

PN2 164/1.10.2007 Conf. Dr. Alexandru Babes

Titlul proiectului:

MECANISMELE PERIFERICE ALE DURERII INFLAMATORII: ROLUL CANALELOR ACTIVATE DE TEMPERATURILE EXTREME, TRPA1 SI TRPV2

Director proiect: Conf. Dr. Alexandru Babes, Universitatea din Bucuresti
Sinteza proiectului PNCDI2 Idei contract 164/2007

1. Efectul GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) asupra co-exprimarii canalelor TRP sensibile la temperatură în neuronii senzitivi de șobolan în cultura

1.1. Introducere

Canalele TRP participa la traducerea semalelor induse de stimuli termici, mecanici și dureroși (nociceptivi). Din familia TRP fac parte șase canale ce percep și traduc stimuli termici, denumite canale termoTRP: TRPV1, TRPV2, TRPV3 și TRPV4 (Caterina et al., 1997; Ahluwalia et al., 2002; Peier et al., 2002; Watanabe et al., 2002) sunt sensibile la caldura, iar TRPM8 (Peier et al., 2002; McKemy et al., 2002) și TRPA1 (sau ANKTM1, Story et al., 2003) sunt activate de stimuli termici reci. TRPM8 este un canal cationic neselectiv, exprimat în neuronii senzitivi din ganglionii spinali și trigeminali. Este activat de frig moderat (prag de activare în jur de 25oC) și de compuși chimici precum mentolul, icilina, eucaliptol, etc. TRPA1 este un canal ionic activat de compuși iritanti precum uleiul de mustar, uleiul de scortisoara (aledhida cinamica), compusul activ din usturoi (alicina), acroleina etc, fiind deasemenea modulată de factori endogeni (bradikina). Activarea TRPA1 la frig și rolul sau în medierea nociceptiei la frig sunt deocamdata controversate. Pe de o parte se sustine faptul ca, în sisteme heterologe de expresie, TRPA1 este activat la temperaturi reci nocive, în jur de 17oC (Story et al. 2003; Bandell et al., 2004) în timp ce alți cercetatori nu au reușit să confirme activarea TRPA1 la racire (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005) sau nu au găsit dovezi pentru implicarea TRPA1 în sensibilitatea la frig în neuronii senzitivi (Babes et al., 2004). TRPV1 este un canal cationic neselectiv activat de capsaicina (compus iritant extras din ardeiul iute) și de temperaturi calde nocive (>42oC). TRPV1 este implicat în inflamatie și are rol în hiperalgezia inflamatorie. Numeroși compuși inflamatori sensibilizează TRPV1: bradikina, prostaglandina E2, NGF, ATP, pH acid, etc. Scopul proiectului l-a reprezentat caracterizarea efectului GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) asupra canalelor termoTRP TRPM8, TRPA1 și TRPV1 din neuronii senzitivi din ganglionii spinali de șobolan cultivați în mediu fara ser.

1.2. Materiale și metode:

Au fost extirpați ganglionii dorsali L1-S1 de la șobolani adulti, rasa Wistar și s-au realizat culturi primare de neuroni senzitivi în mediu fara ser. Jumatate din neuroni au fost incubati cronic cu GDNF 100ng/ml iar restul neuronilor au reprezentat controlul. Tehnica utilizata a fost imagistica de calciu non-ratiometrica. Celulele au fost încarcate cu indicatorul fluorescent de calciu Calcium Green 1-AM și au fost urmăriți mai multi parametri: modificările concentrației de calciu intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), pragul termic de

activare de catre frig (stimulul termic a fost o rampa de racire de 50 secunde, de la 32 la 17°C) și modificările proporiei diferitelor populații de neuroni. Protocolul experimental a constat în aplicarea unui stimul de racire, repetat în prezența mentolului, aplicare de AITC (allylthiocyanate) și capsaicină.

1.3. Rezultate

După incubarea cu GDNF, nivelul de co-exprimare între TRPM8 și TRPA1 a crescut semnificativ, de la 3% în control, la aproximativ 9% din totalul neuronilor studiați (chi square test, $p < 0.05$) (fig. 1.1 A). De asemenea, a crescut fracția de neuroni ce exprimă TRPM8 care co-exprimă și receptorul TRPA1 (fig. 1.1 B).

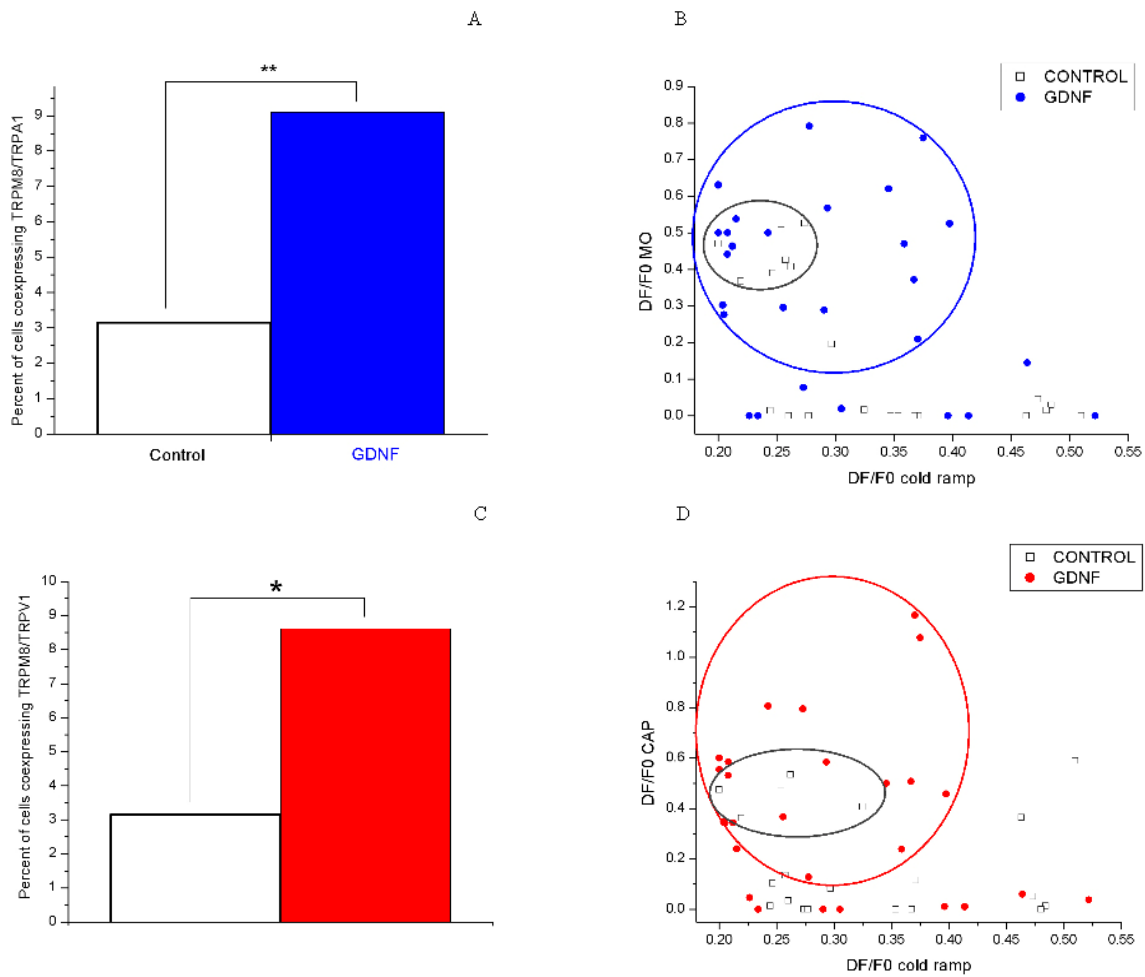


Figura 1.1. A. Gradul de co-exprimarea TRPM8-TRPA1 din populația totală de neuroni studiați. B. Fracția de neuroni care exprimă TRPM8 care co-exprimă și TRPA1 este crescută după tratamentul cu GDNF; C. Gradul de co-exprimarea TRPM8-TRPV1 din populația totală de neuroni studiați. D. Fracția de neuroni care exprimă TRPM8 care co-exprimă și TRPV1 este crescută după tratamentul cu GDNF.

Rezultate similare s-au înregistrat și în ceea ce privește co-exprimarea TRPM8-TRPV1, înregistrându-se o creștere a gradului de coexprimare atât în cadrul populației totale studiate (fig. 1.1 C) cât și în cadrul populației de neuroni care exprima TRMP8 (fig. 1.1 D). O altă observație a fost aceea că numărul de neuroni care exprima receptorul TRPA1 a crescut după tratamentul cu GDNF (de la 35% la 47%, $p < 0.05$) (fig. 2A). De asemenea, co-expresia TRPA1/TRPV1 a crescut de la 35% la 54% ($p < 0.01$). În populația de neuroni sensibili la capsaicina (care exprima cel mai probabil TRPV1), GDNF a indus o creștere a numărului de celule care exprima TRPA1 (fig. 1.2 B). În grupul de control doar 2% din neuroni co-exprima toate canalele studiate (TRPM8/TRPA1/TRPV1). În cazul neuronilor tratați cu GDNF procentul acestor neuroni a crescut la 8,5% ($p < 0,01$). Nu au fost observate efecte semnificative ale GDNF în ceea ce privește amplitudinea răspunsurilor și pragurile termice de activare la frig.

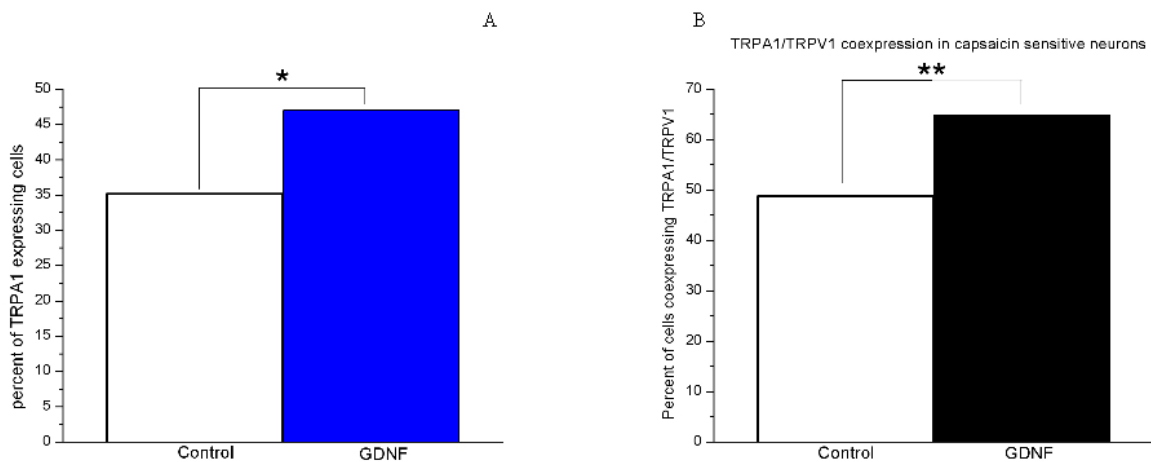


Figura 1.2. A. Tratamentul cu GDNF a crescut semnificativ fracția de neuroni sensibili care exprima TRPA1; B. în cadrul populației de neuroni activați de capsaicină (care exprima TRPV1) a crescut nivelul de co-exprimare cu receptorul TRPA1.

1.4. Concluzii

În concluzie, GDNF a indus o creștere a nivelului de co-exprimare între canalele TRPM8, TRPA1 și TRPV1, ceea ce indică o posibilă implicare în alterarea funcției și sensibilității neuronilor sensibili prin modificarea modelului de exprimare și a interacțiilor dintre receptorii TRP. Acest fapt este semnificativ deoarece TRPA1 și TRPV1 sunt receptori implicați în durerea acută și cronică. Expresia crescută a TRPA1 și creșterea gradului de co-exprimare TRPA1/TRPV1, TRPM8/TRPA1 și TRPM8/TRPV1 după tratamentul cu GDNF, reprezintă un posibil mecanism al alodiniei și hiperalgeziei, stări asociate cu inflamația.

2. Transfecția tranzitorie a celulelor HEK293 cu canalul TRPV1 uman

2.1. Introducere

Un obiectiv important al proiectului nostru pe anul 2008 a fost punerea la punct a metodelor de amplificare și purificare a ADN-ului plasmidic, precum și de realizare a transfecției tranzitorii a celulelor HEK293 (human embryonic kidney) cu canale termo-

sensibile din familia TRP (în particular TRPV1, TRPV2 și TRPA1). Acest demers de biologie moleculară a fost realizat în premieră în laboratorul nostru și, așa cum o ilustrează și figurile de mai jos, a fost realizat cu succes. Am folosit linia celulară HEK293 donată cu generozitate de către Prof. Peter McNaughton de la Cambridge University. Deasemenea, într-o primă fază am folosit clona canalului TRPV1 uman, donată de către dr. Gordon Reid de la University College Cork.

2.2. Materiale și metode

2.2.1. Amplificarea și purificarea ADN-ului plasmidic

Pentru amplificarea clonei TRPV1 (încorporată în plasmidul pcDNA3) am folosit bacterii TOP10 competente furnizate de către colaboratorii noștri de la Institutul Cantacuzino din București (dr. Geza Szegli). În aceleași condiții a fost amplificat și plasmidul ce conține clona GFP (Green Fluorescent Protein), o genă marker folosită pentru a identifica celulele transfectate cu succes. Bacteriile au fost incubate cu cca. 50 ng ADN pe gheață. După 20 min s-a procedat la transformarea bacteriilor prin șoc termic (40 s la 42°C), iar în continuare s-a adăugat mediu LB (LB Broth, Sigma) și bacteriile au fost menținute timp de 1 h la 37°C cu agitare. Ulterior, bacteriile au fost însămânțate pe mediu de agar (Luria Agar, Sigma), în prezența ampicilinei și lasate peste noapte la 37°C. A doua zi am constatat prezența coloniilor de bacterii transformate atât cu plasmidul care conține TRPV1 cât și cu cel care conține GFP. În continuare am trecut la obținerea de culturi "small scale" (5 ml) de bacterii în mediu lichid (LB). Culturile au fost ținute timp de 8 h la 37°C cu agitare. Volume bine precizate din culturile "small scale" au fost folosite pentru generarea de culturi "large scale" (50 ml), care au fost menținute peste noapte (12 h) la 37°C cu agitare. În ziua următoare s-a procedat la purificarea ADN-ului plasmidic din culturile "large scale", folosind kit-ul QIAfilter plasmid Midikit de la Qiagen. Concentrația de ADN plasmidic obținută a fost cuantificată spectrofotometric, prin determinarea absorbanței la 260 nm, iar puritatea prin măsurarea raportului dintre absorbanțele la 280 și 260 nm.

2.2.2. Transfecția celulelor HEK293 prin metoda co-precipitarii fosfatului de calciu

Pentru exprimarea funcțională a canalului TRPV1 uman în celule HEK293 am folosit o metodă simplă și necostisitoare, cea a co-precipitarii fosfatului de calciu. Astfel, s-a adăugat treptat, picatura cu picatura, o soluție ce conținea plasmidul în prezența unei concentrații crescute de ioni de calciu peste o soluție HBS (Hepes Buffered Saline) 2x. Ca urmare s-a obținut o suspensie de particule extrem de fine de precipitat la care au aderat moleculele de ADN, iar vasele Petri cu celule HEK293 dispuse la densitate scăzută (1:20 în urma pasării celulelor confluențe) au fost incubate timp de 8 h cu această suspensie, la 37°C și 5% CO₂. În urma incubării celulele au fost spălate cu mediu și s-a înlocuit mediul cu soluția de transfecție cu mediu normal de cultură. Eficiența transfecției a fost monitorizată cu ajutorul microscopiei de epifluorescență, prin cuantificarea celulelor fluorescente (care exprimă GFP în urma transfecției, fig. 2.1). Pentru a crește semnificativ probabilitatea ca celulele care exprimă GFP să exprime și TRPV1, cei doi plasmizi au fost adăugați în soluția de transfecție în raportul 1:10 (TRPV1:GFP).

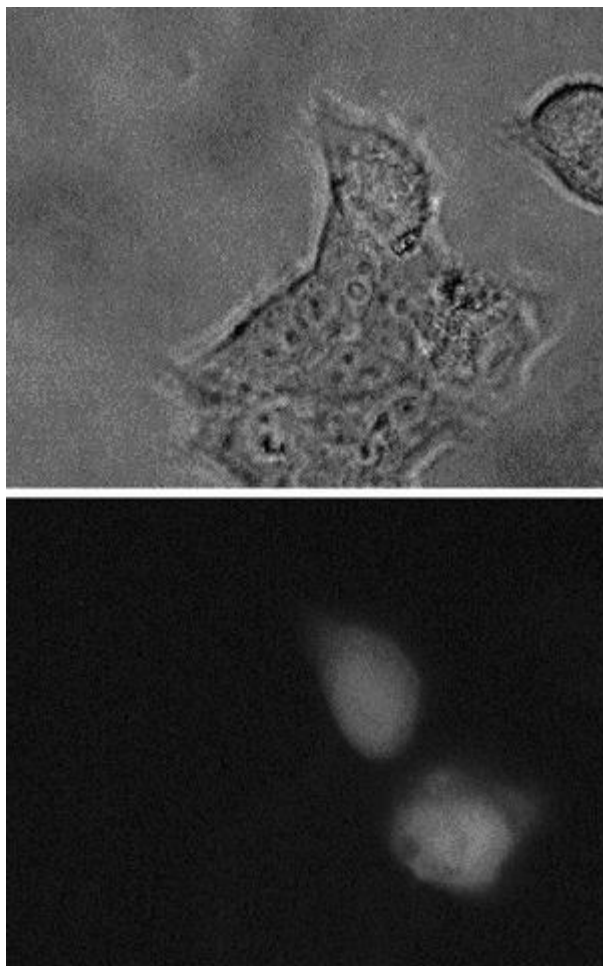


Fig. 2.1. Imaginea aceluiași câmp optic cu celule HEK293 transfectate tranzitoriu cu TRPV1 și GFP în microscopie de contrast de faza (sus) și în epifluorescență (jos). Se observa prezenta a doua celule fluorescente (exprima GFP).

2.3. Rezultate

În urma transfectării cu succes a celulelor HEK cu GFP și TRPV1 (fig. 2.1) am investigat activitatea canalului TRPV1 folosind două metode distincte: microfluorimetria de calciu și tehnica de patch-clamp. În primul caz, celulele au fost transfectate doar cu TRPV1 (prezența GFP ar fi interferat cu fluorescența indicatorului de calciu), după care au fost depuse pe lamele de sticlă și incubate cu indicatorul fluorescent Calcium Green-1 AM. Ulterior, lamelele au fost așezate pe masa microscopului cu fluorescență Olympus IX-70 și celulele au fost stimulate cu capsaicina (50 nM) și cu căldura nocivă ($>43^{\circ}\text{C}$). În calitate de martor am folosit celule netransfectate, care au fost stimulate în aceleași condiții. Aceste celule netransfectate nu au răspuns printr-o creștere a concentrației de calciu intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nici la aplicarea de capsaicină, și nici la stimularea termică. Spre deosebire de lotul martor, o fracțiune importantă de celule transfectate au răspuns atât la capsaicină cât și la căldura printr-o creștere substanțială și reproductibilă a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fig. 2.2). Așa cum se poate observa în figura 2.2, celulele au fost stimulate de două ori cu capsaicină (50 nM, 30 s) și odată cu căldură nocivă. În figura sunt ilustrate patru celule

HEK293 care au raspuns la toți acești stimuli, de unde rezulta ca toate aceste celule au exprimat TRPV1 uman în urma transfecției tranzitorii.

Celule HEK293 transfectate tranzitoriu cu hTRPV1

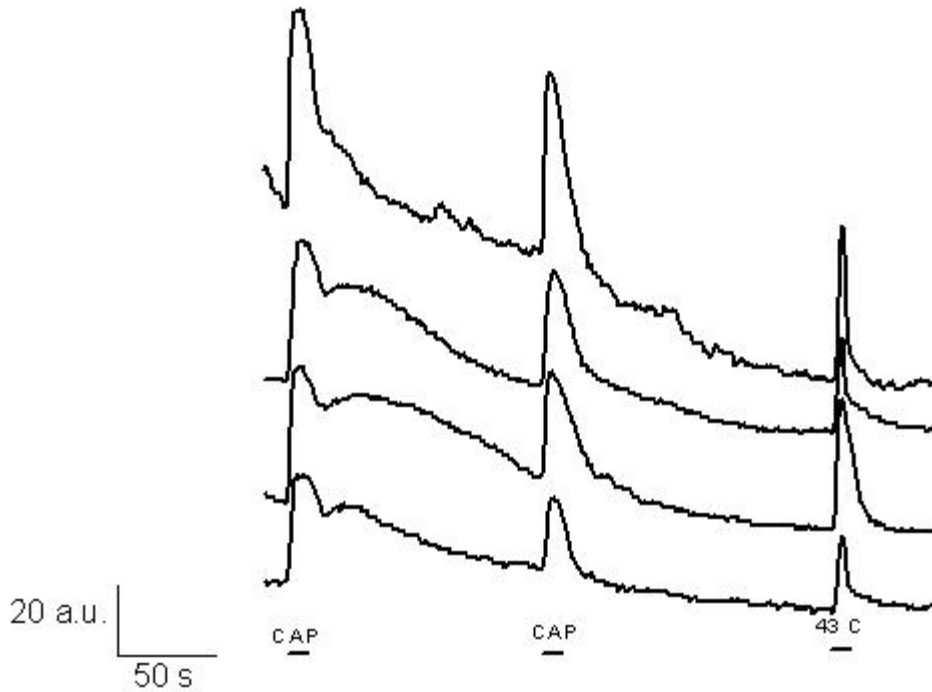


Fig. 2.2. Trasee de fluorescență a Calcium Green-1 AM în patru celule HEK293 care exprima hTRPV1 în urma transfecției tranzitorii. Se observa ca toate celulele raspund la aplicarea de capsaicina (reproductibil) și la stimularea termică cu căldura nocivă.

în cazul folosirii tehnicii de patch-clamp, celulele au fost co-transfectate cu TRPV1 și GFP (în proporție de 10:1) pentru a putea fi identificate optic (în epifluorescență) celulele care exprima GFP (și foarte probabil și TRPV1).

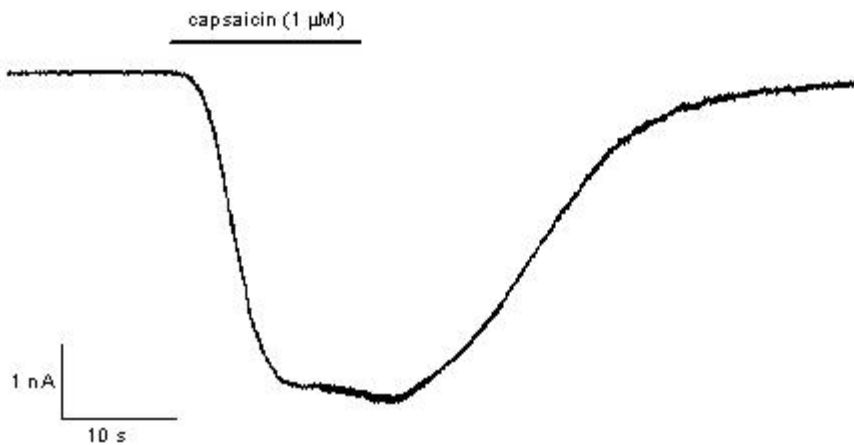


Fig. 2.3. Curent activat de capsaicina (1 microM, 15 s) într-o celula HEK293 transfectata tranzitoriu cu hTRPV1.

La fel ca și în cazul experimentelor de imagistica de calciu, celulele martor (netransfectate) nu au prezentat vreun raspuns (modificare a curentului de membrana) la aplicarea de capsaicină în configurația whole-cell voltage-clamp, la potențialul de membrana de 60 mV (holding potential). În aceleași condiții, celulele transfectate cu hTRPV1 au raspuns prin apariția unui curent cationic spre interior (fig. 2.3.). Aceste rezultate confirmă exprimarea funcțională a canalului TRPV1 uman în celulele HEK293 în urma transfecției tranzitorii realizate prin metoda co-precipitarii fosfatului de calciu.

2.4. Concluzii

În urma acestor rezultate putem afirma că am reușit să obținem înregistrări ale activității canalelor hTRPV1 exprimate heterolog în linia celulară HEK293 (de origine umană), ceea ce deschide calea către investigarea altor canale TRP (în special TRPV2 și TRPA1) în aceleași condiții. Sistemul heterolog de expresie, deși mai puțin fiziologic decât sistemul nativ (neuronii senzitivi din ganglionii spinali), permite înregistrarea activității canalelor ionice în izolare, adică în absența altor canale sau receptori care pot perturba funcționarea canalului de interes. De asemenea, acest tip de experiment ne va permite co-exprimarea canalelor TRP cu receptori ai mediatorilor inflamatori (bradikinină, prostaglandina E2, histamină, serotonină) și investigarea în detaliu cu mijloace farmacologice a modularii acestor canale în condiții inflamatorii.