

Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszertudományi Centrum  
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika (igazgató: Dr. Kemény Lajos egyetemi tanár)<sup>1</sup>  
és a Magyar Tudományos Akadémia - SZTE Dermatológiai Kutatócsoport  
(igazgató: Dr. Dobozy Attila egyetemi tanár)<sup>2</sup>

## Galanin receptorok azonosítása humán keratinocitákon és humán bőrben

### Galanin receptor expression in human keratinocytes and in normal human skin

DALLOS ATTILA<sup>1</sup>, KISS MÁRIA DR.<sup>1</sup>, POLYÁNKA HILDA<sup>2</sup>, DOBOZY ATTILA DR.<sup>1,2</sup>,  
KEMÉNY LAJOS DR.<sup>1,2</sup>, HUSZ SÁNDOR DR.<sup>1</sup>

#### ÖSSZEFOGLALÁS

A galanin (GAL) az idegrendszerben széles körben elterjedt neuropeptid, amely hatását különböző GAL receptorokon keresztül fejti ki. Humán bőrben GAL-szerű immunreaktivitást jelentettek a dermisz szabad idegvégződéseiben. Habár a GAL receptorok meglete alapvető fontosságú a biológiai funkcióhoz a kifejeződését az altípusoknak még nem vizsgálták tenyésztett humán keratinocitákon. A tanulmányunk célja volt megvizsgálni a különböző receptorok jelenlétét mind mRNS mind fehérje szinten. PCR segítségével csupán a GALR2 mRNS jelenlétét tudtuk igazolni HaCaT sejtekben és keratinocitákban. A GALR2 fehérje meglétének vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel feltárta a receptor jelenlétét mindkét sejtípuson továbbá a normál humán bőr immunhisztokémiai vizsgálatai feltárták, hogy a GALR2 főleg az epidermisz bazális rétegében fejeződik ki. A keratinociták galamin kezelése növekedést eredményezett a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentrációban, amely támogatja azt az elképzelést, hogy a GALR2 egy működő receptor.

**Kulcsszavak:**  
humán keratinocita - galanin receptorok

#### SUMMARY

Galanin (GAL) is a neuropeptide that widely distributed in nervous system. GAL exerts action via diverse GAL receptors. In human skin GAL-like immunoreactivity has been reported in free nerve ending of the dermis. Although the GALRs are essential for biological functions, the expressions of different GALR subtypes in cultured human keratinocytes have not yet been investigated. The aim of our study was to study the presence of the different receptors both on mRNA level and on protein level. Using RT-PCR only the presence of the GALR2 mRNA was identified in HaCaT cells and keratinocytes. To investigate the presence of GALR2 protein by immunohistochemistry has revealed its presence on both of the cell types in addition immunohistochemical investigations of normal human skin revealed that GALR2 was expressed mainly in the basal layer of the epidermis. GAL treatment of the keratinocytes resulted in an increase in Cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, suggesting that GALR2 is a functional receptor.

**Key words:**  
human keratinocyte - galanin receptors

A humán bőr az ember legnagyobb szerve, amely részben elhatárolja a belső szerveket, részben felfogja a külvilág ingereit. Régebben a bőrt passzív szervnek tekintették, de mára ez a nézet jelentősen megváltozott. Ezt támasztja alá az ún. SIS (Skin immune System) a bőr immunrendszerének megléte is, melynek jellegzetes sejtjei a keratinociták, Langerhans sejtek, T-limfociták (1). Az utóbbi időkben egyre több kísérleti eredmény igazolja, hogy a SIS szorosan együttműködik a perifériás idegrendszerrel, amelynek rostjai gazdagon behálózzák a bőrt.

Ez az együttműködés egyaránt megtalálható a bőr fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban. A perifériás idegrendszer elsősorban az idegvégződésekből felszabaduló neuro-

peptidek által befolyásolja a SIS működését. Ezen neuropeptidek egyik kevésbé vizsgált képviselője a galanin.

Az 1983-ban felfedezett neuropeptid emberben 30 aminosavból áll. A különböző emlős fajok között erős a szerkezeti homológia (2). A galanin széles körben megtalálható a központi és a környéki idegrendszerben, amely sokrétű biológiai szerepet sejtet. Humán bőrben Johansson és mtsai (3), majd legutóbb Kofler és mtsai (4) mutattak ki galanin immunreaktivitást. Hatásával kapcsolatban még sok a kérdőjel, de úgy tűnik, a bőrben felszabaduló többi neuropeptidhez hasonlóan a galanin is befolyásolja a vasculáris permeabilitást, immunmoduláló szerepet tölt be és feltehetően a sejtnövekedés és proliferáció szabályozásá-

ban is részt vesz (5). Kísérleti tény, hogy gátolja a vasodilatációt galamb bőrben és ez inflammatórikus hatást sejtet (6,7). *Jimenez-Andrade és mtsai* szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a galanin aktívan részt vesz a bőr gyulladásos folyamatainak modulálásában (8,9).

Ezen sokrétű biológiai szerepét a galanin G-fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztül fejti ki. Három különböző receptor altípus ismert GALR1, GALR2 és GALR3 (10,11), melyek különböznek szerkezetükben, elhelyezkedéseikben, különböző gének kódolják őket, melyek különböző humán kromoszómákon helyezkednek el. GALR1 főleg a központi idegrendszerre jellemző (12) míg a GALR3 főleg a perifériás szövetekben fordul elő. A legsebésebb körben elterjedt receptor a GALR2. Kifejeződik mind a környéki, mind a központi idegrendszerben valamint számos perifériás szövetben (13). Munkánk célja volt annak megállapítása, hogy a humán keratinociták rendelkeznek-e receptorral a galanin számára és amennyiben rendelkeznek melyik altípussal.

## Módszerek

### Sejttenyésztés

A receptorok meglétének vizsgálata tenyésztett humán keratinocitákon történt, melyeket egészséges emberek plasztikai műtétei során nyert mintákból izoláltunk. Továbbá vizsgálatokat végeztünk spontán immortalizált humán keratinocita sejtvonalon (HaCaT sejtek) is.

### Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk Trizol-os módszerrel. Az így nyert RNS koncentrációját meghatároztuk és 1µg RNS-t írtunk át cDNS-é iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD) felhasználásával.

A receptorok mRNS szintű kimutatása PCR segítségével történt a megfelelő, specifikus primerek alkalmazásával. Az amplikonokat agaróz gélen megfuttattuk majd a kapott sávból a terméket visszaizoláltuk. A felamplifikált és a gélből visszaizolált termék azonosítása szekvencia analízissel történt.

### Immuncitokémia és immunhisztokémia

Immuncitokémiai vizsgálatok céljára tenyésztett humán keratinocitákat és HaCaT sejteket üveg tárgylemezre vittük fel citocentrifuga segítségével, illetve plasztikai műtéten átesett emberek bőrmintáiból fagyasztott metszeteket készítettünk, amelyeken immunhisztokémiát végeztünk. Elsődleges ellenanyagként anti-humán GALR2 ellenes poliklonális antitestet használtunk.

### Sejten belüli $Ca^{2+}$ koncentráció mérése

A sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentráció változásának meghatározására tenyésztett humán keratinocitákat festettünk Fura-2-vel, egy  $Ca^{2+}$  kelátor festékkal 40 percig majd a sejteket indukáltuk galaninnal. A komplexképződés hatására létrejövő fluoreszcencia változásokat egy Hitachi F-2500 spektorfluorométerrel mértük. A kapott értékekből számoltuk ki a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentrációt.

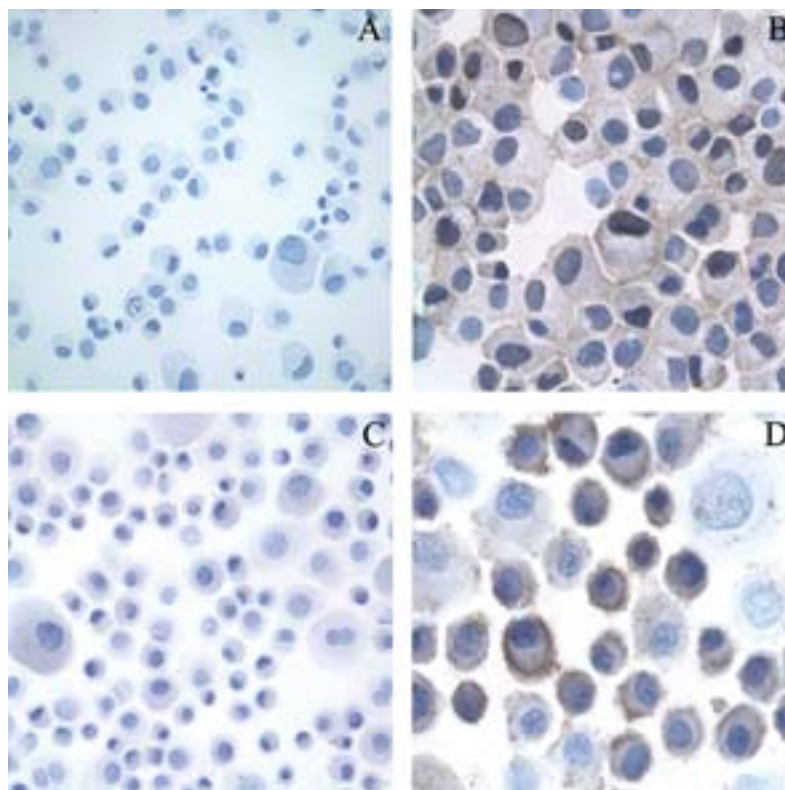
## Eredmények

*GAL receptor mRNS-k kifejeződése HaCaT sejtekben és tenyésztett humán keratinocitákban.*

Első lépésben mRNS szinten vizsgáltuk a különböző galanin receptorok kifejeződését RT-PCR segítségével. Pozitív kontroll céljára humán vékonybelet használtunk a GALR1 és GALR2 esetében, illetve humán agy cDNS-t a GALR3 esetében. A PCR termékeket megfuttattuk agaróz gélen. HaCaT vagy keratinocita cDNS-t használva, nem kaptunk terméket sem a GALR1 sem a GALR3 esetében. Viszont megvizsgálva a GALR2 kifejeződését, kaptunk egy éles sávot az agaróz gélen a kívánt magasságban mind a HaCaT mind a keratinociták esetében. A kapott terméket visszaizoláltuk a gélből és megszekvenáltattuk. A szekvencia analízis igazolta hogy a termékünk a GALR2 mRNS.

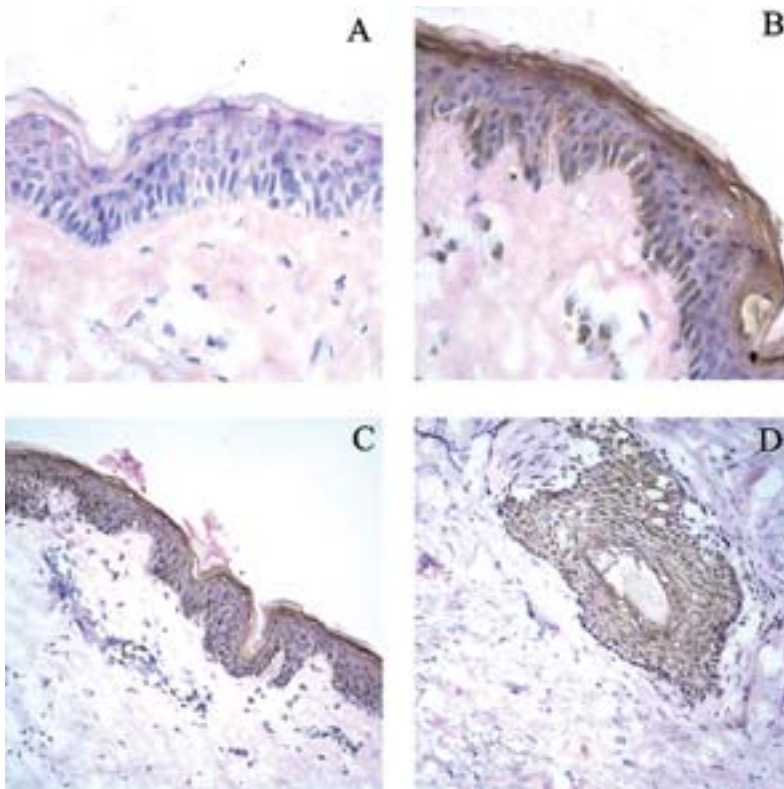
### *GALR2 fehérje vizsgálata HaCaT és tenyésztett humán keratinociták sejt felszínén*

A GALR2 fehérje meglétét HaCaT sejteken és tenyésztett humán keratinocitákon immuncitokémiával igazoltuk poliklonális humán GALR2 antitest használatával. HaCaT sejteken az ellenanyag használatával egyenletes festődést tapasztaltunk a sejtek teljes felszínén. Szintén erős festődés volt látható a tenyésztett keratinocitákon is azzal a különbséggel, hogy a differenciálabb sejtek kevésbé festődtek. Készítettünk negatív kontrollokat, melyek egyik sejtípus esetében sem mutattak festődést (1. ábra).



1. ábra

GALR2 immuncitokémiai vizsgálata HaCaT sejteken és tenyésztett human keratinocitákon. Negatív kontroll HaCaT sejtekre (A) és human keratinocitákra (C). Pozitívan festődő HaCaT sejtek (B) és tenyésztett human keratinociták (D). A sejtmagok haematoxylinnal voltak megfestve.



2. ábra

GALR2 elhelyezkedése a human bőr különböző rétegeiben.

Negatív control (A) nem mutat festődést. A (B) ábrán egy erősebb festődés látható a bazális keratinocitákon. Pozitív festődésű véredek és hajhagyma keresztmetszet látható a (C) illetve (D) ábrán. A sejtmagok haematoxylinnel voltak megfestve.

#### *GALR2 in situ kifejeződése humán bőrben*

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz plasztikai műtéten átesett emberek bőrét használtuk, melyekből fagyasztott metszeteket készítettünk. A metszeteken elvégezve az immunhisztokémiát intenzív festődést tapasztaltunk az epidermisz bazális rétegében és a dermiszben lévő véredek körül (2. ábra).

#### *GALR2 szerepe a szignalizációs folyamatokban*

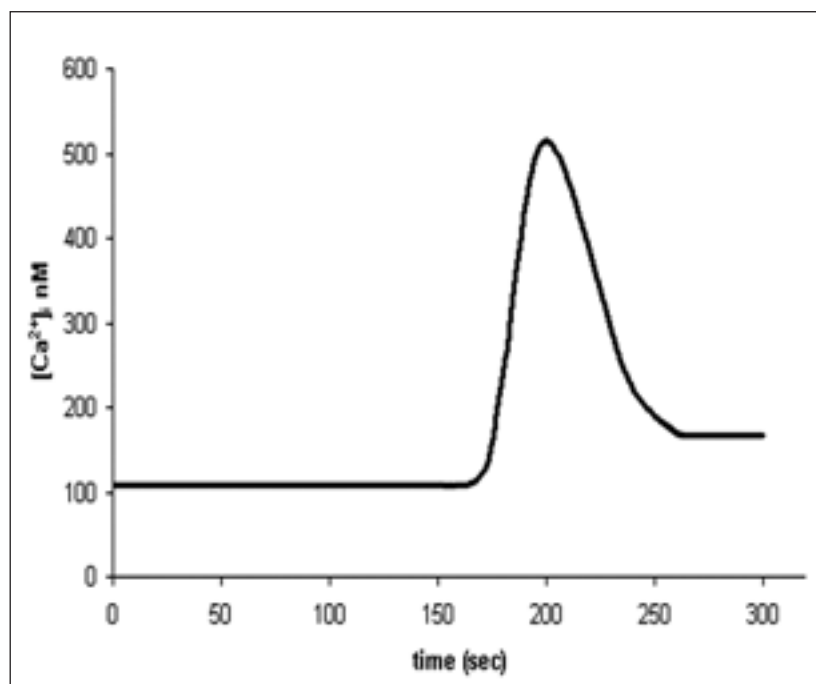
A galanin hatását a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentráció befolyásolására humán keratinocitákon vizsgáltuk. Az előzőleg Fura-2 festékkel feltöltött sejteket galaninnal indukáltuk majd mértük a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentrációban bekövetkező változásokat.

A mérés kezdetétől számítva 107 másodperc múlva elkezdett növekedni a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentrációja, amely a csúcspontját körülbelül 200 másodperc múlva érte el. Ekkor a kezdeti  $Ca^{2+}$  koncentráció 5-szörösét tapasztaltuk (3. ábra).

## Megbeszélés

A jelen tanulmányban kimutattuk a GALR2 mRNS és fehérje jelenlétét tenyésztett humán keratinocitákon és normál humán bőrben, továbbá demonstráltuk a galanin hatását a sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentráció megváltoztatására. A galanin és annak receptorai számos helyen megtalálhatók mind az idegrendszerben, mind a perifériás szövetekben. Galanin kötőhelyek és galanin mRNS első leírása bőrben *Ji és mtsai* (14) nevéhez fűződik, akik patkány bőrt vizsgáltak. Humán bőrben galanin-szerű immunreaktivitást sikerült kimutatni *Kofler és mtsai*-nal (4) akik galanin-kötőhelyeket is találtak a véredek és verejtékmirigyek körül autoradiográfiát használva.

A galanin hatása három G-fehérjével kapcsolatos receptoron keresztül valósul meg, GALR1, GALR2 és GALR3. Megvizsgáltuk mindhárom receptor mRNS jelenlétét HaCaT sejtekben és humán keratinocitákban PCR segítségével. GALR1 és GALR3 mRNS jelenlétét csak a pozitív kontroll esetében tudtuk kimutatni. Viszont a GALR2 mRNS-t megtaláltuk HaCaT sejtekben és keratinocitákban egyaránt. Fehérjeszinten vizsgálva a GALR2 jelenlétét, mind HaCaT sejteken mind humán keratinocitákon erős festődést találtunk a poliklonális anti-GALR2 antitest használatával.



3. ábra

A sejten belüli  $Ca^{2+}$  koncentráció változása galanin indukciót követően



Mivel a GALR2-ről korábban leírták, hogy szerepe lehet a Ca<sup>2+</sup> mobilizációban (15) így nyilvánvalóvá vált ennek a hatásnak vizsgálata tenyésztett humán keratinocitákban. A GALR2 funkcionalitásának vizsgálata során mértük a ligand receptor kötődés hatására létrejövő változást a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> koncentrációban, amely tranzienst növekedést eredményezett. Mivel a Ca<sup>2+</sup> egy fontos és gyakori másodlagos hírvivő számos jelátviteli folyamatban, így szerepe lehet a gyulladási folyamatok befolyásolásától kezdve egészen a sebgyógyulás folyamatáig.

Összefoglalva, munkánk során elsőként sikerült kimutatni a GALR2-t keratinocitákon mind mRNS, mind fehérje szinten. A receptor jelenlétét igazoltuk *in vivo* humán bőrben is. A GALR2 funkcionalitásának vizsgálata során sikerült kimutatni egy tranzienst Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelkedést a keratinocitákban galanin indukciót követően.

### Köszönetnyilvánítás:

Ezt a munkát a Magyar Tudományos Kutatási Alap támogatta (OTKA T 034 964, TS 044 826, T 061 541, NI 62007 és GVOP-0149)

### IRODALOM

1. *Bos J. D., Kapsenberg M. L.*: The skin immune system, progress in cutaneous biology. *Immunol Today*. (1993) *14*, 75-78.
2. *Tatemoto K. és mtsai*: Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* (1983) *164*, 124-128.
3. *Johansson O. és mtsai*: Immunohistochemical evidence of galanin in sensory nerves of human digital skin. *Acta Physiol Scand* (1988) *132*, 261-263.
4. *Kofler B. és mtsai*: Expression of neuropeptide galanin and galanin receptors in human skin. *J Invest Dermatol* (2004) *122*, 1050-1053.
5. *Holmes FE, Mahoney S-A, Wynick D.*: Use of genetically engineered transgenic mice to investigate the role of galanin in the peripheral nervous system after injury. *Neuropeptides* (2005) *39*, 191-199.
6. *Santha P., Pierau F. K., Jancso G.*: Evidence for an inhibition by endogenous galanin of neurogenic cutaneous vasodilatation in the pigeon. *Neurosci Lett* (1998) *243*, 101-104.
7. *Santha P., Pierau F. K., Jancso G.*: Inhibitory modulation of cutaneous vascular responses by endogenous galanin in the pigeon. *Neurosci Lett* (1999) *273*, 64-66.
8. *Jimenez-Andrade J. M. és mtsai*: Pro-nociceptive role of peripheral galanin in inflammatory pain. *Pain* (2004) *110*, 10-21.
9. *Jimenez-Andrade J. M. és mtsai*: Mechanism by which peripheral galanin increases acute inflammatory pain. *Brain Res* (2005) *1056*, 113-7.
10. *Habert-Ortoli E. és mtsai*: Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) *91*, 9780-9783.
11. *Branchek T. A., Smith K. E., Walker M. W.*: Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann N Y Acad Sci* (1998) *863*, 94-107.
12. *Burgevin M. C. és mtsai*: Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J Mol Neurosci* (1995) *6*, 33-41.
13. *Kolakowski L. F. Jr. és mtsai*: Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* (1998) *71*, 2239-2251.
14. *Ji R. R. és mtsai*: Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation. *Neuroscience* (1995) *68*, 563-576.
15. *Kerekes N. és mtsai*: Galanin increases membrane excitability and enhances Ca<sup>2+</sup> currents in adult, acutely dissociated dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* (2003) *18*, 2957-2966.

Érkezett: 2006. VI. 20.

Közlésre elfogadva: 2006. VII. 10.