

Válaszok a doktori értekezéssel kapcsolatban az opponensek által megfogalmazott kérdésekre

A kokain- és amfetamin-regulált transzkript (CART) peptid a gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozásban szerepet játszó neuronális hálózatokban
(doktori értekezés)

dr. Kozsurek Márk

Dr. Jancsó Gábor, egyetemi tanár

“... a CART-pozitív rostok egy része primer afferens eredetű. A kérdésre elegáns választ adhatott volna a hátsógyökér átmetszés következményeinek tanulmányozása, ... vagy azok a szenzoros kutatásokban alkalmazott technikák, melyek a capsaicin szelektív neurotoxikus hatásán alapulnak.”

A hátsó szarv felületes lamináiban nagy mennyiségben észlelt CART-tartalmú rostok primer afferens eredetének igazolására rhizotomiát is végeztünk, mely a laesio oldalán a CART-immunreaktivitás nagyfokú csökkenését mutatta. Ugyanakkor vizsgálatainknak célja volt annak meghatározása, hogy mely primer afferens populációk tartalmazzák a CART-ot, erre a kérdésre pedig a hátsó gyökér átmetszése önmagában nem adott volna választ. És mivel a hátsó gyökereket csak egyetlen állatban vágtuk át, az így kapott eredményt nem publikáltuk.

A CART peptid neuropátiás fájdalomban betöltött szerepét illetően még vizsgálatok vannak folyamatban. A CART-erg rostok primer afferens eredete mellett szól az is, hogy a n. ischiadicus átvágásával előidézett neuropátiás modellnél az ideg gerincvelői végződési helyének megfelelő területen a CART-immunreaktivitás drasztikus kiesését észleltük.

“... hiányolom, hogy nem alkalmazott CART+TRPV1 kettős immunfestést, hiszen a TRPV1 a nociceptív primer afferensek jelenleg általánosan elfogadott markere (sokkal inkább, mint a CGRP)”

Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a TRPV1-receptort mind a peptiderg (CGRP+), mind a nem-peptiderg (IB4+) C nociceptív afferensekhez tartozó ganglionsejtek exprimálják, de a TRPV1-receptor mindkét neuronpopulációnak csak egy részében található meg [Guo és mtsai, 1999, Eur J Neurosci 11:946-58; Price and Flores 2007, J Pain 8:263-72]. Kísérleteinkben a CGRP-t nem mint nociceptív, hanem mint primer afferens markert használtuk, és nociceptív primer afferensnek csak a CGRP+/SP+ rostokat tekintettük, mivel általánosan elfogadott, hogy minden SP-immunpozitív primer afferens nociceptív [Julius és Basbaum, 2001, Nature 413:203-10]

“... a ganglionsejtekben a peptid szintése alacsony szinten folyik, és a peptid gyorsan transzportálódik a végződések felé. Tettek-e kísérletet ennek ... bizonyítására?”

Az elméletet kísérlettel nem bizonyítottuk. A jövőben a feltételezést alátámaszthatja, ha a DRG sejtek nagyobb hányadában jelenik meg a CART kolchicin kezelést vagy rhizotomiát követően.

“...a CTb nem feltétlenül specifikus markere a velőshüvelyű idegrostoknak.”

A CTb a GM1 gangliozidhoz kötődik, mely normál körülmények között csak a velőshüvelyes rostok felszínén található meg [Robertson és Grant, 1985, *Neurosci* 14:895-905]. Ugyanakkor a perifériás ideg krónikus sérülése esetén a C-rostok fenotípusváltása következik be: exprimálni kezdik a GM1 molekulákat, s ezáltal képessé válnak a CTb transzportjára, vagyis idegsérüléssel állatoknál a CTb a myelinhüvely nélküli rostokat is jelölheti [Woolf és mtsai, 1992, *Nature* 355:75-78, vs. Tong és mtsai, 1999, *J Comp Neurol* 40:143-58, Bao és mtsai, 2002, *Eur J Neurosci* 16:175-85, Jancsó és mtsai, 2002, *Acta Biol Hung* 53:77-84; Sántha és Jancsó, 2003, *Neuroscience* 116:621-7]. Kísérleteinket intakt állatokon végeztük, s ilyen körülmények között a myelinhüvelyes rostok és centrális terminálisaik jelölésére nem ismerünk jobb módszert. A myelint festő különböző markerek – tekintettel arra, hogy a velőshüvelyes rostok a terminálisok közelében elvesztik myelinhüvelyüket – az idegvégződések kimutatására alkalmatlanok.

Dr. Rónai András Zoltán, egyetemi docens

1. “... a spinális ganglionokban található »kis sejtek egy csoportjában« megtalálható neuropeptidok vonatkozásában a hivatkozott irodalmi forrás értelmezésem szerint egy kissé liberálisan magas peptidpopulációt nevezett meg. Kérdés: kérem, nevezze meg a listából azokat a peptidokat, melyek esetén az állítással ellentétes irodalmi adatok is szép számmal adódnak.”

A hivatkozott irdalom igyekezett minden olyan neuropeptidet megnevezni, melynek jelenlétét akár egy kutatócsoport is ki tudta mutatni a ganglion spinale (DRG) sejtjeiben. Kétségtelen, hogy számos neuropeptid vonatkozásában a publikált eredmények meglehetősen ellentmondásosak.

A **dinorfin** (DYN) vonatkozásában például egyes szerzők csupán kisszámú DYN-pozitív sejtet figyeltek meg a DRG-ben [Botticelli, 1981, *PNAS* 78:7783-6; Kummer és Heym, 1986, *Cell Tissue Res* 245:657-65], másoknál DYN-immunreaktív jelölés kolchicin előkezelés után sem volt detektálható [Basbaum és mtsai, 1986, 6:127-33; Garry és mtsai, 1989, *J Comp Neurol* 284:36-47]. Hasonló a helyzet a **bombezinnel**: a peptid vagy nem detektálható, vagy a DRG sejtek csupán mitegy 5%-ában figyelhető meg [Fuxe és mtsai, 1983, *Neurosci Lett* 37:17-22; Garry és mtsai, 1989; Panula és mtsai, 1983, *J Neurosci* 3:2021-9; Cameron és mtsai, 1988, *Neurosci* 27:969-79]. Egyes szerzők szerint az **oxitocint** és **vazopresszint** a DRG sejtek 38, ill. 50%-a tartalmazza, és neonatális kapszaicin kezelés után a jelölődés a DRG-ből és a hátsó szarvból is eltűnik [Kai-Kai, 1985, *Neurosci Lett* 55:83-8 1986, *Neuroscience* 18:475-86]. Ezzel ellentétben másoknak a két peptid vagy a prepro vazopressin mRNS-ét sem sikerült kimutatnia a DRG-ben [Boehmer és mtsai, 1989, *Peptides* 10:1179-94; Hallbeck és mtsai, 1996, *Neurosci Lett* 209:125-8]. Egyes közlemények szerint az **enkefalin** csak kis mennyiségben van jelen a DRG-ban, vagy ki sem mutatható felnőtt állatokban [Senba és mtsai, 1982, *J Comp Neurol* 208:54-66; Weihe és mtsai, 1988, *Neurosci Lett* 85:187-92; Pohl és mtsai, 1994, *J Neurochem* 63:1226-34]. Mások jelentős mennyiségű enkefalint vagy enkephalin mRNS-t találtak a DRG-ben, ill. a velőshüvely nélküli primer afferensek 17%-ban mutatták ki a peptidet [Przewłoczki és mtsai, 1983, *Brain Res* 280:95-103; Pohl és mtsai, 1997, *Brain Res* 749:18-28; Carlton és Coggeshall, 1997, *Neurosci Lett* 221:121-4]. Kezdetben a **kolecisztokinint** (CCK) számos szerző mutatta ki a DRG kis sejtjeiben [Dalsgaard és mtsai, 1982, *Neurosci Lett* 33:159-63; Gibson és mtsai, 1982, *Neuroscience* 7:3153-62; Otten és Lorez, 1983, *Neurosci Lett* 34:153-8; Leah és mtsai, 1985, *Neuroscience* 16:683-90; McNeill és Burden, 1987, *Neurosci Lett* 80:27-32], később azonban nyilvánvalóvá vált, hogy patkányban a CCK és a CGRP keresztreakciót mutat, s bár tengerimalacban, macskában és majmokban a CCK a primer afferensek jelentős részében jelen van, a patkány DRG-ből hiányzik [Hökfelt és mtsai, 1988, *J Chem Neuroanat* 1:11-51; Seroogy és mtsai, 1990, *Brain Res Mol Brain Res* 7:171-6].

2. *“Bár a CART receptora(i) egyértelműen nem definiált(ak), számos lehetséges jeltovábbítási út körvonalazódik. Kérdés: hány különböző családba tartozó G proteint nevezne meg, melyeket a jeltovábbításban érintettnek sejthetünk? Milyen következtetést fogalmazna meg az elágazó jeltovábbítási utak lehetőségéből?”*

Hippocampusban a CART(55-102) peptid gátolja az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák működését, ez a hatás staurosporin (a szerin-treonin protein-kinázok, mint a PKA, PKC, PKG, Ca^{2+} -kalmodulin-dependens protein-kináz nem specifikus inhibitora) és genistein (tirozin-kináz inhibitor) alkalmazása mellett is megmarad, de a CART peptid L-típusú Ca^{2+} -áramra kifejtett gátló hatását a pertussis-toxin (PTX) megszünteti [Yermolaieva és mtsai, 2001, *J Neurosci* 21:7474-80]. A hippocampus neuronjaiban a CART peptid hatásának közvetítésében a G_0 α -alegységet tartalmazó heterotrimer G-fehérjék játszhatnak szerepet, ezekről ismert, hogy pertussis-toxin szenzitívek, ill. a dihidropiridin érzékeny Ca^{2+} -csatornák működését gátolni képesek. AtT20 hypophysis sejtvonalonban a CART peptid hatására fokozott ERK foszforilációt írtak le. A foszforilációt a PTX kivédi, míg a tirozin-kináz aktivitást gátló genistein nem befolyásolja. Ezek az adatok is leginkább a $G_{i/0}$ alegységek jelentőségét hangsúlyozzák [Lakatos és mtsai, 2005, *Neuroscie Lett* 384:198-202]. A hypothalamus paraventricularis magjában a CART fokozza a CRH-pozitív sejtekben a CREB foszforilációját [Sarkar és mtsai, 2004, *Brain Res* 999:181-92]. Bár a CREB foszforilációját többféle kináz is előidézheti, közülük ki kell emelnünk a cAMP-dependens protein-kinázt (PKA), melynek aktiválásában a G_s α -alegység játszik meghatározó szerepet.

Összeségében tehát a heterotrimer GTP-fehérjék háromféle α -alegysége (G_i , G_0 , G_s) kapcsán merül fel annak lehetősége, hogy a CART intracelluláris jelátviteli folyamataiban szerepet játszanak. A “kis”, (ras) GTP-kötő fehérjék – egyelőre legalábbis úgy tűnik – nem érintettek a CART szignáltranszdukciós folyamataiban. Amennyiben a CART-ra válaszolni képes neuronpopulációk egyik részében az egyik, a másikban a másik G-fehérje altípus játszik meghatározó szerepet, az egyes neuronpopulációk jelátviteli folyamatainak szelektív és célzott (kevesebb mellékhatással járó) farmakológiai befolyásolására nyílnak lehetőségek.

3. *“Van-e olyan antitest, amely differenciáló módon ismeri fel a CART(55-102) illetve CART(62-102) peptidet?”*

Tudomásunk szerint nincs olyan CART antitest, mely segítségével a CART(55-102) és CART(62-102) peptidek elkülöníthetők lennének. A Phoenix Peptides kínálatában szerepel ugyan CART(55-102) és CART(61-102) antitest is, de a név csupán az immunizáló peptidre utal, ugyanis a cég saját vizsgálata szerint a keresztreakció a két antitest között 100%-os. Kérdéses, hogy létezik-e egyáltalán a két peptidváltozatra két külön antitest. A CART peptid antigenitását az N-terminus felőli, három diszulfid hidat is tartalmazó, s feltehetően a receptorhoz való kötődésben is meghatározó szerepet játszó szakasz határozza meg, a két peptidváltozat közötti hét aminosavnyi hosszkülönbség pedig ettől a kritikus régiótól távolabb, a C-terminusnak megfelelő végen található.

4. *“Van-e irodalmi adat arra, hogy az extracelluláris térben a CART(55-102)-nek mik a hidrolitikus produktumai, és ezek között van-e domináns produktum?”*

A terminálisokból kiszabaduló CART fehérjék további sorsa a mai napig nem ismert. A más neuropeptidok esetében megismert mechanizmusok azonban a CART esetében is elképzelhetőek. Lehet, hogy az extracelluláris térben (esetleg a szinaptikus részben) lévő proteázok hasítják tovább inaktív szakaszokra, végső soron akár aminosavakra, de az is lehetséges, hogy a célsejt felszíni receptorához kötődik, mellyel együtt internalizálódik, s a sejten belül degradálódik. Harmadik lehetőségként a neuropeptideket a terminálisba történő visszavételt követően a sejtek “újrahasznosíthatják”.

5. “Van-e irodalmi adat arra, hogy a nociceptív információ spinális feldolgozása tekintetében eltérő hatású volna a CART(55-102) illetve a CART(62-102)?”

A fájdalomérzés vonatkozásában csak az ismert, hogy “hot plate” tesztben az i.c.v. adott (tehát inkább supraspinalisan ható) CART(62-102) esetében az analgetikus hatás ötször kisebb dózisonál jelenik meg, mint a hosszabb CART(55-102) peptid alkalmazásakor [Bannon és mtsai, 2001, *J Pharmacol Exp Ther* 299:1021–6]. A két CART peptid hatáserőssége közötti különbség a táplálékfelvételt tanulmányozó vagy a szorongást vizsgáló különböző viselkedési tesztekben is észlelhető, az egyik tesztben az egyik peptid, a másik tesztben a másik bizonyul hatékonyabbnak. A viselkedési tesztek eredményeit illetően az egyes szerzők által közölt adatok sok esetben ellentmondásosak, egyetértés leginkább csak abban van, hogy a két peptid hatáserőssége eltérő [Maixnerova és mtsai, 2007, *Peptides* 28:1945-53; Dylag és mtsai, 2006, *Peptides* 27:1926–33].