

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Új neuroendokrin szabályozó mechanizmusok
vizsgálata a humán bőrben**

Volascsekné Tóth Kinga Fanni

Témavezető: Dr. habil. Oláh Attila



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Új neuroendokrin szabályozó mechanizmusok vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: **Volascsekné Tóth Kinga Fanni**
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. habil. Oláh Attila

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, MTA doktora
Dr. Szöőr Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA rendes tagja
tagok: Prof. Dr. Bata - Csörgő Zsuzsanna, MTA doktora
Dr. Szöőr Árpád, PhD
Dr. Kemény Lajos Vince, PhD
Dr. Dajnoki Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. június 7. 13 óra

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az emberi test egyik legnagyobb szerve a bőr, mely kiemelkedő szerepet tölt be a szervezetünk védelmében. Összetett barrier rendszert képezve, az immunrendszerrel szoros együttműködésben egyaránt véd a környezetünkből érkező kémiai, fizikai/mechanikai és biológiai behatásokkal szemben. Munkacsoportunk hosszú évek óta foglalkozik a bőr (kór)élettani folyamataival, illetve azzal, hogy a bőrben fellelhető különböző sejttípusok hogyan járulnak hozzá a gyulladással és/vagy viszketéssel járó kórképek kialakulásához vagy éppen javulásához. Laboratóriumunk kutatásainak másik alappillére az endokannabinoid rendszer (ECS) vizsgálata. Az ECS egy összetett élettani szabályozó rendszer, melynek receptorai és endogén ligandjai a szervezetben szinte mindenhol, így a bőrben is megtalálhatóak. Az ECS „klasszikus” tagjai mellett a bőrben az ionotróp kannabinoid receptorként is funkcionáló tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatorna család tagjai is jelen vannak. Minthogy a közelmúltban kimutattuk, hogy a főként Ca^{2+} -ra permeábilis, hőérzékeny TRPV1, -2 és -4 ioncsatornák kifejeződnek a humán faggyúmirigyek sejtjeiben, az értekezés alapjául szolgáló egyik publikációban a negyedik „melegérzékeny” TRPV csatorna, a TRPV3 kifejeződését és szerepét vizsgáltuk meg humán sebocitákon.

Kísérleteink második felében egy, a kannabinoid rendszerhez közvetlenül nem kapcsolódó anyag, a klinikai gyakorlatban évtizedek óta biztonságosan alkalmazott antidepresszáns fluoxetin (FX) hatásait vizsgáltuk humán epidermális keratinocitákon, különös tekintettel a molekula lehetséges gyulladásgátló hatásaira, illetve a FX bőrgyógyászati repozícionálásának lehetőségére.

A faggyúmirigyek és az akne

A faggyúmirigyek rendellenes működéséhez leggyakrabban kapcsolható kórkép az akne, vagyis a pattanásosság. Patogenezisét tekintve komplex folyamatról van szó, amelynek kialakulásában négy fő tényező vesz részt, melyek

a szeborrea, vagyis fokozott mennyiségű és megváltozott minőségű faggyú termelődése, a kivezetőcső abnormális keratinizációja, a patogén *Cutibacterium acnes* (korábbi nevén: *Propionibacterium acnes*) törzsek elszaporodása a piloszebáceus egységben, valamint az ezzel párhuzamosan kialakuló kóros gyulladáshoz vezető folyamatok. A fentiek mellett az akne patogenezisében fontos szerepet játszanak az androgénhormonok is, hiszen a faggyútermelés fokozódása sok esetben összefügg a férfi nemi hormonok túlermelésével. A pattanások jellegzetesen az arcon jelennek meg, ugyanakkor gyakoriak a háton és a mellkason is. Az akne megjelenési formái lehetnek a különféle nem gyulladáshoz vezető léziók, azaz a nyitott vagy zárt komedók (mitesszerek), valamint az általában papulák, pustulák, illetve ciszták formájában jelentkező gyulladáshoz vezető elváltozások. Az akne sikeres kezelése gyakran különböző kezelési módok kombinált bevetését igényli. A jelenleg elérhető leghatékonyabb anti-akne szer az izotretinoin; alkalmazásakor azonban súlyos mellékhatások (egyebek mellett teratogenitás) fordulhatnak elő.

Mindezek alapján érthető, hogy világszerte komoly igény mutatkozik olyan új terápiás megoldások azonosítására, amelyek a jelenleg elérhetőnél kedvezőbb mellékhatásprofil mellett lehetnek képesek hatékonyan enyhíteni az akne különböző formáinak a tüneteit.

A TRP csatornák szerepe a faggyúmirigyekben

A TRP csatornák a bőrben többféle sejttípusban többek között a keratinocitákban, szenzoros neuronokban, melanocitákban, valamint különböző immunsejtekben is kifejeződnek, és szerepet játszanak számos élettani folyamat szabályozásában. Fontosságukat jól jelzi, hogy egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy ezen TRP csatornák rendellenes működése olyan betegségek és (kór)állapotok kialakulásához vezethet, mint a krónikus fájdalom, a viszketés, különféle bőrgyulladás formák, vitiligo, alopecia, a sebgyógyulás zavarai, különböző bőrdaganatok vagy éppen a barrier károsodása.

A fentiekén túl munkacsoportunk az elmúlt években számos bőrélettani folyamatban vizsgálta a TRP csatornák funkcionális szerepét. Nemrégiben kimutattuk, hogy a TRPV3 stimulációja az NF- κ B útvonalon keresztül erős gyulladáshoz vezet ki humán epidermális keratinocitákon és számos irodalmi, illetve saját adat szól amellett, hogy a TRPV3 overexpressziója és túlműködése az epidermális keratinocitákon jelentősen hozzájárul az atópiás dermatitisz (AD) esetén jellemző bőrgyulladás és kénző viszketés kialakulásához. Bár a fentiek alapján elmondható, hogy egyes TRPV csatornák fontos szerepet játszanak a bőr, és közelebbről a sebociták biológiai folyamatainak szabályozásában, a TRPV3-mal kapcsolatban, humán faggyúmirigyekben kísérleteink idején még nem álltak rendelkezésre kísérletes adatok. Mindezek fényében kísérleteink első felében arra fókuszáltunk, hogy a bőrben már sokrétűen vizsgált TRPV3 kifejeződését és szerepét megvizsgáljuk a humán sebocitákon is.

A bőr barrier funkcióinak épsége nélkülözhetetlen a szervezet túléléséhez. Ennek működési zavarai, illetve károsodása olyan rendkívül gyakori betegségekhez vezethet, mint az ekcémaként is ismert AD. Az AD egy rendkívül összetett kórkép, amely számos különböző klinikai altípusba, valamint tünet- és patogenezis szempontjából differenciált alcsoportokba osztályozható. Közismert, hogy az AD tüneteinek kialakulásában fontos szerepet játszanak a fizikai-kémiai, mikrobiológiai és immunológiai barrier zavarai. Egyebek mellett az epidermális keratinociták differenciálódásának zavara és ezáltal a fizikokémiai barrier hibás működése, genetikai hajlam (pl. filaggrin mutációk) vagy más tényezők miatt, a bőr rendellenes lipidtermelése, a bőrfelszín fokozott pH-ja, a bőr mikrobióta kóros elváltozásai, valamint a kóros T_H2/T_H22 -domináns immunválasz mind jelen vannak AD-ben. Az említett folyamatok mellett a közelmúltban fény derült arra, hogy a Toll-like receptor (TLR)-3 expressziója szintén összefügg az AD tüneteinek súlyosságával. A TLR3 aktivációja nemcsak antimikrobiális peptidek és különféle citokinek felszabadulásához vezethet, hanem más, a bőr (kór)élettani

folymatai szempontjából fontos, pl. viszketést előidéző mediátorok termelődését is kiválthatja. Ebből a szempontból kiemelkedően fontos a fent említett, keratinocitákban expresszálandó TLR3. Éppen ezért választottuk jelen kísérleteink során a poliinozin:policitidilsav (p(I:C)) – TLR3 gyulladáscsökkentő modellt, hiszen a TLR3-nak szerepe van az AD patogenezisében és a viszketés, valamint a tüneteket jelentősen rontó „viszketés-vakarás ciklus” kialakulásában, továbbá szerepe lehet az AD mellett egyéb viszketéssel járó kórképekben is.

A FX egy szelektív szerotonin visszavételezést gátló (SSRI) farmakon, a klinikumban évtizedek óta használatos antidepresszáns szer. Fontos megemlíteni, hogy újabb (állatkísérletekben nyert) eredmények alapján a FX különböző szövetekben (így többek között a bőrben is) számottevő gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki, viszketéscsillapító hatása lehet, továbbá elősegíti a mikrodisszektált humán szőrtüszők (re)pigmentációját is. Fontos megjegyezni, hogy a FX gyulladáscsökkentő hatása a legtöbb esetben valószínűleg független a klasszikus szerotoninerger jel pályától és inkább más jelátviteli útvonalakkal való kölcsönhatás révén alakulhat ki. Ilyen lehetséges alternatív útvonalak az NLRP3 inflammoszóma aktiváció, a nitrogén-oxid termelés, illetve a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) útvonal gátlása.

A FX klinikai alkalmazása során a többi SSRI molekulához képest kedvezőbb biztonságossági és mellékhatásprofil mutat. Emiatt, valamint a fentiekben említett gyulladásgátló, viszketéscsillapító és egyéb „nem klasszikus” hatások fényében nem meglepő, hogy már több esetben felmerült az indikációs területének kiterjesztése, azaz a „drug repurposing” gondolata. A fentiekre figyelemmel jelen vizsgálatainkban a FX lehetséges gyulladásgátló hatásainak további feltárását tűztük ki célul humán epidermális keratinocitákon.

Célkitűzés

A fentiekben részletezett irodalmi adatok és korábbi eredményeink fényében a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Kifejeződik-e a TRPV3 humán szebocitákon, és ha igen, milyen szerepet játszik a sejtek jellemző biológiai folyamatainak (pl. faggyúlipid-szintézis), valamint immunfenotípusának szabályozásában?
2. Miként befolyásolja a FX a humán epidermális keratinociták gyulladási folyamatait, és mi lehet a hatás mechanizmusa?

Anyagok és módszerek

Az SZ95 humán, immortalizált szebociták tenyésztése

Az SZ95 szebocitákat Sebomed® Basal Mediumban tenyésztettük, melyet hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal (FBS), humán rekombináns epidermális növekedési faktorral és CaCl₂-dal, valamint MycoZap™ Plus-CL antibiotikum készítménnyel egészítettük ki. Tenyésztés során a sejteket 5% CO₂ tartalmú 37 °C hőmérsékletű termosztátban tartottuk. A tenyészetek esetleges *Mycoplasma* kontaminációját rendszeresen ellenőriztük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A sejtek tenyésztését *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila, Galicz Anita és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK) tenyésztése

A NHEK-kat sebészeti beavatkozáson átesett, bőrgyógyászatiilag egészséges egyénekből izoláltuk. A kísérletekre a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával (azonosítók: IX-R-052/01396-2/2012, IF-1647-2/2016, IF-1647-9/2016, IF-778-5/2017, 61566-5/2021/EÜIG, DE RKEB/IKEB 4988-2018), a Helsink Deklaráció irányelveinek betartása mellett került sor. A donorok megfelelő tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták mintáik kutatási célú felhasználásához. A sejteket szérummentes EpiLife tápoldatban tenyésztettük, amelyet a keratinociták növekedését elősegítő HKGS-sel egészítettük ki. Az NHEK-kat 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú, párásított légkörben tenyésztettük, és a kísérletekhez csak a 4. passzázsszám alatti keratinocitákat használtuk fel. A sejtek izolálását és tenyésztését *Szabó-Papp Judit, Galicz Anita, Ádám Dorottya, Barotáné Kovács Mónika és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A HaCaT keratinocita sejt vonal tenyésztése

A humán immortalizált HaCaT keratinocitákat 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú, párasított környezetben, DMEM tápoldatban tenyésztettük, amelyet hőinaktivált FBS-sel és antibiotikum készítménnyel egészítettünk ki. A tenyészetek esetleges *Mycoplasma* kontaminációját rendszeresen ellenőriztük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A sejtek tenyésztését *Szabó-Papp Judit, Galicz Anita, Barotáné Kovács Mónika, Ádám Dorottya, Arany József és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Immunfluoreszcens jelölés

A sejteket jéghideg acetonban fixáltuk, majd foszfátpufferelt sóoldatban (PBS) oldott 0,1% Triton-X-100 detergenssel permeabilizáltuk. PBS-sel történő mosás és PBS-ben oldott 1%-os marha szérum albuminnal történő blokkolást követően a sejteket TRPV3 specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át. Fluoreszcens jelölésként a sejteket ezt követően fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk, majd magfestésként 4',6-diamidino-2-fenilindolt alkalmaztunk. A TRPV3 expresszióját Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Negatív kontrollként az elsődleges antitest kihagyásával megfestett fedőlemezeinket használtuk. Az immunfluoreszcens jelöléseket *Dr. Szántó Magdolna* végezte.

A TRPV3 expresszió kimutatása faggyúmirigyekben (immunhisztokémia)

A faggyúmirigyek TRPV3 expresszióját formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákban mutattuk ki, melyek a Kenézy Gyula Egyetemi Kórházban (Debrecen) trichilemmális (piláris) cisztával diagnosztizált betegek, faggyúmirigyben gazdag bőrterületeiről származtak. A blokkolás után a szöveti metszeteket specifikus TRPV3 elleni elsődleges antitesttel inkubáltuk. A csatorna expresszióját HRP-konjugált EnVision+ rendszerrel detektáltuk, majd a TRPV3 jelenlétét 3,3'-

diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá. A sejtmagokat hematoxilin segítségével jelöltük, végezetül pedig megfelelő fedőmédiummal fedtük le a metszeteket. Negatív kontrollként az elsődleges antitest elhagyásával jelölt metszeteinket alkalmaztuk, míg szöveti pozitív kontrollként az epidermisz szolgált a metszeteken. A TRPV3 expresszióját a korábban már említett Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon) segítségével áteső fényben vizsgáltuk. Az immunhisztokémiai jelöléseket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona* végezte.

RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)

A sejteket 500 µl Trizolate reagenssel vagy TRIzol reagenssel arattuk. A mintáink RNS tartalmának meghatározására NanoDrop-1000 spektrofotométert használtunk. A minták RNS tartalmának cDNS-sé történő átírására az Ambion™ reverz transzkripció kitjeit használtunk. A Q-PCR reakciókat TaqMan assay-kkel és Gene expression Master Mix-szel végeztük. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a ciklofillin A (PPIA) és a 18S riboszomális RNS (RNS45S) génexpresszióját használtuk fel. A Q-PCR reakciókat 384 well PCR plate-eken LightCycler® 480 készülékben végeztük. Minden reakciót három technikai ismétléssel végeztünk. Az egyes gének relatív expresszióját a Δ CT módszert alkalmazva a belső kontroll génexpressziójának értékeire normalizálva átlag \pm SD formában adtuk meg. A méréseket *Dr. Szántó Magdolna* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Western blot

A sejteket lízispufferben arattuk, amely proteáz inhibitor koktélt és PhosSTOP reagenst tartalmazott. A proteinkoncentráció meghatározása BCA protein assay kit segítségével történt. A mintákat ezután nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá. A 10 %-os Mini Protean TGX géleket sávonként azonos (15 µg vagy 30 µg) mennyiségű fehérjével töltöttük

meg. A membránokat kísérlet céljától függően humán TRPV3, p-IkBa, illetve p-p38 MAPK specifikus primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal (HRP) konjugált, kecskében termeltetett ellenanyagot használtunk. Az immunreaktív sávokat kemilumineszcens SuperSignal™ West Pico PLUS, valamint Femto PLUS Chemiluminescent Substrate kit segítségével vizualizáltuk KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülékben. Az egyenlő mintafelvétel ellenőrzésére „loading” kontrollként minden esetben a fentiek szerint eljárva a β -tubulin szintjét vizsgáltuk meg. A jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését az *ImageJ 1.52a* szoftver segítségével végeztük. A western blot kísérleteket *Dr. Szántó Magdolna, Ádám Dorottya, Arany József és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Az intracelluláris lipidtartalom kvantitatív meghatározása (Nile Red jelölés)

Az SZ95 szebocitákat „black well, clear bottom” 96 lyukú lemezekre szélesztettük, majd Nile Red oldattal (1 μ g/ml) inkubáltuk őket. Fél óra elteltével FlexStation 3 multimode plate reader segítségével 485 nm-es gerjesztési 565 nm-es detektálási hullámhosszon, „well scan” módban, wellenként kilenc ponton vizsgáltuk meg a fluoreszcencia intenzitását, mely a neutrális (faggyú-) lipidek mennyiségével volt arányos. A Nile Red jelöléseket *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

A sejtek felülúszójának eltávolítása után 0,5 mg/ml végkoncentrációjú, PBS-ben oldott MTT oldatot mértünk a sejtekhez. Ezzel az oldattal 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk a sejteket, majd az oldat eltávolítását követően a kristályokat feloldottuk, az abszorbanciát 565 nm-en a már említett FlexStation 3 készülékkel mértük le. A FX hatásainak vizsgálatokor a kiértékelés némileg különbözött. Ezen kísérletek során a plate-ek üres welljeiben is mértünk abszorbanciát, és ezen wellék értékeinek átlagát háttérnek tekintve rendre kivontuk az összes többi well

esetén mért abszorbancia értékekből. Ezután a háttérrel korrigált értékeket az oldószerrel kezelt kontrollra normáltuk, és a GraphPad Prism 9.3.1 (471) szoftver „non-linear curve fitting” funkciója segítségével a kapott értékekre görbét illesztettünk. A sejtek életképességének vizsgálatát *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A sejtszám vizsgálata (CyQUANT-assay)

Az epidermális keratinocitákat „black well, clear bottom” 96 lyukú lemezekre szélesztettük 5.000 sejt/well sejtszámmal, majd elvégeztük a kezeléseket. A gyártó protokollját követve a fluoreszcencia intenzitását FlexStation 3 készülék segítségével 480 nm-es gerjesztési és 520 nm-es detektálási hullámhosszt alkalmazva, „well scan” módban, wellenként kilenc ponton mértük le. A CyQUANT-assay-t *Arany József, Ádám Dorottya és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -mérés

A szebocitákat fekete falú, átlátszó aljú, 96 well lemezekre szélesztettük, a méréseket pedig Hank oldatban végeztük. Azokban az esetekben, amikor a kezelőanyagok hatásait nominálisan Ca^{2+} -mentes Hank oldatban vizsgáltuk, a Hank oldatba a $CaCl_2$ helyett ekvimoláris mennyiségű extra glükóz került. A mérést a FlexStation 3 készülék segítségével „FLEX mode”-ban végeztük 37 °C-on. A fluoreszcencia intenzitását folyamatosan követtük nyomon, 490 nm-es gerjesztési és 520 nm-es detektálási hullámhosszokat alkalmazva. A Fluo-4 AM-alapú fluoreszcens Ca^{2+} -méréseket *Dr. Szántó Magdolna, Dr. Oláh Attila és Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció)

Az siRNS transzfekcióra Opti-MEM[®] médiumban Lipofectamine RNA_iMax reagens segítségével került sor. Kontrollként „Stealth RNA_i Negative Control Med GC” duplaszálú RNS konstruktot („scrambled RNA construct” [SCR])

alkalmaztunk. A csendesítés hatékonyságát western blot és Q-PCR segítségével ellenőriztük. A szelektív géncsendesítést *Dr. Szántó Magdolna* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Citokin array

A sejtek felülúszóját „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit” segítségével vizsgáltuk meg a gyártó protokollja szerint. A jelek szemikvantitatív denzitometriai elemzését *ImageJ 1.52a* szoftverrel végeztük. Az eredmények kiértékelésekor az egyes membránokon található negatív kontrollok átlagát háttérjelintenzitásnak tekintettük, és kivontuk a nyers értékekből. Ezután az egyes molekulák két-két technikai ismétlésének átlagait a kontroll tenyészet esetén kapott adatokkal normalizáltuk, és a p(I:C)-kezelés hatására bekövetkező $\geq 1,5$ -szeres változást tekintettük releváns hatásnak. A kísérletet *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A citokinek felszabadulásának vizsgálata (ELISA)

Az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 és TNF- α citokinek történő felszabadulásának vizsgálatát OptEIA™ Set Human ELISA kitek segítségével a gyártó által ajánlott protokollt követve *Dr. Szántó Magdolna* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

Az endotelin-felszabadulás vizsgálata (pán-endotelin ELISA)

A felülúszók endotelintartalmát „Endothelin Pan Specific DuoSet ELISA” kit segítségével határoztuk meg, a gyártó által ajánlott protokollt követve. A kísérleteket *Dr. Oláh Attila*, *Ádám Dorottya* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

A szebociták differenciációjának vizsgálata áramlási citometria segítségével

Az SZ95 szebocitákat Nile Red oldattal jelöltük. Ezt követően a sejteket learattuk, és áramlási citometriai vizsgálatnak vetettük alá őket, 488 nm

gerjesztőlézert alkalmazva. A mérés során a Nile Red fluoreszcens jelét és a granuláltsággal korreláló oldalra szórást (side scatter) egyidejűleg detektáltuk, a kapott adatokat pedig *FlowJo* szoftver segítségével értékeltük ki. A kísérletet és az eredmények elemzését *Volascsekné Tóth Kinga Fanni, Péntes Zsófia* és *Dr. Szöllősi Attila Gábor* végezte.

MitoSOX Red jelölés

A sejteket elsőként 5 μ M MitoSOX Red szuperoxid indikátorral töltöttük, melyet szérumentes, előmelegített médiumban oldottunk. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk a keratinociták tenyésztése során alkalmazott médiummal (DMEM), majd a jelzett módon kezeltük őket. A 30 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően a fluoreszcenciát 510 nm-es gerjesztési és 580 nm-es emissziós hullámhosszon mértük a FlexStation 3 készülék segítségével „well scan” üzemmódban. A háttérjel (ugyanazon a lemezen lévő fel nem töltött sejteken mért jel) kivonását követően e mérések átlagát egy adatpontként ábrázoltuk relatív fluoreszcencia egységben. A kísérletet és az eredmények kiértékelését *Dr. Oláh Attila* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

RNA-Seq módszer

A HaCaT keratinocitákat a megfelelő kezeléseket követően 24 óra elteltével gyűjtöttük. Az mRNS-szekvenálást Illumina szekvenáló platformon végeztünk. A könyvtárkészítési folyamat során olyan mintákat használtunk fel, amelyek RNS integritási száma (RIN értéke) >7 volt. A nyers szekvenálási adatokat (fastq) a HISAT2 algoritmus segítségével a GRCh38 humán referencia genom verziójához igazítottuk, és BAM fájlokat készítettünk. A további elemzést a StrandNGS szoftverrel végeztük (www.strand-ngs.com). A BAM-fájlokat a DESeq szoftverbe importáltuk, a normalizáláshoz a DESeq algoritmust használtuk. Moderált T-tesztet használtunk a kezeléseket során differenciálisan expresszázó gének meghatározására. A jelátviteli útvonalak elemzését a g:Profiler (verzió: e109_eg56_p17_1d3191d) segítségével végeztük a honlapon megadott protokollt

követve az „Ordered query” funkciót, és a „GO:molekuláris funkció” adatbázisát használva. Az RNA-Seq-elemzés nyers adatai az NCBI SRA adatbázisában érhetők el (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1022043>).

Az RNS mintákat *Tóth Kinga Fanni* készítette elő. A szekvenálást *Dr. Póliska Szilárd* végezte. Az adatok kiértékelését *Dr. Póliska Szilárd*, *Dr. Oláh Attila* és *Volascsekné Tóth Kinga Fanni* végezte.

BioMAP® Diversity PLUS® profil analízis

A BioMAP® Diversity PLUS® panel a vizsgálni kívánt anyagok biológiaiaktivitás-profiljának a feltérképezésére szolgál. A vizsgálat során az adott anyag több koncentrációjának hatásait vizsgálják meg 12, az emberi szervezet különböző szervrendszereit reprezentáló, primer sejtekből összeállított modellrendszerben. Az egyes modellrendszerekben előre meghatározott, standard kísérletes végpontokra gyakorolt hatások összessége megadja az adott anyag különböző koncentrációira jellemző aktivitásprofil, amit a kísérlet végeztével összevetnek a cég adatbázisában található anyagok aktivitásprofiljaival, majd (megfelelő matematikai elemzés segítségével) megállapítják a hasonlóság mértékét. A BioMAP technológiát a US10018621B2, US9734282B2, US8697387B2, US8467970B2, US8019551B2, US7912651B2, US7908089B2, US7266458B2, US6763307B2 és US6656695B2 szabadalmak védik. A kísérleteket és az elemzést *Dr. Jennifer I. Drake* és *Dr. Alison O'Mahony* végezte.

Molekuláris dokkolás (molekulamodellezés)

A GDC0941-PI3K komplex kristályszerkezetét (PDB ID: 3DBS) kollaborációs partnerünk a Protein Data Bank adatbázisból szerezte be. Az analízis a PyMOL 1.7.5.0 az AutoDockTools (ADT) és az MGLTools 1.5.7191 szoftverek segítségével történt. A FX 3D struktúrafájlja a National Biotechnology Information Center PubChem Compound adatbázisából származott, és minden szimulációra egy ASUS GL502V munkaállomáson került sor. A szimulációkat *Dr. Yesid A. Ramirez* végezte.

PI3K aktivitás assay

A PI3K aktivitás mérését a PI3K-Glo™ Class I Profiling Kit segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A lumineszcenciát FlexStation 3 multimode reader segítségével határoztuk meg, míg néhány előkísérlet esetében a mérés az Envision® 2105 Multimode Plate Reader segítségével történt. A háttér értékkel történő korrekciót követően az eredményeket a 100%-nak tekintett oldószer kontroll százalékában fejeztük ki. A kiugró értékeket a ROUT módszerrel azonosítottuk. A kísérleteket és az elemzést *Arany József, Dr. Szöllősi Attila Gábor és Dr. Oláh Attila* végezte.

Statisztikai analízis

Az adatokat a szebocitákon végzett kísérletek esetén IBM SPSS Statistics 23.0, valamint OriginPro 9, míg a FX hatásainak vizsgálatokor GraphPad Prism 9.3.1 segítségével elemeztük és ábráztuk. A TRPV3 szebocitákon történő vizsgálatokor kétoldalú, párosítatlan t-tesztet (páros összehasonlítás), valamint egyutas ANOVA-t, majd pedig Dunnett (egy kontrollcsoporttal történő összevetés), illetve Bonferroni (többszörös összehasonlítás) *post hoc* tesztet végeztünk. A FX keratinocitákon kifejtett biológiai hatásainak vizsgálata során az adatok eloszlását Anderson-Darling vagy Shapiro-Wilk tesztekkel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén kétoldalú, párosítatlan t-tesztet (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t, majd Šidák-féle *post hoc* tesztet végeztünk (többszörös összehasonlítások) alkalmaztuk, míg nem normál eloszlás esetén kétoldalú Mann-Whitney tesztet (páros összehasonlítások), illetve Kruskal-Wallis-tesztet, majd Dunn-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) végeztünk. Minden esetben a $P < 0,05$ értékeket tekintettünk szignifikáns különbségnek. A statisztikai analízist és az ábrák elkészítését *Volascsekné Tóth Kinga Fanni, Dr. Szántó Magdolna, Dr. Tóth István Balázs és Dr. Oláh Attila* végezte.

Eredmények

A TRPV3 jelen van humán faggyúmirigyeken

Elsőként immunhisztokémiai analízis segítségével kimutattuk, hogy a TRPV3 nemcsak az epidermiszben, hanem a faggyúmirigyekben is kifejeződik. Eredményeink szerint ráadásul a perifériásan elhelyezkedő, differenciálatlan sejtek erősebb immunpozitivitást mutattak, mint a centrálisan elhelyezkedő, differenciáltabb sejtek, ami arra engedett következtetni, hogy a TRPV3 szerepet játszhat a sebociták érési folyamatainak szabályozásában.

A TRPV3 a faggyúmirigyeken tapasztalható hasonló kifejeződési mintázatot mutat humán SZ95 sebocitákon

Tekintettel arra, hogy a korábban említettek szerint a humán faggyúmirigyek vizsgálatára nem áll rendelkezésre megfelelő állatmodell, a primer sebociták vizsgálata pedig jelentős objektív nehézségekbe ütközik, kísérleteinket az SZ95 sebocita sejtvonal felhasználásával folytattuk, melyek a humán faggyúmirigysejtek széleskörben használt modelljei. Megállapítottuk, hogy a sebociták mind fehérje, mind mRNS szinten kifejezik a TRPV3-at; az ioncsatorna expressziója ráadásul az immunhisztokémiai festések során nyert eredményekkel összhangban a poszt-konfluens, differenciált tenyészetekben alacsonyabbnak adódott, mint a gyorsan proliferáló pre-konfluens sejt kultúrák esetén.

A TRPV3 aktivációja Ca^{2+} -jelet indukál SZ95 sebocitákon

Az expressziós mintázat leírása után funkcionális méréseket végeztünk a TRPV3 biológiai szerepének feltárására. Amit arról már szó esett, korábbi kutatásaink során azt találtuk, hogy a humán epidermális keratinocitákon a TRPV3 funkcionálisan aktív formában, azaz dominánsan Ca^{2+} -ra permeábilis ioncsatornaként expresszálódik. Így jelen kísérleteink során is arra törekedtünk, hogy megvizsgáljuk a TRPV3 egy szintetikus (2-aminoetoxidifenil-borát [2-

APB]) és egy növényi eredetű (karvakrol) aktivátorának a hatásait humán szebocitákon. A TRPV3 aktivátorok a keratinocitákon tapasztaltakhoz hasonlóan a szebociták esetében is jelentős intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció-emelkedést eredményeztek. A Ca^{2+} -jel ugyanakkor szinte teljesen megszűnt az általános TRP csatorna gátló ruténium vörös jelenlétében, míg a sejteken szintén funkcionálisan expresszálódó és a TRPV3-hoz szerkezetileg hasonló TRPV1 és TRPV4 ioncsatornák szelektív antagonistái (az AMG9810, illetve a HC067047) nem befolyásolták a kialakult Ca^{2+} -jeleket.

Mivel sajnálatos módon kísérleteink idején szelektív TRPV3 aktivátorok és antagonisták kereskedelmi forgalomban nem voltak elérhetőek, ezért a 2-APB és a karvakrol hatásainak TRPV3-specifitását RNS interferencia alapú szelektív „géncsendesítés”-sel is megvizsgáltuk. Amint arról már az „Anyagok és módszerek” fejezetben szó esett, a szebocitákat a TRPV3 mRNS-ét célzó kis interferáló RNS-sel (siRNS) transzfektáltuk, mely azt eredményezte, hogy a csatorna mRNS és fehérje szintű expressziója a transzfekciót követő 2. napra jelentős mértékben csökkent a non-sense RNS-sel („scrambled”; SCR) transzfektált sejtek esetében detektálhatóhoz képest.

Habár a módszer nem volt képes teljesen megszüntetni a TRPV3 kifejeződését, funkcionális méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a „géncsendesített” sejteken szignifikánsan csökkent az agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek amplitúdója és a jelek felszálló szárának meredeksége is. Mindez azt jelenti, hogy a 2-APB és a karvakrol Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatásait humán szebocitákon nagy valószínűséggel döntően a TRPV3 közvetíti.

A TRPV3 agonisták koncentrációfüggő módon csökkentik a szebociták életképességét

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a TRPV3 farmakológiai aktivációja miként befolyásolja a szebociták jellemző biológiai folyamatait. Elsőként a TRPV3 aktivátorok életképességre gyakorolt hatását vizsgáltuk meg.

Eredményeink szerint az aktivátorok magasabb koncentrációban 24 órás kezelések alkalmával csökkentették az élősejt-számot, alacsonyabb, de még egyértelmű Ca^{2+} -jelet indukáló koncentrációkban azonban nem befolyásolták szignifikánsan. Mindezek alapján a következő kísérletekben ezen hatékony, de nem citotoxikus koncentrációk (2-APB: 150 μM ; karvakrol: 500 μM) biológiai hatásait vizsgáltuk tovább.

A TRPV3-mediált Ca^{2+} jelátvitel gátolja a faggyúlipid-termelést

Amint arról a korábbiakban már szó esett, a TRPV3-hoz nagymértékben hasonló TRPV1 és TRPV4 ioncsatornák aktivációja jelentősen csökkenti a különböző lipogén ágensek (pl. arachidonsav [AA]) által indukált faggyúlipid-termelést humán szebocitákon, ezért kíváncsiak voltunk arra is, hogy a TRPV3 hogyan befolyásolja a sejtek lipidszintézisét. Ennek vizsgálatára a 2-APB és a karvakrol fentebb meghatározott nem citotoxikus, de egyértelmű Ca^{2+} -jelet okozó koncentrációit alkalmazva aktiváltuk a TRPV3 csatornát. A kezelések jelentősen csökkentették az AA-val indukált faggyúlipid-szintézist a non-sense RNS-sel transzfektált (scr) sejtek esetén, míg a TRPV3 „gécscsendesített” sejteken szignifikánsan kisebb hatást váltottak ki. Megfigyeltük azt is, hogy az AA kis, de szignifikáns mértékben hatásosabbnak bizonyult a TRPV3 „gécscsendesítését” követően, ami alapján feltételezhető, hogy a csatorna alap aktivitása is negatívan szabályozza az AA-indukált lipogenezist.

Fontos megjegyezni, hogy a TRPV3 agonisták hatása nem korlátozódott az AA-val indukált lipidszintézisre. Az aktivátorok hasonló módon gátolták az AA-étól (PKC δ aktiváció) eltérő mechanizmussal ható endokannabinoid AEA (CB₂ és ERK1/2 MAPK aktiváció) és a linolsav-tesztoszteron kombináció (PPAR aktiváció) lipogén hatásait, emellett pedig valamelyest csökkentették a nem transzfektált szebociták bazális faggyúlipid-termelését is. Mindezek alapján a TRPV3 a faggyúlipid-termelés egy potens negatív regulátora, aktivátorai pedig (a TRPV4 aktivátoraihoz hasonlóan) univerzális liposztatikus hatást váltanak ki.

A TRPV3 agonista karvakrol ruténium vörössel kivédhető módon csökkenti az AA-val indukált lipidszintézist

A fenti eredményekkel összhangban áramlási citometria segítségével megállapítottuk azt is, hogy a karvakrol (bár nem befolyásolta a sejtek granuláltságát sem kontroll körülmények között, sem pedig AA-kezelést követően) szelektíven gátolta az AA által indukált sejten belüli lipidakkumulációt, melyet az általános TRP csatorna gátlószer ruténium vörös képes volt megakadályozni, újfent megerősítve, hogy valóban egy TRPV csatorna (legvalószínűbben a TRPV3) közvetítheti az említett hatást.

A faggyúlipid-szintézist pozitívan szabályozó PPAR γ és NRIP1 mRNS-szintű expressziója karvakrol kezelés hatására csökken

A jelenség molekuláris hátterét kutatva további kísérleteink során megvizsgáltuk a faggyúlipid-termelés fontos pozitív regulátorainak, a peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (PPAR)- γ -nak és a „nuclear receptor interacting protein” (NRIP)-1-nek az mRNS szintű kifejeződését. Kimutattuk, hogy a karvakrol képes mindkét molekula mRNS szintű expresszióját csökkenteni, így feltételezhető, hogy a TRPV3 aktivátorok liposztatikus hatásának kialakulásában a PPAR γ és az NRIP1 down-regulációja is szerepet játszhat.

A karvakrol (részben TRPV3-függő módon) fokozza egyes gyulladási citokinek kifejeződését és felszabadulását

A lipidtermelés mellett a faggyúmirigyek hozzájárulnak a bőr immunfolyamatainak szabályozásához is, a TRPV3 aktivációjáról pedig ismert, hogy epidermális keratinociták esetén jelentős gyulladási válasz kialakulásához vezet, fokozott kifejeződése és kóros aktivitása pedig szerepet játszik az AD-re jellemző bőrgyulladás kialakulásában. A fentieket számításba véve a TRPV3 sebocitákon játszott szerepét feltáró kísérleteink záróakkordjaként megvizsgáltuk a TRPV3 aktiváció SZ95 sebociták immunfenotípusára gyakorolt

hatását is. Eredményeink azt mutatták, hogy a TRPV3 agonista karvakrol (500 μM) 6 órás kezelést követően egyértelműen fokozta számos gyulladáscitokin transzkripcióját, míg – érdekes módon - a 2-APB 150 μM -os koncentrációban alkalmazva hatástalannak bizonyult.

A karvakrol gyulladáscitokin választ indukáló hatása döntően TRPV3-függő módon alakul ki

Annak eldöntésére, hogy a karvakrol gyulladáscitokin választ kiváltó hatása TRPV3 specifikusan alakult-e ki, kísérleteinket TRPV3-csendesített SZ95 szebocitákon is megismételtük. Azt tapasztaltuk, hogy a TRPV3 szelektív „géncsendesítése” az IL-1 β , az IL-6, az IL-8 és a TNF- α esetén jelentősen csökkentette a karvakrol gyulladást indukáló hatását, ami ismét azt támasztotta alá, hogy a TRPV3 részt vesz a karvakrol hatásainak közvetítésében. Érdekes módon ugyanakkor a géncsendesítés nem befolyásolta az IL-1 α karvakrol-indukálta up-regulációját.

A TRPV3 szelektív „géncsendesítése” jelentősen csökkenti több gyulladáscitokin karvakrol-indukálta felszabadulását

Végezetül eredményeink transzlációs relevanciájának növelésére azt is megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a karvakrol a gyulladáscitokin felszabadulását. mRNS szinten nyert eredményeinkkel jó összhangban azt tapasztaltuk, hogy a TRPV3 szelektív „géncsendesítése” ugyan nem befolyásolta az IL-1 α szintjét a sejtek felülűszójában, de jelentősen csökkentette az IL-1 β , az IL-6 és az IL-8 felszabadulását, míg a TNF- α koncentrációja detekciós küszöb alattinak adódott (nem publikált megfigyelés). Mindezek alapján a TRPV3 valóban fontos (de nagy valószínűséggel nem kizárólagos) szerepet játszik a karvakrol gyulladáscitokin választ indukáló hatásának kialakításában.

14 μM -os koncentrációig a FX a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható humán keratinocitákon

A FX hatásait vizsgáló kísérleteink első lépéseként meg szeretnénk volna határozni azt a legmagasabb FX-koncentrációt, amely 24 órás kezelés során nem gyakorol káros hatást a keratinociták életképességére. A keratinocitákat többféle FX-koncentrációval (100 μM -ig) teszteltük. A megfelelő görbeillesztés azt mutatta, hogy a 24 órás kezeléseket során a FX félcitotoxikus koncentrációja $\sim 25,43$ μM volt, míg a legmagasabb koncentráció, amely nem csökkentette a jel intenzitását az oldószer kontroll szintje alá, 14 μM volt.

14 μM -ig a FX nem csökkenti a HaCaT keratinociták sejtszámát a 24 órás kezeléseket során, míg 100 μM -nál citotoxikus hatást fejt ki

Ezt követően, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban citotoxikus hatást vált ki, egy másik módszerrel, az ún. CyQUANT-assay segítségével is megvizsgáltuk a sejtszámra gyakorolt hatást. Ez a vizsgálat megerősítette, hogy 14 μM -ig a FX nem befolyásolta a sejtek számát a 24 órás kezeléseket során az oldószerrel kezelt kontrollcsoportéhoz képest, míg 100 μM -os alkalmazás esetén jelentősen csökkentette azt. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a FX 14 μM -os koncentrációban a citotoxicitás kockázata nélkül alkalmazható a tervezett rövid (3 órás) és középtávú (24 órás) kísérleteinkben.

A FX jelentősen csökkenti több gyulladáscitokin p(I:C) által indukált up-regulációját humán epidermális keratinocitákon

A következőkben a FX feltételezett gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk meg egy általunk korábban optimalizált gyulladáscsökkentő modellrendszerben. A TLR3 aktivátor p(I:C)-t 20 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban alkalmazva megállapítottuk, hogy várakozásainknak megfelelően a p(I:C) a 3 órás kezeléseket során jelentősen megnövelte számos gyulladáscitokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 és IL-8) mRNS-

expresszióját. Ezeket a hatásokat az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 esetén a FX (14 μ M) egyidejű alkalmazása képes volt szignifikánsan csökkenteni, míg az IL-6 esetén a változás nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket ($P=0,1615$).

A FX mérsékeli a p(I:C) gyulladásos mediátorok felszabadulására gyakorolt hatását

Mivel génexpressziós kísérleteink arra engedtek következtetni, hogy a vizsgált FX koncentráció hatékonyan enyhítheti a p(I:C) által kiváltott gyulladásos választ, következő lépésként fehérje szinten folytattuk vizsgálatunkat. Ennek során elsőként citokin array-t végeztünk. Az array eredményei azt mutatták, hogy a 20 μ g/ml p(I:C)-vel végzett 3 órás kezelés 13 molekula felszabadulását növelte, míg 4 molekuláét csökkentette (relevánsnak a $\geq 1,5\times$ -es változást tekintettük), a FX (14 μ M) együttes adagolása pedig valamennyi esetben mérsékelte a változás mértékét. Mindez arra utalt, hogy a FX mRNS-szinten észlelt gyulladásgátló hatása a citokinek/kemokinek felszabadulásának szintjén is megnyilvánulhat.

A FX jelentősen csökkenti a p(I:C) által indukált IL-8 felszabadulást (24 órás kezelések)

Ezen eredményeinket megerősítendő a keratinociták felülűszóját 3 és 24 órás kezeléseket követően tovább vizsgáltuk, hogy nyomon kövessük a már rendelkezésre álló citokin készlet gyulladásos stimulus által kiváltott korai felszabadulását (3 óra), valamint a *de novo* szintetizált citokinek szekrécióját (24 óra). Q-PCR-ral nyert adatainkkal összhangban azt találtuk, hogy bár a FX csökkenteni látszott az IL-6 p(I:C)-indukált felszabadulását, a hatás egyik vizsgált időpontban sem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket, 24 órás kezelések esetén azonban szignifikánsan csökkentette az IL-8 felszabadulását.

A FX immortalizált (HaCaT) és primer humán epidermális keratinocitákon egyaránt kivédi a viszketést közvetítő endotelinek p(I:C) által indukálta felszabadulását

Miután kimutattuk, hogy a FX gyulladásgátló hatást fejthet ki modellrendszerünkben, célunk az volt, hogy tovább vizsgáljuk feltételezett jótékony hatásait. Mint fentebb említettük, a viszketés a bőrgyógyászati állapotok széles skálájának egyik leggyakoribb tünete, és a különböző pruritogének felszabadításán keresztül az epidermális keratinociták fontos szerepet játszanak a kialakulásában. Irodalmi adatok alapján a különféle endotelinek (és különösen is az endotelin-1) kulcsfontosságú keratinocita-eredetű viszketést elősegítő mediátorok. Az endotelin-1 kifejeződése ráadásul az AD-ben szenvedő betegek tüneteket mutató bőrterületének epidermiszében up-regulálódik és plazmaszintje nemcsak a betegség súlyosbodása során volt emelkedett AD-ben, hanem pozitív korrelációt mutatott a tünetek súlyosságával is. Mivel a TLR3-ról nemrégiben kiderült, hogy számos viszketéssel járó bőrbetegségben up-regulálódik, és p(I:C) általi aktiválása nagymértékben fokozta az endotelin-felszabadulást a primer humán epidermális keratinocitákból, azt kívántuk megvizsgálni, hogy a FX miként befolyásolja ezt a folyamatot. Ennek során először pán-endotelin ELISA kit segítségével egy előkísérletben kimutattuk, hogy az endotelinek felszabadulása a primer epidermális keratinocitákhoz hasonlóan HaCaT keratinocitákban is 24 órás, 20 µg/ml p(I:C) kezelés hatására növekedik meg a legnagyobb mértékben. Későbbi kísérleteinkben a 24 órás kezeléseket során 20 µg/ml p(I:C) kezeléseket alkalmaztunk a keratinocitákon. Megállapítottuk, hogy a FX (14 µM) együttes alkalmazása szinte teljesen kivédi a p(I:C)-indukált endotelin-felszabadulást HaCaT keratinocitákon, valamint öt különböző donortól származó primer humán epidermális keratinocitákon egyaránt. Adataink tehát amellettszólnak, hogy a FX nemcsak gyulladáscsökkentő hatással bírhat, hanem

képes lehet bizonyos viszketéstípusok enyhítésére is, hatásai pedig valószínűleg donorfüggetlen módon alakulnak ki.

A FX nem befolyásolja a p38 és az I κ B α p(I:C)-indukált foszforilációját, és a reaktív oxigéngyökök mitokondriális termelésének (mtROS) emelkedését sem akadályozza meg

A TLR3 stimulálása az NF- κ B útvonal aktiválásához vezethet az I κ B α gátló szabályozó foszforilációján (és ezáltal inaktiválásán) keresztül, továbbá a TLR3 a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat is aktiválhatja. Egy korábbi kísérletben összehasonlítottuk a 10, 20, 30 és 60 perces p(I:C)-kezelés (20 μ g/ml) hatásait. Adataink azt mutatták, hogy a p(I:C) 60 perc után indukálta a legerőteljesebben az I κ B α és a p38 foszforilációját (Western blot; nem publikált adatok). Ezért a további kísérleteinkben úgy döntöttünk, hogy 60 perces kezeléseket alkalmazunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a FX (14 μ M) együttes adása nem befolyásolta az I κ B α vagy a p38 p(I:C)-indukált foszforilációját (Western blot), ami arra utal, hogy a gyulladáscsökkentő hatása az NF- κ B vagy a p38 MAPK aktivitással való közvetlen kölcsönhatás nélkül alakulhat ki.

Az NF- κ B és a p38 MAPK útvonalakra gyakorolt hatásai mellett a TLR3 aktiválása a reaktív oxigéngyökök mitokondriális termelését is növelheti (mtROS). Bár a FX együttes alkalmazása csökkenteni látszott a p(I:C) által indukált mtROS termelést (MitoSOX Red jelölés; 30 perces kezelése), a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet ($P=0,142$).

A 14 μ M-ban alkalmazott FX és a PI3K-gátló GDC0941 biológiaiaktivitás-profilja figyelemre méltó hasonlóságot mutat

A fenti három, legvalószínűbb jelpálya részvételének kizárása után a lehető leginkább elfogulatlan vizsgálómódszert keresve kollaborációs partnereink a BioMAP[®] Diversity PLUS[®] panel segítségével 12 különböző humán primer sejt alapú rendszerben előre definiált és optimalizált végpontok segítségével

térképezték fel a FX különböző koncentrációinak aktivitásprofiljait, majd a kapott eredményeket összehasonlították az adatbázisban szereplő más vegyületek hatásaival. Ez az elemzés kimutatta, hogy 14 μM -os koncentrációban alkalmazva a FX-t, annak aktivitási profilja rendkívüli hasonlóságot mutatott a PI3K-út vonal jól ismert inhibitorának, a 370 nM-os koncentrációban alkalmazott, „pictilisib”-ként is ismert GDC0941-nek az aktivitási profiljával.

Figyelemreméltó, hogy bár a FX szelektív szerotonin visszavételezést gátló szerként ismert, amely elsősorban a szerotonin tónus emelésével hat, a szerotonin nem szerepelt a legjobb találatok között (sőt, a 14 μM FX-t a 90 μM -ban alkalmazott szerotoninnal összehasonlítva a Pearson-féle korrelációs együttható mindössze 0,354 volt), ami arra utal, hogy az általunk vizsgált gyulladáscsökkentő koncentrációban a FX nagy valószínűséggel nem a „klasszikus” szerotoninerg jelátvitelen keresztül fejt ki hatását. Ezt az adatok klaszterelemzése is megerősítette, hiszen az analízis során egyértelművé vált, hogy míg a FX alacsonyabb (520 és 1600 nM) koncentrációi a magasabb FX dózisoktól távolabb (és egyszersmind a szerotoninhoz közelebb) klasztereződtek, a magasabb (4,7 és 14 μM) koncentrációi külön klasztert alkottak, amely nagy hasonlóságot mutatott a GDC0941 különböző koncentrációinak hatásaival. Mindezek alapján a 14 μM -ban alkalmazott FX gyulladáscsökkentő és pruritogén mediátorok felszabadulását csökkentő hatása valószínűleg nem a szerotoninerg jelátviteli rendszerben ismert, klasszikus célpontjaira gyakorolt hatásainak köszönhetően, hanem a pro-inflammatorikus PI3K jelátvitel közvetlen vagy közvetett gátlása következtében alakul ki.

Ismert, hogy a PI3K a gyulladáscsökkentő folyamatok egyik fontos irányítója. Egyes adatok alapján a FX *in vivo* gátolhatja a PI3K foszforilációját (és ezáltal aktivációját) diabéteszes patkányokban és egér BV-2 mikroglia sejtekben, míg mások a PI3K aktivitására gyakorolt koncentráció- és időtartamfüggő, közvetett, kétfázisú hatásról számoltak be. Ennek megfelelően az, hogy a FX biológiai

hatásainak közvetítésében a PI3K-kaszkádnak aktivitásának változásai (is) szerepet játszhatnak, nem tekinthető példanélkülinek a szakirodalomban.

A GDC0941 utánozza a FX gyulladáscsökkentő és endotelin felszabadulást gátló hatását

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a FX kedvező hatásait a hámsejtek esetén kiválthatja-e a PI3K gátlása, ezért a biológiaiaktivitás-profil tekintetében legnagyobb hasonlóságot mutató molekula, a GDC0941 legmegfelelőbb koncentrációjának (370 nM) a hatását is megvizsgáltuk a gyulladásos modellünkben. Megállapítottuk, hogy 370 nM-os koncentrációban alkalmazva a GDC0941 szinte tökéletesen utánozza a FX biológiai hatásait humán keratinocitákban. A FX-hez (14 μ M) hasonlóan a GDC0941 is gátolta az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 p(I:C)-indukált fokozott kifejeződését, de (ismét csak a FX-hez hasonlóan) nem volt szignifikáns hatása az IL-6 mRNS-expressziójára. Mindemellett 24 órás kezelések alkalmával hatékonyan csökkentette az IL-6, az IL-8 és az endotelin a p(I:C) által indukált felszabadulását is. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a 14 μ M-ban alkalmazott FX jótékony gyulladáscsökkentő és pruritogén-felszabadulást gátló hatását valóban közvetítheti a PI3K útvonal gátlása humán epidermális keratinocitákon.

Az *in silico* molekuláris dokkolási adatok azt sugallják, hogy a GDC0941 és a FX elfoglalhatják ugyanazt a kötőhelyet a PI3K-on

Mint azt fentebb említettük, számos irodalmi adat utal arra, hogy a FX képes lehet modulálni a PI3K útvonal aktivitását. Legjobb tudomásunk szerint azonban arra vonatkozóan kísérleteinket megelőzően nem volt irodalmi adat, hogy ezt a hatást a FX közvetlenül a PI3K enzimekhez kapcsolódva, vagy közvetetten (azaz más, a PI3K hatásával interferálva) fejtje-e ki. A GDC0941 és a FX aktivitásprofiljai közötti figyelemre méltó hasonlóságok, valamint a GDC0941 humán keratinociták citokin- és endotelin termelésére gyakorolt hatásáról szóló adataink alapján felmerült, hogy a GDC0941-hez hasonlóan esetleg a kellően

magas koncentrációban alkalmazott FX is gátolhatja közvetlenül a PI3K-t. A feltételezett közvetlen kölcsönhatás vizsgálatához elsőként kollaborációs partnerünk *in silico* molekuláris kötődésvizsgálatot végzett, hogy kiderüljön, a FX képes lehet-e a GDC0941-hez hasonlóan a PI3K ATP-kötő helyéhez kötődni.

A megfelelően optimalizált dokkolási protokoll következetesen reprodukálta a GDC0941 kötődés kísérletes úton meghatározott pozícióját, hiszen a legjobbnak ítélt pozíció csak 0,81 Å-mel különbözött a kísérletileg megfigyelt helyzettől. A modellezés során emellett sikerült a kötődést közvetítő kulcsfontosságú hidrogénkötéseket is reprodukálni a GDC0941 és az enzim megfelelő oldalláncai (D841, Y867, V882 és K802) között. A FX lehetséges kötődését vizsgálva az analízis kimutatta, hogy a FX képes lehet a GDC0941-hez nagyon hasonló módon kötődni a PI3K enzim ATP-kötő zsebéhez, és hidrogénkötéseket kialakítani két olyan oldallánccal (D841 és Y867), amelyekhez a GDC0941 is kötődik. A molekulamodellzés tanúsága szerint emellett a FX (trifluor-metil) benzol- és fenil-csoportjai részben kitöltik a W812, I831, I881, F961 és I963 oldallánccok által meghatározott hidrofób részt, amelyet kísérletes eredmények szerint a GDC0941 hidrofób tienopirimidin magja foglal el a kötődés során. Bár a fentiek alapján a FX nagy valószínűséggel valóban képes a GDC0941 kötőhelyét elfoglalni a PI3K enzimen, fontos megjegyezni, hogy a modellezés segítségével meghatározott kötési energiája alacsonyabb volt, mint a GDC0941-é (FX: -8,05 kcal/mol; GDC0941: -10,62 kcal/mol). A különbség nagy valószínűséggel a FX kisebb méretének köszönhető.

A FX kisebb gátlást gyakorol a PI3K aktivitására sejtmentes enzimaktivitást mérő teszt során

A következőkben, megvizsgáltuk, hogy egy sejtmentes vizsgálat során az FX képes-e közvetlenül gátolni a PI3K aktivitását. Bár az FX magas koncentrációja szignifikánsan gátolni tudta a PI3K aktivitását, a megfigyelt gátlás sokkal gyengébb volt, mint a GDC0941 esetében. Adataink tehát amellett szólnak, hogy

bár kellően magas koncentrációban a FX közvetlenül gátolja a PI3K aktivitását, viszont gyulladáscsökkentő hatását valószínűleg a PI3K közvetett befolyásolásán keresztül és nem a PI3K enzim közvetlen gátlása révén alakítja ki a humán keratinocitákban.

A FX jelentősen módosítja a p(I:C) által kialakított génexpressziós mintázatot

Végül, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a FX humán keratinocitákra gyakorolt gyulladáscsökkentő hatásának természetébe, RNS-mintákat gyűjtöttünk 24 órás p(I:C)-vel (20 µg/ml), p(I:C)+FX (14 µM) kombinációval vagy megfelelő oldószerekkel történő kezelést követően. A főkomponens-elemzés kimutatta, hogy a FX együttes alkalmazása a p(I:C)-kezelt kultúrákhoz képest egy különálló klasztert eredményezett, ami arra utal, hogy a FX-nek jelentős hatása lehet a humán keratinociták p(I:C)-indukált transzkripciós válaszára. Ezekkel az eredményekkel tökéletes összhangban a szignifikánsan up-regulált (>1,5-szeres változás; $P < 0,05$; p(I:C) vs. kontroll) géneket felhasználva a g:Profiler toolset segítségével végzett útvonal-elemzés azt mutatta, hogy a várakozásoknak megfelelően a p(I:C)-kezelés a gyulladással kapcsolatos GO:molekuláris funkció kifejezések dúsulásához vezetett (pl. „citokin aktivitás”, „citokin receptor kötődés”, „kemokin aktivitás”, „CXCR kemokin receptor kötődés” vagy „kemokin receptor kötődés”). Fontos, hogy a FX által szignifikánsan (>1,5-szeres változás; $P < 0,05$) down-regulált gének elemzése (p(I:C)+FX vs. p(I:C)) nagyon hasonló eredményeket hozott („CXCR kemokin receptor kötődés”, „kemokin aktivitás” vagy „kemokin receptor kötődés”), ami arra utal, hogy a FX valóban képes lehet enyhíteni a p(I:C) gyulladással kapcsolatos hatásait.

A differenciálisan expresszált gének* elemzése továbbá kimutatta, hogy a FX képes volt megszüntetni számos kulcsfontosságú gyulladással kapcsolatos molekula és

* A differenciálisan expresszált gének listája megtalálható a disszertáció alapjául szolgáló közlemény „Supplementary” adatai között; a listák készítéséhez felhasznált nyers adatok pedig szabadon böngészhetők az NCBI SRA adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1022043>).

potenciális viszketés-mediátor p(I:C)-indukált up-regulációját. A teljesség igénye nélkül, a FX egyidejű alkalmazása csökkentette az IL-6, az IL-8 (CXCL8), a GRO α (más néven CXCL1), a CXCL5 (más néven ENA-78), az interferon alfa indukálható fehérje 6 (IFI6, más néven G1P3), az oszteoprotegerin (TNFRSF11B), továbbá az interleukin-1 receptor 2-es típusának (IL1R2) expresszióját, és up-regulálta az egyes rendszerekben inkább immunszuppresszív CXCL17-et. Összességében ezek az adatok határozottan amellett szólnak, hogy a FX jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki a humán epidermális keratinocitákon.

Diszkusszió

Korábbi vizsgálataink során munkacsoportunk igazolta, hogy a TRPV3 a humán hajnövekedés fontos negatív regulátora, és kimutattuk azt is, hogy a TRPV3 aktivációja gyulladásoz választ vált ki humán epidermális keratinocitákon, míg mások a száraz bőrhöz társuló viszketésben betöltött szerepéről számoltak be. A megfigyelt gyulladásoz tünetek és a lipidbarrier zavara arra utalt, hogy a TRPV3 túlműködés által kiváltott gyulladásoz bőrbetegségek kialakulásában a keratinocitákon kívül más TRPV3-at expresszáló, bőrben található sejtek is részt vehetnek. Ebből kiindulva a disszertáció alapjául szolgáló egyik tanulmányban megvizsgáltuk a TRPV3 kifejeződését és szerepét a bőr professzionális lipidtermelő sejtjein, a sebocitákon.

Az immunhisztokémiai festés kimutatta, hogy az epidermális keratinocitákhoz hasonlóan a humán faggyúmirigyekben is expresszálódik a TRPV3, és a perifériás, differenciálatlan sejtek erősebb immunpozitivitást mutatnak, mint a centrálisan elhelyezkedő terminálisan differenciált sejtek. Kimutattuk azt is, hogy a TRPV3 fehérje és mRNA szinten is jelen van a humán faggyúmirigyből származó SZ95 sebocitákon is. Megfigyeltük továbbá, hogy (immunhisztokémiával nyert eredményeinkkel összhangban) a TRPV3 expressziója csökken a posztkonfluens, differenciáltabb kultúrákban az erősen proliferáló prekonfluens kultúrákhoz képest.

A TRPV3 szerepének funkcionális vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a szintetikus TRPV3-aktivátor 2-APB, valamint a növényi eredetű karvakrol az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció jelentős emelkedését idézte elő humán sebocitákon. A kiváltott Ca^{2+} jelek gyakorlatilag megszűntek az általános TRP-csatorna blokkoló ruténium vörös jelenlétében, de nem befolyásolta őket sem az AMG9810, sem a HC067047, amelyek a sebociták által szintén kifejezett és a TRPV3-mal nagyfokú szerkezeti rokonságot mutató TRPV1, illetve TRPV4 csatornák szelektív antagonistái. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a TRPV3 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán sebocitákban, azonban,

mivel kereskedelmi forgalomban elérhető specifikus TRPV3 aktivátorok és antagonisták nem álltak rendelkezésünkre, úgy döntöttünk, hogy siRNS-transzfecció segítségével vizsgáljuk meg a TRPV3 expresszió csökkentésének hatását. A sebociták transzfecciója a csatorna expressziójának részleges, de jelentős csökkenését eredményezte a „scrambled” RNS-transzfecciót (kontroll) sejtekhez képest, valamint jelentősen csökkentette az agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek amplitúdóját és az emelkedés sebességét. Mindezen eredmények meggyőzően igazolták, hogy az alkalmazott aktivátorok valóban aktiválják a TRPV3-at humán sebocitákon.

A következőkben az aktivátorok biológiai hatásait vettük górcső alá. Megállapítottuk, hogy magasabb koncentrációkban (2-APB: 200 μ M; karvakrol: 1000 μ M) alkalmazva 24 óra alatt jelentősen csökkentették az élő sejtek számát, de alacsonyabb koncentrációik (2-APB: 150 μ M; karvakrol: 500 μ M), amelyek még mindig képesek voltak Ca^{2+} jeleket kiváltani, nem befolyásolták a sebociták életképességét.

Mivel a faggyúlipidek alapvetően hozzájárulnak az epidermális barrierfunkciók működéséhez, a TRPV3-hoz szerkezetileg nagyon hasonló TRPV1 és TRPV4 esetén pedig munkacsoportunk a korábbiakban azt találta, hogy azok a faggyúlipid-termelés potens negatív regulátorai, a következőkben megvizsgáltuk a TRPV3 lipidszintézisre gyakorolt hatását is. A TRPV3 aktiválása a 2-APB és a karvakrol nem citotoxikus koncentrációival jelentősen csökkentette a lipidszintézist az AA által indukált differenciálódás során a kontrollként használt, „scrambled” RNS-transzfecciót sejtek esetén. A TRPV3 agonisták hatása ugyanakkor szignifikánsan csökkent a TRPV3-at célzó siRNS-sel transzfecciót sejtekben. Megfigyeltük azt is, hogy az AA kis, de szignifikáns mértékben hatásosabb lipogénnek bizonyult TRPV3-csendesített sejteken, ami arra enged következtetni, hogy a TRPV3 alap aktivitása szintén negatívan befolyásolja az AA által indukált faggyúlipid-szintézist. Fontos megjegyezni, hogy a TRPV3 agonisták hatása nem korlátozódott az AA által indukált

lipidszintézisre. Az agonisták szintén gátolták az endokannabinoid anandamid, valamint a linolsav és tesztoszteron kombinációjának lipogén hatását, továbbá kissé csökkentették a nem transzfektált szebociták bazális faggyúlipid-szintézisét is. Mindezek alapján a TRPV3-mediált Ca^{2+} -influx (más intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt növelő beavatkozásokhoz hasonlóan) liposztatikus hatásúnak bizonyult humán szebocitákon.

A jelenséget áramlási citometria segítségével tovább vizsgálva érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a karvakrol nem volt hatással a sejtek (általában differenciációval korreláló) granuláltságára, sem kontroll körülmények között, sem pedig AA-kezelést követően, viszont szelektíven gátolta a lipidek AA-indukálta felhalmozódását. Ez utóbbi hatás ráadásul ruténium vörössel kivédhetőnek, azaz TRPV csatorna által mediálnak bizonyult. Végezetül kimutattuk azt is, hogy a karvakrol képes volt a faggyúlipid-termelés két fontos pozitív regulátorának, a $\text{PPAR}\gamma$ -nak és az NRIP1-nek az expresszióját csökkenteni, így feltételezhető, hogy a hatása (legalább részben) ezen szabályozómolekulák down-regulációjához köthető.

A lipidszintézisen túl a faggyúmirigysejtek jelentős szerepet töltenek be a bőr immunológiai folyamatainak szabályozásában is, a TRPV3-ról pedig ismert, hogy hámsejteken jelentősen fokozza a gyulladásos citokinek termelését és felszabadulását. Ebből kiindulva a TRPV3 hatásait feltérképező kísérleteink záróakkordjaként megvizsgáltuk, hogy a TRPV3 aktivációja miként befolyásolja egyes gyulladásos citokinek expresszióját és felszabadulását. Eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy a TRPV3 agonista karvakrol 6 órán belül számos gyulladásos citokin transzkripcióját fokozta szignifikánsan, érdekes módon ugyanakkor az említett időintervallumon belül a 2-ABP hatástalannak bizonyult. A karvakrol TRPV3 specificitásának igazolására az említett kísérletet TRPV3-csendesített SZ95 szebocitákon is elvégeztük, és az aktivátor hatásának jelentős (bár nem teljes) csökkenését tapasztaltuk a kontrollként használt „scrambled” RNS-sel transzfektált sejtekhez képest. Mindezek alapján a TRPV3 aktivációja a

hámsejtek esetén tapasztaltakhoz hasonlóan szebocitákon is gyulladással választhat ki.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a szebociták részt vehetnek a TRPV3 hiperaktivitással összefüggő, bőrszárazsághoz társuló gyulladással járó bőrbetegségek patogenezisében. Adataink alapján a TRPV3 nemcsak a faggyúlipid-szintézis korábban nem ismert, negatív szabályozója, de kifejezett gyulladással járó választ is képes kiváltani a sejteken, így farmakológiai gátlása (elméletileg) jótékony hatású lehet a fenti bőrbetegségek kezelésében.

A disszertáció alapjául szolgáló második cikk középpontjában egy széles körben használt antidepresszáns, a szelektív szerotonin visszavétel gátlók családjába tartozó FX áll. A FX egy biztonságosan alkalmazható szer, melyről ismert, hogy bizonyos modellekben gyulladáscsökkentő, viszketéscsillapító, sebgyógyulást elősegítő és AD-ellenes hatást is képes kifejteni. A fentiek fényében nem meglepő, hogy lehetséges új indikációként számos betegség és kórállapot merült fel az utóbbi időben, a jelen tanulmány keretein belül pedig a feltételezett jótékony hatásainak további vizsgálatát tűztük ki célul humán epidermális keratinociták felhasználásával.

Megállapítottuk, hogy a FX nem citotoxikus koncentrációja (14 μ M) képes volt jelentősen csökkenteni több gyulladással járó citokin (IL-1 α , IL-1 β és IL-8/CXCL8) p(I:C) által kiváltott upregulációját, míg az IL-6 esetén a hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (Q-PCR). A FX mindezek mellett jelentős mértékben csökkentette az IL-8 p(I:C) által indukált felszabadulását (ELISA; 24 órás kezelések), amely a bőr gyulladással járó folyamatainak kulcsfontosságú szabályozója, és amelyet biomarkerként is használnak a terápiás hatékonyság nyomon követésére AD-ben.

A viszketés számos gyulladással járó bőrbetegség, köztük az AD egyik vezető tünete, a „viszketés-vakarózás ciklus”-ról pedig ismert, hogy hozzájárul ezen betegségek patogeneziséhez, ezért következő lépésként vizsgálatainkat a keratinocita eredetű viszketés-mediátor endotelinekre is ki kívántuk terjeszteni.

Az endotelin-1-ről ismert, hogy nemcsak az AD-s betegek lézionális epidermiszében mutat emelkedést, hanem plazmaszintje a tünetek súlyosságával is korrelál. Fontos megjegyezni, hogy az endotelinek felszabadulása (egyebek mellett) a TLR3 jelátvitel által regulált folyamat. A TLR3 aktiválásán keresztül a p(I:C) megnövelte a primer humán epidermális keratinocitákból történő endotelin-1 felszabadulást; a TLR3 expressziója pedig szignifikánsan megnőtt több viszketéssel járó bőrbetegségben (például AD-ben, prurigo nodularisban és pikkelysömörben) a tüneteket mutató terület epidermiszében. Mivel a p(I:C)-kezelés a humán epidermális keratinocitákban a TLR3 expresszióját is fokozta, feltételezhető, hogy a TLR3, valamint a patológiás TLR3-szignálok által kiváltott keratinocita-eredetű endotelin-felszabadulás jelentős mértékben hozzájárulhat a viszketés-vakarózás ciklus kialakulásához.

A fentiek fényében különösen jelentős, hogy eredményeink szerint a FX fent említett jelentős gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μM) képes volt szinte teljesen kivédeni a p(I:C) által indukált endotelin-felszabadulást HaCaT keratinocitákban, valamint primer humán epidermális keratinocitákban egyaránt. Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy megfelelő topikális formulációkban alkalmazva a FX a jövőben egy hatékony gyulladáscsökkentő és viszketést csillapító szer lehet.

Itt fontos megjegyezni, hogy a rendelkezésre álló igen kevés bizonyíték szerint a FX koncentrációja a bőrben kevesebb, mint fele (kb. 41%-a) lehet a plazmakoncentrációnak. Így figyelembe véve a FX szokásos plazmaszintjét ($\sim 0,4\text{-}2 \mu\text{M}$), nagyon valószínűtlennek tűnik, hogy szisztémásan alkalmazva, nem citotoxikus dózisban is elég magas koncentrációt érhetünk el a bőrben. Ezzel szemben a 14 μM -os koncentráció könnyen elérhető lenne a megfelelő topikális formulációk alkalmazásával. Az ilyen korlátozott, lokálisan alkalmazott FX valószínűleg nem vezetne releváns szisztémás FX expozícióhoz és ezáltal szisztémás (mellék)hatásokhoz sem.

Ezután a fent említett jótékony hatások mechanizmusát kívántuk feltárni. Itt érdemes megemlíteni, hogy a FX vizsgálatunk során használt tesztkoncentrációja (14 μ M) jóval magasabb, mint az általa gátolt szerotonin transzporter (SLC6A4) esetében mutatott K_i értéke (3 nM), és – amint arról már szó esett meghaladja a FX-nel kezelt betegek esetében mért szokásos plazmaszintet (~0,4-2 μ M) is. Mindezek, valamint számos irodalmi adat alapján felmerült, hogy a FX keratinocitákra gyakorolt hatásait nem-klasszikus celluláris célpont(ok) közvetítheti(k).

Miután kizártunk három lehetséges gyulladáscsökkentő mechanizmust (azaz a p(I:C)-indukált NF- κ B és p38 MAPK aktiváció gátlása, valamint az mtROS termelés csökkentése, a hatásmechanizmus feltárása érdekében úgy döntöttünk, hogy egy teljesen elfogulatlan megközelítést alkalmazunk. Kollaborációs partnereink a BioMAP[®] Diversity PLUS[®] panel segítségével 12 humán primer sejt-alapú rendszerben vizsgálták meg a FX biológiaiaktivitás-profilját. Azt tapasztaltuk, hogy a FX 14 μ M-os koncentrációban történő alkalmazásakor az aktivitási profilja nagymértékben átfedett a PI3K enzim jól ismert gátlójának, a „pictilisib”-ként is ismert GDC0941-nek (370 nM) az aktivitási profiljával (Pearson-féle korrelációs együttható (r): 0,926). Érdekes módon ezzel szemben a szerotonin nem szerepelt a legjobb találatok között (a Pearson-féle korrelációs együttható (r) mindössze 0,354 volt a 90 μ M-os koncentrációban alkalmazott szerotonin és a 14 μ M-ban adagolt FX között), ami arra utalt, hogy a FX 14 μ M-os koncentrációban megfigyelt hatásai valószínűleg a „klasszikus” szerotoninerg jelátviteltől függetlenül, a gyulladáscsökkentő PI3K útvonal közvetlen vagy közvetett gátlásával alakulnak ki.

E hipotézist megvizsgálandó megismételtük kísérleteinket a fent említett PI3K-inhibitor (GDC0941; 370 nM) felhasználásával is. Megállapítottuk, hogy a GDC0941 szinte tökéletesen utánozta a FX biológiai hatásait, azaz jelentősen csökkentette az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 p(I:C) által indukált up-regulációját, míg az IL-6 expressziójára (a FX-hez hasonlóan) nem volt szignifikáns hatással

(Q-PCR). Ezen túlmenően a GDC0941 hatékonyan csökkentette a p(I:C) által indukált IL-8 és endotelin felszabadulást (ELISA). Érdekes módon a FX-hez képest egy apró különbséget is megfigyeltünk, nevezetesen, a FX-től eltérően a GDC0941 szignifikánsan csökkentette az IL-6 p(I:C)-indukálta felszabadulását (ELISA), míg ez a hatás a FX esetében nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket.

A fent említett minimális eltérés ellenére eredményeink együttesen amellet szólnak, hogy a FX gátolhatja a PI3K útvonalat a humán keratinocitákban. Bár az elképzelés, hogy (bizonyos koncentrációban) a FX képes befolyásolni a PI3K aktivitását nem példa nélküli az irodalomban, kísérleteink idején nem állt rendelkezésre arra nézve irodalmi adat, hogy ez a PI3K közvetlen, közvetett vagy esetleg kombinált (azaz közvetlen és közvetett) gátlásán keresztül valósul meg.

A kérdés eldöntésére elsőként kollaborációs partnerünk *in silico* molekulamodellézés segítségével megállapította, hogy a FX képes lehet ugyanazt a kötőhelyet elfoglalni a PI3K enzimen, mint a GDC0941. A következőkben, ezen adatok birtokában, sejtmentes aktivitás-vizsgálat segítségével megvizsgáltuk, hogy a FX képes-e a PI3K-aktivitás közvetlen gátlására. Az *in silico* adatainkkal tökéletes összhangban a FX kellően magas koncentrációja valóban képes volt szignifikánsan gátolni a PI3K aktivitást; azonban hatása sokkal gyengébbnek mutatkozott a GDC0941-hez képest. Adataink tehát amellet szólnak, hogy bár hatását kiegészítheti a közvetlen enzimgátlás, a FX valószínűleg közvetve gátolja a PI3K-hoz kapcsolt gyulladási jelátviteli útvonalat az epidermális keratinocitákban. Ezzel együtt eredményeink alapján a FX alapvázának megfelelő kémiai módosítása a PI3K ATP-kötőhelyén lévő további reziduumokat megcélozva a PI3K-val szembeni jobb hatásereőséget és hatékonyságot mutató új vegyületeket eredményezhet. Ennélfogva jelenlegi eredményeink jövőbeli intelligens gyógyszertervezési vizsgálatok kiindulópontját is jelenthetik, amelyek a PI3K-zal szemben fokozott hatékonysággal rendelkező új FX-származékok kifejlesztéséhez vezethetnek.

Kísérleteink befejező szakaszában a FX által kiváltott biológiai hatások mélyebb megértésére RNS-Seq vizsgálatot végeztünk. A főkomponens-elemzés, az útvonal analízis, valamint a differenciáltan expresszálódó gének egyedi vizsgálata is azt igazolta, hogy a FX jelentős mértékben befolyásolja a p(I:C) gyulladáscsökkentő hatását a humán keratinociták esetén. A teljesség igénye nélkül elmondhatjuk, hogy a FX csökkentette a neutrofil kemoattraktáns kemokin GRO α (más néven CXCL1) és CXCL5 (más néven ENA-78) p(I:C)-indukált up-regulációját. Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy a GRO α (CXCL1) egyes adatok alapján viszketésmediátorként is működhet, citokin array-vel nyert adataink pedig arra utalnak, hogy a FX nemcsak az expresszióját, hanem a felszabadulását is képes lehet gátolni. Az eddigiek mellett a FX jelentősen csökkentette az IFI6 (G1P3) p(I:C)-indukált up-regulációját is, amelyről megállapították, hogy pikkelysömörös betegek lézionális és nem lézionális bőrében is up-regulálódik. A FX emellett down-regulálta az oszteoprotegerint (TNFRSF11B), amely a RANKL – RANK kapcsolat szabályozásában vesz részt. Mivel az epidermálisan expresszált RANKL-ról kiderült, hogy a regulatórikus T-sejtek számának növelésén keresztül immunszuppresszív hatást vált ki, az oszteoprotegerin (TNFRSF11B) expressziójának csökkentése *in vivo* egy további réteget adhat a FX gyulladáscsökkentő hatásaihoz. Hasonlóképpen, a FX csökkentette az IL-1 α és az IL-1 β receptorának, az IL1R2-nek a p(I:C)-indukált up-regulációját. Mivel az IL1R2 magas szintje feltehetően szerepet játszik az öregedő bőrben a Langerhans-sejtek károsodott migrációjában, expressziójának normalizálása segíthet a fiziológiás bőr-immunfelügyelet helyreállításában.

A fentiekén túl az is figyelemre méltó, hogy míg a p(I:C) down-regulálta a CXCL17-et, a FX együttes alkalmazása jelentősen csökkentette ezt a hatást. A CXCL17-ről nemrégiben megállapították, hogy a pikkelysömör imiquimod-indukált egérmodelljében a mieloid-eredetű szuppresszor-sejtek és regulatórikus T-sejtek toborzásán keresztül mérsékli a bőrgyulladást. Azt természetesen célzott jövőbeli vizsgálatokban kell meghatározni, hogy a FX által indukált CXCL17 up-

reguláció a felszabaduló citokinek szintjén is megnyilvánul-e, valamint hogy ez kizárólag a p(I:C)-indukálta gyulladási válaszra korlátozódik vagy egy általánosabb gyulladáscsökkentő hatás része. Akárhogy is, a CXCL17 FX által indukált felszabadulása és up-regulációja hosszabb (>24 óra) időskálán tovább erősítheti a FX *in vivo* gyulladáscsökkentő hatását.

Összességében az adataink egyértelműen bizonyítják, hogy a FX jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki, és az endogén viszketés-mediátorok, például az endotelinek (és talán mások, pl. a GRO α [CXCL1]) felszabadulásának csökkentése révén alkalmazása jótékony viszketéscsillapító hatáshoz is vezethet, amely hatások valószínűleg a gyulladási PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül valósulnak meg. Figyelembe véve a FX jólismert biztonságosságát, adataink alapján érdemes lenne célzott klinikai vizsgálatokban tisztázni, hogy a fentebb ismertetett kedvező hatások megfelelő lokális, kellően magas bőrkoncentrációt biztosító formulációkban történő alkalmazás során, *in vivo* is érvényesülnek-e gyulladási és viszketéssel kísért bőrbetegségekben.

Összefoglalás

Eredményeink szerint a TRPV3 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki a humán szebocitákon, ahol aktivációja gátolja a sejtek különféle lipogén ágensekkel kiváltott faggyúlipid-termelését és differenciációját, valamint jelentősen fokozza több gyulladáscsökkentő citokin termelését és felszabadulását. Eredményeink alapján a TRPV3 kóros aktivitása szerepet játszhat a különféle bőrszárazsággal járó bőrgyulladások patogenezisében, ami felveti annak lehetőségét, hogy a TRPV3 antagonisták hatékony terápiás eszközök lehetnek ezen betegségek kezelésében.

A fluoxetinnel végzett kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy ez a molekula jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki humán epidermális keratinocitákon, és hatékonyan csökkenti az endogén viszketés-mediátor endotelinek felszabadulását is. A fluoxetin biológiaiaktivitás-profiljának vizsgálata, RNS-Seq analízis, *in silico* kötődésvizsgálat, valamint direkt enzimaktivitás méréseink tanúsága szerint a hatás valószínűleg a gyulladáscsökkentő PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül alakul ki. Figyelembe véve a fluoxetin jólismert biztonságossági profilját, eredményeink alapján felmerül a fluoxetin bőrgyógyászati repozícionálásának lehetősége, de természetesen további klinikai vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy a jelen tanulmányban bemutatott kedvező hatások *in vivo* is érvényesülnek-e megfelelő topikális formulációkban történő alkalmazás esetén gyulladással és viszketéssel kísért bőrgyógyászati kórképekben.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak az értekezés létrejöttéhez akár az emberi és anyagi háttér biztosítása, akár szakmai tanácsaik, segítségük révén.

Mindenekelőtt köszönetet mondok a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának Prof. Dr. Csernoch László professzor úrnak, aki biztosította a PhD munkámhoz szükséges feltételeket. Köszönöm korábbi - Prof. Dr. Bíró Tamás - és jelenlegi - Dr. habil. Oláh Attila - témavezetőmnek a belém vetett bizalmukat, az évek során nyújtott szakmai segítségüket, és azt, hogy szakmai és emberi szempontból fontos példát adtak, és sokat tanulhattam tőlük.

Köszönet illeti a labor és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóit, PhD és TDK hallgatóit, akik ha szükséges volt, mindig önzetlenül siettek a segítségemre. Köztük is különösen közvetlen munkatársaim, Dr. Czifra Gabriella, Dr. Tóth István Balázs, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Szántó Magdolna, Dr. Mihály Johanna, Dr. Béke Gabriella, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Arany József, Dr. Shahrzad Alimohammadi, Dr. Kelemen Balázs, Dr. Lisztes Erika, Fricz Nikolett, Galicz Anita, Hollósi Erika, Szabó-Papp Judit, Kovács Elek Gergő és Barotáné Kovács Mónika segítségéért vagyok rendkívül hálás.

Hálásan köszönöm témavezetőmet, Faragó Petra és Dr. Sárkány Fruzsina munkáját, akik személyében nagyon tehetséges, szorgalmas, a tudomány iránt elkötelezett TDK hallgatókat ismerhettem meg. Mindig nagy örömmel gondolok a közös munkára.

Köszönöm kollaborációs partnereink (Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Prof. Dr. Christoph Abels, Dr. Michael Soeberdt, Dr. Pór Ágnes, Dr. Póliska Szilárd, Dr. Matolay Orsolya és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Végezetül ebben a pár sorban szeretnék mindent megköszönni Szüleimnek, Férjemnek, Testvéremnek Nagymamámnak, Keresztapámnak és Anyósomnak hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig, nagyon hálás vagyok nekik. Külön

szeretném megköszönni Pénzes Zsófiának a még biológia alapképzés alatt született barátságot és a PhD évek alatt nyújtott szakmai és lelki támogatását.

A doktori disszertáció a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 (I-KOM), az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 „Az orvos-, egészségügyi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése”, az NKFIH „K” (120552) és „FK” (125055, 134235) pályázatai, az Emberi Erőforrás Támogatáskezelő Nemzeti Tehetség Program, a Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíja (azonosító: NTP-NFTÖ-18-B-0168), valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának (azonosító: ÚNKP-19-3-I-DE-141) támogatásával készült. A fluoxetin biológiai hatásainak vizsgálatára (a fentiek mellett) ipari kollaborációs partnerünk (Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel; Bielefeld, Németország) támogatásával került sor.

Függelék - Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/527/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Volascsekné Tóth Kinga Fanni
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Arany, J., Ramirez, Y. A., Bíró, T., Drake, J. I., O'Mahony, A., Szöllősi, A. G., Póliska, S., Kilic, A., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-inflammatory effects on human epidermal keratinocytes and suppresses their endothelin release.
Exp. Dermatol. "Accepted by Publisher", 2023.
IF: 3.6 (2022)
2. Szántó, M., Oláh, A., Szöllősi, A. G., **Tóth, K. F.**, Páyer, E., Czakó, N., Pór, Á., Kovács, I., Zouboulis, C. C., Kemény, L. V., Bíró, T., Tóth, I. B.: Activation of TRPV3 inhibits lipogenesis and stimulates production of inflammatory mediators in human sebocytes: a putative contributor to dry skin dermatoses.
J. Invest. Dermatol. 139 (1), 250-253, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.015>
IF: 7.143

További közlemények

3. Ádám, D., Arany, J., **Tóth, K. F.**, Tóth, I. B., Szöllősi, A. G., Oláh, A.: Opioidergic Signaling: a Neglected, Yet Potentially Important Player in Atopic Dermatitis.
Int. J. Mol. Sci. 23 (8), 4140, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084140>
IF: 5.6
4. Angyal, Á., Péntes, Z., Alimohammadi, S., Horváth, D., Takács, L., Vereb, G., Zsebik, B., **Tóth, K. F.**, Lisztes, E., Tóth, I. B., Oláh, A., Szöllősi, A. G.: Anandamide Concentration-Dependently Modulates Toll-Like Receptor 3 Agonism or UVB-Induced Inflammatory Response of Human Corneal Epithelial Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (15), 7776, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157776>
IF: 6.208





5. Markovics, A., Angyal, Á., **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Péntzes, Z., Magi, J., Pór, Á., Kovács, I., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: GPR119 is a potent regulator of human sebocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 140 (10), 1909-1918, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.011>
IF: 8.551
6. Szabó, I. L., Lisztes, E., Béke, G., **Tóth, K. F.**, Paus, R., Oláh, A., Bíró, T.: The phytocannabinoid (-)-cannabidiol (CBD) operates as a complex, differential modulator of human hair growth: anti-inflammatory submicromolar versus hair growth inhibitory micromolar effects.
J. Invest. Dermatol. 140 (2), 484-488, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>
IF: 8.551
7. **Tóth, K. F.**, Ádám, D., Bíró, T., Oláh, A.: Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "c(ut)annabinoid" system.
Molecules. 24 (5), 918, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050918>
IF: 3.267
8. Markovics, A., **Tóth, K. F.**, Sós, K., Magi, J., Gyöngyösi, A., Benyó, Z., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2).
J. Cell. Mol. Med. 23 (9), 6203-6214, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.14505>
IF: 4.486

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 47,406

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 10,743

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.11.29.

