

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

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

*Lázár József*



**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
ÉLETTANI INTÉZET  
DEBRECEN, 2003**

## BEVEZETÉS

### Kapszaicin-szenzitív neuronok

A primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportja, melyek sejtteste a spinális hátsó gyöki (DRG) és trigeminális szenzoros ganglionokban helyezkedik el, a kapszaicin és rokon vegyületeikkel (pl.: az *Euphorbia resinifera* tejnedvéből izolált reziniferatoxin, RTX) szemben mutatott szelektív érzékenysége alapján a "kapszaicin-szenzitív neuronok" elnevezést kapta. A sejtek afferens működésük során, centrális nyúlványaikon keresztül, szenzoros információt szállítanak a központi idegrendszerbe, míg efferens működésükként perifériás nyúlványaikban raktározott neuropeptideket (pl. P-anyag, a kalcitonin génkapcsolt peptid) szabadítanak fel lokálisan. A felszabadult anyagok más sejteken – pl. keratinocytákon, hízósejteken, makrofágokon, glia sejteken hatva – résztvesznek a lokális trófikus, vazoregulatórikus és immunomodulatórikus folyamatokban, amelyek kóros, kaszkád-szerű felerősödése neurogén gyulladás kifejlődéséhez vezet.

### A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa

A kapszaicin és rokon vegyületek celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolása után azonnal kifejlődő *excitáció*, mely során megnő a sejtmembrán elsősorban  $\text{Ca}^{2+}$ -ra és  $\text{Na}^{+}$ -ra vonatkozó permeabilitása és ez a sejtek depolarizációjához vezet. Ezen változást követi a második jellemző folyamat, a *deszenzitizáció*, a kapszaicin, valamint egyéb fájdalomkeltő (kémiai, hő, mechanikai) ingerek iránti érzékenység-csökkenés. A kapszaicin nagy koncentrációban, illetve hosszú ideig alkalmazva, a sejteken a harmadik jellegzetes folyamatot, a *neurotoxicitást* váltja ki, mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentrációnak ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), valamint ennek következtében kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható.

### A vanilloid receptor (VR1)

Már Jancsó (1968) is felvetette olyan, úgynevezett "fájdalom receptor" meglétének szükségességét, mely bizonyítaná a szenzoros neuronok kapszaicin-szelektivitását. 1997-ben végül megtörtént az első kapszaicin-érzékeny specifikus molekula, a vanilloid (kapszaicin) receptor (VR1) molekuláris karakterizálása, először patkány cDNS könyvtárát felhasználva. A patkány VR1 egy 2514 nukleotidból, azaz 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje. Strukturális sajátosságai alapján a VR1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (tranziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik altípusának tekinthető. A receptorok közös jellemzője, hogy 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkeznek és valószínűleg tetramer formában vannak jelen a membránban. A VR1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy számos kötő és szabályozóhellyel bír mind az intracelluláris, mind az extracelluláris oldalon. Hasonlóan a szenzoros neuronokon megtalálható VR-hoz, a klónozott VR1 is nem-specifikus, főként  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokra permeábilis csatornaként működik.

### A VR1-mediált sejtválaszok kalciumfüggése – a VR1 szubcelluláris lokalizációja

A VR1 aktiválódása után kialakuló komplex sejtfolymatsor vizsgálata során az egyik fontos cél a *VR1-mediált jelenségek extracelluláris kalciumkoncentrációtól ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) való függésének* elemzése volt. Bebizonyosodott, hogy a vanilloid vegyületek által kiváltott membránáramok jellegzetességei csak kismértékben, míg a deszenzitizáció (tachyphylaxis) tulajdonságai, a legtöbb kísérletes elrendezésben, jelentősen függték  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -tól.

Ezen nagyszámú kísérlet ugyanakkor nem szolgáltatott egyértelmű választ *a VR1-mediált  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -tól való függését* illetően. Számos munkacsoport arra a következtetésre jutott, hogy a nociceptív neuronokban található VR1 kizárólag a sejtek felszíni membránjába épül be; azaz a kapszaicin

csak az extracelluláris térben lévő kalcium jelenlétében képes az  $[Ca^{2+}]_i$  megemelésére. Ezzel szöges ellentétben, a legújabb eredmények azt sugallják, hogy a csatorna nemcsak a felszíni, hanem különféle, intracelluláris kalciumraktárakként működő struktúrák (pl. endoplazmatikus retikulum, ER) membránjába is (funkcionálisan) beépülhet, azaz a VR1-mediált sejtválaszok kalciummentes közegben is kiválthatók.

A VR1 molekuláris biológiai leírása óta *számos eltérő heterológ expressziós rendszert* használtak a kutatók a receptor molekuláris és farmakológiai tulajdonságainak feltérképezéséhez, valamint a receptor aktiválódás által kiváltott celluláris mechanizmusok leírására. Ezen rendszerekben nyert adatok ugyanakkor – azon túlmenően, hogy nem adtak választ az intracelluláris kalcium-válasz fent bemutatott kalcium függésével kapcsolatban – eltérő eredményeket szolgáltattak a receptor vanilloid vegyületek iránti érzékenységet és sejten belüli lokalizációját illetően. Például a kapszaicin  $[Ca^{2+}]_i$ -t növelő hatása VR1-et expresszáló kínai hörcsög ovárium (CHO) és embrionális humán vesesejteken (HEK) nagymértékben függött az  $[Ca^{2+}]_e$ -től. Ezzel szemben Oláh és mtsai kimutatták, hogy a zöld fluoreszcens proteinnel jelölt VR1-et (VR1eGFP) expresszáló sejteken az RTX alkalmazása az  $[Ca^{2+}]_i$  növekedését és intracelluláris organelumok károsodását idézte elő kalciummentes közegben is. Bebizonyosodott továbbá, hogy a VR1eGFP nemcsak a plazmamembránban, hanem az ER membránban is megtalálható.

#### *A VR1 központi integrátor szerepe a fájdalomérzés kialakításában*

A VR1-t nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő endogén anyag („endovanilloidok”) is képes aktiválni, mint például az alacsony küszöbű ( $\sim 43^\circ C$ ) hőmérséklet emelkedés, a pH csökkenése (acidózis) és számos, leginkább gyulladáshoz vezető mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.). Ezen ágensek egyrészt direkt

módon (azaz a VR1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kináz-rendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a VR1 működését. Ezen hatások leginkább a VR1 hőérzékenységi küszöbét csökkentik, így a hozzájárulhatnak a termális hyperalgesia jelenségének kialakulásához.

### A neurotrophinok és jelentőségük

A neurotrophinok családjába az idegi növekedési faktor (NGF), az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF), valamint a különféle neurotrophinok (NT3, NT4) sorolhatók. Ezen faktorokat leginkább a különféle neuronfészeségek termelik, azonban megtalálhatók egyéb non-neurális sejttípusban is (lymphoid sejtek, keratinocyták, hízósejtek). A neurotrophinok membránreceptoraikhoz eltérő affinitást mutatnak. Míg a p75 receptorhoz mindegyik neurotrophin nagyon hasonló érzékenységgel kötődhet, addig az NGF leginkább a TrkA, a BDNF és az NT4 a TrkB, az NT3 pedig a TrkC receptorhoz kötődik. A Trk receptorok aktiválódása a tirozin-kináz receptorhoz kapcsolt intracelluláris enzimkaszkádot indít be, míg a p75 receptor aktiválódása megemeli a sejten belüli ceramid szintet, így transzkripciós faktorok (pl. NF $\kappa$ B) működését szabályozza.

Számos neuronfészeség embrionális fejlődéséhez, valamint neuronális differenciálódásához elengedhetetlenül szükséges a trófikus faktorként viselkedő neurotrophinok jelenléte. Kimutatták, hogy ezen faktorok szabályozó szerepe a posztnatális életben központi jelentőségű a neuronális túléléshez, a perifériás axonok sérülést követő regenerációhoz, valamint az adott neurontípusra jellemző funkcionális tulajdonságok kialakulásához. Megállapították emellett, hogy számos neurotrophin képes egyéb, non-neurális szövettípus (pl. szív, vese, bőr) morfogenezisét, újraépülését, valamint az adott szövetben található sejtek proliferációját és apoptózisát is befolyásolni.

### A neurotrofinok és a szenzoros neuronokon expresszáldó VR1 kapcsolata

A szenzoros neuronok, így a kapszaicin-érzékeny nociceptív neuronok, *in vivo* és *in vitro* fejlődéséhez ugyancsak szükséges a neurotrofinok jelenléte. A legújabb kutatási eredmények ugyanakkor a neurotrofinok *akut hatását* is feltételezik a nociceptív szenzoros afferens neuronokon. A szöveti gyulladás folyamata a szenzoros neuronok szenzitizációját okozza, mely leginkább a hőingerekre vonatkozó gyulladásos hyperalgesia jelenségét váltja ki. Bebizonyosodott, hogy az NGF hyperalgesiát vált ki (mely kivédhető NGF-ellenes blokkoló antitestekkel), valamint az is, hogy számos neurotrofin szintje lokálisan megemelkedik a gyulladásos területeken. Több munkacsoport ezért feltételezte a neurotrofinok szerepét a mechanizmusban. Ezen hipotézist alátámasztó kísérletekben kimutatták, hogy pl. a bőrben a gyulladás során a különféle sejtekből (keratinocyták, fibroblasztok) felszabaduló neurotrofinok vagy közvetett módon (azaz pl. hiszócsejtek degranulációja révén) vagy közvetlenül (azaz ezen neuroncsoporton kifejeződő TrkA receptoraikhoz kötődve) válthatják ki a nociceptív szenzitizáció jelenségét. Úgy tűnik tehát, hogy a fájdalom kialakulásának egyik központi integrátor molekulája (azaz a VR1), valamint a neurotrofinok, mint potenciális gyulladásos mediátorok akut (azaz szenzitizáló) hatása között szoros kapcsolat lehetséges.

## **PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK**

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

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

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

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

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

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *A patkány VR1-t kifejező heterológ expressziós rendszerek elkészítése*

A tranziens expressziós rendszer előállításához cos-7 sejteket transzfektáltunk a már korábban leírt módon elkészített 1-2  $\mu$ g VR1eGFP plazmiddal vagy kontrollként használt üres vektorral, LipofectAMINE transzekciós reagens felhasználásával a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően (*VR1eGFP/cos-7 sejtek*). A transzfektált sejteket további 48 órán át

kiegészített DMEM tápoldatban tenyésztettük, majd a sejteken intracelluláris kalciummérést végeztünk.

Az indukálható expressziós rendszert (*VR1/CHO sejtek*) a már korábban leírtaknak megfelelően hoztuk létre. Ezekben a CHO sejtekben tetraciklin jelenlétében egy represszor fehérje termelődik, így a VR1 szekvenciáját kódoló pUHG plazmid nem íródik át mRNS-sé, tehát a receptor termelődése gátolt. A VR1/CHO sejteket kiegészített, valamint 2 µg/ml tetraciklint tartalmazó Ham F-12 médiumban tenyésztettük. A sejteket 48 órával a kísérletek kezdete előtt indukáltuk a tápoldat tetraciklin-mentes Ham F-12 médiumra változtatásával, majd a intracelluláris kalciummérést végeztünk.

A stabil expressziós rendszer előállításához pεMTH plazmidba inzertált patkány VR1 DNS-ét használtuk, melyet C6 patkány glióma sejtekbe transzfektáltuk (*VR1/C6 sejtek*). A transzfekciót követően a sejteket kiegészített, valamint 750 µg/ml G418-t tartalmazó DMEM tápoldatban szelektáltuk, majd különálló kolóniákat szedtünk, melyeket 500 µg/ml G418-t tartalmazó DMEM oldatban tenyésztettük tovább.

### Western (immuno) blot analízis

A VR1 és a neurotrophin receptorok Western blot analízishez a sejteket hideg foszfát-pufferrel (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben homogenizáltuk és a proteintartalmat meghatároztuk. Ezután SDS poliakrilamid gélelektroforézissel mintánként 20-30 µg proteint választottunk szét 7,5%-os gélen, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5% tej-PBS) 30 percig blokkoltuk, majd 5%-os tej-PBS-ben hígított megfelelő elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel inkubáltuk, végül az



immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel tettük láthatóvá.

### Immuncitokémia

A fedőlemezen tenyésztett sejteket a megfelelő konfluencia elérése után 4 °C-os acetonnal fixáltuk. Ezt követően a sejteket blokkoló oldattal 30 percig permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd a megfelelő neurotrophin receptor ellenes, blokkoló oldatban hígított antitesttel két órán keresztül nedveskamrában inkubáltuk. A lemezeket háromszor mostuk PBS-ben, majd a következő lépésben FITC-konjugált másodlagos antitesttel végeztük az immunreakciót. Végül a mintákra DAPI-t tartalmazó fedőanyagot helyeztünk, majd a sejtekről fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk.

### Intracelluláris kalciummérés

A fedőlemezre szélesztett sejteket 5 µM kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával töltöttük fel, majd fluoreszcens mikroszkópon keresztül vizsgáltuk az intracelluláris kalciumkoncentráció változást. Ehhez az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva egy fotoelektron-sokszorozóval. Az  $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk.

Kísérleteink során a sejteket állandóan mostuk kalcium-tartalmú vagy -mentes Tyrode-oldatban. A vizsgált anyagokat a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. Kísérleteinket szobahőmérsékleten (22-23 °C) végeztük.

## Real-time konfokális mikroszkópia

Az 1-2  $\mu\text{g}$  VR1eGFP plazmival transzfektált üveg fedőlemezen további 48 órát tenyésztett cos-7 sejteket MRC-1024 Bio-Rad konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A kiválasztott sejteket az  $x$ - $y$  síkban szkenneltük 1 másodpercen át 30 s-onként 0,2  $\mu\text{m}$ -es lépésekkel a  $z$  tengely mentén.

## EREDMÉNYEK

### **I. A VR1 funkcionális tulajdonságainak összehasonlítása különböző expressziós rendszerekben**

#### A) A tranziens expressziós rendszer – VR1eGFP/cos-7 sejtek

1. Funkcionális kalciummérés segítségével kimutattuk, hogy a VR1eGFP/cos-7 tranziens expressziós rendszerben *a kapszaicin hatékonyabbnak bizonyult  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú, mint  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes körülmények között.* Megállapítottuk, hogy 1,8 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  oldatban a sejtek nagyobb százaléka (79 %) válaszolt szignifikáns  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedéssel kapszaicin kezelésre, mint  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes körülmények között (46 %). A  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldatban kiváltott tranziensek, különféle paramétereik alapján, két csoportba voltak sorolhatók. Az első csoportba tartozó ún. „gyors” tranziensek (a válaszoló sejtek 69 %-a) nagy amplitúdóval, meredek felszálló szárral, valamint gyors kinetikai jellegzetességekkel bírtak. Ezzel szemben az ún. „lassú” tranziensek (a sejtek 31 %-a) amplitúdója kisebbnek, míg kialakulásuk sebességi mutatói lassabbnak bizonyultak. A  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban a kapszaicin által kiváltott  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tranziensek mindegyike a „lassú” csoportba volt sorolható és alacsony amplitúdóval rendelkezett.

2. Minkét csoport esetében a tranziensek ismételt kapszaicin hatására csökkenő amplitúdóval voltak jellemezhetők, azaz a *jelentős* (30-40%-os) *tachyphylaxis* minkét vizsgált oldatban megfigyelhető volt.

3. Minkét oldatban *a kapszaicin hatása VR1 specifikus volt*, hiszen a kapszazepin (mely a VR1 kompetitív antagonistája) jelentősen és egyben reverzibilis módon gátolta a kapszaicinnel kiváltott  $[Ca^{2+}]_i$  válaszok kialakulását.

4. Mindezen adatok, jó összhangban korábbi irodalmi megfigyelésekkel, azt suggalták, hogy *a VR1 nemcsak a sejtfelszíni membránokba, hanem intracelluláris struktúrákba is beépülhet*. Ezen lehetőséget vizsgálva, kihasználva az VR1eGFP zöld fluoreszcenciáját, real-time konfokális mikroszkópia segítségével tanulmányoztuk a kapszaicin hatását a sejtek morfológiai jellegzetességeire. Kimutattuk, hogy  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban a kapszaicin a VR1-t expresszáló intracelluláris membránok (ER, maghártya) hólyagosodását és feldarabolódását okozta, mely hatás kapszazepinnel kivédhető volt. Ezzel elentétben a kapszaicin  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban sokkal kevésbé kifejezett intracelluláris változásokat okozott.

5. Az ultrapotens VR1 agonista RTX hatását vizsgálva ugyanakkor kimutattuk, hogy *az RTX által kiváltott sejtválaszok nagyon hasonlóak voltak  $Ca^{2+}$ -tartalmú és  $Ca^{2+}$ -mentes oldatokban*. Az RTX a vizsgált sejtek közel azonos hányadában váltott ki tranzienszt a két oldatban, melyek a  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban kizárólag, míg  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban a sejtek nagy hányadában (67 %) a „*lassú*” tranziensek jellegzetességeit mutatták. Ezen tranziensek, hasonlóan a kapszaicin esetében tapasztaltakkal, jelentős tachyphylaxist mutattak ismételt RTX adagolás hatására, valamint a VR1 antagonistá kapszazepinnel reverzibilis módon gátolhatóknak bizonyultak.

6.  $Ca^{2+}$ -mentes körülmények között, az intracelluláris membránokba beépült VR1eGFP funkcionális szerepének tisztázása érdekében, vizsgáltuk az intracelluláris kalciumraktárak kiürítésének hatását az RTX által kiváltott válaszokra thapsigargin felhasználásával. Megállapítottuk, hogy *az ER*

*kalciumtartalmának kiürítése a Ca-ATP-áz gátlószerevel jelentősen lecsökkentette az RTX-nal kiváltható  $[Ca^{2+}]_i$  tranziensek amplitúdóját.*

7. Real-time konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk végezetül, hogy az RTX hasonló hatékonysággal hozta létre az intracelluláris membránok felbomlását  $Ca^{2+}$ -mentes és  $Ca^{2+}$ -ot tartalmazó oldatban, mely hatás jelentős mértékben felfüggeszthető volt a kalciumraktárak kiürítésével.

### B) Az indukálható expressziós rendszer – VR1/CHO sejtek

1. Hasonlóan a tranziens expressziós rendszerben tapasztaltakhoz, az indukálható VR1/CHO sejtekben *a kapszaicin sokkal nagyobb hatékonysággal* (a sejtek 66%-ában) hozott létre „gyors”, nagy amplitúdóval rendelkező  $[Ca^{2+}]_i$  tranzienseket  *$Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban*, mint  $Ca^{2+}$ -mentes körülmények között (ez esetben a sejteknek csak 25 %-a válaszolt, kizárólag „lassú” és alacsony amplitúdójú tranzienssel). Minkét esetben a válaszok VR1 specifikusnak adódtak, hisz a kapszazepin sikerrel védte ki a kapszaicin által kiváltott kalciumválaszokat.

2. Ezzel szemben, jelentősen eltérve a VR1eGFP/cos-7 sejtek esetében kapott eredményektől, a *VR1/CHO sejteknél egyik oldatban sem tapasztaltunk tachyphylaxist* ismételt kapszaicin adagolásra, azaz ismételt VR1 stimuláció közel azonos amplitúdójú és kinetikájú tranzienseket hozott létre.

3. Ugyancsak jelentős különbségnek adódott, hogy az indukálható rendszerben *az RTX teljes mértékben hatástalannak bizonyult a  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban*. Ráadásul,  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban is csak a sejtek kis hányada (16%-a) válaszolt „lassú”, alacsony amplitúdójú  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedéssel RTX adagolására.

### C) A stabil expressziós rendszer – VR1/C6 sejtek

1.  *$Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban* vizsgálva a VR1/C6 sejteket *a kapszaicin hatása hasonlóan bizonyult a VR1/CHO sejtek esetében tapasztaltakhoz*. A kapszaicin az összes vizsgált sejten „gyors”, nagy amplitúdóval bíró,

kapszazepinnel gátolható  $[Ca^{2+}]_i$  tranzienszt váltott ki, mely válaszok ismételt agonista adagolás során nem mutattak tachyphylaxist. Ezzel ellentétben, eltérően a VR1/CHO sejtekben mértéktől, a *VR1/C6 sejteken kapszaicinnel nem tudtunk semmilyen választ kiváltani  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban.*

2. Az RTX hatásának vizsgálata teljes mértékben azonos eredményeket szolgáltatott a VR1/CHO sejteken tapasztaltakhoz viszonyítva. Azaz, *az RTX kizárólag  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban volt hatásos*, és csak a sejtek csekély (28 %) hányadán váltott ki „lassú”, kis amplitúdójú tranzienseket.

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

1. A kontroll és VR1 receptort expresszáló sejtek különböző tulajdonságait megvizsgálva a tranziens és az indukálható rendszerben,  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban, egy érdekes jelenséget tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy *a VR1-t tartalmazó vektorokkal transzfektált sejtek nyugalmi  $[Ca^{2+}]_i$ -ja jelentősen magasabb*, mint az üres pGFP vektorral transzfektált cos-7 és kontroll CHO sejteké. Kimutattuk azt is, hogy a VR1eGFP/cos-7 és VR1/CHO sejtekben a kapszazepin adagolás jelentősen (és reverzibilisen) csökkentette a nyugalmi  $[Ca^{2+}]_i$ -t. Fontos hangsúlyoznunk, hogy ilyen jelenségeket soha sem tapasztaltunk a stabil VR1/C6 sejteken.

2. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a VR1eGFP/cos-7 (tranziens) és VR1/CHO (indukálható) rendszerekben, de nem a VR1/C6 stabil rendszerben, a felszíni membránba épült *VR1-csatorna részben nyitott állapotban lehet.*

## **II. A VR1 működésének szabályozása különböző neurotrofinokkal**

1. Az expressziós rendszerek összehasonlítása során a VR1 szabályozásának vizsgálatához *a legideálisabb sejtnek a VR1/C6 rendszer bizonyult*, hisz ezen sejteken a kapszaicin uniform, jelentős amplitúdójú,

valamint ismételt adagolásra tachyphylaxist nem mutató tranzienseket váltott ki. Így a továbbiakban a neurotrophinok hatását a VR1 működésére ezen rendszerben elemeztük.

2. Western blot és immunhisztokémiai technikákkal kapott eredményeink azt mutatták, hogy az eddig felfedezett *neurotrophin receptorok közül az összes, azaz a TrkA, -B és -C, valamint a p75 is expresszálódik a VR1/C6 sejtekben.*

3. Funkcionális kalciummérés segítségével megállapítottuk, hogy *az összes neurotrophin jelentősen, ugyanakkor egymástól eltérő mértékben, megnövelte a VR1 kapszaicin iránt mutatott érzékenységet; azaz, a neurotrophin kezelés után a kapszaicin szignifikánsan nagyon kalciumtranzienst váltott ki, mint előtte.* Nagyszámú sejten kapott eredményeinket statisztikailag elemezve egy BDNF>>NGF>NT3>NT4 hatáserősségi sorrendet tapasztaltunk.

4. A neurotrophinok hatásmechanizmusát elemezve bebizonyosodott, hogy a K252a anyag, mely *a tirozin-kináz útvonal gátlószere, teljes mértékben kivédte az összes neurotrophin VR1-et szenzitizáló hatását.* Eredményeink arra utalnak tehát, hogy a neurotrophinok VR1-t szenzitizáló hatása specifikus, azaz valamely tirozin-kináz útvonalhoz kapcsolt Trk receptor(ok)on keresztül megvalósuló folyamatként értelmezhető.

## MEGBESZÉLÉS

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

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

extracelluláris kalciumtól való függése jelentősen eltér a különböző rendszerekben.

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

VR1eGFP/cos-7 sejteken a vanilloidok által kiváltott tranziensekben jelentős különbségeket mutattunk ki; gyors és lassú válaszokat tudtunk regisztrálni kapszaicinnal mind 1,8 mM  $Ca^{2+}$ -tartalmú és -mentes, illetve RTX-nal  $Ca^{2+}$ -mentes Tyrode-oldatban. Mivel ezek a jelenségek csak VR1eGFP/cos-7 sejtekben voltak megfigyelhetők, az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a tranziens jellegnek és az eltérő transzfekciós hatásfoknak köszönhetően az egyes sejtekben a VR1 szintje eltérő lehet, így ez okozhatja, hogy ugyanaz a vanilloid vegyület a VR1-et eltérő szinten expresszáló sejteken különböző kalciumválaszokat hoz létre.

Az általunk vizsgált három rendszer közül a stabil (VR1/C6) rendszerben homogén válaszok voltak megfigyelhetők. Ezen sejtekben, hasonlóan a szenzoros neuronokon tapasztaltakhoz, a vanilloidok csak  $Ca^{2+}$ -tartalmú extracelluláris oldatban voltak hatásosak. Ráadásul, a kapszaicinnal vagy RTX-nal kapott válaszok tulajdonságai nagyon homogének voltak; az összes vizsgált

sejten a kapszaicin gyors, az RTX lassú  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést hozott létre.. Ezen adatok azt sugallják, hogy a VR1 expressziója a VR1/C6 sejtekben a rekombináns vektor által jól szabályozott módon megy végbe, mely hasonló körülményeket teremt a VR1 tulajdonságainak vizsgálatához.

Az indukálható rendszerben (VR1/CHO sejtek) a vanilloidokkal kiváltott  $Ca^{2+}$ -válaszok nagyon hasonlítottak a VR1/C6 sejteken kapott adatokhoz. 1,8 mM  $[Ca^{2+}]_e$  oldatban a kapszaicin gyors, míg az RTX lassú tranzienseket váltott ki. Ugyanakkor, a hasonlóságok mellett, különbségeket is tapasztaltunk az indukálható és stabil rendszerek összehasonlításakor. A VR1/CHO sejtekben a kapszaicin (ellentétben a RTX-nal) még  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban is kiváltott  $Ca^{2+}$ -tranzienseket, habár megjegyzendő, hogy a kapszaicin csak a sejtek jóval kisebb hányadán volt hatékony, továbbá a válaszok sokkal kisebbek és lassabbak voltak. Természetesen további vizsgálatok szükségesek még az intracelluláris membrán strukturákban expresszálandó VR1 vélelmezett helyének egyértelmű tisztázására. Adataink ugyanakkor megegyeznek Tóth és mtsai által közöltekkel, miszerint a thapsigargin előkezelés teljesen kivédte a kapszaicin által kiváltott  $[Ca^{2+}]_i$  tranzienseket VR1/CHO sejtekben, mely további bizonyítéka a VR1 intracelluláris membránokba épülésének ebben a rendszerben is.

A “legváratlanabb” eredményünk mégis az volt, hogy a kapszaicin ismételt adagolásának hatására nem tapasztaltunk tachyphylaxist a VR1/C6 és VR1/CHO rendszerben. Mivel a tachyphylaxis összetett folyamatában a szenzoros neuronokon szerepe lehet a VR1 csatornadenzitás csökkenésének a vanilloid vegyületek ismételt vagy hosszantartó adagolásának hatására, feltételezzük, hogy ezen expressziós rendszerek stabil vagy részlegesen stabil volta hozzájárulhat a tachyphylaxis hiányához. Ezen túlmenően, mivel a gazdasejtekben kimutatott kifinomult kalcium homeosztatikuss és jelátviteli (kináz, foszfatáz) mechanizmusok eltér(het)nek a szenzoros neuronokéitól, így a VR1 ezen rendszerek általi szabályozása jelentősen különbözhet. Mindemellett az a jelenség, hogy a kapszaicin ismételt adagolásának hatására létrejött



tranziensek amplitúdója csaknem megegyezett VR1/C6 és VR1/CHO sejteken, lehetővé teszi ezen sejtek használatát a VR1-et gátló és szenzitizáló anyagok tulajdonságainak meghatározására (lásd alább).

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

Természetesen nagy jelentőségű lenne azon tényezők azonosítása, amelyek hozzájárulnak a különböző expressziós rendszerek vizsgálatokor tapasztalt eltérésekhez (sejten belüli elhelyezkedés, kalciumfüggés, a vanilloidok iránti érzékenység). Kísérletes adataink, valamint irodalmi hivatkozások alapján úgy tűnik, hogy a rekombináns vektor sajátosságai, a gazdasejt funkcionális tulajdonságai (pl. kalciumhomeosztázis), az expresszió típusa (pl. tranziens vagy stabil), a receptor glikozilációjának mértéke illetve sztöchiometriai eltérések, valamint a kalciumkoncentráció változásának megállapításához használt módszer érzékenysége egyaránt hozzájárulhatnak a rendszerek eltérő tulajdonságaihoz. Adataink tehát a heterológ expressziós rendszerek jelentőségének növekedésére utalnak a VR1 sejtszintű funkciójának meghatározásában, ugyanakkor óvatosságra intenek ezen eredmények más rendszerekkel, például szenzoros neuronokon kapott eredményekkel való összevetésében.

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

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

K252a – mely irodalmi adatok szerint a tirozin-kináz (azaz esetünkben a Trk útvonal) gátlószere – jelenlétében vizsgálva a neurotrophinok hatását megállapítottuk, hogy az anyag hatásosan és szinte teljes egészében felfüggesztette az összes neurotrophin szenzitizáló hatását. Mivel az irodalomban nem találtunk utalást a K252a anyagnak a p75 neurotrophin receptorhoz kötött jelátviteli útvonalat befolyásoló hatásáról, eredményeink azt valószínűsítik, hogy a neurotrophinok a VR1-t szenzitizáló hatásukat a Trk receptorokon keresztül fejtik ki. Mivel kísérleteinkben az összes neurotrophin aktívnak bizonyult a szenzitizáció vonatkozásában, így az összes Trk receptor (azaz a TrkA, -B és -C) közreműködése feltételezhető a folyamatban. Azt is kimutattuk ugyanakkor, hogy a különféle neurotrophin vegyületek eltérő hatékonysággal növelték meg a VR1 kapszaicin iránt mutatott érzékenységét: a több sejten kapott mérési eredmények statisztikai vizsgálata egy BDNF>>NGF>NT3>NT4 hatáserősség-sorrendet állapított meg. Habár természetesen további kísérletek szükségeltetnek a neurotrophinok hatásának

pontos farmakológiai leírásához (dózis-hatás görbék), úgy tűnik, hogy a VR1/C6 sejten a TrkB (azon belül is a BDNF-ral való aktiválás) jelentheti a legkifejezettebb szenzitizáló hatást. Ezt a feltételezést erősítheti azon megfigyelésünk is, miszerint a Western blot kísérletekben kapott eredmények proteinre normálásával a TrkB receptor expresszióját találtuk a legkifejezettebbnek a VR1/C6 sejtekben.

A natív VR1-t expresszáló nociceptív szenzoros neuronok leginkább a TrkA és -B neurotrophin receptorokat expresszálják, ugyanakkor nem található meg membránjukban a TrkC receptor. Ennek megfelelően az NGF, BDNF vagy NT4 bőrbe való injektálása termális hyperalgesiát vált ki, míg a NT3 hatástalan a folyamatban. Kísérleti eredményeinket összevetve a szenzoros neuronokon tapasztaltakkal megállapítható, hogy az általunk használt heterológ expressziós rendszerben – hasonlóan a natív VR1 esetéhez – mind a TrkA, mind a TrkB receptor aktiválása jelentős szenzitizációt okozott. Emellett rendszerünkben megtalálható a TrkC receptor (mely hiányzik a DRG nociceptív neuronjaiból), amelynek aktiválódása hasonló pozitív hatással bír a kapszaicin érzékenységre. Úgy tűnik tehát, hogy amennyiben expresszálódik egy adott Trk receptor altípus, a VR1 szenzitizációja kifejlődhet aktiválódása után. Ezt erősítheti azon irodalmi megfigyelés, miszerint a különféle Trk receptorok által beindított jelátviteli útvonalak jelentős konvergenciát mutatnak.

## ÖSSZEFOGLALÁS

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

## A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

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

## TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

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

## IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

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

- 4) Szentandrassy N., Gönczi M, Papp H., **Lázár J.**, Kovács L., Bíró T., and L. Csernoch (2002): Stretch activated channels and their regulation by protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **119(3)**: 746
- 5) **Lázár J.**, Czifra G., Papp H., Marincsák R., Papp L., Kovács L., and Bíró T. (2002): Protein kinase C regulates the sensitivity of recombinant rat vanilloid receptor to capsaicin. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 13
- 6) Papp H., Bodó E., **Lázár J.**, Czifra G., Kovács L., and Bíró T. (2002): Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 348
- 7) Czifra G., Papp H., **Lázár J.**, Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2002): PKC $\delta$  mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**: 278
- 8) Bíró T., Papp H., Bodó E., **Lázár J.**, Czifra G., Kovács I., Gáspár K., Juhász I., and Kovács L. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 195
- 9) Bodó E., Géczy T., **Lázár J.**, Kovács I., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Bíró T. (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 823
- 10) Czifra G., Papp H., **Lázár J.**, Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2003): PKC $\delta$  mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Neuromuscular Disord.* **13(7-8)**: 621