

Teng, H.P., Huang, C.J., Yeh, J.H., Hsu, S.S., Lo, Y.K., Cheng, J.S., Cheng, H.H., Chen, J.S., Jiann, B.P., Chang, H.T., Huang, J.K., Jan, C.R.: Capsazepine elevates intracellular Ca²⁺ in human osteosarcoma cells, questioning its selectivity as a vanilloid receptor antagonist. *Life Sci.* 75, 2515-2526, 2004.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D.: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543, 1998.

Tominaga, M., Wada, M., Masu, M.: Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6951-6956, 2001.

Tóth, A., Kedei, N., Wang, Y., Blumberg, P.M.: Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life Sci.* 73 (4), 487-498, 2003.

Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M.J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J., Brough, S.J., Owen, D., Smith, G.D., Randall, A.D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J.B., Geppetti, P.: Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat. Neurosci.* 5, 546-551, 2002.

Trevisani, M., Szállási, Á.: Targeting TRPV: Challenges and Issues in Pain Management. *The Open Drug Discovery Journal* 2, 27-49, 2010.

Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T.: Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J.* 280, 1874-1894, 2013.

Valente, J., Jenes, Á., Avelino, A., Nagy, I.: *Neuropeptides* 44, 523, 2010.

van der Stelt, M., Trevisani, M., Vellani, V., De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Campi, B., McNaughton, P., Geppetti, P., Di Marzo, V.: Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J.* 24, 3026-3037, 2005.

Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A.: Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* 534, 813-825, 2001.

Vellani, V., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Valenti, M., Prandini, M., Magherini, P.C., McNaughton, P.A., Di Marzo, V.: Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology* 55, 1274-1279, 2008.

Vlachova, V., Teisinger, J., Susankova, K., Lyfenko, A., Ettrich, R., Vyklicky, L.: Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.* 23, 1340-1350, 2003.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., Nilius, B.: The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430 (7001), 748-754, 2004.

Voets, T., Nilius, B.: Modulation of TRPs by PIPs. *J. Physiol.* 582(3):939-944, 2007.

Vos, M.H., Neelands, T.R., McDonald, H.A., Choi, W., Kroeger, P.E., Puttfarcken, P.S., Faltynek, C.R., Moreland, R.B., Han, P.: TRPV1b overexpression negatively regulates

TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J. Neurochem.* 99, 1088-1102, 2006.

Wang, C., Hu, H.Z., Colton, C.K., Wood, J.D., Zhu, M.X.: An alternative splicing product of the murine *trpv1* gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J. Biol. Chem.* 279, 37423-37430, 2004.

Wanner, S.P., Garami, A., Romanovsky, A.A.: Hyperactive when young, hypoactive and overweight when aged: connecting the dots in the story about locomotor activity, body mass, and aging in *Trpv1* knockout mice. *Aging (Albany NY)* 3 (4), 450-454, 2011.

White, J.P.M., Calcott, G., Jenes, Á., Hossein, M., Paule, C.C., Sántha, P., Davis, J.B., Ma, D., Rice, A.S.C., Nagy, I.: Xenon reduces activation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in rat dorsal root ganglion cells and in human TRPV1-expressing HEK293 cells. *Life Sci.* 88, 141-149, 2011a.

White, J.P., Urbán, L., Nagy, I.: TRPV1 function in health and disease. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 130-144, 2011b.

Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Eversviller, S., Burchette, J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M., Rosenberg, P.B.: A mutation in the TRPC6 Cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308 (5729), 1801-1804, 2005.

Winter, J., Dray, A., Wood, J.N., Yeats, J.C., Bevan, S.: Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 520 (1-2), 131-140, 1990.

Woo, D.H., Jung, S.J., Zhu, M.H., Park, C.K., Kim, Y.H., Oh, S.B., Lee, C.J.: Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol. Pain* 4, 42, 2008.

Wood, J.N., Winter, J., James, I.F., Rang, H.P., Yeats, J., Bevan, S.: Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8, 3208-3220, 1988.

Woolf, C.J., Ma, Q.: Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron* 55, 353-364, 2007.

Xu, H., Blair, N.T., Clapham, D.E.: Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J. Neurosci.* 25 (39)8924-8937, 2005.

Xue, Q., Yu, Y., Trilk, S.L., Jong, B.E., Schumacher, M.A.: The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics* 76, 14-20, 2001.

Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.B., Lee, C.H., Lee, J.K., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B.: Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J. Dent. Res.* 82 (10), 781-785, 2003.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D.: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457, 1999.

Iktatószám: DEENKÉTK/48/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Jenes Ágnes

Neptun kód: V0LZRV

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10038448

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Mistry, S., Paule, C.C., Varga, A., Photiou, A., **Jenes, Á.**, Avelino, A., Buluwela, L., Nagy, I.:
Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons.
Neurosci. Lett. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.006>
IF:2.026 (2012)
2. Varga, A., **Jenes, Á.**, Marczylo, T.H., Sousa-Valente, J., Chen, J., Austin, J., Selvarajah, S., Piscitelli, F., Andreou, A.P., Taylor, A.H., Kyle, F., Yaqoob, M., Brain, S., White, J.P.M., Csernoch, L., Di Marzo, V., Buluwela, L., Nagy, I.: Anandamide produced by Ca²⁺-insensitive enzymes induces excitation in primary sensory neurons.
Pflugers Arch. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1360-7>
IF:4.866 (2012)



További Közlemények

3. **Jenes, Á.**, Szigeti, G.P., Ruzsnavszky, F., Varga, A., Lőrincz, L., Csernoch, L.: Nicotine interferes with purinergic signaling in smooth muscle cells isolated from urinary bladders of patients with lower urinary tract symptoms.
Gen. Physiol. Biophys. 32 (3), 295-302, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013033
IF:0.852 (2012)
4. Palicz, Z., **Jenes, Á.**, Gáll, T., Miszti-Blasius, K., Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csősz, É., Kalló, G., Hegedűs, C., Virág, L., Csernoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 269 (1), 8-16, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>
IF:3.975 (2012)
5. **Jenes, Á.**, Ruzsnavszky, F., Telek, A., Szigeti, G.P., Csernoch, L.: A possible role of the cholinergic and purinergic receptor interaction in the regulation of the rat urinary bladder function.
J. Muscle Res. Cell Motil. 32 (6), 421-431, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-012-9285-x>
IF:1.358
6. Magyar, J., **Jenes, Á.**, Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., Nánási, P.P., Satin, J., Szentandrassy, N., Bányász, T.: Long term regulation of cardiac L-type calcium channel by small G proteins.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3714-3719, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642436>
IF:4.859
7. White, J.P.M., Calcott, G., **Jenes, Á.**, Hossein, M., Paule, C.C., Sántha, P., Davis, J.B., Ma, D., Rice, A.S.C., Nagy, I.: Xenon reduces activation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in rat dorsal root ganglion cells and in human TRPV1-expressing HEK293 cells.
Life Sci. 88 (3-4), 141-149, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.11.002>
IF:2.527





8. Sántha, P., **Jenés, Á.**, Somogyi, C., Nagy, I.: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-mediated currents in rat cultured primary sensory neurons.
Acta Physiol. Hung. 97 (2), 149-158, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/APhysiol.97.2010.2.1>
IF:1.226
9. White, J.P.M., Cibelli, M., Fidalgo, A.R., Paule, C.C., Anderson, P.J., **Jenés, Á.**, Rice, A.S.C., Nagy, I.: Sensitization of the transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel by isoflurane or sevoflurane does not result in extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in rat spinal dorsal horn neurons.
Neuroscience. 166 (2), 633-638, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.052>
IF:3.215

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24.904

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6.892

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.10



8. Tárgyszavak

Tárgyszavak: TRPV1, TRPV1b, CB1, fájdalom, gyulladás, anandamid

Key words: TRPV1, TRPV1b, CB1, pain, inflammation, anandamide

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek a doktori értekezésem létrejöttében.

Hálás vagyok témavezetőimnek, Nagy Istvánnak és Csernoch Lászlónak, amiért éveken keresztül irányították kutatásaimat, és amiért ajtajuk mindig nyitva állt előttem, ha segítségre, tanácsra vagy beszélgetésre volt szükségem.

Köszönöm a támogatását és a barátságát példaképeimnek, akik legtöbbet tettek azért, hogy az élettan elkötelezettje lettem: Rusznák Zoltánnak és Kertai Pálnak.

Köszönöm minden társszerzőmnek és kollaborációs partnerünknek az itt leírt eredményekhez való hozzájárulást, és mindazt, amit tőlük a közös, sikeres munka során megtanulhattam.

Köszönettel tartozom az asszisztensi feladatok kiváló ellátásáért Tálásné Őri Rózának és Vargáné Ibcsikének, valamint az időnként lehetetlennek tűnő vegyszerbeszerzések lehetőségessé tételéért Kissné Csillának.

Köszönöm az Imperial College London „pain” munkacsoportjának és a Debreceni Egyetem Élettani Intézet minden munkatársának azt a jókedvű és baráti légkört, amiért minden nap öröm a laborban dolgozni.

10. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Varga A*, **Jenes A***, Marczylo TH, Sousa-Valente J, Chen J, Austin J, Selvarajah S, Piscitelli F, Andreou AP, Taylor AH, Kyle F, Yaqoob M, Brain S, White JP, Csernoch L, Di Marzo V, Buluwela L, Nagy I: Anandamide produced by Ca²⁺-insensitive enzymes induces excitation in primary sensory neurons. Pflugers Arch Eur J Physiol DOI:10.1007/s00424-013-1360-7 [Epub ahead of print] 2013.

*contributed equally

Mistry S, Paule CC, Varga A, Photiou A, **Jenes A**, Avelino A, Buluwela L, Nagy I: Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. Neurosci Lett DOI: 10.1016/j.neulet.2014.02.006. [Epub ahead of print] 2014.