

**KATIONCSATORNÁK MODULÁCIÓJÁNAK ELEKTROFIZIOLÓGIAI ÉS  
FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLATA PRIMER SZENZOROS NEURONOKBAN ÉS  
AGYI KAPILLÁRIS ENDOTÉLSEJTEKBEN**

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

**Dr. Balla Zsolt**

Neurofarmakológia Program

Programvezető: Prof. Dr. Szolcsányi János

Témavezető: Prof. Dr. Czéh Gábor

\*PD. Dr. Ingolf E. Blasig

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, MTA Neurofarmakológiai Kutatócsoport

\*Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Germany

Pécs, 2003

## A FESZÜLTSGFÜGGŐ $\text{Na}^+$ ÉS $\text{K}^+$ CSATORNÁK

Az élő sejtek általános jellemzője a membránpotenciál, mely a töltött részecskék számára közvetlenül átjárhatatlan sejtmembrán két oldalán a nem neutrális részecskék által hordozott elektromos töltés egyenlőtlen eloszlásából ered. Az intracelluláris térben több negatív töltés halmozódik fel, ennek megfelelően a nyugalmi membránpotenciál a sejtípustól függően különböző mértékben negatív (-20 - -90 mV). A membránpotenciál kialakításában és szabályozásában számos tényező játszik szerepet (az ioncsatornák adott ionra vonatkozó vezetőképessége, az extra- és intracelluláris ionkoncentrációk, Na-K-ATP-áz, transzporterek, stb.). A membránpotenciál fenntartása és aktív szabályozása energiaigényes folyamat, azonban számos fontos sejtfunkcióhoz nélkülözhetetlen (ingerületterjedés és annak szinaptikus átvitele, kontrakció, szekréció, stb.).

Az ionok transzmembrán mozgása speciális membránfehérjéken, az ioncsatornákon át zajlik, melyek 2 alaptípusa: kapuzott és nem-kapuzott csatornák. A nem-kapuzott csatornák vezetőképessége nem regulált, konstans. Ilyenek bizonyos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$  csatornák. Ezeken az ún. szivárgási (leakage) csatornákon át nyugalmi állapotban passzív áramok folynak, a csatornák fenti ionokra vonatkoztatott vezetőképessége a nyugalmi membránpotenciál kialakításában döntő szerepet játszik.

A kapuzott csatornák bizonyos ionokra vonatkoztatott vezetőképessége változó, különféle mechanizmusok által szabályozott, ennek módja alapján az alábbi csoportokra oszthatók: feszültség-aktivált, ligand-aktivált, (intracelluláris) szignál-aktivált, mechanikai erő-aktivált, valamint a disszertációban részletesen jellemzett, kapszaicin, protonok és fájdalmas hőingerek által aktivált vanilloid receptor (VR1). A feszültség-aktivált csatornák  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Cl}^-$  ionokra permeábilis családjai ismertek. Ezen csatornák a membránpotenciál dinamikus szabályozásában (pl. akciós potenciál, szinaptikus transzmisszió, stb.), ill. egyes  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizációs mechanizmusok elindításában bírnak jelentős szereppel. Elsősorban excitábilis sejtek (neuronok, izomsejtek) membránjában találhatóak. Mindez nem zárja ki azonban azt, hogy ezen csatornák a klasszikus értelemben nem excitábilisnek tekintett sejtek (pl. endotélsejtek) felszínén is megtalálhatóak legyenek és szabályozó funkcióval bírjanak.

Munkám során a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  csatornáknak a célsejtekben betöltött funkcióját, azok patológias körülmények közötti változását, ennek lehetséges következményeit és farmakológiai modulálhatóságát vizsgáltam. E csatornák működése azonban a sejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak módosításán keresztül jórészt a

feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák funkciója által a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisát befolyásolva számos szignalizációs utat aktivál, melyek közvetlenül szabályozzák a sejtfunciót, akár magukon a csatornákon kifejtett moduláló hatással is.

A feszültségfüggő ioncsatornák vizsgálatára a patch-clamp metodika voltage-clamp variánsa jól bevált módszer. Ennek okán munkám során e módszerrel tanulmányoztam primer szenzoros neuronokban a kapszaicin feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatornákon kifejtett hatását, ennek a deszenzitizáció jelenségében játszott szerepét. Ez a későbbiekben kiegészült a fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  mérés módszerének alkalmazásával, mellyel a patkány VR1 receptor sejtvonalba történt transzfekcióját is jellemeztük. Agyi kapilláris endotelsejtek esetében pedig a feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák inaktivációjának hipoxiás modulációját vizsgáltam. Ezen esetben a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependens protein kináz II (CaMKII) izoenzimek ebben játszott szerepének felderítésére a patch-clamp metodikát az RT-PCR, Western-blot és laser scanning mikroszkópia módszereivel kombináltam.

A disszertációban összefoglalt munkám a PTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében kezdődött, ahol mint Ph.D. ösztöndíjas hallgató vettem részt a celluláris elektrofiziológiai laboratóriumban az alábbi új módszerek elindításában:

- patch-clamp technika
- fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$ -mérés
- a szövetszelet technika adaptációja trigeminus ganglionra
- a primer neuronok tenyésztésének elindítása és elektrofiziológiai alkalmazása
- az elektrofiziológiai és fluoreszcens mérésekkel kapcsolatban felmerülő számítógépes problémák megoldása hardver- és szoftverszinten.

Az új módszerek bevezetése, optimalizálása során nyert tapasztalataimra alapozva pályázat által vendégkutatói állást kaptam a berlini Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Intézetben, ahol teljesen önállóan egy patch-clamp laboratórium felszerelése és munkájának biztosítása volt feladatomban. Az intézet profiljából adódóan módomban nyílt egyes alapvető molekuláris biológiai technikák elsajátítására is, melyet az elektrofiziológia módszerével kombinálva alkalmaztam, ill. betekintést nyerni a gyógyászati, farmakológiai kérdések molekuláris szintű megközelítésének módszereibe is.

# KAPSAZICIN FESZÜLTSEGFÜGGŐ $\text{Na}^+$ CSATORNÁKRA GYAKOROLT HATÁSA PRIMER SENZOROS NEURONOKBAN

## BEVEZETÉS

A kapszaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), mely a paprika csípős anyaga, a vanilloid receptor (VR1) szelektív aktivátora. A kapszaicin hatások vizsgálatának elindítása magyar kutatók nevéhez (Hőgyes, 1878, Jancsó Miklós, 1955) kapcsolódik. A későbbiekben a szerkezet-hatás vizsgálatok alapján egy kapszaicinre specifikus receptor létezésének felvetése szintén magyar ötlet (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975, 1976). A kapszaicin VR1 receptorra vonatkoztatott szelektivitása már a kutatások kezdeti szakaszában nagy hangsúlyt kapott, a kapszaicin nagyobb dózisaival kiváltott, egyéb kémiai fájdalomkeltőkkel szembeni deszenzibilizáció kialakulása is egy korán leírt alapjelenség (Jancsó Miklós, 1955). A kapszaicinre specifikus receptorra vonatkozó hipotézis helyességét a receptor újabban történt klónozása igazolta (Caterina és mtsai, 1997) A VR1 molekula szerkezete emlékeztet az ún. store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákéra. Ezek tipikus képviselője a *Drosophila* retinájában található TRP (transiens receptor potenciál) protein, ezért a VR1 receptort és a többi, magas hőmérséklettel aktiválható hasonló szerkezetű ioncsatornát az új nevezéktan alapján a TRP kationcsatornák szupercsaládjának TRPV1-6 alcsoportjába sorolták (Montell és mtsai, 2002). A TRPV1/VR1 receptor agonistája több vanilloid szerkezetű anyag (kapszaicin, resiniferatoxin), természetes aktivátorának a savas pH (protonok) valamint a fájdalmas, 43 °C-ot meghaladó hőinger tekinthető, vagyis a receptor a fájdalmas fizikai és kémiai ingerek integrátoraként funkcionál (Tominaga és mtsai, 1998). A TRPV1/VR1 endogén ligandjának meghatározása jelenleg is aktuális kérdés.

A TRPV1/VR1 receptor plazmamembrán protein egy nem-szelektív kationcsatorna, mely a  $\text{Ca}^{2+}$  ionokra erősen permeábilis (Bevan és Szolcsányi, 1990). E receptor-csatorna komplex megtalálható a primer szenzoros neuronok jelentős részében, melyek szómája a trigeminális, valamint a hátsó gyöki ganglionokban található. A kapszaicin szenzitív primer afferens neuronok (Szolcsányi, 1982) csoportját az exteroceptív területek C-polimodális és A $\delta$ -polimodális nociceptorai, valamint az interoceptív területeken a nyálkahártyák és a vizszerális szervek perivaszkuláris kemonociceptorai alkotják. A szenzoros terminálisok mellett a trigeminus és hátsógyöki ganglion neuronpopuláció kis méretű, B típusú sejtjeinek szómamembránja kapszaicin direkt adagolására szintén érzékenységet mutat (Bevan, 1996).

A kapszaicin szelektív hatásának felfedezése a szenzoros neuronok farmakológiai vizsgálatának nagy lendületet adott. Számos új VR1 agonista vált ismertté, mint pl. a természetes eredetű piperin, zingeron, eugenol, terpenoidok, guajacol, resiniferatoxin (RTX), ill. a szintetikus olvanil, nuvanil, forbol vanilloidok (Szállási és Blumberg, 1999).

## PROBLÉMAFELVETÉS

A kapszaicin szenzitív neuronok intracelluláris elektrofiziológiai regisztráció során kapszaicin hatására koncentrációfüggő depolarizációt mutatnak, melyhez gyakran akciós potenciál, valamint membrán konduktancia növekedés is társul (Baccaglioni és Hogan, 1983). Voltage-clamp vizsgálatok során a kation csatorna kapszaicin hatására történő nyitása különböző időkinetikájú befelé folyó áramokat generált a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlással párhuzamosan (Bevan és Szolcsányi, 1990). A kapszaicin-indukált áram fordulási potenciálja 0 mV körüli, ami egy nem-szelektív kationcsatorna aktiválódását sugallja (Oh és mtsai, 1996). Ion szubsztitúciós és radioaktív  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -mal végzett kísérletek a megnyíló konduktancia divalens kationokra, azon belül is túlnyomórészt  $\text{Ca}^{2+}$ -ra való permeabilitását mutatták (Wood és mtsai, 1988).

Több tanulmány által leírt jelenség, hogy átmeneti izgató hatást követően kapszaicin a polimodális nociceptorokat deszenzitizálja természetes ingerekkel, így mechanikai, hő és kémiai ingerekkel szemben is (Szolcsányi, 1987, 1993). A deszenzitizáció jelensége jól megfigyelhető kapszaicin ismételt adagolását követően (Szállási és Blumberg, 1999). Nagyobb dózisban alkalmazva az anyag neurotoxikus hatást fejt ki. Voltage-clamp kísérletekben a pozitív membránpotenciál értéken tartott sejtek nagymértékben csökkent deszenzitizációt mutattak (Piper és mtsai, 1999), hasonlóan a  $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor BAPTA-val dializált sejtekhez. Mindezek azt mutatják, hogy a deszenzitizációban a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás hatására kialakuló intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés központi szereppel bír. Irodalmi adatok szerint a funkcionális deszenzitizáció függ az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtól (Santicioli és mtsai, 1987), a jelenség kialakulása ruténium vörössel, a VR1 receptor blokkolójával megakadályozható (Maggi és mtsai, 1998). Más tanulmányok szerint az akut deszenzitizáció jelenségében a tartós depolarizációt követő receptor-csatorna komplex defoszforiláció játszik szerepet (Piper és mtsai, 1999).

A kapszaicin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna blokkolásban tehát az aktivált receptor-csatorna komplexen át történő  $\text{Ca}^{2+}$ -influx szerepe vetődött fel (Bleakman és mtsai, 1990).

Ennek megfelelően hátsó gyöki ganglionsejtekben az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -nak  $\text{Ba}^{2+}$ -ra történő cseréje megakadályozta a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  áramok kapszaicin adagolást követő gátlását. Azon sejtekben, ahol a kapszaicin nem növelte a membrán konduktanciát, nem volt megfigyelhető a feszültségfüggő csatornák funkciójának változása sem (Docherty és mtsai, 1991). Eszerint a feszültségfüggő befelé folyó (inward) áramok modulálásában a vanilloid receptor aktiválódásának szerepe jelentős, mivel a kationcsatornán át belépő  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  az iongrádienszt módosítva befolyásolja az adott ionokra ható hajtóerőket.

A szenzoros neuronok farmakológiáját tekintve jelentős ismeretanyag gyűlt össze, mindezek ellenére jelenleg sem rendelkezünk a szenzoros neuronokon szelektíven ható gyógyszerekkel. Ezek szisztematikus fejlesztésében a deszenzitizáció mechanizmusa áll középpontban, különös tekintettel a deszenzitizációt előzetes izgatás nélkül létrehozó anyagok vizsgálatára. Kísérleteink során ezért a kapszaicinnek a nociceptorok deszenzitizációjában játszott szerepét az elektrofiziológia és a fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  mérés módszerének alkalmazásával vizsgáltuk. A deszenzitizáció egyik lehetséges magyarázata a VR1 receptor funkció kiesése, a hosszantartó szenzoros deszenzitizáció pontos mechanizmusa azonban még tisztázásra szorul. A szenzoros neuronok ionáramainak, azok kapszaicin általi direkt vagy indirekt modulálódásának jellemzése az egyik lehetséges megközelítési mód. A nociceptív neuronokban kapszaicin akciós potenciálokat generál, melyek létrejöttében a feszültségfüggő ioncsatornák központi szereppel bírnak. A vanilloid receptor aktiválódásának feszültségfüggő csatornákra gyakorolt hatása, ill. ennek szerepe a deszenzitizáció jelenségében javarészt még tisztázatlan. E tekintetben számos, a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  áramokat vizsgáló publikáció született, a  $\text{Na}^+$  áramokra gyakorolt hatás azonban még kevésbé vizsgált. Továbbá látható, hogy a bőségesen rendelkezésre álló irodalmi adatok a kapszaicin-indukált áramok, ill. a kapszaicin adagolással kapcsolatos egyéb elektrofiziológiai jelenségek paramétereit meglehetősen nagy variabilitással írják le. Hiányzik viszont a szisztematikus összehasonlítás arról, hogy ezek mennyiben tudhatók be a kísérleti elrendezés körülményeinek, a kapszaicin adagolási módjának ill. annak, hogyan módosítják a kapszaicin hatását a sejtenyésztes körülményei, pl. hogy vizsgálhatók-e az ionáramok szenzoros ganglionból készített szelet preparátumon.

## CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a fentebb leírtaknak megfelelően az alábbi kérdések vizsgálatát választottuk feladatul:

- I. Kapszaicinnek a sejtek elektrofiziológiai paramétereire, valamint a feszültségfüggő inward áramokra gyakorolt hatásainak leírása.
- II. A nM-os nagyságrendben alkalmazott kapszaicin hatásosságának vizsgálata.
- III. Kapszaicin hatása a TTX-szenzitív és rezisztens  $\text{Na}^+$  áramokra.
- IV. Ismételten alkalmazott kapszaicin ionáramokra gyakorolt hatásának leírása.
- V. A kapszaicin által indukált inward clamp-áram és a feszültségfüggő inward áramok közötti kapcsolat vizsgálata.
- VI. A kapszaicin szenzitív sejtek arányának összehasonlító vizsgálata szept preparátumban, akutan izolált és tenyésztett trigeminus ganglionsejtekben.
- VII. A kapszaicin által indukált membránáramok összehasonlító vizsgálata szept preparátumban, akutan izolált és tenyésztett trigeminus ganglionsejtekben.
- VIII. Az idegnövekedési faktor (NGF) szerepének tisztázása a fentiekben.
- IX. A különböző módszerrel adagolt kapszaicin által indukált membránáramok összehasonlító vizsgálata.

## KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

### *1. Preparátumok*

#### a. Sejtkultúra

A primer sejtenyészetek készítéséhez 1-7 napos Wistar patkányok trigeminális ganglionját használtuk. A ganglionok eltávolításukat követően 2% kollagenázt (XI. típus) tartalmazó 37 °C-os PBS oldatban 5%  $\text{CO}_2$ -tartalom mellett 40 percig emésztődtek. Ezt 8 perces dezoxiribonukleáz I. tartalmú PBS-sel történő inkubálás követte, majd triturációt végeztünk. A sejtenyésztést tekintve szokványos eljárásunknál maradtunk. Egyes sejtenyészetekben a médium 200 ng/ml NGF-el egészült ki.

#### b. Akutan izolált sejtek

Az eltávolított trigeminus ganglionok 50 percre 34 °C-os  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  mentes, kollagenáz (Ia) és pronáz E tartalmú mesterséges cerebrospinális folyadékban (ACSF)

emésztődtek, a folyamat 1 perces tripszin inhibitoros mosással lett leállítva. A sejteket HEPES pufferelt ACSF oldatban triturációval disszociáltuk, majd üveglemezre ülepítettük, melyek 4 órán belül a regisztráló kamrába kerültek.

### c. Szeletpreparátumok

3-12 napos Wistar patkányok agyának gyors eltávolítását követően preparáltuk ki a trigeminus ganglionokat jéghideg, oxigenált, magas  $Mg^{2+}$  és alacsony  $Ca^{2+}$  tartalmú ACSF oldat folyamatos rámosása mellett. A kötőszövet eltávolítása után vibratómmal 400  $\mu m$  vastag szeletek készültek. Az idősebb (7-12 napos) állatokból származó szeleteket a tiszta, szabad sejtfelszínhez való hozzáférés érdekében 5-10 percig IV. típusú kollagenázzal emésztettük.

## 2. *Elektrofiziológia*

A trigeminus ganglionsejtek whole-cell voltage-clamp vizsgálata szobahőmérsékleten (23 °C) történt, folyamatos átáramlású regisztráló kamrában. A kapszaicin az alábbi 3 módon került alkalmazásra: 1) Az oldatok perisztaltikus pumpa segítségével áramlottak 2 külön csőben, azok alternáló használatával. A teljes kamravolumen kicserélődési ideje 5 sec alatt maradt. Szenzitív sejtek esetén a kapszaicin bemosás időtartama maximum 1 perc volt, a gyors válasz hiányában a bemosást 5 percig tartottuk fenn. 2) A kapszaicin rámosás idejére a perisztaltikus pumpát leállítottuk, s mikropipetta segítségével a kamrában elérni kívánt végkoncentrációnak megfelelő mennyiségű kapszaicint injektáltunk be. 3) A kapszaicin tesztoldat perisztaltikus pumpa által hajtva direkt, gyors rámosással jutott el a sejtekhez, ahol a cső szájadéka a kiválasztott sejttől 150-200  $\mu m$  távolságra helyezkedett el.

A DIC optikájú mikroszkópos képek rögzítése digitális videokamerával történt, a sejtekre vonatkozó vizuális szelektációs kritériumok az alábbiak voltak: éles sejtkontúr, homogén textúra citoplazma szegregáció és a sejtduzzadás jelei nélkül.

Az ionáramok mérése Axopatch 200B erősítőt használtunk. A kommand pulzusok vezérlése és az adatok elsődleges rögzítése a Clampex 7.0 szoftverrel történt, a digitális kamera képét az ezzel szimultán futó Axon Imaging Workbench 2.1 program jelenítette meg. A nyers adatok rögzítése a merevlemezzel párhuzamosan folyamatos 44 kHz-es digitalizálással DRA400 recorderrel CD-lemezre is történt. A regisztrátumok 20 kHz-es mintavételezéssel 10 kHz-es felülvágó Bessel-szűrővel kerültek rögzítésre. A sejtkapacitás és soros ellenállás kompenzálásra került. A sejtek elektrofiziológiai szelektációs kritériumai a következők voltak: min. 1 GOhm seal-rezisztencia; 20 MOhm alatti soros rezisztencia; -50



mV alatti membránpotenciál; -60, -70 mV holding potenciál mellett mért stabil, gyenge szivárgási (leak) áram (<150 pA); a megfelelő step-, ill. ramp-protokollra létrejövő robosztus befelé folyó áram.

A feszültségfüggő csatornák vizsgálatára step- és ramp-kommandok variánsait használtuk. A step-kommand variánsok az alábbi paraméterekkel bírtak: -60 mV holding potenciálról egy 20-500 ms, -100 mV priming stepet követően -60 - -10 mV tartományban 2-5 mV-os növekményekkel 100-200 ms step-sorozat történt 3 sec interstimulus intervallummal. Túl nagy amplitúdójú válaszok esetén a priming step paramétereit módosítottuk, ill. szükség esetén el is hagytuk. A leak áram a p4 protokoll alkalmazásával már a regisztrációval egyidejűleg, vagy az egyes sweepek után alkalmazott 10 mV step-kommandra adott válaszok átlagolásával kiszámított értékkel, a regisztráció után került levonásra.

A ramp-protokollok során a holding potenciálról -100 mV 20 ms priming step után indult a 50-500 ms tartamú depolarizáló ramp, melynek végpontja a -30 - +100 mV tartományban mozgott. Így a feszültségváltozás rátája 0.03 és 3 mV/ms között alakult. Az áram-feszültség (I-V) függvények mind a step, mind a ramp regisztrátumok esetében is kiszámításra kerültek.

A step- és ramp-protokollok közötti időben a holdingon mért alapvonal (clamp) áramot a DRA-400 recorderrel folyamatosan rögzítettük.

## EREDMÉNYEK

### 1. NGF-kezelt trigeminus ganglionsejt tenyészet

A 200 ng/ml NGF jelenlétében tenyésztett sejtek 78%-a volt kapszaicin szenzitív. A szenzitivitás kritériumai az alábbiak voltak: 100 pA-t meghaladó amplitúdójú befelé folyó áram kapszaicin 150 nM, 330 nM vagy 1  $\mu$ M koncentrációinak hatására és/vagy kapszaicin hatására fellépő membránkonduktancia növekedés. A kontroll csoport sejtjei esetében (n=7) a kapszaicin-szenzitivitás bizonyítását a kapszaicin nélküli szolvens rámosása követte, mely nem váltotta ki a kapszaicinre adott jellemző válaszokat.

#### a. Step-pulzusok által kiváltott TTXs és TTXr inward áramok

Ezen kísérletsorozatunkban a depolarizációkor fellépő kifelé folyó  $K^+$  áramok eliminálásához CsCl tartalmú patch-pipettával dializáltuk a sejteket. A step-kommandokkal kiváltott befelé folyó áram TTX alkalmazásával egy TTX-szenzitív (TTXs) és egy TTX-

rezisztens (TTXr)  $\text{Na}^+$  komponensre volt bontható. A gyors, nagy amplitúdójú TTXs komponens 1  $\mu\text{M}$  TTX erőteljesen, gyakran teljes mértékben blokkolta. A fennmaradó lassabb, kisebb amplitúdójú TTXr komponens a vizsgált sejtek 80%-ban kimutatható. A kevert és a TTXs komponens küszöbe a -50 - -45 mV tartományban mozgott,  $-24 \pm 2.02$  mV ( $n=5$ ) számított fél-maximális aktivációs küszöbvel. A TTXr áram küszöbe és csúcshintenzitása is kb. 10 mV-al volt pozitívabb, kalkulált fél-maximális aktivációs küszöbe pedig  $-16 \pm 1.28$  mV ( $n=5$ ) volt.

b. Kapszaicin hatása step-pulzusokkal kiváltott inward áramokra

A kapszaicin depolarizáló step-pulzus által kiváltott befelé folyó áramokra gyakorolt hatását 6 sec-ként ismétlődő depolarizáló step-sorozattal monitoroztuk. 330 nM, ill. 1  $\mu\text{M}$  kapszaicin rámosása 20-80%-kal csökkentette a feszültségfüggő inward áram amplitúdóját, a depresszió átlagos értéke  $32.78 \pm 26.42\%$  ( $n=27$ ) volt. Az áram részleges depressziója a kapszaicin rámosástól számított 20-30 sec-on belül bekövetkezett, visszatérése lassú és még 5 perces kimosási periódus után sem volt teljes.

A sejtek egy csoportjában a depolarizáló step által kiváltott áram amplitúdójának fokozatos csökkenését tapasztaltuk a 10-15 perces kontroll periódusban (run-down). Ezen sejteknél a step-kommand által kiváltott áram amplitúdójának hirtelen, a kapszaicin rámosást rövid időn belül követő csökkenése jelezte a kapszaicin hatását ( $n=22$ ). A sejtek egy másik csoportjában ( $n=6$ ) a feszültségfüggő inward áram depressziója tisztán, a run-down jelenség nélkül volt megfigyelhető.

c. Kapszaicin hatása ramp-pulzusokkal kiváltott inward áramokra

A depolarizáló ramp-kommandok 6-8 sec intervallummal alkalmazva demonstrálták kapszaicinnek (330 nM) a slope-konduktanciára és a feszültségfüggő befelé folyó áramra kifejtett hatását, annak időbeli alakulását és a clamp-áramhoz való viszonyát. Az I-V karakterisztika -95 és -65 mV közötti szakasza lineáris volt. Kapszaicin (330 nM) a kontroll  $18.01 \pm 8.79$  pA/mV-ről  $28.376 \pm 14.24$  pA/mV-re ( $n=34$ ) növelte e szakasz meredekségét, ami  $170.5 \pm 68\%$ -os emelkedés.

A ramp-válaszokból származtatott I-V függvény -95 és -65 mV közötti szakasza meredekségének (slope-konduktancia) emelkedése gyors és átmeneti volt, melyet lassú, a kimosás utáni 3. percben gyakran már a kontroll értékre történő visszatérés követett. Sok esetben e szakasz meredekségének emelkedése és a feszültségfüggő befelé folyó áram blokkja

időben egybeesett. A feszültségfüggő áram 25%-ra való csökkenésének időpontjában a meredekség a kontroll  $13.5 \pm 9.9$  mV/pA-ról  $18.8 \pm 11.8$  mV/pA-re, azaz 160%-kal emelkedett (n=14). A feszültségfüggő áram amplitúdójának depresszióból való visszatérése a kimosási fázisban hosszabb időt vett igénybe, mint a meredekség rendeződése.

A clamp-áram negatív irányú növekedése, a slope-konduktancia emelkedése és a feszültségfüggő áram depressziója időben párhuzamosan zajlottak. Gyakran azonban a clamp-áram inward irányú növekedésének csúcsa megelőzte a step-pulzus által kiváltott áram depressziójának maximumát.

#### d. Kapszaicin hatása az inward áram komponenseire

Míg egyes sejtekben tisztán TTXs befelé folyó áramok voltak regisztrálhatók, sok sejtben kevert áramot mértünk TTXr komponenssel. Kapszaicin a TTXs áramot egy átmeneti facilitáció után blokkolta (n=6), a TTXr komponensnél viszont tiszta depressziót láttunk (n=16).

#### e. Kapszaicinnel kiváltott inward áramok

A szenzitív sejtekben kapszaicin több, mint 50 pA-rel emelte inward irányba a clamp-áram amplitúdóját  $-60$  mV-os holding potenciál mellett. A kapszaicinnak a regisztráló kamrába a Módszerek részben leírt 1) és 2) módon való bejuttatása kis amplitúdójú (100-400 pA) áramokat váltott ki kb. 15 sec latenciával, 10-20 sec-os elnyújtott csúccsal és lassú, fokozatos csökkenéssel. A direkt rámosás során kapszaicin többnyire nagy, tipikusan 1-3 nA amplitúdójú, kis latenciájú, meredeken növekvő befelé folyó áramokat indukált kb. 6-8 sec time-to-peak idővel, gyorsabb, esetenként azonban elnyújtott alapvonalra való visszatéréssel (20-50 sec). Gyors, nagy amplitúdójú vagy komplex áramokat azonban direkt adagolás esetében is csak NGF-el történő tenyésztést követően figyeltünk meg.

#### f. Kapszaicin ismételt alkalmazása

Kapszaicin (330 nM) többszöri alkalmazása során az egyes expozíciók között 10 perces periódust tartva 2-4 alkalommal végeztünk rámosást (n=15), melyek során a kapszaicin indukált inward clamp-áram amplitúdója egyre csökkent, a 3., 4. rámosás esetén az 1. rámosáskor mért áram amplitúdójának 25-0%-át mértük. Mindezen idő alatt a feszültségfüggő áramok blokkja változatlanul fennállt.

## 2. Akutan izolált trigeminus ganglionsejtek

Mind az akutan izolált (2-8 órás), mind az NGF nélkül tenyésztett sejtek kisebb hányada, 14%-a (n=28) reagált kapszaicinre (150 nM - 3.3  $\mu$ M). Az inward áram amplitúdója a 100-200 pA tartományban mozgott a feszültségfüggő befelé folyó áramok depressziójával, ill. teljes, permanens blokkjával társulva.

## 3. Trigeminus ganglion szeletpreparátum

A ganglionszeletekben a szabad felszíntől 50  $\mu$ m távolságon belül elhelyezkedő sejtekről történt elvezetés. A kapszaicin szenzitív sejtek aránya ezen preparátumokban 40% volt (n=67). Az NGF-kezelt tenyésztett sejtekkel összevetve szeletpreparátumban kisebb amplitúdójú, a 100-400 pA tartományban mozgó és lassabb kapszaicin által indukált inward áramokat mértünk kb. 30-40 sec time-to-peak idővel és 150-200 sec alapvonalra való visszatérési idővel.

### a. Kapszaicin hatása step-pulzusokkal kiváltott válaszokra

A ganglionsejtek 3 sec intervallumokkal kaptak depolarizáló step-pulzust. A kapszaicin által indukált inward clamp-áram kifejlődésekor a küszöbalatti pulzusokra adott válaszok amplitúdója a kontroll értékről  $674 \pm 420\%$ -ra emelkedett (n=10). Amikor a depolarizáló step-pulzus feszültségfüggő befelé folyó áramot váltott ki, kapszaicin ennek depresszióját okozta hasonlóan a sejtenyészetben tapasztaltakhoz.

### b. Kapszaicin hatása ramp-pulzusokkal kiváltott válaszokra

5 sec-ként ismétlődő, 0.8 mV/ms rátájú ramp-pulzusokkal vizsgálva a válaszokból származtatott I-V függvények -100 - -50 mV közötti tartományának meredeksége 150 nM kapszaicin hatására átlagosan  $218 \pm 86\%$ -ra emelkedett (n=18) a clamp-áram inward irányú növekedésével egyidejűleg. A nem szenzitív sejtek esetében a meredekség szignifikánsan nem változott ( $109 \pm 7.5\%$ , n=11). A meredekség változása mellett a rektifikáció átmeneti változását is tapasztaltuk, a fordulási (zéró-áram) potenciál pedig átmenetileg pozitív irányba tolódott.

A kapszaicin hatását az I-V függvény -50 mV-nál pozitívabb szakaszain több tényező is befolyásolta. A CsCl-os töltőoldattal dializált sejtek esetében a függvény meredeksége főleg a negatív feszültségtartományban megnőtt, a visszatérés kb. 10 percet vett igénybe. A KCl-os pipettával dializált sejtek esetében kapszaicin hatásának csúcsán az I-V görbék negatív

feszültségtartományának meredeksége nőtt, míg a pozitív tartományé kevéssé, vagy nem változott. A slope konduktancia változásával párhuzamosan a rampok előtt alkalmazott step-pulzusok válaszaiból számolt konduktancia kapszaicin hatására 500%-os növekedést mutatott.

A magasabb feszültségváltozási rátájú (1.8 mV/ms) rampok aktiválták a gyors feszültségfüggő inward áramot, ezek kapszaicin hatására bekövetkező depressziója most is megfigyelhető volt, párhuzamosan az inward clamp-áram kifejlődésével. A feszültségfüggő befelé folyó áram blokkja a kimosási periódus első néhány percében is tartott.

## ÚJ EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

**I. Kapszaicin jelentősen csökkentette, ill. blokkolta a feszültségfüggő inward áramokat mindhárom preparátum típusban.** Kísérleteinkben 330 nM kapszaicin mintegy 20-80%-kal csökkentette a feszültségfüggő kevert befelé folyó áram amplitúdóját. Sok esetben ezzel párhuzamosan a membránkonduktancia értéke mintegy 150-600%-kal nőtt.

**II. Kísérleteinkben kapszaicin már 150 nM hígításban is hatékonyan bizonyult, a membránkonduktancia nőtt, az inward (clamp-)áram észlelhető volt és a feszültségfüggő befelé folyó áramok csökkentek.** Az irodalom elsősorban a kapszaicin  $\mu\text{M}$ -os dimenziókban használt koncentrációinak hatásaival foglalkozik (Szállási és Blumberg, 1999), kevés ismerettel rendelkezünk a nM-os hígításban kifejtett hatásokról. Ez a kérdés különösen fontos, hiszen a több  $\mu\text{M}$ -os hígításban észlelt neurotoxikus hatás közreműködésével jelen vizsgálatainkban nem kell számolnunk.

**III. Kapszaicin a TTXr áram tiszta depressziója mellett a TTXs áramnál átmeneti facilitáció után blokkolta az áramot.** A TTXr és TTXs áramok eltérő kapszaicin szenzitivitása arra utal, hogy a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  áram blokkolása nem csupán a kationcsatornán át történő  $\text{Na}^+$ -beáramlás következménye volt.

**IV. Kapszaicin ismételt alkalmazása során a feszültségfüggő inward áramok permanens blokkolása mellett a kapszaicinnal kiváltott inward clamp-áram amplitúdójának csökkenését regisztráltuk.** Az inward clamp-áram nagysága, ill. jelenléte tehát ez esetben is független volt a feszültségfüggő áramok blokkjától.

**V. Méréseink szerint a feszültségfüggő áram blokkja nem egyszerűen az inward clamp-áram kifejlődésének tudható be.** A feszültségfüggő befelé folyó áram gátlása, blokkolása akkor is jelentkezett, amikor a kapszaicin-indukált inward clamp-áram amplitúdója méréshatár alatt maradt, viszont a membrán konduktancia növekedett. A feszültségfüggő áram amplitúdójának regenerációja azonban lassabb, gyakran csak részleges volt még akkor is, amikor a másik két mutató már visszatért a szer bemosása előtti időszakot jellemző mértékeihez. Mindemellett gyakran az inward clamp-áram maximuma időben megelőzte a feszültségfüggő áram maximális depresszióját.

**VI. A trigeminus ganglionsejtek preparálási és tenyésztési módszere befolyásolta a kapszaicin szenzitív sejtek arányát.** NGF-et tartalmazó médiumban tenyésztett sejtek esetében a szenzitív sejtek aránya 78% volt, míg az akután izolált, valamint az NGF-nélkül tenyésztett sejteknél ez az arány 14%, a ganglionszeletben pedig 40% volt. A kapszaicin szenzitív, azaz a polimodális kemonociceptor sejtek hányada a primer afferensek között ismételten visszatérő kérdés az irodalomban és a valós hányad becslése helyett szerzők a saját mintáikra jellemző értékeket közlik, melyek szélső értékei 20 ill. 90%.

**VII. A kapszaicin-indukált inward áram kvantitatív jellemzőit a preparálási, tenyésztési módszer is befolyásolta.** Tenyésztett sejtekben nagy amplitúdójú (1-3 nA), gyorsan kifejlődő (6-8 sec time-to-peak idő) inward áramokat mértünk, melyek 20-50 sec alatt tértek vissza az alapvonalra. Az akután izolált sejteknél elsősorban az alacsonyabb áramamplitúdó (100-200 pA), ganglionszeletben pedig a kis amplitúdó (100-400 pA) mellett a lassabb áramkinetika (30-40 sec time-to-peak idő, 150-200 sec visszatérési idő) volt tipikus.

**VIII. A kapszaicin szenzitív sejtek arányának és a kapszaicin-indukált inward áram jellemzőinek különbségéért a preparálást jellemző körülmények mellett az NGF hiánya, ill. jelenléte is felelős.** Az NGF a VR1 receptor expressziójához szükséges, így a sejt kapszaicin érzékenységét befolyásolni képes. A szelet preparátum őrzi meg leginkább a sejtek természetes mikrokozonyát, s ez esetben az exogén NGF hatása kiküszöbölhető. Nyilvánvaló, hogy a különféle preparátumokban a különböző mértékű NGF hatás eltérő VR1 receptorsűrűséget eredményez, ami meghatározza a kapszaicin rámosásra kialakuló inward áram amplitúdóját és kinetikáját.

**IX. A kapszaicin adagolási módszere kritikusnak bizonyult a sejtek kapszaicin érzékenysége, elsősorban a befelé folyó clamp-áram amplitúdó- és időparamétereinek szempontjából.** A kapszaicinnek a regisztráló kamrába az 1) és 2) módon való lassabb, fokozatos rámosása kis amplitúdójú áramokat váltott ki elnyújtott csúccsal és lassú, fokozatos csökkenéssel. A 3) alatt leírt direkt rámosás során kapszaicin a fentiekben említett nagy amplitúdójú, kis latenciájú, meredeken növekvő befelé folyó áramokat indukált, gyorsabb visszatéréssel. Kapszaicin hosszabb idő alatt kisebb koncentrációban a receptorokat feltehetően még az észlelhető reakció kifejlődése előtt deszenzitizálja. Azonban gyors, nagy amplitúdójú, komplex áramokat direkt adagolás esetében is csak NGF-el történő tenyésztést követően regisztráltunk. Kísérleteinkben elsőként hasonlítottuk össze a kapszaicin által kiváltott válaszokat a szenzoros ganglionsejtek három különböző preparátumán.

Összegezve a fenti megfontolásokat következtetésként megállapítható, hogy a feszültségfüggő csatornák gátlása a vanilloid receptor aktiváció következménye, mechanizmusát tekintve azonban ez nem csupán a kationcsatornán át történő  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásra alapul. A problémakör még számos tisztázatlan részlete ellenére feltehető, hogy a feszültségfüggő csatornák gátlása fontos szerepet játszik a szenzoros neuronok funkcionális deszenzitizációjában, így a kapszaicin analgetikus hatásában. A kapszaicin-indukált áramok irodalomban található nagyfokú diverzitásának alapja inkább a sejt- és preparátumtípusok, tenyésztési módszerek, tesztanyag adagolási módok változatossága, nem pedig a receptorok többféle fajtájának jelentkezése. A kvantitatív különbségek ellenére e hatás szeletpreparátumban, sejtenyésztésben és akutan izolált szenzoros neuronokon egyaránt kimutatható.

# A VR1 RECEPTOR KAPSAICIN ÁLTALI AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA FLUORESZCENS $\text{Ca}^{2+}$ MÉRÉSI MÓDSZERREL

## BEVEZETÉS

A trigeminus ganglionsejtek elektrofiziológiai vizsgálata mellett a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben folytatott Ph.D. munkám keretében vettem részt a fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  mérés módszerének trigeminus ganglionsejt tenyésztésre való adaptálásában. Elektrofiziológiai vizsgálataink során a kapszaicin okozta VR1 receptor aktiválódás feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  áramokra gyakorolt hatására, ennek a deszenzitizációban betöltött lehetséges szerepére fókuszáltunk. A receptor aktiváció során kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás nyilvánvalóan szerepet játszott az inward clamp-áram, valamint a depolarizáció által aktivált feszültségfüggő befelé folyó áram kialakításában. Munkánk során azonban közvetlenül nem vizsgáltuk a fenti áramok  $\text{Ca}^{2+}$  komponensét. A fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  mérés módszerével viszont közvetlen információt nyertünk a VR1 receptor aktiváció intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációra gyakorolt hatásáról, annak jellemzőiről. A metodika hatékonyan alkalmazhatónak bizonyult egy endokannabinoid, az anandamid trigeminus ganglion neuronokon kifejtett hatásának vizsgálatára, mely szerint anandamid a kapszaicinhez hasonlóan emeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet, valamint az anyag nanomoláris koncentrációi gátolni képesek a kapszaicin hatására létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulációt (Szőke és mtsai, 2000).

## CÉLKITŰZÉSEK

A VR1 receptor tanulmányozása hagyományosan csak in vivo modellekben, valamint szenzoros neuron sejt kultúrákban volt lehetséges. A VR1 molekula klónozása megnyitotta az utat a molekuláris biológiai módszerek számára a receptor, ill. a kapszaicin receptorialis hatásainak molekuláris szintű vizsgálatához, lehetővé tette annak sejt vonalakba történő transzfekcióját. Natív sejtekben a VR1 receptor számos splicing variánsa, és egyéb, a vanilloid receptorhoz hasonló szerkezetű proteinek találhatóak, míg a transzfektált sejtek egyetlen meghatározott VR1 molekulát expresszálnak, ami lehetővé teszi az egyes receptor típusok pontosabb leírását (McIntyre és mtsai, 2001). Mindezeket túl mutáns formák használatával mód nyílik a funkcionális domének, ill. a különféle aktivátorok és inhibitorok



kötőhelyének tanulmányozására (Welch és mtsai, 2000). A VR1 receptort stabilan expresszáló sejtvonal használata pedig a sejttenyészetnél jobban reprodukálható eredményekre vezet. Ezen lehetőségek kihasználása céljából egy nagyobb távlatú munka kezdeti lépéseként humán HT1080 sejtvonalba transzfektáltunk patkány VR1 receptort. Kísérleteinkben a fluoreszcens  $Ca^{2+}$  mérés módszerét alkalmazva a funkcionális szempontból is sikerrel járó VR1 receptor molekula transzfekciót detektáltuk és jellemeztük.

## KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

### 1. *Sejtkultúra*

A primer sejttenyészetek preparálása az előző fejezetben leírtak szerint történt.

### 2. *Fluoreszcens $Ca^{2+}$ -mérés*

A 3-8 napos tenyészetek 1  $\mu$ M fura-2-acetoxy-metilészter (fura-2-AM) fluoreszcens  $Ca^{2+}$  indikátor festéket tartalmazó oldatban inkubálódtak 37 °C-on 15 percig. A fluoreszcens mérések szobahőmérsékleten történtek Olympus BX50WI fluoreszcens mikroszkóppal, 20x nagyítású vízimmerziós objektívvel. A tenyészetek normál és fluoreszcens képének regisztrálása CCD kamerával történt, melynek adatait az Axon Imaging Workbench 2.2 szoftver segítségével dolgoztuk fel. A festék gerjesztéséhez használt fényt monokromátorral állítottuk elő. A mérések során az alternálva alkalmazott 340 nm és 380 nm hullámhosszú gerjesztő fényre adott 510 nm hullámhosszú emittált fény intenzitásainak arányát határoztuk meg (rációmetrikus érték,  $R=F_{340}/F_{380}$ ) az idő függvényében. Az R érték az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  koncentrációval egyenes arányban változott. 3-15 sejtről történt szimultán regisztráció. A sejtek területére illesztett ROI-k (Region Of Interest) által befoglalt pixelek intenzitásának átlaga jellemezte egyetlen sejt fluoreszcens intenzitásának időbeli alakulását. A sejtmentes területek intenzitásadatainak felhasználásával minden egyes méréskor háttérlevonást alkalmaztunk. Perfúziós rendszerünk használatával a folyamatosan adott tápoldat áramlását megszakítva pár sec időtartamban közvetlenül a sejtek felületére mostuk a tesztanyagokat, mely kapszaicin (330 nM), valamint KCl (50 mM) volt.

### 3. *RT-PCR*

A teljes RNS tartalom újszülött Wistar patkányok trigeminus ganglionjából való izolálását követően a reverz transzkripció és a cDNS amplifikációja a Titan One Tube RT-

PCR rendszerrel egy lépésben történt. Az egyszálú cDNS szintéziséhez AMV reverz transzkriptázt, az amplifikációhoz Taq és Tgo polimerázokat használtunk. A Tgo polimeráz proofreading funkciója a PCR hibaarányát mintegy ezredrészére csökkenti. A primer oligonukleotid szekvenciák a VR1 mRNS 58-78 és 2626-2647 helyeihez kötődnek. A 30 perces 50 °C-on zajló reverz transzkripciót 15 amplifikációs ciklus (denaturáció: 10 sec 94 °C, hibridizáció: 30 sec 56 °C, elongáció: 2 perc 68 °C) követte, melyet 20 ciklus folytatott 3 percre növelt elongációs idővel. A reakciót 68 °C-on 7 perces végső elongáció zárta. Az RT-PCR reakció produktuma agaróz gélen futtatva a VR1 cDNS méretének megfelelő 2.6 kb-nál mutatott jelet.

#### 4. *A VR1 cDNS klónozása*

A Klenow polimeráz alkalmazásával kapott blunt end PCR fragmentek Sma I emésztett pGEM-3zf vektorba lettek beépítve blunt end ligációval. *E. coli* való transzfekciót követően a VR1 inzertet tartalmazó plazmiddal rendelkező klónok szelekciója X-gal-t tartalmazó agar lemezen történt. Első kísérleteinkben olyan mutánsokat használtunk, melyekben a receptor konzervált régiói nem érintettek, ezek a protein variábilis első felében az alábbi mutációkat tartalmazták: P25S, L70P, D88G, I277T, L353P. Ezek a mutánsok ép transzmembrán és pórus régióval rendelkeznek, 3 mutációs hely pedig a humán, patkány és egér molekula konzervált régióin is kívül esik. Emiatt a mutáns receptor bizonyos mértékig a vad típus funkcióját mutatja. Újabb kísérleteinkben sikerült mutációt nem tartalmazó VR1 klónt előállítani, a továbbiakban ezen klónnal szándékozunk dolgozni.

A VR1 cDNS-t a pGEM-3zf vektorból az emlős pEGFP-N1 vektorba vittük át, mely egy zölden fluoreszkáló fehérjét (green fluorescent protein, GFP) tartalmaz, ami a VR1 receptor C-terminálisával fuzionálva jelöli azt. Két különböző vektort használtunk, a pVR1 a VR1 cDNS-t, a pVR1eGFP vektor pedig a 11 aminosav hosszúságú linker szakasszal összekapcsolt VR1-eGFP fúziós proteint expresszált. Az utóbbi vektor használatával a sejtek VR1 expressziója könnyen detektálható és flow-citometriával kvantifikálható. A stabilan beépült plazmiddal rendelkező sejtek szűrésére mindkét vektor neomycin szelekciós markert is tartalmazott, ezáltal a VR1 receptort folyamatosan expresszáló sejtvonalat tudunk előállítani.

#### 5. *Humán sejtvonal transzfekciója*

Az expressziós vektorokat humán fibroszarkóma eredetű HT1080 sejtvonalba transzfektáltuk kb. 20%-os hatékonysággal. A pVR1 vektor transzfekciójának sikerességét a kontroll eGFP expressziós vektorral való kotranszfekció útján határoztuk meg. A pVR1eGFP

vektor transzfekciója a VR1-eGFP fúziós protein fluoreszcens detektálásával közvetlenül is kimutatható volt.

## EREDMÉNYEK

### *1. Kapszaicin hatása trigeminus ganglionsejtek intracelluláris $Ca^{2+}$ koncentrációjára*

330 nM kapszaicin hatására a sejtek 45%-a (n=75) reagált  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedéssel. A pozitív válaszu csoportba sorolás kritériuma  $R > 0.1$  volt. Az 5 sec kapszaicin rámosás hatására az R érték maximuma 30 sec-on belül kifejlődött, a visszatérés azonban rövidebb-hosszabb időt (20-260 sec) vett igénybe. Az R értékek maximumainak átlaga  $0.68 \pm 0.2$  (n=34) volt. A kapszaicin inszenzitív sejtek 90%-ában (n=20) 50 mM extracelluláris KCl-dal keltett depolarizáció az R érték szignifikáns emelkedését okozta, igazolva ezzel, hogy a kapszaicin válasz hiánya nem a sejtek károsodására, hanem a VR1 receptorok hiányára vezethető vissza.

### *2. Kapszaicin hatása patkány VR1 receptorral transzfektált HT1080 sejtvonalon*

A VR1 receptor sejt felszíni expresszióját mindkét vektor esetében a GFP protein jelezte. A normál klónokkal összevetve a mutációt tartalmazó klónok esetében kisebb fluoreszcens jelet detektáltunk, ami a plazmamembrán mellett a citoplazmában is megfigyelhető volt. A VR1 receptorral transzfektált HT1080 sejt vonal 5 sec 330 nM kapszaicin rámosásakor az R érték emelkedését mutatta, jelezve a VR1 molekula aktiválódását. Az R érték változásának mértéke és időbeli lefutása a ganglionsejtekben tapasztaltakhoz hasonló volt. A mutáns VR1 klónt tartalmazó sejtek esetében a fura-2 jel emelkedése a tenyésztett trigeminus ganglionsejtek reakciójánál lassabb és kisebb mértékű volt. A transzfektált sejteket  $Ca^{2+}$ -mentes extracelluláris oldatban vizsgálva kapszaicin rámosásakor a fluoreszcens intenzitás az alapvonalon maradt, hasonlóan a nem transzfektált HT1080 sejtekhez.

## ÚJ EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

**X. Fluoreszcens  $Ca^{2+}$  méréseink során a trigeminus ganglionsejtek 45%-a mutatott kapszaicin hatására intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedést.** Az R érték visszatérési ideje variabilitásának oka lehet egyrészt a kapszaicin direkt rámosási és kimosási

kinetikájának egyes sejtek közti differenciája, valamint a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -ot "eltakarító" mechanizmusainak eltérő hatékonysága.

**XI. A transzfektált VR1 molekula expresszióját a GFP intenzitás, funkcióképességét pedig a kapszaicin rámosásra kifejlődő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés mutatta.** A mutáns VR1 receptorokkal rendelkező sejtekben a kisebb, s jelentős mértékben a citoplazmában is észlelt intenzitás arra utal, hogy a mutáció a molekula olyan térszerkezeti változását okozhatta, ami a plazmamembránba való beépülését megváltoztatta, megnehezítette. Emellett mutáns VR1 esetében a fluoreszcens jel lassabb és kisebb mértékű emelkedése a VR1 molekula alacsonyabb expressziójára, ill. a funkciót módosító ultrastrukturális változására utal. Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy transzfekció útján sikerült létrehozni egy VR1 receptort expresszáló sejtvonalat, amely további kísérleteink alapjául szolgálhat.

# A $\text{Ca}^{2+}$ /KALMODULIN-DEPENDENS PROTEIN KINÁZ II IZOENZIMEK MODULÁLÓ HATÁSA KAPILLÁRIS ENDOTÉLSEJTEK FESZÜLTSGFÜGGŐ $\text{K}^+$ CSATORNÁIRA HIPOXIÁBAN

## BEVEZETÉS

Az endotélsejtek jellegzetes multifunkcionális sejtek, működésük komplexitásába egyre szélesebb körű betekintést nyerünk. Mivel a vérárammal óriási felszínen érintkeznek, normál és patofiziológiás körülmények közötti működésük megértése nagy jelentőségű. Az endotélsejtek kulcsszerepet játszanak többek között a koagulációs, antikoagulációs folyamatokban, mint antigén prezentáló sejtek az immunválaszok mediálásában, az angiogenezisben, stb. Mindemellett az érátmérőnek az aktuális hemodinamikai igényekhez történő beállításában is részt vesznek. A sejt-sejt közötti kapcsolataik módosulása révén valósul meg a plazmaextravazáció, ödémaképződés, ill. a vér-agy gát permeabilitás szabályozásának egy lépése. Természetesen sokféle funkciójuk anatómiai meghatározottságuk szerint differenciált, így különbséget kell tennünk a makro- és mikrovaszkuláris/kapilláris endotélium működése között, s ezen funkcionális differenciáltság egyik meghatározója az ionsatorna mintázatuk eltérése.

A vasoaktív anyagok (NO, EDHF, endotelin, substance P, prosztaglandinok, ATP, stb.) számos funkciójukat modulálják, s ezen anyagok többségét maguk is szekretálják (Inagami és mtsai, 1995). Ezen anyagok jelentős hányadának szekréciója  $\text{Ca}^{2+}$ -függő, tehát az intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció és a  $\text{Ca}^{2+}$ -triggerelt jelátviteli mechanizmusok ebben a folyamatban szabályozó szerepet játszanak (Usachev és mtsai, 1995). A szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt pedig nagymértékben befolyásolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás, mely a feszültségfüggő, a vasoaktív agonisták, valamint a mechanikai, hemodinamikai (axiális és tangenciális) erők által aktivált ionsatornákon át történik (Nilius, 1991). Mindezek mellett az endotélsejtek membránpotenciálja, mely nagyrészt  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , ill. nem-szelektív kationcsatornák által meghatározott, szintén fontos szereppel bír a  $\text{Ca}^{2+}$ -influx szabályozásában a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra irányuló hajtóerő beállítása révén (Luckhoff és Busse, 1990).

Látható tehát, hogy az ionsatornák, azok funkciójának szignál transzdukciós mechanizmusok általi modulációja az endotélsejtek működését alapvetően befolyásolni képes. Napjainkra mind nagyobb számú ionsatornát írnak le endotélsejteken, melyen meghatározóak a membránpotenciál, a sejtvolumen, érpermeabilitás, mechanoszenzor

funkciók, valamint a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizációs utak szabályozásában (Nilius és mtsai, 1997). Pontos szerepük definiálása azonban számos esetben még várat magára. Általánosan elfogadott nézet szerint az endotélisejtek nem excitábilisek, ennek ellenére feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  (Walsh és mtsai, 1998),  $\text{K}^+$  (Takeda és mtsai, 1987) valamint  $\text{Ca}^{2+}$  (Bkaily és mtsai, 1993) csatornák is találhatóak rajtuk, melyek egyik feltételezett szerepe a membránpotenciál regulálásával az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció beállításán keresztül a vasoaktív anyagok szekréciójának szabályozása. A makrovaszkuláris endotélium ioncsatornái részletesebben meghatározottak, ellentétben a kapilláris endotéliummal, ahol jelen ideig feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  (Bossu és mtsai, 1992),  $\text{Na}^+$  (Walsh és mtsai, 1998), ATP-szenzitív és feszülés-aktivált nem-szelektív kation (Popp és Gogelein, 1992, Popp és mtsai, 1992) csatornákat írtak le. A  $\text{K}^+$  csatornák közül  $\text{Ca}^{2+}$ -függő (Jow és mtsai, 1999), valamint feszültségfüggő csatornák találhatóak (Dittrich és Daut, 1999).

A feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák népes családja (Shaker, Shab, Shaw, Shal, stb.) egyes tagjainak funkcióját különböző protein kinázok, többek között a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependens protein kináz II (CaMKII) modulálja. A Shaker-típusú  $\text{K}_v1.4$   $\text{K}^+$  csatorna intracelluláris N-terminális inaktivációs doménjének CaMKII általi foszforilációja modulálni képes a tranziens outward, A típusú  $\text{K}^+$  áram inaktivációs kinetikáját transzfektált HEK sejteken (Roepert és mtsai, 1997). Hasonló moduláció ismert excitábilis sejteken, nevezetesen pitvari szívizomsejteken (Tessier és mtsai, 1999) és colon simaizomsejteken (Koh és mtsai, 1999) is.

A multifunkcionális Ser/Thr protein kináz családba tartozó CaMKII a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált továbbítva részt vesz a génextpresszió és a sejtciklus szabályozásában (Nghiem és mtsai, 1994), a sejtdifferenciálódásban (Wang és Simonson, 1996), a memóriafunkció regulálásában (Mayford és mtsai, 1995). A CaMKII proteinek az agy bizonyos régióiban a teljes fehérjetartalom 2%-át is kiteszik. A CaMKII holoenzim egy 8-12 azonos vagy eltérő alegységből álló oligomer (Kanaseki és mtsai, 1991). A 4 gén ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) által kódolt primer transzkriptek alternatív splicing-ja következtében az alegységek több alosztálya létezik. Míg az  $\alpha$  és  $\beta$  izoformok neuronálisan fordulnak elő, a  $\gamma$  és  $\delta$  formák a neuronok mellett változatos szöveti expressziót mutatnak (Tobimatsu és Fujisawa, 1989). A makrovaszkuláris endotélium esetén a CaMKII trombin-indukált barrier diszfunkcióban (Borbiev és mtsai, 2001) és az NO szintáz szabályozásában (Cai és mtsai, 2001) betöltött szerepe igazolódott.

## PROBLÉMAFELVETÉS

Az endotélsejtek morfológiai tulajdonságai fontos szerepet játszanak a sejt-sejt kapcsolatok integritásának megőrzésében, ami a vaszkuláris permeabilitást nagymértékben befolyásolni képes. A patológiás morfológiai megjelenés (duzzadás, dezorganizáció) kapilláris perfúziós zavarokhoz, megnövekedett plazmaextravazációhoz vezet (Ward és Firth, 1989, Mazzoni és mtsai, 1995). A normál morfológiai jellegzetességek megőrzésében a sejtek ozmotikus homeosztázisának fenntartása fontos tényező, melyhez az ionos homeosztázis ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) pontos szabályozása és fenntartása is szükségeltetik. A volumenregulációban szerepet játszó ionok mellett a mikrovaszkuláris endotélsejtek hidraulikus permeabilitását a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás is befolyásolja (He és Curry, 1991).

Tartós vagy hosszabb hipoxiás állapot számos patofiziológiai jelenség velejárója, gyakori klinikai probléma. A citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hipoxiás, poszthipoxiás emelkedése is régóta ismert folyamat. A poszthipoxiás  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése és a sejtduzzadás jelensége endotélsejtek esetében is leírásra került (Mertsch és mtsai, 1998). Humán endotél sejt kultúrában az intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hipoxiás emelkedése főként az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásának köszönhető (Arnould és mtsai, 1992). Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -akkumuláció pedig morfológiai eltérésekkel jár. Humán köldökvéna sejtek esetében konfokális laser scanning mikroszkópia a hipoxiás stressz után keletkező kitüremkedések (bleb) területén lokális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedést mutatott ki (Ikeda és mtsai, 1998). Vér-agy gát modellben hipoxiás állapot a megnövekedett paraendoteliális permeabilitás által jelzett barrier funkció sérüléshez vezetett (Giese és mtsai, 1995). Mindezek mellett a megemelkedett szabad intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció számos szignál transzdukciós utat aktivál (PKC, CaMKII, stb.).

A fentiek alapján feltételeztük, hogy a CaMKII, annak egyes izoenzimeit a hipoxiás sejt-károsodás folyamatában aktiválódnak kapilláris endotélsejtek esetében is. Az aktivált CaMKII pedig befolyásolni képes a feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatorna működését, mely a membránpotenciál és az ozmoreguláció szabályozásának szempontjából bír jelentőséggel. Ezen paraméterek pedig a fentiek szerint fontos szerepet játszanak az endotélium normál morfológiájának, és ezzel egyben normál funkciójának megtartásában is.

## CÉLKITŰZÉSEK

A CaMKII különféle izoenzimeinek jelenléte, azok hipoxiás aktivációja kapilláris endotélsejtekben még nem került leírásra. Hasonlóan ismeretlen volt kapilláris endotélsejtekben a feszültségfüggő  $K^+$  csatorna működésének hipoxiás modulációja, ill. az, hogy ennek háttérében mely mechanizmusok állhatnak. Ezeknek és a fentebb vázolt munkahipotézisünknek megfelelően kísérleteink során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- XII. A feszültségfüggő outward áram komponenseinek leírása patkány agyi kapilláris endotélsejtekben.
- XIII. A feszültségfüggő outward áram szelektivitásának meghatározása.
- XIV. A feszültségfüggő outward  $K^+$  áram jellemzése, hipoxiás modulációjának leírása.
- XV. A hipoxiás moduláció mechanizmusának vizsgálata.
- XVI. A CaMKII izoenzimek transzkripciós mintázatának jellemzése patkány agyi kapilláris endotélsejtekben.
- XVII. A CaMKII izoenzim proteinek expressziós mintázatának jellemzése.
- XVIII. A CaMKII izoenzimek ionomycinnel, valamint hipoxiával kiváltott aktiválódásának kimutatása, jellemzése.
- XIX. A modulált áramot vezetni képes feszültségfüggő  $K^+$  csatornatípusok kimutatása sejtvonalunkban

## KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

### *1. Sejtkultúra*

Munkánk során immortalizált patkány agyi kapilláris endotél sejtkultúrát használtunk. Az immortalizáció az alábbi immortalizáló, immortalizáló/transzformáló gének felhasználásával: polyoma large T antigén, polyoma modifikált large T antigén, polyoma middle T antigén, SV40 large T antigén, SV40 small t antigén. A kontroll (mock) transzfekcióval együtt a transzfekció 6 sejtvonalat eredményezett: rat brain capillary endothelial cell line 1-6 (rBCEC1-6). A sejtvonalak közül a primer kapilláris endotél fenotípusát legjobban megőrző sejtvonal lett kisselektálva és került további felhasználásra. A szelekció számos morfológiai, proliferációs, biokémiai és funkcionális kritérium szerint zajlott, a 4. sejtvonal kiválasztását



eredményezve (rBCEC4). A tenyésztés a szokványos módszerek szerint D-MEM alapú tenyésztő médiummal történt. Csak a 20.-30. szubkultúrák kerültek kísérletekre.

## 2. *Hipoxia protokoll*

A sejt kultúrák 5 óra inkubációs időre anaerob kamrába kerültek, melynek gázösszetétele a következő volt: 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub> (100% páratartalom, 37 °C).

## 3. *RT-PCR*

A CaMKII izoenzimek transzkripciójának vizsgálatához RT-PCR módszert használtunk 35 ciklussal, az izoenzimekhez egyedileg optimalizált további paraméterekkel. Az RNS extrakció az rBCEC4 sejtekből az Invisorb rendszer alkalmazásával, míg patkány agyszövetből a guanidin-tiocianát módszerrel történt. Az izolációt a DNS szennyeződés emésztése, majd reextrakció követte. Az  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  izoenzimek esetében az osztályra jellemző variábilis régióknak megfelelő flanking primer párokat használtunk, ami az összes expresszált variáns amplifikációját lehetővé tette. A  $\delta$  osztály vizsgálata az egyedi  $\delta$  alosztályokra specifikus primer kombinációkkal történt. A PCR termékek vizsgálatához ethidium-bromidos agaróz (2%), ill. poliakrilamid gélt (4%) használtunk. A szekvenálás a gélből való extrakciót követően az InViTek standard módszerével történt.

## 4. *Immunoblot*

A CaMKII izoenzim fehérjék expressziójának vizsgálatára a Western-blot módszert alkalmaztuk. HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) oldattal történő mosást követően 37 °C-on 15 perces stabilizációs periódust hagytunk ugyanezen oldatban. Az izoenzimek aktiválásához 250 nM ionomycint, gátlásához pedig 20  $\mu$ M KN-93-al 30 perces előinkubációt alkalmaztunk a HBSS oldatban. Az elektroforézis és a blotting 10% poliakrilamid gélen futott sávonként 20  $\mu$ g proteinnel. Az aktivált izoenzimek detektálásához a CaMKII autofoszforilált formája elleni antitesteket alkalmaztunk 1  $\mu$ g/ml koncentrációban. Az antitest a CaMKII autofoszforilációs helyén található Thr<sup>287</sup> körüli régióknak megfelelő MHRQEpTVDC foszfopeptid ellen nyúlban termelődött. A CaMKII  $\delta$  izomerjének detektálásához használt alosztály specifikus antitest a C-terminálistól számított 2. variábilis domént ismerte fel. A  $\gamma$  osztály azonosításához a Santa Cruz Biotechnology által forgalmazott antitestet alkalmaztuk. Másodlagos antitestként nyúlban, ill. kecskében termelt peroxidáz-konjugált antitestet

használtunk. Az eredmények vizualizációja kemolumineszcens kit és autoradiográfia alkalmazásával történt.

### 5. *Immunhisztokémia*

A sejtenyészetet PBS-el történő mosást követően 1% paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig. Háromszori PBS-ben való mosás után 0.2% Triton X-100-al permeabilizáltunk, majd 60 perces blokkolást követően (1% PBS-ben oldott borjúsérum) anti-K<sub>v</sub>1.4 antitesttel inkubáltuk. Ezt három alkalommal 0.2% borjúsérummal végzett mosás követte, ami után 60 percig Cy3-konjugált szekunder antitesttel inkubáltunk. Négyszeri mosás után a sejteket lefedtük. A mintákat Zeiss fluoreszcens mikroszkóppal, a Zeiss Axiovision képfeldolgozó szoftver segítségével elemeztük ki.

### 6. *Laser scanning mikroszkópia*

A kontroll és az 5 órás hipoxia protokollon átesett sejteket Zeiss LSM 410 laser scanning mikroszkóppal vizsgáltuk. A sejtek keresése a készülék transzmissziós módjában, a laser fény használata nélkül DIC optikával történt. A sejtmorfológia részletes elemzése a reflexiós módban zajlott, ahol az eltérő optikai denzitású közegek határfelületéről (pl. sejtmembrán, organelumok) visszaverődő lasernyaláb elemzése történt. Ebben a módban lehetőség nyílt az x-y síkban való sorozatok rögzítése mellett a vertikális irányú x-z-metszetek felvételére is. Fényforrásként HeNe lasert (543 nm) alkalmaztunk.

### 7. *Elektrofiziológia*

A feszültségfüggő K<sup>+</sup> csatornákon folyó áram vizsgálatára a patch-clamp technika whole-cell voltage-clamp módszerét alkalmaztuk. A kísérleti elrendezés, a sejtek vizuális szelekciós kritériumai a trigeminus ganglionsejteknél említettekhez hasonlóan alakultak. Az endotélsejtek vizsgálatához filament nélküli pipettákat használtunk, a húzást és hőpolírozást követő 2-4 MOhm rezisztenciával. Az elektromos zaj csökkentése céljából a pipetták monokomponens elasztomer borítást kaptak.

A K<sup>+</sup> áramok méréséhez Axopatch 200A erősítőt használtunk. A kommand protokollok generálása és az adatrögzítés Clampex 8.1 szoftver segítségével történt. A regisztrátumokat 10 kHz-en digitalizáltuk 5kHz-es felülvágó Bessel-szűrővel. A sejtkapacitás és a soros ellenállás az erősítő megfelelő kompenzáló áramköreinek segítségével került kiszámításra és 0-85%-os kompenzációra. Csak a 10 MOhm alatti soros ellenállással rendelkező sejtekből történt elvezetés.

A  $K^+$  áramok kiváltására step-kommandokat használtunk a következő paraméterekkel: 2 sec  $-90$  mV prepulzus, 1 sec step-pulzusok  $-80$  mV -  $+80$  mV tartományban  $10$  mV lépésközzel, 10 sec interstimulus intervallum. Ez a protokoll a tranziens outward és delayed rectifier áram együttes kiváltására alkalmas. A sustained áramkomponens amplitúdója ( $I_{\text{sus}}$ ) az 1 sec step-pulzus végén mért kifelé folyó áram amplitúdójaként lett definiálva. A tranziens outward áram maximuma ( $I_{\text{to}}$ ) a teljes kifelé folyó áram maximuma ( $I_{\text{peak}}$ ) és a sustained áram különbségként került kiszámításra. A tranziens áram gyors inaktivációs fázis időállandójának ( $\tau_{\text{fast}}$ ) kiszámítása az outward áram leszálló fázisára történő biexponenciális illesztéssel történt. Az inaktiváció mértéke a tranziens áram és a teljes kifelé folyó áram amplitúdójának arányaként ( $I_{\text{to}}/I_{\text{peak}}$ ) lett meghatározva. Az áramok amplitúdója a sejtkapacitásra lett normalizálva.

## EREDMÉNYEK

### *1. Az agyi kapilláris endotélsejtek hipoxiás duzzadása*

A sejtduzzadás mértékének meghatározásaként a sejtek felületének változását mértük digitális képfeldolgozással 2-dimenzióban. A hipoxia protokoll szignifikánsan növelte a sejtek felületét (kezdő érték:  $481 \pm 23 \mu\text{m}^2$ ,  $n=29$ ; poszthipoxiás érték:  $617 \pm 36 \mu\text{m}^2$ ,  $n=21$ ,  $P < 0.05$ ), míg az ugyanolyan időtartamban (5 óra) vizsgált normoxiás kontroll sejtek esetében szignifikáns változást nem tapasztaltunk (normoxiás kontroll érték:  $510 \pm 37 \mu\text{m}^2$ ,  $n=20$ ,  $P > 0.05$ ).

A laser scanning mikroszkópia módszerét alkalmazva a hipoxiás endotélsejtek morfológiai változásának finomabb, részletesebb elemzésére is módunk nyílt. A transzmissziós üzemmódot használva első lépésként a megfelelő sejtek, sejtcsoportok képére lineáris, a sejteket minél nagyobb szakaszon metsző vonalakat illesztettünk, s második lépésként e vonalak mentén reflexiós módban leképeztük a sejtek x-z-vetületét.

A sejtek morfológiai változásának jellemzésére más módszert is alkalmaztunk. Reflexiós módban a tárgylemez felületéről felfelé indulva  $0.5 \mu\text{m}$ -es lépésközönként az x-y síkban metszeteket készítettünk, s minden egyes metszeten a sejtek kerületét és területét lemérve Microsoft Excel programban írt macro script segítségével lehetőség nyílt a térbeli felület és térfogat közelítő kiszámolására. Eredményeink azt mutatják, hogy a 2 dimenzióban leképezett terület megnövekedésén túl a sejtek alakja, térfogata komplexebb módon is megváltozott,

sokszor azon esetben is, mikor a sejtek felülete 2 dimenzióban vizsgálva nem mutatott lényeges növekedést.

## 2. *A feszültségfüggő $K^+$ áram komponensei, azok szeparálása*

A step-kommandok által kiváltott teljes outward áram 2 komponensre tagolható: a gyorsan aktiválódó és lassabb kinetikával inaktiválódó (tranziens) komponensre, valamint a step-kommand időtartama alatt inaktivációt nem mutató (sustained) komponensre.

Az áramkomponensek szelektivitásának vizsgálatára 2 tipikus  $K^+$  csatorna blokkolót, 4-AP-t és TEA-t használtunk, melyek áramtípusra szelektív, dózisfüggő, megfelelő koncentrációban szignifikáns blokkoló hatást mutattak. 4-AP blokkolta az  $I_{to}$ , míg a TEA az  $I_{sus}$  áramot. A dózis-hatás függvény pontjaira illesztett Hill-görbe kissé eltérő karakterisztikájú blokkoló hatást mutatott a 2 blokkolót összevetve. A 4-AP  $I_{to}$ -ra gyakorolt maximális blokkoló hatását 5 mM koncentrációnál érte el, ahol +70 mV-on az áram amplitúdóját a kontroll 9%-ra csökkentette. A dózis-hatás görbe további paraméterei:  $IC_{50} = 1.1 \pm 0.04$  mM, a Hill-koefficiens, azaz  $nH = 2.9 \pm 0.05$ . A TEA  $I_{sus}$ -on kifejtett maximális blokkoló hatását 10 mM koncentrációnál érte el +70 mV-on 21%-ra csökkentve a kontroll amplitúdót, további paraméterek:  $IC_{50} = 2.8 \pm 0.5$  mM,  $nH = 1.4 \pm 0.3$ . TEA nagyobb koncentrációban (10 mM) az  $I_{to}$  áram amplitúdóját is csökkentette kisebb mértékben, 86%-ra ( $n=4$ ). A  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$  csatornát blokkoló charybdotoxin (1  $\mu$ M) nem befolyásolta szignifikánsan az  $I_{to}$  és  $I_{sus}$  áramokat.

## 3. *A feszültségfüggő $K^+$ áram jellemzése, hipoxiás modulációjának leírása*

A  $K^+$  áram komponenseinek jellemzésére a következő paramétereket használtuk: tranziens outward komponens maximális amplitúdó ( $I_{to}$ ), sustained outward komponens amplitúdó ( $I_{sus}$ ), az  $I_{to}$  gyors inaktivációs fázisának időállandója ( $\tau_{fast}$ ), az inaktiváció mértéke ( $I_{to}/I_{peak}$ ). Regisztráltuk a normoxiás állapotban, valamint az 5 órás hipoxia protokoll után kiváltható áramsorozatokat.

Hipoxia szignifikánsan növelte az  $I_{to}$ -t a +50 mV - +80 mV (+70 mV-on kontroll állapot:  $11.5 \pm 2.3$  pA/pF,  $n=22$ , hipoxia után:  $15.9 \pm 1$  pA/pF,  $n=16$ ,  $p < 0.05$ ), ill. az  $I_{sus}$ -t a -10 mV - +80 mV (+70 mV-on kontroll állapot:  $11.4 \pm 2.4$  pA/pF,  $n=23$ , hipoxia után:  $24.1 \pm 4.9$  pA/pF,  $n=18$ ,  $p < 0.01$ ) tartományban.

Az inaktiváció kinetikáját leíró 2 paraméter közül a  $\tau_{fast}$  szignifikánsan emelkedett a +40 mV - +80 mV tartományban (+70 mV-on kontroll állapot:  $76.7 \pm 2.5$  ms,  $n=21$ , hipoxia után:

89.7±3.2 ms, n=16, p<0.01). Az időálló emelkedése az outward áram inaktivációjának lassulását jelzi. Az  $I_{to}/I_{peak}$  arány szignifikáns csökkenését találtuk poszthipoxiás állapotban (+70 mV-on kontroll állapot: 0.5±0.04, n=22, hipoxia után: 0.4±0.02, n=16, p<0.01), ami a tranziens komponensnek a teljes áramhoz való csökkent mértékű hozzájárulását jelzi.

#### 4. *A hipoxiás moduláció mechanizmusának vizsgálata*

A CaMKII izoenzimeknek a  $K^+$  áram hipoxiás változásában betöltött szerepének alátámasztására a sejtek egy csoportjában az izoenzimek feltételezett hipoxiás aktiválódását a CaMKII egy szelektív, potens blokkolójával, a KN-93-al kívántuk megakadályozni. Ebben a csoportban a hipoxiás protokoll előtt 20  $\mu$ M KN-93-al 30 perces inkubációt végeztünk. Mivel egyes irodalmi adatok szerint bizonyos sejtekben a KN-93 képes a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák közvetlen blokkolására is (Ledoux és mtsai, 1998), ezért negatív kontrollként hasonló paraméterekkel végeztünk inkubációt a KN-92-vel is, ami a KN-93 CaMKII blokkoló hatással nem rendelkező szerkezeti analógja.

A KN-93 előkezelés mind a 4, a  $K^+$  áramot jellemző paraméter esetén képes volt azok hipoxiás módosulását megakadályozni, azaz a paraméterek a kontroll tartományban maradtak. Így az értékek az alábbiak szerint alakultak +70 mV-on:  $I_{to}$  10.7±1.7 pA/pF, n=16,  $I_{sus}$  10.3±2.4 pA/pF, n=17,  $\tau_{fast}$  71.6±2.6 ms, n=15,  $I_{to}/I_{peak}$  0.51±0.04, n=15.

KN-92 alkalmazása nem befolyásolta a paraméterek hipoxiás változását, tehát ezen értékek a hipoxiás tartományban maradtak, azaz +70 mV-on a következőképp alakultak:  $I_{to}$  15.6±1.5 pA/pF, n=11,  $I_{sus}$  23.7±8.8 pA/pF, n=11,  $\tau_{fast}$  93.4±4.9 ms, n=11,  $I_{to}/I_{peak}$  0.4±0.06, n=11.

#### 5. *A CaMKII izoenzimek transzkripció mintázatának jellemzése rBCEC4 sejtekben*

A CaMKII izoenzimek mRNS expressziójának meghatározásához osztály-, ill. izoform specifikus primer párokat használtunk az RT-PCR során. Az rBCEC4 sejtekből nyert RNS mellett pozitív kontrollként patkány agyból származó RNS-t használtunk, mivel az  $\alpha$  és  $\beta$  izoenzimek főként neuronban expresszálódnak. Negatív kontrollként az RT-PCR reverz transzkriptáz enzim nélkül kapott eredménye szolgált. Ellentétben a patkány agyszövettel, sejtvonalunkban nem találtunk  $\alpha$  és  $\beta$  izoenzimnek megfelelő mRNS-t. A  $\gamma$  osztály specifikus kombinációval a kapilláris sejtekben 2 jelet találtunk, melyek méretük és a szekvenálás alapján a  $\gamma_B$  és  $\gamma_C$  izoformoknak felelnek meg. A CaMKII $\delta$  esetében a nem-neuronális alosztályoknak ( $\delta_2$ ,  $\delta_3$ ,  $\delta_4$ ,  $\delta_9$ ) megfelelő primereket használtunk, pozitív kontrollként pedig a

megfelelő izoformokat tartalmazó plazmidokat alkalmaztunk. Ez esetben specifikus szignált a CaMKII $\delta_2$ -nek megfelelő primer esetében kaptunk.

#### 6. *A CaMKII izoenzim proteinek expressziós mintázatának jellemzése*

A CaMKII enzimfehérjék expressziójának kimutatására az mRNS adatok alapján választott CaMKII $\gamma$ - és CaMKII $\delta$ -specifikus antitestekkel dolgoztunk. A  $\delta$  antitest egyetlen, 54 kDa-os jelet adott, mely a transzkripció adatok és a molekulatömeg alapján a  $\delta_2$  izoenzimnek felel meg. A  $\gamma$ -specifikus antitest 3 jelet azonosított 42, 54 és 60 kDa molekulatömeggel. Az mRNS adatok és a tömeg alapján a kifejezett 60 kDa-os jel a  $\gamma_B$ , míg a kisebb intenzitású 54 kDa-os a  $\gamma_C$  izoformot mutatja. A 42 kDa nagyságú jel kívül esik az ismert CaMKII proteinek mérettartományán.

#### 7. *A CaMKII izoenzimek ionomycinnel és hipoxiával kiváltott aktiválódásának kimutatása, jellemzése*

Az ionomycin mint közismert Ca<sup>2+</sup>-ionofor az intracelluláris szabad Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelésével képes aktiválni a CaMKII izoenzimeket. 250 nM ionomycin alkalmazását követően a CaMKII aktivált formája elleni antitestek egy 54 és 60 kDa jelet azonosítottak a CaMKII $\delta_2$  és a CaMKII $\gamma_B$  izoenzimeknek megfelelően. Az autofoszforilált  $\delta_2$  izoform aktivitása kontroll állapotban minimális volt, ionomycin stimulációra azonban gyorsan és robosztusan emelkedett. Mindez azonban rövid idejű volt, az aktivált forma 10 perc elteltével már nem volt detektálható. Ezzel ellentétben a  $\gamma_B$  izomer autofoszforilált formájának magasabb alapaktivitása ionomycin stimulációra lassabb időkinetikával emelkedett, viszont az autofoszforilációs állapot stabilabbnak bizonyult, mert az autofoszforilált CaMKII $\gamma_B$  10 perc elteltével is detektálható volt. A 42 kDa pozícióban nem találtunk autofoszforilációs jelet. 30 perces KN-93 előkezelés szignifikánsan csökkentette mindkét izoenzim autofoszforilációját.

5 óra anoxiás protokoll az előzőekhez hasonló módon aktiválta mindkét izoenzimet, melyet szintén az autofoszforilált formák detektálásával vizsgáltunk. Azaz a  $\delta_2$  izoform aktivitása a kontroll állapotú minimumról hipoxia hatására gyorsan és nagymértékben emelkedett (kontroll:  $10 \pm 2.6$  O.D., n=3, hipoxia:  $85.6 \pm 7.4$  O.D., n=5, P<0.01), míg a  $\gamma_B$  esetében magasabb kontroll aktivitásról kisebb rátájú, de szintén szignifikáns növekedést tapasztaltunk (kontroll:  $74.3 \pm 5.7$  O.D., n=3, hipoxia:  $121.8 \pm 10.7$  O.D., n=5, P<0.05). KN-93 előkezelés ez esetben is teljesen blokkolta a hipoxia által kiváltott autofoszforilációt mindkét izoenzim esetében (CaMKII $\delta_2$ :  $11.6 \pm 1.6$  O.D., n=5, CaMKII $\gamma_B$ :  $75.6 \pm 9.9$  O.D., n=5).

#### 8. *A tranziens outward $K^+$ áramot vezető csatornaprotein immunhisztológiai detektálása*

Irodalmi adatok szerint a Shaker-típusú  $K_v1.4$  csatorna részt vesz a tranziens outward, A-típusú  $K^+$  áram kialakításában. Az anti- $K_v1.4$  antitesttel végzett immunhisztológiai vizsgálattal, Cy3-konjugált szekunder antitesttel történt vizualizációval igazoltuk sejtvonalkban a  $K_v1.4$  proteinek jelenlétét.

### ÚJ EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

**XII.a. Az A típusú, valamint a delayed rectifier outward áram a kísérleteinkben regisztrált  $I_{to}$  és  $I_{sus}$  áramoknak feleltethetők meg.** Irodalmi adatok szerint mind az A típusú, mind a delayed rectifier áram megtalálható primer kapilláris endotélsejteken (Jow és mtsai, 1999, Dittrich és Daut, 1999), Ezek szerint rBCEC4 sejtvonalkban megőrizte a primer endotélsejtek tulajdonságait, ezáltal igazolva eredményeink validitását az elektrofiziológiai adatokra vonatkoztatva is.

**XII.b. A hipoxia protokoll után kimutatott szignifikáns mértékű sejtduzzadás igazolta, hogy ezen esetben méréseink releváns patofiziológiai eltéréseket mutató állapotban történtek.** Klinikai vizsgálatok szövettanilag igazolták iszkémiát követően az endotélsejtek duzzadását, dezintegrációját. Ennek meghatározó jelentősége van az ún. no-reflow jelenség létrehozásában, amikor a sikeres makrovaszkuláris rekanalizáció ellenére a kapilláris reperfüzió nem, vagy elégtelen szinten valósul meg. Ez jól ismert probléma a szívinfarktus, stroke ellátásában, valamint a koronária és transzplantációs sebészetben (Welt és mtsai, 2000, Vizzotto és mtsai, 2001). A probléma megoldására többféle módszer is kipróbálásra került, pl. lipoxigenáz inhibitorok (Welt és mtsai, 2000), hiperozmotikus oldatok alkalmazása (Kempski és Behmanesh, 1997), megnyugtató eredmények e tekintetben azonban még nem születtek.

**XIII.a. A 4-AP és TEA klasszikus feszültségfüggő  $K^+$  csatorna blokkolókkal kapott eredmények szerint a vizsgált áramok hordozója döntő mértékben  $K^+$  volt.** Elsőként írtuk le ezen blokkolók dózis-hatás görbéjének paramétereit agyi kapilláris endotél esetében.

**XIII.b. A charybdotoxin hatástalansága igazolta, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  áramok nem játszanak közvetlen szerepet a vizsgált áramok modulációjában.** A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  csatornák jelenléte endotélsejteken több esetben is leírásra került, elsősorban azonban makrovaszkuláris endotéliumban (Colden és mtsai, 1987, Demirel és mtsai, 1994).

**XIV.a. Munkánk során elsőként írtuk le agyi kapilláris endotélsejteken a feszültségfüggő outward  $\text{K}^+$  áram komponensek I-V karakterisztikáját.**

**XIV.b. Az amplitúdó, valamint a kinetikai paraméterek alkalmazásával részletesen jellemeztük az áramkomponensek hipoxiás modulációját.** Eszerint hipoxia megnöveli a tranziens, még inkább a sustained komponens amplitúdóját ezáltal csökkentve az inaktiváció mértékét. Mindezek felül a tranziens komponens inaktivációs időállandóját emeli, ami az inaktiváció sebességének csökkenését mutatja. Ezen jelenségek egyes részletei leírásra kerültek excitábilis sejteken (pitvari izomsejteken és colon simaizomsejteken) (Tessier és mtsai, 1999, Koh és mtsai, 1999), endotélsejteken azonban ezidáig még nem.

**XV.a. KN-93, a CaMKII izoenzimek szelektív gátlószere megakadályozta az áramkomponensek paramétereinek hipoxiás módosulását.** Ezen jelenség alátámasztja azon munkahipotézisünket, mely szerint a hipoxiára bekövetkező intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése aktiválja a CaMKII izoenzimeket endotélsejteken, melyek a feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák foszforilálásával azok áramvezetési paramétereit módosítják. Ezen paraméterek CaMKII általi, normoxiás körülmények alatti szabályozásának egyes elemei ismertek voltak transzfektált HEK (Roeper és mtsai, 1997), valamint egyes excitábilis sejteken (Tessier és mtsai, 1999, Koh és mtsai, 1999), azonban sem hipoxiás körülmények között, sem endotélsejteken még nem kerültek leírásra. Az A áram inaktivációjának lassulása a  $\text{K}^+$  kiáramlást emelve annak repolarizációs erejét növeli.

**XV.b. A KN-92-nek az áramparaméterekre vonatkozó hatástalansága bizonyította, hogy sejtjeinkben a KN-93 közvetlen csatornablokkoló hatással nem rendelkezik.** Egyes sejt típusokban ugyanis a KN-93 közvetlen  $\text{K}^+$  csatornablokkoló hatással bír (Ledoux és mtsai, 1998). Eredményeink azt mutatják, hogy a KN-93 áramkomponensekre gyakorolt hatása a CaMKII izoenzimekre gyakorolt közvetlen blokkoló effektusának tudható be.



**XVI. Az RT-PCR technika alkalmazásával rBCEC4 sejtekben a  $\gamma_B$ ,  $\gamma_C$ , valamint a  $\delta_2$  CaMKII izoenzimek mRNS-einek transzkripcióját detektáltuk.** Kapilláris endotélsejtekben a CaMKII izoenzimek transzkripció mintázata eddig ismeretlen volt.

**XVII. A Western-blot módszer segítségével az RT-PCR által mRNS szinten detektált izoenzimek proteinjeinek expressziós mintázatát mutattuk ki.**

**XVIII. Az autofoszforylált izoenzimek elleni antitestek alkalmazásával kimutattuk az izoformok aktiválódását mind  $Ca^{2+}$ -ionofor alkalmazása, mind hipoxia hatására.** Elsőként jellemeztük az izoenzimek aktiválódásának időkinetikáját endotélsejtekben. Észleléseink arra utalnak, hogy a  $K^+$  csatornák modulációját tekintve a  $\gamma$  izoformokkal szemben a  $\delta_2$  szerepe lehet meghatározó, míg adataink a  $\gamma$  alosztályokat tekintve a  $\gamma_B$  izoenzim aktivitásának dominanciájára utalnak.

**XIX. Immunhisztológiai vizsgálattal a  $K_v1.4$  csatorna jelenlétét bizonyítottuk rBCEC4 sejteken.** A  $K_v1.4$  típusú csatornák jellemzője az N-terminális domén által megvalósuló gyors inaktiváció (Hoshi és mtsai, 1991).

## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### *Az értekezéshez kapcsolódó közlemények*

**Balla, Z.**, Hoch, B., Karczewski, P., Blasig, I.E. (2002): Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase II $\delta$  and gamma Isoforms Regulate Potassium Currents of Rat Brain Capillary Endothelial Cells under Hypoxic Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 277(24):21306-14. IF: 7.258

**Balla, Z.**, Szőke, É., Czéh, G., Szolcsányi, J. (2001) Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations. *Acta Physiologica Hungarica* 88(3-4):173-196. IF: 0.246

Szőke, É., **Balla, Z.**, Csernoch, L., Czéh, G., Szolcsányi, J. (2000): Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport* 11(9):1949-52. IF: 2.374

### *Egyéb közlemények*

Pongo, É., **Balla, Z.**, Mubagwa, K., Flameng, W., Édes, I., Szilvássy, Z., Ferdinandy P. (2001): Deterioration of the protein kinase C-K(ATP) channel pathway in regulation of coronary flow in hypercholesterolaemic rabbits. *European Journal of Pharmacology* 418(3):217-23. IF: 2.164

Németh, J., Vecsernyés, M., Oroszi, G., **Balla, Z.**, Helyes, Zs., Farkas, B., Szilvássy, Z. (2000): Preparation of mono-<sup>125</sup>I-labelled gastrin-17 for radioimmunoassay measurements. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 43(9):855-863. IF: 0.839

**Balla, Z.**, Németh, J., Kovács, P., Rablóczy, Gy., Literáti-Nagy, P., Szolcsányi, J., Ferdinándi, P., Szilvássy, Z. Development of insulin resistance by nitrate tolerance in conscious rabbits. *European Journal of Pharmacology – közlésre benyújtva*

### *Folyóiratban megjelent referált (megbírált) idézhető abstractok*

Sándor Z., **Balla Zs.**, Szolcsányi J. Expression of rat vanilloid-1 (VR1) receptor in cell culture *Clinical Neuroscience, közlésre elfogadva* IF: 1.353

Angelika Varga, Éva Szőke, **Zs. Balla**, G. Czéh, J. Szolcsányi Parallel measurement of rhodamine 123 and fura-2 in capsaicin-stimulated sensory neurons *Clinical Neuroscience, közlésre elfogadva* IF: 1.353

**Balla, Z.**, Hoch, B., Karczewski, P., Blasig, I. E. (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms regulate K<sup>+</sup> currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 365(1):65 IF: 2.472

Czéh, G., **Balla, Z.**, Szőke, É., Szolcsányi, J. (2000) Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones. J. Physiol. London, 526. IF: 4.476

**Balla, Z.**, Szőke, É., Czéh, G., Szolcsányi, J. (2000) Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations Eur. J. Neurosci. 12:309 IF: 3.919

Szőke, É., Czéh, G., **Balla, Z.**, Szolcsányi, J. (2000) Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones. Eur. J. Neurosci. 12:308 IF: 3.919

**Balla, Z.**, Szőke, É., Szolcsányi, J., Czéh, G. (1999) Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation. Fundam. Clin. Pharmacol., 13. IF: 1.036

### *Folyóiratban megjelent egyéb idézhető abstractok*

**Balla, Z.**, Szőke, É., Szolcsányi, J., Czéh, G. (1999) Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons. Neurobiology 7(3):280

Szőke, É., **Balla, Z.**, Szolcsányi, J., Czéh, G. (1999) Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons. Neurobiology 7(3):392-393

Becze Z., **Balla Z.**, Szolcsányi J., Czéh G. (1998) Intracellular recordings from control and capsaicin treated trigeminal ganglia of rat pups. Neurobiology 6(2):8-9

Horváth, Z., **Balla, Z.**, Hati, K., Vajda, Z., Seress, L. (1996) Kindling of the perforant pathway results in epileptic behavior but no sprouting of the mossy fibers in rat hippocampus. Neurobiology 4:323

Hati, K., **Balla, Z.**, Vajda, Z., Horváth, Z. (1994) Kindling-induced structural changes in rat nervous system. Neurobiology 2:59

### *Angol nyelvű előadások, poszterek*

**Zs. Balla**, É. Szőke, J. Szolcsányi, G. Czéh: Capsaicin in low concentration modulates voltage-gated ionic currents in vanilloid sensitive trigeminal nerve-cells in slice preparation Second European congress of Pharmacology, 1999, Budapest, poszter

**Zs. Balla**, É. Szőke, J. Szolcsányi, G. Czéh: Depression of voltage-gated sodium and potassium currents by capsaicin The Primary Nociceptive Neuron, Official Meeting of the 9<sup>th</sup> World Congress on Pain, 1999, Prague, Czech Republic, poszter

G. Czéh, **Zs. Balla**, É. Szőke, J. Szolcsányi: Membrane current and intracellular calcium changes induced by capsaicin and anandamide in the rat's isolated trigeminal neurones The Joint Meeting of the Physiological Society with the Hungarian Physiological Society, 2000, Budapest, előadás

**Zs. Balla**, É. Szőke, G. Czéh, J. Szolcsányi: Effects of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations  
Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK, poszter

É. Szőke, G. Czéh, **Zs. Balla**, J. Szolcsányi: Capsaicin and anandamide induced current and calcium changes in sensory neurones  
Forum of European Neuroscience, Millennium Meeting, 2000, Brighton, UK, poszter

**Balla, Z.**, Hoch, B., Karczewski, P., Blasig, I. E.: The role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in the regulation of K<sup>+</sup> currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions  
VII<sup>th</sup> International Dahlem Symposium on Cellular Signal Recognition and Transduction, 2001, Berlin-Dahlem, Germany, poszter

**Balla, Z.**, Hoch, B., Karczewski, P., Blasig, I. E.: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II $\gamma$  and  $\delta$  isoforms regulate K<sup>+</sup> currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions  
43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 2002, Mainz, Germany, előadás

**Z. Balla**, M. Sladek, T. Bauer, I. E. Blasig: AMPA/Kainate receptor activation in rat cortical astrocytes under normal and hypoxic conditions  
Berlin Neuroscience Forum, 2002, Liebenwalde, Germany, poszter

**Balla, Z.**, Hoch, B., Karczewski, P. and Blasig, I. E.: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II  $\delta_2$  and  $\gamma$  isoforms regulate K<sup>+</sup> currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions  
Fifth Symposium on Signal transduction in the blood-brain barriers, 2002, Potsdam, Germany, előadás

### *Magyar nyelvű előadások, poszterek*

Hati, K., **Balla, Z.**, Vajda, Z. és Horváth, Z.: Kindling-indukálta strukturális változások patkány központi idegrendszerében  
MITT 1994. évi konferenciája, Pécs (1994), poszter

Horváth, Z., **Balla, Z.** Hati, K., Vajda, Z., Seress, L.: Perforáns pálya kindling okozta epilepsziás magatartás moharost sarjadzás nélkül patkányokban  
MITT 1996. évi konferenciája, Balatonfüred (1996), előadás

Becze Zs., **Balla Zs.**, Szolcsányi J., Czéh G.: Intracellular recordings from control and capsaicin treated trigeminal ganglia of rat pups  
MITT 1998. évi konferenciája, Debrecen (1998), poszter

**Balla Zs.**, Szőke É., Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminus ganglion B-típusú sejtjeiben  
II. Országos Ph.D. Konferencia, Debrecen (1998.), I. díjas előadás

Szőke É., **Balla Zs.**, Czéh G., Szolcsányi J.: Capsaicin-indukált kation áramok trigeminus ganglion B-típusú sejtjeiben  
II. Országos Ph.D. Konferencia, Debrecen (1998.), poszter

**Zs. Balla**, É. Szőke, J. Szolcsányi and G. Czéh: Changes of free calcium ion concentration in sensory neurons  
MITT 1999. évi konferenciája, Harkány (1999.), előadás

É. Szőke, **Zs. Balla**, J. Szolcsányi and G. Czéh: Capsaicin-sensitive voltage-gated ionic currents in sensory neurons  
MITT 1999. évi konferenciája, Harkány (1999.), előadás

Szőke É., **Balla Zs.**, Czéh G., Szolcsányi J. Capsaicin által kiváltott calciumszint változás sejtszintű vizsgálata fluoreszcens módszerrel  
IBRO-MITT Millenniumi Konferencia 2000, Budapest, poszter

Sándor Z., **Balla Zs.**, Szolcsányi J. Expression of rat vanilloid-1 (VR1) receptor in cell culture  
MITT IX. konferenciája, Balatonfüred, 2003, poszter

Angelika Varga, Éva Szőke, **Zs. Balla**, G. Czéh, J. Szolcsányi Parallel measurement of rhodamine 123 and fura-2 in capsaicin-stimulated sensory neurons  
MITT IX. konferenciája, Balatonfüred, 2003, poszter

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik a disszertáció alapjául szolgáló munkámban segítségemre voltak. Hazai munkámat tekintve tisztelet és köszönet illeti Szolcsányi János professzor urat és Czéh Gábor professzor urat, akik a tudományos iskola programvezetőjeként és témavezetőjeként biztosították számomra a kedvező feltételeket, valamint tanácsaikkal, észrevételeikkel, kritikáikkal segítették kísérleteimet, és akik bevezettek a neurofarmakológia és celluláris elektrofiziológia korántsem egyszerű tudományába. Köszönettel tartozom továbbá munkatársaimnak: Dr. Szőke Évának, Varga Angelikának és Dr. Sándor Zoltánnak, akik egy-egy kísérletsorozatban voltak segítségemre. A kísérletekhez nyújtott megbízható és nélkülözhetetlen segítségért köszönetem fejezem ki Búzasi Ádámné Anna és Disztl Cecília asszisztensnőknek. Mindezekén túl köszönet illeti a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozóját, hogy munkámat nyugodt, oldott légkörben végezhettem.

Külföldi munkámat illetően köszönettel tartozom Dr. Ingolf E. Blasig docens úrnak és Peter Karczewski professzor úrnak, akik kísérleteimhez a kedvező háttérrel biztosították és tanácsaikkal, ötleteikkel segítették azt. Köszönettel gondolok munkatársaimra: Dr. Brigitte Hoch-ra és Dr. Kenan Maric-ra az egyes kísérletsorozatokban nyújtott értékes segítségükért. Odaadó, precíz munkájáért ugyancsak köszönet illeti Barbara Eilemann asszisztensnőt. Szeretném külön köszönetem kifejezni a Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin valamennyi munkatársának, akik őszinte segítőkészségükkel, szimpátiájukkal könnyítették meg számomra a beilleszkedést és biztosították a produktív, baráti légkört.

Nagy szeretettel és hálával gondolok feleségemre, szüleimre és öcsémre, akik munkám során mindvégig megértettek, támogattak és kitartottak mellettem.