

Részletes szakmai jelentés

A TRPV1 kapszaicin receptor által közvetített nocicepció és antinocicepció mechanizmusa és farmakológiai befolyásolása című OTKA pályázat több évtizedes hazai kutatási irány folytatását képezte. A témavezető elsősorban a kapszaicin szerkezeti analógjaival végzett vizsgálatainak alapján fogalmazta meg először azt a hipotézist, mely szerint a kapszaicin fájdalomkeltő és deszenzibilizáló hatását a polimodális nociceptorok plazmamembránján található „kapszaicin receptor”-hoz kötődve fejtik ki (Szolcsányi J. és Jancsó-Gábor A. *Arzn. Forsch. (Drug Res)* 25: 1877-1881 (1975), 26: 33-37 (1976), mely az első „single patch clamp” eredményük alapján resiniferatoxinnal és kapszaicinnal egyaránt aktiválható kationcsatornának bizonyult (Bevan S. Szolcsányi J. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 330-333 (1990). Jelentős áttörést jelentett az analgetikumok és ioncsatornák kutatásában, mikor David Julius és munkacsoportja ezen adatokból kiindulva és ezen munkákra hivatkozva publikálta, hogy sikerült a kapszaicin receptorát klónozni (Caterina M. et al. *Nature* 389: 816-824 (1997). A kapszaicin receptora a funkcionális vizsgálatok alapján olyan kation csatornának bizonyult, mely hat transzmembrán szegmenssel és egy membrán hurokkal, valamint az intracelluláris C-terminálison található 6 ankyrin doménnal rendelkezik és a *Drosophila* légy retinájában először leírt TRP (Transient Receptor Potential) ioncsatorna családba sorolható. Ezért annak vanilloid 1 altípusa (TRPV1) elnevezést kapta. A TRPV1 bizonyult az első olyan ioncsatornának, mely hő ingerrel aktiválható. Ez a forró ingerrel (>43°C), valamint nociceptív hatású rendkívül heterogén struktúrájú endogén (pl. oleoldopamin, anandamin protonok) és exogén kémiai anyagokkal (kapszaicin, kámfor, etanol stb.) nyitható ioncsatorna igazi nociceptív molekuláris szenzorként széleskörű szövetkárosító hatású ingerekkel aktiválva a Sherrington által feltételezett értelemben a nociceptor idegvégződések révén közvetít nociceptív ill. fájdalmat kiváltó ingereket a központi idegrendszerhez. A TRPV1 kapszaicin receptort expresszáló sejtvonalakon nagyon jelentős kutatási potenciállal világszerte több mint 55 gyógyszer- és biotechnológiai gyárban összesen mintegy 1 milliárd dollár költséggel (Gavva N.R. *Trends Pharm. Sci.* 29: 550-557, 2008) megindult nagy hatékonyságú sorozatvizsgálatokkal a gyógyszerkutatási verseny az első nociceptoron ható analgetikum kifejlesztése céljából. A TRP családból egyedül a TRPV1 aktiválható „vanilloid” struktúrájú kapszaicinnal és resiniferatoxinnal, a többi termoszenzor vagy hőre érzéketlen TRP csatorna nem.

A pályázat célkitűzése volt a TRPV1-kapszaicin receptort kifejező nociceptív primér afferens neuron működésének és farmakológiai jellegzetességeinek vizsgálata molekuláris, sejtbiológiai, valamint in vivo hőnocicepció vizsgálatára általunk kifejlesztett új módszerek segítségével.

Az eredeti pályázati célkitűzéseket sikerült elérni annak ellenére, hogy az első év után a munkacsoport több kutatója (Dr. Czéh Gábor D.Sc., Dr. Németh József kandidátus, Varga Angelika doktorandusz, majd PhD. Jakab Balázs doktorandusz) az MTA-PTE Neurofarmakológiai Kutatócsoport felszámolása következtében elhagyta az intézetet. Az MTA tanszéki kutatócsoport vezetését a szigorú korhatár miatt nem pályázhattam meg és a tanszékvezető tanítványom Dr. Barthó Loránd D.Sc. vezetésével beadott pályázatunk nem kapott bizalmat. Az in vitro molekuláris biológiai kutatási irány Dr. Sándor Zoltán vezetésével folytatható volt és az alapkutatási eredmények beépítése gyógyszerkutatási céllal indult el, mivel a témát a Richter Gedeon NyRT gyógyszergyár támogatta. Jelenleg intézetünkben a PTE-Richter Analgetikum Kutatólaboratóriumban a gyár alkalmazásában dolgozik dr. Sándor Zoltán PhD altémavezetőn kívül még dr. Bölcskei Kata PhD és dr. Szőke Éva PhD. Az in vivo nociceptív módszerek felhasználására és a TRPV1-et kifejező nociceptorok funkciójának és farmakológiájának alapkutatási szintű elemzése így jelentős mértékben a gyulladáshoz kapcsolódó hiperalgesia és neuropathia irányába bővült, melyeknél felhasználtuk a dr. Németh József eltávozása után is tovább működő RIA laboratóriumot szenzoros neuropeptidek (P-anyag, CGRP, szomatosztatin, PACAP) meghatározására biológiai mintákból, melyekre dr. Pintér Erika D.Sc és dr. Helyes Zsuzsanna PhD témavezetők által támogatott OTKA témákhoz csatlakozva került sor.

Kutatási eredmények

1. A TRPV1 kapszaicin receptor sejtszintű hatásainak vizsgálatához három módszertani megközelítést használtunk.

a. A széles körben alkalmazott szenzoros neuron (trigeminus) sejt kultúrán (TRG) ill. TRPV1 transzfektált sejt vonalon epifluoreszcenciás mikroszkóp segítségével ill. $^{45}\text{Ca}^{++}$ izotóp technikával mértük a TRPV1 agonisták, antagonisták és modulátorok hatását az intracelluláris kalcium akkumuláció ill. transiens jel mérése alapján.

b. RNS interferencia segítségével TRPV1 knock-down sejt vonalat állítottunk elő további in vivo kísérletek előkészítéséhez.

c. Az érzőidegvégződésekre gyakorolt hatást a fenti módszerekkel nem lehet vizsgálni, ezért a sejttesten kapott eredményeket, intracelluláris TRPV1 protein vándorlást az endoplazmás

retikulum és plazmamembrán között automatikusan érvényesnek vélik az idegvégződésekre is, ahol ezen intracelluláris membránstruktúrák nem találhatóak. Így több eredmény tévesnek bizonyult ill. nem is került sor vizsgálatára (8, 17). A TRPV1 agonisták hatására a beáramló Ca^{++} szenzoros idegvégződésekből szenzoros neuropeptidok felszabadulását váltja ki. Így ezt a módszert a közvetlen in vivo funkcionális relevancián kívül erre a célra is használtuk (3, 4, 5, 9, 11, 12, 15).

2. A TRPV1 hőérzékeny ioncsatorna nocicepcióban betöltött szerepének vizsgálatára TRPV1 génhiányos egereket tenyésztettünk és használtunk fel (12, 13) és a hőküszöb meghatározására új módszert dolgoztunk ki (10, 18). Ez utóbbi az „Emelkedő Hőmérsékletű Forrólap” módszerünkötől (Almási R. et al. Br. J. Pharmacol. 2003 139: 49-58) eltérően az egész lábon nemcsak a talpon alkalmas a nociceptív hőküszöb meghatározására.

Ad 1.a TRPV transzfektált sejt vonalak előállítás.

Patkány trigeminális ganglion sejtekből teljes RNS-t izolálva RT-PCR segítségével a TRPV1 cDNS-t amplifikáltunk és expressziós vektorba klónoztuk. HT1080 sejteket stabilan transzfektálva két sejt vonalat állítottunk elő, az egyik a natív TRPV1 receptort, a másik a fluoreszkáló TRPV1-eGFP fúziós fehérjét expresszálja. A sejt vonalakra építve radioaktív Ca^{45} izotópot használó és mikrofluorimetrián alapuló tesztek is kidolgoztunk melyek alkalmasak a TRPV1 agonisták és antagonisták aktivitásának mérésére. Eredményeink közlésre kerültek (2).

Gyógyszerfejlesztési célból szükséges volt humán TRPV1 receptort expresszáló sejt vonalak előállítás. Az emberi TRPV1 cDNS-t egy cégtől vásároltuk és egy expressziós vektorba klónoztuk CMV promotor irányítása alá. HT1080 és CHO-K1 sejteket stabilan transzfektálva létre hoztuk a humán TRPV1 receptort expresszáló HT20-80-nak és CHO20-5 sejt vonalakat. A HT20-80 és CHO20-5-10 sejtek kapszaicin érzékenységét megvizsgálva a HT20-80 sejteken a kapszaicin $EC_{50} \sim 20$ nM-nak és CHO20-5-10 sejteken az $EC_{50} \sim 30$ nM-nak adódott ami gyakorlatilag megegyezik a korábban általunk a patkány TRPV1-en mért 33 nM értékkel. A humán TRPV1 receptor pH csökkenésre történő aktivációját is vizsgáltuk az új sejt vonalakon. A CHO20-5 sejtekben az alacsony pH önmagában is képes volt a receptor aktiválására, míg a HT20-80 sejtek gyakorlatilag nem reagáltak az önmagában való pH csökkentésre, bár e sejtekben is a pH csökkenés jelentős mértékben potenciózta a kapszaicin hatását. A sejt vonalakat részletesen jellemeztük az ipari partner által kiválasztott referencia vegyületekkel is, melyek publikálására egy éven belül sor kerülhet. Sorozatvizsgálatokra a CHO sejteken alapuló sejt vonalat használtunk és így elkészítettük a TRPV1-et expresszáló CHO30-36 sejt vonalat is.

Korábban kimutattuk, hogy az anandamiddel szemben az N-oleoyldopamin (OLDA) olyan endogén ligandja a TRPV1-nek, mely nem rendelkezik ugyanazon az idegvégződésen gátló CB1 agonista hatással (Szolcsányi J. et al. *Neurosci Letters* 361: 155-158, 2004). Kimutattuk (14), hogy az OLDA potenciális metabolitjai közül a 3-methyl-N-oleoyldopamine (3-MOLDA) agonista, míg a 4-methyl-N-oleoyldopamin (4-MOLDA) antagonistá hatású mind a transzfektált sejtvonalakon, mind pedig a TRG neuronokon és intraplantárisan adva az idegvégződéseken is nociceptív reakciók alapján (14).

Szerkezet-hatás összefüggések alapján már korábban felvetettük azt a hipotézist, hogy a TRPV1 ioncsatorna működésében és különösen a kapszaicin és reziniferatoxin (RTX) hatásában lényeges szerepet játszik a protein körüli lipid raft (17). Közlésre elküldött kéziratunkban (Szőke, É., Börzsei, R., Tóth, D.M., Lengl, O., Helyes, Zs., Sándor, Z., Szolcsányi, J. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurones and transfected cell line) az alábbi lényeges eredmények publikálását indítottuk el: A kapszaicinnel (100 nM) és RTX-el (3nM) kiváltott Ca^{++} akkumuláció csökkent ha trigeminus neuronok sejt kultúrájában a koleszterint depletáltuk metil β -ciklodextrinnel (1-10 mM), viszont TRPV1-el transzfektált sejtvonalon nem gátolta az előkezelés az RTX, anandamid és savi PH hatását csak a kapszaicinét és az OLDA-t. A hatás az Ca^{++} transziensek nagyságában is kimutatható volt. rTRPV1-el transzfektált sejtvonalon sphingomyelinase előkezelés csak a kapszaicin hatását gátolta változatlanul hagyva az RTX-ét, míg TRG neuronokon mindkét agonista hatását gátolt az előkezelés. Gangliozid bioszintézis gátlása D-PDMP-vel (10-20 μ M) vagy myriocinnel (5-5 nM) mindkét sejt típuson gátolta mindkét agonista hatását. Az eredmények elsőként bizonyították a lipid raft mindhárom alkotórészének szerepét, továbbá a kapszaicin és RTX alloszterikus agonista hatását a TRPV1 proteinen.

b. RNS interferencia segítségével gátoltuk a TRPV1 receptor kifejeződését különböző in vitro és in vivo rendszerekben. Korábban publikált információk alapján patkány TRPV1 receptor elleni siRNS duplex szekvenciákat vásároltunk. Az siRNS duplexeket egy TRPV1eGFP fúziós fehérjét expresszáló plazmiddal együtt a patkány hátsógyöki ganglion eredetű NDC sejtvonalba kotranszfektáltuk és a zöld fluoreszcenciát áramlási citométerrel mérve következtettünk a TRPV1eGFP fehérje expressziójára. A TRPV1 elleni siRNS nagyobb mint 90%-os gátlást eredményezett, egy hasonló kémiai módon módosított siRNS ugyanilyen mértékű gátlást okozott, míg egy kontroll siRNS duplex hatástalan volt. Lényegében hasonló eredményt kaptunk CHO sejtekben is, bár itt maximum kb. 80 %-os gátlást sikerült elérni. Az siRNS-ek hatását megvizsgáltuk frissen izolált patkány TRG neuronokon is. Az 50 nM TRPV1 ellenes siRNS 50%-ról 1%-ra csökkentette a kapszaicinre reagáló TRG neuronok

számát a tenyészetben, míg a kontroll siRNS hatástalan volt. Megkezdtük az siRNS duplexek tesztelését in vivo patkányban is. Előzetes adataink szerint a hatékony siRNS-el kezelt állatok szignifikánsan kisebb nocitensiv reakciót mutattak 14 napon át, a kontroll siRNS duplexel kezeltékhez viszonyítva (20).

c. Izolált patkány trachea kapszaicin-érzékeny érzőidegvégződéseiből inger hatására P-anyag, CGRP és szomatosztatin szabadul fel. Ezen neuropeptideket TRPV1 agonisták u.m. reziniferatoxin, kapszaicin és piperin 10^{-10} M, 10^{-8} M ill. 2×10^{-6} M küszöb koncentrációkkal dózisfüggő módon szabadítják fel. 10^{-8} M reziniferatoxin tartós peptidfelszabadulást eredményez. A küszöb koncentráció reprodukálható válaszokat vált ki és téringlerléssel kiváltott neuropeptid-felszabadulás a reziniferatoxin 30 perces adása után a P-anyag esetében csak 10^{-7} M után, a szomatosztatin esetében 10^{-8} M után és a CGRP esetében 10^{-9} M után, vagyis a küszöbkoncentráció $100 \times 10 \times$ adásánál jelentkeznek. A kapszaicin deszenzibilizáló küszöbkoncentrációja szintén eltérő volt a három neuropeptid vonatkozásában. (P-anyag: 10^{-5} M, szomatosztatin 10^{-6} M, CGRP 10^{-7} M). Ezek az adatok a három neuropeptid eltérő depletálhatóságát bizonyítják és nem magyarázhatók az idegvégzések együttes neurotoxikus degenerálódásával. Nem találtunk különbséget a kapszaicinnal és idegelemek izgatásával kiváltott válaszok hatáscsökkenésében sem, így TRPV1 membránprotein deszenzibilizálódása (defoszforilálódása) a funkciócsökkenéssel nem bizonyítható.

Kimutattuk, hogy a methyl β -ciklodextrin a kapszaicinnal és RTX-el kiváltott CGRP felszabadulást már $100 \mu\text{M}$ koncentrációban gátolta és a sphingomyelinase előkezelés is gátló hatást váltott ki bizonyítva a lipid raft-ok szerepét az idegvégzésekben is.

A kapszaicin-érzékeny idegvégzésekben felszabaduló szomatosztatin gátolja a P-anyag és CGRP felszabadulását mely felismerés és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló „szenzokrin hatása” új neurohumorális szabályozás és gyógyszerfejlesztés kiindulópontja lett (1, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 16). Jelen pályázati támogatással kimutattuk egy szintetikus szomatosztatin-4 agonista potens gátló hatását a P-anyag és CGRP felszabadulásra és a mintegy egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban kifejtett gátlást a szomatosztatin felszabadulására (3). Neuropathia modellben (4) endotoxinnal kiváltott pneumocitisben (12) a szomatosztatin plazmaszintje emelkedik és gyulladásgátló hatású ellenregulációt vált ki, mely TRPV1 KO egerekben hiányzik (12). Új felismerés, hogy in vitro a tracheából a kapszaicin és téringlerlés PACAP-38-at (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38) szabadít fel, mely 20 nM koncentrációtól negatív feedbackszerű gátlást vált ki a peptidek felszabadulására és in vivo gátolja a TRPA1 agonista mustárolaj gyulladáskeltő hatását (5). Módszerünkkel

bizonyítottuk, hogy az endomorphin-1 is gátolja P-anyag és CGRP felszabadulását és a neurogén gyulladást (15).

2. Nocicepció, hiperalgéria, antinociceptív, antihiperalgéria mérésére új módszert vezettünk be, melynek lényege, hogy a patkány lábát olyan vízfürdőbe helyezük, melynek hőmérséklete 30°C-ról 24°C/min ütemben emelkedik míg az állat a lábát ki nem rántja a vízből. (43.5±0.4°C). Thernalis hiperalgéria modellt dolgoztunk ki, mely módszerrel a morfin 0,3 mg/kg, diclofenac 0,3 mg/kg, ibuprofen 10 mg/kg, paracetamol 30 mg/kg i.p. dózisokban bizonyult analgetikus hatásúnak. A módszer reprodukálhatósága miatt különösen alkalmas hatásidőtartam érzékeny mérésére (10). Plantaris incízió után 24 órával hiperalgéria alakul ki, mely modellként alkalmas posztoperatív fájdalomra ható analgetikumok tesztelésére. A morfin diclofenac és paracetamol szisztémás és lokális hatása új módszerünkkel mind hatáserősség mind időtartam mérése vonatkozásban is igen ígéretesnek bizonyult (18).

In vitro és in vivo módszertani repertoárunk segítségével trigeminus neuronokon és hőküszöb mérés alapján in vivo szubplantáris injekciókkal vizsgáltuk a proteinkinázok u.m. PKC és PKA foszforiláló szerepét a TRPV1 Ca⁺⁺ ion beáramlást, ill. transienst ill. szenzoros receptorális szinten nocicepciót kiváltó hatásában. Az eredmények azt bizonyították, hogy a bazális TRPV1 receptor funkciót a sejttesten in vitro nem a PKC, hanem a PKA enzim határozza meg. Nyugalmi szint feletti izgatásnál pl. hiperalgériában azonban a TRPV1 funkciójában a PKC is szerepet játszik. RTX szubplantáris injekciójával kiváltott hiperalgériát csak a szelektív PKA-gátló (KT 5720) csökkentette a szelektív PKC-gátló chelerythrine azonban nem, viszont az RTX által kiváltott enyhe hiperalgériát a PKC aktivátor PMA lokális adása fokozni tudta (9).

Az ioncsatornák szerepéről a nociceptív membránban (8), a TRPV1 kapszaicin receptor néhány kritikus vitatott aspektusáról (17) valamint a TRPV1-et expresszáló szenzoros végződésekből felszabaduló szomatosztatin szerepéről, a szomatosztatin 4 receptoron ható agonisták potenciális analgetikumként való kifejlesztéséről (1, 6) összefoglaló közlemények jelentek meg.

The present project on the TRPV1 capsaicin receptor is a continuation of a research trend initiated in Hungary several decades ago.

The theory for the existence of the „capsaicin receptor” on the plasma membrane was put forward on the basis of structure-activity relationship of the pain producing and desensitizing actions of capsaicin (Szolcsányi J. and Jancsó-Gábor a. *Arzn. Forsch. (Drug Res)* 25: 1877-1881 (1975), 26: 33-37 (1976). Afterwards our „single patch clamp” evidence formed the first evidence that capsaicin and resiniferatoxin activates the same cation channel (Bevan S. and Szolcsányi J. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 330-333 (1990). The real breakthrough in the field of research on analgesics and ion channels in general was, however, when David Julius and his group in the States based on and referred to our data mentioned above succeeded the clone the „capsaicin-receptor” (Caterina M. et al. *Nature* 389: 816-824 (1997). These functional genomic data revealed that it is a cation channel with 6 transmembrane segments and a membrane pore loop and with an intracellular C-terminal with 6 ankyrin domains belonging in this way to the „transient receptor potential” (TRP) family of ion channels described earlier in the retina of *Drosophila* flye. Thus the „capsaicin receptor” was denoted also as TRPV1 (vanilloid). The TRPV1 turned out to be the first ion channel gated by thermal signals (thermo-TRP channels) which is gated by noxious heat (>43°C) as well as by various endogenous (e.g. oleoyl dopamine, anandamin, protons) and exogenous chemical agents (capsaicin, camphor, ethanol etc). This nociceptive molecular sensor gated by highly diverse chemical entities on the nociceptive nerve endings - predicted by Sherrington - is a molecular transducer for signalling nociceptive and pain producing interventions to the central nervous system. Thus on TRPV1-expressing cell lines an outburst of research started over the world in more than 55 drug companies spending altogether an enormous high sum of 1 billion USD (Gavva N.R. *Trends Pharm. Sci* 29: 550-557, 2008) for high throughput screening (HTS) to discover and introduce into the market the first analgesic drug with a selective site of action on nociceptors. It is worthy to mention that out of the whole TRP superfamily only the TRPV1 could be gated by „vanilloids” like capsaicin or resiniferatoxin (RTX) and other thermo TRP channels are not sensitive to these irritants.

The aim of the present project was to study the function and pharmacology of nociceptive primary afferent neurons which express TRPV1 capsaicin by means of molecular cell biological as well as in vivo methods developed in our laboratories for measuring thermonociception in rodents.

The original goals were achieved in spite of the fact that after the first year several researchers (Dr. Gábor Czéh D.Sc., dr. József Németh Ph.D., Angelika Varga doctorant then PhD, Balázs Jakab biologist) left the department owing to the lack of support from the Hungarian Academy of Sciences. Owing to the strict age limit I could not be the applicant (principal investigator) of the MTA-PTE Neuropharmacology Research Group and the grant application was signed by my coworker and present head of the department Dr. Lorand Barthó D.Sc. Under these conditions the support was stopped. The *in vitro* molecular biological scope leaded by Zoltán Sándor MD., Ph.D. could be followed and these achievements in basic science established a cooperation with the Gedeon Richter drug company. At present within the frame of PTE-Richter Analgetics Research Laboratory are working Zoltán Sándor MD., Ph.D., Kata Bölcskei MD., Ph.D. and Éva Szőke Ph.D. Thus, the nociceptive methodical repertoire as well as the analyses of the function and pharmacology of TRPV1-expressing nociceptors were extended by using these approaches for research on inflammatory hyperalgesia and neuropathy in which we utilized the measurements of the RIA laboratory for detection sensory neuropeptides (substance P, CGRP, somatostatin, PACAP-38). These directions were also supported by other OTKA projects leaded by Erika Pintér MD., D.Sc. and Zsuzsanna Helyes MD., Ph.D.

Results

1. Three methodical approach was used for analysing the function of TRPV1 capsaicin receptor at the cellular level.
 - a.) Using the well established cultured sensory neurons (trigeminal TRG) or TRPV1-transfected cell lines and epifluorescent microscopy and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation techniques in cells we measured the Ca_i^{2+} influx or transients in responses to TRPV1 agonists, antagonists or modulators.
 - b.) With the aid of RNA interference we created TRPV1 knock-down cell line for further *in vivo* experiments.
 - c.) The effect on sensory nerve endings could not be measured by the above techniques therefore the results obtained on cell bodies e.g. trafficking of TRRPV1 from endoplasmic reticulum to cell membrane are also interpreted by others to be valid on nerve endings where these intracellular membrane organelles are not present.

Thus several misleading conclusions were drawn and in fact this aspect in general has not been addressed (8, 17). In response to TRPV1 agonists the influx of Ca^{2+} into the sensory nerve endings results in release of sensory neuropeptides. Thus this method was used for comparison TRPV1 operational features on cell body is nerve ending beyond using measurements of sensory neuropeptide release from the strict in vivo functional point of view and relevance (3, 4, 5, 9, 11, 12, 15).

2. In order to study the role of TRPV1 thermosensor cation channel in vivo we used TRPV1 gene deleted mice (12, 13) and we developed novel behavioural methods for detection the real nociceptive thermal threshold (10, 18). This latter method is a further invention. The first one the „Increasing Temperature Hot Plate (ITHP) has been already described (Almási R. et al. Br. J. Pharmacol. 2003 139: 49-58). The present invention is suitable for measuring not only on the plantar skin but on the whole paw the noxious heat threshold which elicits the protective nocifensor reflex.

Ad 1.a.

We isolated total RNA from rat trigeminal cells, amplified the TRPV1 cDNA by RT-PCR and cloned the cDNA into a mammalian expression vector. Using stable transfection of HT1080 cells two cell lines were constructed, one expressing the native rat TRPV1 receptor the other one expressing the fluorescent TRPV1-eGFP fusion protein. Based on these cell lines we setup assays using radioactive Ca^{45} isotope or microfluorimetry to measure the activity of TRPV1 agonists and antagonists. We have already published these results (2).

Drug development efforts required the construction of cell lines expressing the human TRPV1 receptor as well. The human cDNA coding the TRPV1 receptor was obtained from a company and cloned into a mammalian expression vector under the control of the CMV promoter. Stably transfecting CHO-K1 and HT1080 cells, the HT20-80 and the CHO20-5 cell lines expressing the native human TRPV1 receptor were constructed. We determined the capsaicin sensitivity of these cell lines, and found $\text{EC}_{50} \sim 20$ nM in case of cell line HT20-80 and in case of CHO20-5 cells, which values are very similar to the capsaicin sensitivity of $\text{EC}_{50} \sim 33$ nM we measured for the rat TRPV1 receptor, previously. We also investigated the low pH induced activation of the human TRPV1 receptor in these cell lines. In CHO20-5 cells the low pH alone was able to activate the receptor while in HT20-80 low pH alone could not activate the receptor, only increase the potency of capsaicin. We thoroughly characterized these cell lines with reference drugs selected by our industrial partner. These results will be published within a year. In high throughput screening tests the CHO20-80 cell line were used, so we

created a new corresponding cell line expressing the rat TRPV1 receptor in CHO-K1 cells, as well.

1.b. We have described earlier that N-oleoyl dopamine (OLDA) – unlike the other putative endogenous ligand of TRPV1, anandamide – does not have an inhibitory CB1 agonist effect on the same nerve endings (Szolcsányi J. et al. *Neurosci. Letters* 361: 155-158, 2004).

In the present study we have shown (14) that out of the potential metabolites of OLDA 3-methyl-N-oleoyldopamine (3-MOLDA) is an agonist while 4-methyl-N-oleoyl dopamine (4-MOLDA) is an antagonist on TRPV1 receptor in transfected cell lines and cultured trigeminal neuron as well as on the basis of nociceptive responses evoked by intraplantar injection (14).

1.c. We put forward the hypothesis, that in the operation of TRPV1 cation channels and particularly in gating evoked by capsaicin and RTX not only this protein but the lipid raft around it plays an important modulatory role (17). In a manuscript sent already for publication (Szöke, É., Börzsei, R., Tóth, D.M., Lengl, O., Helyes, Zs., Sándor, Z., Szolcsányi, J.: Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurones and transfected cell line) the following main results and conclusions were obtained.

Depletion of cholesterol by methyl β -cyclodextrin (1-10mM) diminished the percent of cultured trigeminal neurones which respond with calcium uptake to capsaicin (100 nM) or resiniferatoxin (3 nM), but on TRPV1-transfected cells the inhibition occurred only when capsaicin or N-oleoyldopamine (10 μ M) were applied but not when resiniferatoxin, anandamid (10 μ M) or pH 5.5 were used for gating. The magnitude of Ca^{2+} -transients evoked by capsaicin (330 nM) was also inhibited in both cell types. Treatment of rTRPV1-expressing cells with sphingomyelinase inhibited the ^{45}Ca -uptake elicited by capsaicin leaving the resiniferatoxin-induced response unchanged. On the other hand the effect of both compounds was inhibited on trigeminal neurones by sphingomyelinase treatment. Inhibition of ganglioside biosynthesis by D-PDMP (10-20 μ M) or myriocyn (5-50 nM) diminished similarly the calcium uptake evoked by capsaicin or resiniferatoxin both in cultured trigeminal neurones and TRPV1-transfected cells.

These results provided the first evidence that in gating the TRPV1 ion channel all principal constituents of lipid raft play important role and capsaicin and RTX are allosteric agonists on the TRPV1 protein.

b. RNA interference was used to knock down TRPV1 expression in different in vitro and in vivo systems. We obtained anti TRPV1 siRNA duplexes based on previously published information. First the siRNA duplexes were cotransfected with a vector expression the rat

TRPV1-eGFP fusion protein into rat dorsal root ganglion derived NDC cells and the receptor expression was monitored by flowcytometry. The active siRNA induced a ~90% knock down of receptor expression, a chemically modified siRNA induced similar inhibition, while the control siRNA had no effect. Similar results were obtained in CHO cells as well, but a maximum ~80% inhibition could be achieved. The effect of siRNA was also examined on freshly isolated rat TRG neurones. 50 nM anti TRPV1 siRNA reduced the number of cells reacting to capsaicin from 50% to 1%, while the control siRNA had no effect. We have started to investigate the effects of siRNA in vivo in rats, too. According to preliminary results, the anti TRPV1 siRNA inhibited capsaicin induced pain sensation in treated animals up to 14 days (20).

c. The release of substance P, CGRP and somatostatin from the TRPV1-expressing capsaicin-sensitive sensory nerve endings in response to various agonists were investigated. RTX, capsaicin and piperin at threshold concentrations of 10^{-10} M, 10^{-8} M and 2×10^{-6} M, respectively dose-dependently released these neuropeptides. RTX in a concentration of 10^{-8} M induced long-lasting release in this preparation. The release response to threshold concentrations of these agonists, was reproducible and after a 30 min exposure of RTX the release of neuropeptides evoked by field stimulation was inhibited at a threshold concentration of 10^{-7} M for substance P, 10^{-8} M for somatostatin and 10^{-9} M for CGRP i.e. 100-10x higher concentration than the threshold RTX concentration. The capsaicin-induced desensitization was also different in respect of the three neuropeptides (SP 10^{-5} M, somatostatin 10^{-6} M, CGRP 10^{-7} M). These data provide evidence for the differential influence of TRPV1 agonists on depletion of the three sensory neuropeptides and are against that it may be due to a neurotoxic degeneration at this concentration range. The fact, that these effects were similar if TRPV1 agonists or if electrical field stimulation were used indicate no evidence for a dephosphorylation (which could not play a role in electrical nerve stimulation) in the inhibited of neuropeptide release. We have shown also the important role of lipid raft in the TRPV1 gating at the nerve endings since methyl β -ciklodextrin inhibited in a very low concentration of 100 μ M the release of CGRP evoked by capsaicin or RTX and CGRP release was also inhibited in the presence of sphingomyelinase in the organ bath.

Somatostatin released from the activated TRPV1-expressing capsaicin-sensitive sensory nerve endings reaches into the circulation, in vivo inhibits neurogenic inflammation and in vitro inhibits the release of CGRP and substance P. This novel neurohumoral regulatory system discovered in our laboratories were termed as „sensocrine” function of TRPV1-expressing

nerve endings has initiated drug development and pathophysiological investigations (1, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 16). Within the frame of the present project we showed that potent synthetic somatostatin-4 receptor agonist inhibits in vitro the release of substance P and CGRP but only about 10 times higher concentration than that of somatostatin (3). In a neuropathy model (4) as well as in LPS-induced lung inflammation (12) the somatostatin-like immunoreactivity of the plasma is enhanced and induces an antiinflammatory/analgesic counterregulatory effect which is absent in TRPV1 KO mice (12). We have revealed, that PACAP-38 is released in vitro from the rat trachea in response to capsaicin or electrical field stimulation of the nerve fibers. PACAP-38 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38) in a 20nM concentration elicits a negative feedback by inhibition in vitro the release of sensory neuropeptides and in vivo by inhibition the neurogenic inflammation evoked by the TRPA1 agonist, mustard oil (5). Using our techniques we showed that endomorphin-1 also inhibits the release of substance P and CGRP from the nerve endings in vitro and has an antiinflammatory effect in vivo on neurogenic inflammation (15).

2. For measuring thermal nociception, antinociception, hyperalgesia and antihyperalgesic effects we introduced a novel method by putting the hind paw of rodents into a waterbath the temperature of which is increasing from 30°C by 24°C/min until the animal indicates a nocifensive reaction (43.5°C±0.4°C). A thermal hyperalgesia model was introduced with high sensitivity to analgesic drugs (morphine 0.3 mg/kg diclofenac 0.3 mg/kg, ibuprofen 10 mg/kg, paracetamol 30 mg/kg i.p.). The reproducibility makes this method suitable for detection of noxious heat threshold during tracing the time course of the analgesic effect of drugs (10). Plantar incision performed one day before testing resulted in a surgical hyperalgesia model. Morphine, diclofenac and paracetamol given both locally or systemically induced antinociceptive/antihyperalgesic effects (18).

Using the combination of our in vitro and in vivo methods on trigeminal neurons and TRPV1-transfected cell line as well as after subplantar injection in vivo we analysed the role of phosphorylating enzymes (PKC and PKA) on the Ca²⁺ influx and nociception mediated by TRPV1 gating. Evidence was obtained that under basal activity PKA plays a role in TRPV1 responsibility but not PKC. Under condition of hyperalgesia PKC also plays a role. TRPV1 activation by RTX was inhibited only by the PKA inhibitor (KT 5720) while the PKC inhibitor chelerythine also inhibited the nociception evoked by PMA subplantar injection (9).

Review articles as well as comments were published on the role of ion channels in nociceptive membrane (8), about some critical issues on TRPV1 capsaicin receptor (17) as well as about the role of somatostatin released from TRPV1-expressing capsaicin-sensitive nerve endings and about its sst4R as a target for drug research (1, 6).