

A TRPV1 KATION CSATORNA FUNKCIÓJÁNAK GÁTLÁSA RNS INTERFERENCIÁVAL ÉS LIPID RAFT KÁROSÍTÁSSAL

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Tóth Dániel Márton



Elméleti Orvostudományok - Neurofarmakológiai Program

Programvezető: Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Sándor Zoltán, PhD

FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

PÉCS

2012

A TRPV1 RECEPTOR, MINT CÉLMOLEKULA RÖVID ISMERTETÉSE

A kapszaicin érzékeny neuronok és azok hármass funkciója

A nociceptorok az elsődleges érző neuronok egy csoportját képezik. Szerepük a káros ingerek feldolgozása a periférián. A nociceptorok legnagyobb csoportja polimodális, amely képes mindhárom típusú fájdalmas ingert (fájdalmas mechanikai, hő, valamint a károsító pH, vagy más kémiai ágensek okozta ingerek) érzékelni [1]. Ezekre a polimodális nociceptorokra jellemző, hogy egyben kapszaicinre is érzékenyek [2;3].

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármass funkcióval bírnak. Az első a klasszikus **afferens funkció**, amely a fájdalmas inger érzékelését, ingerületté való átalakítását és továbbítását jelenti a központi idegrendszer (KIR) felé. Kapszaicin hatására az aktivált perifériás idegvégződések több neuropeptid is felszabadul, amelyek arteriális vazodilatációt, plazma protein extravazációt és a gyulladáss sejtek akkumulációját váltják ki a beidegzett területen [4;5]. Ezt a jelenséget hívjuk neurogén gyulladásnak [6], ami a kapszaicin-érzékeny idegek ún. **lokális efferens funkciója**. Azonban ezekből az idegvégződések közül szomatosztatin is felszabadul, amely bejutva a keringésbe szisztémás gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Ezt nevezzük a kapszaicin-érzékeny nociceptorok **szisztémás efferens funkciójának** [7a,b].

A kapszaicin receptor: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1)

Szerkezet. A TRPV1 cDNS-ét egy ligand-függő kation csatornaként klónozták és kapszaicin receptornak, vagy 1-es típusú vanilloid receptornak nevezték el [8]. Majd a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornákkal mutatott szerkezeti analógiának köszönhetően besorolták a TRP családba és átnevezték tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1)-nek [9]. A TRPV1 egy politopikus fehérje. Hat transzmembrán (TM) doménből épül fel, a C- és N-terminálisai intracellulárisan helyezkednek el. Az ötödik és hatodik TM domén között egy rövid, pórust formáló hidrofób hurok található [8]. A receptor a membránban egy tetramer struktúrát vesz fel, négy TM5-pórus hurok-TM6 egymás felé fordulva a csatorna középpontját képezi, amely így egy szelektív kaput alkot [10].

Aktívátorok. A TRPV1 egy integratív nociszenzor fehérje, mert (1) vanilloidok, (2) fájdalmas hőinger és (3) protonok is képesek aktiválni [11]. A (1) vanilloidok, úgymint a kapszaicin és annak analógjai, pl. reziniferatoxin (RTX) lipofilek és átjutva a sejtmembránra a receptor intracelluláris oldalához kötődnek [12]. A vanilloidok mellett egyéb endogén anyagok is képesek aktiválni a receptort, pl: N-oleoildopamin (OLDA), anandamid (AEA) és lipoxigenáz termékek [13-15]. Ezek az agonisták mind lipofilek és hasonlóan a vanilloidokhoz a kötőhelyük a TM-ek intracelluláris oldalán található [16]. A TRPV1-ről írták le elsőként, hogy (2) hővel is aktiválható (>43°C) kation csatorna [11]. Szobahőmérsékleten az (3) extracelluláris protonok is képesek a csatorna nyitására, vagy a fájdalmas hőre és egyéb stimulusokra adott válasz potenciózására [11;17]. A TRPV1 csatorna alacsony szelektivitásának köszönhetően egy- és kétértékű kationokat is képes átengedni, úgymint Na⁺ és Ca²⁺ [8;18]. Az előbbi az akciós potenciál és így a fájdalom kialakulásáért felelős, az utóbbi pedig főként a neurogén gyulladás létrejöttében játszik szerepet. Egy hosszan tartó, vagy magas koncentrációjú kapszaicin kezelés során a csatorna sokáig nyitott állapotban megnövekedett mennyiségű Ca²⁺ áramlik be a sejtbe. Ez a pozitív

membránpotenciál megnövekedését és így deszenzitizációt idéz elő, ami a feszültség-függő Na⁺ csatornák fokozatos inaktivációjához, azaz a fájdalomérzékelés megszűnéséhez vezet [19].

Előfordulás. A TRPV1 receptor elsődlegesen a polimodális nociceptorokon található, de különböző, nem neuronális sejteken is expresszálódik, mint a keratinocitákon, uroepitélialis-, simaizom- és endotél sejteken, valamint az immunrendszer egyes sejtjein [20]. Különböző tanulmányokban, különböző metodikák felhasználásával leírták, hogy a TRPV1 megtalálható a KIR-ben is, de knock-in egerekkel végzett kísérletek a TRPV1 jelenlétét csak a kaudális hipotalamuszban és annak közvetlen környékén erősítették meg [21].

TRPV1 a fájdalomcsillapításban. Mivel a TRPV1 az agonistáival deszenzitizálható, így az antagonistáktól merőben eltérő fájdalomcsillapítási módszert lehet megvalósítani. Azonban a TRPV1 agonisták egy átmeneti hipotermiát is kiváltanak, amely koordinált hőleadás eredményeképpen jön létre, a meleg környezet teljes elkerülése, a vazodilatáció és az anyagcsere lelassulása révén [22a,b-24]. Ezt a hatást a *Trpv1* knock out (KO) egereknél sem kapszaicinnel, sem pedig RTX-szel nem lehet előidézni [25;26]. Az antagonisták a TRPV1 csatorna kapumechanizmusát gátolják, és mind a gyulladással, mind pedig a krónikus neuropátiás fájdalom esetében jó hatékonyságot mutatnak [27]. A TRPV1 antagonisták vazokonstriktó és megnövekedett termogenezis révén hipertermiát váltanak ki. Ez a hatás a *Trpv1* KO egereknél nem figyelhető meg, tehát ez a hatás TRPV1 mediált [26;28].

Egy másik TRP csatorna: ankyrin repeat domain 1 (TRPA1) receptor

A TRPA1 receptor a TRP ioncsatornák családjába tartozó TRPA oldalág egyetlen tagja emlősökben [10;29].

A TRPA1 túlnyomórészt a TRPV1-gyel együtt expresszálódik a polimodális nociceptorokon, de megtalálható a tüdőben lévő fibroblasztokon és a belsőfül szőrsejtjein is [29]. Kapszaicinnel nem aktiválható, de izotiocianát származékok (pl. a mustárolajban megtalálható allil-izotiocianát) vagy a formaldehid képesek aktiválni [30]. A TRPA1 17°C alatti fájdalmas hideggel is aktiválható és szenzitizálható, ezért a fájdalmas hideg receptorának is tekintik [29;31]. Aktivációja során az érzőideg végződéseiben kis fokú Ca²⁺-beáramlás jön létre, ami egyrészt akut fájdalmat, másrészt a perifériáról felszabaduló neuropeptideknek köszönhetően neurogén gyulladást indukál [32].

I. TRPV1 KNOCKDOWN TRANSZGENIKUS EGEREK LÉTREHOZÁSA, JELLEMZÉSE

I.1 BEVEZETÉS

RNS interferencia (RNSi). Az RNSi az evolúció során konzerválódott, szekvencia specifikus, poszt-transzkripcionális, dupla szálú RNS-ekkel (dsRNS) létrejövő géncsendesítő folyamat. Már több, az RNSi-ban résztvevő dsRNS-t azonosítottak, amelyek közül a legfontosabbak a rövid interferáló RNS-ek (siRNS) és a mikroRNS-ek (miRNS).

Az siRNS-ek extragenomiális eredetűek, és feladatuk a genom integritásának megóvása a különböző idegen, vagy invazív nukleinsavakkal szemben, mint a vírusok, transzpozonok és transzgenek [33]. Az siRNS 21-23 nukleotid (nt) hosszú,

dupla szálú RNS, mindkét 3' végén 2 nt hosszúságú túlnyúló véggel. A Dicer vágja ki egy hosszú, komplementer dsRNS-ből a citoplazmában. Ezt követően az *RNS induced silencing complex*hez (RISC) csatlakozik, ahol kicsavarodik [34-36] és az ún. utazó (*sense*) szál, amelynek az 5' vége magasabb relatív stabilitással bír, degradálódik [35]. A másik, vezető (*antisense*) szál a RISC-kel együtt egy ribonukleoprotein komplexet képez, és a Watson-Crick bázispárosodásnak köszönhetően felismeri a célul szolgáló komplementer mRNS-t, amelyet a RISC nukleáz aktivitásánál fogva elvág [34;36]. Végül az elvágott mRNS leválik a komplexről, degradálódik és az így szabaddá vált komplex újabb mRNS-t képes magához kötni [36].

A miRNS-ek endogén eredetűek és az endogén gének szabályozásában van szerepük. A genomról több hurkot tartalmazó pri-miRNS íródik át [33], amelyet a Drosha elvág és pre-miRNS-eket eredményez [37;38]. Ez a citoplazmába exportálódik, ahol a Dicer az érett, kétszálú miRNS-t kivágja belőle [39]. Végül az érett miRNS *antisense* szála stabilan kapcsolódik a RISC-hez [38] és megköti vagy tökéletes, vagy részleges bázispárosodással a komplementer mRNS-t [36]. Ha a bázispárosodás tökéletes, a mRNS elvágódik és degradálódik, ha nem, akkor csak a translációja gátlódik a riboszómákon [40].

Több lehetőség is van a knockdown fenotípus létrehozására. Egyrészt siRNS-eket, amelyek exogén (kémiai vagy enzimatikus) úton szintetizálhatóak, juttathatunk be sejtekbe vagy állatokba. Ez esetben csak egy átmeneti csendesítő hatást tudunk elérni, mivel nincs az siRNS intracelluláris reprodukciójára lehetőség [34]. Másrészt az interferáló RNS-t a sejten belül is megtermeltethetjük miRNS-ek, vagy rövid hurok alakú RNS-ek (shRNS) segítségével. Az shRNS-ek egy DNS konstrukcióról íródnak át, amely kódol egy 21-29 nukleotid hosszú, a célszekvenciával megegyező (*sense*) szálát. Ehhez kapcsolódik egy rövid hurok szekvencia, majd a cél szekvencia fordított komplementere (*antisense* szál) és egy rövid (5-6 T) terminátor régió [34]. Amikor ez *in vivo* átíródik, általában Pol III promóterek (U6 vagy H1) irányításával, a rövid transzkriptum visszahajlik önmagára és hurok alakzatot vesz föl. Ezt a Dicer átalakítja egy dupla szálú siRNS-é, amely a már korábban leírtak szerint komplexet alkot a RISC-el [41].

Transzgenézis lentivírusokkal. A lentivírusok, úgymint a Humán Immundeficiencia Vírus (HIV) a retrovírusok családjába tartoznak. Képesek megfertőzni az osztódó, a nem osztódó és a differenciált sejteket is. Miután bejutottak a gazdasejtbe, a virális RNS genom reverz transzkripcióval átíródik cDNS-re és stabilan beépül a gazdasejt genomjába.

A transzgenézishez korlátozott replikációjú vírusokat használnak, ugyanis a genomjukból azon géneket, amelyek nem esszenciálisak, eltávolították. A transzfer plazmidban található az ún. *cis*-ható szekvenciák és a vírus két *long terminal repeat* (LTR) szekvenciái között elhelyezkedő, a transzgen beépítésére szolgáló klónozó hely. Az LTR-ek elengedhetetlenek az általuk közbezárt transzgen beépüléséhez a gazdagenomba. De mivel promóter és *enhancer* szerepük is van, képesek a köztes transzgen transzkripcióját is befolyásolni. Ezért ún. *self inactivated* (SIN) lentivírus vektorokat hoztak létre, amelyekben megszüntették a virális promóter aktivitást. További előnye, hogy ez a rendszer kiküszöböli a virális LTR-ek és a transzgen internális promótere között fellépő interferencia lehetőségét is [42]. A *transz*-ható elemek, amelyek feltétlenül szükségesek a vírusok előállításához, az infekcióhoz és a gazdagenomba történő beépüléshez, a segédplazmidokban találhatóak. Ezek

tartalmazzák az integrázt, a reverz transzkriptázt, a szerkezeti fehérjéket, valamint a burok glikoproteineket kódoló géneket [43].

Ezeknek a módosított vírusoknak a replikációja egy ciklusra korlátozódik. A transzdúcer sejtekbe bejuttatott transzfer- és segéd plazmidokból transzgént tartalmazó virionok jönnek létre, amelyek a gazdasejt megfertőzése után provírusként stabilan beépülnek a gazdagenomba anélkül, hogy újabb vírusokat lennének képesek létrehozni. Így, ha a transzgén egy shRNS-t kódol, az stabilan beépül a genomba, átíródik, exportálódik a citoplazmába, végül az endogén RNSi útvonalba bekapcsolódva a kívánt mRNS-t degradálja [41].

A transzgenikus állatok lentivírusokkal történő előállításának egyik lehetősége, hogy a vírusokat közvetlenül az egysejtes állapotban lévő zigóta *zona pellucidája* alá injektálják [44]. Ez az eljárás független a sejtmag helyzetétől és annak láthatóságától, továbbá nem károsítja sem a sejtmembránt, sem a magmembránt. További előnye, hogy a transzgén csak egy kópiában épül be, így szerkezetileg jobban hasonlít egy endogén génhez, ezért kevésbé van kitéve az epigenetikus csendesítés (metiláció, hiszton deacetiláció) veszélyeinek [45;46].

I.2 CÉLKITŰZÉS

A munkám célja TRPV1 knockdown egerek és patkányok előállítása volt. Ehhez a következő lépéseket kellett megtennünk:

1. a mások által közölt anti-TRPV1 siRNS-ek hatékonyságának és specificitásának *in vitro* tesztelése.
2. több shRNS és miRNS konstrukció építése és *in vitro* validálása.
3. a legjobban működő konstrukció lentivirális plazmid rendszerbe történő beépítése, és belőlük lentivírus vektorok gyártása.
4. a lentivírus vektorok mikroinjektálása egysejtes embriókba.
5. a született transzgenikus állatok tipizálása, majd egy transzgenikus vonal felállítása.
6. transzgenikus állatok tulajdonságainak vizsgálata különböző *in vitro* és *in vivo* modellekben.

I.3 VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

siRNS oligonukleotidokkal végzett kísérletek

Áramlási citométerrel végzett mérések: ND-C és CHO sejtekbe 200 ng patkány-TRPV1eGFP fúziós fehérjét expresszáló pZS5 vektort [47] együttesen transzfektáltunk a már mások által leírt [48] 8 pmol anti-TRPV1 siRNS-sel (VsiR1) ill. a kontrollként szolgáló VsiR1INV-vel. Egész éjszakás inkubációt követően a patkány-TRPV1eGFP fúziós fehérje fluoreszcenciáját áramlási citométerrel mértük és az eredményeket a csak pZS5-tel transzfektált sejtekhez hasonlítottuk %-ban kifejezve.

Mikrofluorimetriás mérések: Wistar újszülött patkányok TRG-jéből trigeminális ganglionsejt tenyészetet készítettünk [49]. A sejtenyészetet egy éjszakán át előkezeltük 50 nM VsiR1, vagy VsiR1INV siRNS-sel, majd a következő nap a sejteket megfestettük 1 μ M fura-2-acetoxy-metilészter (AM) fluoreszcens Ca^{2+} -indikátor festékkel. A sejtekbe beáramló kalcium mennyiségét fluoreszcens mikroszkóp alatt mértük, ahol a sejteket alternálva 340 és 380 nm hullámhosszú fényel világítottuk meg. Az emittált fényt 510 nm hullámhosszúságon detektáltuk és a fluoreszcencia intenzitás arányát ($R=F_{340}/F_{380}$) folyamatosan mértük. A TRPV1

receptorok izgatásához 330 nM kapszaicint (ECS-ben hígítva) használtunk, míg a TRPA1 receptorokat 100 μ M mustárolajjal (ECS-ben hígítva) aktiváltuk. Receptort expresszáló sejteknek azokat tekintettük, amelyek agonista kezelés hatására $\Delta R > 0,1$ értékkel válaszoltak. Az agonistára reagáló sejteket megszámláltuk, ezt az siRNS-sel nem előkezelt, reagáló sejtek számához (100%) viszonyítottuk %-ban kifejezve.

Knockdown transzgenikus állatok létrehozása

shRNS-ek és miRNS-ek megépítése, tesztelése: 14 shRNS-t terveztünk. Közülük hat (shRNSa, és shRNSc-től shRNSg-ig) a patkány TRPV1 mRNS különböző szakaszaihoz kötődik, a továbbiak (shRNSb, és shRNSi-től shRNSm-ig) pedig az shRNSa, amely a VsiR1 siRNS-sel azonos helyre kötődik, különböző variánsai. Az shRNS-eket kódoló DNS-eket négy oligonukleotidból építettük meg, amelyeket klónoztunk a pU6Abase plazmid ún. alap szekvenciájába a humán U6 promóter mögé.

A miRNS-eket hasonló módon építettük meg, mint az shRNS-eket, de ezeket a pDsRedmibase vektorba klónoztuk az 5' és 3' miRNS szabályozó szekvenciák közé, amelyek egy miRNS155-öt kódolnak. Ezt az egész konstrukciót a DsRed fluorescens fehérje mögé helyeztük el, amely egy CMV promóterrel működik.

Végül ezeket az shRNS-eket és miRNS-eket expresszáló plazmidokat külön-külön a patkány-TRPV1eGFP fúziós fehérjét expresszáló plazmiddal (pZS5) együtt transzfektáltuk ND-C sejtekbe, és a patkány-TRPV1eGFP expresszióját áramlási citométerrel mértük. A kapott eredményeket azon sejtekhez hasonlítottuk, amelyeket pZS5-tel és pU6Abase-zel, vagy pDsRedmibase-zel transzfektáltunk (100%) és az eltéréseket %-ban adtuk meg.

A lentivírusok elkészítése: Ezt a munkafolyamatot Kvell Krisztián végezte a Pécsi Egyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében. Az shRNSa konstrukciót a humán U6 promóterrel együtt a pWPTS-GFP plazmidba átraktuk, az EF1 promóterrel ellátott eGFP transzkripcióos egységgel azonos irányultsággal. Majd ezt a lentivirális transzfer plazmidot, amit pLshRNSa-nak nevezünk el, pSPAX2 és pMD2g segéd plazmidokkal együtt transzfektáltuk HEK293T transzdúcer sejtekbe, CaCl₂ módszer alkalmazásával. A létrejött vírusokat a sejtek felülúszójából összegyűjtöttük és tisztítottuk. A virális titert HeLa sejteken határoztuk meg, ahol a GFP-t expresszáló sejtek %-os értékét mértük áramlási citométerrel. Végül a vírusokat 20%-os szacharóz oldatban koncentráltuk ultracentrifugálással, amíg a titer elérte a 10⁸ TU/ml-es koncentrációt.

A lentivírus vektorok bejuttatása: Ezt a munkafolyamatot Bender Balázs és Bősze Zsuzsa végezte a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben.

Sprague Dawley nőstény patkányok és FVB/Nhsd nőstény egerek szuperovulációját váltották ki, majd a megtermékenyítés után az egysejtes állapotban lévő embriókat a petevezetékéből eltávolították. A lentivírusokat egy módosított metodika alapján a *zona pellucida* alá mikroinjektálták [50]. Az injekciós pipettán lévő tű hegyét átszúrták a *zona pellucidán* és finom pozitív nyomást alkalmazva a koncentrált vírusokat beinjektálták a *zona pellucida* és a sejtmembrán közé. Végül a korai stádiumban lévő, ép *zona pellucidával* rendelkező embriókat visszaültették álterhes nőstények petevezetékébe.

A transzgenikus állatok azonosítása és jellemzése

Transzgenikus állatok genotipizálása: A DNS-t farok szövetből izoláltuk izopropanolos kicsapással. A transzgén meglétét genomiális PCR-rel határoztuk meg GFP specifikus (*forward*: 5'-CTCGTGACCACCCTGACCTAC-3', *reverse*: 5'-CATGATATAGACGTTGTGGCTGTT-3'), és shRNS specifikus (*forward*: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGAT-3', *reverse*: 5'-TAAAGGTACCTCGCGAATGC-3') primerekkel.

A transzgén beépülés helyének meghatározása ligáció-mediálta PCR-al (LM-PCR): A transzgén beépülésének a helyét LM-PCR-rel határoztuk meg [51]. A genomiális DNS-t *HaeIII* restrikciós endonukleázzal emésztettük. Ezt követően az első PCR során egy a transzgénre specifikus primer no.1-t (5'-CAGGGTACCTTTAAGACCAATGAC-3'), a második PCR során Y-primer D-t és a transzgénre specifikus primer no.2-t (5'-TTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGG-3'), végül a harmadik PCR során Y-primer G-t és transzgén specifikus primer no.3-t használtunk (5'-TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTG-3'). A végső PCR termék egy ~500 bp hosszúságú fragment volt, melyet szekvenáltunk a no.3 és Y-primer G primerekkel és a vírusszekvenciához kapcsolódó kromoszómális szekvencia alapján, BLAST felhasználásával meghatároztuk a beépülés helyét. Majd az egész, ~4,5 Kb hosszú beépült provírust amplifikáltuk a vírus szekvenciához kapcsolódó kromoszómális DNS-re specifikus primerekkel, mint a Chr3A (5'-GCTTTAAATGCCTTCCTTGTTAAA-3') és Chr3B (5'-TAACTGAGAAGCAAGGTTTTGTTG-3'). Végül ugyanezen primerekkel a kromoszómális részeket szekvenáltunk.

Mennyiségi PCR (qPCR): Négy hetes egerek TRG sejtjeiből totál RNS-t izoláltunk, majd oligo-dT primerekkel reverz transzkripciót végeztünk. A TRPV1, TRPA1 és TRPV3 mRNS-ek mennyiségét qPCR-rel (Mm01246301_m1, Mm00625268_m1 és Mm00454996_m1 TaqMan próbák) határoztuk meg. A ΔC_t értékeket a hipoxantin foszforiboziltranszferáz 1 és β 2-mikroglobulin háztartási génekre történt normalizálással kaptuk meg.

TRPV1 aktivitásának mérése TRG sejteken mikrofluorimetriával: A TRG sejtekből álló sejtenyészetet néhány napos egerekből készítettük el. A mérés, a receptorok aktiválása kapszaicinnel vagy mustárolajjal, valamint a kiértékelés ugyanazon módszer szerint történt, mint az siRNS-sel végzett kísérlet esetében. Az agonistákra reagáló sejteket megszámláltuk és a kezeletlen sejtekhez hasonlítottuk őket %-ban kifejezve.

Szemtörlés teszt: Az egerek szemébe kapszaicint (10 μ g/ml) cseppentettünk és a mellső lábakkal végzett szemtörlések számát számoltuk.

Talpon kiváltott nocifenzív viselkedés mérése: Az egerek bal hátsó lábának talpi részébe kapszaicint (20 μ l, 100 μ g/ml) vagy annak oldószerét injektáltuk. A kiváltott nocifenzív viselkedés mértékét pontszámokkal jellemeztük, amely a talpnyalással eltöltött időből és a talprázások számából tevődik össze.

Fülön kiváltott akut neurogén gyulladás mérése: Az egerek fülének mindkét oldalát 30 μ l, 2,5%-os kapszaicinnel (96%-os etanolban oldva) vagy 3%-os mustárolajjal (paraffin olajban oldva) kentük be. A fül duzzadásának mértékét egy 5 óras

intervallumban óránként mértük műszaki mikrométer segítségével. A duzzadás mértékét %-ban fejeztük ki a kezdeti értékhez viszonyítva és az oldószerrel kezelt állatokhoz hasonlítottuk.

RTX által kiváltott hipotermia: Az egerek testhőmérsékletét a rektumon keresztül egy digitális hőmérővel mértük 20 µg/kg RTX i.p. beadása előtt és 7,5, 15, 30 és 60 perccel utána.

RTX által kiváltott perifériás vazodilatáció: Transzgenikus, nem transzgenikus és *Trpv1* KO nőstény egerek altatást követően i.p. 20 µg/kg RTX injekciót kaptak. A farokban kialakuló véráramlás változást magas-felbontású PIM-2 lézer Doppler scannerrel mértük.

Környezeti hőmérséklet-preferencia mérése: Az egereket egy olyan készülékbe helyeztük el, amelyben azok szabadon, két hőmérséklet (30°C vs. 35°C) között választhattak. 40 percen keresztül, 10 perces intervallumokra bontva mértük az egyes hőmérsékleten eltöltött időt és az eredményeket %-ban adtuk meg. A mérés elején és végén is megmértük a rektális hőmérsékletet.

I.4 EREDMÉNYEK

siRNS oligonukleotidokkal végzett kísérletek

siRNS-ek hatása ND-C és CHO kotranszfektált sejteken: VsiR1 siRNS transzfektáció után a GFP fluoreszcenciája szignifikánsan csökkent az ND-C (15,4 ± 3,5%) és CHO (25,3 ± 6,7%) sejtekben a csak pZS5-tel transzfektált sejtekhez (100%) viszonyítva. Ahogy várható volt, a TRPV1 knockdown hatás nem, vagy csak nagyon kis mértékben jelentkezett a kontroll VsiR1INV siRNS-sel transzfektált ND-C (102,4 ± 9,4%) és CHO (85,1 ± 6,8%) sejtekben.

siRNS-ek hatása a TRPV1-et természetesen expresszáló TRG neuronokon: Az siRNS-sel nem kezelt mintákon a TRG sejtek 49,5%-a (95-ből 47) reagált ($\Delta R_{F340/380} > 0,1$) kapszaicin-indukcióra. Ez az érték szignifikánsan csökkent 6%-ra (134-ből 8) VsiR1 siRNS-sel való előkezelés után, amíg a VsiR1INV siRNS előkezelés nem okozott változást (48%; 79-ből 38).

Hogy megerősítsük a VsiR1 siRNS szelektivitását és kizárjuk a nem specifikus hatásokat, a TRPA1 receptor aktivitását is néztük. A kezeletlen mintákon a mustárolaj a TRG sejtek 23%-át (60-ből 14) aktiválta, amely érték nem változott a VsiR1 siRNS-sel való előkezelés után (23%; 66-ből 15). Ezek az eredmények megerősítik a VsiR1 siRNS hatásosságát és szelektivitását a TRPV1 receptoron.

Knockdown transzgenikus állatok létrehozása

A különböző shRNS-ek és miRNS-ek *in vitro* tesztelése: A különböző shRNS konstrukció pU6Abase kontroll vektorhoz viszonyított expressziós értéke az 1-es táblázatban látható.

A pU6shRNSa, amelyet a VsiR1 siRNS alapján terveztünk, majdnem teljesen gátolta a patkány-TRPV1eGFP expresszióját. A pU6shRNSc és pU6shRNSe ugyancsak erőteljes, viszont a pU6shRNSf csak visszafogott gátlóhatást fejtett ki. Ezzel szemben a pU6shRNSd és pU6shRNSg nem befolyásolták a patkány-TRPV1eGFP expresszióját. Érdekes, hogy a pU6shRNSh, amelyet egy hatástalan kontrollnak

terveztünk, kisebb mértékben, de szignifikánsan csökkentette az expressziót. Ennek az okát nem tisztáztuk és a továbbiakban nem is vizsgáltuk.

1-es táblázat.

Név	kötési hely (start:hossz)	shRNS szekvencia (sense-hurok-antisense)	TRPV1eGFP expresszió (%) (átlag±SD)
pshRNSa	1373:21	5' GCGCAUCUUCUACUUCUACUUC ^C _G UUCGCGUAGAAGAUGAAGUUGAA _A	2±1 ^{***}
pshRNSc	1726:21	5' GGACCAACAUGCUCUACUUA ^G _A UUCGUGGUUGUACGAGAUGAUUA _A	11±2 ^{***}
pshRNSd	1946:20	5' GCCAGGUAACUCUUAACA ^C _G UUCGGUCCAUUGAGAAUGUUGU _A	100±5
pshRNSe	1000:21	5' GCAUGUACAACGAGAUCUUGA ^A _A UUCGUACAUGUUGCUCUAGAACU _G	8±3 ^{***}
pshRNSf	2471:21	5' GGAUGCAAGCACUCGAGAUA ^A _A UUCCUACGUUCGUGAGCUCUAU _G	43±6 ^{***}
pshRNSg	802:20	5' GGAGGCCUGGCUUCUACUUU ^A _A UUCUCCGGACCGAAGAUGAAA _G	98±5
pshRNSh	kevert kontroll	5' GCACGAUCAUCGUCUACAAUA ^G _A UUCGUGCUAGUAGCAGAUGUUUA _A	79±4 ^{***}
pshRNSb	ellentétes hurok	5' GAAGUUGAAGUAGAAGAUGC ^C _G UUCUUCUACUUCUUCUACGCG _A	37±9 ^{***}
pshRNSi	mismatch	5' GCGCA <u>a</u> CUUCUACUUCUACUUC ^C _G UUCGCGU <u>u</u> GAAGAUGAAGUUGAA _A	9±1 ^{***}
pshRNSj	mismatch	5' GCGC <u>u</u> aCUUCUACUUCUACUUC ^C _G UUCGCG <u>au</u> GAAGAUGAAGUUGAA _A	40±3 ^{***}
pshRNSk	mismatch	5' GCGCA <u>a</u> CUUCU <u>ag</u> UUCUACUUC ^C _G UUCGCGU <u>u</u> GAAGAU <u>ca</u> AGUUGAA _A	81±3 ^{***}
pshRNSl	nagy hurok	5' GCGCAUCUUCUACUUCUAC ^{UUAG} _C UUCGCGUAGAAGAUGAAGUUG _{GUC}	4±2 ^{***}
pshRNSm	deléció	5' GCGCA-CUUCUACUUCUAC ^{UUAG} _C UUCGCGUAGAAGAUGAAGUUG _{GUC}	15±2 ^{***}
pshRNSn	fordított kontroll	5' GCAACUUCUUCUUCUACGCGU ^C _G UUCGUUGAAGUAGAAGAUGC _A	101±3

Továbbá megvizsgáltuk az shRNSa hét változatát is (shRNSb, shRNSi-shRNSn). A pU6shRNSb, amely egy *antisense*-hurok-*sense* felépítéssel rendelkezik és az elején egy extra G-t is tartalmaz, nem volt képes oly mértékben csökkenteni a patkány-TRPV1eGFP expresszióját, mint a pU6shRNSa. Az egyszeres *mismatch*-et tartalmazó pU6shRNSi variáns elég hatékonyan, a tandem *mismatch*-et hordozó variáns (pU6shRNSj) mérsékelten, míg az elkülönülő dupla *mismatch*-et hordozó

változat (pU6shRNS_k) a legkevésbé gátolta az expressziót. A kilenc-bázisú hurokkal rendelkező pU6shRNS_l hasonlóan jól működött, mint a pU6shRNS_a. A *sense* szálon egy egyszeres deléció hordozó variáns (pU6shRNS_m) esetében a hatékonyság lecsökkent, de nem nagymértékben. Végül a kontroll VsiR1INV-nek megfelelő pU6shRNS_n a vártaknak megfelelően hatástalan volt.

A leghatékonyabb shRNS-ekkel azonos támadáspontú két miRNS-t is tervezünk. A pDsRedmiRNS_a kevésbé tudta gátolni a patkány-TRPV1eGFP expresszióját ($24 \pm 10\%$), mint a vele megegyező támadáspontú pU6shRNS_a. A másik miRNS (pDsRedmiRNS_e) hasonlóan alulmúlta hatékonyságban ($38 \pm 15\%$) az shRNS párját (pU6shRNA_e).

Az shRNS_a volt a leghatékonyabb ebben az *in vitro* tesztben, ezért ezt használtuk a továbbiakban a TRPV1 knockdown állatok létrehozásához. Mivel az shRNS_a a mRNS egy olyan szakaszát ismeri fel, ami az egérben és patkányban is megegyezik, ezért mindkét állat esetében fel tudtuk használni.

Lentivírusal történő transzgenezis: 96 lentivírusal injektált patkány embrióból 24 született meg, de közülük egy sem mutatott 455-495 nm-es hullámhosszúságú kék fény alatt látható GFP expressziót, és nem adott pozitív GFP-specifikus PCR eredményt sem.

60 injektált egér embrióból 43 született meg. Kettőn volt látható a GFP expresszió, de 5 adott pozitív GFP-specifikus PCR eredményt, amelyek közül két alapító állatot (#4 és #11) keresztezve vad típusú FVB/N_{hsd} egerekkel transzgenikus utódokat kaptunk.

Az alapító állatok GFP-PCR-pozitív utódjainak szemébe kapszaicint cseppentettünk és a szemtörlések számát néztük. A vad típusú állatok esetében, ill. csak a GFP-t hordozó transzgenikus egerek esetében ez az érték $14,2 \pm 0,9$ és $15 \pm 0,9$ volt. Ezzel szemben a *Trpv1* KO állatok nulla, vagy csak egy szemtörléssel válaszoltak. A legtöbb transzgenikus utód ezen értékek közti fenotípust mutatott, kevesebb, mint öt szemtörléssel.

Ezen eredményekre alapozva a legérzékenyebb 10-es számú állatot kiválasztottuk és szaporítottuk, hogy egy transzgenikus egér vonalat hozzunk létre a további kísérletekhez. A lentivírus vektor beépülésének helyét LM-PCR-rel meghatároztuk és megállapíthattuk, hogy egy kópia épült be a 3-as kromoszómába a 154300070 nukleotidnál a *zeta crystalline* gén (GeneID 12972) mögé.

Elválasztás után a 10-es állat minden egyes utódját PCR-rel és kapszaicinnal kiváltott szemtörléssel teszteltük. Ezek alapján az állatokat vagy *transzgenikus (tg+)* vagy *nem transzgenikus (tg-)* csoportba soroltuk. A további kísérletek során a tg- alomtársakat használtuk kontrollként.

A transzgenikus állatok jellemzése

Egerek TRG neuronjain expresszáló TRPV1 analízise: Meghatároztuk TaqMan qPCR-rel a transzgenikus állatok TRG neuronjaiban a TRPV1, TRPV3 és TRPA1 mRNS szinteket. TRPV3 mRNS szintje a tg+ és a tg- állatokban is a detektálási limit alatt volt. Viszont a TRPV1 mRNS szintben szignifikáns különbség mutatkozott a két állatcsoport között: tg- ($\Delta C_t = 4,4$), tg+ ($\Delta C_t = 8,1$). Az ezekből kapott $\Delta\Delta C_t = 3,7$ -es érték egy 13X-os TRPV1 mRNS csökkenést mutatott, azaz egy ~8%-os mRNS szintet a tg- állatokhoz viszonyítva. A TRPA1 mRNS szintben a tg- és tg+ állatok között nem találtunk különbséget. Ezek az eredmények is jól mutatják, hogy az shRNS_a transzgén szignifikánsan és szelektíven csökkentette a TRPV1 expresszióját a tg+ egerek TRG-jében.

A TRG neuronokban a funkcionális TRPV1 és TRPA1 receptorok mennyiségét is meghatároztuk fura-2 mikrofluorimetriával. A TRG neuronok 63%-a (123-ból 77) reagált kapszaicinre ($\Delta R=1,11 \pm 0,16$) a tg- állatokban. A tg+ állatokból származó neuronok egyike sem (134-ből 0) adott detektálható fluoreszcens jelet, mindegyik a háttérzaj ($\Delta R < 0,1$) alatt volt. Ugyanakkor mustárolajra a TRG neuronok 23%-a (85-ből 20) ($\Delta R=0,65 \pm 0,36$) válaszolt a tg- egerekben, és hasonlóan 21%-a (81-ből 17) ($\Delta R=0,59 \pm 0,35$) a tg+ állatokban. Tehát a TRPV1 elleni shRNS transzgen képes eliminálni a funkcionális TRPV1 receptorokat, amíg a TRPA1 receptor expresszióra nincs hatással.

Talpon kiváltott nocifenzív viselkedés: Tg- állatok esetében a fájdalom nagyságát megadó érték az oldószerral végzett kezelés után $20,2 \pm 22,0$ volt, amely kapszaicin intraplantáris beadása után szignifikánsan megnőtt ($84,5 \pm 33,2$). A tg+ állatokban a kapszaicines kezelés jelentősebb fájdalmat nem idézett elő ($24,4 \pm 26,2$), ami szignifikánsan nem is volt nagyobb, mint a szolvens által kiváltott fájdalom mértéke ($12,0 \pm 12,7$). Ez jól mutatja, hogy a tg+ egerek talpában lévő polimodális szenzoros neuronokon csak nagyon kevés maradvány TRPV1 aktivitás található.

Fülön kiváltott akut neurogén gyulladás: A tg- állatokban a kapszaicinnel kiváltott fülduzzadás mértéke legmarkánsabban 2 órával a kezelés után alakult ki ($42,6 \pm 5,9\%$), amely a mérés ideje alatt mindvégig megmaradt. A tg+ állatokban nem jött létre fülduzzadás, szignifikáns növekedés nem volt mérhető az oldószerral kezelt csoporthoz hasonlítva.

A mustárolaj-kezelés a tg- és tg+ állatoknál egyaránt fülduzzadást váltott ki. A legnagyobb növekedést a kezelés utáni második órában mértük: $28,2 \pm 5,5$ (tg-) és $31,4 \pm 7,5\%$ (tg+). Egyik állatnál sem okozott az oldószert szignifikáns változást a fülek vastagságában.

Elmondhatjuk, hogy a TRPA1 receptor funkcionálisan nem sérült a tg+ állatokban és nem csak a TRPV1-hez kapcsolódó fájdalom-érzékelés, de a neurogén gyulladás kialakulása is szelektíven gátlódik bennük.

RTX hatása az egerek testhőmérsékletére és perifériás vérkeringésére: RTX i.p. adását követően a tg- egerekben a testhőmérséklet minden mérési pontban szignifikánsan csökkent. A legalacsonyabb hőmérsékletet 30 perccel a beadás után érték el ($33,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$, a kezdeti érték $37,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ volt). A tg+ egerekben a testhőmérséklet csak némileg, de nem szignifikánsan csökkent. A legalacsonyabb értéket ők is a 30. percnél érték el ($36,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$). Ez is azt támogatja, hogy a tg+ egerekben a TRPV1 aktivitás szignifikánsan kisebb, de nem tűnt el teljesen.

A farkok vérátáramlásának változását is vizsgáltuk lézer Doppler scanner segítségével tg-, tg+ és *Trpv1* KO egerekben. Az i.p. RTX kezelés szignifikáns vérátáramlás-növekedést idézett elő a tg- egerek farkában, a legnagyobb értéket a 15. percben érték el ($75,8 \pm 25,9\%$, a kezdeti értékhez viszonyítva). A tg+ és *Trpv1* KO állatok esetében csak egy kismértékű változást figyeltünk meg, a maximum értéket a 27. percben érték el: $35,5 \pm 2\%$ és $21,9 \pm 18,5\%$. Tehát RTX i.p. adása következtében a tg+ egerek farkában vazodilatáció nem alakult ki.

Egerek környezeti hőmérséklet-preferenciája: A tg- és tg+ nőstény egerek rektális hőmérséklete és hőmérséklet preferenciája között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. Bár a tg+ hím egerek egy kicsivel több idő töltöttek 35°C -on, mint a tg- hím egerek, ez a különbség csak a második mérési pontban volt

szignifikáns (tg-: $21,1 \pm 2,0\%$; tg+: $29,0 \pm 2,7\%$). Érdekes, hogy a tg+ hím egerek egy kicsivel több időt töltöttek a melegebb hőmérsékleten, mégis a rektális hőmérsékletük szignifikánsan alacsonyabb volt a kísérlet végén.

I.5 MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozatom első részében azt ismertettem, hogy a TRPV1 receptor knockdown állatokat hogyan állítottuk elő és hogyan jellemeztük.

Első lépésben siRNS-sel hatékonyan és szelektíven gátoltuk a TRPV1 expresszióját transzfektált sejteken és patkány izolált TRG neuronokon. Mivel a további célunk TRPV1 knockdown transzgenikus egerek és patkányok előállítására volt, ezért egy hatékony TRPV1 elleni shRNS konstrukciót kellett létrehozunk.

Több shRNS-t terveztünk a patkány TRPV1 mRNS különböző helyeit megcélozva. A leghatékonyabb shRNS (shRNSa) kötődési helye a korábban már *in vitro* tesztelt VsiR1 siRNS-sel megegyező volt. Nem vizsgáltuk, hogy egyes shRNS-ek miért nem voltak elég hatékonyak, de a mi tapasztalataink is egybecsengenek mások észrevételeivel, miszerint minden egyes célba vett gén esetében több interferáló RNS-t kell tervezni és tesztelni. Továbbá az shRNSa-nak különböző változatait is elkészítettük. De sem a kilenc-bázisú hurokkal rendelkező variáns (shRNSl), sem az *antisense*-hurok-*sense* szerkezetű variáns (shRNSb) nem volt jobb, mint az shRNSa. Továbbá az eredményeink azt mutatják, hogy az egyszeres *mismatch* csak minimális csökkenést idézett elő a hatékonyságban, ahogy azt már mások is leírták [52], viszont a tandem és a különálló dupla *mismatch*ek a hatékonyságot jelentősen visszavetették. Az shRNS-ek mellett egy másik lehetőség a knockdown fenotípus kialakításához a mesterséges miRNS-ek alkalmazása. Mivel a mesterséges miRNS-ek jobban hasonlítanak a RNSi-ban természetesen is megtalálható szubsztrátokra, ezért akár hatékonyabban is működhetnek [53]. Bár egyesek szerint a pol III promóterekkel átírt shRNS-ek, mivel nagy mennyiségben expresszálódnak, hatékonyabbak, mint a pol II promóterekkel átírt miRNS-ek [54]. Az általunk kapott eredmények is ezt támasztják alá, hiszen a mi miRNS-eink is alulmúlták a velük megegyező shRNS-ek hatékonyságát.

Ezek után az előkísérletek után a legjobban működő shRNS-t (shRNSa) használtuk fel a lentivirális transzgenézis során.

Annak ellenére, hogy több tanulmány is íródott patkányok egysejtes embróinak sikeres transzgenéziséről lentivírus szubzonális injekciójával [55;56], sajnálatos módon a mi esetünkben ez a metodika nem volt eredményes.

Másrészről, mivel az shRNSa támadáspontja mind a patkány, mind pedig az egér TRPV1 mRNS-én megegyezik, ezért a vele elkészített vírusokat fel tudtuk használni az egerek esetében is. A transzgenézis hatékonysága (~12%) alulmaradt a várható képest (80%; [45]), de még mindig a többszöröse volt, mint amit a pronukleáris injekciózással el lehet érni (~2%; [57]). 5 alapító egér adott pozitív genomiális GFP-PCR eredményt, de közülük csak kettő mutatott látható GFP fluoreszcenciát (#4-es és #11-es alapítók). A provírusok nem aktív kromatinba történő beépülése lehet az oka annak, hogy egyes állatokban a GFP nem expresszálódott. Az alapító állatok utódai között (F1 generáció) több transzgenikus is volt, amelyek GFP-PCR-ra és GFP fluoreszcenciára is pozitívást és a kapszaicinnal kiváltott szemtörlés tesztben erősen csökkent érzékenységet mutattak. Ez megerősítést adott abban, hogy a lentivirussal bejuttatott shRNSa konstrukció a csírvonalba is bejutott, és így képes öröklődni. A továbbiakban kiválasztottuk az F1 generáció kapszaicinre legkevésbé érzékeny egyedét (#10), hogy továbbszaporításával megalapozzuk a transzgenikus

egér törzset (tg+). Meghatároztuk LM-PCR-ral, hogy ebben a vonalban a lentivirális vektor egyetlen kópiában épült be a genomba.

A tg+ egerek a kapszaicinnel indukált szemtörlés tesztben csökkent érzékenységet mutattak (1-5 törlés). Ez annak lehet köszönhető, hogy van olyan mRNS, amely elkerülve az RNS interferenciát képes egy minimális receptorexpressziót eredményezni. Meghatároztuk qPCR segítségével a TRPV1 mRNS mennyiségét és azt találtuk, hogy a tg+ egerekben ez az érték kb. 8% a tg- egerekhez viszonyítva. Direkt módon nem tudtuk kimutatni a receptor fehérje jelenlétét, de az intracelluláris Ca^{2+} -mérésekre alapozva, durva számítások alapján kisebb, mint 5%-ra becsüljük azt. Annak ellenére, hogy lehet valamennyi minimális maradék receptor expresszió a tg+ egerekben, azok TRPV1 receptor hiányos fenotípust mutattak *in vitro*, ahol egyetlen egy TRG neuron sem válaszolt kapszaicin izgatásra, és *in vivo* is, ahol a talpban kiváltott nocifenzív tesztben és a fülön előidézett neurogén gyulladós tesztben is a kapszaicin érzékelésének a hiányát láttuk.

A tg+ egerek hőszabályozását is vizsgáltuk. A TRPV1 csatorna nagyarányú csökkenését jelzi az is, hogy az i.p. beadott RTX nem váltott ki a tg+ állatokban hipotermiát, és a farokban sem idézett elő vazodilatációt. Továbbá, hasonlóan a *Trpv1* KO egerekhez [26;58], a tg+ egereknél sem szobahőmérsékleten, sem pedig hőnek kitéve nem figyeltünk meg hipertermiát. Ezek az eredmények nem támogatják azt az elképzelést, hogy a TRPV1 receptornak van egy tónusos, abdominális preferenciájú hatása [26;59] a testhőmérséklet szabályozására.

Próbáltuk TRG sejtekből qPCR-ral meghatározni a TRPV3 mRNS szintjét [60], de az a tg+ és tg- állatokban is a detektálási határ alatt volt, amely eltér a mások által előállított tg+ egerekben mértektől [61].

Állatainkban még megvizsgáltuk a TRPA1 receptor expresszióját és működését is izolált TRG neuronokon és mustárolaj-kiváltotta gyulladós modellben. Mivel a tg+ egerekben sem a TRPA1 mRNS szint, sem a mustárolajra reagáló TRG neuronok száma, sem pedig a neurogén gyulladós modellben a TRPA1 iránti érzékenység nem változott, elmondhatjuk, hogy a TRPV1 knockdown hatás szelektív és nem befolyásolja a TRPA1 receptort. Ugyanakkor a vad típusú egerekből származó érzőidegekben a mustárolajjal kiváltott áram nagyobb, mint a *Trpv1* KO egerekben, és a TRPV1 receptor hiánya esetén a mustárolajra válaszoló sejtek száma kevesebb [62;63]. Tehát lehetséges, hogy létezik egy transzlációs vagy poszt-transzlációs szabályozás a két receptor között, és a TRPV1 knockdown egerekben a kis mennyiségben megmaradó TRPV1 receptorok elegendőek, hogy stabilizálják vagy szabályozzák a TRPA1 receptort a plazmamembránban.

Sajnálatos módon nem tudtunk homozigóta tg+ egyedeket előállítani, mindig csak heterozigóta tg+, vagy tg- utódokat kaptunk. Mások kimutatták, hogy az U6 irányította shRNS overexpresszió interferálhat a sejtben expresszálandó miRNS-ekkel, ami akár letális is lehet [64]. Ezért úgy sejtjük, hogy a homozigótákban lévő két kópia U6-shRNS konstrukció már túl sok shRNS-t termel, és ez eredményezi az életképtelen homozigóta embriókat.

A dolgozatomban ebben a fejezetében bemutattam, hogy hogyan hoztunk létre egy jól működő TRPV1 knockdown transzgenikus egértörzset lentivirális transzgenézissel. A továbbiakban még tervezzük, hogy a törzssel kapcsolatos felmerülő kérdéseket megválaszoljuk, valamint, hogy segítségükkel bővítsük eddigi tudásunkat a TRPV1 receptorról.

II. A LIPID RAFT KÁROSÍTÁSÁNAK HATÁSAI TRPV1 ÉS TRPA1 CSATORNÁK AKTIVITÁSÁRA

II.1 BEVEZETÉS

A lipid raftok szerkezete. A sejtmembrán a korábban leírt Singer-Nicholson féle modelltől eltérően nem egységes, hanem rendezettebb struktúrával rendelkező ún. lipid raftok helyezkednek el benne [65]. A lipid raftok gazdagabbak koleszterolban, szfingolipidekben (glikoszfingolipidek (GSL-ek) és szfingomielin (SM)) és telített glicerofosfolipidekben (GPL) a nem lipid raft régiókhoz képest. A kettős lipid rétegben ezeknek az alkotóelemeknek az elhelyezkedése nem szimmetrikus. A külső rétegben inkább szfingolipidek helyezkednek el, amíg a belső rétegben több telített GPL található. A koleszterol mindkét rétegben egyenlő arányban van jelen és szerepe egyrészt a szfingolipidek „feje” közti rész kitöltése, másrészt a zsírsavláncok kikötése a szemben lévő réteghez. A lipid raftok fehérjéket is tartalmaznak a külső vagy a belső réteghez kihorgonyozva, esetleg transzmembrán domének révén a membránon átnyúlva [65;66].

Lipid raftok a receptorkutatásban. Több lehetőség is van arra, hogy a lipid raftok szerepét a receptorok funkciójában megvizsgáljuk: a *metil-β-cyclodextrin* ($M_{\beta}CD$) megnöveli a koleszterol oldékonyságát és eltávolítja azt a membránból [67], a *szfingomielináz* ($SMáz$) hidrolizálja a SM-t [68], a *myriocin* gátolja a SM bioszintézisét [69], valamint a *D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol* (*D-PDMP*) gátolja a GSL-ek szintézisét [67].

Eddig csak kevés és ellentmondó eredményeket hozó kísérlet zajlott annak érdekében, hogy a TRPV1 csatorna működése és a lipid raftok közti esetleges kapcsolatot feltárják. DRG neuronokban $M_{\beta}CD$ -vel kiváltott koleszterol depléció a hővel indukált áramot nem befolyásolta, amíg a kapszaicin-aktivált áram amplitudója szignifikánsan csökkent [70]. Ezzel szemben, korábban közöltek szerint, a koleszterol depléció nem befolyásolta a TRPV1 működését patkány C6 glioma sejteken [71].

II.2 CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki annak meghatározását, hogy a lipid raftban történő változtatások képesek-e a TRPV1 és TRPA1 csatornák aktiválhatóságát módosítani:

1. Meg akartuk vizsgálni TRPV1-transzfektált sejt vonalon, hogy a koleszterol, SM és GSL-ek depléciója hogyan változtatja meg a csatornán beáramló Ca^{2+} mennyiségét különböző vanilloid és nem vanilloid aktivátorok alkalmazása esetén.
2. Ugyanez volt a célunk TRPV1-et természetesen expresszáló érző neuronokon is.
3. Végül a TRPA1 különböző agonistákkal való aktiválhatóságának változását akartuk megmérni SM depléciót követően érző neuronokon.

II.3 VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

TRPV1-et expresszáló CHO sejteken végzett kísérletek: TRPV1 receptort stabilan expresszáló CHO sejteket előkezeltünk $M_{\beta}CD$ -vel 30, SMázzal 60 percig, myriocinnal és D-PDMP-vel egy éjszakán keresztül. A kontrollként szolgáló sejteket hasonlóan kezeltük elő, de csak az anyagnak megfelelő oldószerrel. Majd a sejteket kalcium-

mentes Hank's oldattal (pH 7.4) mostuk, és inkubáltuk a receptor egyik agonistájával (100 nM kapszaicin, 3 nM RTX, 10 μ M AEA, 10 μ M OLDA) és 200 μ Ci/ml $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóppal. Amikor pH 5.5-tel aktiváltuk a receptort, először pH 7.4, majd pH 2.05 Hank's oldatot tettünk a sejteket tartalmazó lemezre, hogy a kívánt pH értéket elérjük. Az aktivációt követően a sejteket többször ECS-sel mostuk, a visszamaradt puffert elpárologtattuk, 0,1%-os SDS-sel a sejtekben felgyülemlt izotópot felszabadítottuk és szcintillációs folyadékba téve szcintillációs mérővel a radioaktivitást meghatároztuk. A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel értékét %-ban adtuk meg az oldószeres kontrollhoz (100%) viszonyítva.

TRG neuronokon végzett kísérletek: A TRG neuronokból álló sejt kultúrák elkészítése és a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivitásának mérése fura-2 mikrofluorimetriával az I/3 fejezetben leírtak alapján történt.

A TRG neuronokat különböző koncentrációjú $\text{M}\beta\text{CD}$ -vel 30 percig, SMázzal, ceramiddal, vagy szfingozinnal 60 percig, myriocinnal, vagy D-PDMP-vel egy éjszakán keresztül inkubáltuk standard körülmények között. A kontroll esetében a sejtek az adott vegyület oldószerével volt előkezelve.

A fura-2-AM festést követően a TRPV1 receptor aktivációja egy 10 mp-es kapszaicin (330 nM) vagy RTX (3 nM) adással történt. A TRPA1 receptort mustárolajjal (200 μ M) vagy formalinnal (0,01%) aktiváltuk 30 mp-ig. A belső raktárakból történő Ca^{2+} felszabaduláshoz a sejteket thapsigarginnal (200 nM) kezeltük 30 mp-ig. A feszültség-függő csatornák aktiválása 3 mp-es KCl (50 mM) adással történt.

Azokat a sejteket tekintettük receptort expresszáló sejteknek, amelyek ΔR értéke az aktivációt követően $>0,1$. Az aktivált és nem aktivált sejtek arányát %-ban adtuk meg és az oldószerrel kezelt kontrollhoz viszonyítottuk.

II.4 EREDMÉNYEK

A koleszterol-kivonás hatása a TRPV1 receptoron

1, 3 és 10 mM $\text{M}\beta\text{CD}$ előkezelés után TRPV1-et expresszáló CHO sejtek kapszaicinre adott válasza dózistól függően csökkent $81,7 \pm 8,8$, $72,7 \pm 19,4$ és $57,5 \pm 16,6\%$ -ra. Hasonló szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető OLDA aktivációt követően is (3 mM-os előkezelés után $56,9 \pm 17,6\%$ és 10 mM-os után $56 \pm 22,7\%$). Más TRPV1 agonisták, mint az RTX, az endogén ligand AEA és az 5.5 pH által kiváltott aktivációra a hasonló előkezelés nem gyakorolt hatást.

TRG neuronok esetében az előkezelés nélküli kontrollokon a kapszaicinnal aktivált reagáló sejtek aránya 62% (93-ból 58) volt, amely 3 és 10 mM $\text{M}\beta\text{CD}$ előkezelést követően 39%-ra (38-ből 15) és 10,5%-ra (76-ből 8) csökkent. RTX aktiváció esetén a kontroll érték 57% (70-ből 40) volt és 22%-ra (77-ből 17) valamint 15%-ra (80-ből 12) csökkent.

A SM-károsítás hatása a TRPV1 és TRPA1 csatornákon

Megváltozott TRPV1 aktiváció SM-emésztés után: TRPV1-et expresszáló CHO sejteken a 1 és 10 mM SMáz előkezelés szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-kiváltotta $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt $42,3 \pm 15,8$ és $19 \pm 7,7\%$ -ra. A hasonló előkezelés az RTX-kiváltotta aktivációra nem gyakorolt hatást. Továbbá a kapszaicin-indukálta $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel 10 és 20 μ M D-PDMP előkezelést követően a kontroll érték 51,3 és 23,5%-ára csökkent. Ezek az előkezelések az RTX aktivációs hatását is csökkentették (68 és 38%-ra). Hasonló aktivitás csökkenést mutattak az 5 és 50 nM myriocinnal

előkezelt sejtek a kapszaicin aktivációt követően (51 és 22%). Az 50 nM-os myriocin előkezelés az RTX által kiváltott aktivációt is csökkentette 47%-ra.

TRG neuronok esetében a 10 mUN-os SMáz előkezelés a kapszaicinnal aktivált sejtek arányát 65%-ról (155-ből 101) 56%-ra (75-ből 42), a 30 mUN-os SMáz előkezelés szignifikánsan 48%-ra (75-ből 36) csökkentette. Az RTX esetében a válaszoló sejtek aránya a 10 és 30 mUN-os SMáz előkezelést követően a kontroll 60,3%-ról (116-ből 70) 45%-ra (33-ből 15) és 34%-ra (32-ből 11) változott. A magasabb koncentrációjú D-PDMP (50 μ M) előkezelés a kapszaicin (22%; 55-ből 12) és RTX (11%; 47-ből 5) aktivációt is szignifikánsan csökkentette. Végül a magasabb koncentrációjú myriocin (200 nM) előkezelés ugyancsak szignifikáns csökkenést idézett elő mindkét agonista esetében: kapszaicin 30% (56-ből 17), RTX 40% (60-ből 24).

SMáz előkezelés hatása TRPA1 aktivációjára: SMáz előkezelés nélkül a mustárolajra válaszoló TRG neuronok aránya 26,8% (379-ből 98) volt. Ez az érték 10 és 30 mUN-os SMáz előkezeléssel szignifikánsan csökkent 16,9 (148-ből 25) és 4.1%-ra (97-ből 4). Formalinos aktiváció esetén a kontroll sejtek 39,7%-a (88-ből 35) aktiválódott, ami 10 mUN SMáz előkezelés után nem, de 30 mUN SMáz előkezelés után szignifikánsan csökkent 26,3%-ra (80-ből 21).

SMáz előkezelés nem befolyásolta a belső membránokat, sem a feszültség-függő Ca^{2+} csatornákat: Thapsigargin hatására, amely a belső raktárakban lévő Ca^{2+} -ot szabadítja fel [72], az előkezeletlen TRG neuronok 48,1%-ában (154-ből 74) mértünk Ca-jelet. Ez az érték nem változott szignifikánsan sem a 10 mUN (44,3%; 192-ből 85), sem pedig a 30 mUN (44,9%; 107-ből 48) SMáz előkezelést követően. Ez jól mutatja, hogy az SMáz a belső membránokat nem károsította.

KCl hatására a kontroll lemezekon a TRG neuronok 96%-a (76-ből 73) mutatott aktivációt és ez az érték nem változott 30 mUN SMáz előkezelés (95,2%; 83-ből 79) hatására sem. Hasonlóképpen az SMáz előkezelés a mért átlagos fluoreszcencia csúcstértékét sem változtatta meg a KCl-kiváltott indukció során, ami a kontroll lemezekon $\Delta R=1,107 \pm 0,496$ volt, míg az SMáz előkezelt lemezekon $\Delta R=1,143 \pm 0,506$ volt. Ezzel szemben ez az érték az SMáz előkezelésnek köszönhetően szignifikánsan csökkent $1,066 \pm 0,618$ -ról $0,403 \pm 0,229$ -re a TRPV1 kapszaicinnal történő izgatása és $0,714 \pm 0,316$ -ról $0,313 \pm 0,120$ -ra a TRPA1 mustárolajjal való aktiválása során.

Sem a ceramid, sem a szfingozin nem befolyásolta a TRPV1 receptor aktivitását: TRPV1-et expresszáló CHO sejteket az SMáz enzim termékeivel, 1 és 10 μ M ceramiddal vagy szfingozinnal előkezelünk és a TRPV1-et kapszaicinnal aktiváltuk. Nem találtunk receptor aktivitás csökkenést sem az 1 és 10 μ M ceramid ($120 \pm 31,2$ és $126 \pm 33,9\%$), sem pedig az 1 és 10 μ M szfingozin ($117 \pm 29,8$ és $115 \pm 36,7\%$) előkezelést követően.

M β CD és SMáz együttes alkalmazása megváltoztatta a TRPV1 receptor aktivitását

Amikor TRG neuronokat együttesen előkezelünk alacsony, önmagában nem hatásos koncentrációjú M β CD-vel (1 mM) és SMáz-zal (0,1 mUN), nem találtunk a kapszaicinre vagy RTX-re szignifikánsan kisebb választ.

Viszont a TRPV1-et expresszáló CHO sejtek esetében a kombinált előkezelés egy jelentős gátlást idézett elő a kapszaicinnal (14,5%) és az RTX-nél (18,7%) is.

II.5 MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Dolgozatomban ebben a részben azt vizsgáltuk, hogy a lipid raft fő komponenseinek, mint koleszterol, SM és GSL-ek, depléciójával előidézett sejtmembrán károsítás hogyan hat a TRPV1 és TRPA1 kation csatornák nyithatósági tulajdonságaira.

A koleszterol M_{β} CD-vel előidézett depléciója a TRPV1-et expresszáló CHO sejteken gátolta a kapszaicin és OLDA által kiváltott kalcium választ, de az RTX, AEA és az alacsony pH általi válaszokat nem. Mivel a proton mediálta csatorna aktivációért és nyitáért a pórust alkotó hurok külső részén elhelyezkedő Glu 648 és Glu 600 aminosavak a felelősek [73], ezért nem meglepő, hogy a lipid raft károsítás nem befolyásolta ezt a kapufunkciót. A kapszaicin és RTX kapunyitó tulajdonságai közti különbségek a koleszterol és SM depléció után ezen agonisták különböző allosztérikus kötőhelyeivel magyarázhatók. Ezek az agonisták intracellulárisan kötődnek a receptorhoz. A vanilloid gyök H-kötő tulajdonsága nélkülözhetetlen a kapszaicin hatásában, de az RTX-ében nem. Az RTX esetében talán a 3α -keto egységgel ellátott nagy hidrofób diterpén váz alapvető [74] és elegendő, hogy egy overexpresszált sejt vonalon a receptorhoz kötődjön még akkor is, ha a lipid raftból a koleszterol, vagy SM depletálva van. Ezzel szemben a receptort természetesen expresszáló TRG sejteken a koleszterol és SM depléció hasonló hatást fejtett ki a kapszaicin és RTX hatására. A különbségnek részben az lehet az oka, hogy különbség van az ioncsatornát körbevevő lipid raftban az overexpresszált és a természetesen expresszáló sejtek között. Mindazonáltal, az M_{β} CD és SMáz együttes adásából fakadó eredmények, ahol csak a TRPV1-et overexpresszált sejt vonalon volt csökkenés és a TRG-ken nem, abból is eredhetnek, hogy a TRPV1 és más TRP csatornák között interakció van [62].

A lipid raft SMázzal történt előkezelése mindkét TRPA1 agonista hatását befolyásolta, de a feszültség-függő Ca^{2+} csatornák vagy a thapsigargin hatását nem. A ceramid és szfingozin előkezelés sem befolyásolta a TRPV1 aktivitását. Együttesen ezen eredményekből levonhatjuk, hogy a sejtmembránban lévő lipid raftok fontosabb szerepet játszhatnak a ligand-függő TRP csatornák aktivációjában, mint azt eddig gondolták. Továbbá ezek az eredmények megerősítik az SMáz előkezelés, mint alkalmas farmakológiai módszertani eszköz megbízhatóságát is.

További kísérletekre van szükség annak tisztázására, hogy az SMáz, SM és GSL-ek bioszintézisét gátló vegyületek hatásai közti különbségek az RTX kötődésével vannak-e kapcsolatban, vagy az utóbbi vegyületek hosszabb expozíciójával, amely jelentősebb eltérést idézhet elő a lipid raftban.

Összegzésképpen elmondható, hogy a lipid raft az eddigi elképzeléseken túl fontosabb szerepet tölthet be a TRP csatornákon ható anyagok aktivációs képességében.

ÖSSZEGZÉS

A doktori értekezésemben olyan új megközelítési módokat mutattam be, amelyekkel többet megtudhatunk a már sokat kutatott TRPV1 receptorról.

A dolgozatomban első felében leírtam, hogy hogyan hoztunk létre lentivírusokkal transzgenikus TRPV1 knockdown állatokat.

Több shRNS és miRNS konstrukciót terveztünk és teszteltünk sejt kultúrákon. A leghatékonyabban működő shRNS-t beépítettük egy lentivirális vektor rendszerbe, amelyből vírusokat állítottunk elő és szubkónális injekcióval patkány és egér egysejtes állapotban lévő embrióiba juttatuk. Az egerek esetében több módon is tudtuk bizonyítani a transzgenézis hatékonyságát, és hogy a kialakult TRPV1 fenotípus egy állandó és öröklődő tulajdonság. Tehát a saját eredményeink alapján csak megerősíteni tudjuk a lentivirális transzgenézis hatékonyságát, és támogatjuk azt a nézetet, hogy az RNSi egy alkalmas módszer lehet a fájdalomkutatásban, mind a validálásban, mind pedig a lehetséges új targetek leírásában. Viszont azt szemelőtt kell tartani, hogy ugyanakkor a fehérjének a hiánya, attól függően, hogy milyen módszerrel lett kiváltva, más mellékhatással bírhat, amit a TRPV1 knockout egerekben a csökkent, a knockdown egerekben a változatlan TRPA1 expressziós szint is jól mutat. Ezért az a személyes véleményem, hogy ezek a technikák nem helyettesíthetők egymással, hanem együttes alkalmazásukkal lehet pontosabb képet alkotni.

A dolgozatom második felében a lipid raft deplécióját, mint új farmakológiai módszert használtuk, hogy a receptort ne önmagában, mint egy „magányos” fehérjét vizsgáljuk, hanem mint egy komplex membránstruktúra elemét. Bemutattuk, hogy a lipid raft képes befolyásolni a TRPV1 és TRPA1 receptorok aktivációját az aktivátorok hozzáférhetőségének megváltoztatásával. Ezek a változások attól is függhetnek, hogy a lipid raft megváltoztatásához milyen anyagot használunk, és hogy milyen receptor-expressziós rendszerben tesszük azt. Eredményeink több bizonyítékot is adnak arra, hogy ez a megközelítési mód egy teljesen új módszer lehet a farmakológiai kutatásokban.

REFERENCIÁK

- [1] Perl ER (1996) Cutaneous polymodal receptors: characteristic and plasticity. *Prog Brain Res* **113**: 21-37.
- [2] Szolcsányi J (1977) A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibers and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol* **73**: 251-259.
- [3] Szolcsányi J (1987) Capsaicin and nociception. *Acta Physiol Hung* **69**: 323-332.
- [4] Maggi CA (1995) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* **45**: 1-98.
- [5] Szolcsányi J (1996) Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog Brain Res* **113**: 343-359.
- [6] Jancsó N, Jancsó-Gábor A, and Szolcsányi J (1967) Direkt evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* **31**: 138-151.
- [7a] Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, and Pintér E (1998) Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibers of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* **123**: 936-942.
- [7b] Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, and Németh J (1998) Systemic anti-inflammatory effect induced by counter irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* **125**: 916-922.
- [8] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.
- [9] Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, and Davis JB (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 183-191.
- [10] Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- [11] Tominaga M, Caterina MJ, Malmborg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531-543.
- [12] Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, and Treanor JJS (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* **279**: 20283-20295.
- [13] Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, and Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8400-8405.

- [14] Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, and Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457.
- [15] Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, and Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6155-6160.
- [16] Holzer P (2008) The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br J Pharmacol* **155**(8): 1145-1162.
- [17] Jordt SE, Tominaga M, and Julius D (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8134-8139.
- [18] Bevan S and Szolcsányi J (1990) Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and application. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 330-333.
- [19] Balla Zs, Szőke É, Czéh G, and Szolcsányi J (2001) Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurons in cell culture and slice preparations. *Acta Physiol Hung* **88**: 173-196.
- [20] Cortright DN and Szallasi A (2004) Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* **271**: 1814-1819.
- [21] Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, and Basbaum AI (2011) Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* **31**(13): 5067-5077.
- [22a] Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, and Jancsó N (1970). Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *J Physiology* **206**: 495-507.
- [22b] Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, and Jancsó N (1970). Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiology* **208**: 449-459.
- [23] Szolcsányi J, Joó F, and Jancsó-Gábor A (1971) Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermoreceptors in rats. *Nature* **229**: 116-117.
- [24] Woods AJ, Stock MJ, Gupta AN, Wong TTL, and Andrews PLR (1994) Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the rat. *Eur J Pharmacol* **264**: 125-133.
- [25] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, and Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**: 306-313.
- [26] Garami A, Pakai E, Oliveira DL, Steiner AA, Wanner SP, Almeida MC, Lesnikov VA, Gavva NR, and Romanovsky AA (2011) Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. *J Neurosci* **31**(5): 1721-1733.
- [27] Khairatkar-Joshi N and Szallasi A (2009) TRPV1 antagonists: the challenges for therapeutic targeting. *Trends Mol Med* **15**(1): 14-22.
- [28] Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, Burmeister JJ, Oliveira DL, Roberts JL, Bannon AW, Norman MH, Louis JC, Treanor JJ, Gavva NR, and Romanovsky AA (2007) Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* **27**(28): 7459-7468.
- [29] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, and Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**: 819-829.
- [30] McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, and Fanger CM (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(33): 13525-13530.
- [31] Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, and Kobayashi S (2007) Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* **1160**: 39-46.
- [32] Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, and Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**(6): 849-857.
- [33] Okamura K and Lai EC (2008) Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 673-678.
- [34] Dykxhoorn DM, Novina CD, and Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Rev Mol Cell Biol* **4**: 457-467
- [35] Kurreck J (2006) siRNA efficiency: structure or sequence—that is the question. *J Biomed Biotechnol* 1-7.
- [36] Carthew RW and Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655.
- [37] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, and Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**(6956): 415-419.
- [38] Kim JK, Gabel HW, Kamath RS, Tewari M, Pasquinelli A, Rual JF, Kennedy S, Dybbs M, Bertin N, Kaplan JM, Vidal M, and Ruvkun G (2005) Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science* **308**: 1164-1167.
- [39] Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2): 281-297.
- [40] Aleman LM, Doench J, and Sharp PA (2007) Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* **13**: 385-395.
- [41] Manjunath N, Wu H, Subramanya S, and Shankar P (2009) Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* **61**(9): 732-745.
- [42] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, and Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**(12): 9873-9880.

- [43] Singer O and Verma IM (2008) Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* **8(6)**: 483-488.
- [44] Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, and Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**: 868-872.
- [45] Pfeifer A (2004) Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* **13**: 513-522.
- [46] Dann CT (2007) New technology for an old favorite: lentiviral transgenesis and RNAi in rats. *Transgenic Res* **16**: 571-580.
- [47] Sándor Z, Varga A, Horváth P, Nagy B, and Szolcsányi J (2005) Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell Mol Biol Lett* **10**: 499-514.
- [48] Christoph T, Grünweller A, Mika J, Schafer MKH, Wade EJ, Weihe E, Erdmann VA, Frank R, Gillen C, and Kurreck J (2006) Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 238-243.
- [49] Szőke É, Balla Zs, Csernoch L, Czéh G, and Szolcsányi J (2000) Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport* **11**: 1949-1952.
- [50] Ritchie WA, Neil C, King T, and Whitelaw CBA (2007) Transgenic embryos and mice produced from low titer lentiviral vectors. *Transgenic Res* **16**: 661-664.
- [51] Bryda EC, Pearson M, Agca Y, and Bauer BA (2006) Method for detection and identification of multiple chromosomal integration sites in transgenic animals created with lentivirus. *BioTechniques* **41**: 715-719.
- [52] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, and Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**: 635-637.
- [53] Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, and Turner DL (2006) Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acid Res* **34**: e53. doi: 10.1093/nar/gkl143.
- [54] Boudreau RL, Monteys AM, and Davidson BL (2008) Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA* **14**: 1834-1844.
- [55] Dann CT, Alvarado AL, Hammer RE, and Garbers DL (2006) Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11246-11251.
- [56] Michalkiewicz M, Michalkiewicz T, Geurts AM, Roman RJ, Slocum GR, Singer O, Weihrauch D, Greene AS, Kaldunski M, Verma IM, Jacob HJ, and Cowley AW Jr (2007) Efficient transgenic rat production by a lentiviral vector. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H881-H894.
- [57] Wall RJ (1996) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* **45**: 57-68. Welch JM, Simon SA, and Reinhart PH (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13889-13894.
- [58] Szelényi Z, Hummel Z, Szolcsányi J, and Davis JB (2004) Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. *19(5)*: 1421-1424.
- [59] Romanovsky AJ, Almeida MC, Garami A, Steiner AA, Norman MH, Morrison SH, Nakamura K, Burmeister JJ, and Nucci TB (2009) The Transient Receptor Potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* **61**: 228-261.
- [60] Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, and Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418(6894)**: 181-186.
- [61] Christoph T, Bahrenberg G, De Vry J, Englberger W, Erdmann VA, Frech M, Kögel B, Röhl T, Schiene K, Schröder W, Seibler J, and Kurreck J (2008) Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. *Mol Cell Neurosci* **37**: 579-589.
- [62] Salas MM, Hargreaves KM, and Akopian AN (2009) TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* **29(8)**: 1568-1578.
- [63] Staruschenko A, Jeske NA, and Akopian AN (2010) Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biologic Chemistry* **285(20)**: 15167-15177.
- [64] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, and Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541.
- [65] Pike LJ (2009) The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* **50**: S323-S328.
- [66] Mishra S and Joshi PG (2007) Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem* **103**: 135-142.
- [67] Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, and Pitha J (1989) Differential effects of alpha -, beta - and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* **186**: 17-22.
- [68] Kobayashi T, Takahashi M, Nagatsuka Y, and Hirabayashi Y (2006) Lipid Rafts: New tools and a new component. *Biol Pharm Bull* **29**: 1526-1531.
- [69] Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, and Kawasaki T (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/Myriocin. *Biochem* **211**: 396-403.
- [70] Liu M, Huang W, Wu D, and Priestley JV (2006) TRPV1, but not P2X3, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur J Neurosci* **24**: 1-6.
- [71] Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agrò A, and Maccarrone M (2005) Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells: implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**: 12212-12220.
- [72] Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, and Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2466-2470.

[73] Caterina MJ and Park U (2006) TRPV1, A polymodal sensor in the nociceptor terminal. in: *The nociceptive membrane* (Oh U ed) pp114–150, San Diego: Academic Press.

[74] Szolcsányi J (2008) Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. *British J Pharmacol* **155**: 1142-1144.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Sándor Zoltánnak, hogy bevezetett a molekuláris biológia rejtelmes világába, továbbá, hogy egész munkám során mindvégig támogatott. Köszönöm Szőke Évának, hogy hozzájárult munkámhoz és a vidám légkör megteremtéséhez az évek során. Nem mellékesen köszönöm mindkettőjüknek, hogy mint szobatársak képesek voltak elviselni.

Hálás köszönetem Szolcsányi János Professor Úrnak, hogy lehetőséget adott, hogy az ő iskolájában dolgozhassak és tanulhassak. Külön köszönöm, hogy mindvégig támogatott és felbecsülhetetlen tanácsokat adott, hogy a munkámat minél professzionálisabban végezhessem.

Köszönöm Pintér Erika Professor Asszonynak, a Neurofarmakológia PhD program vezetőjének és Barthó Loránd Professor Úrnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy az intézetben tölthettem PhD éveimet.

Külön köszönet illeti Búzasi Ádámné Annát, a nélkülözhetetlen és kitűnő technikai asszisztenciáért.

Köszönöm Bölcskei Katának az *in vivo* kísérletekben nyújtott segítségét, hasonlóan Dézsi Lászlónak és Ömböliné Dórinak a segítőkész munkájukat.

Szeretném megköszönni Kvell Krisztiánnak, Bősze Zsuzsának, Bender Balázsnak, Likó Istvánnak, és Szántó Rékának az együttműködésüket és nélkülözhetetlen munkájukat, amivel a doktori értekezésem létrejöttéhez hozzájárultak.

Sok köszönet illeti a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi munkatársát, az összes kutatót, PhD hallgatót, az asszisztenseket és állatgondozókat, akik különböző módon, de hozzájárultak a munkámhoz.

Végül nem lehetek elég hálás a szüleimnek és családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak és bátorítottak, valamint menyasszonyomnak a türelmével és szeretetével adott támogatásért.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapját képező publikációk:

Tóth DM, Szőke É, Bölcskei K, Kvell K, Bender B, Bősze Z, Szolcsányi J, and Sándor Z (2011) Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2589-2601, DOI: 10.1007/s00018-010-0569-2, (IF: 7.047)

Szőke É, Börzsei R, **Tóth DM**, Lengl O, Helyes Zs, Sándor Z, and Szolcsányi J (2010) Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *Eur J Pharmacol* **628**: 67-74, (IF: 2.737; FC:3)

Cumulative Impactfactor: **9.784**

Egyéb eredeti közlemények:

Helyes Zs, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi Á, Keszthelyi D, Szőke É, **Tóth DM**, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, Markovics A, and Szolcsányi J (2009) Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Nat Acad Sci USA* **106(31)**: 13088-13093, (IF: 9.432)

Helyes Zs, Sándor K, Borbély É, Tékus V, Pintér E, Elekes K, **Tóth DM**, Szolcsányi J, and McDougall JJ (2010) Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 receptors in Protease-Activated Receptor 2-induced joint inflammation and nociception. *Eur J Pain* **14(4)**: 351-358, (IF: 3.819; FC: 2)

Cumulative Impactfactor: **13.251**

Az értekezéshez kapcsolódó prezentációk:

Sándor Z, Szőke É, **Tóth DM**; TRPV1 receptor expressziójának gátlása RNS interferenciával. *Richter Gedeon Kutatási Fórum*, Dobogókő, Magyarország, 2007 (poszter).

Szőke É, Börzsei R, **Tóth DM**, Bagoly T, Helyes Zs, Sándor Z, Szolcsányi J; A lipid raft károsítás hatása a TRPV1 receptor aktivációjára érző idegsejteken, sejtvonalon és érző idegvégződéseken. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Magyarország, 2008 (poszter).

Tóth DM, Szőke É, Bölcskei K, Tékus V, Dézsi L, Sándor Z, Szolcsányi J; Patkány TRPV1 receptor expressziójának gátlása RNS interferenciával. *Membrán-transzport Konferencia*, Sümeg, Magyarország, 2008 (poszter).

Börzsei R, Szőke É, **Tóth DM**, Bagoly T, Helyes Zs, Sándor Z, Szolcsányi J; Effect of lipid raft disruption by methyl- β -cyclodextrin on TRPV1 receptor activation in distinct experimental systems. *European Opioid Conference-European Neuropeptide Club*, Ferrara, Olaszország, 2008 (poszter).

Tóth DM, Szőke É, Bölcskei K, Valéria Tékus V, Dézsi L, Sándor Z, Szolcsányi J; Inhibition of the expression of the rat TRPV1 receptor by RNA interference. *European Opioid Conference-European Neuropeptide Club*, Ferrara, Olaszország, 2008 (poszter).

Sándor Z, **Tóth DM**, Szőke É, Bölcskei K, Tékus V, Dézsi L, Szolcsányi J; RNS interferencia alkalmazása a TRPV1 receptor kutatásában. *A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a MÉT LXXII. Vándorgyűlése*, Debrecen, Magyarország, 2008 (előadás).

Szőke É, Börzsei R, **Tóth DM**, Bagoly T, Helyes Zs, Sándor Z, Szolcsányi J; Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation on sensory neurones, transfected cell line and sensory nerve endings. *A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a MÉT LXXII. Vándorgyűlése*, Debrecen, Magyarország, 2008 (poszter). **absztrakt:** *Acta Physiol Hung* 2009, **96:(1):** p.137 (IF: 0.75).

Tóth DM, Szőke É, Bölcskei K, Tékus V, Dézsi L, Sándor Z, Szolcsányi J; Inhibition of the expression of the rat TRPV1 receptor by RNA interference. *A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a MÉT LXXII. Vándorgyűlése*, Debrecen, Magyarország, 2008 (poszter). **absztrakt:** *Acta Physiol Hung* 2009, **96:(1):** p.138 (IF: 0.75).

Szőke É, Börzsei R, **Tóth DM**, Lengl O, Helyes Zs, Sándor Z, Szolcsányi J; Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *MITT XII. Konferenciája*, Budapest, Magyarország, 2009 (poszter). **absztrakt:** *Frontiers in Neuroscience*.

Tóth DM; TRPV1 knockdown transzgenikus egér előállítása. *Biológus Doktoranduszok Konferenciája*, Pécs, Magyarország, 2009 (előadás).

Sándor Z, **Tóth DM**, Szőke É, Bölcskei K, Kvell K, Bender B, Bősze Zs, Szolcsányi J; Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice. *7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference*, Pécs, Magyarország, 2010 (előadás) **absztrakt:** *Frontiers in Neuroptides*.

Bender B, **Tóth DM**, Kvell K, Bősze Zs, Szolcsányi J, Sándor Z; Creation and characterization of TRPV1-shRNA and GFP transgenic mice with lentiviral transgenesis. *9th Transgenic Technology Meeting (TT2010)*, Berlin, Németország, 2010 (poszter). **absztrakt:** *Transgenic Res* 2010, **19:(2):** p.37 (IF: 2.569).

Szőke É, **Tóth DM**, Kvell K, Bender B, Bősze Zs, Szolcsányi J, Zoltán Sándor; Creating TRPV1 knock down mice by lentiviral transgenesis. *The 16th World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter) **absztrakt:** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010, **107(suppl 1)**, p.600 (IF: 2.308).

Tóth DM, Sándor Z; TRPV1 knockdown transzgenikus egértörzs előállítása. *Richter Gedeon Kutatási Fórum*, Visegrád, Magyarország, 2010 (előadás).

Szöke É, **Tóth DM**, Helyes Zs, Sándor Z, and Szolcsányi J; Effect of sphingomyelinase on TRP ion channel activation of trigeminal sensory neurons and transfected cells. *The Joint Meeting of Summer Neuropeptide Conference and The European Neuropeptide Club (ENC) Meeting*, Boston, USA, 2011 (poszter) **absztrakt:** *Frontiers in Neuropeptides*.

Szolcsányi J, Szöke É, **Tóth DM**, and Sándor Z; Effect of sphingomyelinase on TRP ion channel activation of trigeminal sensory neurons and transfected cells. *FAMÉ*, Pécs, Magyarország, 2011 (előadás) **absztrakt:** *Frontiers in Acta Physiol*.

Szolcsányi J, Sándor Z, **Tóth DM**, and Szöke É; Role of sphingomyelin and lipid raft in Ca²⁺-gating of the TRP channels. *EFIC Pain Congress*, Hamburg, Németország, 2011 (poszter) **absztrakt:** *European Journal of Pain* 2011, **5**(suppl 1), p.103 (IF: 3.819).

Egyéb prezentációk:

Tékus V, Bölcskei K, **Tóth DM**, Dézsi L, Szolcsányi J; Az SB705498 TRPV1 receptor antagonist vegyület hatásai patkány in vivo nociceptív modellekben. *Magyar Fájdalom Társaság Kongresszusa*, Kecskemét, Magyarország, 2007 (poszter).

Helyes Zs, Sándor K, McDougall JJ, **Tóth DM**, Pintér E, Szolcsányi J; A proteináz-aktivált receptor 2 (PAR2) gyulladás- és fájdalomkeltő szerepének és mechanizmusának állatkísérletes vizsgálata térdízületben és talpban. *Magyar Fájdalom Társaság Kongresszusa*, Budapest, Magyarország, 2008 (előadás).

Sándor K, McDougall JJ, **Tóth DM**, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs; Inflammation and nociceptive actions of the PAR₂-activating peptide in the rat knee joint and mouse paw. *European Opioid Conference – European Neuropeptide Club Joint Meeting*, Ferrara, Olaszország, 2008 (poszter).

Sándor K, McDougall JJ, **Tóth DM**, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs; Inflammatory and nociceptive actions of the PAR₂-activating peptide in the rat knee joint and mouse paw. *Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológus Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése*, Debrecen, Magyarország, 2008 (poszter) **absztrakt:** *Acta Physiol Hung* 2009, **96(1)**: p.121-122 (IF: 0.75).

Helyes Zs, Sándor K, Tékus V, Pintér E, Elekes K, **Tóth DM**, Szolcsányi J, McDougall JJ; Involvement of TRPV1 receptors in protease-activated receptor 2-induced joint inflammation and nociception. *Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and Summer Neuropeptide Conference*, Salzburg, Ausztria, 2009 (előadás). **absztrakt:** *Neuropeptides* 2009, **43(5)**: p.451 (IF: 2.438).

Sándor K, Tékus V, Pintér E, Elekes K, **Tóth DM**, Szolcsányi J, McDougall JJ, Helyes Zs; Involvement of Transient receptor potential vanilloid 1 receptors in proteinase-activated receptor 2-induced joint inflammation and nociception. *30th Winter Neuropeptide Conference*, Breckenridge, Colorado, USA, 2009 (poszter).

Elekes K, Sándor K, Szöke É, **Tóth DM**, Molnár FT, Szolcsányi J, Markovics A, Jakab L, Mester M, Szitter I, Helyes Zs; Effects of marijuana smoke on the mouse lung. *IBRO International Workshop*, Pécs, Magyarország, 2010 (poszter). **absztrakt:** *Frontiers in Neuroscience*.

Elekes K, Sándor K, Szöke É, **Tóth DM**, Markovics A, Jakab L, Szakács B, Kereskai L, Szolcsányi J, Molnár FT, Helyes Zs; Peripheral effects of the marijuana smoke in the lung of mice. *The 16th World Congress of Pharmacology*, Koppenhága, Dánia, 2010 (poszter). **absztrakt:** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010, **107** (suppl 1), p.267 (IF: 2.308).