

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

A TRPV1 ioncsatorna aktivitását befolyásoló egyes regulátorok vizsgálata érzőneuronokon

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Jenes Ágnes általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezetők: Dr. Nagy István, kandidátus
Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllösi János, az MTA doktora
tagok: Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Szabó Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2.305-306. szoba
2014. május 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Jancsó Gábor, az MTA doktora
Dr. Tóth Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllösi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Jancsó Gábor, az MTA doktora
Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Szabó Tamás, PhD
Dr. Tóth Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK In Vitro Diagnosztikai Tömb
tanterme
2014. május 13. 13 óra

Bevezetés

Az elsődleges érzőneuronok a testi és zsigeri szöveteket érő mechanikai, kémiai vagy hőingerek felfogására, feldolgozására és az ingerületeknek a központi idegrendszerbe juttatására specializálódott idegsejtek, melyeknek két fő csoportját különböztethetjük meg: fájdalomérző, illetve nem fájdalomérző sejteket. Amíg a nem fájdalomérző neuronok csak egyfajta ingerrel (vagy meleggel, vagy hűvös ingerrel, vagy tapintással) aktiválhatók, addig a fájdalomérző sejtek túlnyomó többsége valamennyi erőteljes ingerrel, ami esetleg szöveti sérüléssel járhat (forró, hideg, erős mechanikai és kémiai inger) ingerületbe hozható, azaz polimodális sejt. A fájdalomérző elsődleges érzőneuronok aktiválása ily módon fájdalmat, és fájdalomhoz társult viselkedési mintázatot, menekülést, elkerülést vált ki.

A fájdalomérző neuronok túlnyomó többségén kifejeződik a tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptor és a kannabinoid 1 (CB1) receptor. Azonban amíg a CB1 receptor aktiválása az érzőneuronok működését szignifikánsan gátolja, és jelentős fájdalomcsillapító hatással rendelkezik, addig a TRPV1 aktiválása az idegsejteket stimuláló hatással bír. Polimodális fájdalomérzőként a TRPV1 számos fájdalmat keltő ligand, protonok és 43 °C feletti hőmérséklet hatását integrálja. A fiziológias működéseken kívül a TRPV1 számos patológias folyamat kialakításában is kulcsszerepet játszik, közülük kiemelten fontos a gyulladással járó fájdalom kialakulásában és fenntartásában betöltött szerepe. A TRPV1 első ismert, és máig a legszelektívebbnek tartott exogén ligandja a paprika csípősségéért felelős kapszaicin, az egyik legismertebb endogén agonistája pedig az anandamid.

Az anandamid egy endogén lipid, melynek élettani és patológias folyamatok széles spektrumában tulajdonítunk szerepet, részben az idegrendszerben, részben azon kívül. Az anandamid több különböző fehérjével is kölcsönhatásba lép, ám a hatásainak többségét a CB1 és a TRPV1 receptorok közvetítik. Szerterágazó hatásai közül kiemelendő a fájdalomérző primer érzőneuronok működésének szabályozása, mely szintén a CB1 és a TRPV1 receptorok közvetítésével valósul meg. Különféle szövetek egyes sejtípusai – köztük a primer érzőneuronok – anandamidot termelnek. Anandamidtermelés több lépésben, több különböző enzimátikus útvonalon létrejöhet, melyek egy része Ca^{2+} -ot igényel, más része Ca^{2+} -tól függetlenül is működik. Legalább hat olyan enzimet ismerünk, mely

közreműködhet az anandamid szintézisében, közülük legismertebb az *N*-acilfoszfatidiletanolamin foszfolipáz D (NAPE-PLD), mely az egyetlen ismert Ca^{2+} -függő anandamidtermelő enzim. Tudjuk, hogy a primer érzőneuronok egy csoportja rendelkezik NAPE-PLD-vel. A primer érzőneuronok azonban képesek anandamidtermelésre extracelluláris Ca^{2+} hiányában is, 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.

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. Az ioncsatornák működésének szabályozásában fontos mechanizmus az alegységek összetételének változása. 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.

A TRPV1-et kifejező sejtek közül a nociceptív primer érzőneuronokat általában elsőként említik. Ezekben a neuronokban a TRPV1 ioncsatornának alapvető szerep jut a perifériás gyulladáshoz vezető folyamatok jelzésében a központi idegrendszer felé, majd a gyulladással járó hő hiperalgiára és viscerális hiperreflexia kialakulásában és fenntartásában. A TRPV1 és a TRPV1b molekulák együttes kifejeződése a primer érzőneuronokon, és a TRPV1b heterológ rendszerekben leírt gátló hatása a csatorna válaszkészségére arra utal, hogy a TRPV1 ioncsatorna összetételének változása hozzájárulhat a receptor érzékenységének fokozásához is gyulladáshoz vezető körülmények között. Ennek megfelelően, egy ilyen változás hosszabb távon esetleg megmutatkozhat a TRPV1 és TRPV1b mRNS és fehérje szintjeinek módosulásában.

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 Ca^{2+} -független anandamidtermelésre alkalmas enzimek azonosítását és működésének leírását tűztük ki célul, patkány hátsógyöki ganglionjaiból tenyésztett primer érzőneuronokban.

Ezt követően az ezen enzimek által termelt anandamid hatását vizsgáltuk a TRPV1-et kifejező sejtekre, 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. Kísérleteinkben *in vitro* “gyulladást utánzó közeg” hatását vizsgáltuk a TRPV1 ioncsatorna válaszkészségére, miközben a TRPV1 és TRPV1b mRNS és fehérje szintjeit vizsgáltuk. Azt kerestük, hogy a TRPV1 egyik splice variánsa, a TRPV1b mennyiségének változása magyarázatot ad-e a TRPV1 fokozott érzékenységére gyulladással körülmények között.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok, alkalmazott anyagok. A kísérletekhez összesen 94 hím, 80-200 g tömegű Sprague-Dawley patkányt, valamint 5 vad típusú és 6 TRPV1 KO egeret áldoztunk fel. NAPE, kapszaicin, anandamid, rimonabant, mustárolaj és ionomycin oldására etanolt, Tocrisolve-ot vagy DMSO-t, vagy ezek keverékét használtuk. A DMSO-t legalább 2000-szeresre, az etanolt legalább 1000-szeresre hígítva alkalmaztuk.

Primer érzőneuronok tenyésztése. A kísérleti állatok hátsógyöki ganglionjait az első nyaki szegmenstől a hatodik lumbális szegmensig kireparáltuk, tenyésztőoldatba gyűjtöttük. Enzimátikus és mechanikus emésztés után a sejteket poly-DL-ornitinnel bevont üveg fedőlemezekre tenyésztettük 24 vagy 48 órán át. Tenyészteteink egy részét gyulladáso mediátorok (prostaglandin E₂ és bradikinin) jelenlétében tartottuk.

RNS izolálása, cDNS átírás és polimeráz láncreakció (RT-PCR). 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. A cDNS átíráshoz SuperScript II cDNS szintézis reagenseket használtunk. A reverz transzkripciót követően a következő gének felszorzosítását, majd gélen vizualizálását végeztük: NAPE-PLD, glicerofoszfodiészter foszfodiészteráz 1 (GDE1), α/β -hidroláz 4 (ABHD4), protein tirozin foszfátáz, nem-receptor típus 22 (PTPn22), 1b csoportba tartozó szolubilis foszfolipáz A₂ (sPLA2G1b), inozitol 5' foszfátáz (Inpp5), TRPV1 és gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH).

Patkány TRPV1b szekvenálása. Az RT-PCR termékeket elektroforézist követően az agaróz gélről QIAquick Gel extrakció kit és mikrocentrifuga segítségével a gyártó ajánlása szerint kinyertük. A szekvenálást ABI Prism automata szekvenáló rendszerben az előzőleg RT-PCR-hoz is használt primerekkel végeztük.

Immuncitokémia. A kitapadt sejteket PBS-ben mostuk, majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk. Permeabilizálást, és blokkolást követően a sejteket a primer antitestekkel inkubáltuk, majd a jeleket szekunder antitestekkel vizualizáltuk. A sejteket Leica DMR fluoreszcenciás mikroszkóppal vizsgáltuk.

Western blot. A sejtek homogenizálását, a fehérjék membránból történő kikapcsolását követően a fehérjetartalmat meghatároztuk. A fehérjéket denaturáltuk, aztán Bis-Tris gélen fracionáltuk, majd PVDF membránra blottoltuk. Blokkolást követően a membránokat a primer antitestekkel inkubáltuk, majd torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel és western blotting luminal reagenssel vizualizáltuk.

Anandamidfelszabadulás vizsgálata és mennyiségi meghatározása. A tenyészeteket kétszer mostuk HBSS-HEPES pufferben, majd 37 °C-on 5 percig inkubáltuk a tesztoldatokban. A felülúszókat jégen gyűjtöttük, ahonnan a lipideket etilacetáttal extraháltuk. A mintákból a termelt anandamid mennyiségét három független labor, némileg különböző módszerekkel határozta meg („A”, „B”, „C” protokoll).

Kobalt akkumuláció vizsgálata. A fedőlemezre letapadt sejteket mostuk, majd a vizsgált agonisták, illetve antagonisták jelenlétében kobalt-felvétel pufferben inkubáltuk. A sejtekbe felvett kobaltból β -merkaptotetanollal csapadékot képeztünk, majd a sejteket fixáltuk. Fénymikroszkópos felvételeket készítettünk, melyeket ImageJ programmal elemeztünk.

Fluoreszcens Ca^{2+} -koncentrációmérés. A sejtek kalciumhomeosztázisának vizsgálatára két fluoreszcens módszert alkalmaztunk. A kísérleteket Fura-2 AM-mel töltött sejteken PTI rendszeren, vagy Fluo-4 AM-mel töltött sejteken Zeiss LSM 5 LIVE konfokális mikroszkópon végeztük.

Árammérés. Feszültség-clamp körülmények között teljes-sejt áramokat mértünk 15-30 μm átmérőjű tenyésztett érzőneuronokon, 37 °C-on. 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.

Statisztikai módszerek. Az ismételt kísérletekből származó adatokat átlagoltuk. Az átlagok közötti különbségeket Student-féle t-próbával, egytényezős vagy többtényezős varianciaelemzéssel (ANOVA), illetve Fisher-féle egzakt teszttel hasonlítottuk össze. A bemutatásra kerülő adatoknál $\text{átlag} \pm \text{standard hiba}$ értékeket tüntettünk fel.

Eredmények

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. A termékek mérete jól korrelált a várt méretekkel. Mennyiségük változó volt, legtöbbször a GDE1 expresszióját találtuk, legalacsonyabbnak a PTPn22-é bizonyult.

Következő lépésben az enzimek expresszióját immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az érzőneuronok szubpopulációin ABHd4, GDE1, Inpp5 és PTPn22 fejeződik ki. 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.

A NAPE anandamidtermelést indukál a tenyésztett érzőneuronokban

Miután több olyan enzim jelenlétét kimutattuk az érzőneuronokban, melyekről tudjuk, hogy szerepet játszanak 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. 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 percg tartó 100 μ M 20:4-NAPE kezelés hatására anandamid jelent meg. 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 lizofoszfátid sav (18:1-LPA), melynek endovanilloid tulajdonságára nemrég derült fény. 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 µM 20:4-NAPE-et, 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 melleleg 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 µM 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 µM 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), míg szobahőmérsékleten ez az anandamidtermelés egy nagyságrenddel kisebb volt. A 20:4-NAPE által indukált anandamidtermelés koncentrációfüggőnek bizonyult ("A" protokoll). A legalacsonyabb 20:4-NAPE koncentráció, amely már szignifikáns anandamidtermelést okozott, 1 µM volt.

A NAPE által indukált anandamidszintézis kalciumfüggése

Az anandamid Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független útvonalakon is szintetizálódik. Ennek 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). 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; $n=3$).

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. Ellenőrzésként, hogy a mi tenyészetünk is mutatja ezt a tulajdonságot, a sejtekre 5 percig 100 nM kapszaicint adagoltunk, mely TRPV1 csatornákon keresztül Ca^{2+} influxot hoz létre a nociceptív sejtek többségében. 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+} -függően termel anandamidot.

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 elkezdjük az anandamid mennyiségi meghatározását sejtekből is (a továbbiakban a felülúszón kívül a tenyésztett 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.

NAPE jelenlétében kobalt akkumulálódik a tenyésztett érzőneuronokban

Ismert, hogy érzőneuronokon a TRPV1 receptorok stimulálása exogén anandamiddal kobalt akkumulációt eredményez. 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 ($n=10$). Kapszaicin (500 nM) hatására a kobalttal jelölt sejtek aránya szignifikánsan nőtt ($37,5\pm 3\%$, $n=10$). Hasonlóan, a 20:4-NAPE hatására a kobalttal jelölt sejtek aránya szignifikánsan nőtt, mely hatás koncentrációfüggőnek bizonyult. A legalacsonyabb 20:4-NAPE koncentráció, amely még szignifikáns kobalt akkumulációt okozott, $0,1\text{ }\mu\text{M}$ volt ($6,4\pm 1\%$, $n=4$). Többségében kisméretű neuronok jelölődtek.

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

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 $50\text{ }\mu\text{M}$ 20:4-NAPE hatására. Outward árammal egyetlen sejt sem reagált. Néhány neuron inward árama még a 20:4-NAPE adagolás befejezése után is emelkedett. Éppen emiatt, a válaszok csúcsmplitudóját (ami $-0,41\pm 0,1\text{ nA}$ -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, melyek amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt ($-2,36\pm 0,6\text{ nA}$, $n=9$), mint a NAPE-re adott válaszoké ($-0,35\pm 0,1\text{ nA}$, $n=9$). 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 ($n=11$).

NAPE hatására az érzőneuronok intracelluláris kalciumkoncentrációja nő

Az endogén anandamid intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatásait $50\text{ }\mu\text{M}$ 20:4-NAPE adagolásával vizsgáltuk. Kontrollként a NAPE oldószereit (etanol és Tocrisolve), kapszaicint ($1\text{ }\mu\text{M}$) és KCl-ot (50 mM) alkalmaztunk.

Az oldószert 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 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% , $n=6$).

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). A 20:4-NAPE hatására lassabban alakult ki válasz, mint kapszaicin hatására.

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). 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), míg az összes kapszaicinérzékeny sejt aránya 12% (403 neuron közül 47, n=5). Kapszazepin jelenlétében a NAPE-re és a kapszaicinre válaszoló sejtek aránya is szignifikánsan kisebb volt, mint kapszazepin nélkül. Elgondolkodtató, hogy a neuronok egy csoportja a kapszazepin adagolása közben (kb. 30 s elteltével) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést mutatott. 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, de tenyésztett érzőneuronokban még nem. A jelenség további vizsgálata folyamatban van.

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

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.

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. 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. A WT egérből tenyésztett 68 neuron közül 32 csak kapszaicinre reagált, NAPE-re nem (47%).

Ellentétben a WT egerek tenyészetében talált 20:4-NAPE-érzékeny neuronokkal, a KO egerekből származó hátsógyöki gangliontenyészetek egyetlen sejtje ($n=59$) sem reagált 20:4-NAPE-re. A vártnak megfelelően, a KO egerekből származó hátsógyöki gangliontenyészetek egyetlen sejtje sem reagált kapszaicinre sem. Mustárolajra azonban 59 esetből 22-ben kaptunk választ, 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.

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

A felülszóban mérhető anandamid koncentrációja (~10 nM) nagyságrendekkel kisebb, mint az exogén anandamid érzőneuronokon hatásos koncentrációja. 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 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 expresszázó érzőneuronok jelentős hányada kifejezi a TRPV1-et is. A PTPn22 immunpozitív sejtek közül alig néhány mutat TRPV1 jelölődést.

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

A TRPV1b-ből részben vagy teljes mértékben 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.

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 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 gyulladási környezetben tartott tenyészetekben megegyeznek.

A BK és PGE₂ jelenlétében tenyésztett érzőneuronok fokozottan érzékenyek kapszaicinre

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

30 nM kapszaicin hozzáadása a kobaltfelvétel pufferhez szignifikánsan növelte a jelölt sejtek arányát a kontroll (11,1±2%; n=4) és a gyulladási tenyészetekben (23,4±6%; n=4) is, továbbá kapszaicin hatására a gyulladási közegben tartott tenyészetekben szignifikánsan több sejt jelölődött, mint kontroll tenyészetekben.

A BK és PGE₂ jelenlétében tenyésztett érzőneuronok TRPV1 mRNS szintje nő, de a TRPV1b mRNS expressziója nem módosul

A TRPV1 és TRPV1b mRNS expresszióját kontroll, valamint BK és PGE₂ tartalmú tápoldatban tenyésztett sejtekben RT-PCR módszerrel vizsgáltuk két független kísérletsorozatban. A cDNS mennyiségi kontrolljaként β-aktint alkalmazva a TRPV1 és a

TRPV1b mRNS szemikvantitatív meghatározását elvégezve a gyulladásoz kultúrákban a TRPV1 kifejeződését szignifikánsan nagyobbak találtuk ($362\pm 80\%$, $n=4$), mint kontrollban, míg a TRPV1b expressziója nem emelkedett ($188\pm 18\%$, $n=4$). Ez összességében szignifikáns növekedést eredményezett a TRPV1/TRPV1b mRNS expresszió arányában, a kontroll tenyészetekben megfigyelt $1,07\pm 0,2$ ($n=4$) értékről a gyulladásoz közegben tartott tenyészetekben $1,86\pm 0,18$ ($n=4$) értékre nőtt.

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

A BK és PGE₂ jelenlétében tenyésztett érzőneuronok TRPV1 és TRPV1b fehérje expressziója nem változik

A TRPV1 elleni antitest a teljes sejt lizátumokból izolált fehérje Western blot vizsgálatokor két egyértelműen elkülöníthető (~110 kDa és ~88 kDa méretű) sávot jelölt, valamint egy harmadik, alig látható (~95 kDa) sávot. Membránfrakcióból történő izoláláskor ezeken kívül egy negyedik sáv (~75 kDa) is megjelent. A fent említett összes sáv kontroll és gyulladásoz közegben tenyésztett sejtekből izolált fehérjék western blotján is látszik. A 110 kDa körüli és a 95 kDa körüli fehérjék irodalmi adatok alapján a teljes hosszúságú TRPV1 teljesen glikozilált, illetve a teljes hosszúságú TRPV1 nem-glikozilált formájának felelhet meg. A ~88 kDa méretű fehérje valószínűleg a TRPV1b, a ~75 kDa fehérje viszont vélhetően csak a membránfrakciók preparálásakor keletkező melléktermék, hiszen a teljes sejt lizátumból hiányzik. 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. Meglepő módon, a gyulladásoz mediátorok nem okoztak szignifikáns változásokat sem a teljes sejt lizátumból izolált TRPV1, sem a TRPV1b mennyiségében. Hasonló eredményre jutottunk a membránfrakciók vizsgálatokor is. Bár a TRPV1 némileg kevesebbnek, a TRPV1b valamivel többnek adódott a gyulladásoz közegben tartott tenyészetekben, a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

Megbeszélés

Endogén anandamid

Vizsgálataink kezdetéig öt kalciumfüggetlen enzim szerepét valószínűsítették az anandamid termelésében. Munkánkban ezek közül négy fehérje (ABHD4, GDE1, Inpp5 és PTPn22) kifejeződését mutattuk meg tenyésztett primer érzőneuronokon. 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, és a $[Ca^{2+}]_i$ -t növelő TRPV1 agonista kapszaicin anandamidtermelést idéz elő. 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 az anandamid túlnyomó többsége a primer érzőneuronokból származik. Legvalószínűbb, hogy az általunk kimutatott anandamidszintézis során a sejtekre adagolt 20:4-NAPE beépül a sejtmembránba, ahol az intracelluláris enzimek a membránhoz asszociálódva átalakítják azt.

Bár a 20:4-NAPE adagolása valamelyest emeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t, a kalcium eltávolítása az extracelluláris térből nem változtatja meg a termelt anandamid mennyiségét, ezért úgy gondoljuk, hogy ez a növekedés az $[Ca^{2+}]_i$ -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.

A 20:4-NAPE kobaltbeáramlást, kalciumbeáramlást és áramot indukál a tenyésztett érzőneuronok egy csoportjában. A 20:4-NAPE kis átmérőjű sejtekben okozott kobaltbeáramlást, mely sejtek többsége TRPV1-et expresszáló fájdalomérző neuron. Kontroll körülmények között minden egyes sejt, amely 20:4-NAPE adagolására kalciumbeáramlással illetve inward árammal válaszolt, válaszolt kapszaicinre is. A válaszoló sejtek arányát a TRPV1 antagonistá kapszazepin szignifikánsan csökkentette. Továbbá, TRPV1 KO egerekből izolált neuronok közül egy sem reagált 20:4-NAPE-re, míg

a vad típusúak 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. Másodsor, 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, igen. Végül, a 20:4-NAPE szignifikánsan lassabb válaszokat hoz létre, mint a kapszaicin által kiváltott válaszok. 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 „céláll” is lehetnek a sejtben. 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.

Lévéen a felülülőszóban mért anandamidkoncentráció lényegesen alacsonyabb, mint ami a TRPV1 aktiválásához szükséges, a kalciumfüggetlen útvonalakon termelt anandamid valószínűleg autokrin módon hat. 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. 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.

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 nyilvánvaló, hogy ennek a fontos lipid mediátornak a viselkedését számtalan tényező befolyásolja.

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, míg a kisebb termék éppen 180 bázispárral (a 7-es exonnal) kevesebb ennél. A patkány hátsógyöki ganglionból felsokszorozott kisebb RT-PCR terméket TRPV1b homológoknak tartjuk, mely a teljes hosszúságú TRPV1-gyel együtt kifejezve az ioncsatorna válaszkészségét a kifejeződés arányában csökkenti. Eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV1 és a TRPV1b mRNS is fehérjére íródik át tenyésztett érzőneuronokban.

A gyulladási folyamatokban termelt és felszabadított számtalan mediátor közül a fájdalom kialakításában és fenntartásában nagy valószínűséggel a BK és a PGE_2 játszik az egyik legfontosabb szerepet. Mind a BK, mind a PGE_2 a TRPV1 gyors foszforilációját okozza, mely az ioncsatorna hőküszöbének szignifikáns csökkenéséhez vezet. Ismert, hogy a különféle TRPV1 agonisták a csatorna kapuzási mechanikáját együtt befolyásolják, ez a hőküszöbcsökkenés fokozza a TRPV1 által közvetített válaszokat, beleértve a kapszaicin

okozta kobaltbeáramlást is. Azt találtuk, hogy 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*. Az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok közötti ellentmondásos eredményeket magyarázhatja a gyulladós szövetekben valójában felszaporodó mediátorok és a kísérleteinkben a gyulladós körülményeket modellező környezet közötti különbség, de indokolhatja a gyulladós 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.

Miközben a TRPV1 fehérje szintje nem emelkedett, a kapszaicin-indukált, azaz TRPV1 közvetített kobaltbeáramlás szignifikánsan fokozódott a gyulladós 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. Az is elképzelhető, hogy a BK és a PGE₂ expozíció megváltoztatja a TRPV1 és a TRPV1b alegységek arányát az egyes összeszerelt csatornáknak anélkül, hogy a TRPV1 vagy a TRPV1b össz mennyisége változna. Így előfordulhat, gyulladós körülmények között inkább TRPV1 homotetramerek és TRPV1b homotetramerek szerelődnek össze, míg kontroll körülmények között nagyobb arányban jelennek meg TRPV1/TRPV1b heterotetramerek. Azaz a gyulladós mediátorok jelenlétében nagyobb számban előforduló teljes válaszkészsgű 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 gyulladós környezetben megfigyelhető fokozott válaszkészsgéhez.

Összefoglalás

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

Az arachidonol-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 érzőneuroni 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-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-arachidonolnak (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 hiperalgészia 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 gyulladáshoz vezető mediátorok ($10 \mu\text{M}$ BK és $10 \mu\text{M}$ 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.

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

Jelölt: Jenes Ágnes

Neptun kód: V0LZRZV

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., Csósz, 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., **Jenes, 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., **Jenes, 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

